

ラン結果の見方がわかる！ Sequencing Analysis Viewer(SAV) の使用法

岩崎 万由子

テクニカルアプリケーションサイエンティスト

2023年5月31日



Agenda

- 1 Sequencing Analysis Viewerのご紹介
- 2 基本的な操作方法
- 3 各ランメトリクスの解説と確認方法
- 4 イルミナシーケンサーの仕様値
- 5 その他リソース情報

Sequencing Analysis Viewerのご紹介



Sequencing Analysis Viewer(SAV)とは？

- Sequencing Analysis Viewer(SAV) は、
イリミナ次世代シーケンサーのランメトリクスを可視化するソフトウェアです
- 配列情報などを参照する機能はなく、ランのクオリティを評価するためのものです



SAVのダウンロードとバージョンについて

イルミナ社のウェブサイトからダウンロードが可能です

詳細なインストール要件は、各バージョンのSoftware GuideまたはProduct Documentationをご確認ください

– v2.4.7 (Windows対応)

iSeq™ 100、MiSeq™、MiniSeq™、NextSeq™ 500/550/1000/2000、NovaSeq™ 6000のデータに対応
(NextSeq 1000/2000 Control Software v1.5以降のデータに非対応)

– v2.5.12 (Windows対応)

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.5以降のデータのみに対応

– v3.0 (Windows 10以降、Linux、MacOS対応)

iSeq 100、MiSeq、MiniSeq、NextSeq 500/550/1000/2000、NovaSeq 6000/Xのデータに対応
version 2.x.xと並行してインストールが可能

* Linux版をNextSeq 1000/2000にインストールすることはできません

SAVサポートページ: https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav.html

SAV version 3.0のご紹介

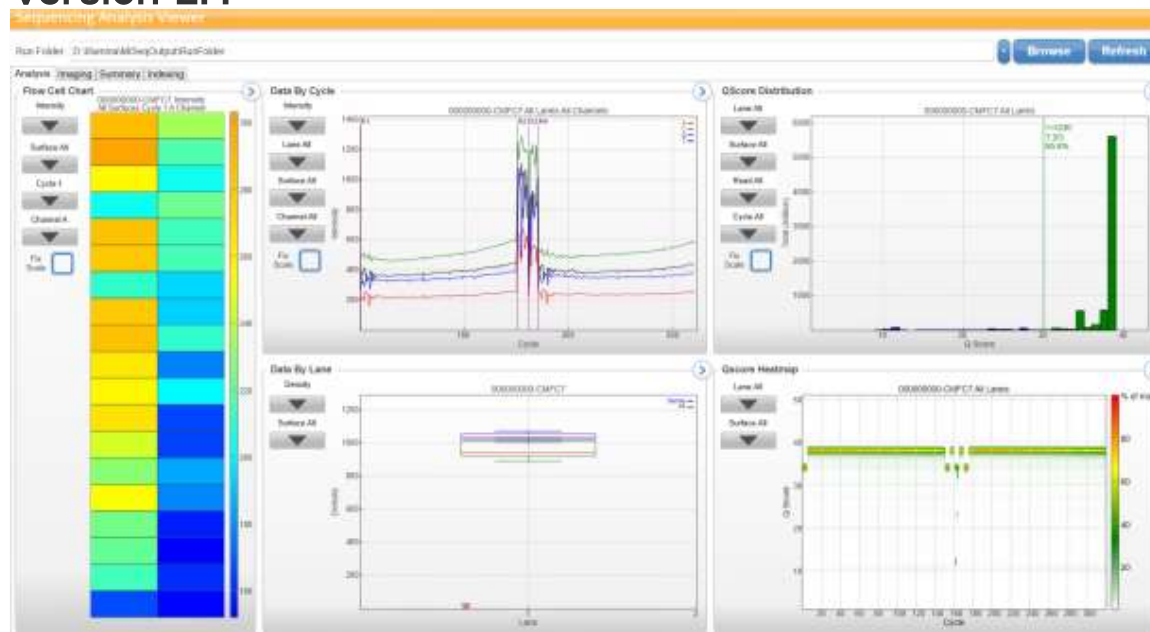
2023年3月に、デザインが一新されたSAV version 3.0がリリースされました

- Windowsに加え、MacOS・Linuxに対応したバージョンも登場
- NovaSeq Xのランデータに対応
- version 2がインストールされているコンピューターに、並行してインストールが可能

