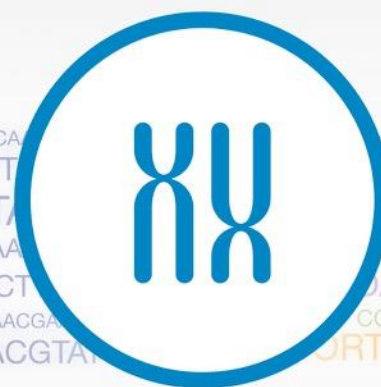


# サンプルシート作成ツール: Illumina Experimental Manager (IEM) の使用方法 — 最新バージョン v1.15.1 のご紹介 —

上利 佳弘

フィールドアプリケーション スーパーバイザー

25-Jul-2018



# Illumina Experiment Manager (IEM) とは？

- ▶ サンプルシートを作成するためのWindows用プログラム
- ▶ 各シーケンサーワークフローに対応したサンプルシートをウィザード形式で作成できる

## －サンプルシートとは

(MiSeq) MiSeq に指示を与えるラン設定ファイル

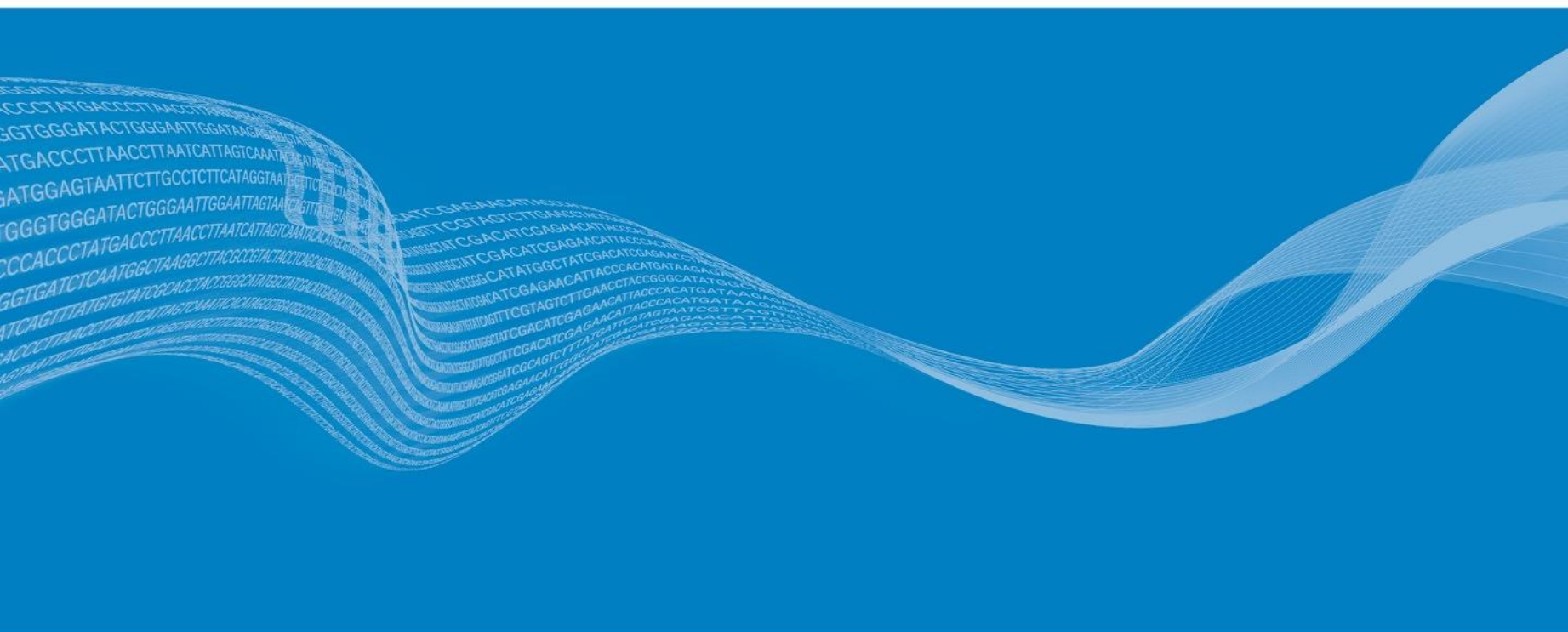
(MiSeq 以外) Linux の bcl2fastq でイルミナシーケンサーの最終出力である bcl を FASTQ へ変換する際に必要となる設定ファイル

# 本日の Outline

- 事前準備
- サンプルシート作成とランセットアップのワークフロー
- Index選択のベストプラクティス

# 事前準備

IEMのダウンロードとインストール



# IEMのダウンロード： イルミナウェブサイトで「サポート」をクリック



※ 2018年7月のウェブサイト

# IEMのダウンロード： "Analysis"をクリック

The screenshot shows the Illumina website interface. At the top, there is a navigation bar with links for SIGN IN, 予算申請書類リクエスト (Request for budget application documents), 論文要旨集リクエスト (Request for paper abstract collection), お問い合わせ (Contact us), and ログイン (Login). Below the navigation bar, there is a main content area with several sections:

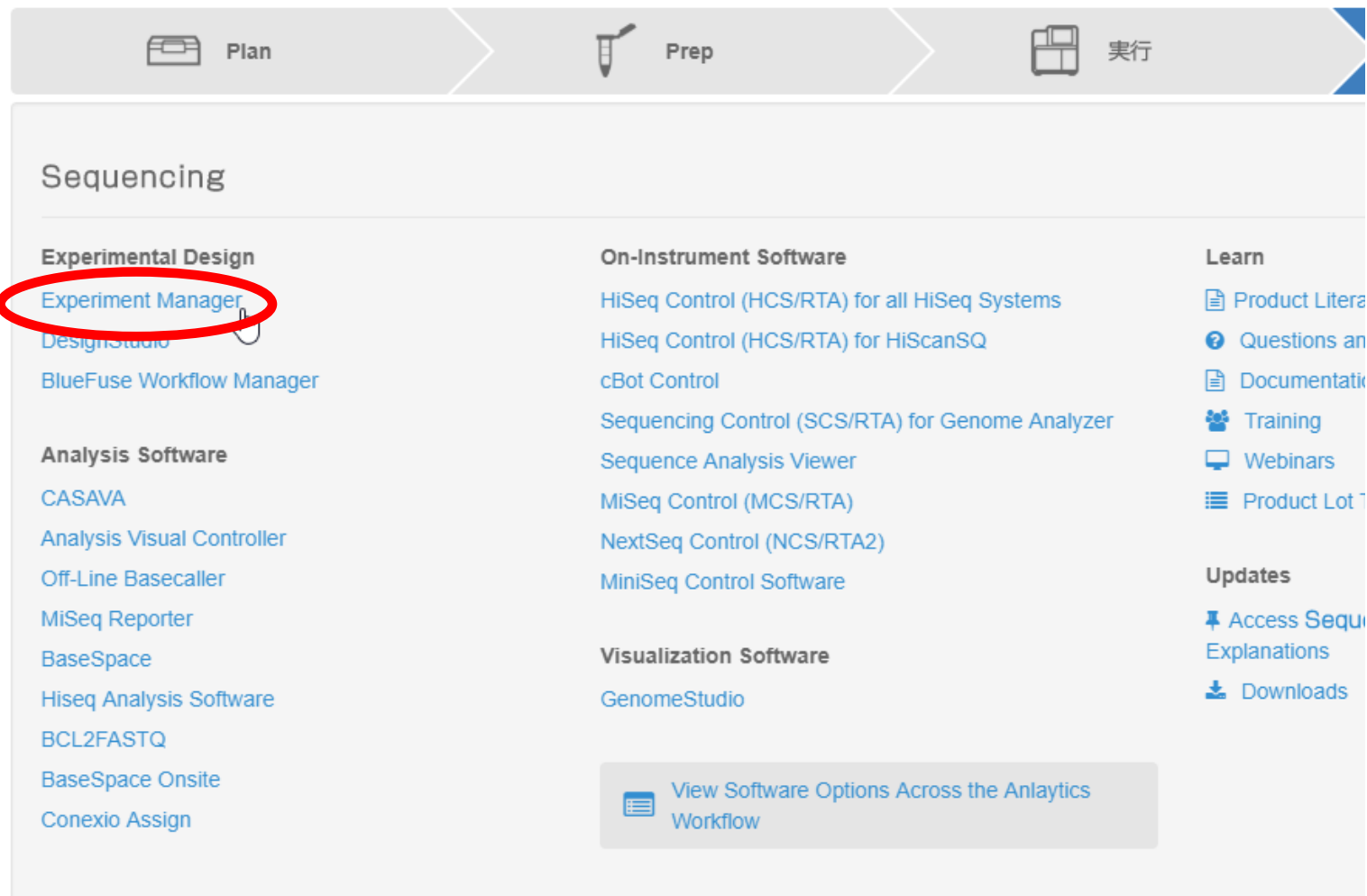
- Support for Your System**: Includes a section for MiSeq with an image of the MiSeq sequencer.
- MiSeq Support Links**: Includes links for MiSeq System Guide, Questions and Answers, Bulletins, and a link to view all MiSeq support.
- Popular Kits for MiSeq**: Lists various sequencing kits like Nextera DNA Flex Kit, Nextera XT DNA Library Prep Kit, AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel, AmpliSeq for Illumina BRCA Panel, and AmpliSeq for Illumina Focus Panel, with a link to view all supported kits.
- Support for Popular Kits**: Includes links for Nextera DNA Library Prep Kit Support, MiSeq Reagent Kit Support, and links to view all sequencing and array kits.
- その他のリソース** (Other resources): Includes links for desktop sharing, support notifications, webinars, safety data sheets, Japanese protocol guides, and technical tips.
- Support for your organization**: Includes links to view all systems in your organization and reorder kits with Quick Order.

Below the main content area, there is a blue banner with the text "お客様のワークフローをサポート" (Support your workflow) and "お役立ちツールおよびヒント" (Helpful tools and hints). Underneath this banner, there is a workflow diagram with steps: Plan > Prep > Run > **Analyze** (highlighted with a red circle and a mouse cursor). To the right of the workflow, there are two promotional cards: "充実したカスタムプロトコールセレクトター" (Comprehensive custom protocol selector) and "ライブラリー調製キットおよびアレイキットセレクトター" (Library preparation kit and array kit selector). A blue button on the right says "すべてのサポートオプションを" (All support options).

At the bottom of the page, there are four small images: a book, a person's face, a person's face, and a person's face.

