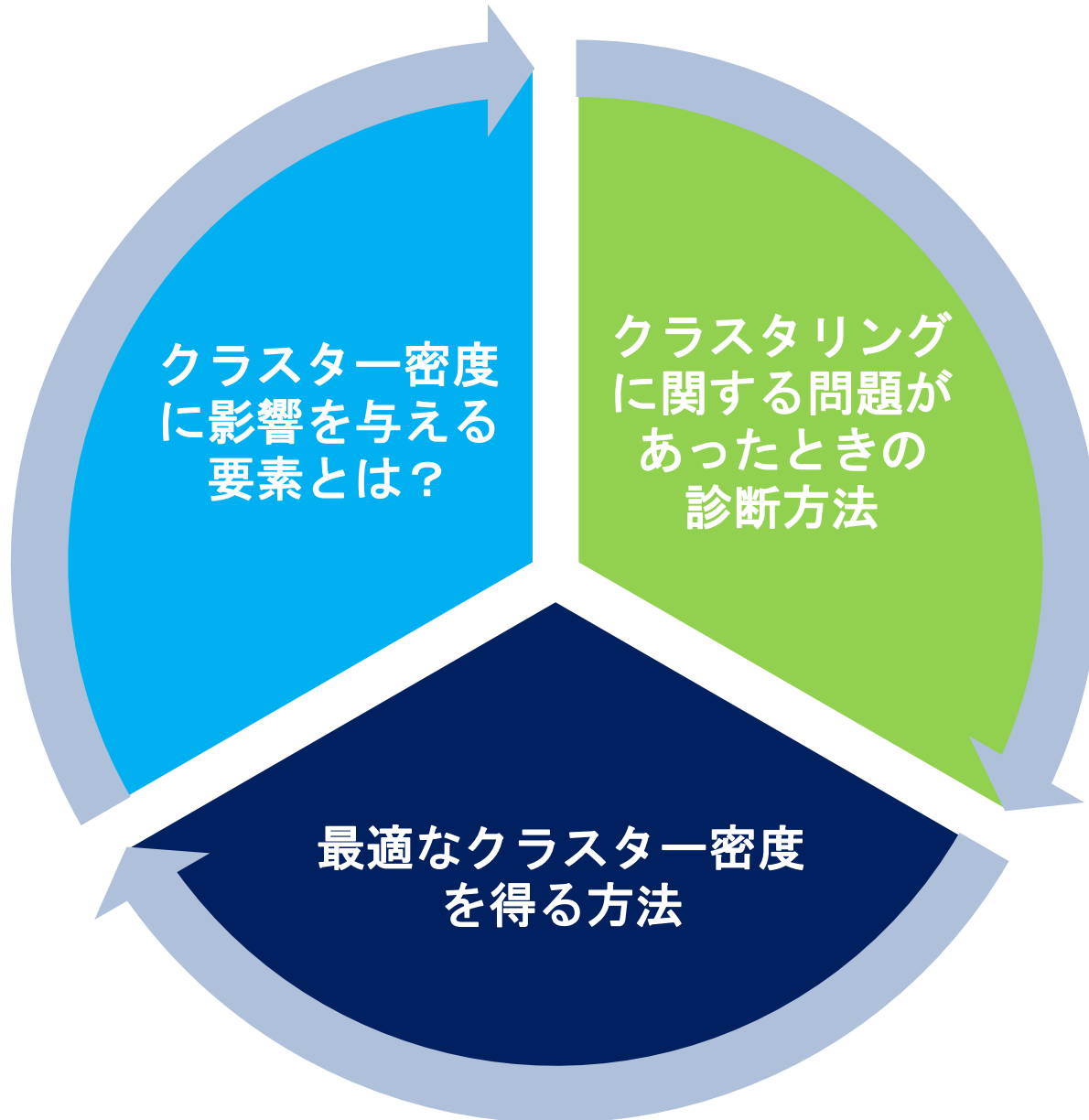


ランを成功させるための 最適なクラスター密度を得る方法

イルミナ株式会社 Field Applications Scientist
福世 裕貴子



本ウェビナーのゴール



本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

サポート資料

本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

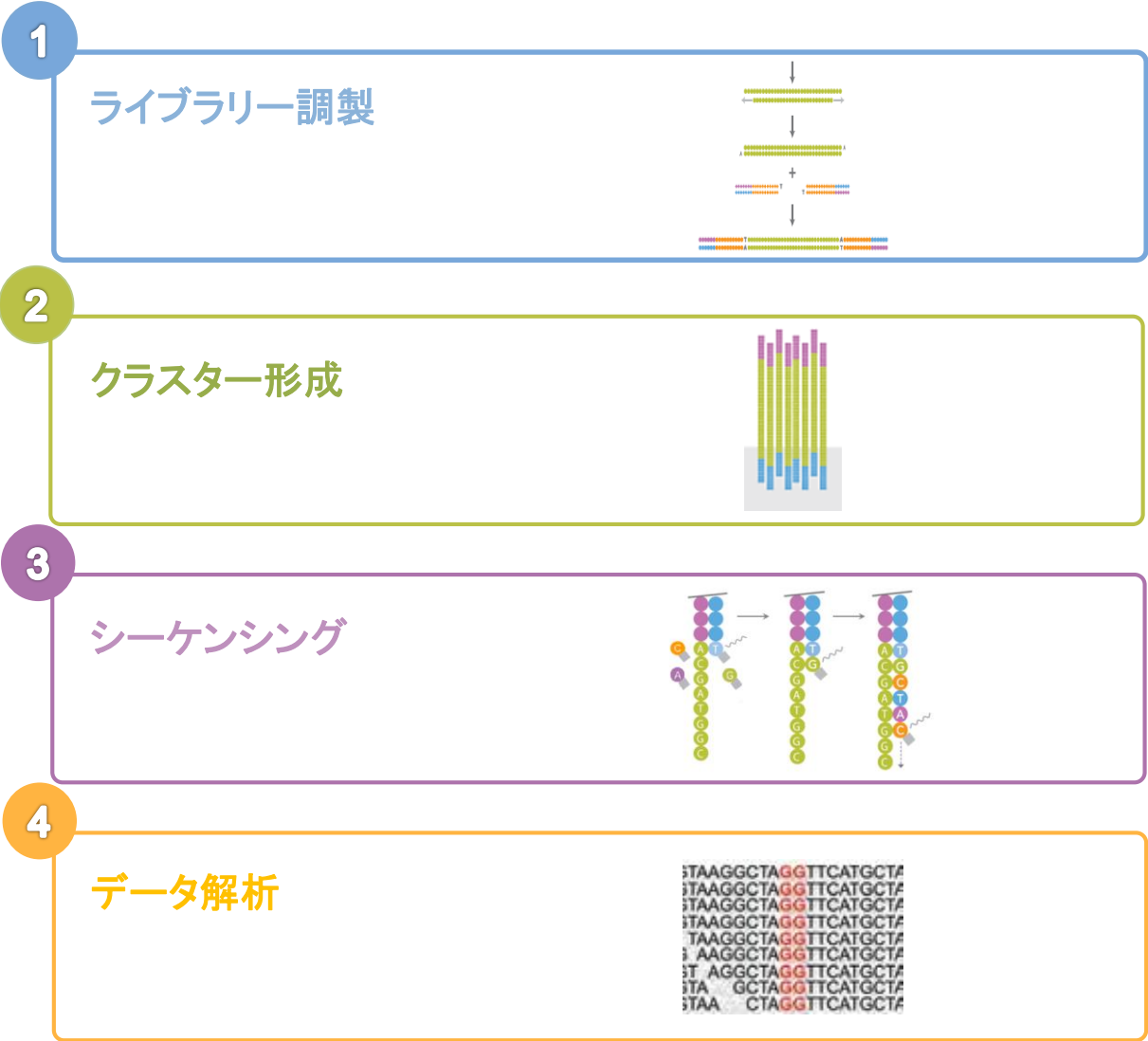
5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

サポート資料

次世代シーケンサーでデータを得るまでの4つの工程



次世代シーケンサー(NGS)でデータを得るまでの4つの工程



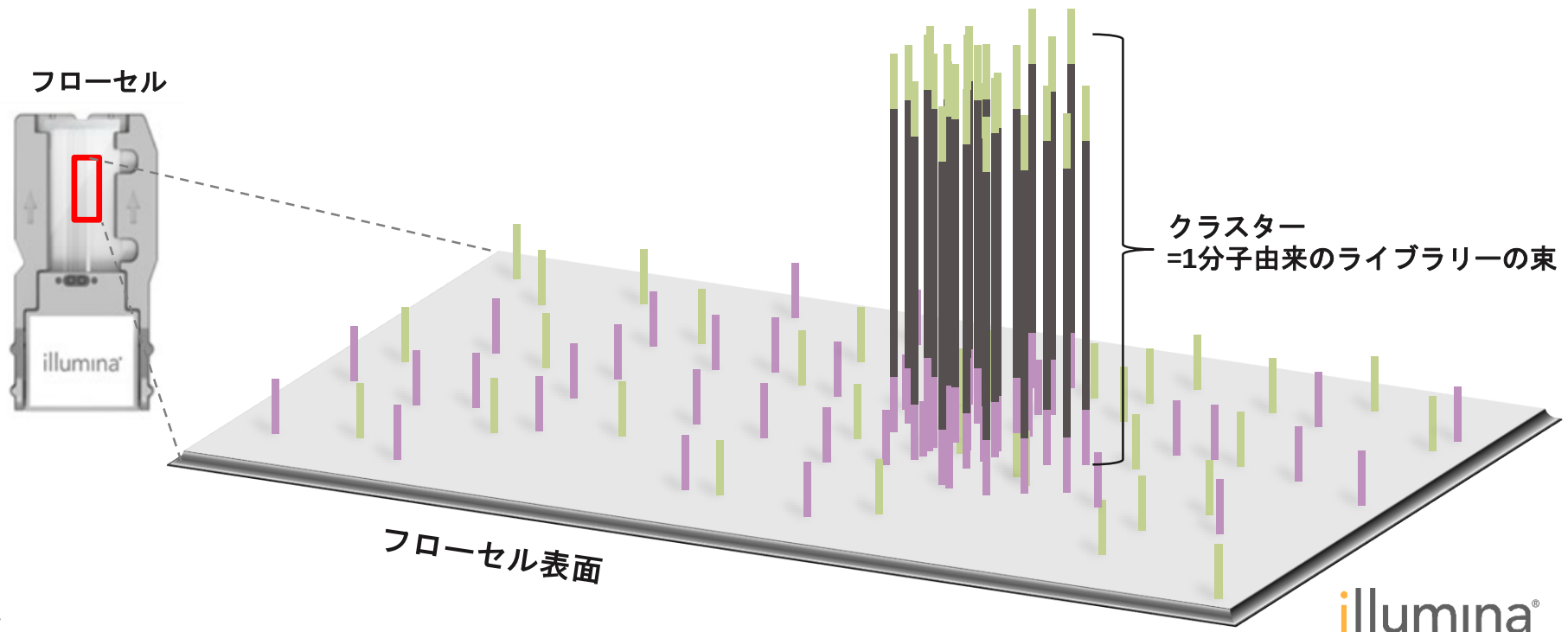
クラスター形成とは

クラスター形成の目的は？

調製したライブラリーのDNA量だけではシーケンシングで検出する際に量が不十分なため、PCR増幅をフローセル（流路をもったガラス基板）上で行うことにより検出に十分なDNA量を確保する

クラスターとは？

フローセルの表面上で断片化されたライブラリーが増幅された領域

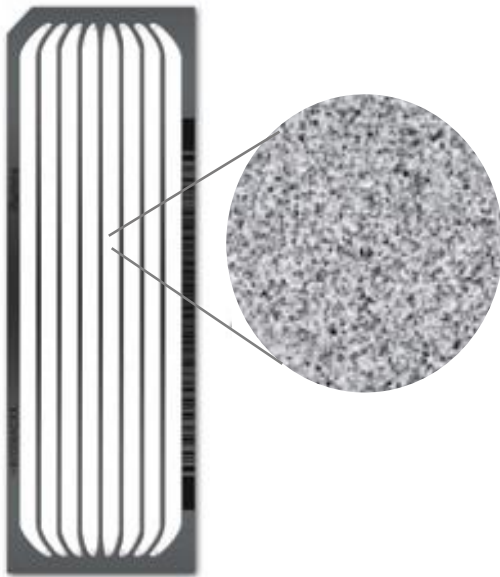


クラスター形成に使われるフローセルとは？

流路を持ったガラス基板で、クラスター形成が行われる場所

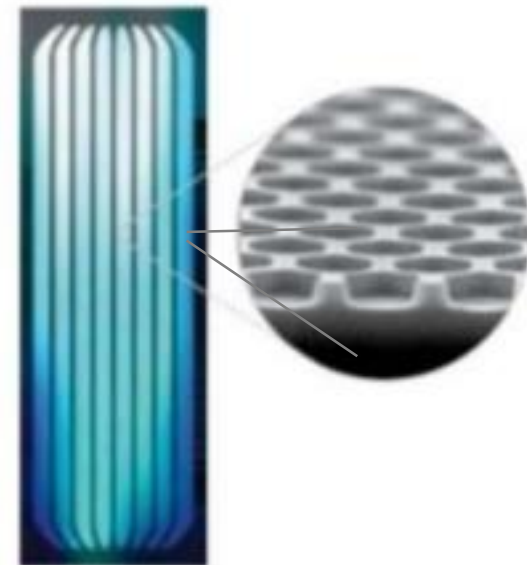
ランダムフローセル

- HiSeq 2500, MiSeq, NextSeq, MiniSeq
- ・クラスターがランダムな位置で増幅される
- ・インサート長対応の柔軟性
- ・Duplication率が低い



