

トラブルシューティング編 ～Bioanalyzerを使用したライブラリーQCと適切な定量方法～ 【イルミナiSchool 初級】

小寺 啓文

テクニカルアプリケーションサイエンティスト

March 27, 2019



本日の Outline

- **なぜライブラリーQCが必要か？**

- 正確なライブラリーサイズ（構造）を知ることの重要性
- 正確にライブラリー濃度を測定する重要性

- **最終ライブラリーの期待されるトレース**

- 期待されるトレース
(TruSeq DNA Nano, TruSeq PCR Free, RNA-seq libraries, TruSeq Small RNA, Nextera XT, Nextera DNA Flex, Ampliconライブラリー)

- **起こりうる問題点および対策**

- 期待と異なるサイズ
(TruSeq DNA kits, TruSeq RNA kits, Nextera XT, Nextera)
- ピークの消失
(TruSeq and Nextera, TruSeq DNA and RNA, TruSeq Small RNA, Nextera)
- 目的外の大きなサイズのピーク
- 目的外の小さなサイズのピーク
(TruSeq, Nextera)

なぜライブラリーQCが必要か？

適切なライブラリー構造と濃度は、
データ品質と総データ出力量の点で
シーケンスパフォーマンスに
大きな影響を与えます。



期待通りのラン結果を得るためには、
ライブラリーの品質管理が重要です。

正確なライブラリーサイズ（構造）を知ることの重要性

- もし、ライブラリーにアダプター配列が適切に付加されていない場合にはフローセル上でクラスター形成ができないため、データが得られません。
- 各種フローセルに対して、適切な最終ライブラリー濃度があります。もし、ライブラリーのサイズを適切に測定できていない場合にはモル濃度が適切に計算できないため、ライブラリー濃度を誤るリスクが生じます。
- アダプターダイマーはフローセル上でクラスターを形成するため、もし、高い割合のアダプターダイマーの混入がある場合アダプターダイマー由来のリードにデータ量を奪われてしまうデメリットがあります。

正確にライブラリー濃度を測定する重要性



推奨クラスター密度 (**PhiX Control ライブラリー**の場合)

PhiX loading concentrations for validation runs on Illumina sequencing platforms

http://jp.support.illumina.com/content/illumina-support/apac/ja_JP/bulletins/2016/10/phix-loading-concentrations-for-validation-runs-on-illumina-sequencing-platforms.html

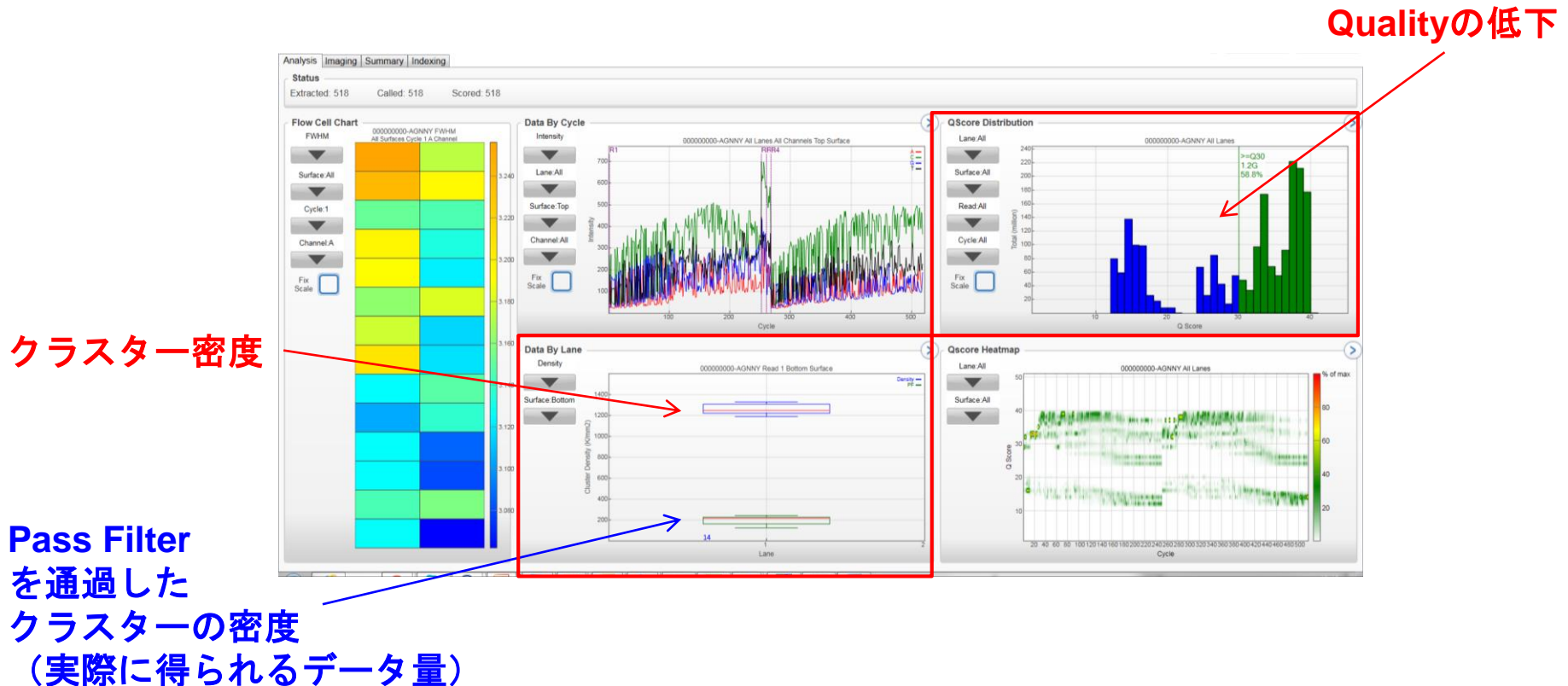
Platform	Optimal Loading Concentration	Optimal Raw Cluster Density
HiSeq 2000/2500 High Output v3	12 pM	750-850K clusters/mm ²
HiSeq 2500 High Output v4	18 pM	950-1050K clusters/mm ²
HiSeq 2500 Rapid Run v2	12 pM	850-1000K clusters/mm ²
HiSeq 3000/4000	2-3 nM*	N/A**
MiniSeq	1.4 pM	170-220K clusters/mm ²
MiSeq v2 reagents	12.5 pM	1000-1200K clusters/mm ²
MiSeq v3 reagents	20 pM	1200-1400K clusters/mm ²
NextSeq High Output reagents	1.8 pM	170-220K clusters/mm ²
NextSeq Mid Output reagents	1.5 pM	170-220K clusters/mm ²
NovaSeq - NovaSeq Control Software v1.1 or lower	300 pM	N/A**
NovaSeq - NovaSeq Control Software v1.2 or later	175 pM	N/A**
iSeq 100	60 pM	N/A**

*Nondenatured pre-ExAmp concentration.