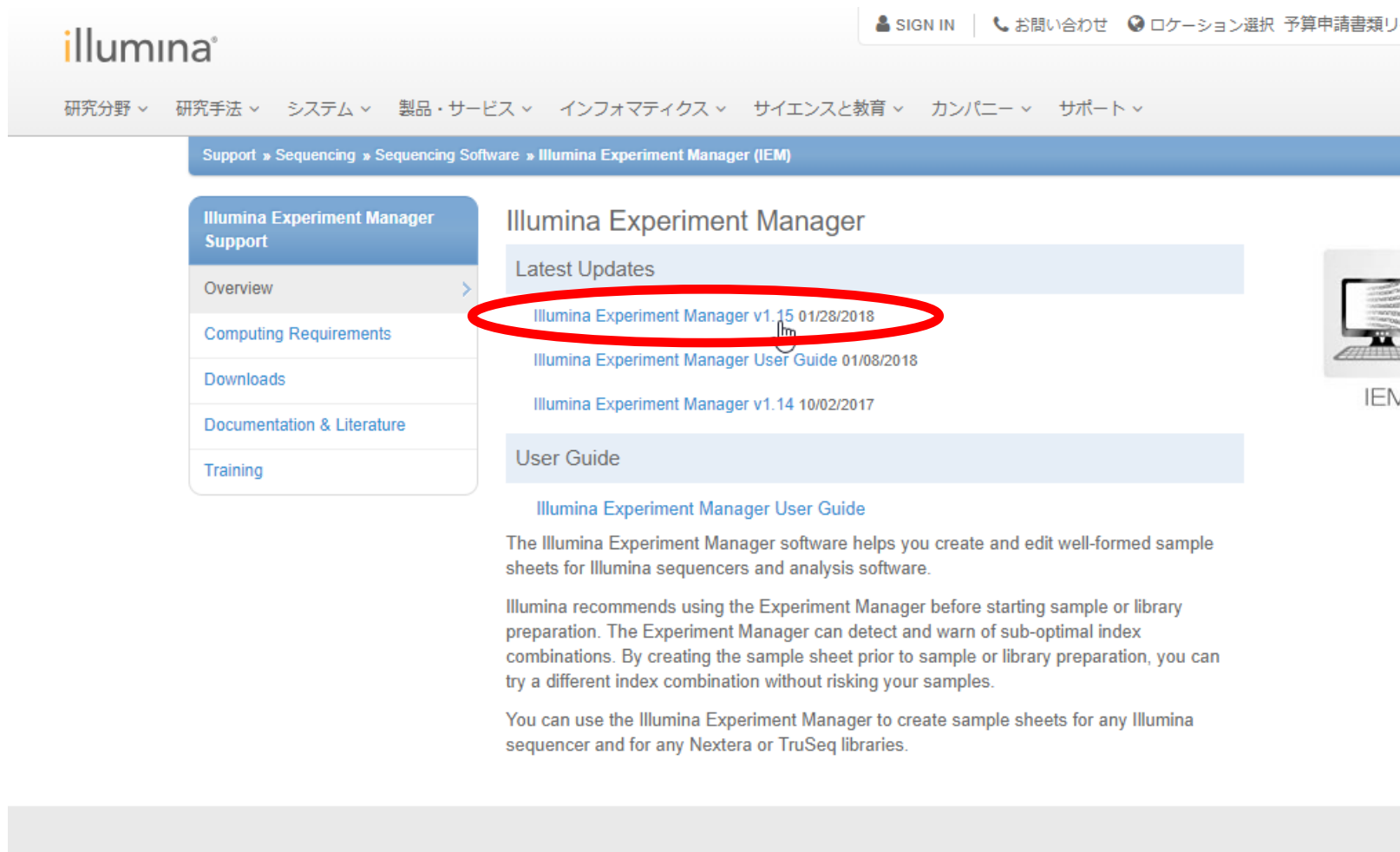
※ 2018年7月のウェブサイト

# IEMのダウンロード: “Experiment Manager”をクリック



※ 2018年7月のウェブサイト

# IEMのダウンロード: "Illumina Experiment Manager v1.15"をクリック



illumina®

SIGN IN | お問い合わせ | ロケーション選択 | 予算申請書類

研究分野 ▾ 研究手法 ▾ システム ▾ 製品・サービス ▾ インフォマティクス ▾ サイエンスと教育 ▾ カンパニー ▾ サポート ▾

Support » Sequencing » Sequencing Software » Illumina Experiment Manager (IEM)

**Illumina Experiment Manager Support**

- Overview >
- Computing Requirements
- Downloads
- Documentation & Literature
- Training

## Illumina Experiment Manager

### Latest Updates

- Illumina Experiment Manager v1.15 01/28/2018**
- Illumina Experiment Manager User Guide 01/08/2018
- Illumina Experiment Manager v1.14 10/02/2017

### User Guide

#### Illumina Experiment Manager User Guide

The Illumina Experiment Manager software helps you create and edit well-formed sample sheets for Illumina sequencers and analysis software.

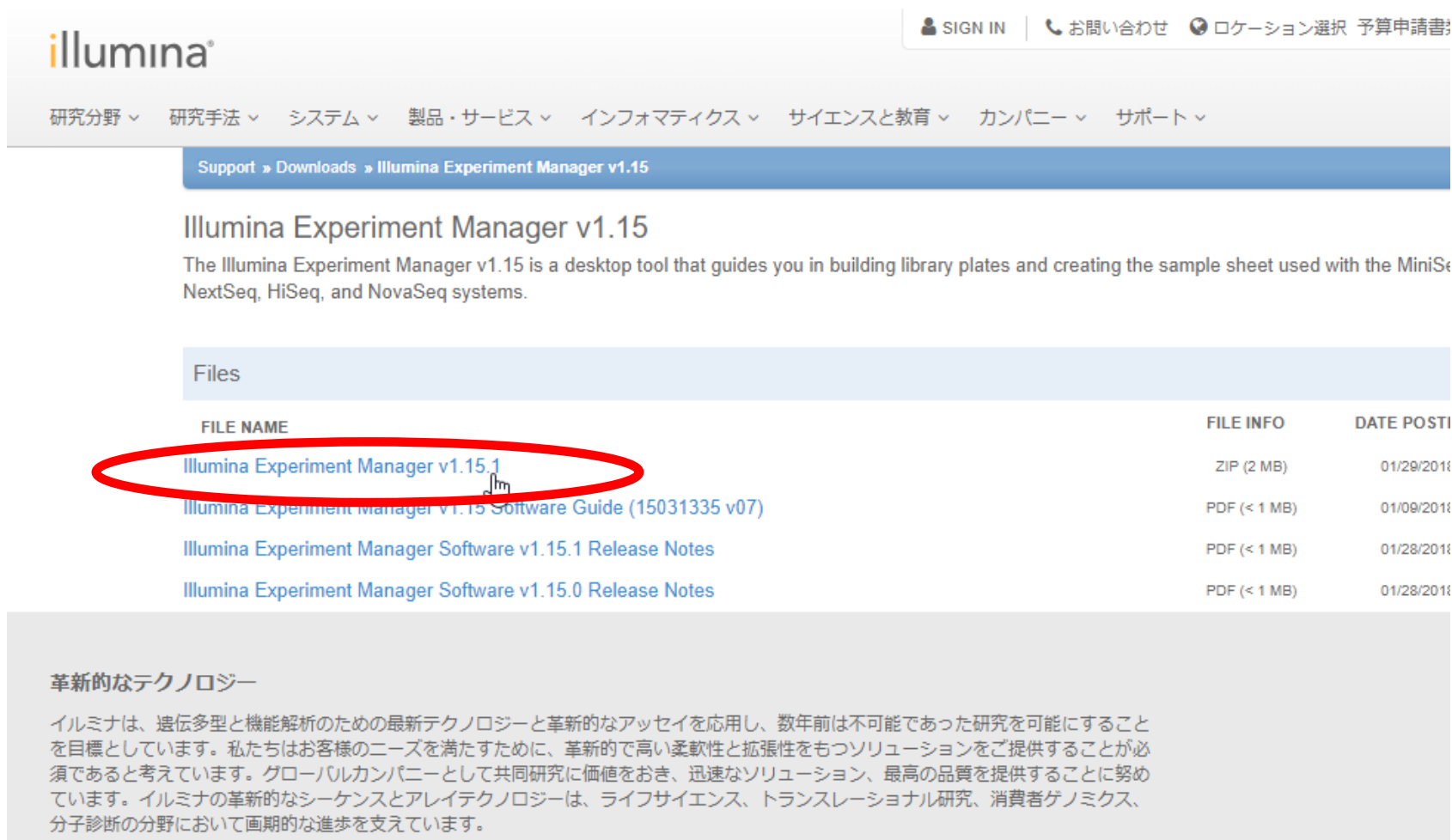
Illumina recommends using the Experiment Manager before starting sample or library preparation. The Experiment Manager can detect and warn of sub-optimal index combinations. By creating the sample sheet prior to sample or library preparation, you can try a different index combination without risking your samples.

You can use the Illumina Experiment Manager to create sample sheets for any Illumina sequencer and for any Nextera or TruSeq libraries.

※ 2018年7月のウェブサイト



# IEMのダウンロード: "Illumina Experiment Manager v1.15.1"をクリック



The screenshot shows the Illumina website's download page for Illumina Experiment Manager v1.15. The page includes a navigation bar with links like 'SIGN IN', 'お問い合わせ', and 'ロケーション選択'. Below the navigation bar, there's a breadcrumb trail: 'Support » Downloads » Illumina Experiment Manager v1.15'. The main heading is 'Illumina Experiment Manager v1.15', followed by a description: 'The Illumina Experiment Manager v1.15 is a desktop tool that guides you in building library plates and creating the sample sheet used with the MiniSeq, NextSeq, HiSeq, and NovaSeq systems.' Below this, there's a table of files for download. The first row, 'Illumina Experiment Manager v1.15.1', is circled in red. The table also lists software guides and release notes for v1.15.1 and v1.15.0.

FILE NAME	FILE INFO	DATE POSTED
<a href="#">Illumina Experiment Manager v1.15.1</a>	ZIP (2 MB)	01/29/2018
<a href="#">Illumina Experiment Manager v1.15 Software Guide (15031335 v07)</a>	PDF (< 1 MB)	01/09/2018
<a href="#">Illumina Experiment Manager Software v1.15.1 Release Notes</a>	PDF (< 1 MB)	01/28/2018
<a href="#">Illumina Experiment Manager Software v1.15.0 Release Notes</a>	PDF (< 1 MB)	01/28/2018