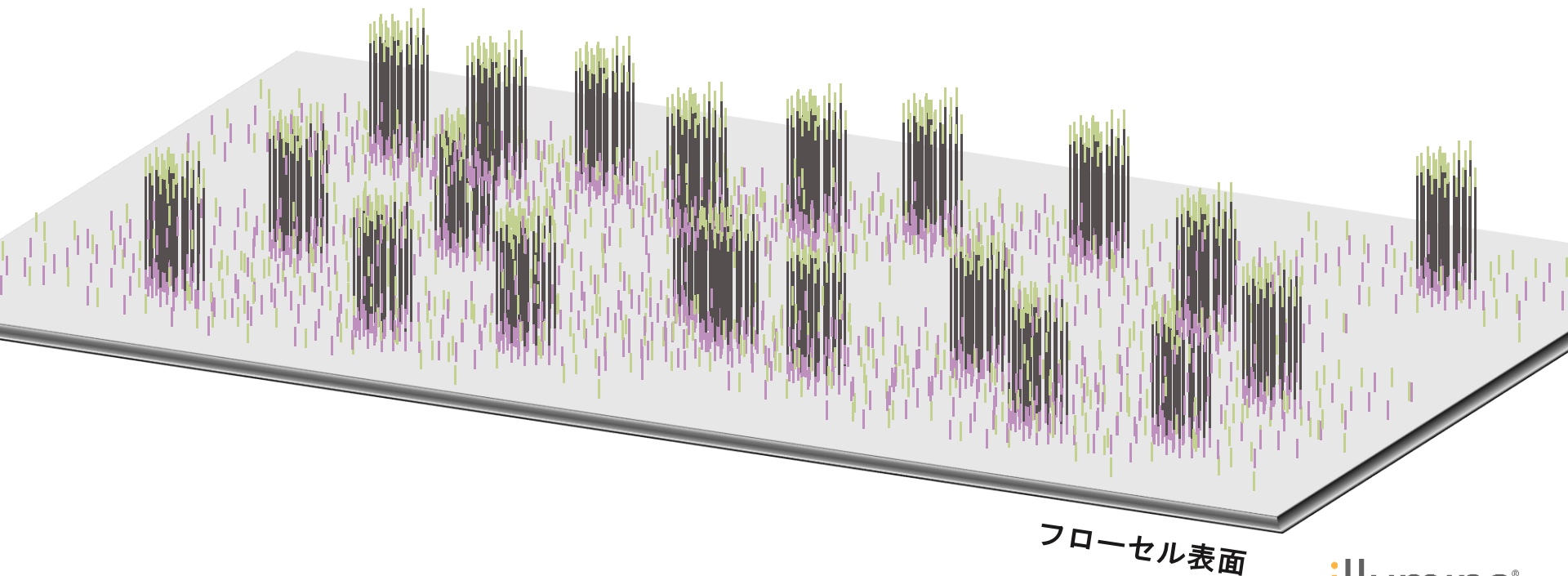
パターン化フローセル

- HiSeq 3K/4K/X, NovaSeq, iSeq 100
- ・サイズと位置が決定
- ・クラスターの高密度化
- ・イメージングを簡略化



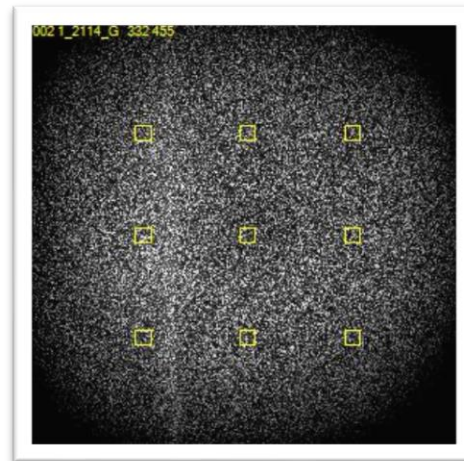
クラスター形成とは

- 多数のクラスターがフローセルの表面上に形成される
- Read1シーケンシングプライマーが結合し超並列でシーケンシングが開始される
- 1クラスター= 1リード 例： 10,000クラスター= 10,000リード



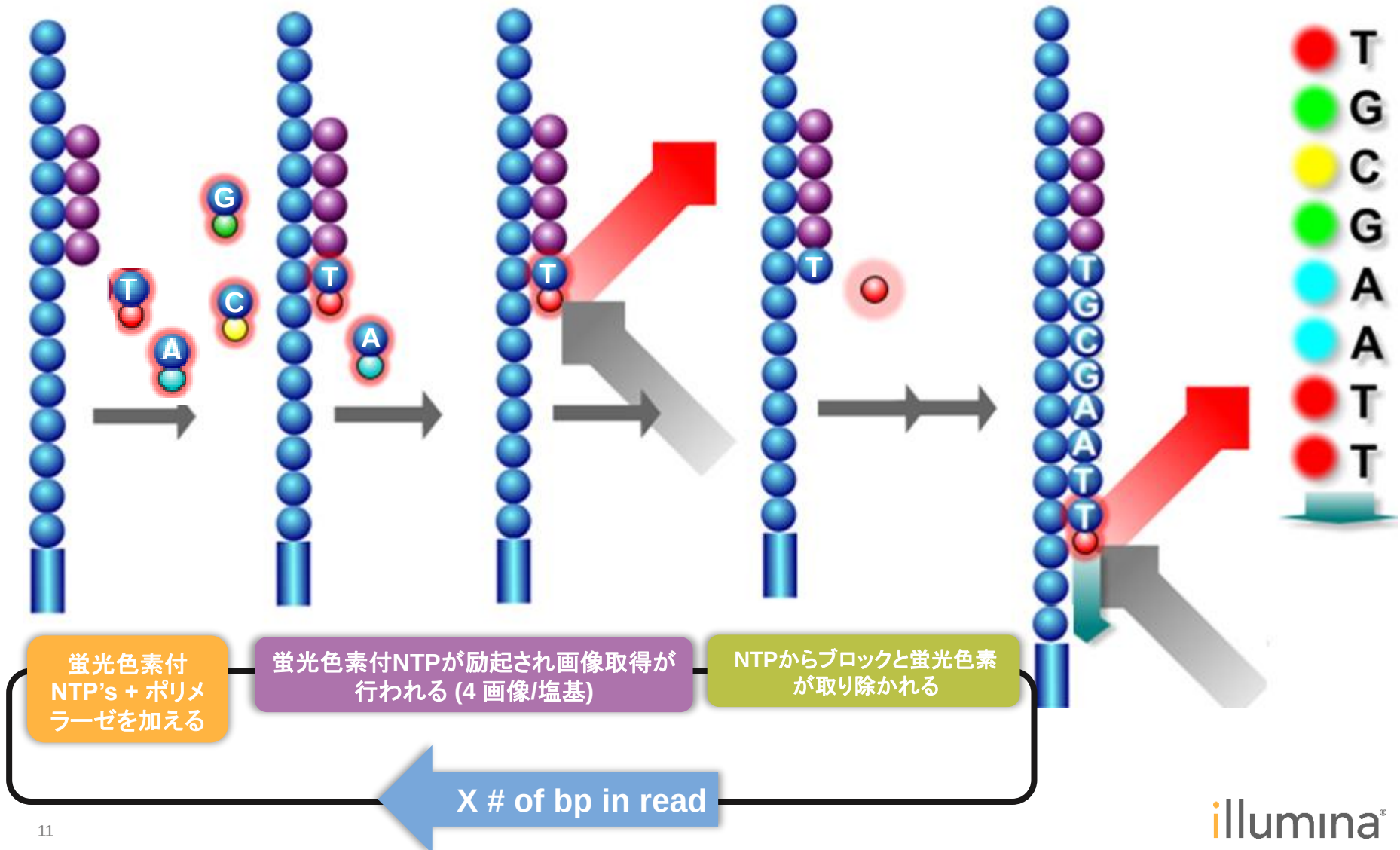
どうやってクラスターの画像取得が行われるのか？

- クラスターは、Read1シーケンシングプライマーが適切に結合されている状態でのみ確認することができる
- 最初の1塩基が取り込まれると、画像取得が開始される



- クラスターが検出されると、シーケンサーは Sequencing By Synthesis(SBS)法を利用し伸長反応を進める

伸長反応- Sequencing by Synthesis



取得した画像解析から塩基情報を決定するまで

シーケンシング中に、Real-time analysis software (RTA software)が装置内で自動で立ち上がり得られたクラスターの画像データから主に下記の工程を行い最終的に塩基情報を決定する

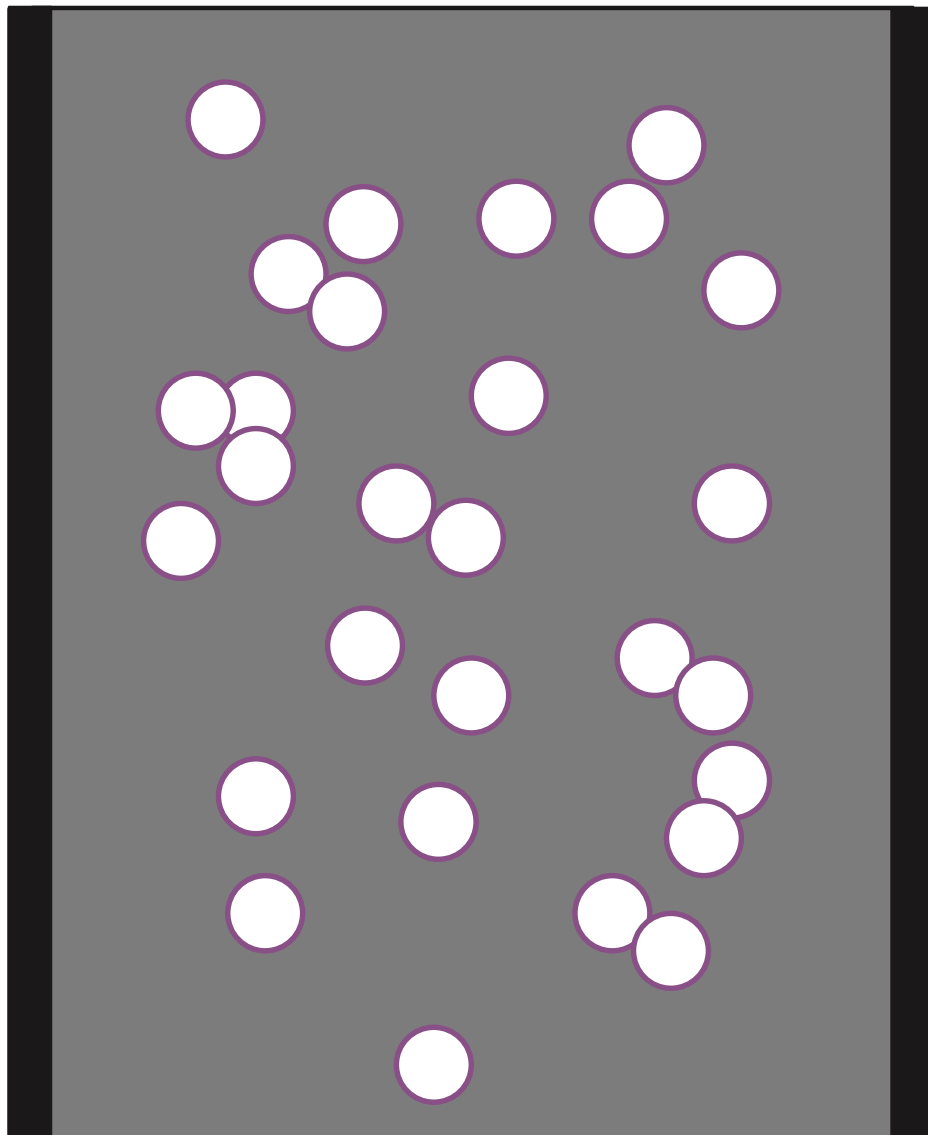
フローセル上のクラスター密度がRTAの解析の下記工程に影響を与える

クラスターの位置決め

蛍光強度
(インテンシティ)
の抽出

クラスター品質による選別
(Passing Filter)