**Patterned flow cells consist of a nanowell with ordered wells.

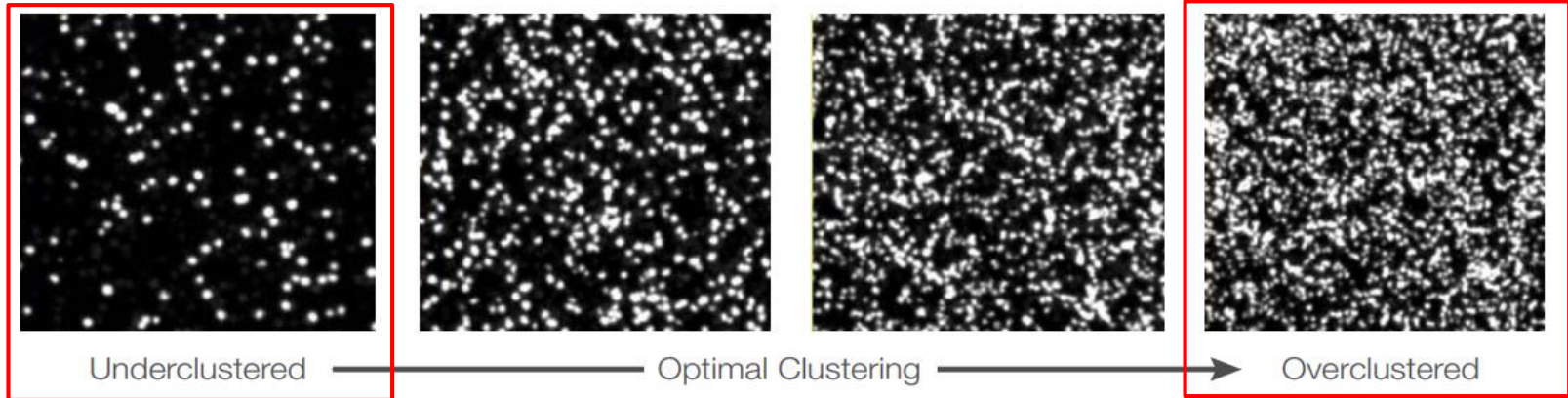
正確にライブラリー濃度を測定する重要性

- ライブラリー濃度が高すぎる（クラスター密度が高すぎる）場合、%PF（取得データ量）の低下や、クオリティ低下がおこりえます。

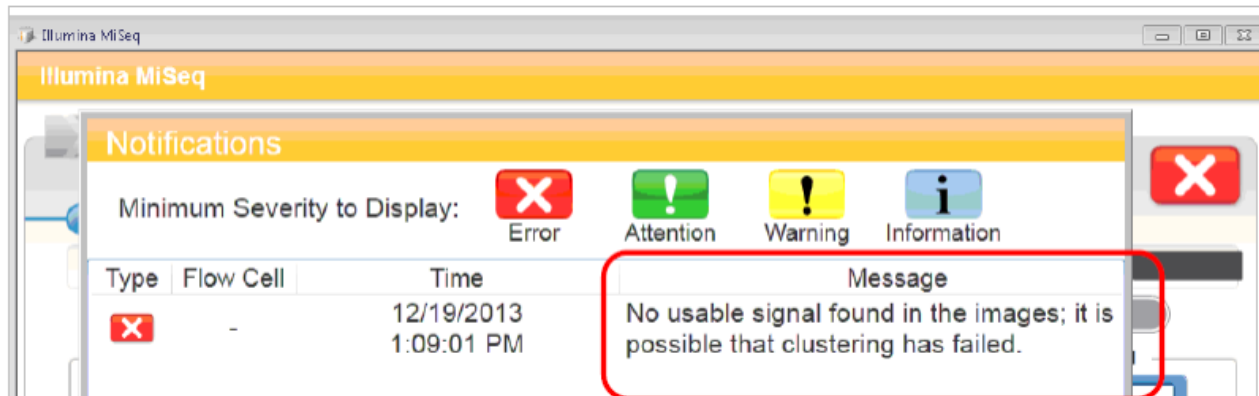


正確にライブラリー濃度を測定する重要性

- さらに極端にクラスター密度が高すぎる、または低すぎる状態は



クラスター由来の蛍光とバックの明るさの比（Signal to Noise比）が低くなりフォーカスを合わせにくくなるため、フォーカスエラーでランが中断する原因になり得ます。



本セッションの目的

期待通りのシーケンス結果が得られるように、
弊社のライブラリー調製キットを用いて得られたライブラリーに対して
適切なライブラリー構造が得られているのかが確認できるようになることを目的とし
その目的の達成のために

バイオアナライザーで品質チェックした場合の

- 1) 期待される検出パターンをご案内するとともに、
- 2) 予想とは異なる結果が得られた場合のトラブルシューティングの方法
についてご案内いたします。

関連ウェビナー録画

(ライブラリーが原因で生じる問題について)

SAV (Sequencing Analysis Viewer) でランの評価と改善を行う

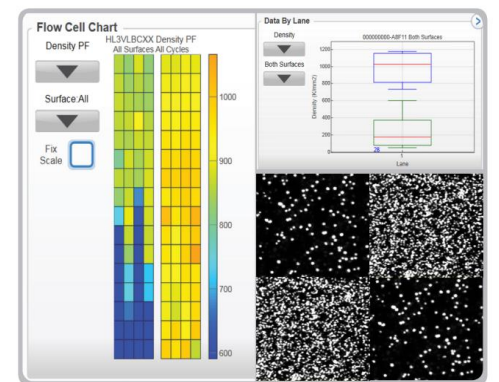
https://jp.illumina.com/events/webinar/2017/webinar_170614_j.html

MiSeqのランのセットアップ時・開始時によくあるトラブルの対処方法

https://jp.illumina.com/events/webinar/2017/webinar_170726_j.html

Optimizing Cluster Density on Illumina Sequencing Systems

<https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/miseq-overclustering-primer-770-2014-038.pdf>



Optimizing Cluster Density on Illumina Sequencing Systems

Understanding cluster density limitations and strategies for preventing under- and overclustering.

本日のTopic

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

ピークの消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

目的外の
小さなサイズの
ピーク

- TruSeq Nano DNA, TruSeq DNA PCR Free
- Nextera DNA, Nextera DNA Flex, Nextera XT

DNA ライブラリー

- TruSeq Stranded mRNA, TruSeq Stranded Total RNA, TruSeq RNA V2
- TruSeq RNA Exome
- TruSeq Small RNA

RNA ライブラリー

- TruSeq Targeted RNA
- TruSight Tumor 15

Amplicon ライブラリー

本日のTopic

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

ピークの消失

目的外の
大きなサイズの
ピーク

目的外の
小さなサイズの
ピーク

ウェビナー録画

(本日ご紹介しないDNA濃縮ライブラリーや
AmpliSeqライブラリーに関するウェビナー)

- **DNA Enrichment ライブラリー**

TruSeq Rapid Exome & TruSeq Exome Library Prep Kitを用いた
Easy Prep Exome 【イルミナiSchool 中級】

- https://jp.illumina.com/events/webinar/archive/webinar_160527_j.html

- **AmpliSeq ライブラリー**

イルミナで AmpliSeq for Illumina パネル解析をはじめよう
-製品紹介とライブラリー調製編- 【イルミナiSchool 初級】

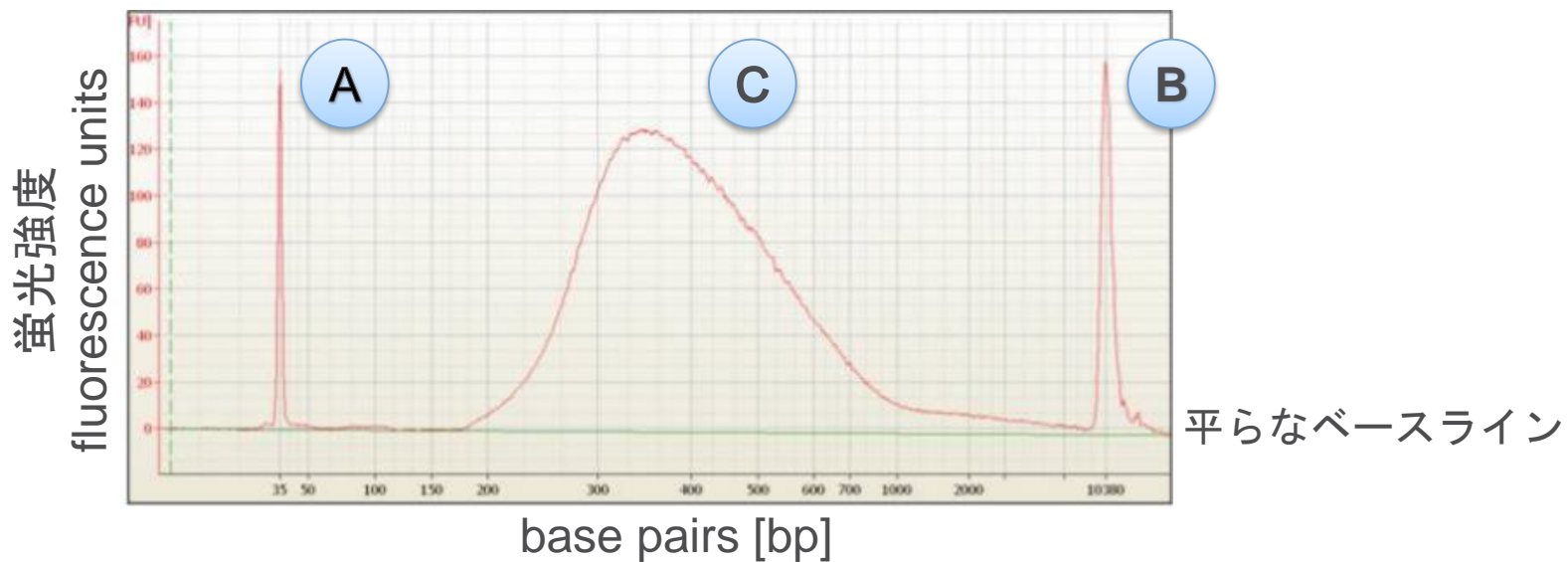
<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-180425-j.html>