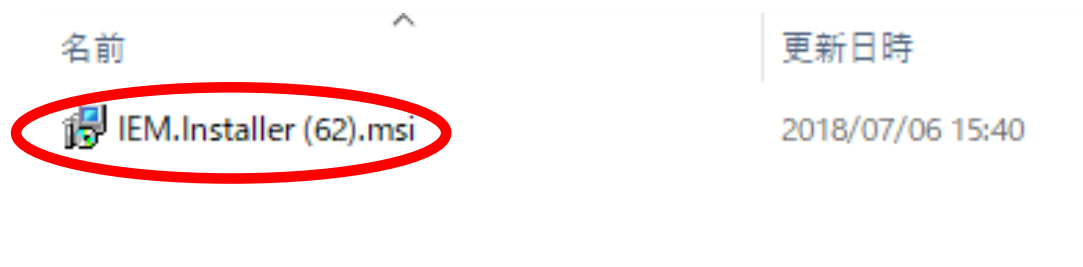
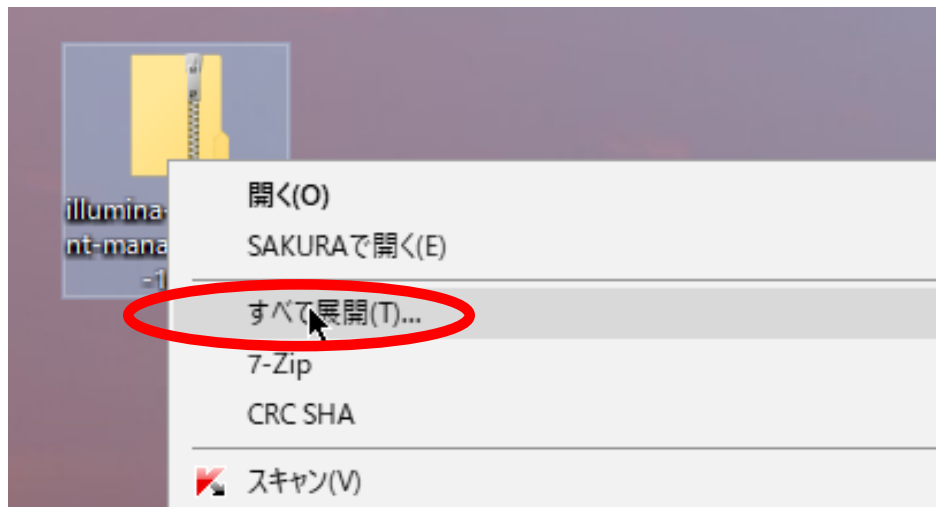
**革新的なテクノロジー**

イルミナは、遺伝多型と機能解析のための最新テクノロジーと革新的なアッセイを応用し、数年前は不可能であった研究を可能にすることを目標としています。私たちはお客様のニーズを満たすために、革新的で高い柔軟性と拡張性をもつソリューションをご提供することが必須であると考えています。グローバルカンパニーとして共同研究に価値をおき、迅速なソリューション、最高の品質を提供することに努めています。イルミナの革新的なシーケンスとアレイテクノロジーは、ライフサイエンス、トランスレーショナル研究、消費者ゲノミクス、分子診断の分野において画期的な進歩を支えています。

※ 2018年7月のウェブサイト

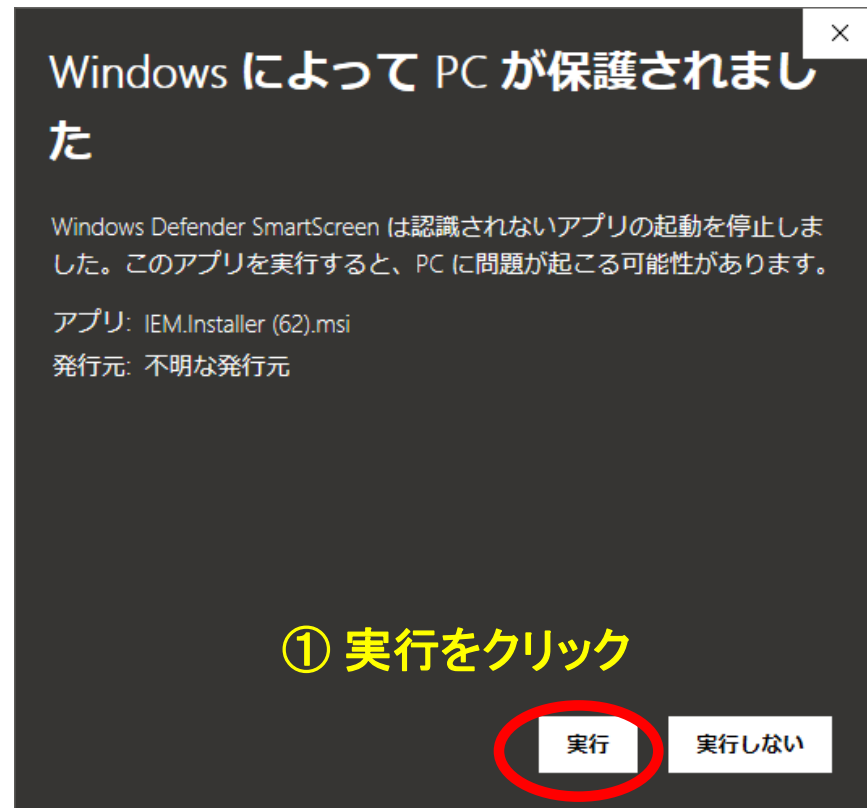
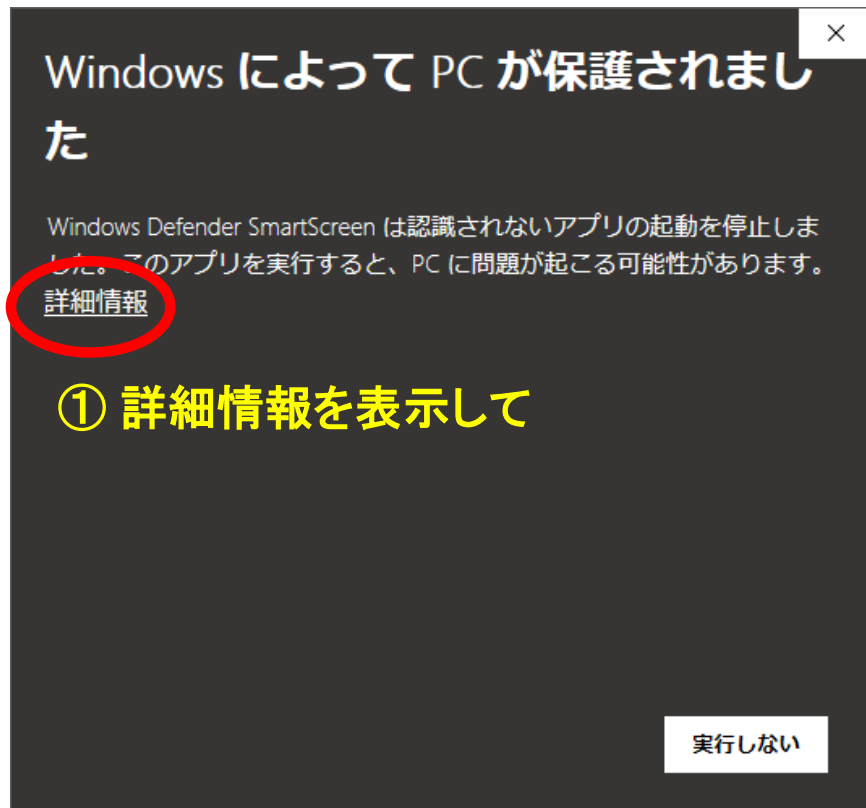
# IEMのインストール:

## ダウンロードしたZipファイルを解凍、 IEM.Installer(62).msiを実行



既にIEMをインストール済みのPCでは、あらかじめ旧バージョンをアンインストールしておく必要があります。

# セキュリティ設定によって、警告が表示される場合



# 事前準備; IEM でサンプルシートを作成する際に

- ライブラリーに関する情報を準備する
  - 使用したライブラリー調製キット
  - 各サンプルのIndexやカスタムプライマー
  - シーケンスするサイクル数やPaired End/Single Readなどの条件
- 標的領域のみをシーケンスするアプリケーションでは、位置情報を示すイルミナ独自のマニフェストファイルが必要になります。（MiSeq用サンプルシートの場合）
- ライブラリー調製前にIEMでサンプルシートを作成して、設定上の問題がないかをチェックしておくことをお勧めします

# マニフェストファイルを指定する際の注意点

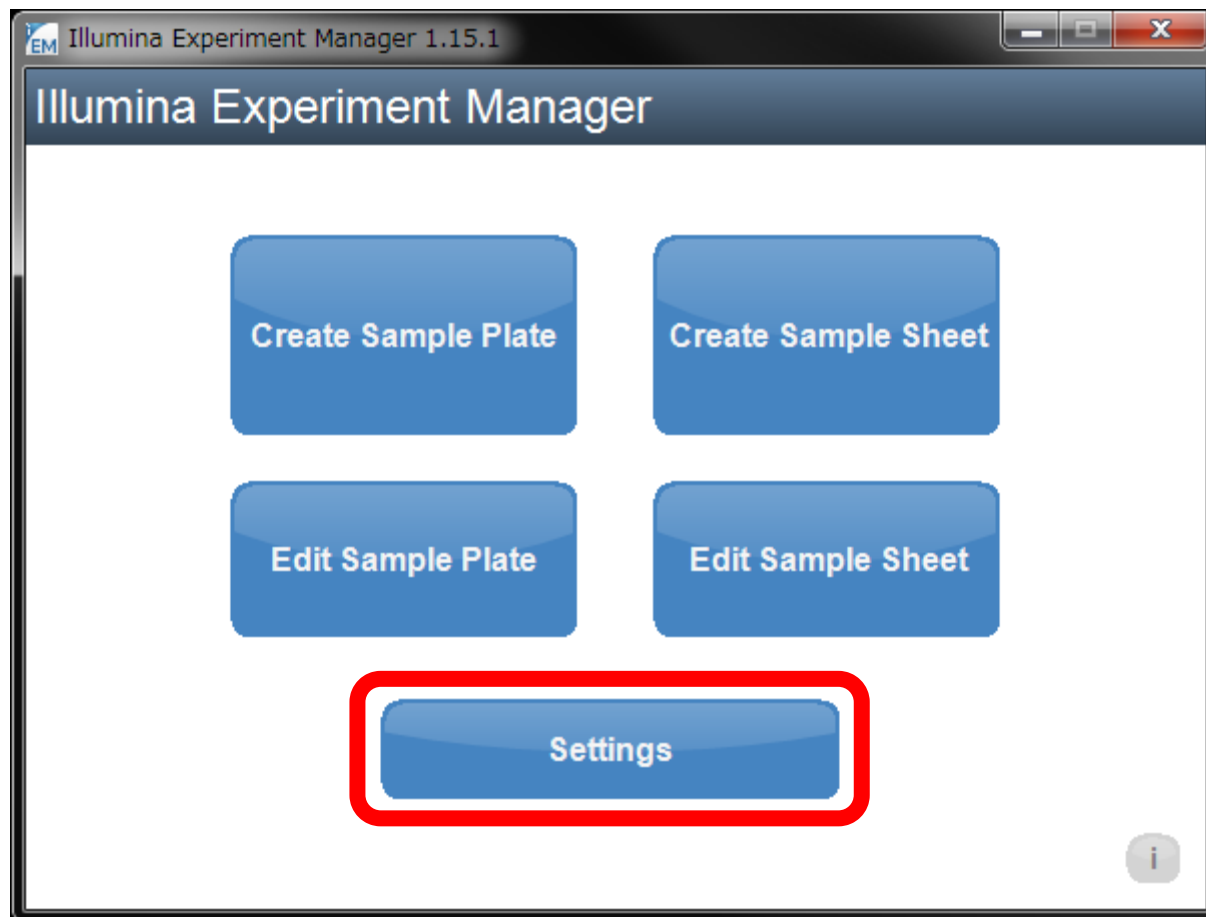
- マニフェストファイルが必要なアプリケーション\*では、サンプルシートはMiSeq本体のIEMで作成することを推奨