クラスターの位置決め



- ランダムフローセルの場合は、ライブラリーがフローセルに流入した際にランダムにフローセル上に結合しその後クラスターを形成する
クラスターが形成される場所がランダムなため最初にクラスターの位置を探す工程が必要になる
- RTAは最初の4~7サイクルでクラスターの位置を特定する
- 位置の特定後、次の補正の工程に進む
- iSeq、NovaSeqで使用するパターン化フローセルは整列されたウェルの中にクラスターが形成されるのでクラスターの位置決めの工程は不要

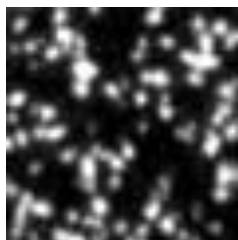
蛍光強度（インテンシティ）の抽出

クラスターの位置決めをした後、各クラスターの蛍光強度を抽出しクラスターの分離を行う

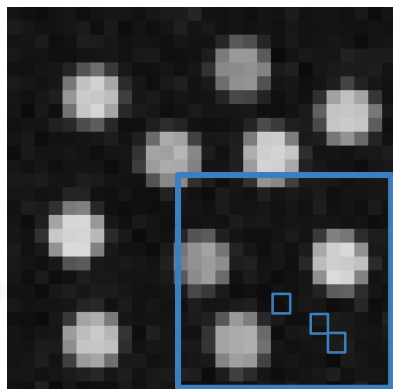
バックグラウンドの
蛍光強度を計算

各クラスターの
蛍光強度を計算

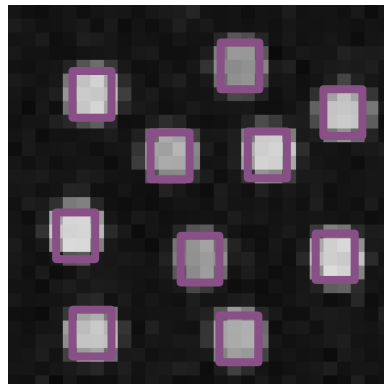
各クラスターの
蛍光強度から
バックグラウン
ドを引く



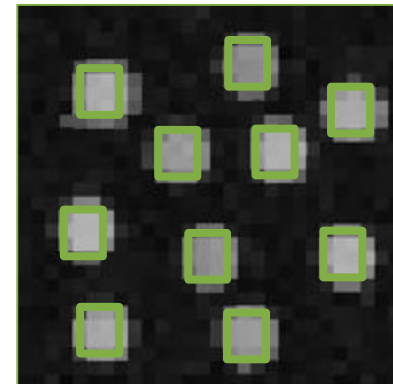
実際のクラスター
は上記のように完
璧な円状ではない



蛍光強度が低く暗い
ピクセルの平均値を
使ってバックグラウ
ンの蛍光強度を計算
する



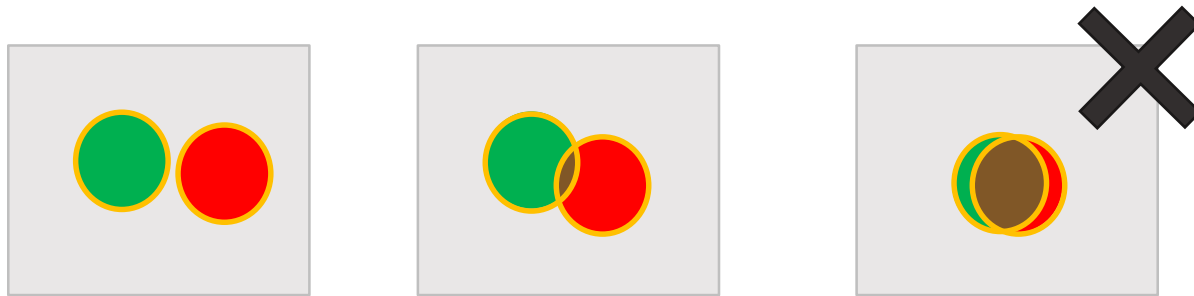
各クラスターの蛍光強
度が高く最も明るいピ
クセルを用いてクラス
ターの蛍光強度を抽出
する



抽出した各クラス
ターの蛍光強度から
バックグラウン
ドの蛍光強度を引く

クラスター品質による選別 Passing Filter

Passing Filterは、重なり合って分離ができなかったクラスターのような純度の低いクラスターを取り除く役割がある



- 塩基伸長が始まって1塩基目～25塩基目で、蛍光強度の抽出結果に基づき純度の低いクラスターをふるい落とす
- Passing Filterを通った純度の高いクラスターのみデータ収量として考慮され、塩基決定の精度を表すスコア（Q30）に貢献する

本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

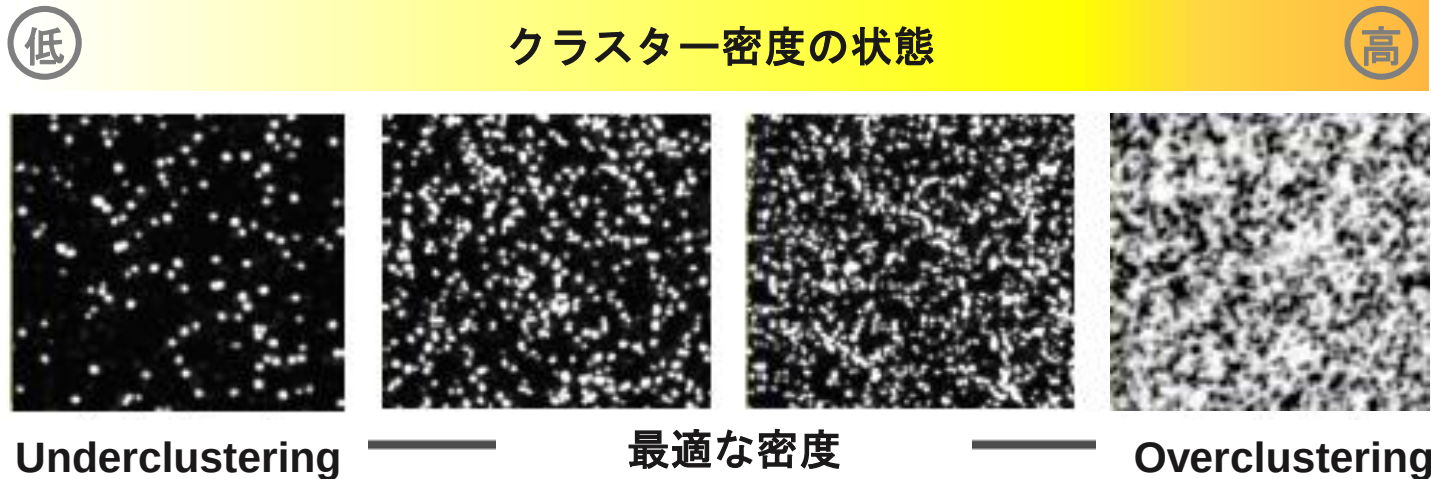
サポート資料

なぜクラスター密度のコントロールが重要なのか？

クラスター密度は画像解析から塩基情報の決定を行う際の工程で大きな影響を与えるため、最終的なデータの品質とデータの収量に密接に結びついている

最適なクラスター密度でランを行う上でoverclusterとunderclusterの間のバランスのよい密度を見つけることが重要

目標はoverclusterを避けて適切なSignal/ Noise比を確保しつつ、十分なデータ量を確保できるくらいクラスター密度を高くする



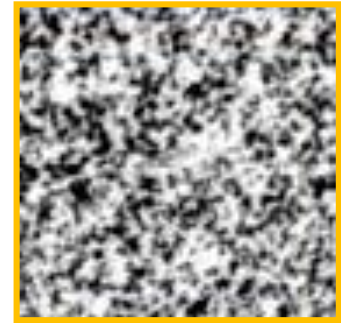
OverclusteringとUnderclusteringがもたらす影響

Overcluster – クラスターが多すぎる状態

原因 ライブラリーのローディング量が多い

症状

- Q30スコアの低下
- Cluster Passing Filterの低下
- インデックスの振り分け (demultiplexing) 不良
- ランが止まる

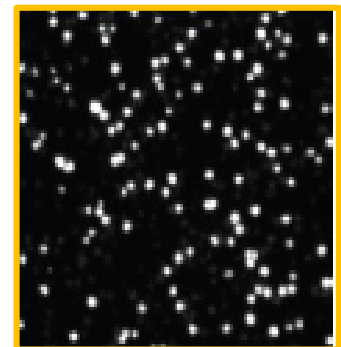


Undercluster – クラスターが足りない状態

原因 ライブラリーのローディング量が少ない

症状

- 最終的なデータ収量が非常に少ない
- ただしデータの質は良好なことが多い



装置別 推奨のクラスター密度

装置	シーケンシング用試薬	推奨クラスター密度 (K/mm ²)
HiSeq 2500 (High Output)	HiSeq v4	950 – 1050
	TruSeq v3	750 – 850
HiSeq 2500 (Rapid Run)	HiSeq v2, TruSeq(v1), Rapid Duo	850 – 1000
MiniSeq	MiniSeq High/Mid Output	170 – 220
MiSeq	MiSeq v3	1200 – 1400
	MiSeq v2	1000 – 1200
NextSeq	High/ Mid Output (v2.5 and v2)	170 - 220

※ 上記推奨密度は塩基多様性に偏りのないライブラリーを使用した場合を想定

本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

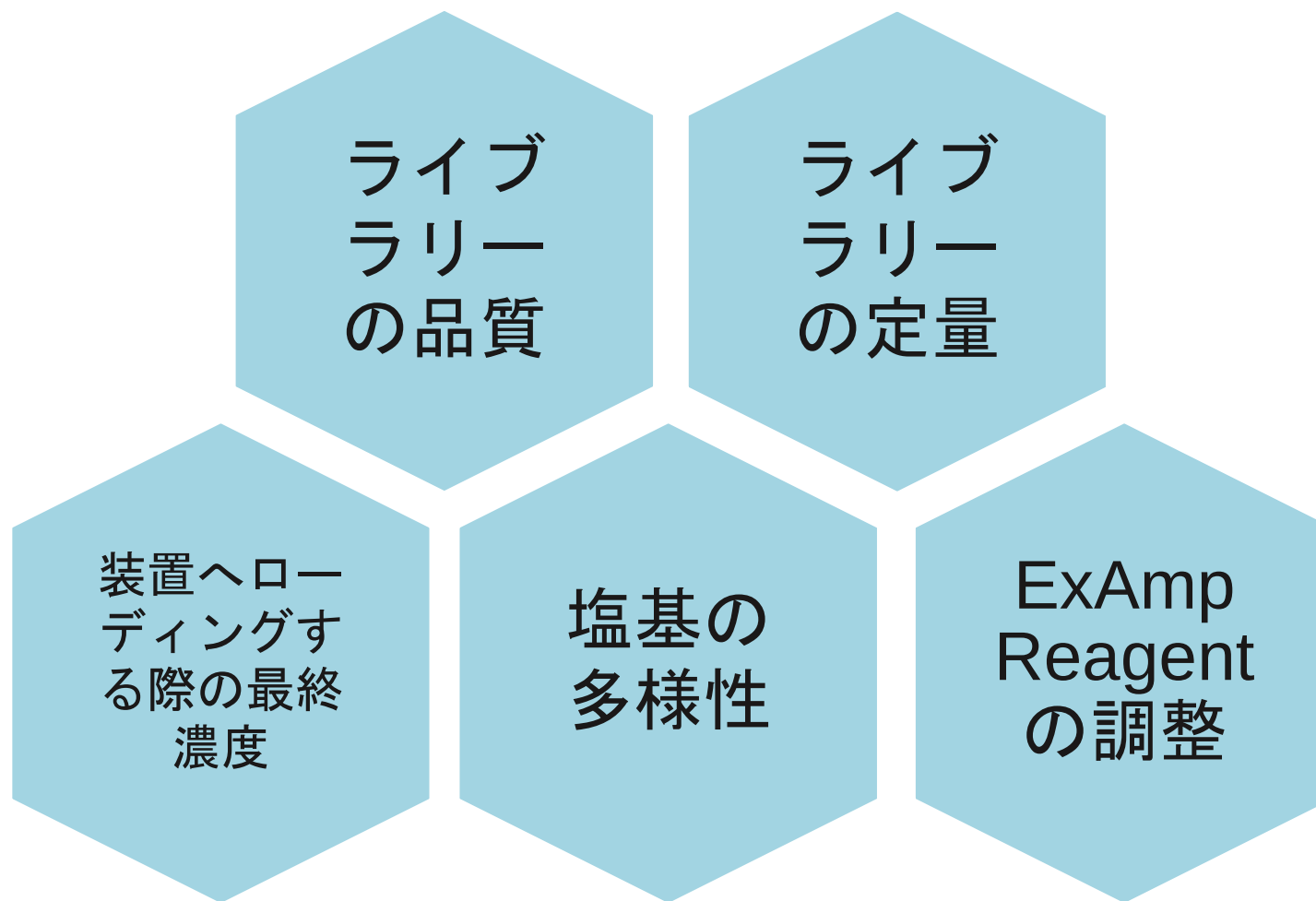
5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

