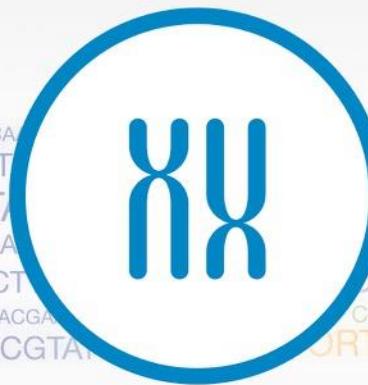


# サンプルシート作成ツール: Illumina Experimental Manager (IEM) の使用方法 —最新バージョン v1.15.1 のご紹介—

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

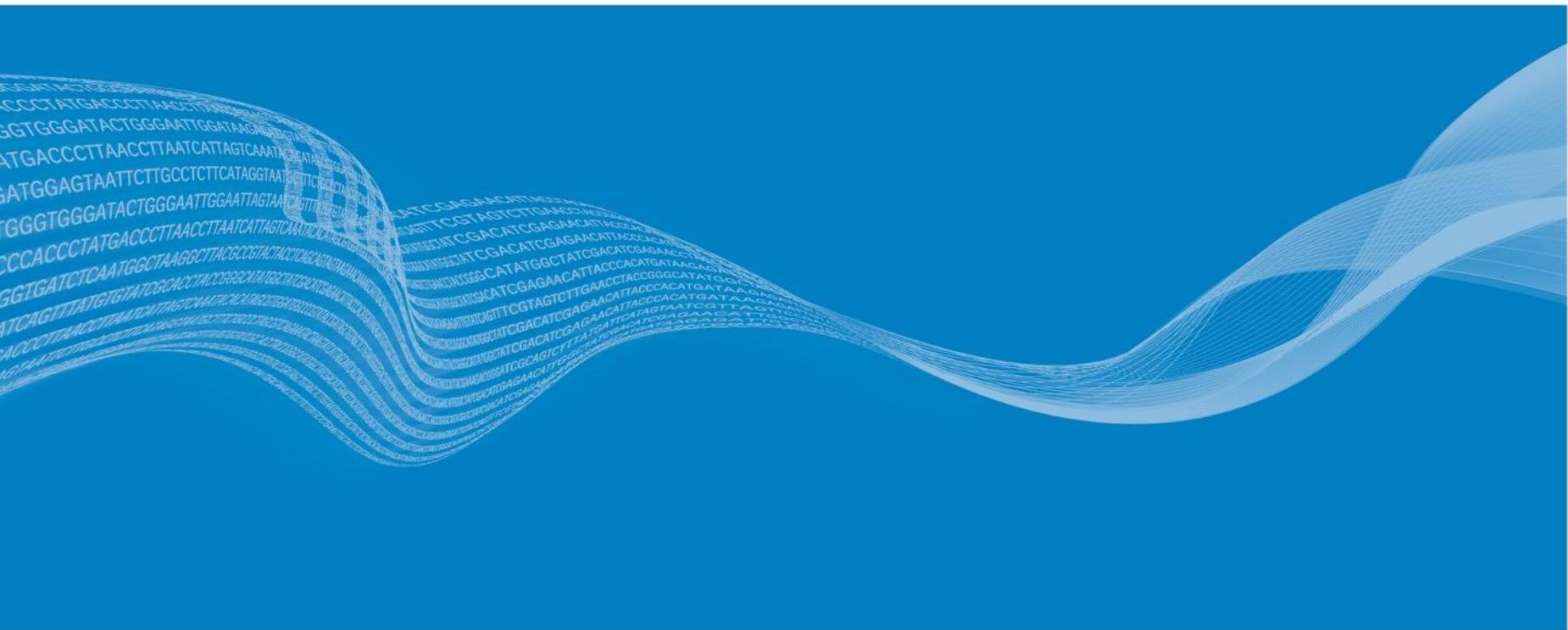
(MiSeq 以外) Linux の bcl2fastq でイルミナ  
シーケンサーの最終出力である bcl を FASTQ へ  
変換する際に必要となる設定ファイル

# 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



The screenshot shows the Illumina website homepage. At the top, there is a navigation bar with links for SIGN IN, 予算申請書類リクエスト, 論文要旨集リクエスト, お問い合わせ, ログイン, 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, and サポート. The 'サポート' link is circled in red. Below the navigation bar, the main content area features a large image of a scientist in a lab coat and gloves working with a pipette, overlaid with a blue glowing effect containing text like 'RNA', 'sequencing', and 'analysis'. To the left of the scientist is a blue button labeled '詳細ははこちら'. To the right, there are two columns: 'Product Finder' with links to various product categories and 'Login' with a 'Choose login option' button. At the bottom, there are four small images: 'イルミナ iSchool' (books), 'ゲノムに夢中' (two cartoon characters), a scientist in a lab, and a woman in a suit.

※ 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 support website for the MiSeq system. At the top, there are navigation links for SIGN IN, REQUEST FOR QUOTATION, REQUEST FOR PUBLICATIONS, CONTACT US, and REGION. Below the header, there are sections for Support for Your System (MiSeq), MiSeq Support Links, Popular Kits for MiSeq, Support for Popular Kits, and other resources like Safety Data Sheets and Technical Tips. A large image of the MiSeq sequencer is displayed. In the center, there's a workflow navigation bar with steps: Plan, Prep, Run, and Analyze. The 'Analyze' button is circled in red. To the right of the workflow, there are links for custom protocols, array kits, and support options. Below the workflow, there are images of a running track and a book.

※ 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

The screenshot shows the 'Sequencing' software selection interface. At the top, there are three main categories: 'Plan' (with a folder icon), 'Prep' (with a test tube icon), and 'Run' (with a floppy disk icon). Below these, the 'Sequencing' section is displayed. On the left, there are two main sections: 'Experimental Design' and 'Analysis Software'. Under 'Experimental Design', the 'Experiment Manager' link is highlighted with a red circle and a cursor icon. Other links in this section include 'DesignStudio' and 'BlueFuse Workflow Manager'. Under 'Analysis Software', links include 'CASAVA', 'Analysis Visual Controller', 'Off-Line Basecaller', 'MiSeq Reporter', 'BaseSpace', 'Hiseq Analysis Software', 'BCL2FASTQ', 'BaseSpace Onsite', and 'Conexio Assign'. In the center, there are three columns: 'On-Instrument Software' (listing 'HiSeq Control (HCS/RTA) for all HiSeq Systems', 'HiSeq Control (HCS/RTA) for HiScanSQ', 'cBot Control', 'Sequencing Control (SCS/RTA) for Genome Analyzer', 'Sequence Analysis Viewer', 'MiSeq Control (MCS/RTA)', 'NextSeq Control (NCS/RTA2)', and 'MiniSeq Control Software'), 'Visualization Software' (listing 'GenomeStudio'), and 'Learn' (listing 'Product Literature', 'Questions and Answers', 'Documentation', 'Training', 'Webinars', and 'Product Lots'). At the bottom, a button says 'View Software Options Across the Analytics Workflow'.

※ 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

The screenshot shows the Illumina Support website with the following details:

- Header:** Includes the Illumina logo, a sign-in button, and links for "お問い合わせ", "ロケーション選択", and "予算申請書類リクエスト".
- Navigation:** "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", and "サポート".
- Breadcrumbs:** Support > Sequencing > Sequencing Software > Illumina Experiment Manager (IEM)
- Left Sidebar (Illumina Experiment Manager Support):**
  - Overview
  - Computing Requirements
  - Downloads
  - Documentation & Literature
  - Training
- Main Content Area:**

## Illumina Experiment Manager

### Latest Updates

  - [Illumina Experiment Manager v1.15 01/28/2018](#) (This link is circled in red.)
  - [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

illumina®

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

 SIGN IN | お問い合わせ | ロケーション選択 | 予算申請書

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 » Downloads » Illumina Experiment Manager v1.15

## Illumina Experiment Manager v1.15

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.