\*TruSight Panel製品, TruSeq Amplicon, TruSeq Exome, TruSeq Targeted RNA Expression, TruSeq Bovineなど

マニフェストファイル (TruSeq Ampliconの例)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
1	[Header]													
2	Customer Name	Illumina												
3	Product Type	15025138												
4	Date Manufactured													
5	Lot													
6	DesignStudio ID	TSCA_Control												
7	Target Plexity	341												
8														
9	[Probes]													
10	Target Region Name	Target Region ID	Target ID	Species	Build ID	Chromosome	Start Position	End Position	Submitter	ULSO Sequence	ULSO Genotype	DLSO Sequence	DLSO Genotype	Probe
11	snp_rs10138962	snp_rs10138962	snp_rs101	Homo sap	hg19	chr14	1.05E+08	1.05E+08	+	AAGCCAA	282	TGCGCAC	1200	+
12	snp_rs1149580	snp_rs1149580	snp_rs114	Homo sap	hg19	chr11	76549431	76549489	+	GGATCAA	32	ACTGGGG	68	+
13	snp_rs10988298	snp_rs10988298	snp_rs109	Homo sap	hg19	chr9	1.32E+08	1.32E+08	+	GAGGCTG	1200	ATTGTGC	75	+
14	snp_rs10086550	snp_rs10086550	snp_rs100	Homo sap	hg19	chr8	1.43E+08	1.43E+08	+	GTGTGAC	51	CATAGAG	73	+
15	snp_rs10409978	snp_rs10409978	snp_rs104	Homo sap	hg19	chr19	57796594	57796646	+	TGTCTTAC	50	TTATGGG	115	+

# IEMの起動と、初期設定の確認



# IEMの各ファイルのデフォルト保存先(MiSeq)

Illumina Experiment Manager

## Illumina Experiment Manager Settings

Sample Plate Repository

C:\Users\y\_aga\AppData\Roaming\Illumina Inc\Illumina Experiment Manager\Plates

Sample Sheet Repository

D:\Illumina\MiSeq Control Software\SampleSheets

Manifest Repository

D:\Illumina\MiSeq Control Software\Manifests

Genome Repository

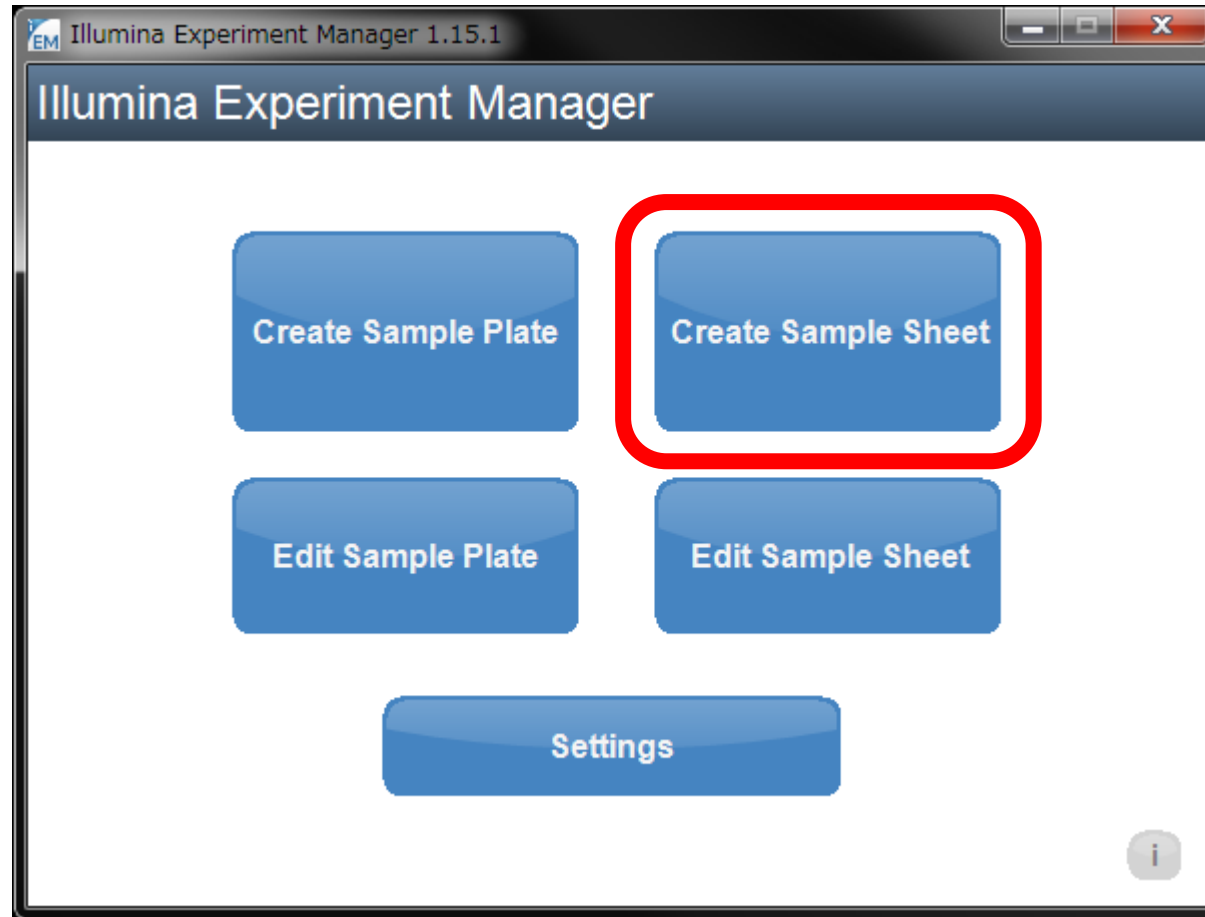
C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes

# サンプルシート作成と ランセットアップのワークフロー

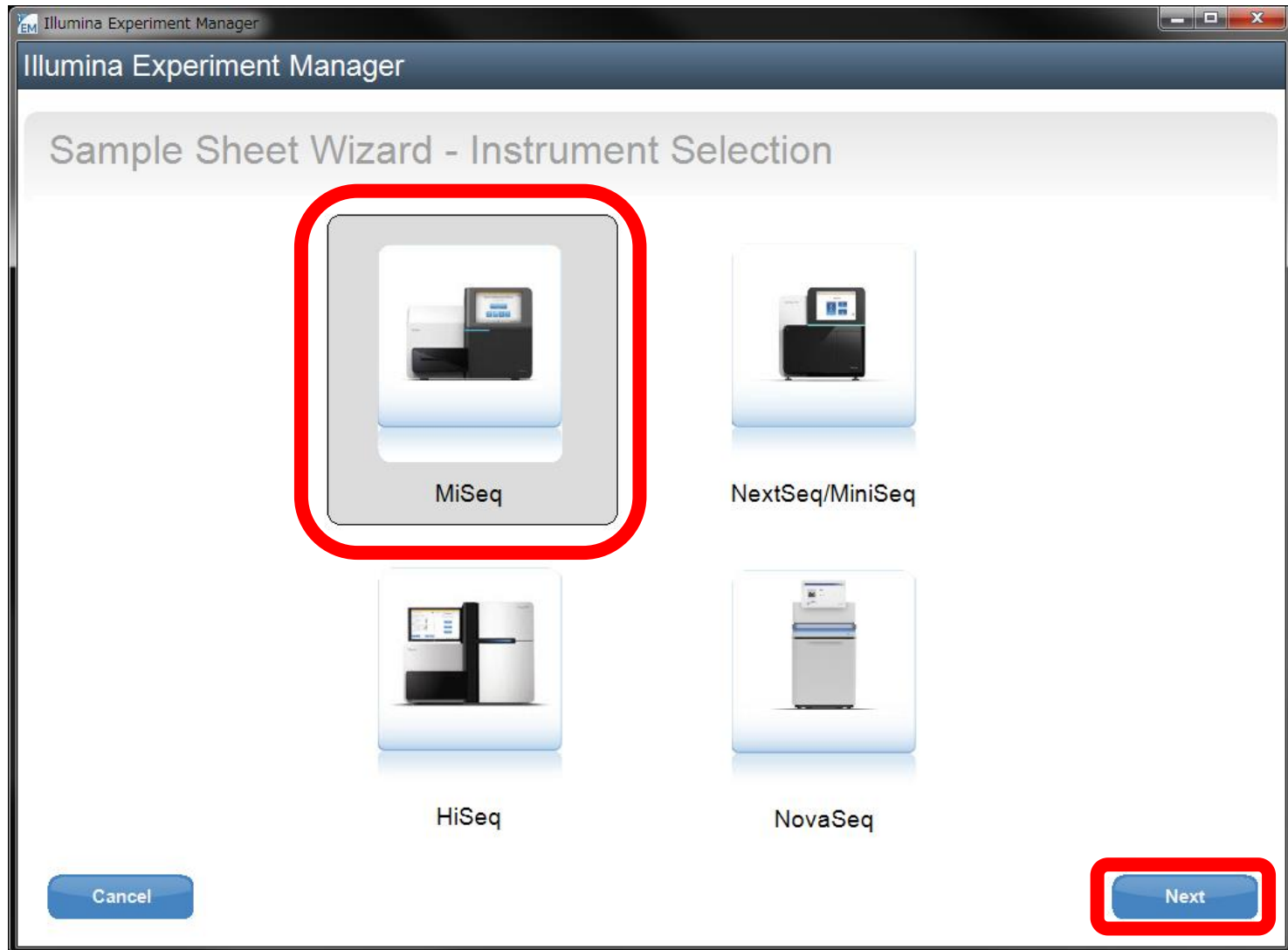




# IEM の起動



# Instrument Selection



# MiSeq Reporterで二次解析する場合の カテゴリーとアプリケーションの選択

EM Illumina Experiment Manager

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - MiSeq Application Selection

## Category の選択

Select Category

 Targeted Resequencing

 Small Genome Sequencing

 RNA Sequencing

 Other

## Application の選択

Select Application

 TruSight Tumor 15

 TruSeq Bovine

 TruSeq Amplicon

 PCR Amplicon

 Metagenomics 16S rRNA

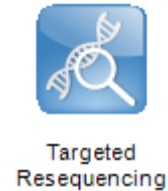
 Enrichment

 Clone Checking

 Amplicon - DS TruSight Tumor 26

Cancel Back Next

# アプリケーション一覧



Targeted Resequencing



Small Genome Sequencing



RNA Sequencing



Other

TruSight Tumor 15

TruSeq Bovine

TruSeq Amplicon

PCR Amplicon

Metagenomics 16S rRNA

Enrichment

Clone Checking\*

Amplicon - DS, TST 26

Resequencing

Plasmids\*

Assembly

Targeted RNA

Small RNA

RNA-Seq\*

TruSight HLA

Library QC

FASTQ Only\*

ChIP-Seq\*

illumina®

# Application の選択; Resequencing の例

EM Illumina Experiment Manager

Illumina Experiment Manager

Sample Sheet Wizard - MiSeq Application Selection

Select Category

Targeted Resequencing

Small Genome Sequencing

RNA Sequencing

Other

Select Application

Resequencing

Plasmids

Assembly

Cancel

Back

Next

# Workflow Parameters の設定

Illumina Experiment Manager

## Sample Sheet Wizard - Workflow Parameters

**Resequencing Run Settings**

Reagent Cartridge Barcode\*

Library Prep Workflow

Index Adapters

Index Reads ☐ 0 (None) ☐ 1 (Single) ☒ 2 (Dual)