期待されるトレース

定性では、アガロースゲル電気泳動よりも、
より精密にライブラリーサイズを確認する必要がある
→ Bioanalyzerの使用が有効！



A Lower marker **C** Library **B** Upper marker

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

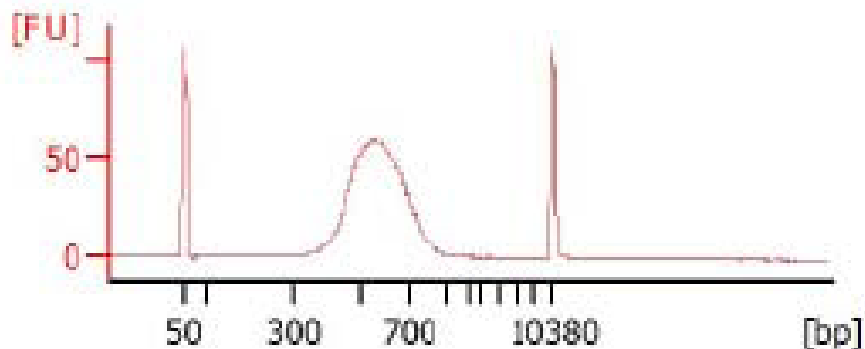
ピークの
消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

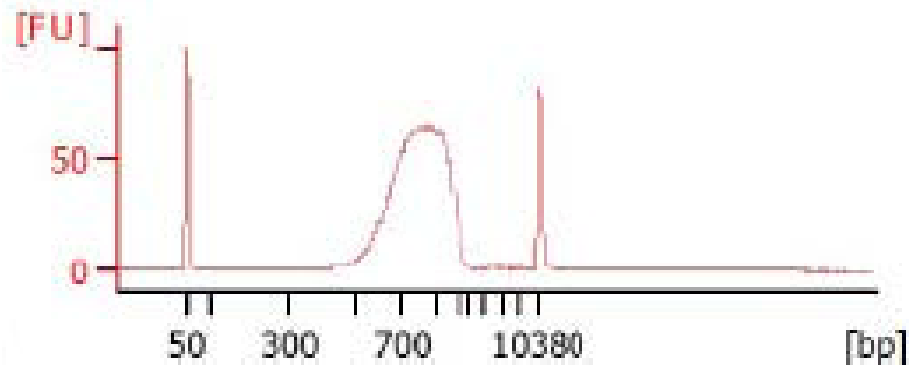
目的外の
小さなサイズ
のピーク

期待されるトレース: TruSeq DNA Nano

TruSeq DNA Nano 350 bp insert



TruSeq DNA Nano 550 bp insert

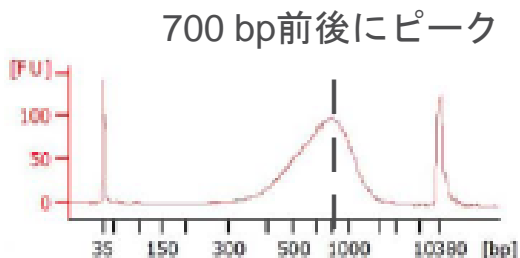


TruSeq Nano DNA Kit は、SPB ビーズによるサイズセレクションがある。最終ライブラリーには、インサートと～120 bp (single indexed adapter) または～135 bp (CD index kit or UD index kit) のアダプターが含まれる。



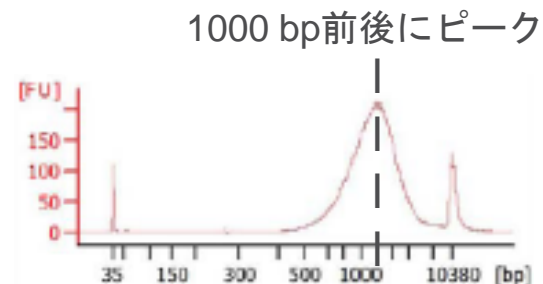
期待されるトレース: TruSeq PCR Free

TruSeq PCR Free 350 bp insert



最終ライブラリーの
トレース

TruSeq PCR Free 550 bp insert



バイオアナライザーのマーカが2本鎖DNAなのに対して、末端のY字アダプターは1本鎖であるため、立体障害の影響により泳動速度が遅くなり、実際よりも大きなライブラリーサイズのピークとして検出されます。

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

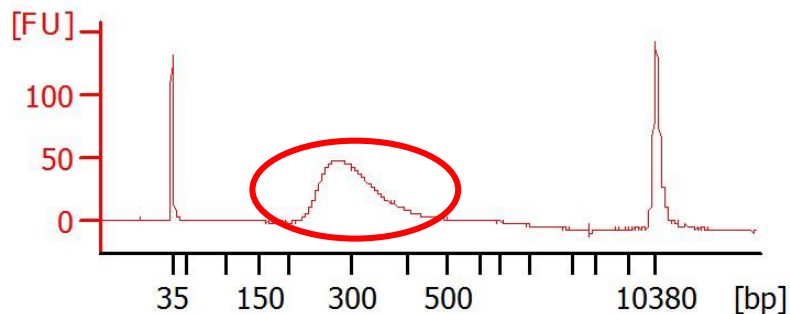
ピークの
消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

目的外の
小さなサイズ
のピーク

期待されるトレース: RNA-Seq libraries

TruSeq RNA ≈ 260 bp



ライブラリーサイズがブロードに見える理由は、RNAの断片化に熱処理が行われている点と、サイズセレクションのステップがないため

TruSeq RNA V2
TruSeq Stranded mRNA
TruSeq Stranded Total RNA
TruSeq RNA Exome (before capture)