*version 2.xと3.0で、確認できる主要メトリクスに大きな違いはありません

*version 3.0は、データ参照用のファイルパスが半角英数字である必要があります

version 2.4

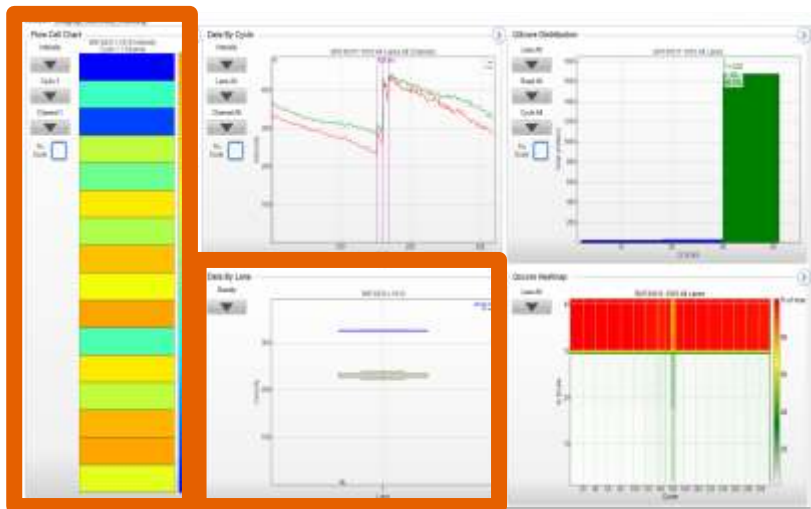


version 3.0

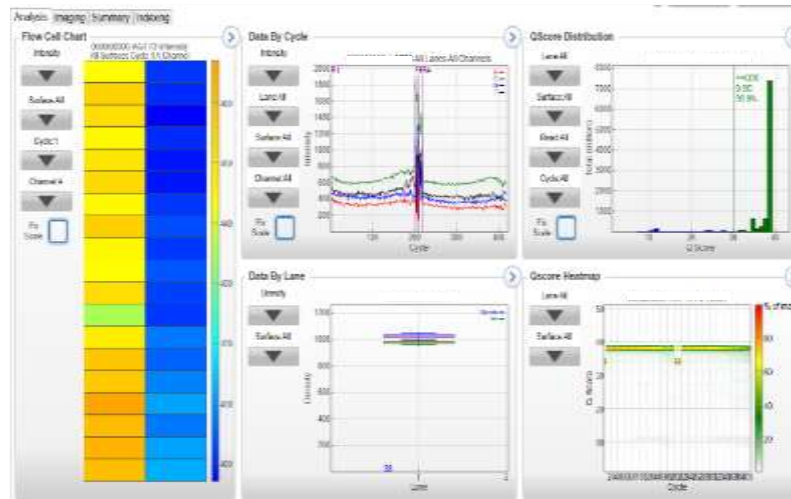


シーケンサーごとにカスタマイズされた表示メトリクス

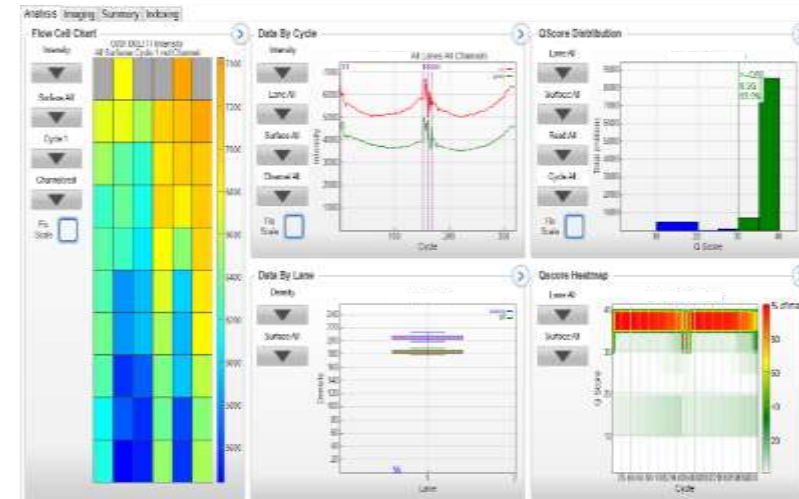
iSeq 100



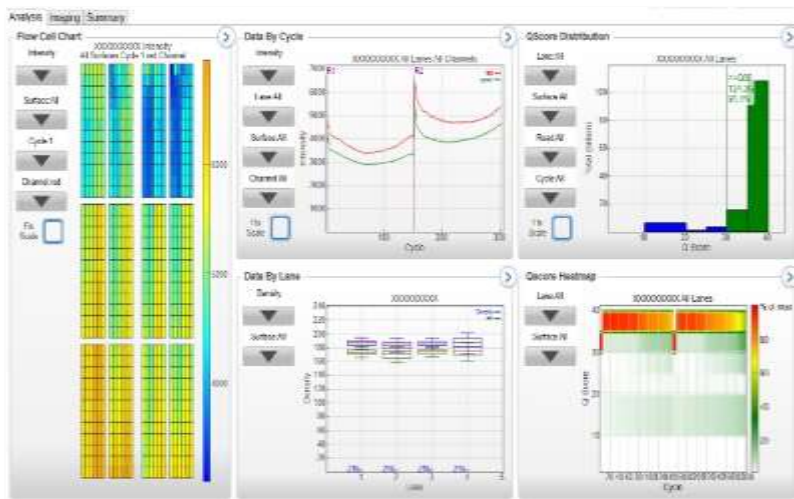
MiSeq



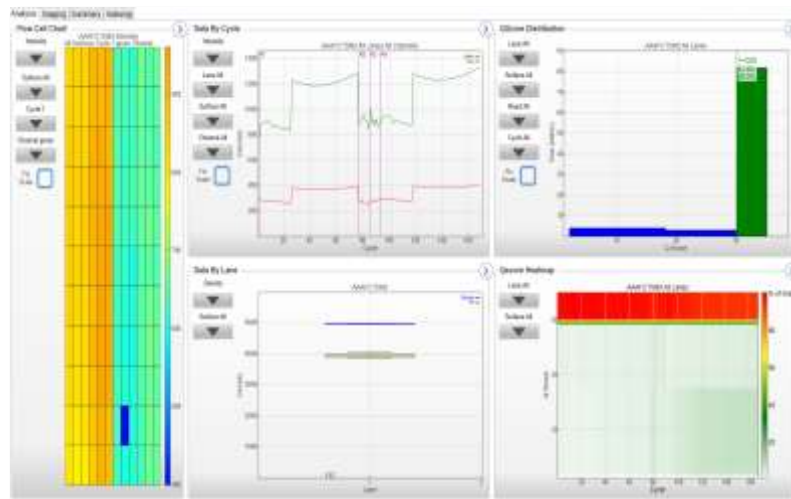
MiniSeq



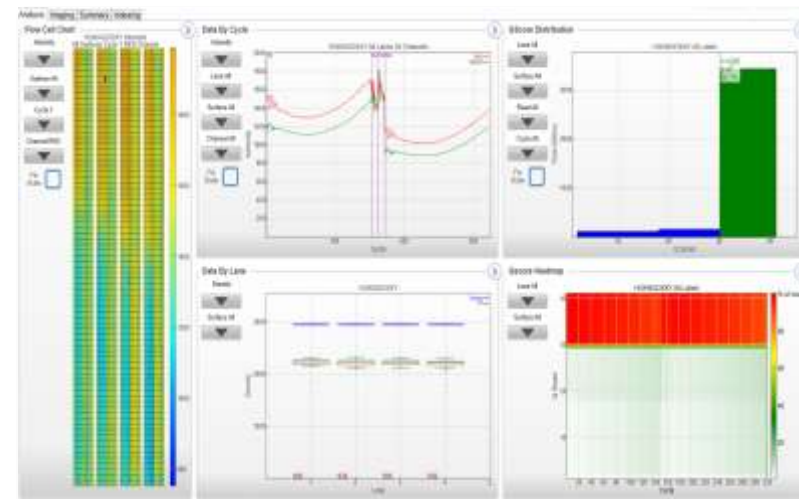
NextSeq 500/550



NextSeq 1000/2000



NovaSeq 6000



基本的な操作方法

2

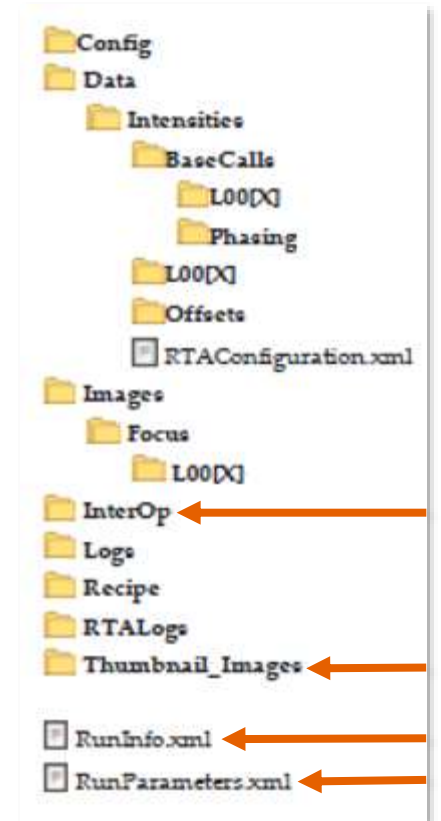
SAVでデータを参照するために必要なファイル

必要なファイル:

- InterOpフォルダ全体
- RunInfo.xml
- RunParameters.xml
- Thumbnail_Imagesフォルダ (オプション): クラスターの画像を見ることができます (Thumbnailフォルダは、機種によっては存在しません)

必要なファイルの入手先 (個人のPC上のSAVの場合):

- Run folder内 (ランを実施した日付や装置シリアル番号の入ったフォルダ)
 - BaseSpace Sequence Hub (BSSH) からダウンロード (p.10参照)
- *装置上のSAVでは、Outputフォルダ内のRun folderの指定でご使用いただけます



BaseSpace™ Sequence Hub からSAV参照に必要なファイルをダウンロードする方法

- RUNSタブより該当ランをクリックし、FILEにあるDownloadからSAVを選択しダウンロードします

1

2

3

4

5

6

Download Run

Run Name	Size
NextSeq2000: Nextera Flex Enrichment (8 reps of NA1287...	40.04 GB

BaseSpace Sequence Hub Downloader must be installed. It's a one-time installation and provides fast and secure downloads via SSL.

[INSTALL DOWNLOADER](#)

Select the file types to be downloaded:

FASTQ

SAV

No analysis files are available for this run

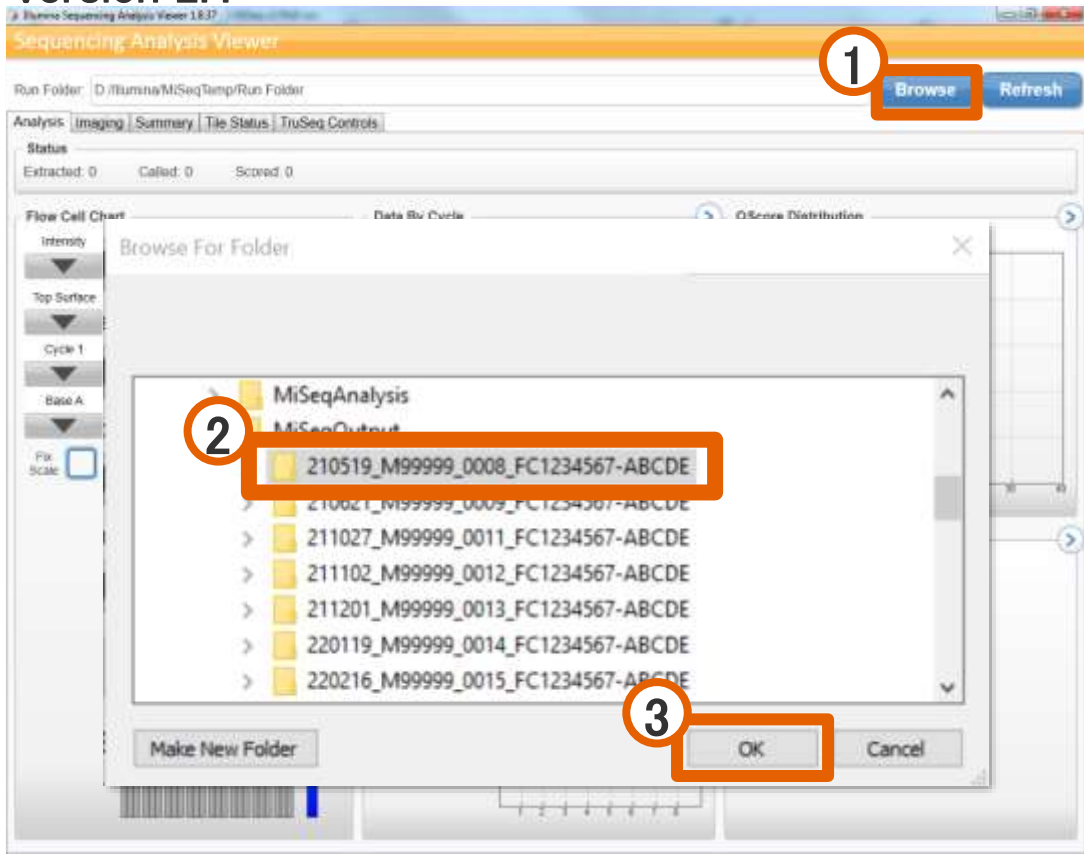
[CLOSE](#) [DOWNLOAD](#)