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

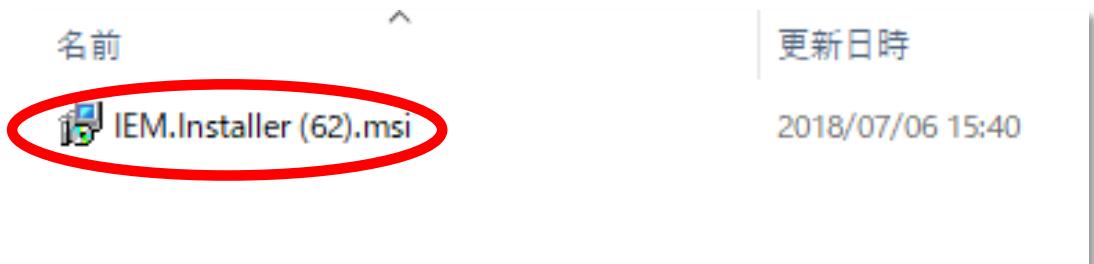
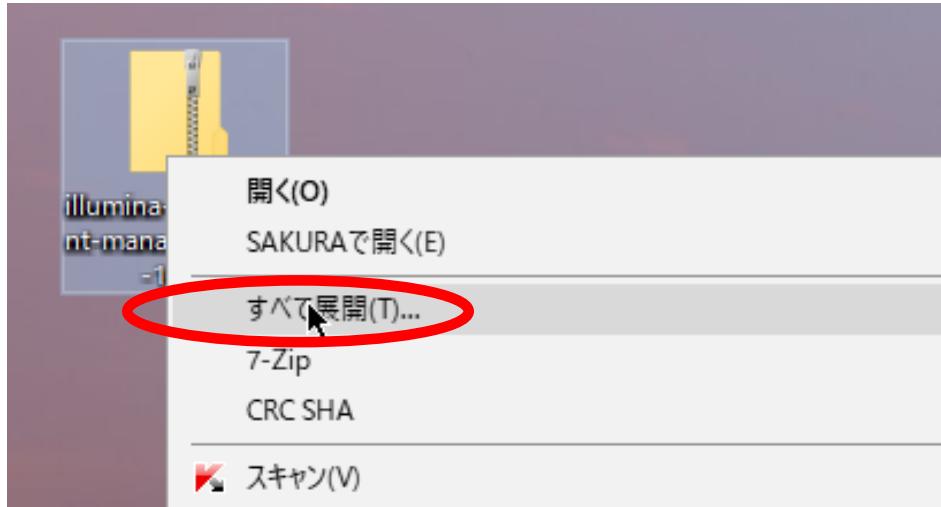
**革新的なテクノロジー**

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指しています。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

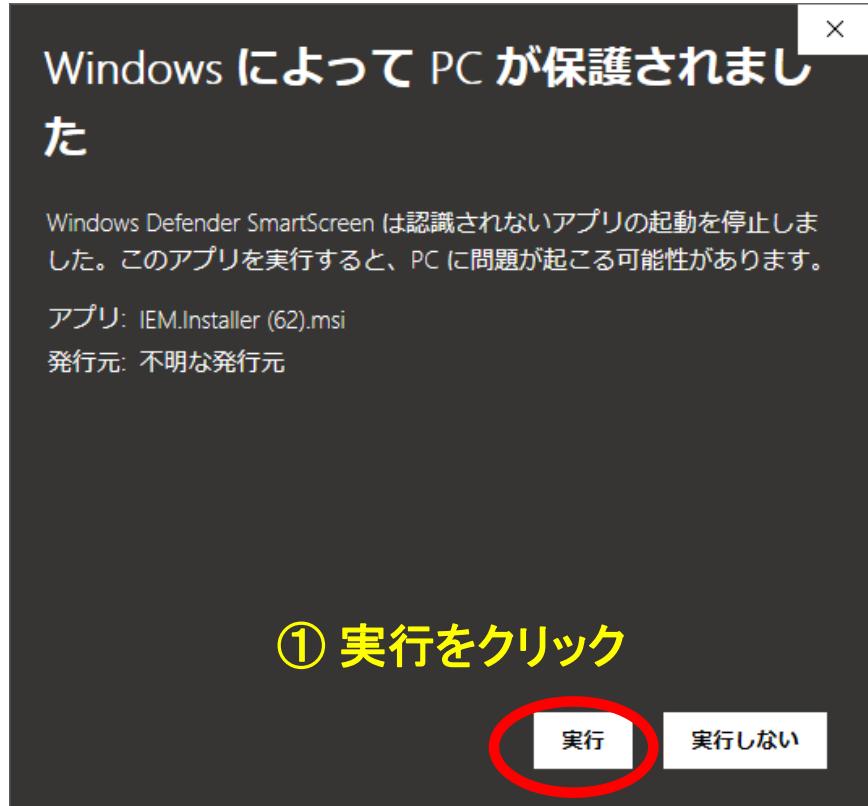
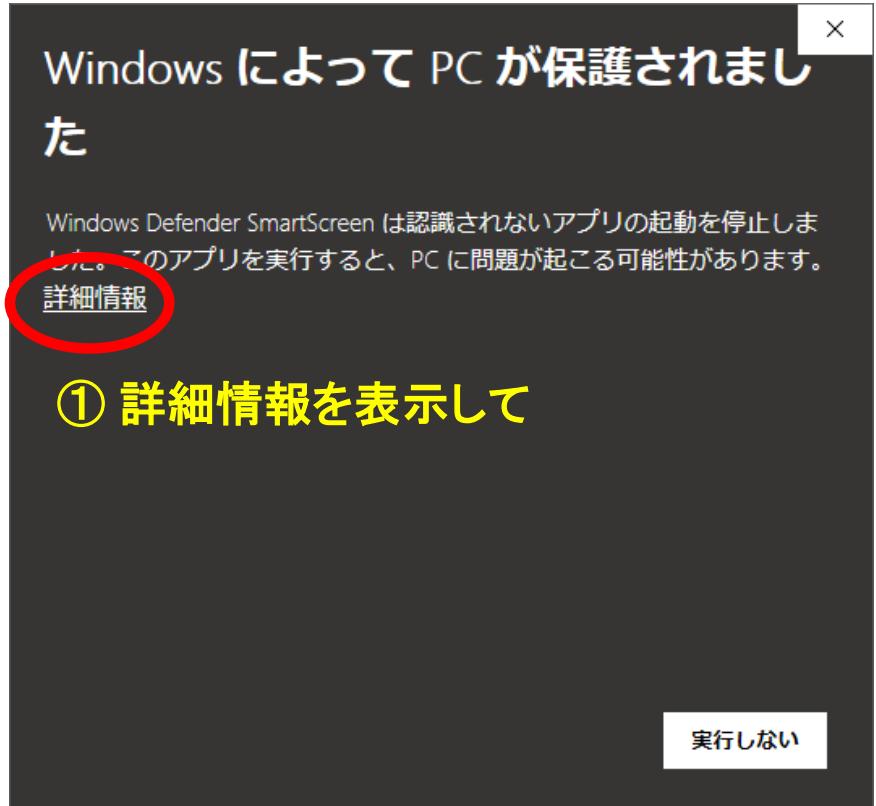


# IEMのインストール: ダウンロードしたZipファイルを解凍、 IEM.Installer(62).msiを実行



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

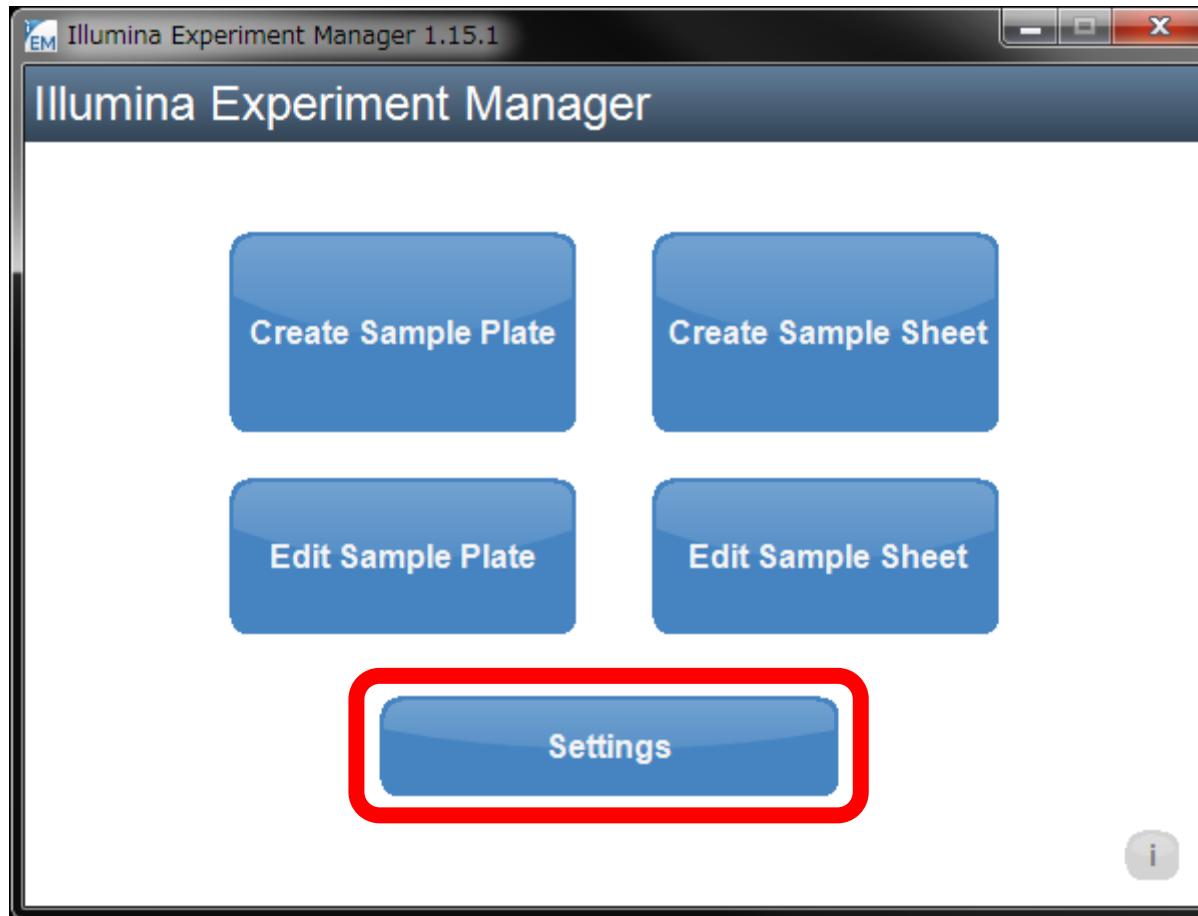
- マニフェストファイルが必要なアプリケーション\*では、サンプルシートはMiSeq本体のIEMで作成することを推奨