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

ピークの
消失

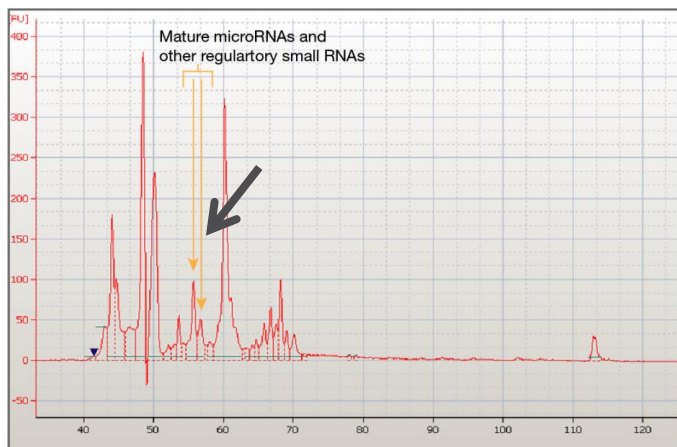
目的外の
大きなサイズの
ピーク

目的外の
小さなサイズの
ピーク

期待されるトレース: TruSeq Small RNA

TruSeq Small RNAライブラリーは、
20-30ヌクレオチドのsmall RNAにアダプターが付加されたライブラリー（145~160 bp）

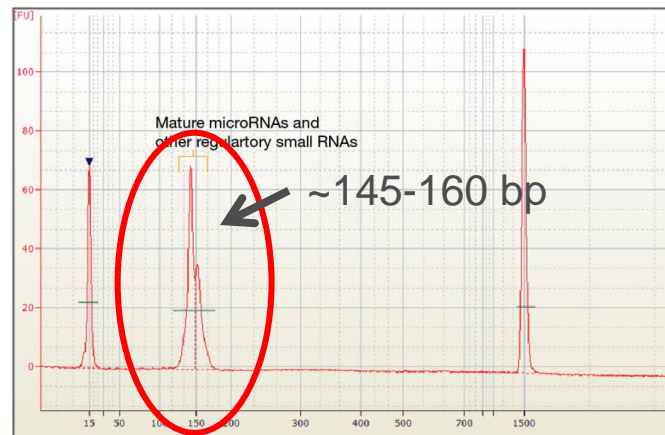
ゲルからの切り出し（PAGE）精製を
する範囲: ~145-160bp



ゲル精製



最終ライブラリーのトレース



シングルピーク

多くのピークが見られるのは問題ない所見
これらの小さなピークは
プライマーとプライマーダイマー
160 bpより大きいピークは、
より大きなRNA種由来

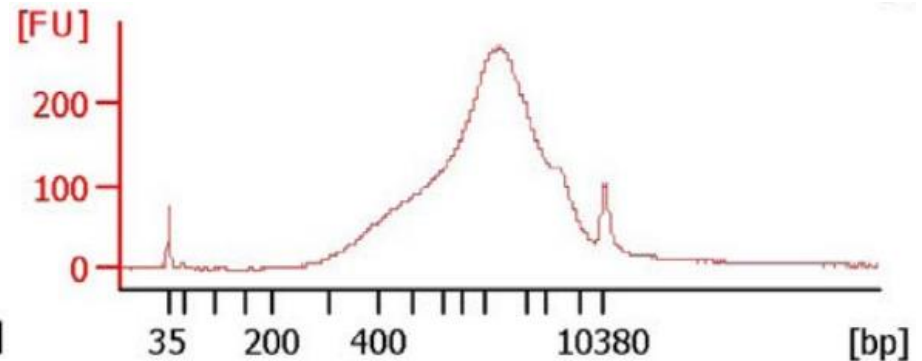
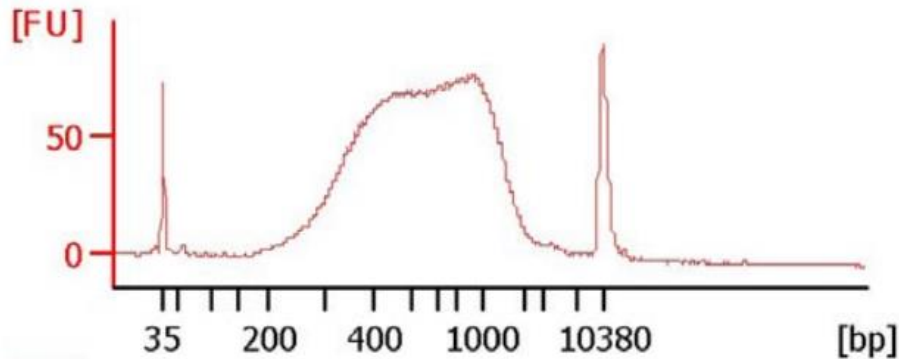
Expected Peaks	Peak Size	Product
	144bp – 150bp	Primary product – miRNA library
150bp – 155bp	Secondary product- often contains pre-miRNA or piRNA	



期待されるトレース: Nextera XT

Nextera XTライブラリーは、幅広いサイズ分布（250 bp ~ 1500 bp）を示す

Nextera XTライブラリーは物理的なせん断ではなく、酵素的断片化を行う。
また、断片化後のサイズ選択はないため、
ライブラリーのサイズは他のライブラリーよりもブロードになる。



Nextera XTライブラリーでは、最終ライブラリーのトレースが、
図のようにライブラリーによって異なるトレースを示しても、どちらもシーケンスが可能。
また、ライブラリーサイズが小さいものの方がクラスター形成効率が高いため、
実際に得られるデータの平均サイズは、トレース上の平均サイズよりも小さくなる。

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

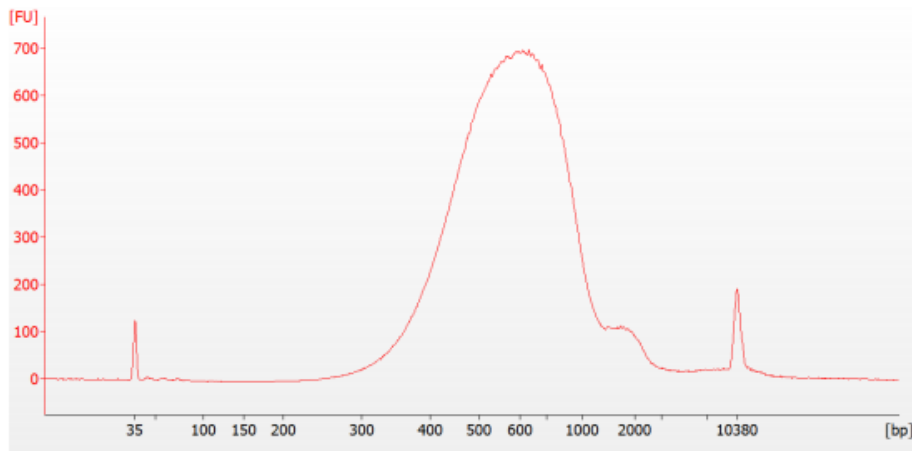
ピークの
消失

目的外の
大きなサイズの
ピーク

目的外の
小さなサイズの
ピーク

期待されるトレース: Nextera DNA Flex

Bioanalyzer (High Sensitivity DNA kit)



およそ150bpから1500bp付近のサイズ分布を示し、平均サイズは~600bp



ウェビナー録画

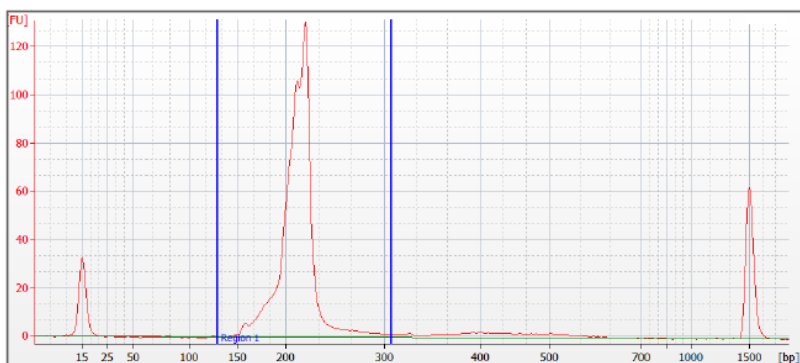
進化したNextera DNA Flexを用いたライブラリー調製【イルミナiSchool 初級】