Experiment Name

Investigator Name

Description

Date

Read Type ☒ Paired End ☐ Single Read

Cycles Read 1

Cycles Read 2

\* - required field

**Resequencing Workflow-Specific Settings**

☐ Custom Primer for Read 1

☐ Custom Primer for Index

☐ Custom Primer for Read 2

☐ Use Somatic Variant Caller

☒ Flag PCR Duplicates

☐ Reverse Complement

☐ Indel Realignment GATK

Variant Quality Filter

**Run Setting**

**Workflow Specific Setting**

Cancel Back Next

# Run Setting 詳細

試薬カードリッジのバーコードを入力  
(サンプルシート名となる。ランセットアップ時に MCS が自動的にサンプルシートを検出する。)  
または、ラン前にファイル名を修正する

Resequencing Run Settings

Reagent Cartridge Barcode*	<input type="text"/>	使用したライブラリー調製キットを選択
Library Prep Workflow	Nextera DNA	使用したインデックスアダプターを選択
Index Adapters	Nextera Index Kit (24 Indexes, 96 Sample)	インデックスの数を選択。 インデックスリードのサイクル数はインデックスキットごとに決まっている。
Index Reads	<input type="radio"/> 0 (None) <input type="radio"/> 1 (Single) <input checked="" type="radio"/> 2 (Dual)	
Experiment Name	<input type="text"/>	実験名
Investigator Name	<input type="text"/>	実施者名
Description	<input type="text"/>	説明事項
Date	2018/07/12	実施日
Read Type	<input checked="" type="radio"/> Paired End <input type="radio"/> Single Read	Paired End / Single Read
Cycles Read 1	151	シーケンスリードのサイクル数
Cycles Read 2	151	

\* - required field

\* 必須項目

# Workflow-Specific Settings の比較

## Resequencing

### Resequencing Workflow-Specific Settings

- ☐ Custom Primer for Read 1
- ☐ Custom Primer for Index
- ☐ Custom Primer for Read 2
- ☐ Use Somatic Variant Caller
- ☒ Flag PCR Duplicates
- ☐ Reverse Complement
- ☐ Indel Realignment GATK
- Variant Quality Filter
- ☐ Export to gVCF
- ☐ BWA-backtrack
- ☒ Use Adapter Trimming

## Enrichment

### Enrichment Workflow-Specific Settings

- ☒ Indel Realignment GATK
- ☐ Flag PCR Duplicates
- ☐ Run Picard HsMetrics
- Variant Quality Filter
- ☐ Export to gVCF
- ☐ BWA-backtrack
- ☒ Use Adapter Trimming
- ☒ Use Adapter Trimming Read 2



# Workflow-specific Setting: Resequencing

Illumina Experiment Manager Software Guide より

## Resequencing Workflow-Specific Settings

☐ Custom Primer for Read 1

☐ Custom Primer for Index

☐ Custom Primer for Read 2

☐ Use Somatic Variant Caller

☒ Flag PCR Duplicates

☐ Reverse Complement

☐ Indel Realignment GATK

Variant Quality Filter

30

カスタムプライマーを使用するときチェック  
(現在、イルミナのライブラリー調製キットをご使用の場合はチェック不要)  
(Onにした場合、MiSeq Reagent Kit の Port18-20 にプライマーを分注する必要がある)

Illumina の Somatic Variant Caller を使用する  
(体細胞変異を検出したい場合にチェック)

PCR 重複のリードにフラグを立て、Variant call から除外する。

# Workflow-specific Setting

Illumina Experiment Manager Software Guide より

## Resequencing Workflow-Specific Settings

☐ Custom Primer for Read 1

☐ Custom Primer for Index

☐ Custom Primer for Read 2

☐ Use Somatic Variant Caller

☒ Flag PCR Duplicates

☐ Reverse Complement

リードを逆相補鎖に変換する(Nextera Mate Pair KitのときOn)

☐ Indel Realignment GATK

Insertion, Deletion の部位に再度アライメントを行って  
Insertion, Deletion の検出感度を上げる

Variant Quality Filter

30

変異解析のクオリティの閾値  
デフォルトでは「30」  
出力されるVCFファイルにフラグが立つ

# Workflow-specific Setting

Illumina Experiment Manager Software Guide より

## Enrichment Workflow-Specific Settings

☒ Indel Realignment GATK

☐ Flag PCR Duplicates

☐ Run Picard HsMetrics

Variant Quality Filter

☐ Export to gVCF

☐ BWA-backtrack

☒ Use Adapter Trimming

☒ Use Adapter Trimming Read 2

Read1, Read2それぞれについて、アダプター配列が  
読まれてきた際にアダプターから下流をトリミングする  
(推奨はOn)

# Workflow-specific Setting ①

Illumina Experiment Manager Software Guide より

Setting	Applications	Description
<b>BWA-Backtrack</b>	Enrichment, Library QC, PCR Amplicon, Small Genome Resequencing	以前のバージョンの BWA aligner v0.6.1 を使用する。BWA-MEM v0.7.9a を使用しているMiSeq Reporter v2.6 以降用。
<b>Custom Primer for Read1</b>	Truseq Amplicon 以外	カスタムプライマーを使用する場合に選択する。 (現在、イルミナのライブラリー調製キットをご使用の場合は選択することはありません) (MiSeq Reagent Kit の Port18-20 にプライマーを分注する必要があります)
<b>Custom Primer for index</b>		
<b>Custom Primer for Read2</b>		
<b>Use Somatic Variant Caller</b>	TruSeq Amplicon, PCR Amplicon, Enrichment, Resequencing	Illumina の Somatic Variant Caller を使用する (体細胞変異を検出したい場合にチェック)

# Workflow-specific Setting ②

Setting	Applications	Description
<b>Indel Realignment GATK</b>	Resequencing, Enrichment	Insertion, Deletion の部位に再度アライメントを行ってInsertion, Deletion の検出感度を上げる
<b>Flag PCR Duplicates</b>	TruSeq Amplicon 以外	PCR 重複のリードにフラグを立て、Variant call から除外する。
<b>Variant Quality Filter</b>	TruSeq Amplicon, PCR Amplicon, Resequencing, Enrichment	変異解析のクオリティの閾値 デフォルトでは「30」 出力されるVCFファイルにフラグが立つ
<b>Use Adapter Trimming</b>	TruSeq Amplicon 以外	Read1 でアダプター配列が読まれてきた際にアダプター配列をトリミングする
<b>Use Adapter Trimming Read2</b>	TruSeq Amplicon 以外	Read2 でアダプター配列が読まれてきた際にそのアダプタ配列をトリミングする
<b>Run Picard HsMetric</b>	Enrichment	On-target RateやCoverage Uniformityといった濃縮に関連したレポートをPicard hybrid selectionで出力する

# Workflow-specific Setting ③

Setting	Applications	Description
<b>Reverse Complement</b>	Resequencing, Library QC, FASTQ Only, ChIP-Seq	Nextera Mate Pair ライブラリのリードを逆相補鎖に変換する
<b>K-mer size</b>	Assembly	アセンブリに使用する K-mer サイズを設定する
<b>Genome</b>	Small RNA	Small RNA の際に下記のリファレンスへのパスを設定する <ul style="list-style-type: none"> <li>・Contaminants (Human RNA Contaminants)</li> <li>・RNA (Human RNA)</li> <li>・miRNA (Human RNA Mature)</li> </ul>
<b>Export to gVCF</b>	PCR Amplicon, TruSeq Amplicon, Enrichment	gVCF を出力する
<b>Genus-level Classification</b>	Metagenomics	デフォルトでは種レベルでの分類を試みる。チェックすると属レベルでの分類となる。

**詳しくはMiSeq Sample Sheet Quick Reference Guideをご参照ください**

[http://support.illumina.com/downloads/miseq\\_sample\\_sheet\\_quick\\_reference\\_guide\\_15028392.html](http://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html)

# Sample Selection ①

Illumina Experiment Manager

## Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Sample Plate

Select Plate... New Plate...

Table View Plate View

Sample ID	Sample Name	Index Well	Index 1 (17)
-----------	-------------	------------	--------------

Samples to include in sample sheet

\* - required field ☐ Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index Well*	Index 1 (17)*	17 Seq
------------	-------------	-------	------	-------------	---------------	--------

# Sample Selection ①

Illumina Experiment Manager

## Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet

\* - required field ☒ Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*

< >

**Add Blank Row** Remove Selected Rows ?

Sample Sheet Status: Invalid  
Reason: Not all Samples in this sample sheet have all the required fields

Cancel Back Finish



# Sample Selection ①

Illumina Experiment Manager

## Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Sample ID 1000 Index情報 \* - required field ☒ Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index Well*	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
PhiX			A01		D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT	
PhiV			A02		D702	TCCGGAGA	D501	TATAGCCT	
PhiV			A03		D703	CGCTCATT	D501	TATAGCCT	
PhiT			A04		D704	GAGATTCC	D501	TATAGCCT	
PhiS			A05		D705	ATTCAGAA	D501	TATAGCCT	
PhiR			A06		D706	GAATTCGT	D501	TATAGCCT	
PhiQ			A07		D707	CTGAAGCT	D501	TATAGCCT	
PhiP			A08		D708	TAATGCGC	D501	TATAGCCT	
PhiO			A09		D701	ATTACTCG	D502	ATAGAGGC	
PhiN			A10		D702	TCCGGAGA	D502	ATAGAGGC	
PhiM			A11		D703	CGCTCATT	D502	ATAGAGGC	
PhiL			A12		D704	GAGATTCC	D502	ATAGAGGC	
PhiK			B01		D705	ATTCAGAA	D502	ATAGAGGC	
PhiJ			B02		D706	GAATTCGT	D502	ATAGAGGC	
PhiI			B03		D707	CTGAAGCT	D502	ATAGAGGC	
PhiH			B04		D708	TAATGCGC	D502	ATAGAGGC	
PhiG			B05		D701	ATTACTCG	D503	CCTATCCT	
PhiF			B06		D702	TCCGGAGA	D503	CCTATCCT	
			B07						
			B08						
			B09						
			B10						
			B11						
			B12						

Sample Sheet Status: Invalid

Reason: Not all Samples in this sample sheet have all the required fields

# Sample Selection ②

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet

\* - required field ☒ Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index Well*	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
PhiX				A01	D701	Arabidopsis_thaliana#NCBI#build9.1#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiV				A02	D702	Bos_taurus#Ensembl#UMD3.1#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiT				A03	D703	Escherichia_coli_K_12_DH10B#NCBI#2008-03-17#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiS				A05	D705	Homo_sapiens#UCSC#hg19#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiR				A06	D706	Mus_musculus#UCSC#mm9#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiQ				A07	D707	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiP				A08	D708	Rattus_norvegicus#UCSC#rn4#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiO				B01	D701	Saccharomyces_cerevisiae#UCSC#sacCer2#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiN				B02	D702	Staphylococcus_aureus_NCTC_8325#NCBI#2006-02-13#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiM				B03	D703	CGTCATT D502 ATAGAGGC			
PhiL				B04	D704	GAGATTCC D502 ATAGAGGC			
PhiK				B05	D705	ATTCAGAA D502 ATAGAGGC			
PhiJ				B06	D706	GAATTCGT D502 ATAGAGGC			
PhiI				B07	D707	CTGAAGCT D502 ATAGAGGC			
PhiH				B08	D708	TAATGCGC D502 ATAGAGGC			
PhiG				C01	D701	ATTACTCG D503 CCTATCCT			
PhiF				C02	D702	TCCGAGGA D503 CCTATCCT			