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

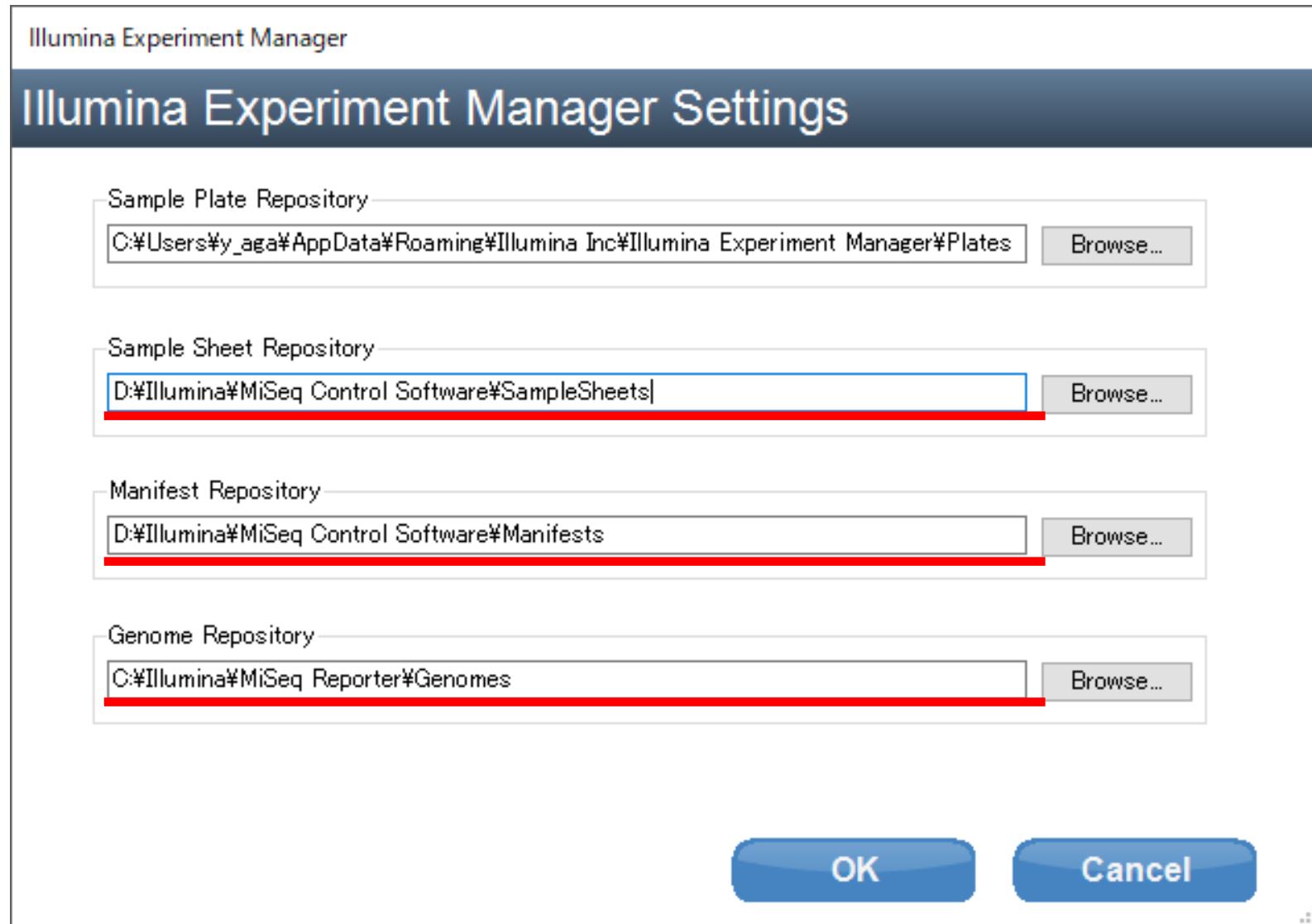
マニフェストファイル (TruSeq Ampliconの例)

	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 Purity		341											
8														
9	[Probes]													
10	Target Region Name	Target Region ID	Target ID	Species	Build ID	Chromosome	Start Posit.	End Posit.	Submitted	ULSO Seq	ULSO Gen	DLSO Seq	DLSO Gen	Proc.
11	snp_rs10138962	snp_rs10138962	snp_rs101	Homo sapiens	hg19	chr14	1.05E+08	1.05E+08	+	AAGCCAA	282	TGCGCACCA	1200	+
12	snp_rs1149580	snp_rs1149580	snp_rs114	Homo sapiens	hg19	chr11	76549431	76549489	+	GGATCAA	32	ACTGGGG	68	+
13	snp_rs10988298	snp_rs10988298	snp_rs109	Homo sapiens	hg19	chr9	1.32E+08	1.32E+08	+	GAGGCTG	1200	ATTGTGCA	75	+
14	snp_rs10086550	snp_rs10086550	snp_rs100	Homo sapiens	hg19	chr8	1.43E+08	1.43E+08	+	GTGTGAC	51	CATAGAG	73	+
15	snp_rs10409978	snp_rs10409978	snp_rs104	Homo sapiens	hg19	chr19	57796594	57796646	+	TGTCTTAC	50	TTATGGG	115	+