サポート資料

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策



ライブラリーの品質

ライブラリーの品質が影響を与える理由

- ライブラリー調製の際に残ったアダプターダイマー、プライマーダイマーがライブラリー定量やクラスター形成に影響を与える
- ライブラリーの精製が不十分だと、上記のコンタミネーションが残る可能性が高い

推奨の定性確認・ライブラリー精製方法

各ライブラリー調製キットのガイドに従った方法でライブラリーの定性確認、およびライブラリーの精製を行う

- 定性確認方法の例 : Bioanalyzer, Fragment Analyzer
- 精製方法の例 : AMPure Beads

ライブラリーのモル濃度の計算に使用するため、平均ライブラリーサイズを確認する

ライブラリーの定量

精度の高いライブラリー定量が最適なクラスター密度のコントロールには不可欠

qPCR

- ・ ライブラリーのサイズ分布が近似している場合は最も効果的な定量方法
- ・ 両端にアダプター付加された構造的に問題ないライブラリーのみ測定することができる

Qubit/ PicoGreen

- ・ ライブラリーのサイズ分布がブロードなライブラリーに効果的
- ・ アダプターダイマーを含めたすべての二本鎖DNAを測定する恐れがあるがBioanalyzerで定性確認しコンタミネーションがない場合は非常に正確に測定できる

Bioanalyzer

- ・ TruSeq Small RNA, TruSight Tumor 26, TruSeq Targeted RNA Expressionの3種類では測定可能

NanoDropや吸光度測定は一本鎖DNAやRNAも測定されライブラリーの濃度が多めに推定される恐れがある

装置へローディングする際のライブラリー最終濃度

ライブラリー調製後、ライブラリーはライブラリーの種類、装置、シーケンシング用試薬に合わせて適切に最終濃度に希釈する必要がある

最終濃度を誤ってしまうと起こること

- ・ 高濃度だとoverclusterになる可能性大 → Cluster Passing Filter低下、ラン不良
- ・ 低濃度だとunderclusterになる可能性大 → データ収量が低下、データ精度低下

最適な最終濃度を決定するためには

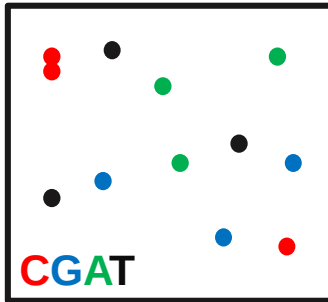
- ・ 装置へローディングする際の濃度を少しずつ調整していくことがお勧め
- ・ 装置ごとに推奨のライブラリー最終濃度が異なるため下記ガイドを参照する
 - The denature and dilute guide
 - 各装置のSystem Guide
- ・ クラスター密度とライブラリー最終濃度は直線状に比例しない 最終濃度を上げるときは、少しずつ濃度を上げランを行い、次回以降参考にする

NaOH

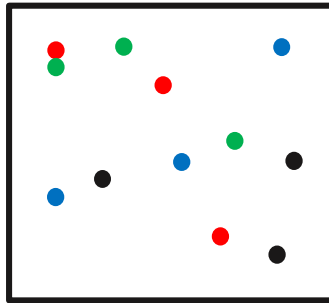
- ・ ライブラリーの一本鎖DNAへの変性で使用 用事調整してpH>12.5のものを使用 (最終ライブラリー中に1mM以内になるように注意)
- ・ 消費期限切れまたは酸化したNaOHは変性の効率が下がり、2本鎖ライブラリーの変性がうまくいかない可能性がある 2本鎖ライブラリーはフローセルに結合しないため注意が必要
- ・ 中和されずに過剰なNaOHがフローセルに入ることによってクラスター形成が抑制される

塩基の多様性

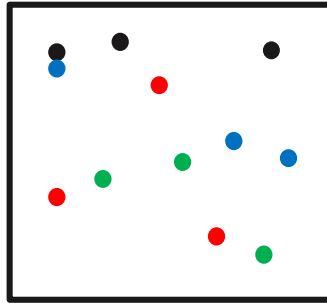
塩基バランスのよいライブラリー



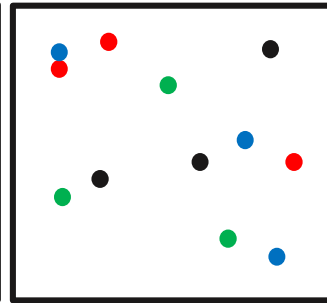
CYCLE 1



CYCLE 2

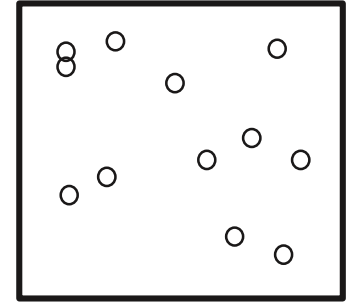


CYCLE 3



CYCLE 4

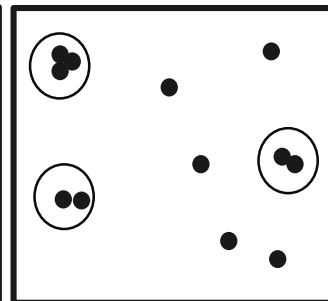
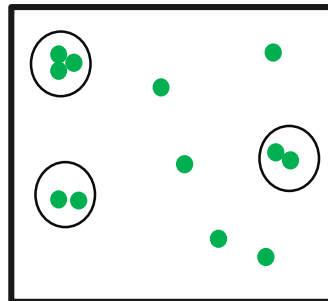
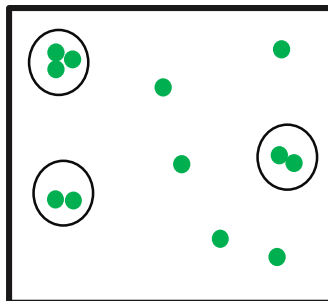
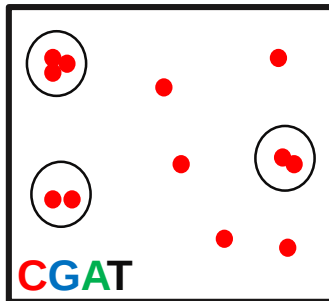
TEMPLATE



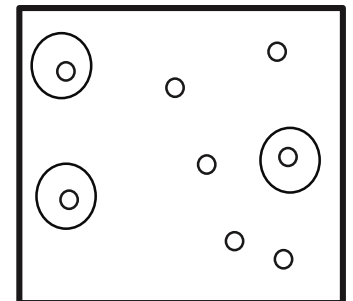
12個のクラスターが認識される

それぞれのクラスターが異なる配列を持つので、サイクルごとに異なるシグナルが得られる
隣り合ったクラスターを区別することができる

塩基の多様性が乏しいライブラリー（例：PCRアンプリコン）



TEMPLATE



- ローディングする際の最終濃度を低くする 物理的にクラスターの重なりを低減させる
- PhiXや塩基の多様性が高いライブラリーをspike-inして使用する
- 装置ごとのPhiX spike-inの推奨量を参考にする

塩基の多様性

下記の装置別のPhiX Spike-inの推奨量を参考にしてspike-inを行う
最初はspike-inを多めにし、徐々に様子を見ながら少な目に調整していくとよい

System	PhiX Spike-In for Low Diversity (%)
HiSeq 2500	≥ 10
HiSeq 3000 and HiSeq 4000	5–20
HiSeq X	5–20
iSeq 100	≥ 5
MiniSeq	10–50
MiSeq	≥ 5
NextSeq 500 and NextSeq 550	10–50
NovaSeq 6000	~5

塩基の多様性に関するウェビナー



SIGN INVIEW CARTお問い合わせ予算申請書類リクエストロケーション選択

製品ソリューション企業情報サポートがん研究 関連情報 ①

学会&イベント概要開催予定ウェビナーイルミナISchoolイベント開催レポート開催終了イベントウェビナー録画More

PCRアンプリコンDNAライブラリーなどのLow Diversityサンプルのシーケンスランを成功させるコツ

詳細

16S rRNA遺伝子解析のようなPCRアンプリコンDNAライブラリーを用いたアプリケーションでは、シーケンスする配列に相同性があり、塩基の偏りが生じます。このようなLow Diversityサンプルのランでは、データ量やクオリティの低下が生じやすい傾向があります。本ウェビナーでは、Low Diversityサンプルのランデータの特徴、シーケンスのクオリティやデータ量を改善するためのポイントをご紹介します。

Fill Out Form to Access Webinar

姓（日本語）例：山田

名（日本語）例：花子

姓（英語）例：Yamada

名（英語）例：Hanako

Date & Time
2019/11/20
15:00

Location
Japan
Asia

Presenter
イルミナ株式会社
テクニカルアプリケーションサイエンティスト
仁田原 翔太

Topic
Cellular and Molecular Biology

[Download PDF](#)

[ウェビナーを見る](#)

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2019/webinar-191120-j.html>

ExAmp Reagentの調整

HiSeq3000/4000、NovaSeqではマニュアルでExAmp Reagentを調整する必要があるが、誤った調整方法は結果に影響を与える

調整の際の注意点

- ExAmp reagentは粘性が高いため、混ぜる際はゆっくりピペティングするよう注意する
- ExAmp reagentが劣化しないように、調整後フローセルに載せるまでに長い時間置かないようにする
- NovaSeq Xp workflowの場合は、フローセルにExAmp reagentとlibrary mixのMixtureをローディングした後ランを開始するまでに時間が空いてしまうと最適な条件下でない状態でクラスターが形成されてしまう

本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

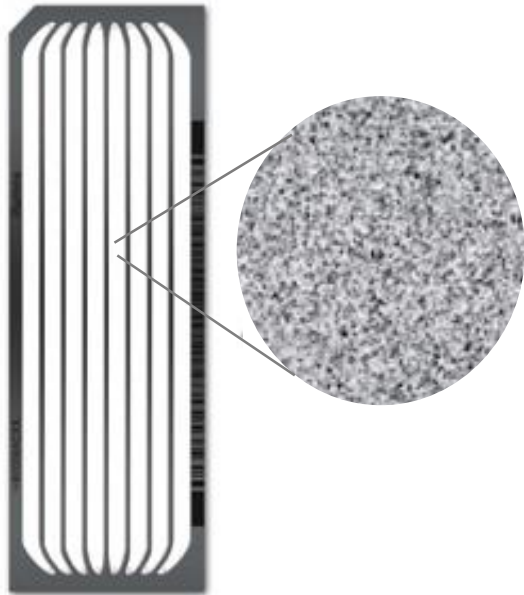
5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

サポート資料

ランダムフローセルとは？



- HiSeq 2500, MiSeq, NextSeq, MiniSeq
- クラスターがランダムな位置で増幅される
- ランダムな位置でクラスター形成が行われるため、overclusterになるとクラスター同士の重なりが多発する可能性が高くなる
- 塩基決定のための補正が問題なく行われるためにはクラスター密度のコントロールが重要な要素になる
- ランの状態を適切に確認し調整を行う必要がある

シーケンシングランがうまくいったかどうかの確認方法

イルミナでは主にシーケンシングランの状態を確認するためのツールを2つご用意

Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV)