初回はBaseSpace Downloaderがインストールされます

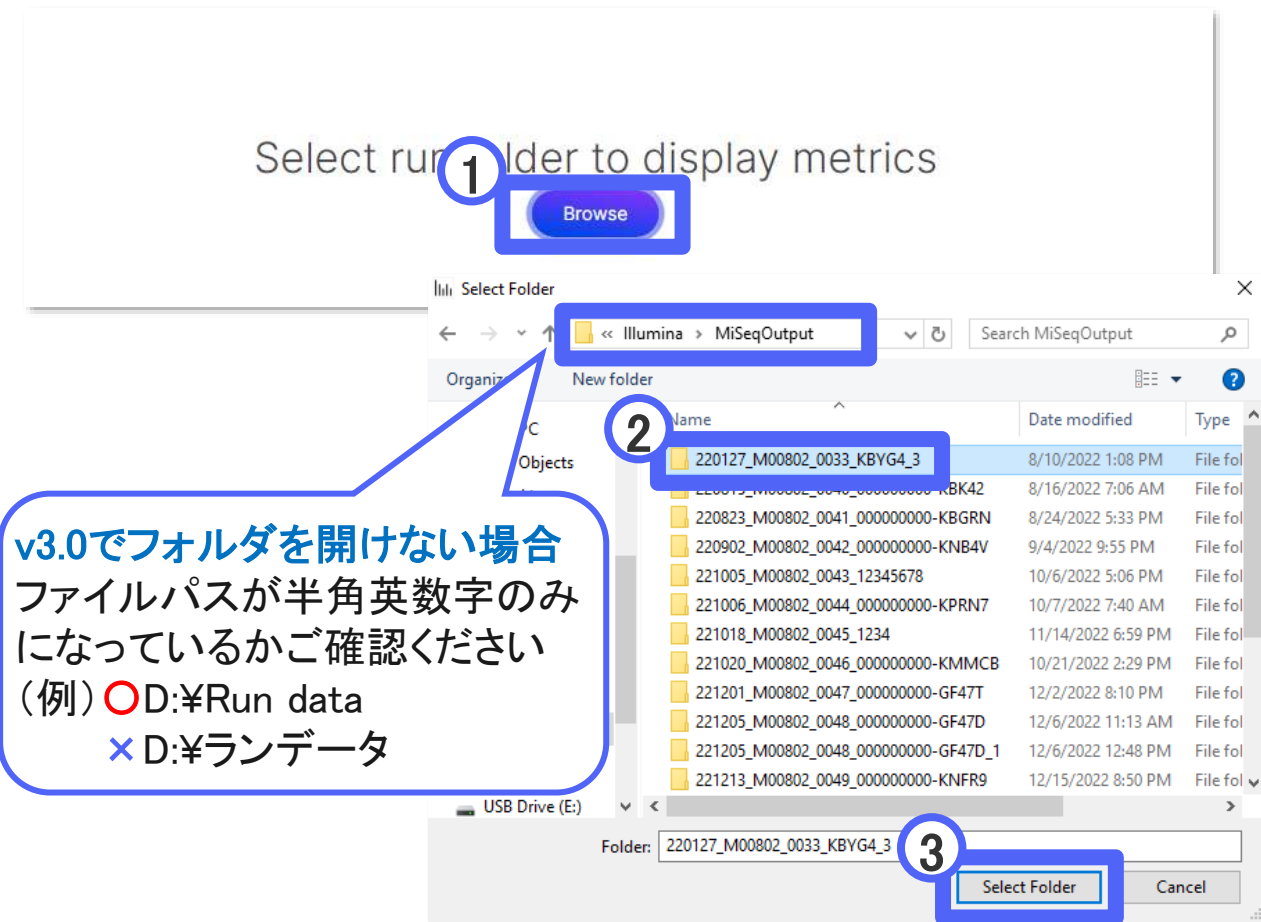
ファイルの開き方

- 「Browse」からInterOp、RunInfo、RunParametersが入っているフォルダを選択します

version 2.4



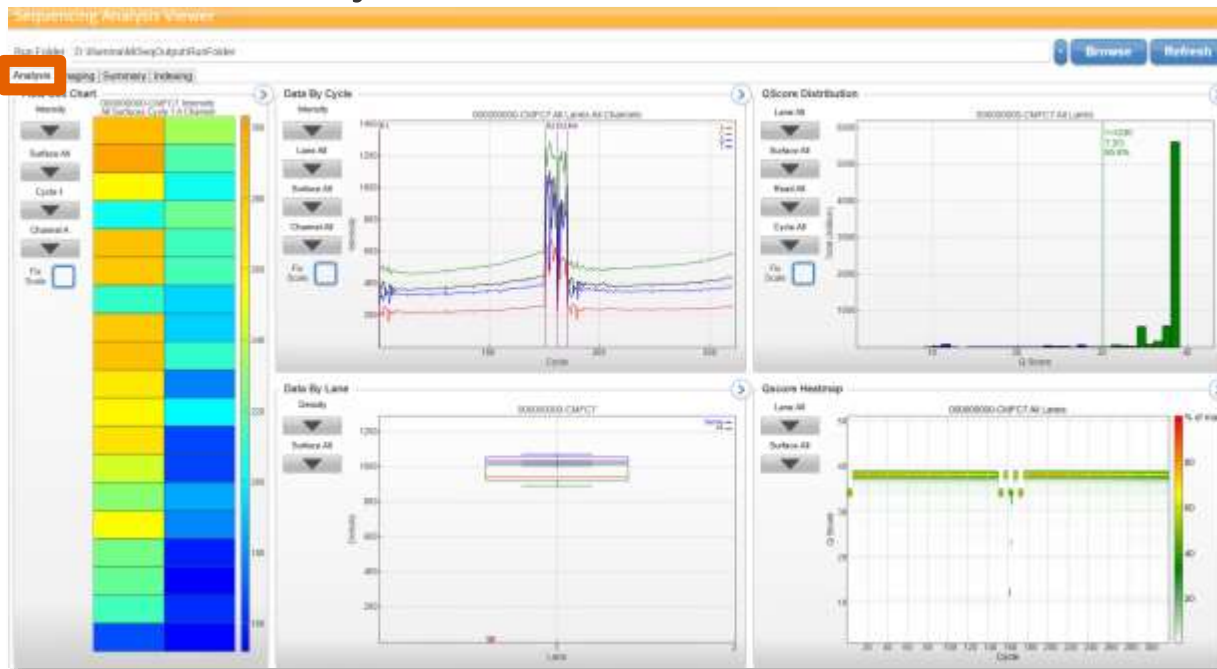
version 3.0



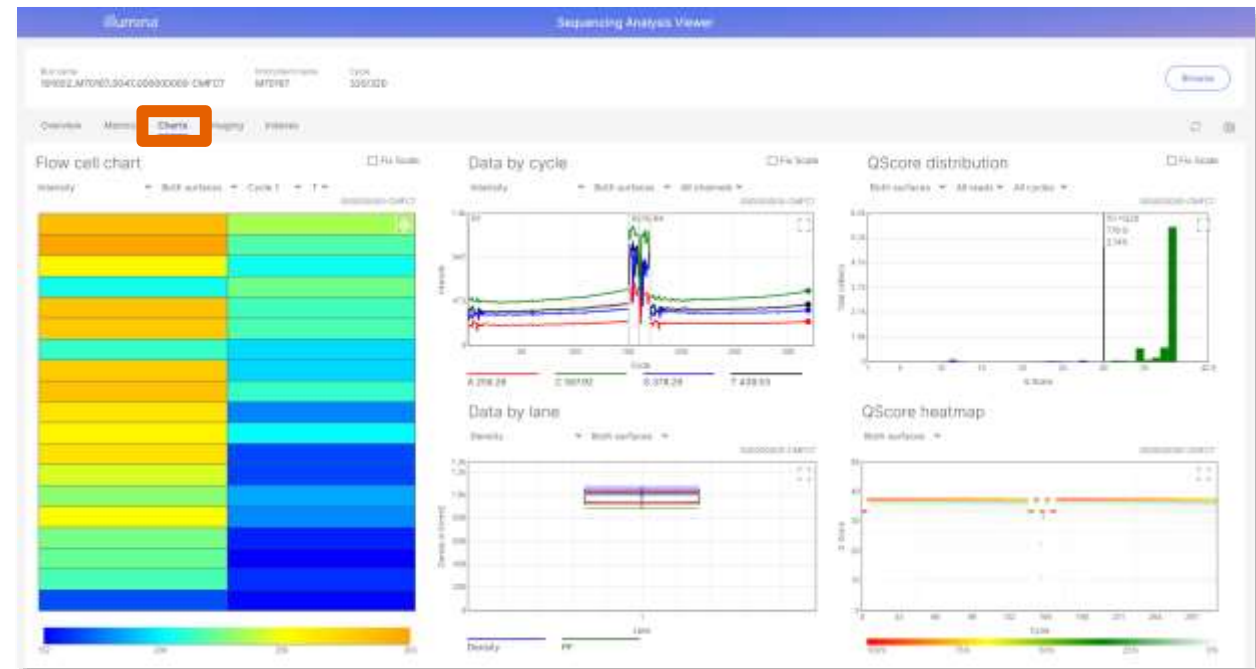
各タブの解説 [Analysis/Chartsタブ]

- フローセルのタイルやサイクル、Laneごとの各メトリクスを、チャートで確認できます

version 2.4 Analysisタブ



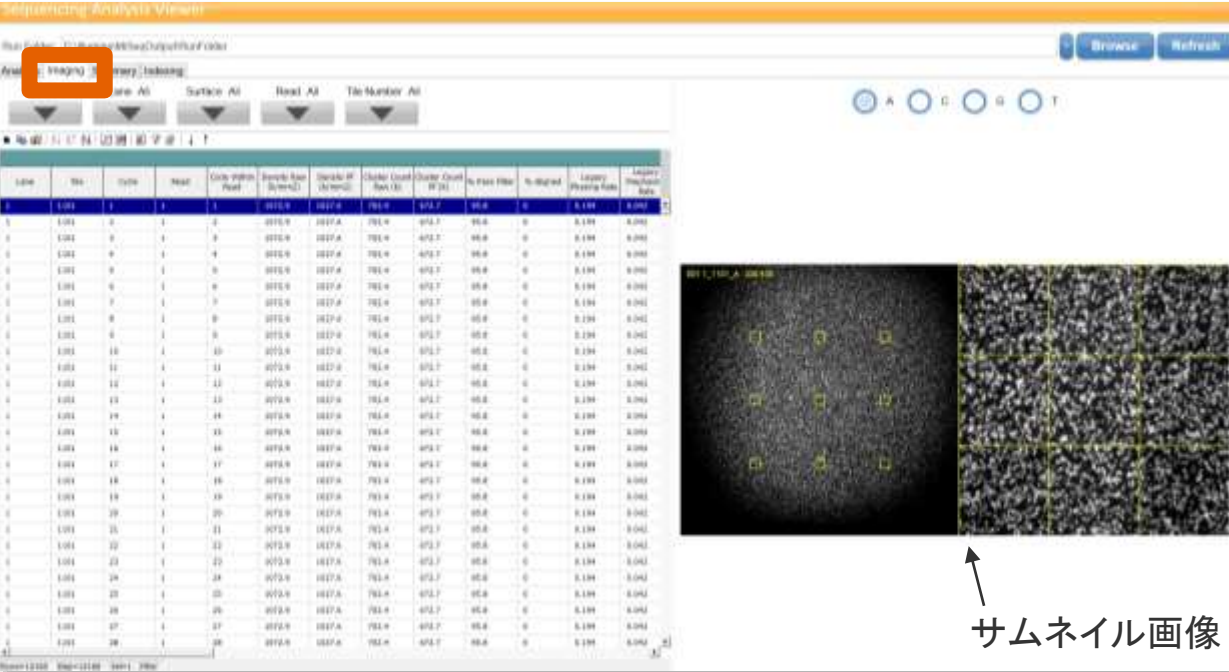
version 3.0 Chartsタブ



各タブの解説 [Imagingタブ]

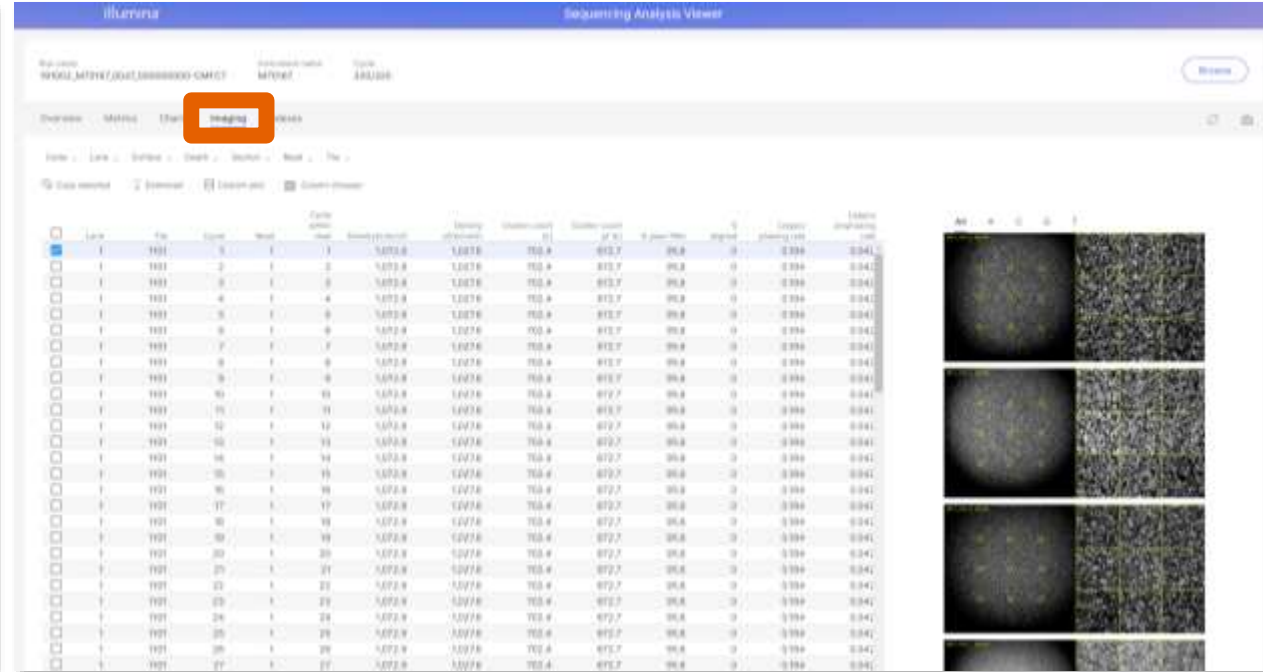
- サイクル、タイルごとに、各メトリクスの具体的な数値を確認できます
- Browseで指定したフォルダ内の適切なLocationにThumbnail_Images(*)のデータがある場合、クラスタの様子をサムネイル画像で見ることができます

version 2.4



サムネイル画像

version 3.0



(*)Thumbnail_Imagesは、機種によっては存在しません

各タブの解説 [Summary/Metricsタブ]

- Read、Laneごとに要約された、主要なランメトリクスを確認できます
- Read2(i)などの「(i)」がつくReadは、Indexを示します

version 2.4 Summaryタブ

Sequencing Analysis Viewer

Run Folder: [Path] [Browse] [Refresh]

Analysis Links: **Summary** [Other tabs]

Cycle Status: Extracted: 520 | Collected: 520 | Scored: 520 | Error Rate: 0

Run Summary

Lane	Read Type	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
Read 1	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00
Read 2 (i)	0.21	0.21	0.00	0.21	0.00
Read 3 (i)	0.21	0.21	0.00	0.21	0.00
Read 4	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00
Non-indexed total	3.42	3.42	0.00	3.42	0.00
Total	7.41	7.41	0.00	7.41	0.00