Sample Sheet Status: **Invalid**

Reason: **Not all Samples in this sample sheet have all the required fields**

## Sample Selection ③

Sample Sheet Wizard - Sample Selection

Samples to include in sample sheet

\* - required field ☒ Maximize

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index Well*	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
PhiX				A01	D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiV				A02	D702	TCCGGAGA	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiV				A03	D703	CGCTCATT	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiT				A04	D704	GAGATTCC	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiS				A05	D705	ATTCAGAA	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiR				A06	D706	GAATTCGT	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiQ				A07	D707	CTGAAGCT	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiP				A08	D708	TAATGCGC	D501	TATAGCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiO				B01	D701	ATTACTCG	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiN				B02	D702	TCCGGAGA	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiM				B03	D703	CGCTCATT	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiL				B04	D704	GAGATTCC	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiK				B05	D705	ATTCAGAA	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiJ				B06	D706	GAATTCGT	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiI				B07	D707	CTGAAGCT	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiH				B08	D708	TAATGCGC	D502	ATAGAGGC	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiG				C01	D701	ATTACTCG	D503	CCTATCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole
PhiF				C02	D702	TCCGGAGA	D503	CCTATCCT	PhiX\Illumina\RTA\Sequence\Whole

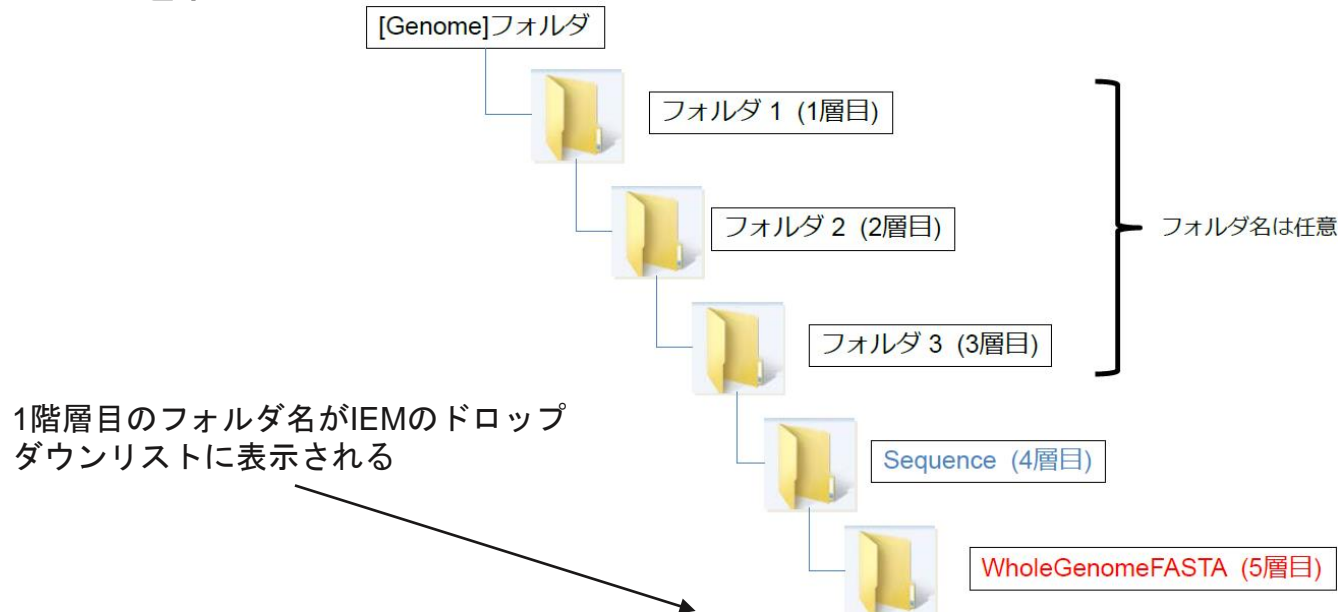
Sample Sheet Status: **Valid**

Reason:

入力完了: **Valid**  
Finish → 終了

# 補足:MiSeq ReporterのReference Genomeの場所

- MiSeq ReporterにReference Genomeを追加するには、IEMのSettingで指定したGenomeフォルダ以下の、次の階層にFASTAファイルを置きます



- 例:...¥Genomes¥Saccharomyces\_cerevisiae\_NCBI\_build3.1¥NCBI¥build3.1¥Sequence¥WholeGenomeFASTA¥genome.fa

# サンプルシートの例

[Header]											
ITEMFileVersion	5										
Date	2018/7/										
Workflow	Resequencing										
Application	Resequencing										
Instrument Type	MiSeq										
Assay	TruSeq DNA PCR-Free										
Index Adapters	TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes)										
Description											
Chemistry	Amplicon										
[Reads]											
151											
151											
[Settings]											
FlagPCRDuplicates	1										
ReverseComplement	0										
VariantFilterQualityCut	30										
outputgenomevcf	FALSE										
RunBwaAln	0										
Adapter	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA										
AdapterRead2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT										
[Data]											
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	Index_Plate	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	GenomeFolder	Sample_Project	Description
PhiX				A01	D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiW				A02	D702	TCCGGAGA	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiV				A03	D703	CGCTCATT	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiT				A04	D704	GAGATTCC	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiS				A05	D705	ATTCAGAA	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiR				A06	D706	GAATTCGT	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiQ				A07	D707	CTGAAGCT	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiP				A08	D708	TAATGCGC	D501	TATAGCCT	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		
PhiO				B01	D701	ATTACTCG	D502	ATAGAGGC	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta		

# 注意事項

- 禁則文字は使用しない

? ( ) [ ] / ￥ = + < > : ; " ' , \* ^ | & . とスペースやタブ

- 全角文字は使用しない

日本語 OS の場合には注意

- セルの値が “ ” で囲まれているか

Excel や OpenOffice ではなく、notepad などで確認

XXXXXX.csv を右クリック > プログラムから開く >  
notepad

## MiSeq でのランの準備

- ▶ サンプルシートを MiSeq以外で作成した場合には、MiSeq上のデフォルト保存先にコピーして使用する

D:\Illumina\MiSeq Control Software\SampleSheet

- ▶ サンプルシートのファイル名が試薬バーコードになっているか確認する
- ▶ マニフェストファイルが必要な場合、MiSeq本体上のサンプルシートで指定した場所にファイルがあるか確認する

# インデックス選択の ベストプラクティス





# ベストプラクティス

- **Low Plex Pooling際の注意点について**

- レーンあたりに使用するサンプルの数が少ない場合、Indexリードのカラーバランスを考慮し、Indexの選択に注意する必要がある

- **Unique Dual Index (UD index) の使用について**

- UD indexはNovaSeqやHiSeq3000/4000などのパターンフローセルを採用している装置で発生しやすいIndex hoppingの影響を回避できる  
(**使用を推奨**)
- UD Indexは最新版のIEMで選択可能

# Low Plex Pooling際のIndex選択の注意点

## ● 4色蛍光検出のシーケンサーの場合

- MiSeqおよびHiSeqシリーズでは、ATGCの塩基がそれぞれ異なる蛍光でラベルされており、蛍光の励起には以下のレーザーが使用されます
  - A/C塩基-----赤色レーザー
  - G/T塩基-----緑色レーザー
- Indexリードの各サイクルに、A/C塩基およびG/T塩基がどちらも出現することが望ましい



Good !

カラーバランスが良好なIndexの組み合わせの例

i7 index	
N701	TAAGGCGA
N702	CGTACTAG
N705	GGACTCCT
	√√√√√√√√
cycles	12345678



Bad !

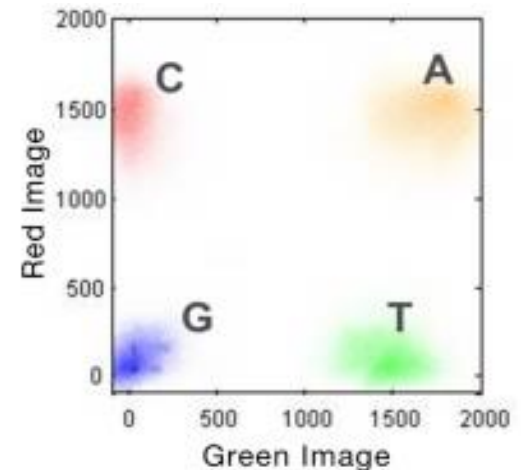
カラーバランスに偏りのあるIndexの組み合わせの例

i7 index	
N701	TAAGGCGA
N704	TCCTGAGC
N705	GGACTCCT
	X√X√XX√√
cycles	12345678

# Low Plex Pooling際のIndex選択の注意点

## ● 2色蛍光検出のシーケンサーの場合

- NovaSeq、NextSeqおよびMiniSeqは、2色の蛍光のみで、塩基の検出を行う；Cは赤、Tは緑、Aは赤と緑両方の蛍光ラベルを持ち、Gは蛍光ラベルされていない
- 2色蛍光検出のシーケンサーにおけるそれぞれの蛍光の励起には下記のレーザーが用いられる
  - A/C塩基-----赤色レーザー
  - A/T塩基-----緑色レーザー



# Low Plex Pooling際のIndex選択の注意点

## ● 2色蛍光検出のシーケンサーのIndex選択の注意点

- Indexリードの各サイクルで、A/C塩基およびA/T塩基が両方出現することが望ましい
- 全てのIndexリードの先頭2塩基がGで始まっていると、クラスターの検出に失敗し、データの出力が行われない



Good !

カラーバランスの良好な  
Indexの組み合わせの例

i7 index	
D705	A T T C A G A A
D704	G A A T T C G T
D712	A G C G A T A G
	√√√√√√√√
cycles	1 2 3 4 5 6 7 8



Bad !

シーケンスは可能だがカラー  
バランスに偏りのあるIndex  
の組み合わせの例

i7 index	
N704	T C C T G A G C
N707	C T C T C T A C
N718	G G A G C T A C
	√√√XX√√X
cycles	1 2 3 4 5 6 7 8



Bad !