- 装置上にインストールされているラン結果確認用ソフトウェア
- ご自身のPC（Windowsのみ）にインストールしてご使用も可能

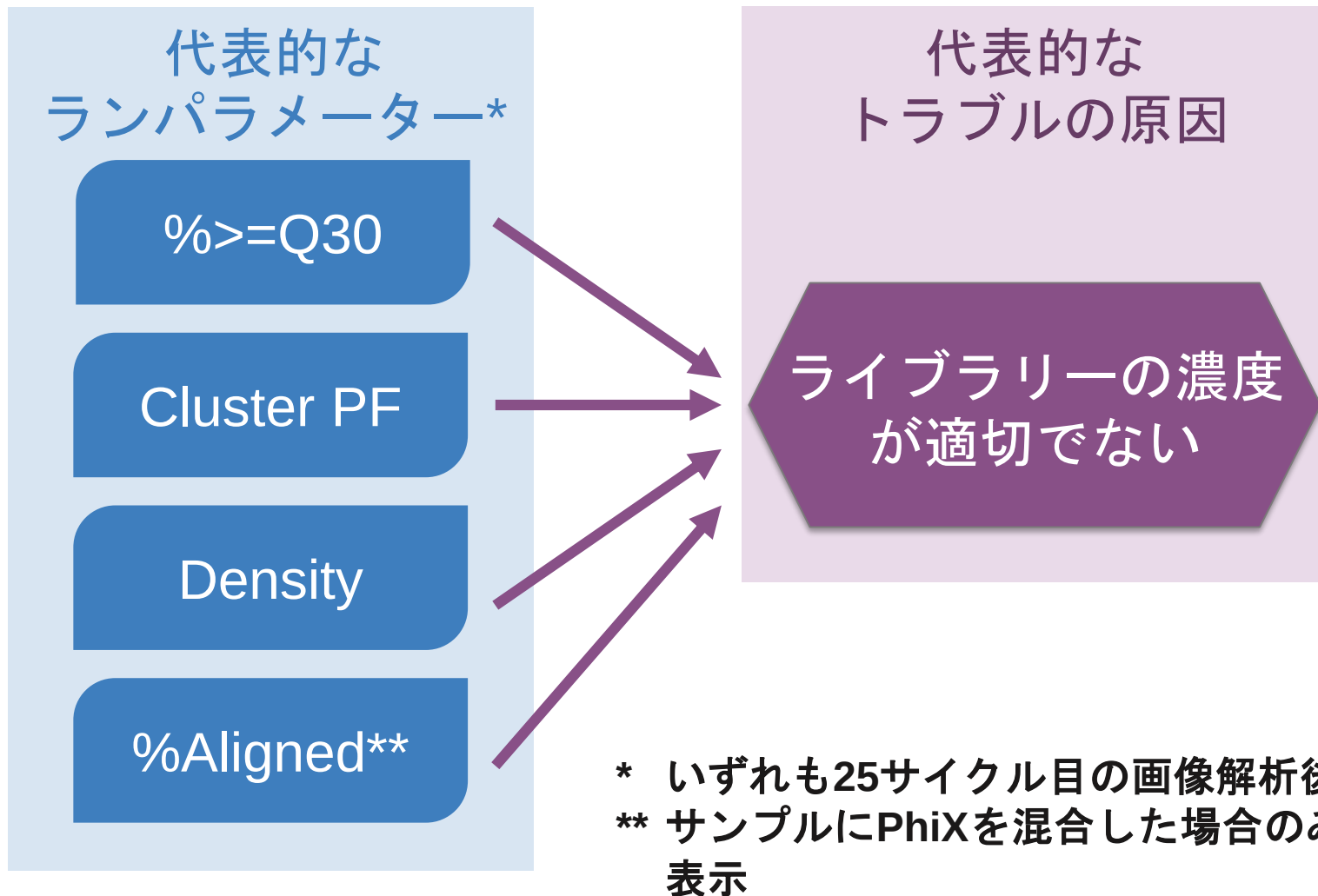
BaseSpace Sequence Hub

- 当社が展開しているクラウドサービス
- ランデータを転送しネットワーク上で解析のモニタリングが可能

Sequence Analysis Viewer (SAV) を使用する際に必要なファイル



クラスター密度の問題同定に役立つランパラメーター



%>=Q30: 決定した塩基の信頼性を示すスコア

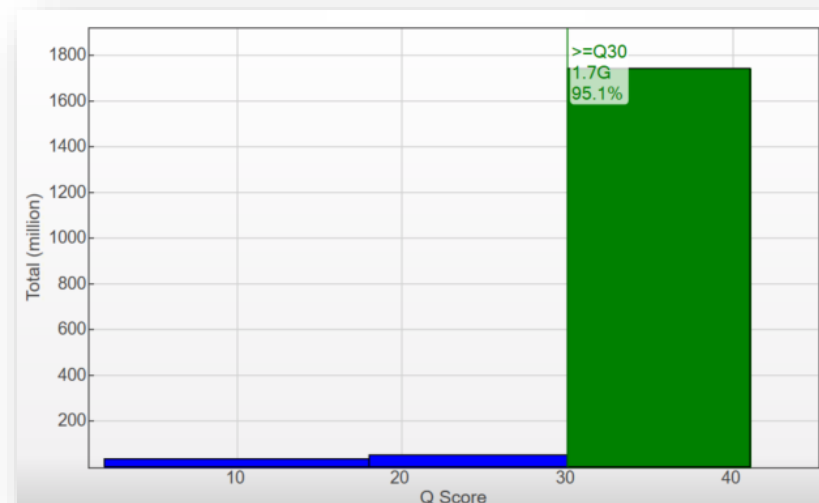
- Quality Scores (Q Score)

- 決定された塩基が正しい確率
- 高い値 $\equiv$ 高い信頼性
- 塩基ごとに計算
- 計算式: $-10 \times \log_{10} P_{error}$

Q Score	% Error	%Correct
Q10	10%	90%
Q20	1%	99%
Q30	0.1%	99.9%
Q40	0.01%	99.99%

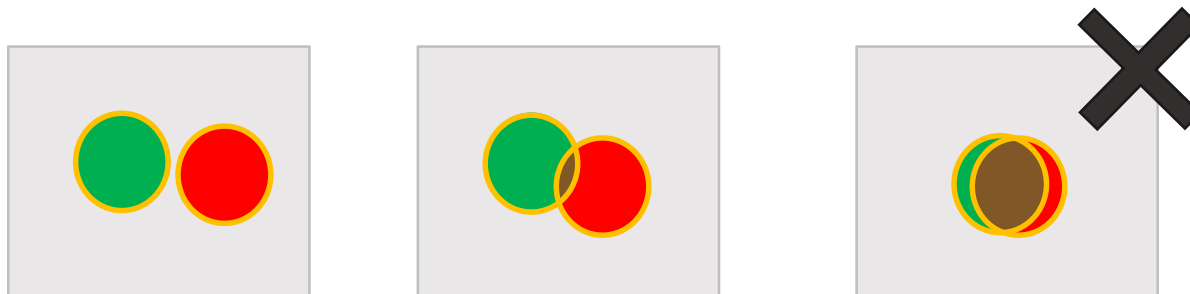
- %>=Q30

- >=Q30が割り当てられた塩基の割合
- リード長に応じた基準値で、ランの品質を確認可能



Cluster Passing Filter

Passing Filterは、重なり合って分離ができなかったクラスターのような純度の低いクラスターを取り除く役割がある



- 塩基伸長が始まって1塩基目～25塩基目で、蛍光強度の抽出結果に基づき純度の低いクラスターをふるい落とす
- Passing Filterを通った純度の高いクラスターのみデータ収量として考慮され、塩基決定の精度を表すQ30のスコアに貢献する

SAVでのCluster PFは純度の高いクラスターが全体のクラスターの内何%存在していたかを表わす指標

SAV Summary Tabの確認

SAV上のSummaryタブを確認する

Analysis

Imaging

Summary

Summary Tab

Cycle Status

Extracted: 152

Called: 152

Scored: 152

Error Rated: 151

Run Summary

1

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% >= Q30
Read 1	2.50	2.50	99.45	0.19	411	96.78
Read 2	2.50	2.50	97.74	0.28	434	94.65
Non-Indexed Total	4.99	4.99	98.59	0.23	422	95.72
Total	4.99	4.99	98.59	0.23	422	95.72

Read 1

2

3

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prep slope
1	38	1563 ± 22	89.28 ± 1.48	0.130 / 0.059	NaN / NaN	NaN / NaN

Read 2

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prep slope
1	38	1563 ± 22	89.28 ± 1.48	0.157 / 0.063	NaN / NaN	NaN / NaN

1 Aligned (%)

- PhiXをSpike-inした時のみ数値が表示される
- PhiXの参照配列とどの程度アライメントが取れたのかわかる
- 25% spike-inした場合は通常25%に近い値を取る

低く表示されたとき：

実サンプル由来のライブラリー濃度が過剰である可能性がある 通常はOverclusterである可能性が高い

高く表示されたとき：

実サンプル由来のライブラリーの濃度が低すぎる可能性がある Underclusterである可能性が高い

2 Density (K/mm2)

- 各装置の推奨クラスター密度に範囲内か確認する

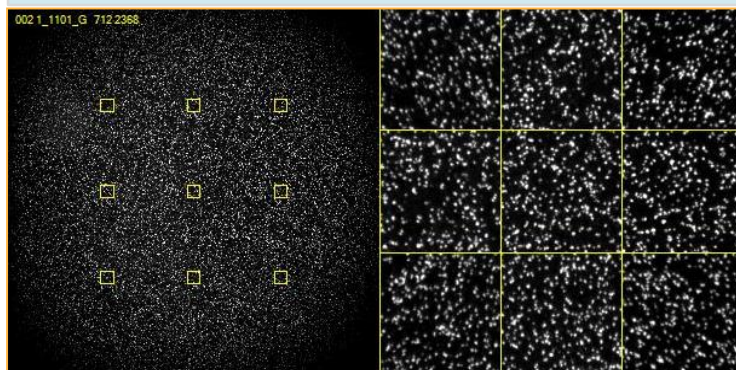
3 Cluster PF (%)

- Filterをパスしたクラスター（純度の高いクラター）の数が十分に高いか確認する

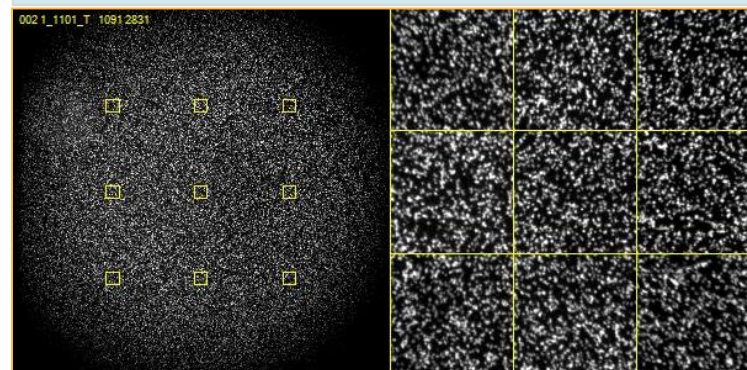
SAV Imaging Tabの確認：クラスター画像

各装置によってクラスター画像の見え方は異なるが、実際のクラスターの画像を確認可能
下記はMiSeq v2試薬でランした際のクラスター画像

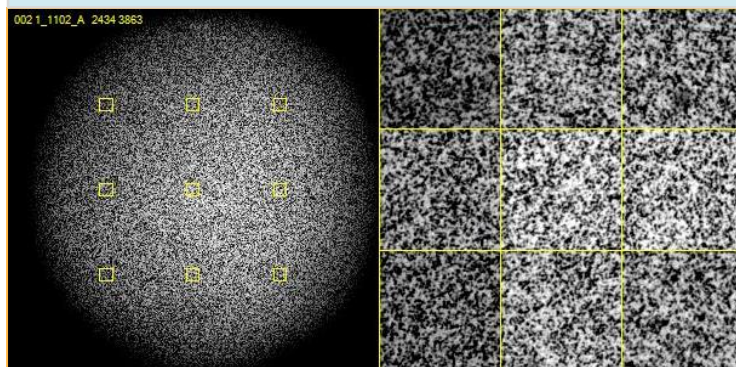
正常な場合の例



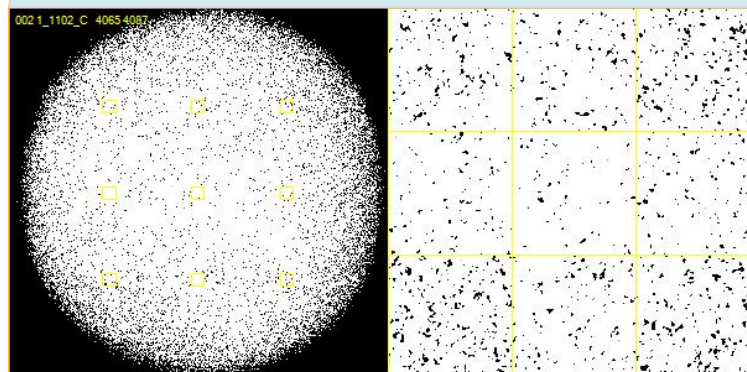
推奨クラスター密度の範囲で一番高い状態の例



Overclusterの例



Overclusterでサチュレーションを起こしている例

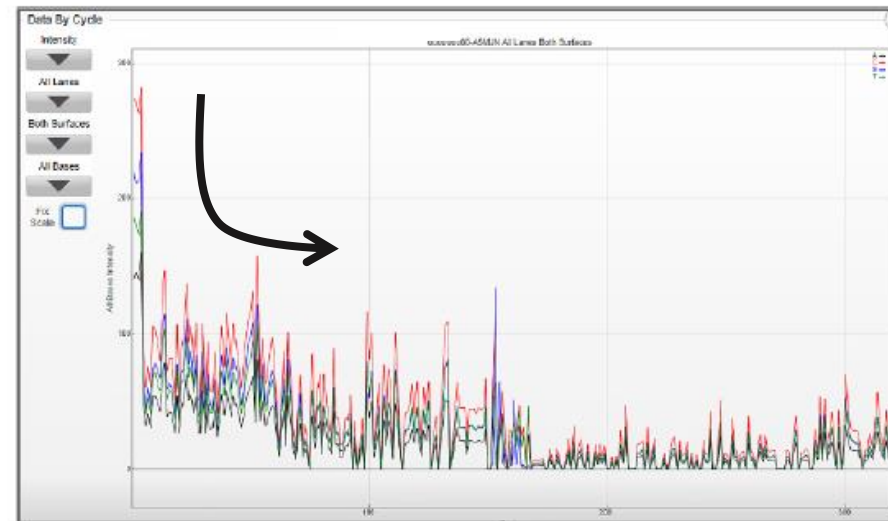
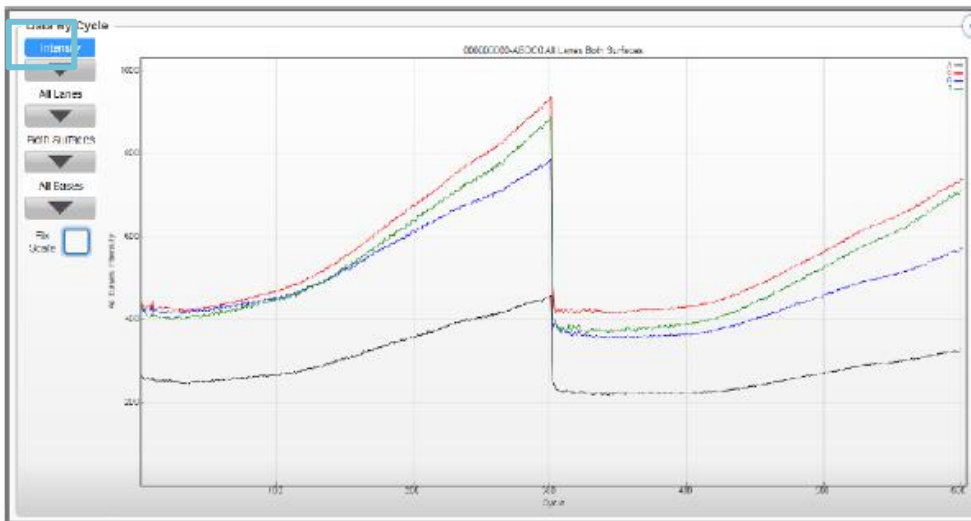