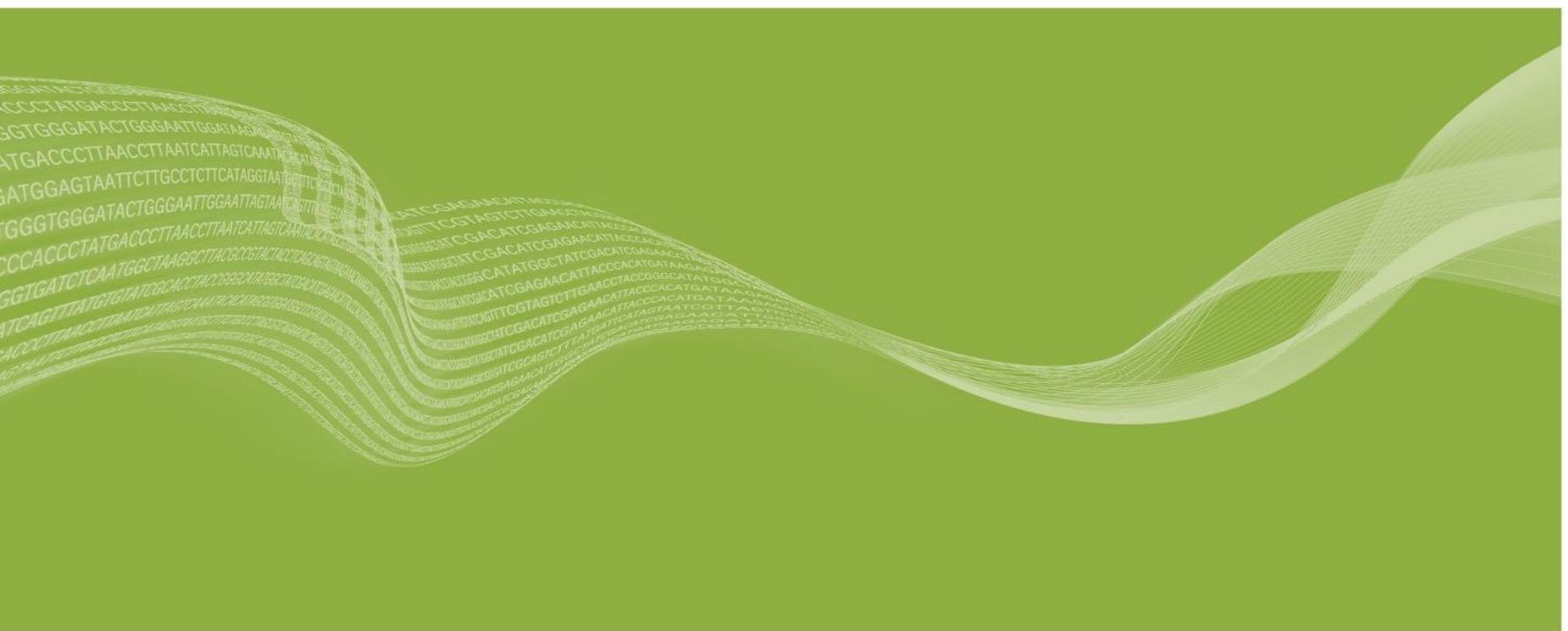
# IEMの起動と、初期設定の確認



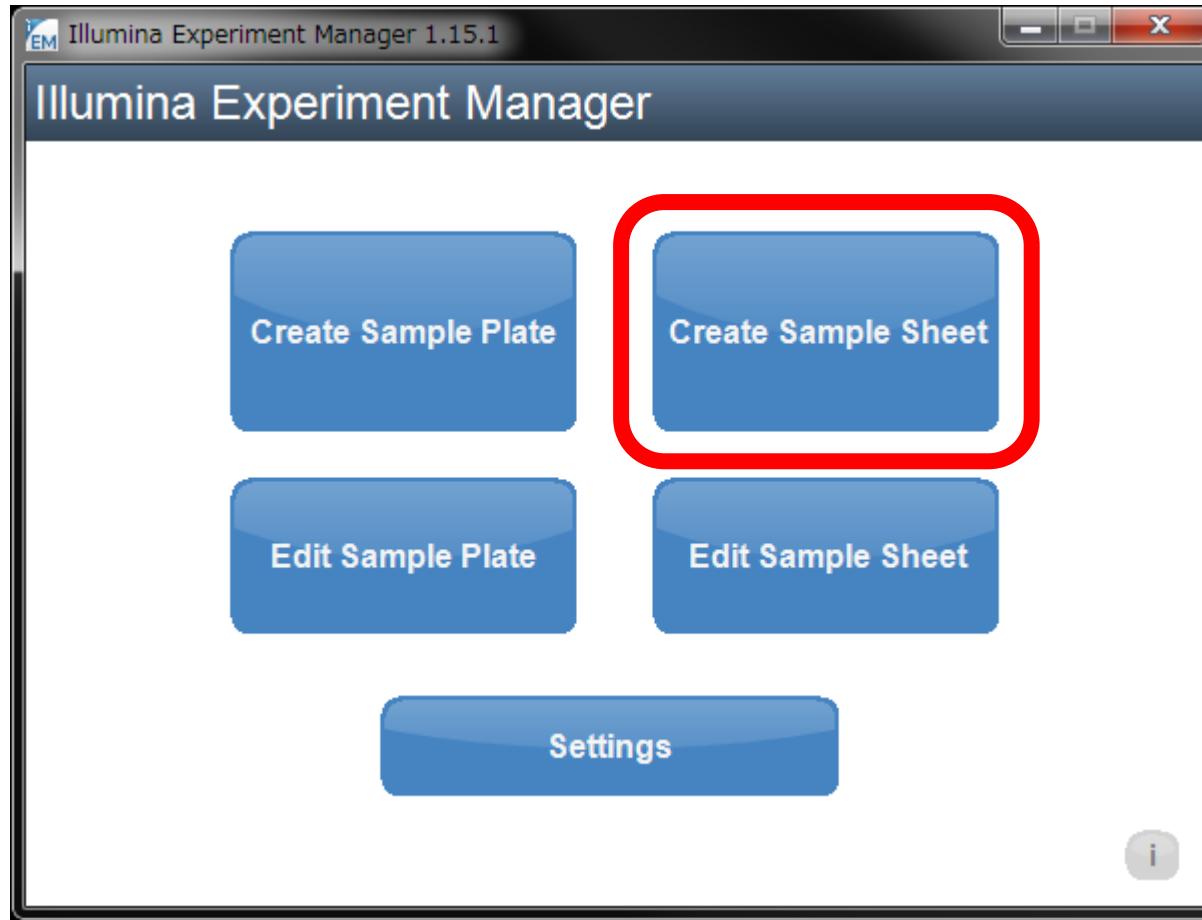
# IEMの各ファイルのデフォルト保存先(MiSeq)