すべてのIndexの先頭2塩基  
がGで始まっており、データ  
が出力されない例

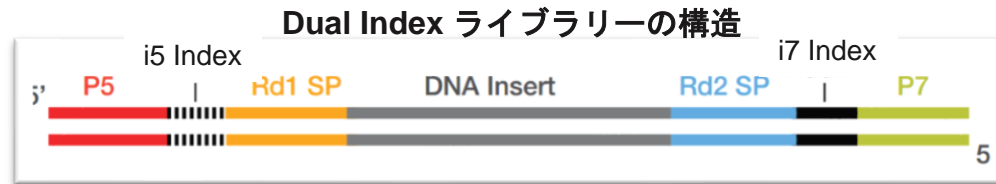
i7 index	
N705	G G A C T C C T
N718	G G A G C T A C
	XX√X√√√√
cycles	1 2 3 4 5 6 7 8

# Low Plex Pooling際のIndex選択の注意点

- Low Plex Sample Poolingを行う際のIndexの組み合わせの推奨例などの詳細な情報はTechnoteをご参照ください
  - [Index Adapter Pooling Guide](#)
- 2色蛍光検出シーケンサーのIndex poolingについての詳細情報
  - [Bulletin: Library pooling guidelines for the NextSeq and MiniSeq systems](#)

# Unique Dual Index (UD index) の使用について

- Unique Dual Index (UD index) は、i7側、i5側のIndex配列に重複がない



## <4サンプルPoolingの例>

### 従来型Index (CD index)

Sample	i7 index	i5 index
1	TCGCCTTA	TAGATCGC
2	TCGCCTTA	CTCTCTAT
3	CTAGTACG	TAGATCGC
4	CTAGTACG	CTCTCTAT

Index1とIndex2の組み合わせで、サンプルを区別。  
片側のIndexはサンプル間で重複している場合がある

### UD index

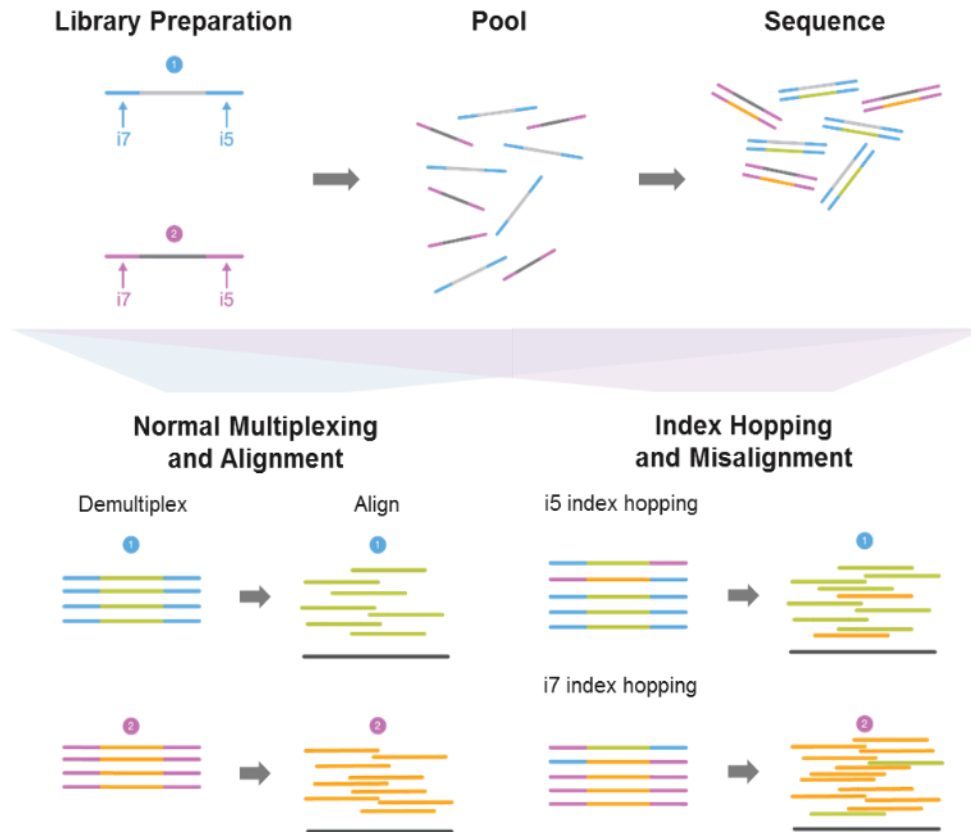
sample	i7 index	i5 index
1	CCGCGGTT	AGCGCTAG
2	TTATAACC	GATATCGA
3	GGAATTGG	CGCAGACG
4	AAGTCCAA	TATGAGTA

Index1, Index2どちらもサンプル間で重複がない

- UD Indexを使用することによって、パターンフローセルを使用する装置で生じる、Index hoppingの問題を回避できます

# Index hoppingとは

- 複数ライブラリーをプーリングし、シーケンスをした際にライブラリー間でIndex の組み換えが起こり、Demultiplexing 後のライブラリーに、別のライブラリー由来のリードが含まれてしまう現象



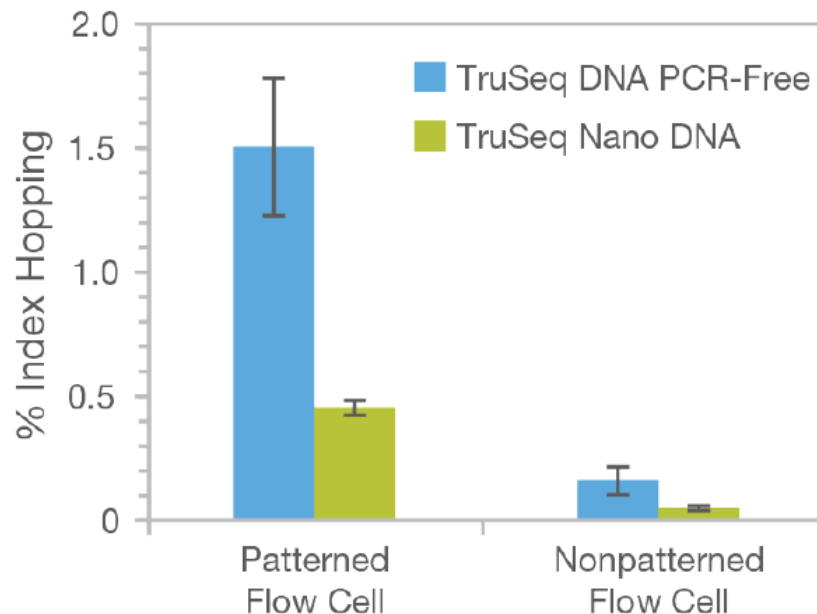
複数ライブラリーをPoolingし、シーケンスを実施

シーケンスの後の、Demultiplexingでは、各ライブラリーの由来のリードがIndexの情報に基づいて、振り分けられる

低い頻度で、Index hoppingによりライブラリー間で組み換えられたIndexによって、リードのミスアサインメントが発生する

# Index hoppingとは

- HiSeqX・HiSeq3000/4000、NovaSeqなどのパターンフローセルを採用した装置で低頻度ながら発生する
- MiSeqやHiSeqシリーズなど従来型フローセルの装置で発生する頻度はごく僅か



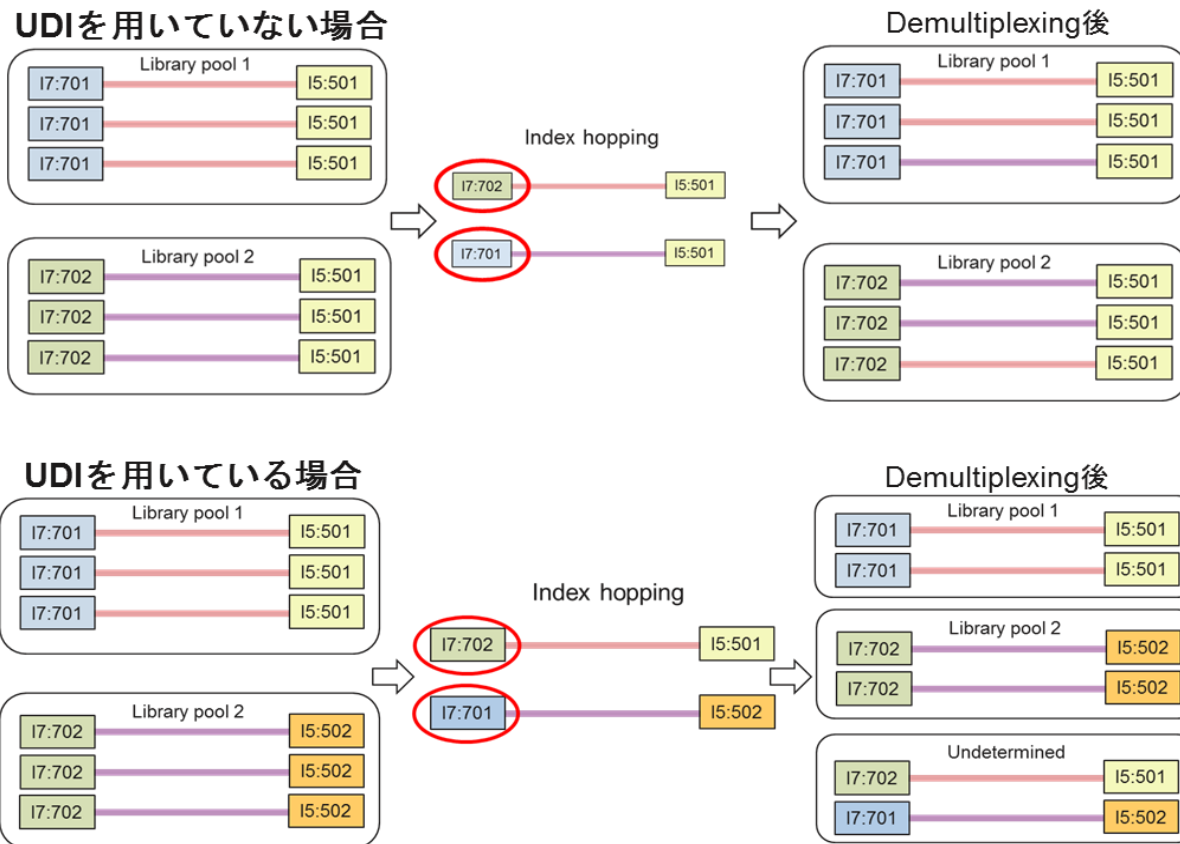
- その他Index hoppingの詳細については、[White Paper](https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/products/whitepapers/index-hopping-white-paper-770-2017-004.pdf)をご参照ください

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/products/whitepapers/index-hopping-white-paper-770-2017-004.pdf>



# UD indexの使用でIndex hoppingの影響を回避

- UD Indexを使用したランでは、Index hoppingを生じたリードは、Demultiplexingによって、Undermined Read（どのライブラリーにも使用していないIndexの組み合わせ）として振り分けられ、各ライブラリーのリードに、コンタミネーションとして混ざることがない。



# UD indexの製品情報

## ● UD Indexが選択可能なライブラリー調製キット(DNA)

型番	製品名	価格 / キット
20015962	TruSeq DNA PCR-Free LT Library Prep Kit (24 Samples)	¥116,000
20015963	TruSeq DNA PCR-Free HT Library Prep Kit (96 Samples)	¥464,000
20015964	TruSeq DNA Nano LT Library Prep Kit (24 Samples)	¥116,000
20015965	TruSeq DNA Nano HT Library Prep Kit (96 Samples)	¥464,000
20020181	TruSeq DNA Library Prep for Enrichment (24 Samples)*	¥184,000
20020182	TruSeq DNA Library Prep for Enrichment (96 Samples)*	¥612,000