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-181031-j.html>

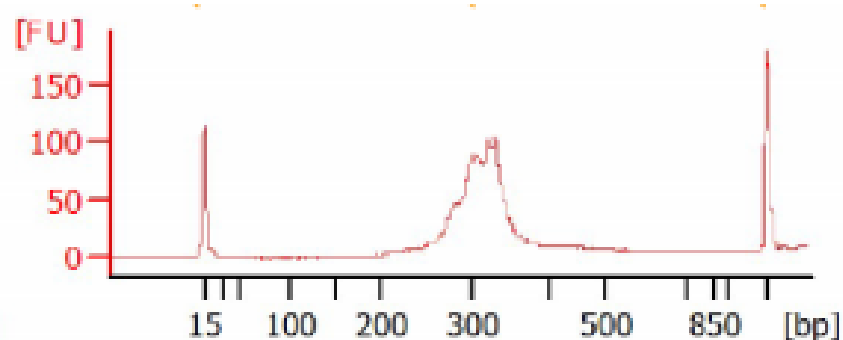


期待されるトレース: Ampliconライブラリー

TruSeq Targeted RNA Expression



TruSight Tumor 15



Amplicon ベースのライブラリーでは、
目的のライブラリーサイズの位置にシャープなピークが得られる。

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

ピークの
消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

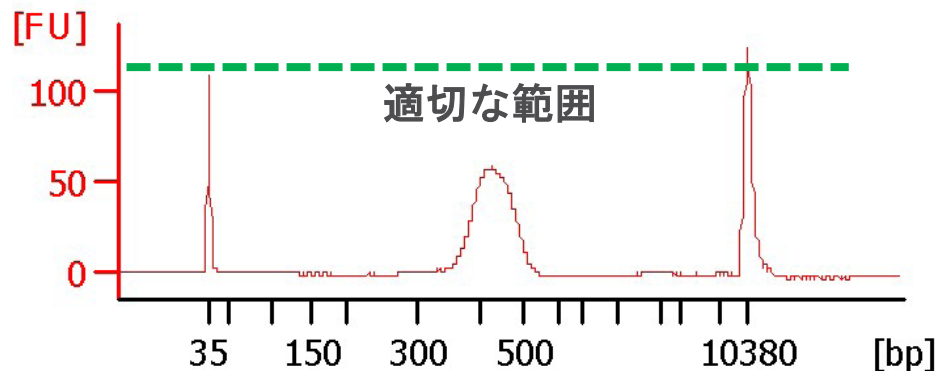
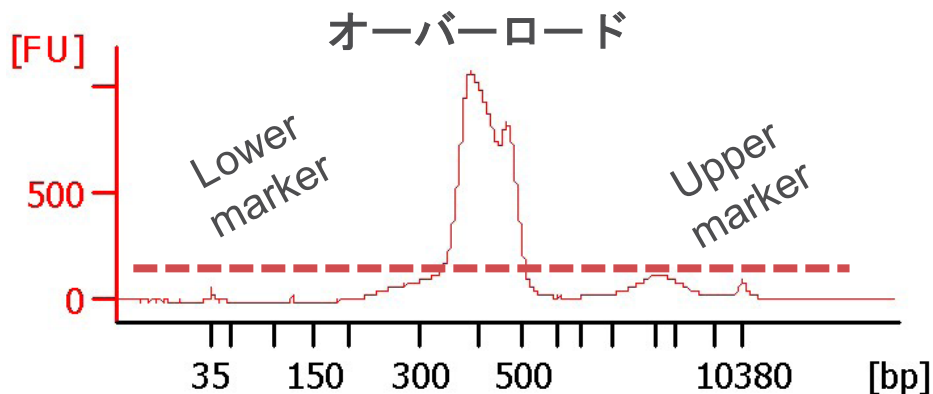
目的外の
小さなサイズ
のピーク



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

illumina®

期待と異なるサイズ ライブラリーのオーバーロード



マーカーのピークを識別することができない
ライブラリーのサイズを確認することが難しい
アーチファクトのピークが生じる可能性あり

解決法： ライブラリーを希釈したのち、再解析を行う
適切な検出限界の Bioanalyzer chip を使用する

- High Sensitivity DNA Assay: 5~500 pg/ μ L
- DNA 1000 Assay: 0.1~50 ng/ μ L
- RNA 6000 Nano total RNA Assay: 5~500 ng/ μ L
- RNA 6000 Pico total RNA Assay: 50~5000 pg/ μ L



期待と異なるサイズ: TruSeq DNA kits

小さすぎるライブラリーサイズ

考えられる原因	対策
インプットDNAの質が悪い	ゲル電気泳動、またはBioanalyzerのトレースでDNAが断片化されていないことを確認する
インプットDNAの量が不十分	QubitまたはPicogreenを用いて定量を行う (DNA希釈前の定量がより正確)
ビーズ精製時のサンプルの消失	Best Practicesの手法にしたがってビーズ精製を行う

大きすぎるライブラリーサイズ

考えられる原因	対策
インプットDNAの量が多すぎる	QubitまたはPicogreenを用いて定量する
高分子量DNA除去の過程で、目的の(小さな)DNAが含まれる上清を捨ててしまった	上清を捨てずに、次のステップに用いる

Input DNA/RNA についてのBulletin

DNA/RNA isolation considerations for Illumina Library Preparation Kits

<https://support.illumina.com/bulletins/2016/05/dnarna-isolation-considerations-when-using-truseq-library-prep-kits.html>

Best Practice の具体的な手法

Handling Master Mix Reagents

http://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/truseq-nano-dna-1t-kit/best-practices.html?langsel=/jp/



期待と異なるサイズ: TruSeq RNA kits

小さすぎるライブラリーサイズ

考えられる原因	対策
サーマルサイクラーの温度が指定温度よりも高い (RNA-seq)	サーマルサイクラーの温度調整が正確かを確認
Elute, Prime, Frag インキュベーション (RNA断片化) を8分以上行った	質の良いRNAを用いてElute, Prime, Frag インキュベーションからやり直す

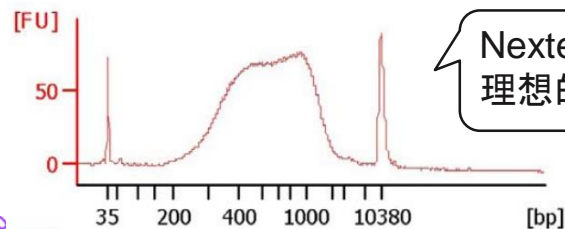
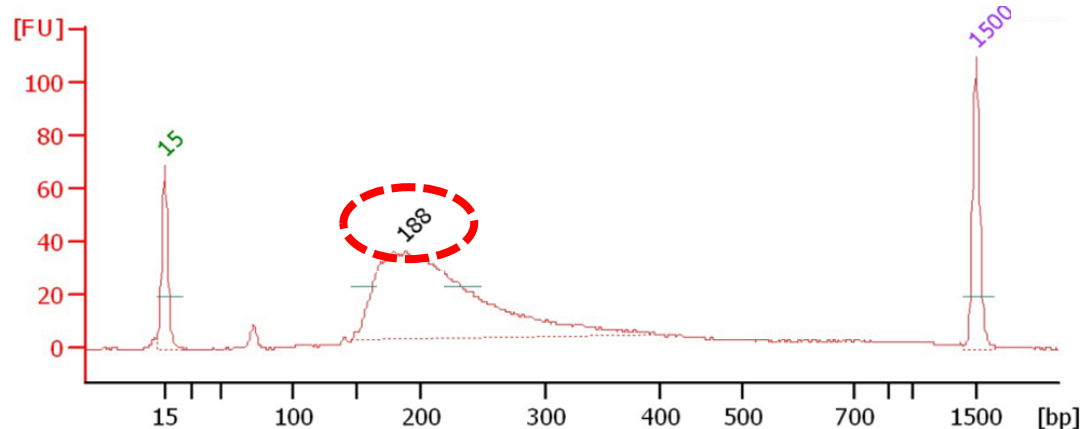
大きすぎるライブラリーサイズ

考えられる原因	対策
サーマルサイクラーの温度が指定温度よりも低い (RNA-seq)	サーマルサイクラーの温度調整が正確かを確認
Elute, Prime, Frag インキュベーション (RNA断片化) が8分未満であった	質の良いRNAを用いてElute, Prime, Frag インキュベーションからやり直す

RNA断片化時間とRNAフラグメントの長さの関係は
TruSeq Stranded Total RNA Reference Guideの36～40ページをご参照ください。

http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-stranded-total-rna-workflow/truseq-stranded-total-rna-workflow-reference-1000000040499-00.pdf

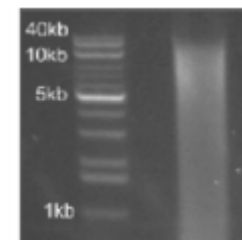
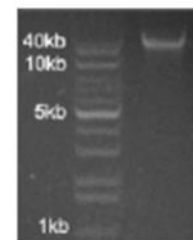
期待と異なるサイズ: Nextera XT 小さすぎるライブラリーサイズ



Nextera XTの場合の理想的なトレース例

望ましい
Input DNA

断片化した
DNA



考えられる原因

対策

インプットDNAの質が悪い

ゲル電気泳動、またはBioanalyzerのトレースでDNAが断片化されていないことを確認する

インプットDNAの量が不十分

QubitまたはPicogreenを用いて定量を行う
(DNA希釈前の定量がより正確)

タグメンテーションの反応時間が長すぎる
または反応温度が推奨より高い

タグメンテーション後、すぐに次のポイントに進む
サーマルサイクラーの温度調整が正確かを確認

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

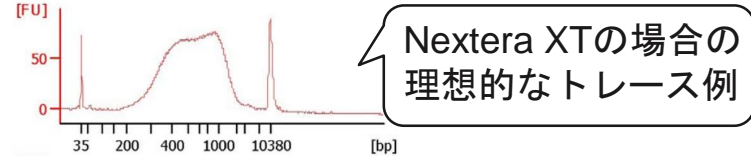
ピークの
消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