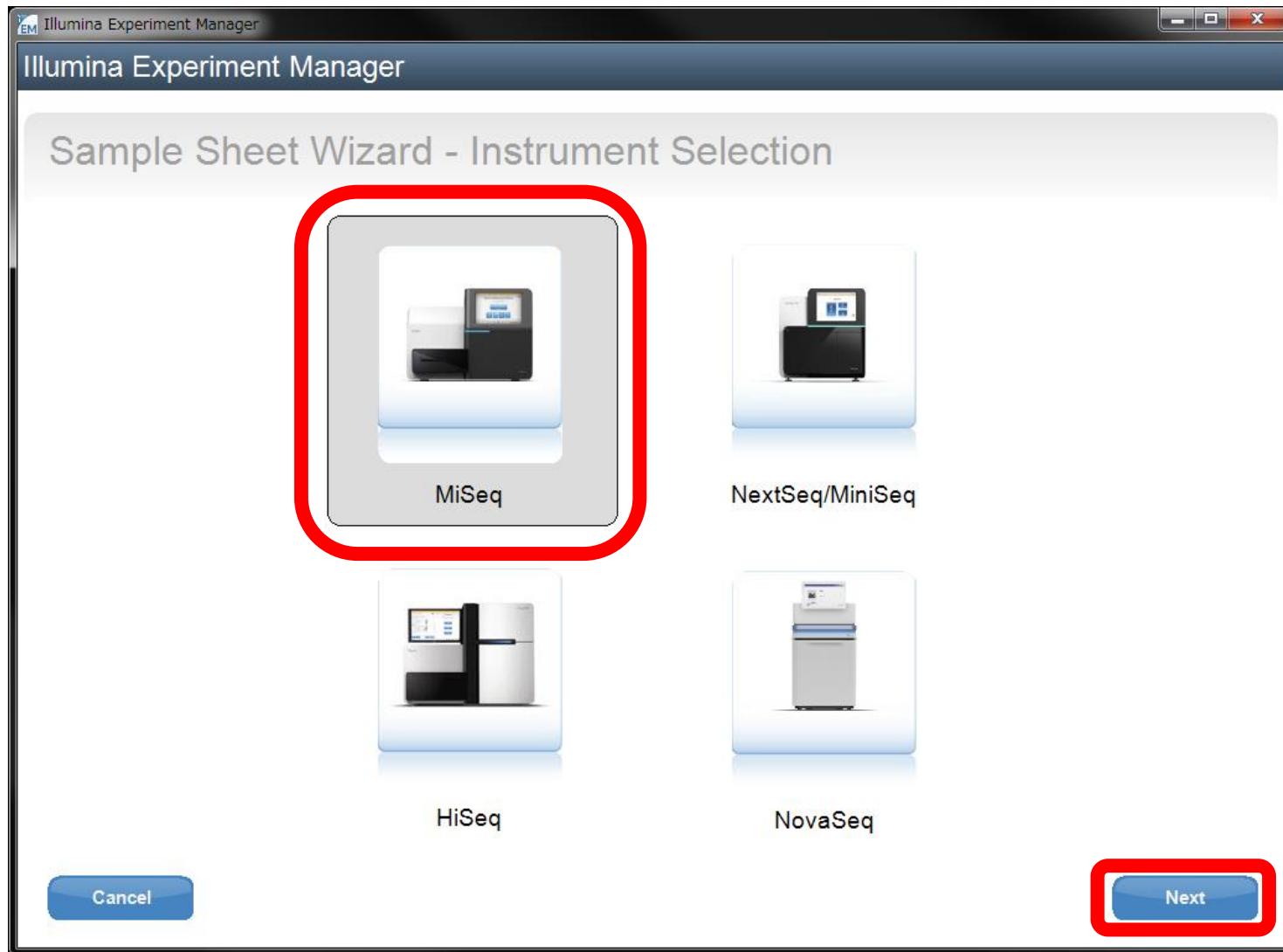
# サンプルシート作成と ランセットアップのワークフロー



# 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



# アプリケーション一覧



Targeted Resequencing

Targeted Resequencing



Small Genome Sequencing

Small Genome Sequencing



RNA Sequencing

RNA Sequencing



Other

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\*

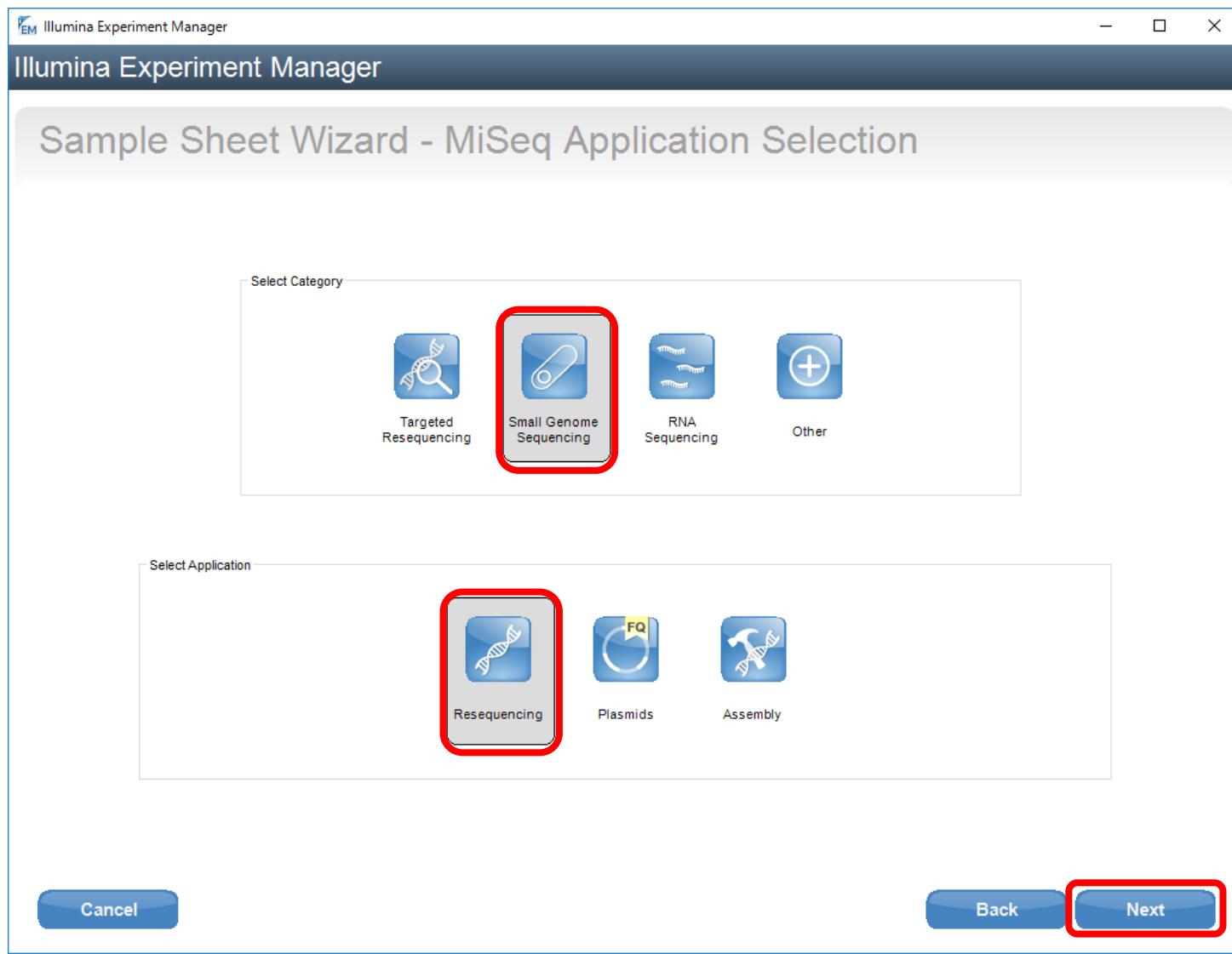
TruSight HLA

Library QC

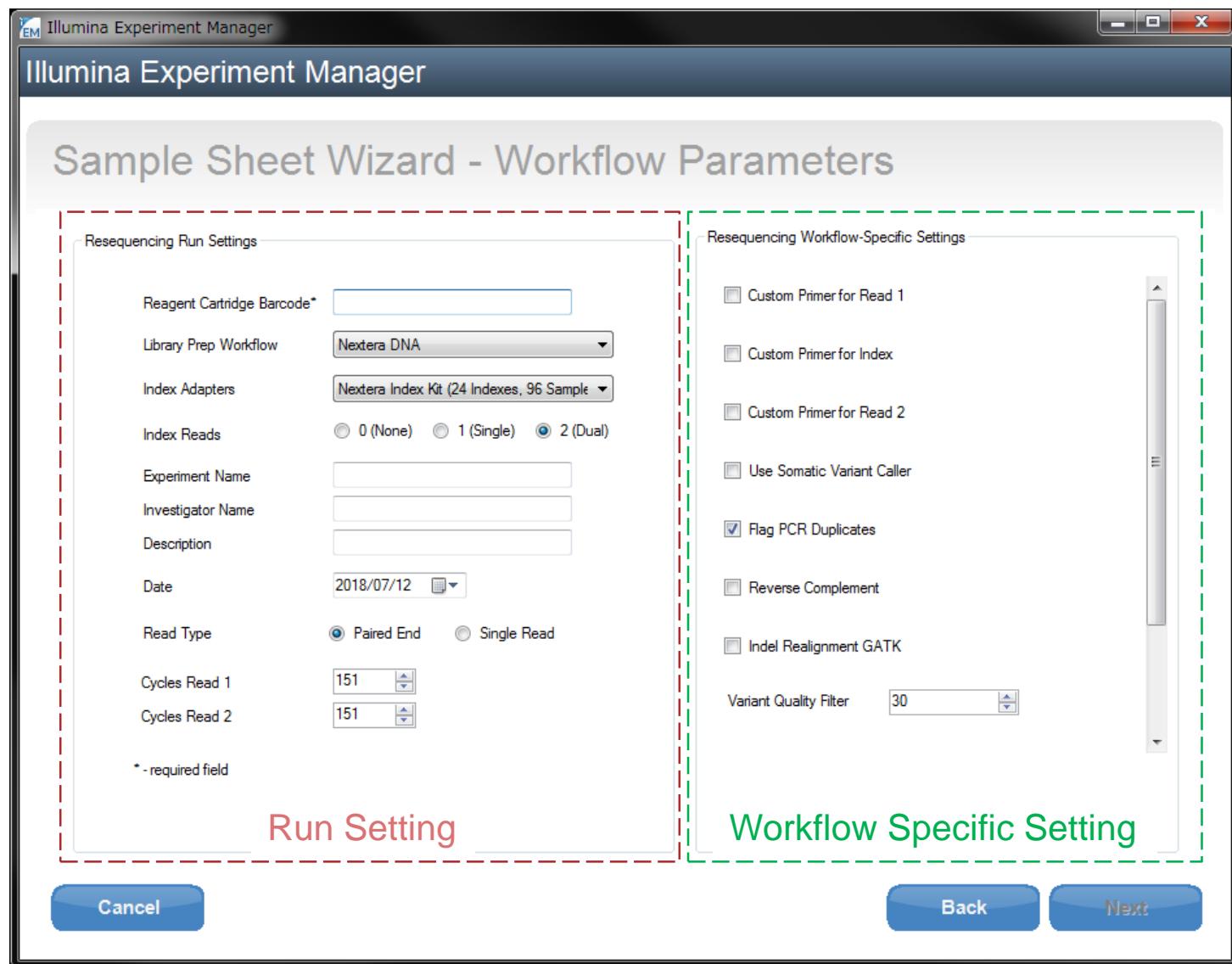
FASTQ Only\*

ChIP-Seq\*

# Application の選択; Resequencing の例



# Workflow Parameters の設定



# 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"/>
Library Prep Workflow	Nextera DNA
Index Adapters	Nextera Index Kit (24 Indexes, 96 Sample)
Index Reads	<input type="radio"/> 0 (None) <input type="radio"/> 1 (Single) <input checked="" type="radio"/> 2 (Dual)

使用したライブラリー調製キットを選択

使用したインデックスアダプターを選択

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。

Experiment Name

実験名

Investigator Name

実施者名

Description

説明事項

Date 2018/07/12

実施日

Read Type Paired End

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

illumina®

# 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

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>		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>	Truseq Amplicon 以外	
<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