Read 1

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

Read 2 (i)

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

Read 3 (i)

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

Read 4

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

Buttons: Copy to Clipboard, Zip My Run

version 3.0 Metricsタブ

illumina Sequencing Analysis Viewer

Run Name: [ID] [Browse] [Refresh]

Analysis Links: **Metrics** [Other tabs]

Cycle Status: Extracted: 520 | Collected: 520 | Scored: 520 | Error Rate: 0

Run Summary

Lane	Read Type	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
Read 1	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00
Read 2 (i)	0.21	0.21	0.00	0.21	0.00
Read 3 (i)	0.21	0.21	0.00	0.21	0.00
Read 4	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00

Read 1

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

Read 2 (i)

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

Read 3 (i)

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

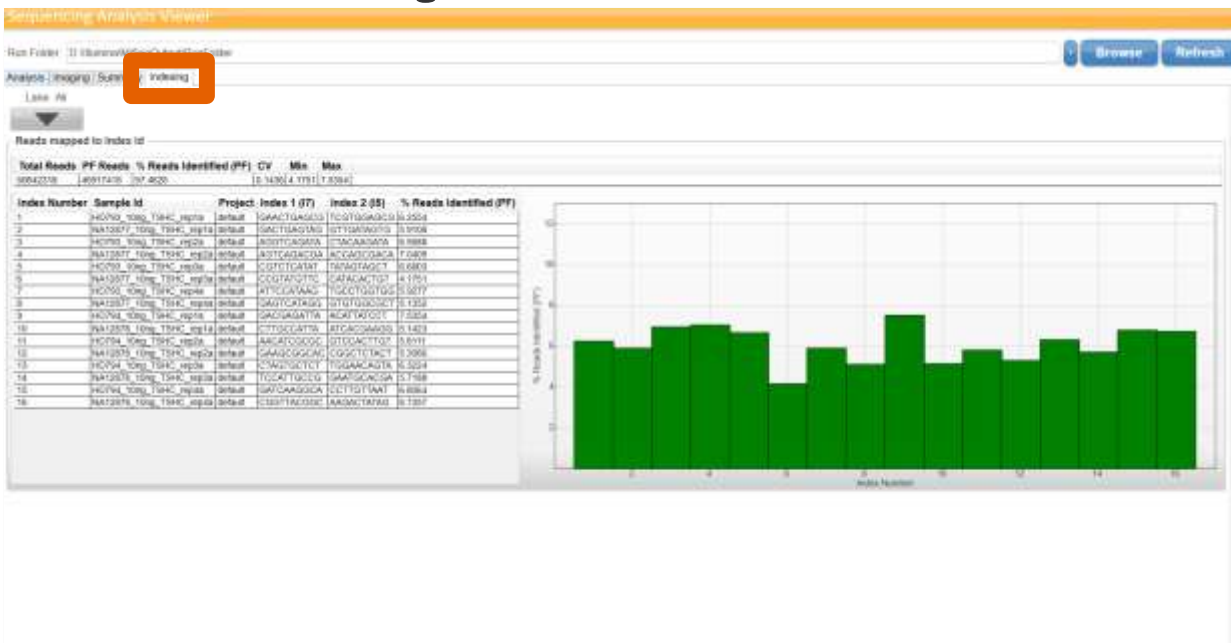
Read 4

Lane	Read	Sequencing Rate (Paired)	Sequencing Rate (Unpaired)	Sequencing Rate (Total)	Sequencing Rate (Error)
1	30	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00	1.00 x 1.00	0.00 x 0.00

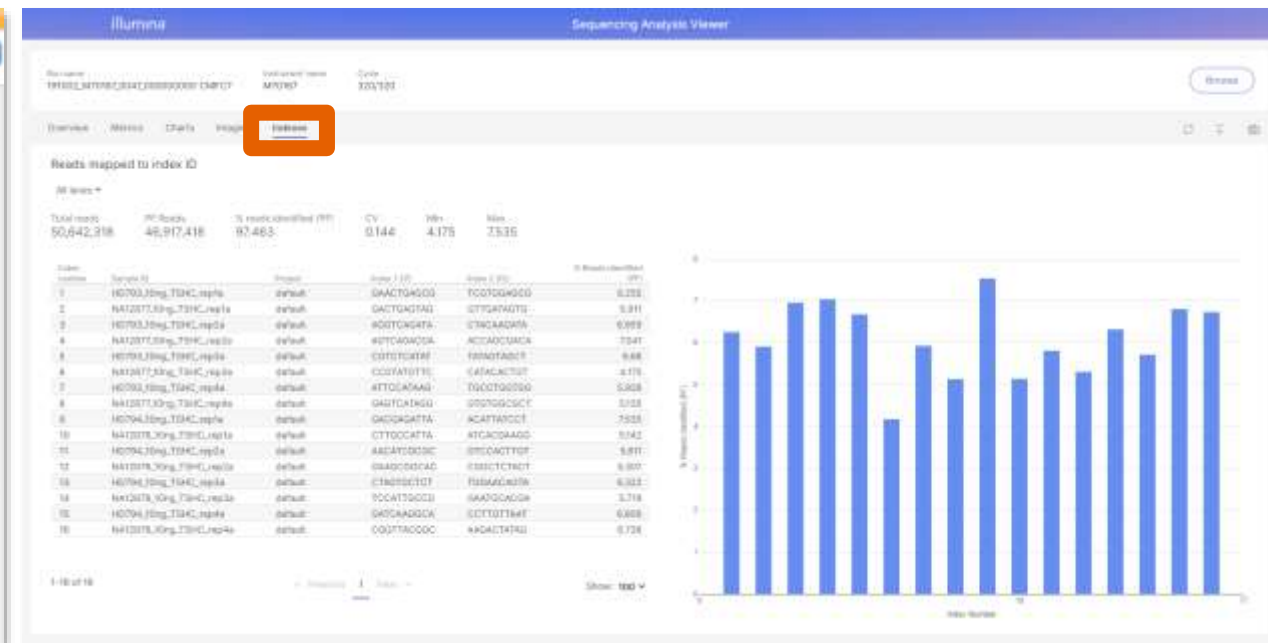
各タブの解説 [Indexing/Indexesタブ]

- Indexタブは、InterOpフォルダ内にIndexMetricsOut.binが存在する場合のみ表示されます
- Index情報に基づき、サンプルごとのおおよそのリードの割合を確認できます

version 2.4 Indexingタブ



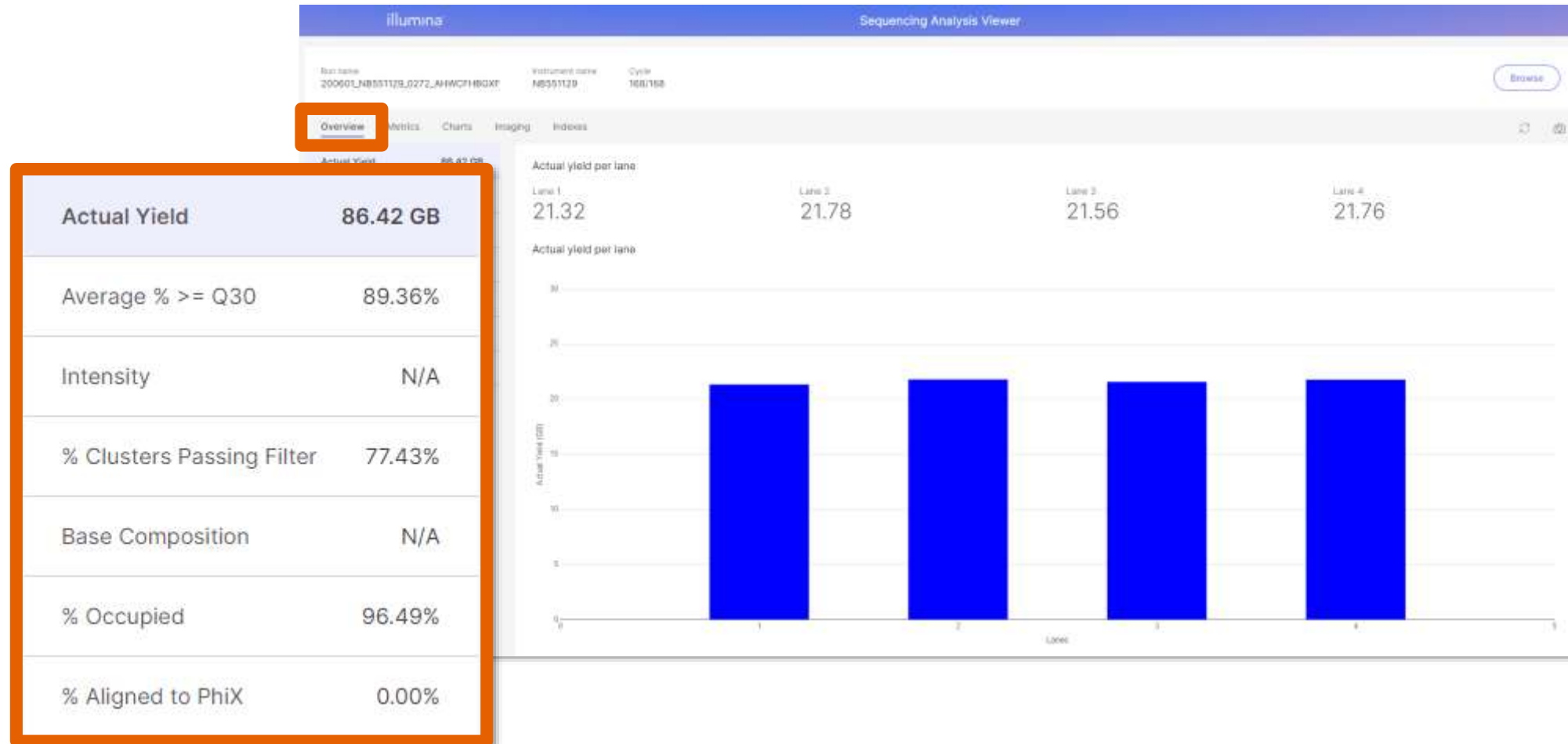
version 3.0 Indexesタブ



*NextSeq 1000/2000では、IndexMetricsOut.binがRun folder中のInterOpフォルダ内に自動生成されません。Local DRAGEN analysis モードご利用の場合は、IndexMetricsOut.binが、Run folder中のAnalysis/[Analysis番号]/Data/Reportフォルダ内に生成されるため、手動でInterOpフォルダ内にコピーしてください

Overviewタブ (v3.0以降のみ)

- 主要なランメトリクスの数値とグラフを確認できます



各ランメトリクス of 解説と確認方法

3

ランメトリクス

1 データ収量

2 クオリティ($\% \geq Q30$)

3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)

4 Intensity

5 FWHM

6 %Base

7 Phasing / Prephasing

8 %AlignedとError Rate

ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスター密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 %AlignedとError Rate