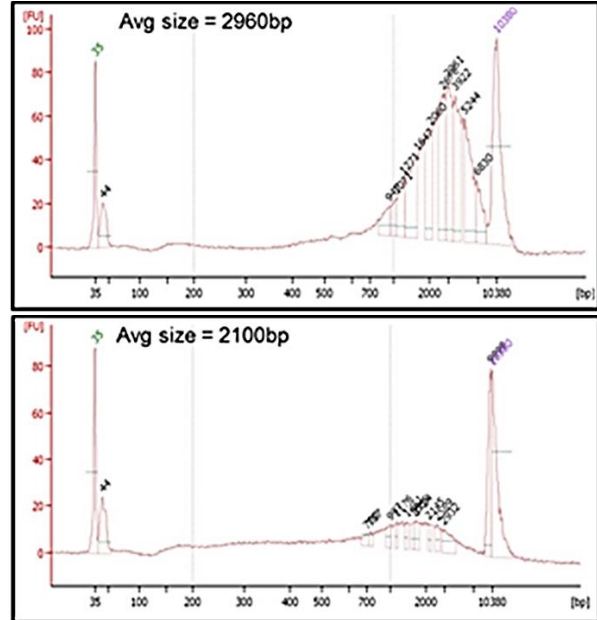
目的外の
小さなサイズ
のピーク

期待と異なるサイズ: Nextera libraries

大きすぎるライブラリーサイズ



考えられる原因	対策
インプットDNAの量が多すぎる	QubitまたはPicogreenを用いて定量を行う
タグメンテーションの反応時間が短すぎる、または反応温度が低い	タグメンテーションの時間を守る。サーマルサイクラーの温度調整が正確かを確認
タグメンテーションの酵素が阻害されている	インプットDNAに夾雑物が含まれていないか確認



タグメンテーションの酵素を阻害する物質としては、抽出したインプットDNAに含まれるEDTAやアルコールなどの例が考えられる。

具体的なリストは「[Nextera Tips and Troubleshooting guide](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-troubleshooting-guide.pdf)」をご参照下さい。



Nexteraライブラリーのトラブルシューティング

ウェビナー録画

- Nextera XT

トラブルシューティング編 -

Nexteraライブラリー調製キットシリーズで
期待通りのライブラリーを得るためのヒント【イルミナiSchool】

https://jp.illumina.com/events/webinar/archive/webinar_150306_j.html

- Nextera DNA Flex

進化したNextera DNA Flexを用いたライブラリー調製【イルミナ
iSchool 初級】

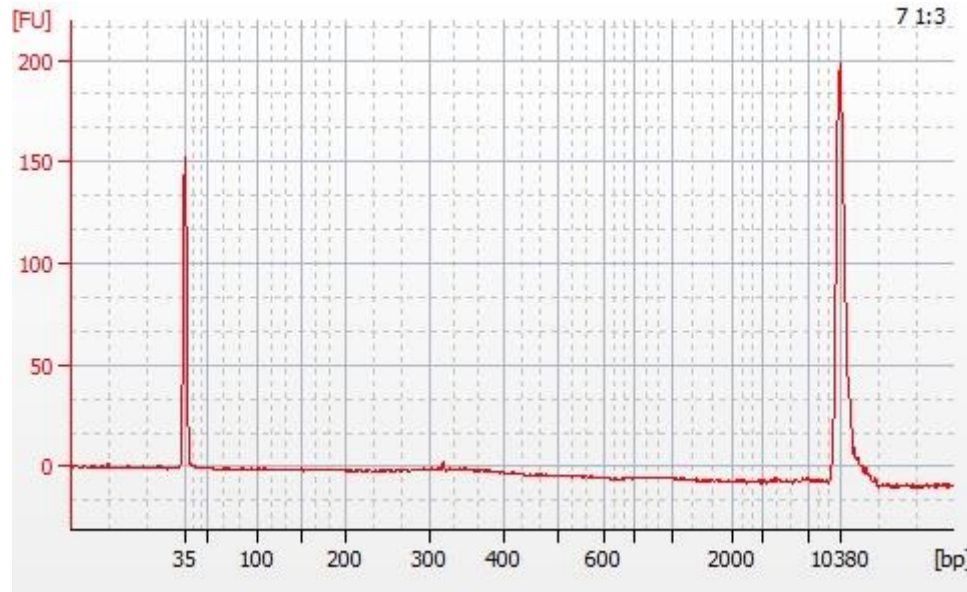
<https://jp.illumina.com/events/webinar/2018/webinar-181031-j.html>





ピークの消失: TruSeq and Nextera libraries

ライブラリーのピークが見られない、もしくはダイマーのピークしか見えない。



ライブラリーの定量でも濃度が確認できない場合には、ライブラリーを再度、調製していただく必要がある。

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

ピークの
消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

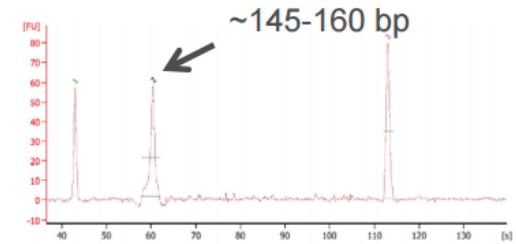
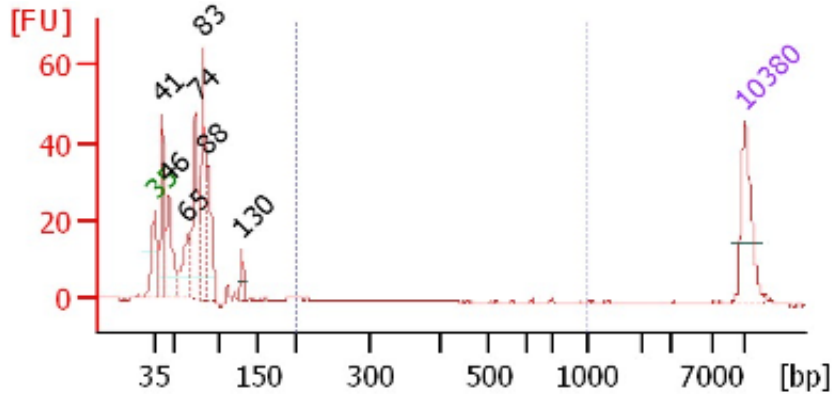
目的外の
小さなサイズ
のピーク

ピークの消失: TruSeq DNA and RNA libraries

考えられる原因	対策
インプットDNAの質が悪い	ゲル電気泳動、またはBioanalyzerのトレースでDNAが断片化されていないことを確認する
インプットDNAの量が不十分	QubitまたはPicogreenを用いて定量を行う (DNA希釈前の定量がより正確)
ビーズ精製時のサンプルの消失	Best Practicesの手法にしたがってビーズ精製を行う
サーマルサイクラーの蓋が加熱されていない	サーマルサイクラーが室温以上に加熱される時は、蓋の温度を100°Cにする
不完全な Fragmentation	Fragmentation後のサイズ分布をチェックする
酵素の劣化	酵素を消費期限内に使用する。 凍結融解を繰り返さない (<=4)



ピークの消失: TruSeq Small RNA



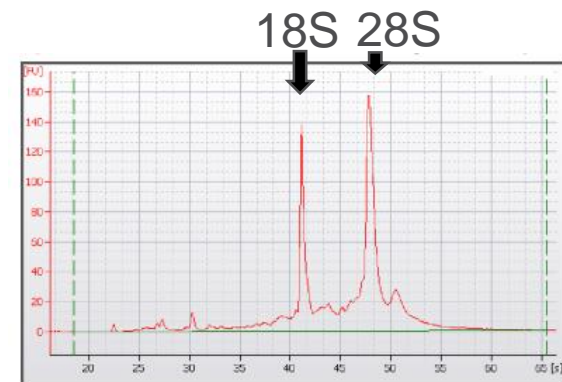
Small RNA由来の145-160 bpのピークが見られない。
本キットによりSmall RNAが回収されなかった。

	Peak Size	Product
Unexpected Peaks	≤ 100bp	Primer or primer dimer
	120bp – 125bp	Amplified adapter dimer
	130bp – 138bp	Adapter concatamer
	≥ 200bp	tRNA or rRNA with ligated adapters



ピークの消失: TruSeq Small RNA

Small RNA由来の145-160 bpのピークが見られない。
本キットによりSmall RNAが回収されなかった。



RNA input

考えられる原因	対策
質の低いインプットRNA	RIN8以上のRNAサンプルを使用する
精製したRNA中にSmall RNAが存在しない	Small RNAの精製に対応したキットを使用する
アダプターオリゴの二次構造の形成	70°Cで温めた直後に氷上に移す