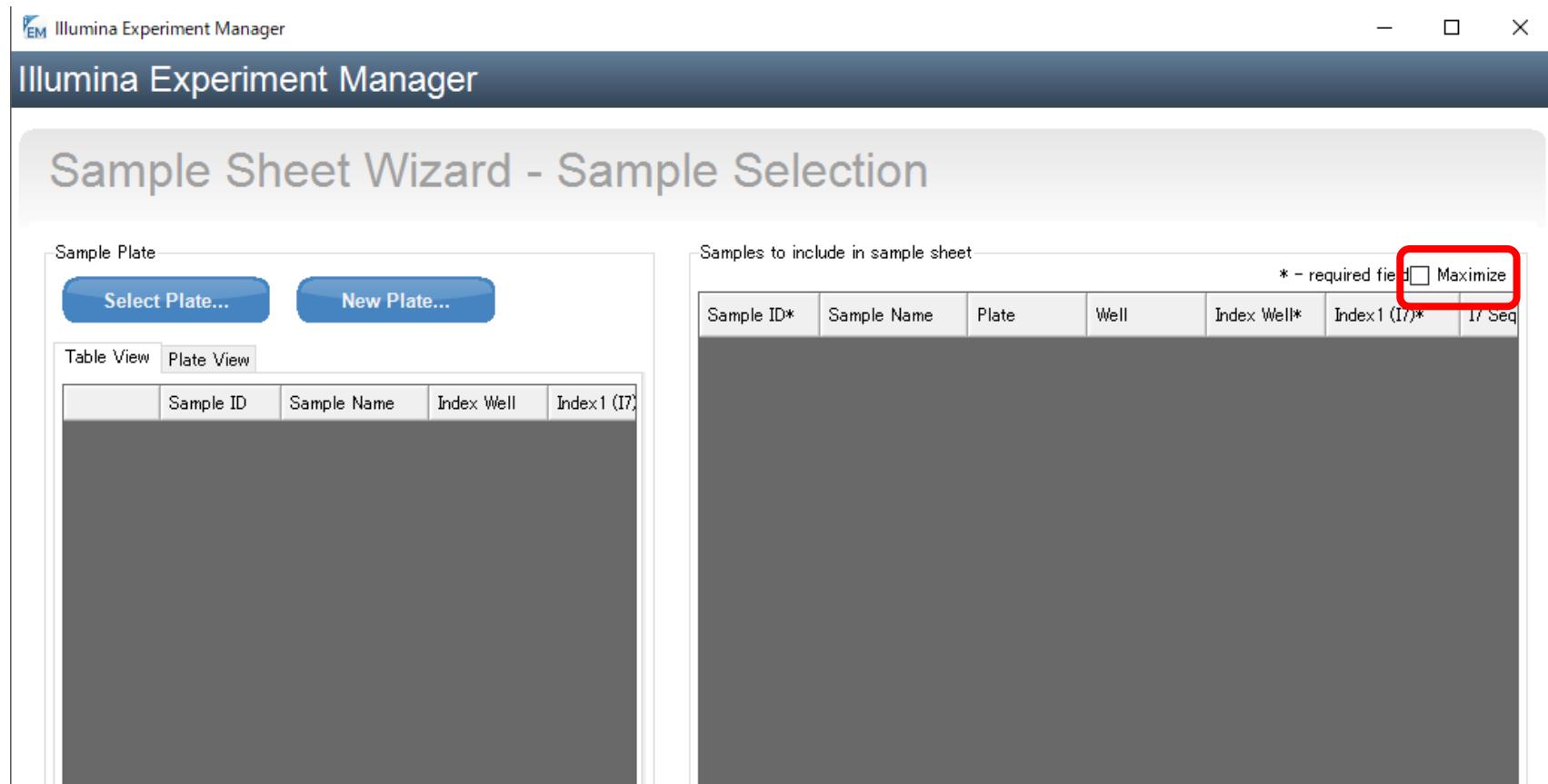
# Workflow-specific Setting ③

Setting	Applications	Description
Reverse Complement	Resequencing, Library QC, FASTQ Only, ChIP-Seq	Nextera Mate Pair ライブライリのリードを逆相補鎖に変換する
K-mer size	Assembly	アッセンブリに使用する K-mer サイズを設定する
Genome	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>
Export to gVCF	PCR Amplicon, TruSeq Amplicon, Enrichment	gVCF を出力する
Genus-level Classification	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



# 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      Index情報

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index Well*	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
PhiX			A01	D701	ATTACTCG	D501	TATAGCCT		
PhiW			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	GAATTCTG	D502	ATAGAGGC		
PhiJ			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						

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 ②

**Illumina Experiment Manager**

**Sample Sheet Wizard - Sample Selection**

Samples to include in sample sheet

Sample ID*	Sample Name	Plate	Well	Index Well*	Index1 (I7)*	I7 Sequence	Index2 (I5)*	I5 Sequence	Genome Folder*
PhiX				A01	D701	Arabidopsis_thaliana#NCBI#build 9.1#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiW				A02	D702	Bos_taurus#Ensembl#UMD3.1#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiV				A03	D703	Escherichia_coli_K_12_DH10B#NCBI#2008-03-17#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiT				A04	D704	Homo_sapiens#UCSC#hg19#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiS				A05	D705	Mus_musculus#UCSC#mm9#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiR				A06	D706	PhiX#Illumina#RTA#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiQ				A07	D707	Rattus_norvegicus#UCSC#rn4#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiP				A08	D708	Saccharomyces_cerevisiae#UCSC#sacCer2#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiO				B01	D701	Staphylococcus_aureus_NCTC_8325#NCBI#2006-02-13#Sequence#WholeGenomeFasta			
PhiN				B02	D702				
PhiM				B03	D703	CCTCATTC 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	TCCGGAGA D503	CCTATCCT		

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 ③

**Illumina Experiment Manager**

**Sample Sheet Wizard - Sample Selection**

Samples to include in sample sheet										* - required field	<input checked="" type="checkbox"/> 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		
PhiW				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			

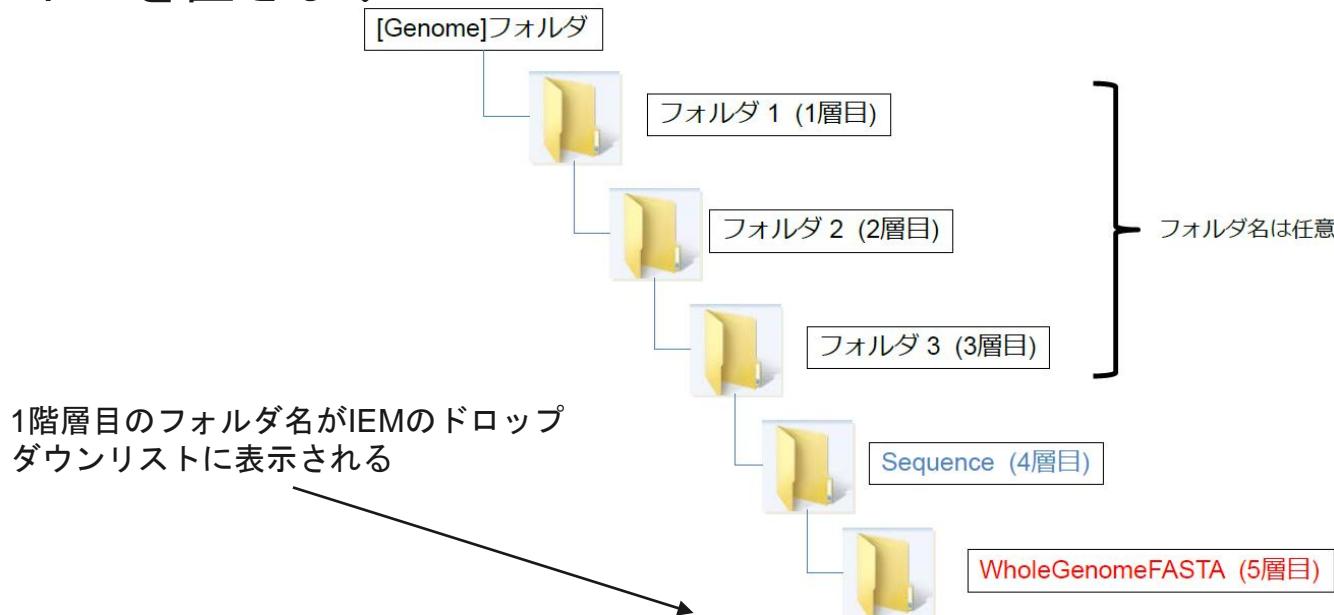
Add Blank Row      Remove Selected Rows      ?

Sample Sheet Status: **Valid**  
Reason:

**Finish** → **終了**      Back      **Finish**

# 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	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAAGTCCAGTC								
AdapterRead2	AGATCGGAAGAGCGTCGTAGGGAAAGAGTGT								
[Data]									
Sample_ID	Sample_Name	Sample_Plate	Sample_Well	Index_Plate	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2	GenomeFolder
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
									Sample_Project Description

# 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 “ ” で囲まれていないか

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:\llumina\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 !

i7 index	
N701	TAAGGCCGA
N702	CGTACTAG
N705	GGACTCCT
	✓✓✓✓✓✓✓✓
cycles	12345678



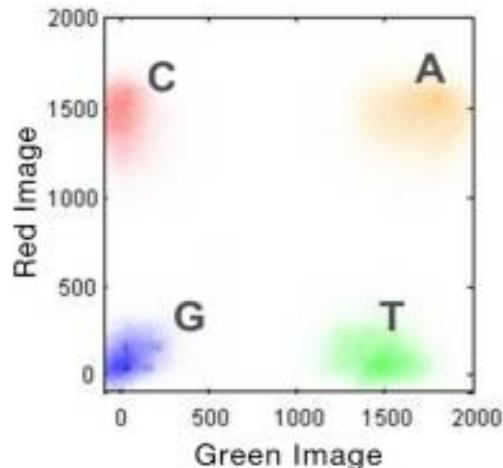
Bad !

i7 index	
N701	TAAGGCCGA
N704	TCCCTGAGC
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



カラーバランスの良好なIndexの組み合わせの例  
Good !

i7 index	
D705	ATT <b>CAGAA</b>
D704	<b>GAA</b> TTCGT
D712	AGC <b>GATAG</b>
	✓✓✓✓✓✓✓
cycles	12345678



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  
Bad !

i7 index	
N704	T <b>CCTGAGC</b>
N707	<b>CTCTCTAC</b>
N718	GG <b>AGCTAC</b>
	✓✓✓XX✓✓X
cycles	12345678



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  
Bad !