データ収量とは？

- データ収量 (Yield) は、コールされた塩基数 (b) で、フィルター (p.28参照) を通過した塩基のみカウントされます
- SummaryタブのRun SummaryまたはOverviewタブから、データ収量を確認することができます

version 2.4

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% >= Q30
Read 1	3.50	3.50	0.00	NaN	220	96.36
Read 2 (I)	0.21	0.21	0.00	NaN	650	97.16
Read 3 (I)	0.21	0.21	0.00	NaN	537	84.51
Read 4	3.50	3.50	0.00	NaN	244	95.59
Non-Indexed Total	6.99	6.99	0.00	NaN	232	95.98
Total	7.41	7.41	0.00	NaN	413	95.68

version 3.0

Actual Yield	7.41 GB
Average % >= Q30	95.68%
Intensity	N/A
% Clusters Passing Filter	92.64%
Base Composition	N/A
% Aligned to PhiX	0.00%

ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 %AlignedとError Rate

クオリティスコアとは？

- クオリティスコアとは、Phredスケールに基づいた、ベースコールの正確性の指標です
- クオリティスコアは、25サイクル後にフィルター(p.28参照)を通過したクラスターに対してのみ計算されます

Phred Quality Score	塩基が誤ってコールされる確率	ベースコールの正確性
10	10分の1	90%
20	100分の1	99%
30	1000分の1	99.9%
40	10000分の1	99.99%

} % \geq Q30

- イルミナシーケンサーでは、クオリティスコアが30以上の塩基の割合(% \geq Q30)を仕様値として採用しています
- % \geq Q30は、99.9%以上の正確性でコールされた塩基の割合を示しています

参考ページ: <https://jp.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>

% \geq Q30の確認方法と例

- SummaryタブのRun SummaryまたはOverviewタブから、ラン全体の% \geq Q30を見ることができます

version 2.4

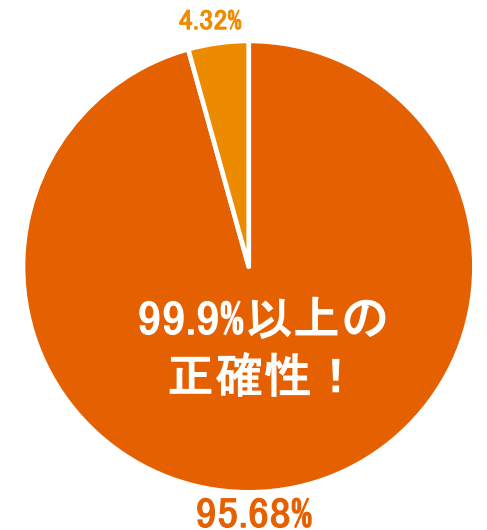
Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle	% \geq Q30
Read 1	3.50	3.50	0.00	NaN	220	96.36
Read 2 (I)	0.21	0.21	0.00	NaN	650	97.16
Read 3 (I)	0.21	0.21	0.00	NaN	537	84.51
Read 4	3.50	3.50	0.00	NaN	244	95.59
Non-Indexed Total	6.99	6.99	0.00	NaN	232	95.98
Total	7.41	7.41	0.00	NaN	413	95.68

version 3.0

Overview	Metrics	Charts	Int
Actual Yield	7.41 GB		
Average % \geq Q30	95.68%		
Intensity	N/A		
% Clusters Passing Filter	92.64%		
Base Composition	N/A		
% Aligned to PhiX	0.00%		



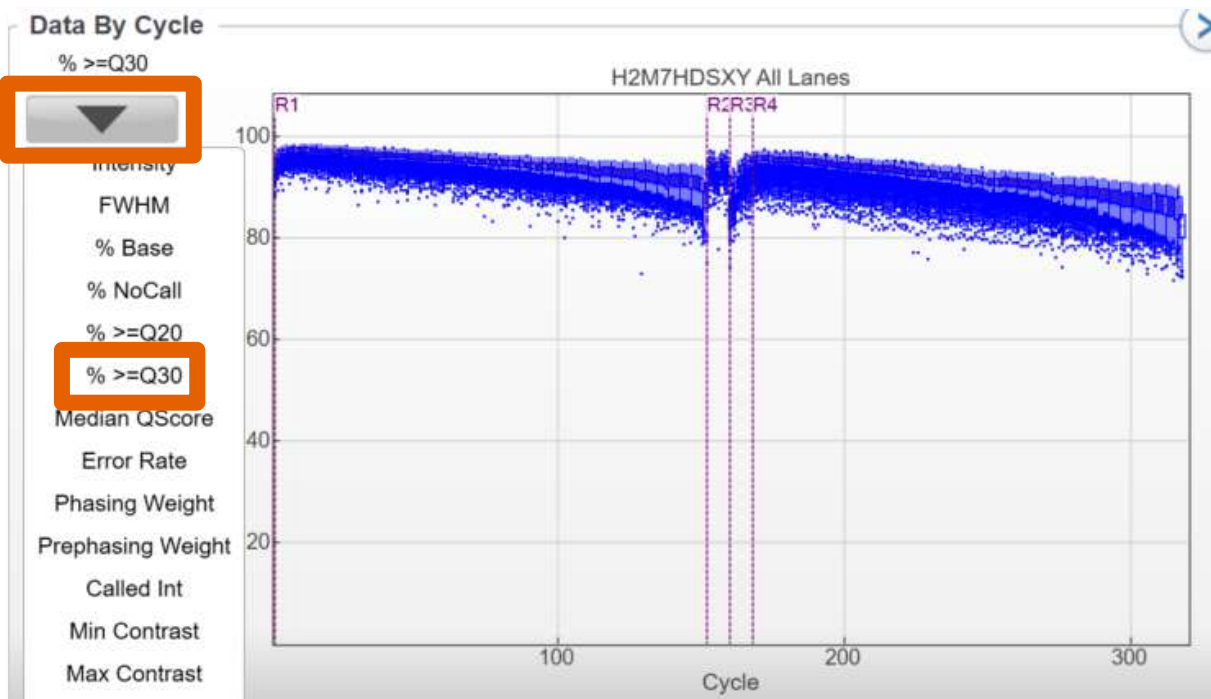
「% \geq Q30が95.68%」とはどういう意味？
ラン全体でコールされた塩基のうち95.68%が
99.9%以上の正確性でコールされている



サイクルごとの% \geq Q30

- Analysis/ChartsタブのData By Cycleから、サイクルごとの% \geq Q30を見ることができます
- 通常、サイクルが進むにつれて% \geq Q30は低下していきます

version 2.4



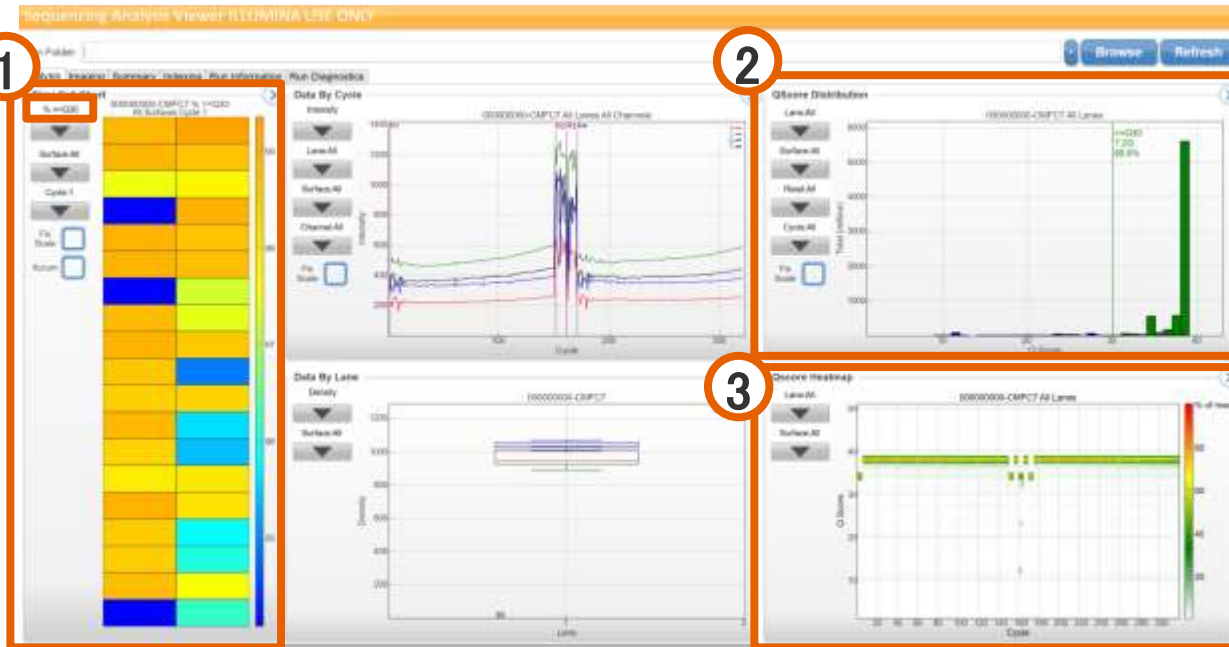
version 3.0



その他 クオリティスコアの確認方法

- Analysis/Chartsタブから、タイルごとの $\% \geq Q30$ や、クオリティスコアの分布、サイクルごとのクオリティスコアのヒートマップを確認することができます

version 2.4



version 3.0



- ① フローセルのタイルごとの $\% \geq Q30$
- ② クオリティスコアの分布
- ③ サイクルごとのクオリティスコアのヒートマップ

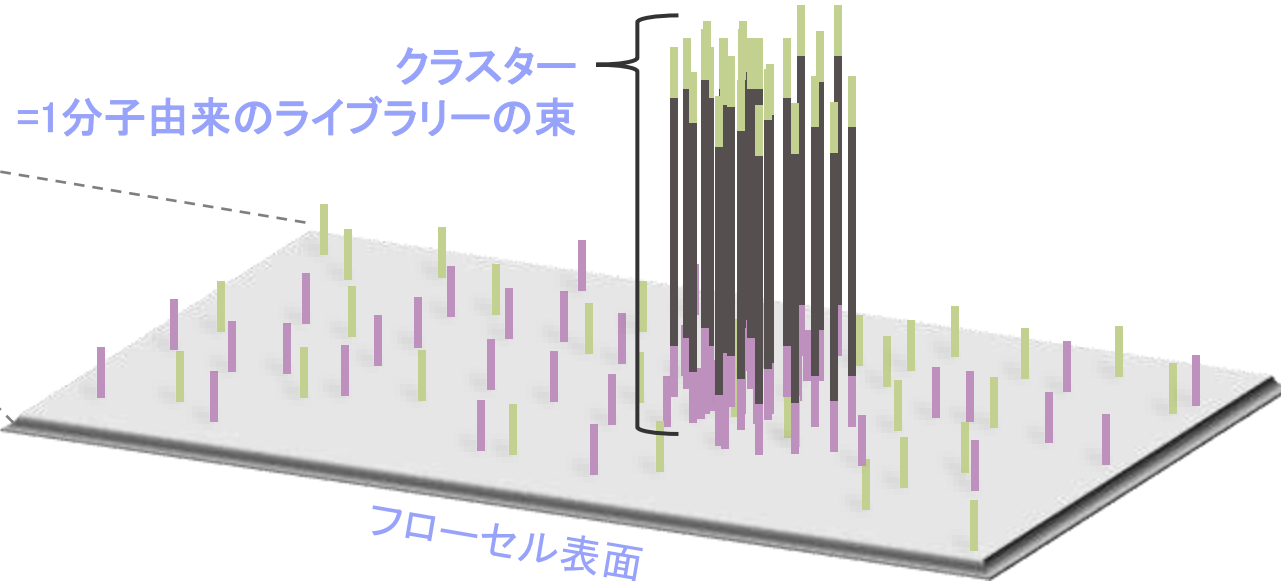
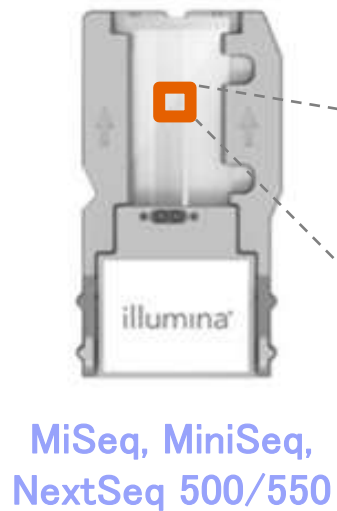
ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 **クラスター密度と%Passing Filter(%PF)**
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 %AlignedとError Rate