ピークの消失: Nextera libraries

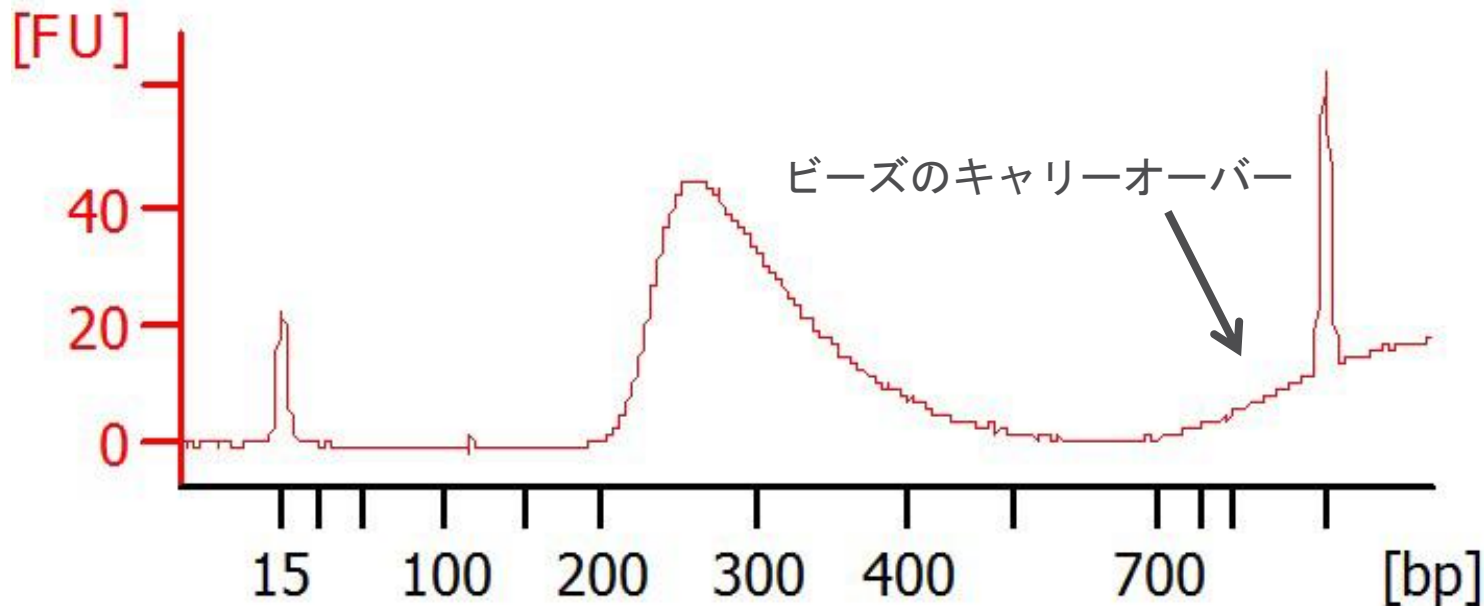
考えられる原因	対策
インプットDNAの質が悪い	ゲル電気泳動、またはBioanalyzerのトレースでDNAが断片化されていないことを確認する
インプットDNAの量が不十分	QubitまたはPicogreenを用いて定量を行う (DNA希釈前の定量がより正確)
ビーズ精製時のサンプルの消失	Best Practicesの手法にしたがってビーズ精製を行う
PCR時に誤ったプライマーを使用した	使用予定のインデックス付アダプターが、適切なキットのものであることを確認する
酵素の劣化	酵素を消費期限内に使用する。 凍結融解を繰り返さない (<=4)





目的外の大きなサイズのピーク

AMPure beadsの持ち込み

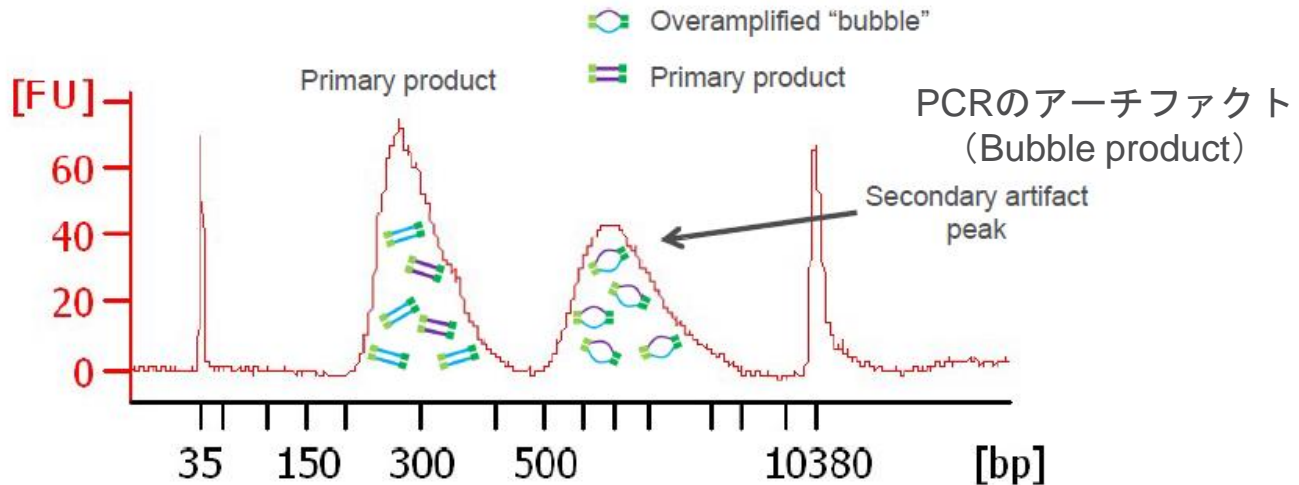


考えられる原因	対策
ライブラリーの回収時に ビーズが混入した (ビーズのキャリーオーバー)	ライブラリーが透明になるまで磁石の上に静置したのち、 Best Practicesの手法にしたがってビーズ精製を行う



目的外の大きなサイズのピーク

PCR artifacts



1) サンプルの一部を 95°C、5分間加熱したのち、ヒートブロック中でゆっくり室温に戻す
または、2) サンプルの一部を template として 1~2 サイクルの PCR にかけた場合に
ピークが 1 つになれば Bubble product であることが確認できる。
Bubble product が生じた場合には、qPCR による定量がお勧め。

考えられる原因

対策

インプットするサンプル量が多すぎる
(PCR反応に必要な試薬が枯渇)

インプットするサンプル量を減らす

PCRのcycle数が多すぎる

PCRのcycle数を減らす

期待される
結果

期待と異なる
サイズ

ピークの
消失

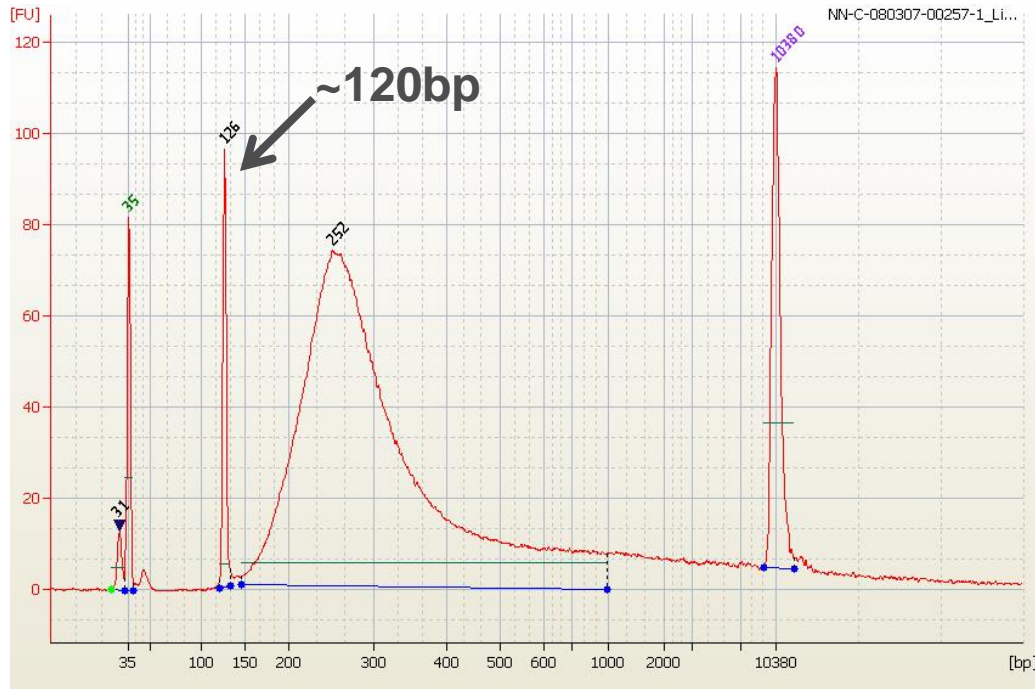
目的外の
大きなサイズ
のピーク

目的外の
小さなサイズ
のピーク



目的外の小さなサイズのピーク: TruSeq libraries

アダプターダイマー



アダプターダイマー

アダプターダイマーはフローセル上でクラスターを形成する
もしライブラリー中にアダプターダイマーが含まれていたら、
アダプターダイマー由来のリードにデータ量を奪われてしまう恐れがある。