SAV Analysis Tabの確認：蛍光強度の低下

SAV上のAnalysisタブにあるData By CycleをIntensityに変更して確認する

クラスター密度が正常な時の例

Overclusterで
ランが失敗した時の例



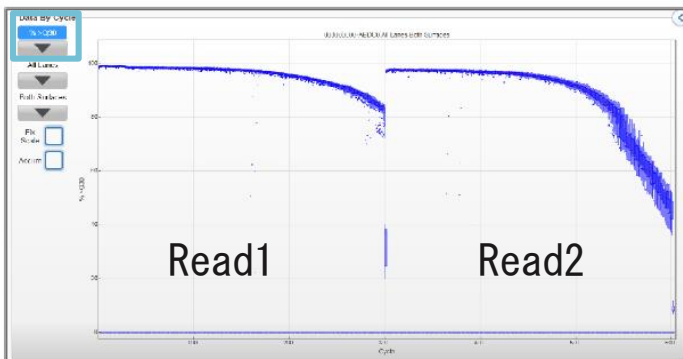
MiSeq V2試薬を使用した際の例
通常はこのようにスパイクのない曲線がみられる

Overclusterの結果クラスターの位置決めができず
全塩基で最初の数サイクルで蛍光強度が下がって
しまうことがある

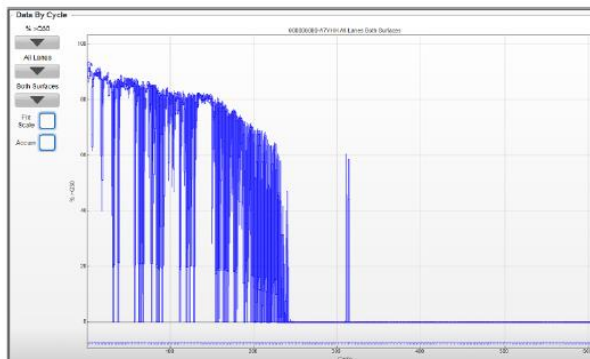
SAV Analysis Tabの確認：%>=Q30の低下

SAV上のAnalysisタブにあるData By Cycleを%>=Q30に変更して確認する

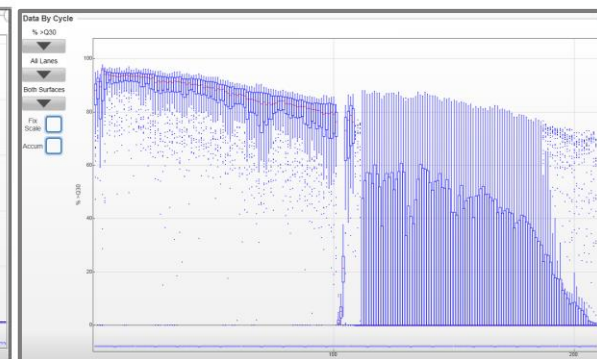
クラスター密度が正常な時の例



OverclusterでRead2開始後ランが止まってしまった例



OverclusterでRead2開始前の再合成でOverclusterが悪化した例



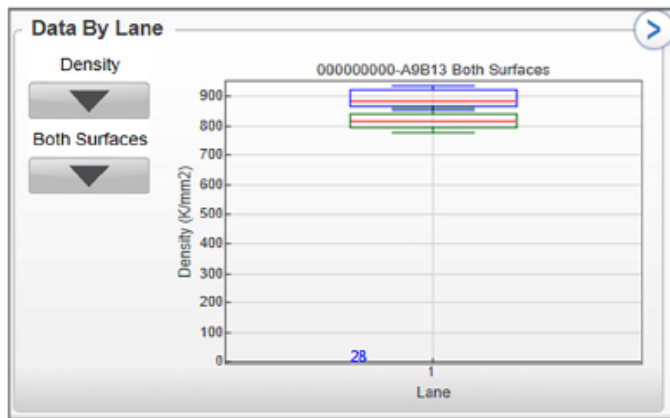
- OverclusterはRead1とRead2いずれにも影響を与えるが、Read2がより影響を受ける傾向にある
- Read2のシーケンシング開始前に数サイクルDNAの再合成を行う際に、クラスターのサイズが大きくなりクラスター同士の重なることが増えるためである
- クラスター同士が重なると補正がうまくいかずQ30が下がり、結果としてランが失敗してしまう恐れがある

SAV Analysis Tabの確認：Cluster Pass Filterの低下

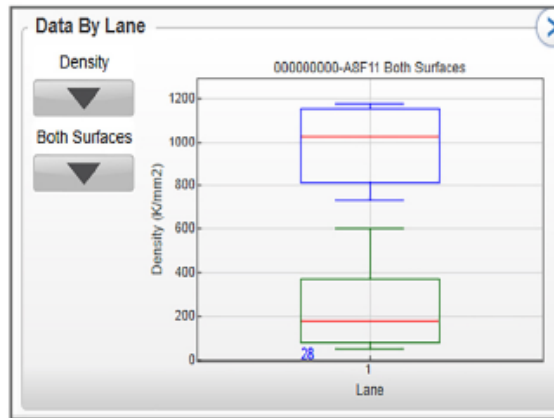
SAV上のAnalysisタブにあるData By Laneを確認する

青ボックスプロットは形成されたすべてのクラスターの数、緑ボックスプロットは純度の高いクラスター（＝filterをパスした配列情報決定に使用されるクラスター）の数を表している

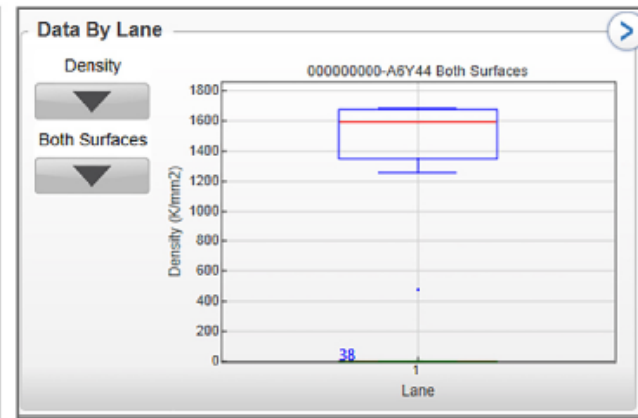
最適なクラスター密度の時



Overclusterの時



ひどく Overclusterの時



生のクラスター数と純度の高いクラスターの数に近い
＝青と緑のボックスプロットの距離が近い傾向を示す

補正がうまくいかず純度の高いクラスターの数が少なくなる
＝青と緑のボックスプロットの距離が遠くなる傾向を示す

ひどいoverclusterになると純度の高いクラスターがなくなる
＝緑のボックスプロットは0を示し、青ボックスプロットのみ表示される

本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

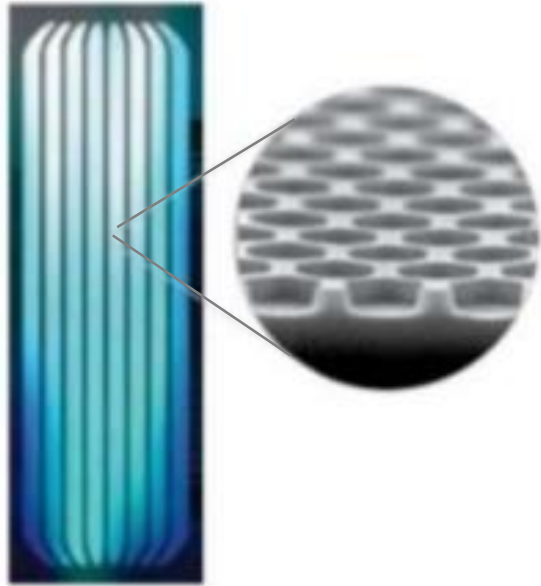
5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

サポート資料

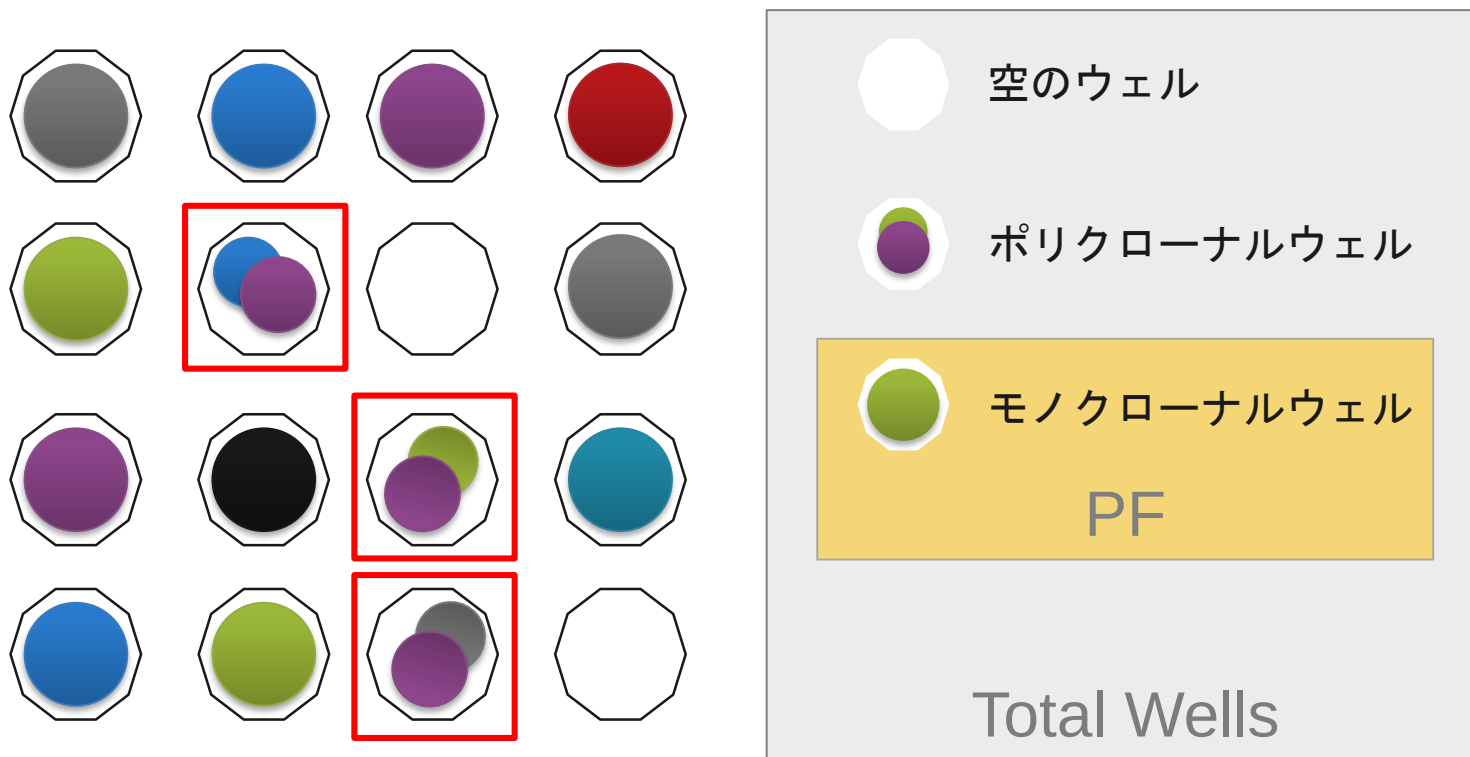
パターン化フローセルとは？



- パターン化フローセルは数百万以上の整列されたウェルから構成される
- 整列したウェル中にクラスターが形成される仕組みになっており、クラスターのサイズとクラスター間の幅が予めコントロールされているため overcluster にはなりにくい構造になっている
- 構造的には overcluster にならないためランダムフローセルのように厳密なクラスター密度のコントロールは不要だが、良好な結果を得るためにはライブラリーのローディング量を適正にコントロールする必要がある
- 適切なローディング量を確認するための項目：
 - Cluster Passing Filter(%PF)
 - % Occupancy
 - %>=Q30