\*IDT株式会社のエクソーム濃縮パネル、ブロックングオリゴおよび濃縮試薬と合わせてご利用ください。

## ● 上記DNA/Exomeキットと組み合わせ可能なUD Index

型番	製品名	価格 / キット
20020590	IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes (24 Indexes, 96 Samples)	¥118,000
20022370	IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	¥118,000

# UD indexの製品情報

## ● UD Indexが選択可能なライブラリー調製キット(RNA)

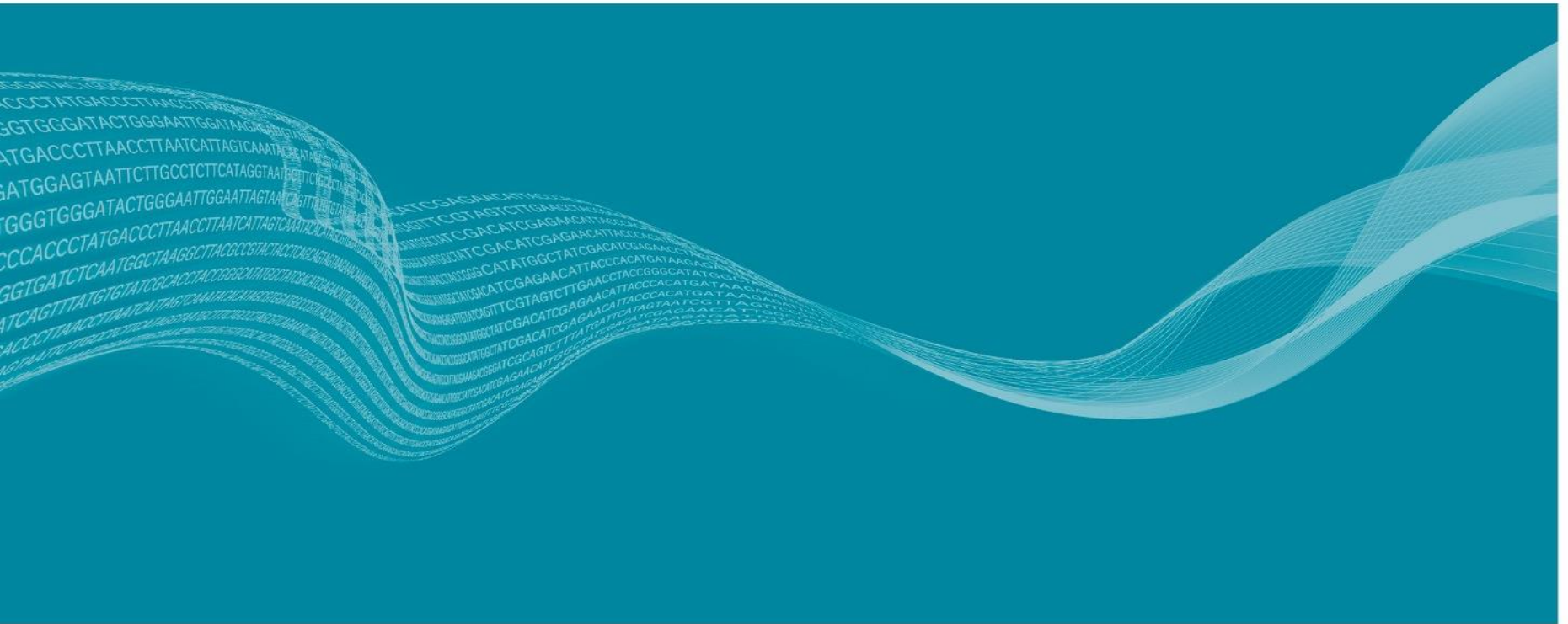
型番	製品名	価格 / キット
20020594	TruSeq Stranded mRNA Library Prep (48 Samples)	¥397,000
20020595	TruSeq Stranded mRNA Library Prep (96 Samples)	¥794,000
20020596	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat (48 Samples)	¥989,000
20020597	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Rat (96 Samples)	¥1,790,000
20020598	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold (48 Samples)	¥989,000
20020599	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold (96 Samples)	¥1,790,000
20020610	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant (48 Samples)	¥989,000
20020611	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant (96 Samples)	¥1,790,000
20020612	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Globin (48 Samples)	¥989,000
20020613	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Globin (96 Samples)	¥1,790,000
20020189	TruSeq RNA Library Prep Enrichment (48 Samples)*	¥413,000

\*20020490 TruSeq RNA Enrichment, 20020183 Exome Panelとあわせてご利用ください。

## ● 上記RNAキットと組み合わせて使用可能なUD Index

型番	製品名	価格 / キット
20020591	IDT for Illumina – TruSeq RNA UD Indexes (24 Indexes, 96 Samples)	¥118,000
20022371	IDT for Illumina – TruSeq RNA UD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	¥118,000

# 補足事項



# Software Guide について

- ▶ **Illumina Experiment Manager Software Guide**

[http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/experiment\\_manager.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager.html)

- ▶ **MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide**

[http://support.illumina.com/downloads/miseq\\_sample\\_sheet\\_quick\\_reference\\_guide\\_15028392.html](http://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html)

- ▶ **MiSeq System User Guide**

[http://support.illumina.com/downloads/miseq\\_system\\_user\\_guide\\_15027617.html](http://support.illumina.com/downloads/miseq_system_user_guide_15027617.html)

# ランの条件については、各調製キットのウェブページをご参照ください。

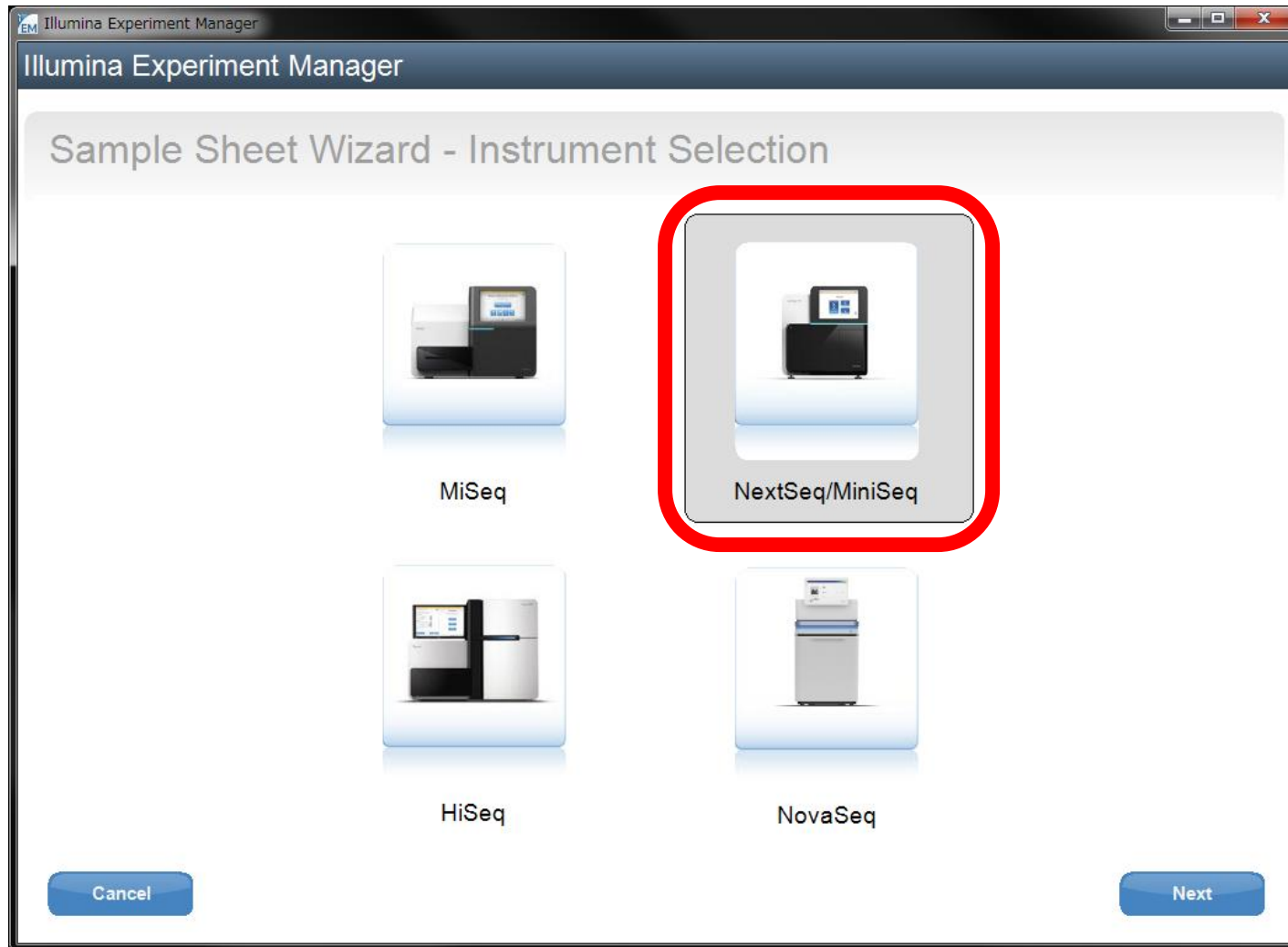
## IEM Quick Reference Card も参考になります

The screenshot shows the Illumina support website for the TruSight One Sequencing Panel. The sidebar on the left contains links to Downloads, Documentation & Literature (highlighted), Training, Questions & Answers, Best Practices, Bulletins, Webinars, and Product Ordering Information. The main content area features a welcome message and links to the TruSight One Sequencing Panel Protocol Guide, Checklist, and Consumables and Equipment. Below this is a section titled 'Experimental Design Documentation' which contains a table with columns for DESCRIPTION, FILE INFO, and DATE POSTED. The table lists the 'IEM TruSight Quick Reference Card' as a PDF document posted on 02/03/2016. The page also includes a 'Supporting Documentation' section at the bottom.

DESCRIPTION	FILE INFO	DATE POSTED
<a href="#">IEM TruSight Quick Reference Card</a> Instructions for using IEM with TruSight kits.	PDF (< 1 MB)	02/03/2016

# サンプルシートの作成 – Instrument Selection

## NextSeqの結果からFASTQファイルを作成



# NextSeqの結果からFASTQファイルを作成する方法

サポートウェビナーシリーズ2014

2014/11/14

「NextSeq 500から得られるデータのFASTQ変換」



イルミナサポートウェビナー

[http://www.illumina.co.jp/events/webinar\\_japan.ilmn?ws=ss](http://www.illumina.co.jp/events/webinar_japan.ilmn?ws=ss)



サポートウェビナーにご参加いただき  
ありがとうございました。

本日のセッション終了後のご質問は、  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)  
で承ります。

テクニカルサポート直通のフリーダイヤ  
ルもご利用ください（AM9 – PM5）。

[0800-111-5011](tel:0800-111-5011)