考えられる原因

対策

インプットDNA
の量が不十分

Qubitまたは
Picogreenを用い
て定量を行う

ビーズ精製が
不十分

Best Practicesの
手法にしたがって
ビーズ精製を行う

末端修飾、
または3'末端の
アデニル化の失敗

試薬を消費期限内
に使用する
PCRの温度調整が
正確かを確認

Heat inactivation
ステップを行わな
かった

A-tailing後に70°C
でインキュベート
する

期待される
結果

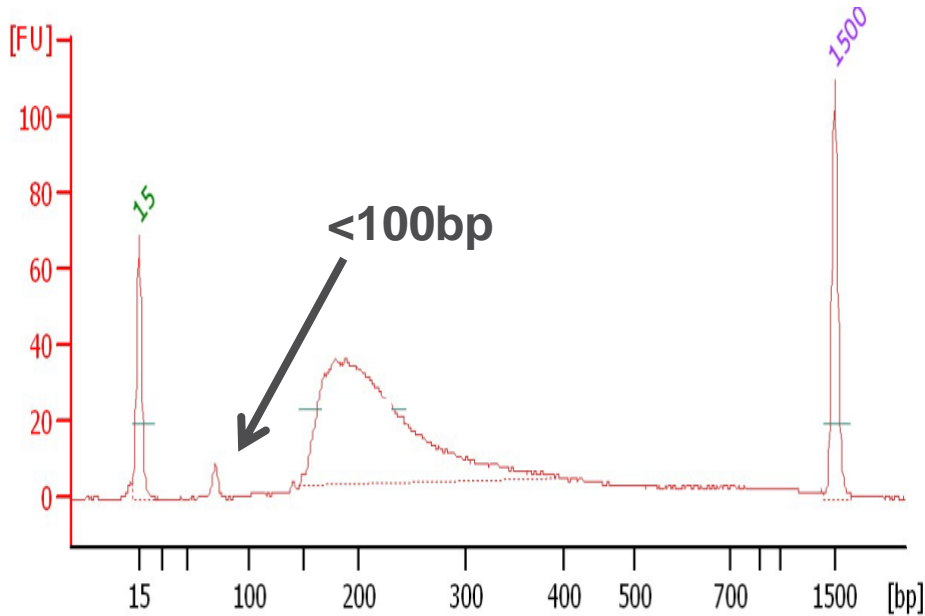
期待と異なる
サイズ

ピークの
消失

目的外の
大きなサイズ
のピーク

目的外の
小さなサイズ
のピーク

目的外の小さなサイズのピーク: Nextera libraries プライマーダイマー



考えられる原因	対策
インプットDNAの量が不十分	QubitまたはPicogreenを用いて定量を行う
ビーズ精製が不十分	Best Practicesの手法にしたがってビーズ精製を行う
タグメンテーションが不十分	タグメンテーションのステップで、正しい時間と温度でタグメンテーションを行う



プライマーダイマー

プライマーダイマーには完全なアダプター配列が含まれていないため、クラスターを形成したり、SBSケミストリーを行ったりすることはできない。しかし、定量に影響を与える可能性があるため、追加のクリーンアップがお勧め



定量定性まとめ - DNA kits

Kits	定量	定性
TruSeq Nano DNA	Fluorometric Method or qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSeq PCR Free	qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
Nextera DNA Flex	Fluorometric Method (QuBit/PicoGreen)	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
Nextera XT	Fluorometric Method or Bead-based Normalization	BioAnalyzer (Needed when using Fluorometric Method; Optional when using Bead-based Normalization)
Nextera Mate Pair	qPCR/BioAnalyzer	BioAnalyzer or Agarose Gel
Nextera DNA Flex for Enrichment	QuBit	BioAnalyzer
TruSeq Exome	Fluorometric Method or qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
Nextera DNA Exome	Fluorometric Method or qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
Nextera Rapid Capture Custom Enrichment	Fluorometric Method or qPCR	BioAnalyzer
TruSight Inherited Disease	Fluorometric Method or qPCR	BioAnalyzer
TruSight Tumor 15	Fluorometric Method (AccuClear/PicoGreen/QuBit)	BioAnalyzer or Agarose Gel
TruSight Tumor 26 (TruSight Tumor)	BioAnalyzer	Gel/BioAnalyzer
Ampliseq (DNA Panels)	BioAnalyzer/Fragment Analyzer/qPCR/QuBit/AccuClear/QuantIT	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSight Myeloid	Bead-based Normalization	BioAnalyzer or Agarose Gel
TruSeq Amplicon Cancer Panel	Bead-based Normalization	BioAnalyzer or Agarose Gel
TruSeq Bovine Parentage Sequencing Panel	Bead-based Normalization	BioAnalyzer/Fragment Analyzer/Agarose Gel
TruSeq ChIP	qPCR	BioAnalyzer
TruSeq Methyl Capture EPIC Library Prep Kit	QuBit	BioAnalyzer

定量定性まとめ - RNA kits

Kits	定量	定性
TruSeq RNA v2	qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSeq Stranded mRNA	qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSeq Stranded Total RNA	qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSeq RNA Exome	qPCR/Fluorometric Method	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSight RNA Pan-Cancer	qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSight RNA Fusion	qPCR	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSeq Targeted RNA Expression	BioAnalyzer or Fragment Analyzer	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
TruSeq Small RNA	BioAnalyzer	BioAnalyzer
Ampiseq (RNA Panels)	BioAnalyzer/Fragment Analyzer/qPCR/QuBit/AccuClear/QuantIT	BioAnalyzer or Fragment Analyzer
SureCell WTA 3'	BioAnalyzer	BioAnalyzer

Library quantification and quality control quick reference guide

<https://support.illumina.com/bulletins/2016/05/library-quantification-and-quality-control-quick-reference-guide.html>

まとめ

期待される
結果

- 理想的なトレースの条件
ベースラインが平ら、X軸がbpで指定、Markerのピークが確認できる

期待と異なる
サイズ

- ライブラリーのオーバーロード → 希釈し再解析
- ビーズ精製時のミス (T)、タグメンテーションの反応時間 (N) が合っていない
→ ライブラリーはシーケンス可能。

ピークの消失

- インプットDNA/RNAの量・質に問題、調製時にサンプルが消失した可能性
→ シーケンス不可。ライブラリーを再度調製する必要がある。

目的外の
大きなサイズ
のピーク

- AMPure XP ビーズの混入、PCR アーチファクト
→ ライブラリーはシーケンス可能。

目的外の
小さなサイズ
のピーク

- Adapter dimers: ~120 bp にピーク (T)、Primer dimers: <100 bp にピーク (N)
→ ライブラリーはシーケンス可能だが、追加のビーズ精製を行うほうが良い。

(T) TruSeq (N) Nextera

ご清聴ありがとうございました

Additional Resources

- [Nextera Troubleshooting Guide](#)
- [TruSeq Sample Preparation Best Practices and Troubleshooting Guide](#)
- [Bulletin Board](#)
 - [DNA/RNA isolation considerations for Illumina Library Preparation Kits](#)
 - [How to thaw and store sequencing reagents for optimal performance](#)
 - [How to achieve more consistent cluster density on Illumina sequencing platforms](#)
 - [Best practices for manually normalizing library concentrations](#)
 - [Library quantification and quality control quick reference guide](#)
 - [Recommended quality control of FFPE samples for Illumina FFPE-supported library preparation kits](#)