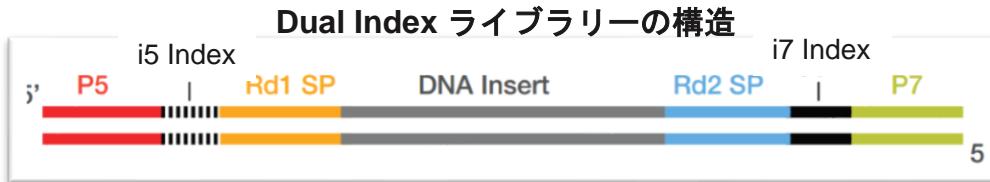
i7 index	
N705	GG <b>A</b> CTCCT
N718	GG <b>A</b> GCTAC
	XX✓X✓✓✓✓
cycles	12345678

# 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

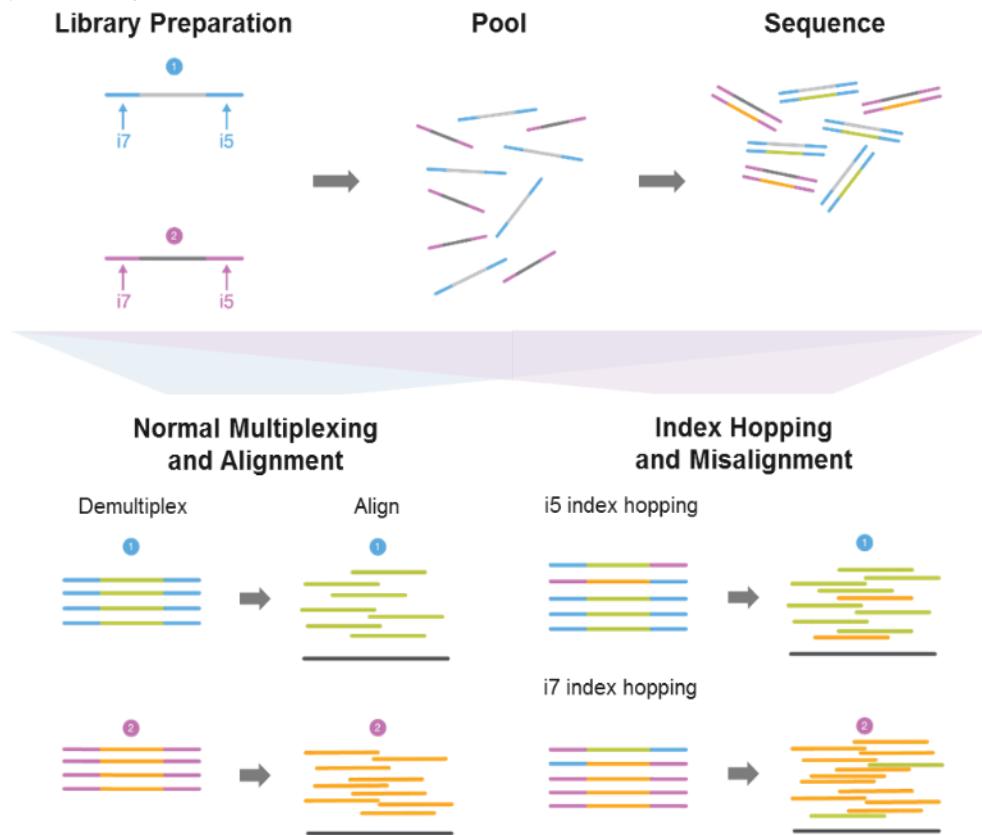
sample	i7 index	i5 index
1	CCGCGGTT	AGCGCTAG
2	TTATAACC	GATATCGA
3	GGACTTGG	CGCAGACG
4	AAGTCCAA	TATGAGTA

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



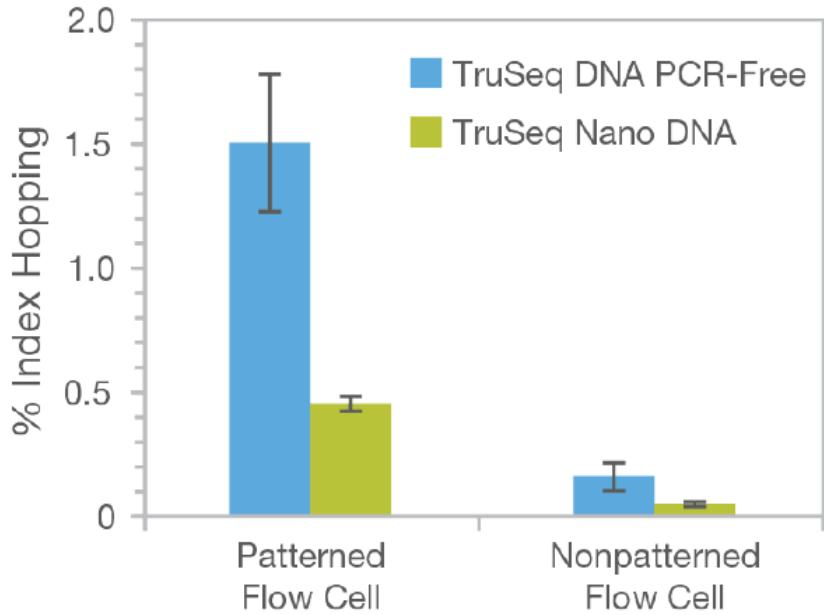
複数ライブラリーをPooling  
し、シーケンスを実施

シーケンスの後の、  
Demultiplex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  
間で組みかえられた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



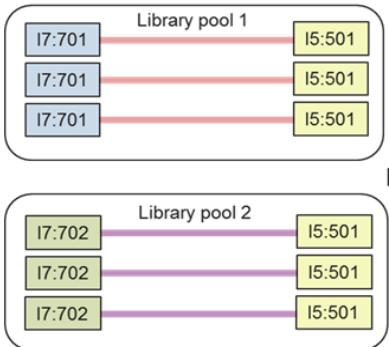
- その他Index hoppingの詳細については、[White Paper](#)をご参照ください

<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

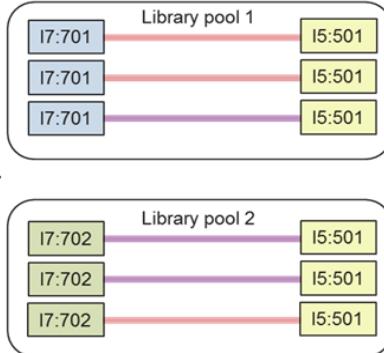
- UD Indexを使用したランでは、Index hoppingを生じたリードは、Demultiplexingによって、Undermined Read（どのライブラリーにも使用していないIndexの組み合わせ）として振り分けられ、各ライブラリーのリードに、コンタミネーションとして混ざることがない。