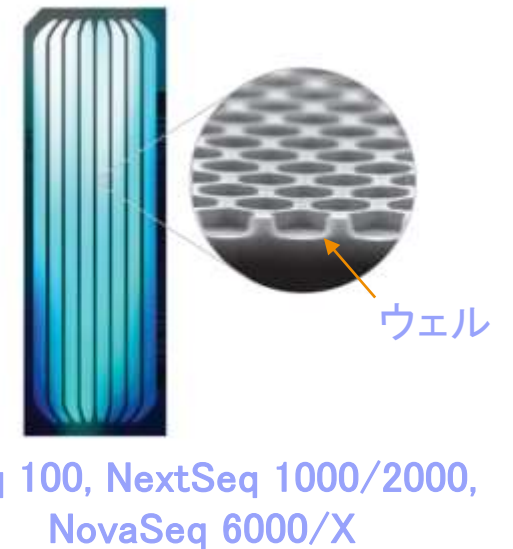
クラスター密度とは？

- シーケンス中には、ライブラリーがフローセルの表面上で増幅されます
- フローセル表面上で増幅した、1分子由来のライブラリーの束を「クラスター」といいます
- フローセルには、クラスターがランダムな位置で形成される「ランダムフローセル」と、クラスターの位置がウェルで固定された「パターン化フローセル」の2タイプがあります

ランダムフローセル



パターン化フローセル

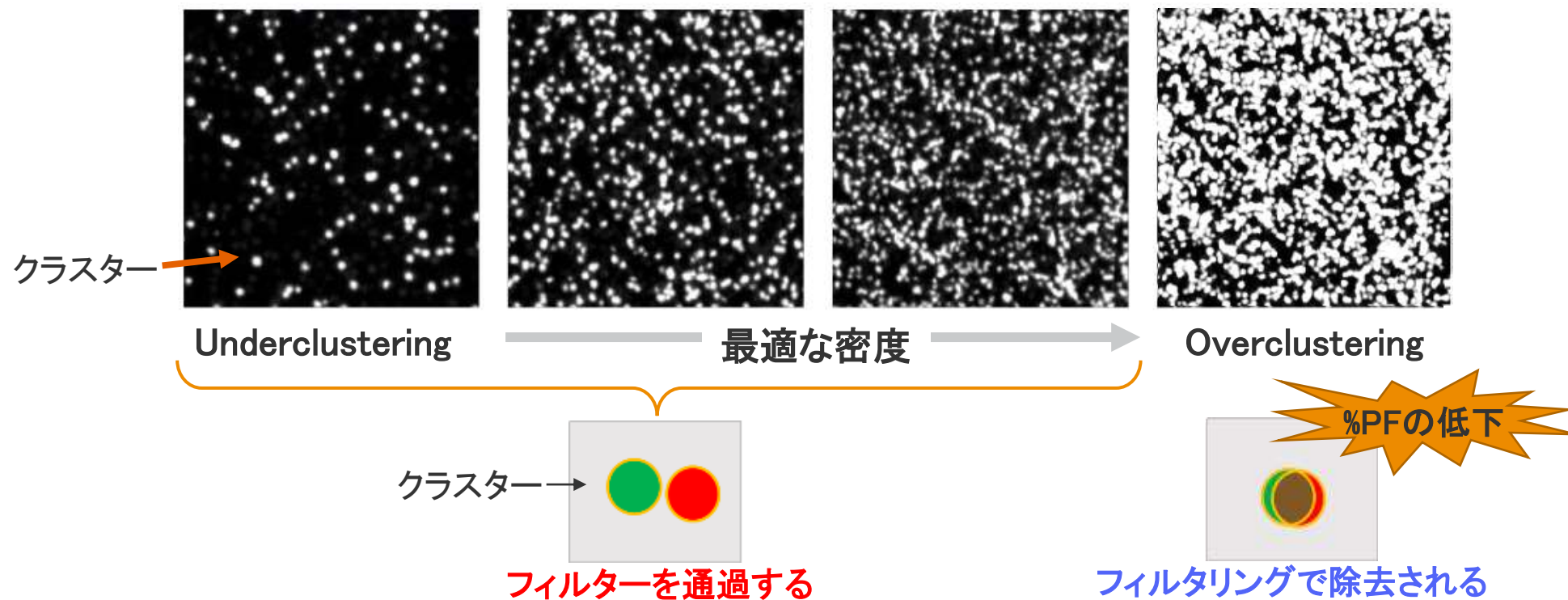


ランダムフローセルでは、ライブラリーのローディング濃度によって

フローセル上の**クラスター密度** (単位: K/mm²) が増減します (パターン化フローセルでは固定値)

%Passing Filter(%PF)とは？

- シーケンス中にクラスターを、シグナルの純度によってフィルタリングしており、Read1の25サイクル目までのデータから、シグナルの純度が低いクラスターを除いています
- このフィルターをパスしたクラスターの割合が**%Passing Filter(%PF)**となります
- データ収量や% \geq Q30は、フィルターを通ったクラスターからのみ計算されます



クラスタ密度が高すぎる場合、クラスタが重なりシグナルの純度が低下し、フィルターで除かれるため、%PFが低下します

ランダムフローセル装置の推奨クラスター密度

- PhiXコントロールライブラリーのような、塩基多様性が高いライブラリーを想定した推奨値です
- 推奨より高いクラスター密度は、%PFの低下につながります
その場合は、%PFを上げるために、次のランでローディング濃度 (pM) を下げることをご検討ください
- PCRアンプリコンのように塩基多様性が低いライブラリーは、クラスター密度を推奨の6~8割程度に下げることをおすすめしています

	シーケンス試薬	推奨クラスター密度 (K/mm ²)
NextSeq 500/550	Mid/High Output	170-220
MiniSeq	Mid/High Output	170-220
MiSeq	MiSeq v3	1200-1400
	MiSeq v2	1000-1200

参考ウェビナー

「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」

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2019/webinar-191225-j.html>

「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>

クラスター密度と%PFの確認方法①

- Summary/Metricsタブから、Laneごとのクラスター密度(=Density)と%PFを見ることができます

version 2.4

Analysis Imaging **Summary** Indexing Subtile Grid Event Metrics Run Information Run Diagnostics

Cycle Status
 Extracted: 168 Called: 168 Scored: 168 Error Rated: 0

Run Summary

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% >= Q30	% >= Q30 (Last 10 Cycles)
Read 1	38.47	38.47	0.00	NaN	1340	89.56	89.66
Read 2 (I)	4.74	4.74	0.00	NaN	7867	93.11	93.11
Read 3 (I)	4.74	4.74	0.00	NaN	7016	92.25	92.25
Read 4	38.46	38.46	0.00	NaN	666	88.33	84.68
Non-Indexed Total	76.93	76.93	0.00	NaN	1003	88.95	85.17
Total	86.42	86.42	0.00	NaN	4222	89.36	89.73

Read 1

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)
1	216	261 ± 17	77.20 ± 4.87	0.34 / 0.18	0.202 / 2.848	0.068 / 2.785	169.40
2	216	273 ± 23	75.72 ± 6.44	0.326 / 0.171	0.190 / 2.891	0.069 / 2.767	177.16
3	216	256 ± 23	79.27 ± 3.09	0.314 / 0.166	0.190 / 2.978	0.067 / 2.967	166.32
4	216	260 ± 17	78.96 ± 3.19	0.307 / 0.158	0.183 / 3.091	0.067 / 2.928	168.35

Read 2 (I)

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)
1	216	261 ± 17	77.20 ± 4.87	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	169.40
2	216	273 ± 23	75.72 ± 6.44	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	177.16
3	216	256 ± 23	79.27 ± 3.09	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	166.32
4	216	260 ± 17	78.96 ± 3.19	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	168.35

Read 3 (I)

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)
1	216	261 ± 17	77.20 ± 4.87	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	169.40
2	216	273 ± 23	75.72 ± 6.44	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	177.16
3	216	256 ± 23	79.27 ± 3.09	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	166.32
4	216	260 ± 17	78.96 ± 3.19	NaN / NaN	NaN / NaN	NaN / NaN	168.35

version 3.0

Overview **Metrics** Charts Imaging Indexes

Level	Yield Total (GB)	Projected Yield (GB)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% Intensity Cycle 1	% >= Q30	% O...
Read 1	38.47	38.47	0	NaN	1,340.39	31.75	89.56	
Read 2 (I)	4.74	4.74	0	NaN	7,867.07	186.32	93.11	
Read 3 (I)	4.74	4.74	0	NaN	7,015.7	166.16	92.25	
Read 4	38.46	38.46	0	NaN	666.16	15.75	88.33	

Read 1

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	% PF	Legacy Phasing / Prephasing Rate	Reads (M)	Reads PF (M)	% >= Q30
1	216	261.15 ± 17.03	77.2 ± 4.87	0.34 / 0.18	169.4	130.26	89.56
2	216	273.11 ± 23.06	75.72 ± 6.44	0.33 / 0.17	177.16	133.21	89.21
3	216	256.4 ± 23.04	79.27 ± 3.09	0.31 / 0.17	166.32	131.41	89.76
4	216	259.52 ± 17.05	78.96 ± 3.19	0.31 / 0.16	168.35	132.6	89.7

Read 2 (I)

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	% PF	Legacy Phasing / Prephasing Rate	Reads (M)	Reads PF (M)	% >= Q30
1	216	261.15 ± 17.03	77.2 ± 4.87	NaN / NaN	169.4	130.26	93.62
2	216	273.11 ± 23.06	75.72 ± 6.44	NaN / NaN	177.16	133.21	92.56
3	216	256.4 ± 23.04	79.27 ± 3.09	NaN / NaN	166.32	131.41	93.59
4	216	259.52 ± 17.05	78.96 ± 3.19	NaN / NaN	168.35	132.6	92.7

Read 3 (I)