Cluster Passing Filter(%PF): 塩基を決定できるクラスター数の指標

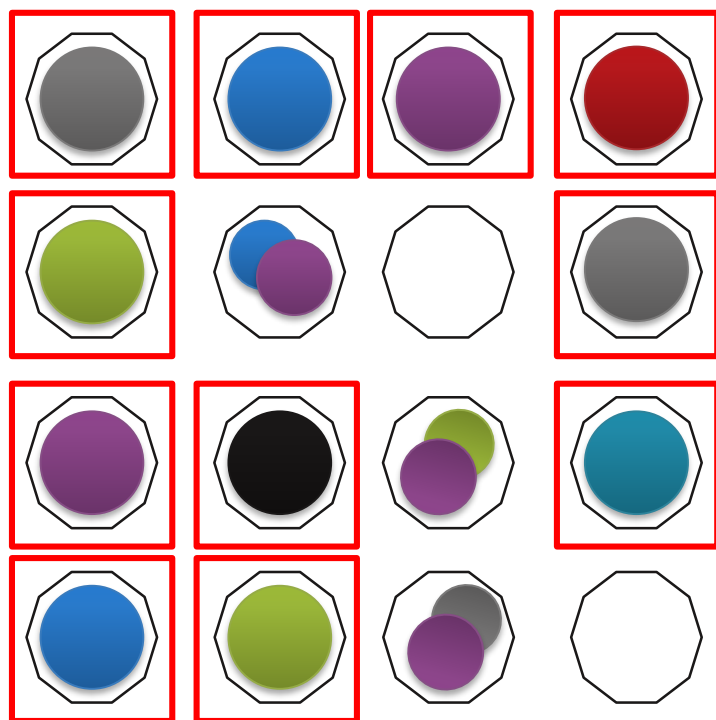
%PFが高いと、1回のランでより多くの塩基配列を決定できる



$$\%PF = \frac{\text{PF数}}{\text{Total Wells数}}$$

Cluster Passing Filter(%PF): 塩基を決定できるクラスター数の指標

%PFが高いと、1回のランでより多くの塩基配列を決定できる



$$\%PF = \frac{\text{PF数}}{\text{Total Wells数}}$$

ライブラリー濃度による%PFの変動

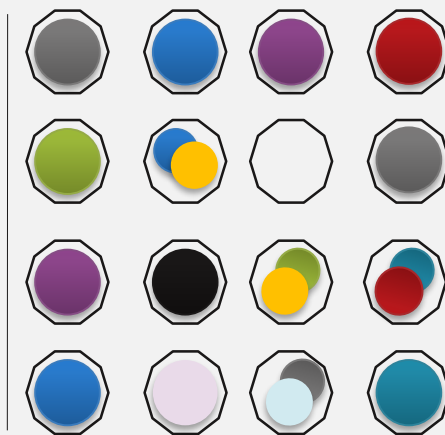
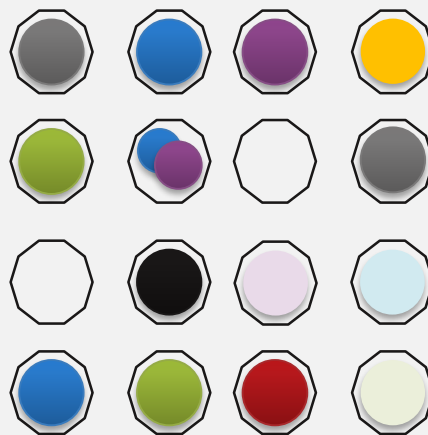
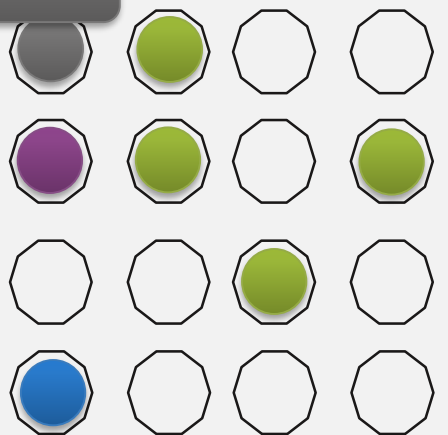
ライブラリー濃度

過少

通常範囲

過多

ウェルの状態

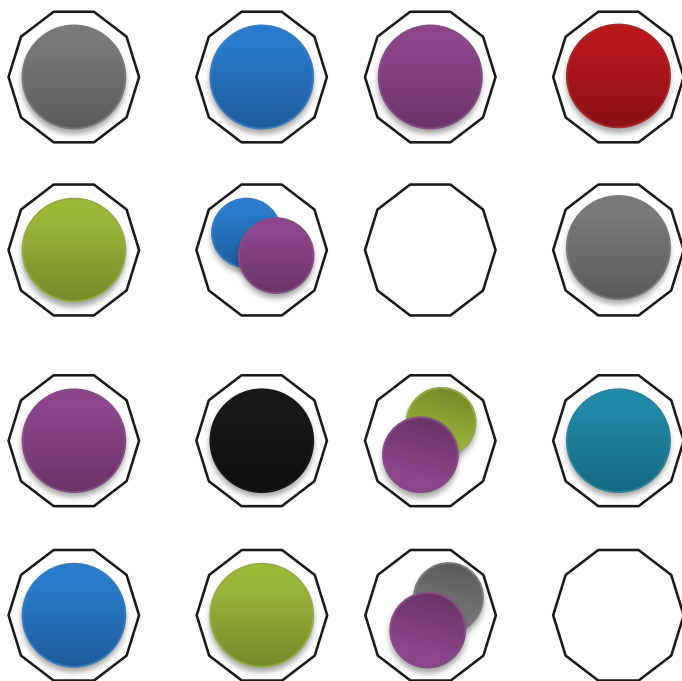


%PF



%Occupancy ・ %Occupied: クラスターが形成されたウェルの割合を示す指標

ポリクローナルウェルなど、塩基配列を決定できないクラスターも含む



$$\%Occupancy = \frac{\text{Occupied Wells数}}{\text{Total Wells数}}$$

ライブラリー濃度による%Occupancyの変動

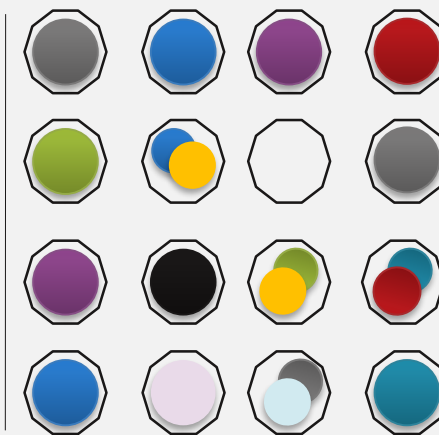
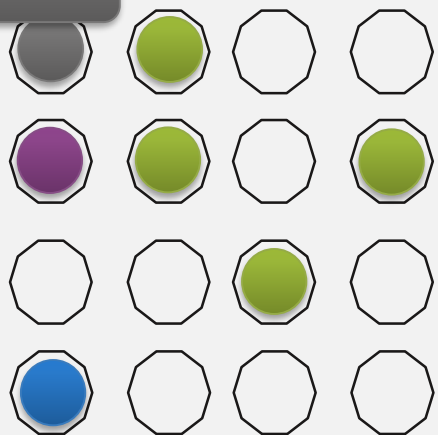
ライブラリー濃度

過少

通常範囲

過多

ウェルの状態



%Occupancy



パターン化フローセルの場合の診断方法

ライブラリー濃度が過剰量または非常に少ないとデータに影響するため、下記マトリックスの傾向の組み合わせをSAV、BaseSpace Sequence Hub、または装置25サイクル後のControl Software画面で確認し評価することが望ましい

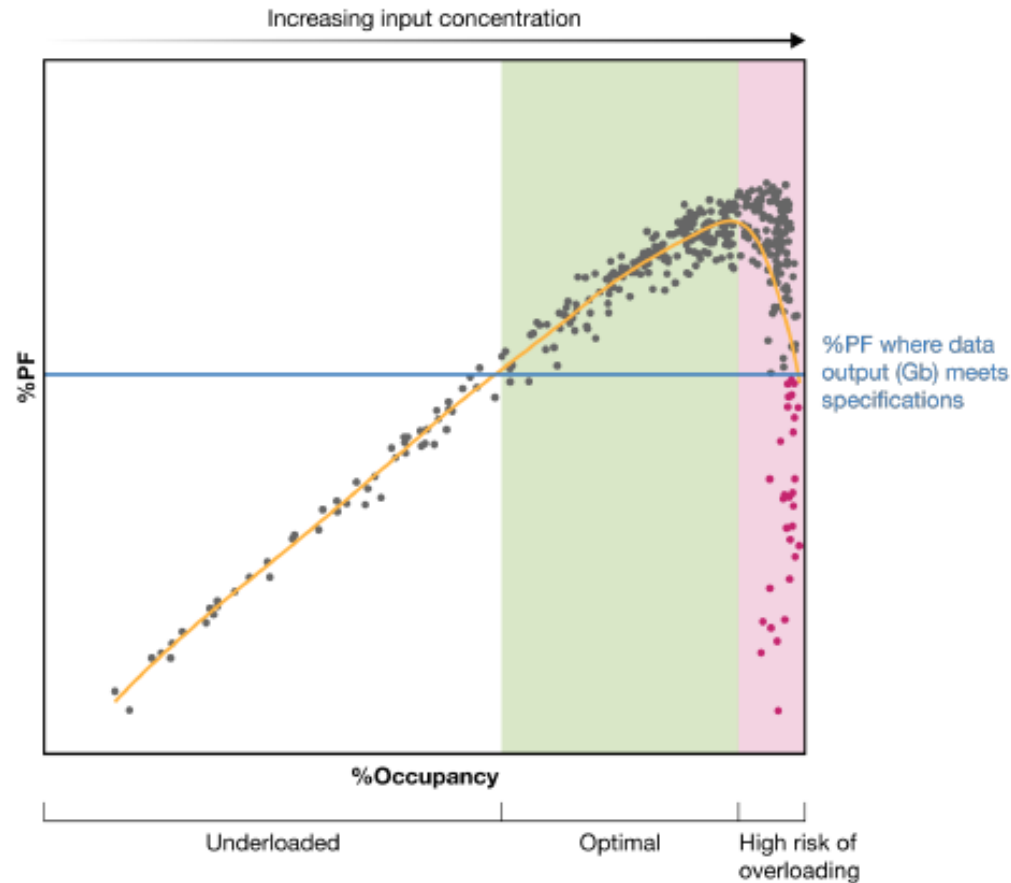
- %Occupancy
- %Passing filter
- % $\geq$ Q30

Metric	Underloaded	Optimal	Overloaded
%Occupancy ¹	Low	High	High
%PF	Low	High	Low
% $\geq$ Q30	High	High	Variable

※ iSeqとNovaSeq 6000パターン化フローセルの場合はクラスター密度が固定されている

パターン化フローセルの場合の診断方法

下図はiSeqとNovaSeqのラン結果に基づいた%Occupancyと%PF metricsの相関図



フローセルに過剰量ライブラリーがローディングされた状態だと%Occupancyが高く、%PFが下がる傾向

本ウェビナーのアジェンダ

1

クラスター形成とは？クラスターとは？

2

最適なクラスター密度の重要性とは？

– Overclustering と Underclusteringが与える影響 –

3

一般的にみられるクラスタリングに関する問題への回避策

4

ランダムフローセルにおける最適なクラスタリングの診断方法

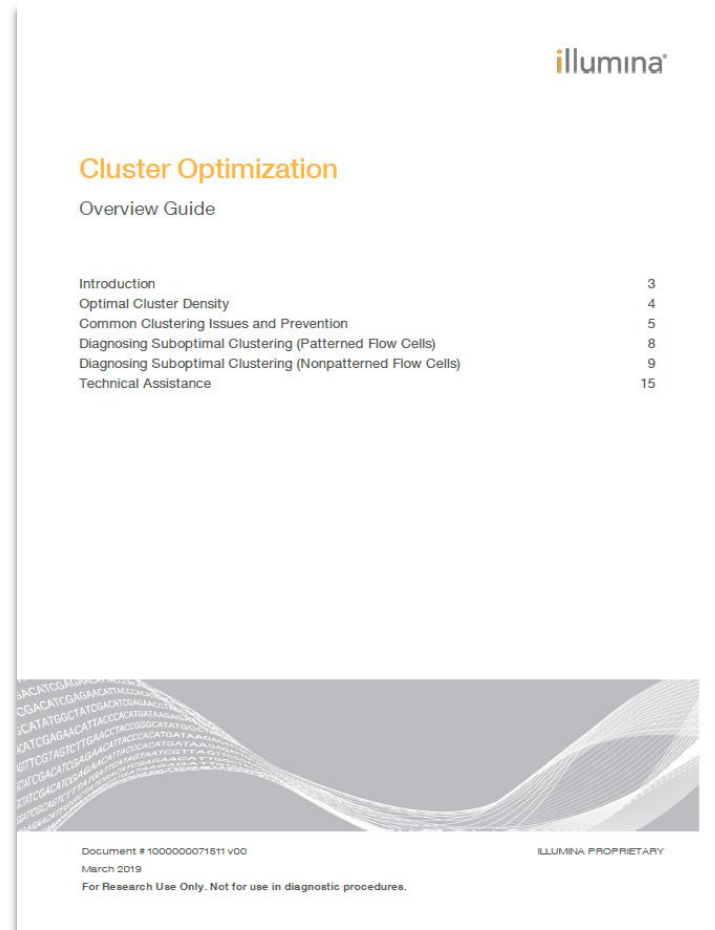
5

パターン化フローセル（ iSeq ・ NovaSeq ）

6

サポート資料

クラスター密度の最適化に関する最新版ガイド



<https://jp.support.illumina.com/downloads/cluster-optimization-overview-guide-1000000071511.html>