UDIを用いていない場合

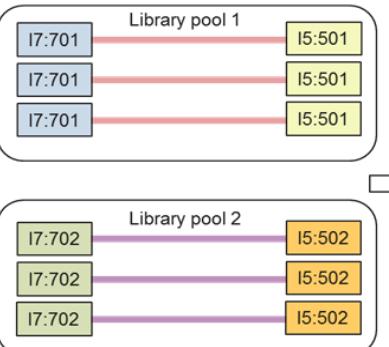


Index hopping

Demultiplexing後

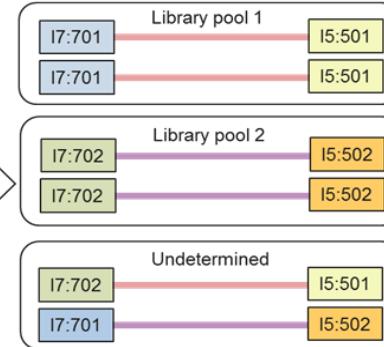


UDIを用いている場合



Index hopping

Demultiplexing後



# 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、ブロッキ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。

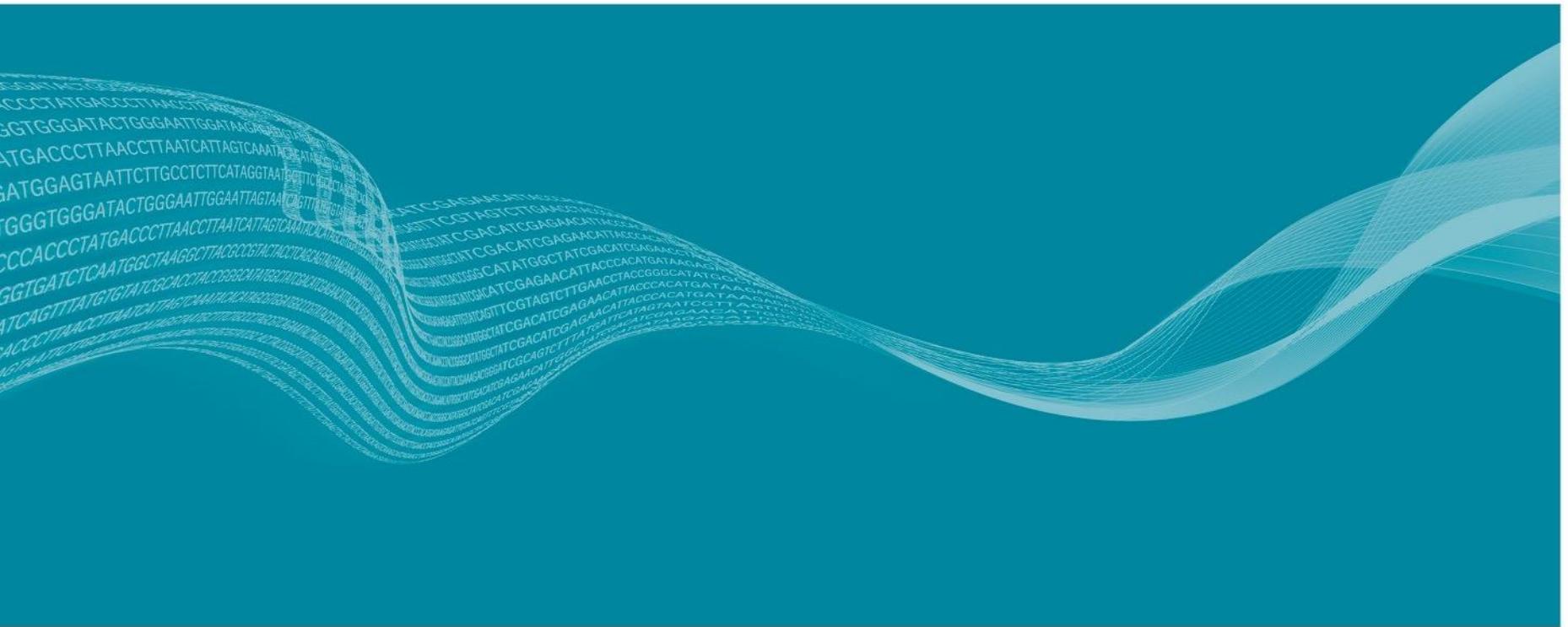
- 上記RNAキットと組み合わせて使用可能なUD Index

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

価格は2018年7月25日現在の価格です。



# 補足事項



# Software Guide について

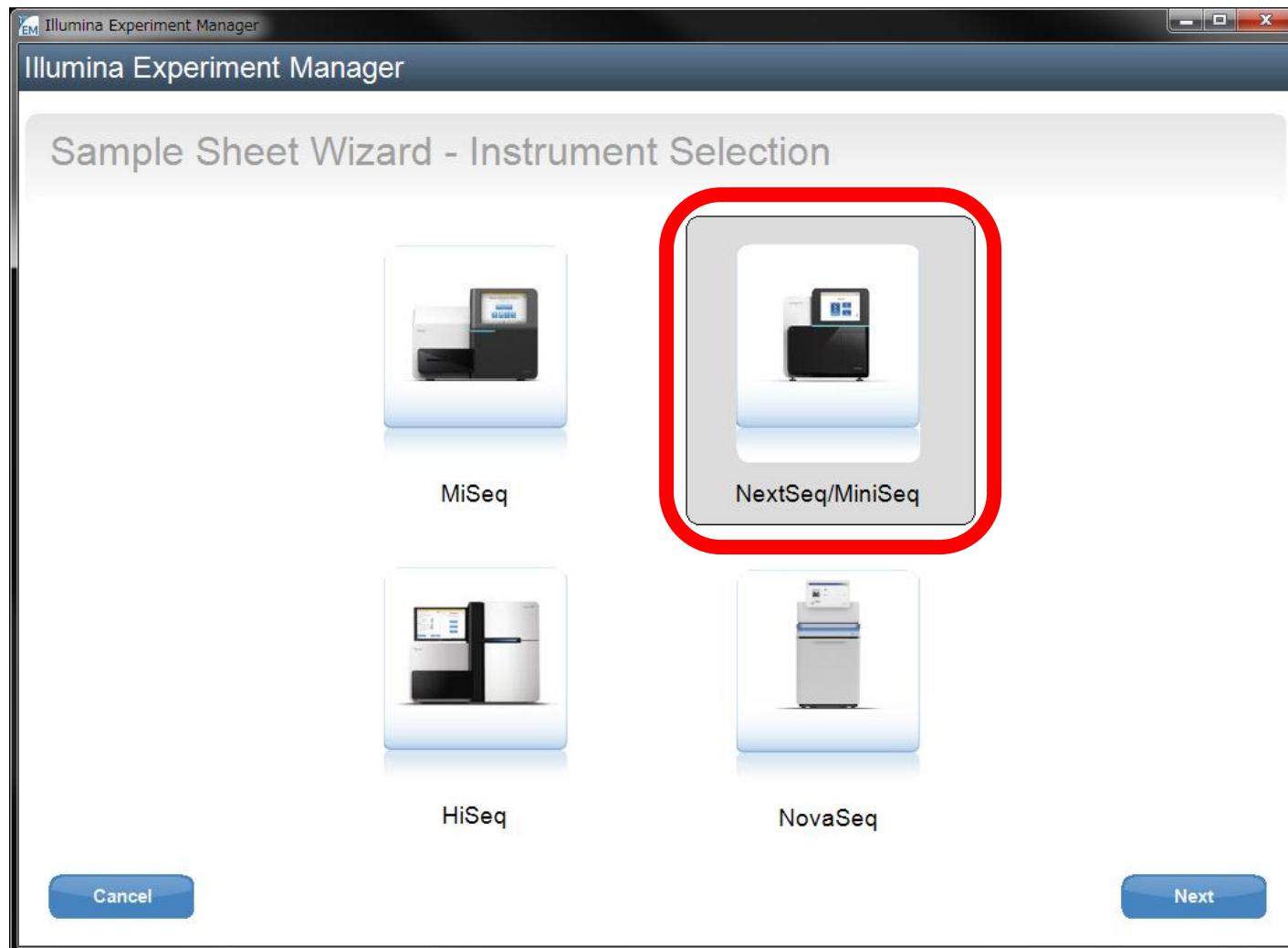
- ▶ **Illumina Experiment Manager Software Guide**  
[http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/experiment\\_manager.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager.html)
- ▶ **MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide**  
[http://support.illumina.com/downloads/miseq\\_sample\\_sheet\\_quick\\_reference\\_guide\\_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 a web browser window displaying the Illumina support website at [http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/trusight\\_one\\_kit/documentation](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit/documentation). The page title is "TruSight One Sequencing P...". The left sidebar menu includes "Downloads", "Documentation & Literature" (which is highlighted with a red box), "Training", "Questions & Answers", "Best Practices", "Bulletins", "Webinars", and "Product Ordering Information". The main content area starts with a brief introduction: "This guide contains everything a first-time user needs, including an overview of the TruSight One Sequencing Panel protocol, tips and techniques, protocol steps, kit contents, and user-supplied consumables." Below this, there are three expandable sections: "+ TruSight One Sequencing Panel Protocol Guide", "+ TruSight One Sequencing Panel Checklist", and "+ TruSight One Sequencing Panel Consumables and Equipment". The "Experimental Design Documentation" section follows, containing a table with columns for "DESCRIPTION", "FILE INFO", and "DATE POSTED". The "DESCRIPTION" column lists "- IEM TruSight Quick Reference Card" (which is highlighted with a red box) and "+ Create TruSight Sample Plates and Sample Sheets with IEM Quick Reference Card (15048138 v01)". The "FILE INFO" column shows "PDF (< 1 MB)" and the "DATE POSTED" column shows "02/03/2016". The "DATE POSTED" header has a "Top" link above it. The "Supporting Documentation" section is also visible at the bottom.

# 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.illuminakk.co.jp/events/webinar\\_japan.ilmn?ws=ss](http://www.illuminakk.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)