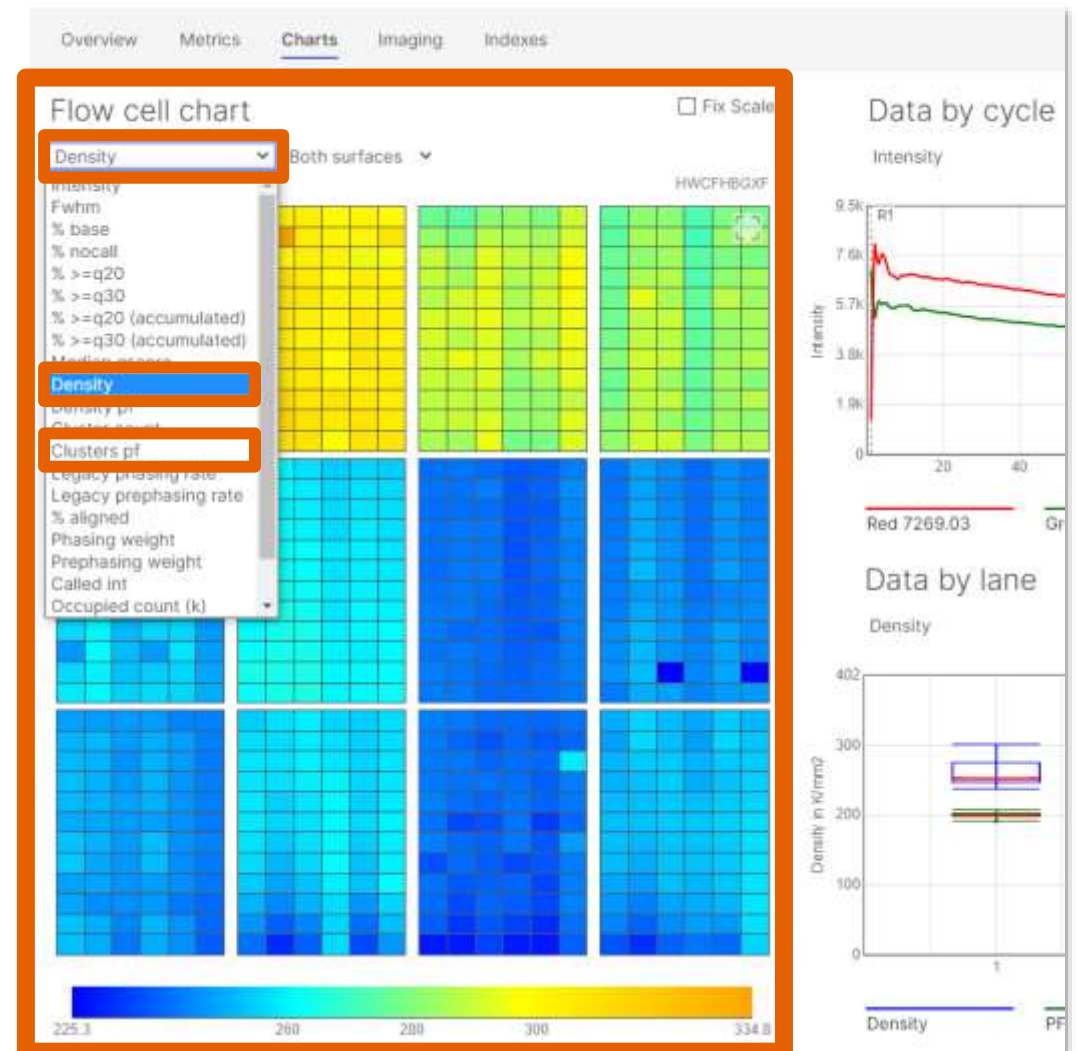
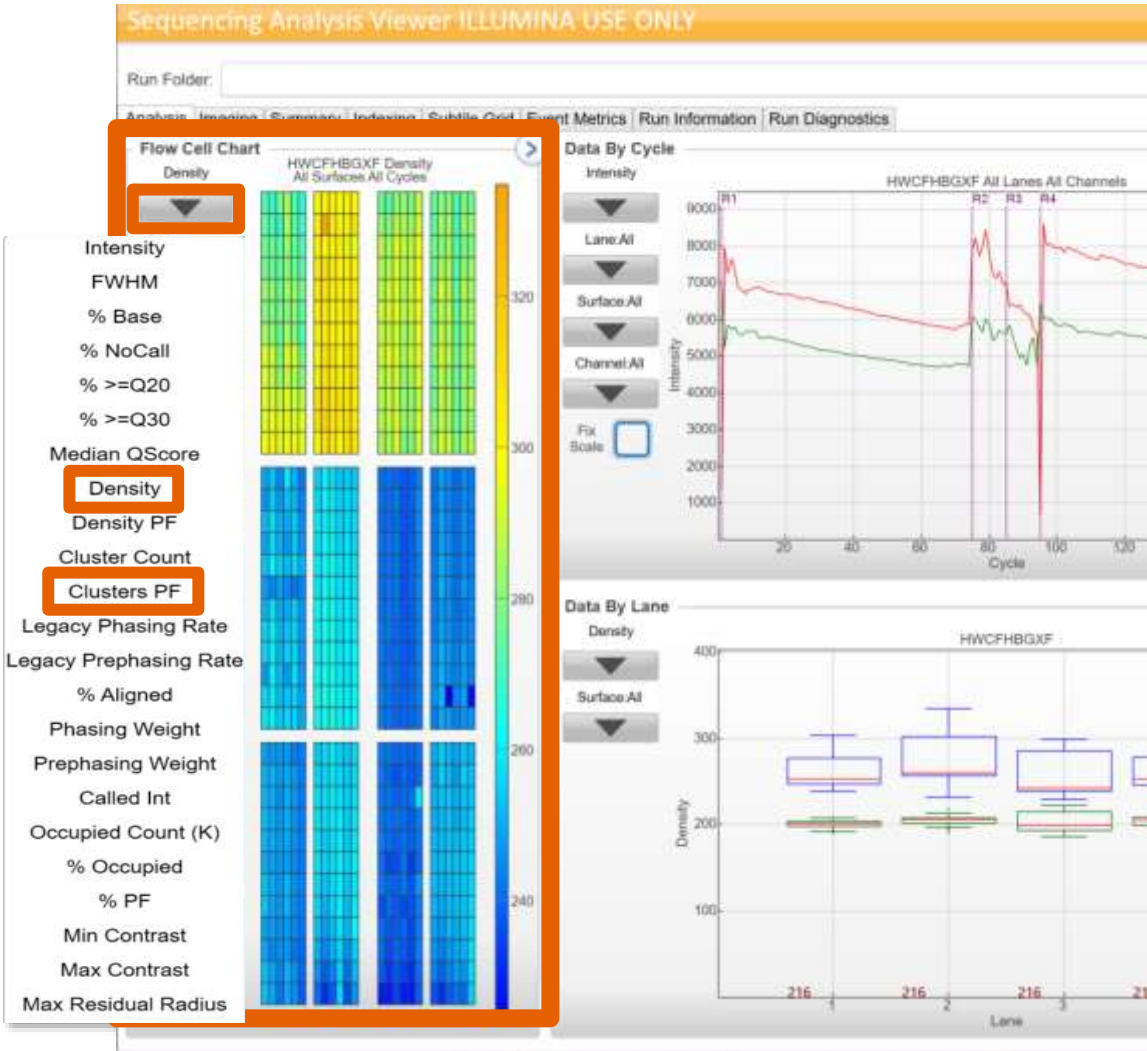
Lane	Tiles	Density (K/mm2)	% PF	Legacy Phasing / Prephasing Rate	Reads (M)	Reads PF (M)	% >= Q30
1	216	261.15 ± 17.03	77.2 ± 4.87	NaN / NaN	169.4	130.26	92.28
2	216	273.11 ± 23.06	75.72 ± 6.44	NaN / NaN	177.16	133.21	91.89
3	216	256.4 ± 23.04	79.27 ± 3.09	NaN / NaN	166.32	131.41	92.49
4	216	259.52 ± 17.05	78.96 ± 3.19	NaN / NaN	168.35	132.6	92.35

クラスター密度と%PFの確認方法②

- Analysis/Chartsタブから、フローセルのタイトルごとのクラスター密度と%PFをチャートで見ることができます

version 2.4

version 3.0



パターン化フローセルの場合 - %PF vs %Occupied ①

- パターン化フローセルでは、固定のウェルにクラスターが形成されるためクラスター密度は固定値です
- %Occupiedとは全ウェル数のうち、クラスターが形成されたウェル数の割合を示します
- %PFと%Occupiedのプロットから、ライブラリーのローディング濃度が適切かどうか、チェックすることができます

%PFと%Occupiedのプロット作成法

*NextSeq 1000/2000では、ローディング濃度最適化の判断に
%Loading Concentrationの値もご参照ください

version 2.4

Sequencing Analysis Viewer

Run Folder: D:\Illumina\MiSeqOutput\RunFolder

Analysis: **Imaging** Summary Indexing

Cycle All Lane All

① Imagingタブで Scatter Plot toolを選択

Lane	Tile	Cycle	Read	Cycle Within Read	Density Raw (k/mm ²)	Density Pf (k/mm ²)	Cluster Count Raw (k)	Cluster Co. PF (k)
Data Labels (Tooltips)								
X Values				Y Values				
Columns				Columns				
Maximum Contrast	Surface	Swath	Tile Number	Density Pf(k/mm ²)	Cluster Count Raw (k)	Cluster Co. PF (k)	Legacy Phasing Rate	Legacy Prephasing F
Cluster Count Occupied			% Occupied	% Pass Filter			%>= Q20	Error Rate
Legacy Phasing Rate	Cloud Centroid	Confusion Matrix	Cloud Determinant				%>= Q30	

version 3.0

Overview Metrics Charts **Imaging** Indexes

Cycle v Lane v Surface v Swath v Section

Copy selected Download **Custom plot** Column chooser

Scatter plot
 Box plot

X axis value
% Occupied v

Y axis value
% Pass Filter v

① Imagingタブで Custom plotを選択

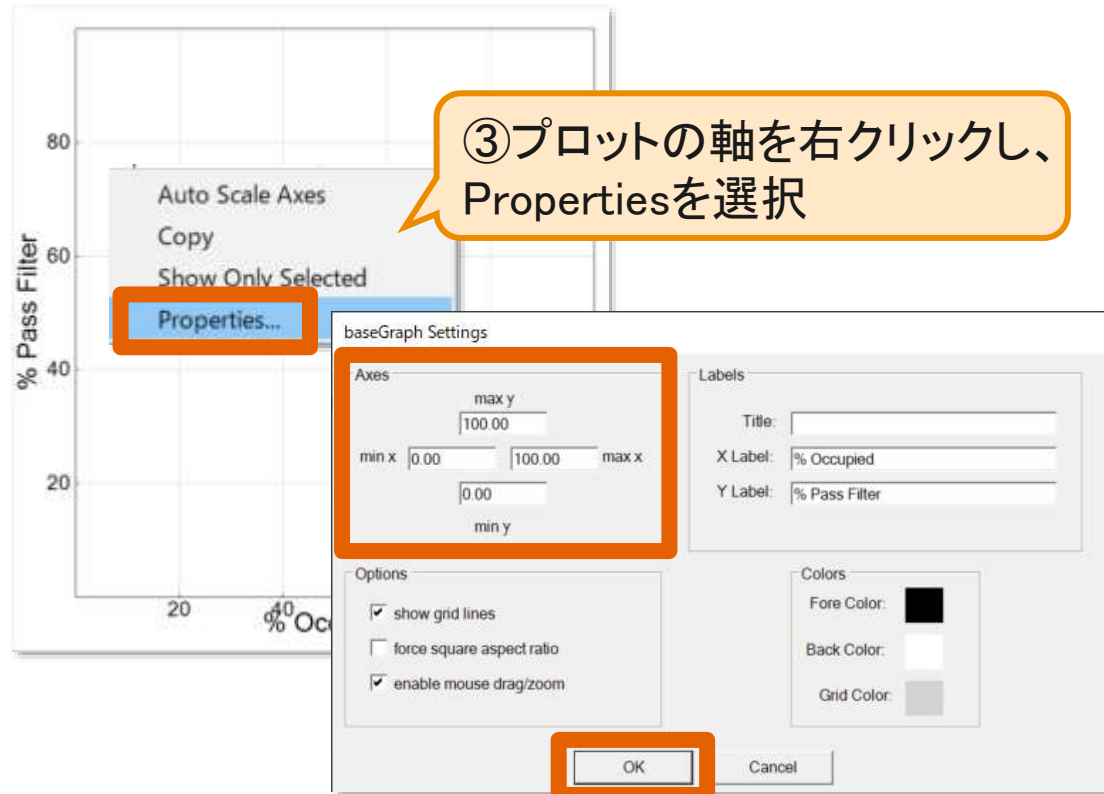
② Scatter plotで X axis value: %Occupied Y axis value: %PFを選択