装置に関するサポートページ

Illumina Support Center

Search Support Center



SUPPORT RESOURCES

概要

Documentation

FAQs

Compatible Products

Reagent Kits

Software Downloads

Training

Troubleshooting

Bulletins

More ▾

SUPPORT HOME

Instrument

MiSeq System Support Resources



Support Center:
MiSeq Support

Documentation

MiSeq System Guide for Local Run Manager

MiSeq System Denature and Dilute Libraries
Guide

Cluster Optimization Overview Guide

Software Downloads

MiSeq Software Updater

MiSeq Reporter Installer

Product Information

Technical Bulletins

Specifications

Proactive Instrument Monitoring

Services and Warranties

Regulatory and Quality Information

NovaSeq 6000

<https://jp.support.illumina.com/>

関連ウェビナー

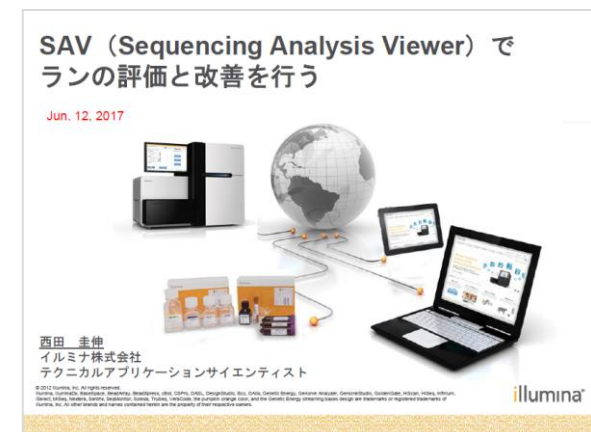
PCRアンプリコンDNAライブラリーなどのLow Diversityサンプルのシーケンスランを成功させるコツ

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2019/webinar-191120-j.html>



SAV (Sequencing Analysis Viewer) でランの評価と改善を行う【イルミナiSchool 初級】

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



その他サポート資料

Library quantification and quality control quick reference guide

Library quantification and quality control quick reference guide

01/29/19

Accurate quantification and proper quality check of next-generation sequencing libraries is key to a successful sequencing run. Different methods for quantification and quality control are recommended depending on the sequencing library kit being used. In this bulletin, we summarize the library quantification and quality control methods for libraries prepared with all current Illumina kits. Use the methods listed in the tables to validate the final library before sequencing.

DNA Kits – Research Use Only

Kits	Quantification	Quality Control
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)

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

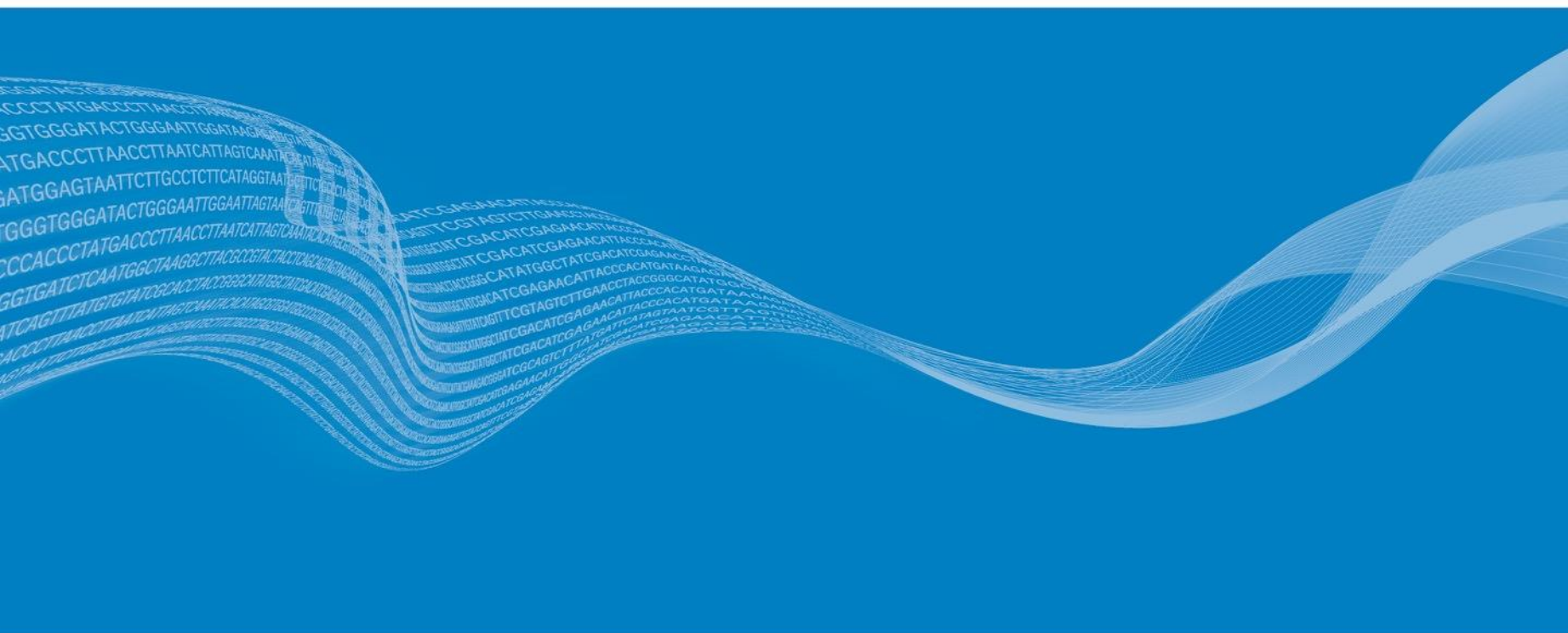
Support Bulletins <https://jp.support.illumina.com/bulletins.html?langsel=/jp/>

- Cluster Density Specifications for Illumina Sequencing Platforms
- Considerations when migrating non-Illumina libraries between sequencing platforms
- Cluster density considerations when migrating Illumina libraries between sequencing platforms

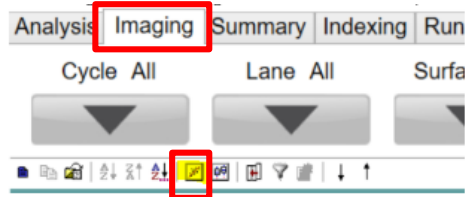
Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV) のガイドとインストレーター

https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav.html?langsel=/jp/

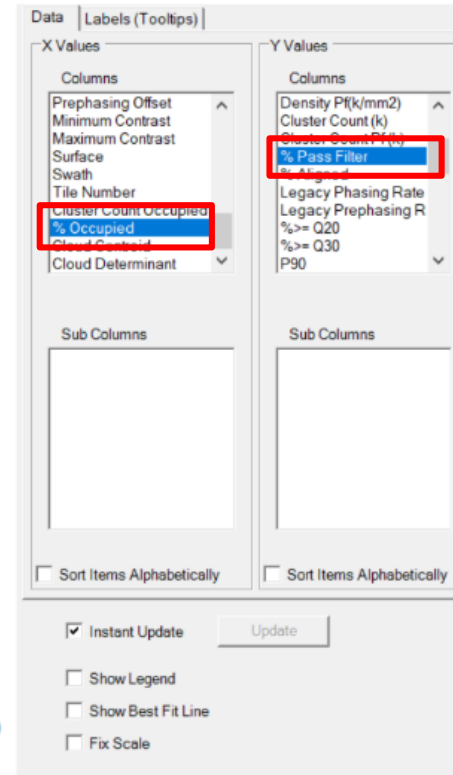
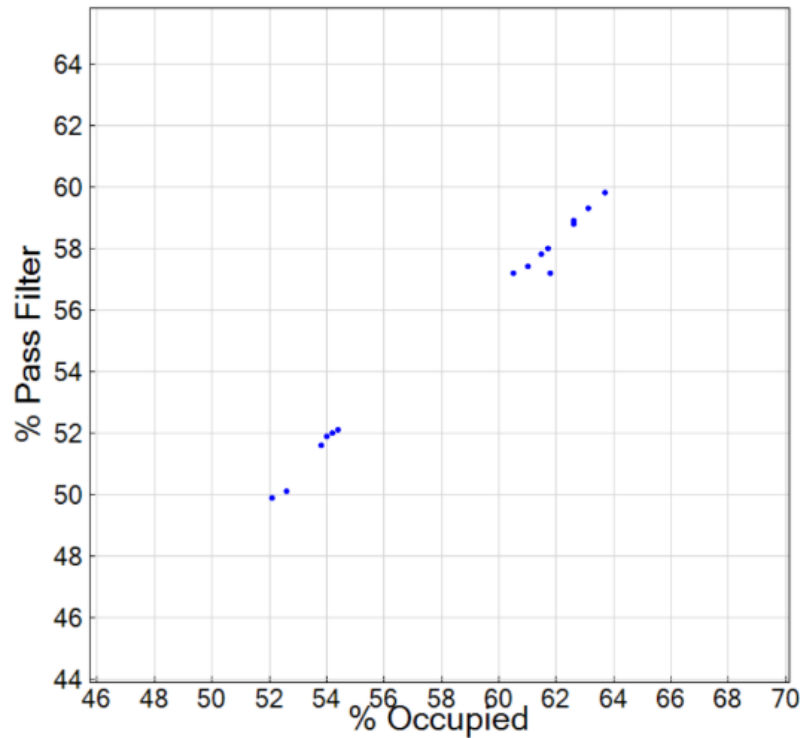
参考資料



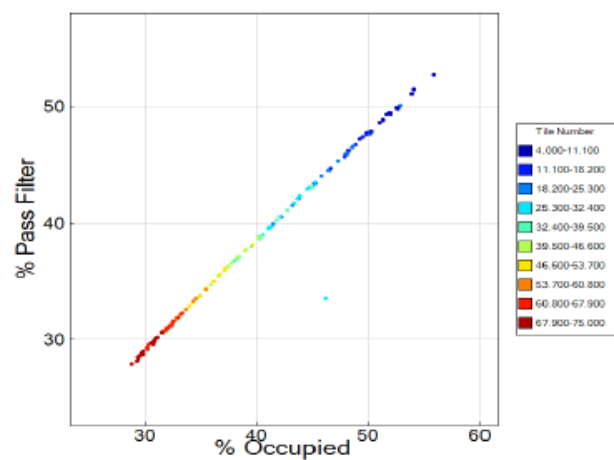
%Occupancy vs %PF 相関図の描き方



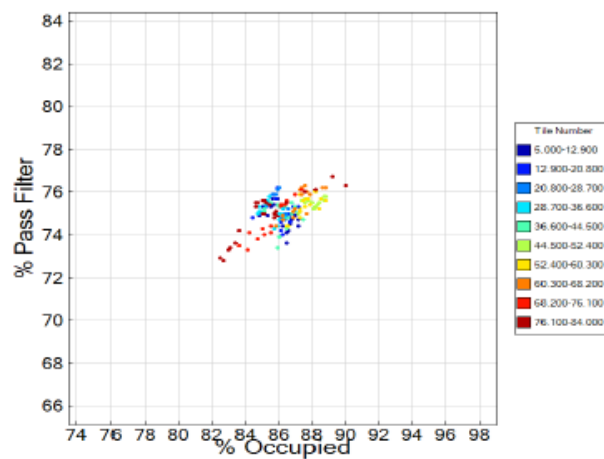
A pop up box will come up where you can choose the X and Y metrics for a scatter plot. Choose % occupied for the X value and % PF for the Y value



Under Loaded



Properly Loaded



Overloaded Loaded