パターン化フローセルの場合 - %PF vs %Occupied ②

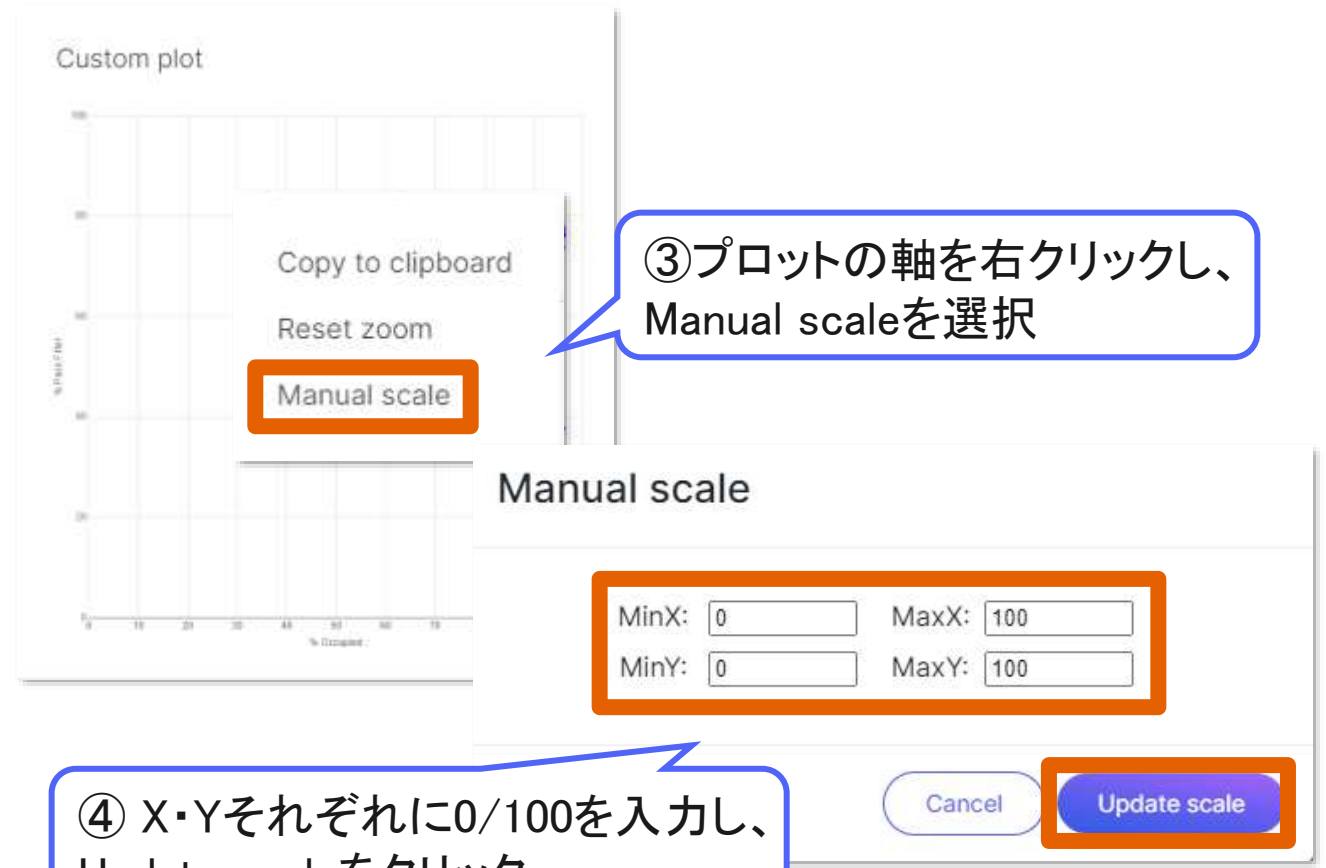
%PFと%Occupiedのプロット作成法

- X軸とY軸のスケールを0~100に合わせることで、よりプロットが見やすくなります

version 2.4



version 3.0



パターン化フローセルの場合 - %PF vs %Occupied ③

%PFと%Occupiedのプロットの見方



参考ページ:「Cluster Optimization Overview」

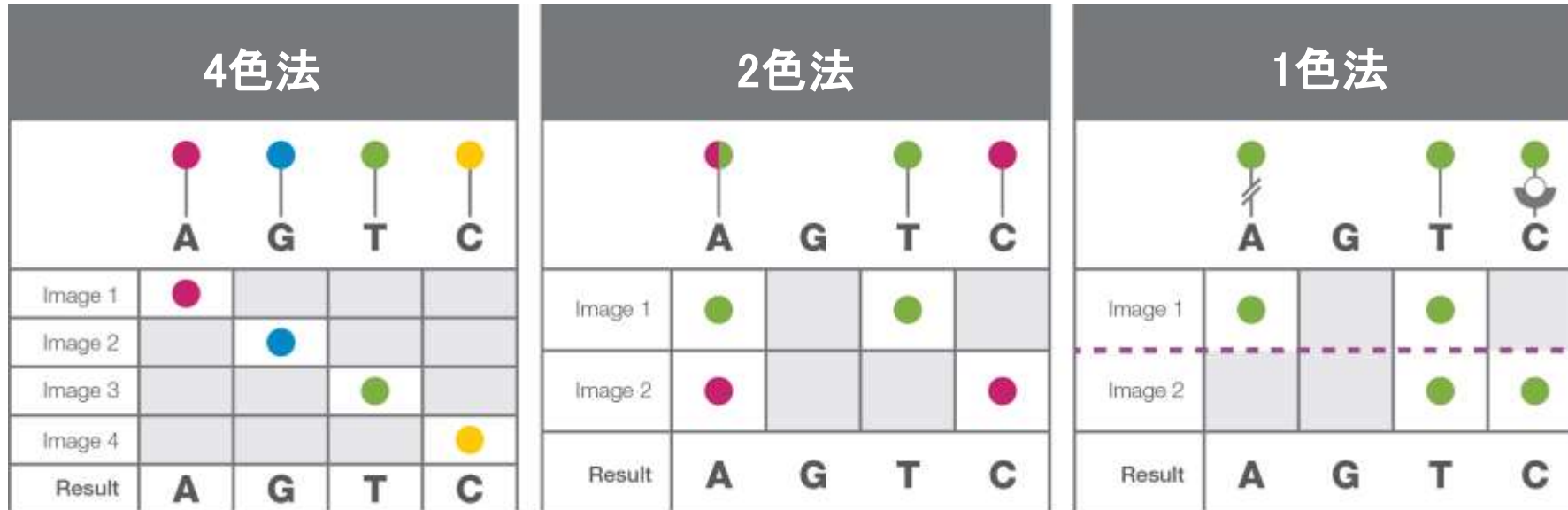
<https://jp.support.illumina.com/downloads/cluster-optimization-overview-guide-1000000071511.html>

ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 %AlignedとError Rate

Intensityとは？

- 装置ごとに、4・2・1色の蛍光色素で塩基が標識されており、各蛍光の強度を**Intensity**といいます
- フィルターをパスしたクラスターのみ、Intensityが計算されています



MiSeq

MiniSeq、NextSeq 500/550、
NextSeq 1000/2000、
NovaSeq 6000

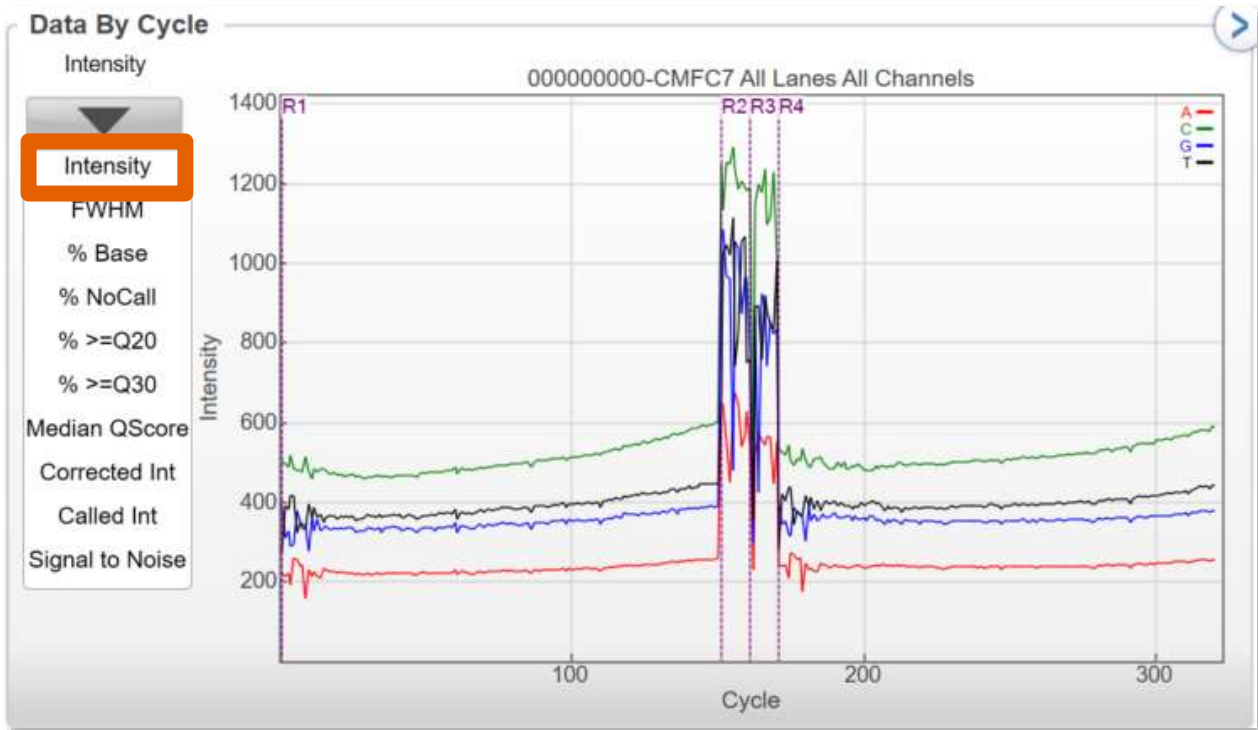
iSeq 100

参考資料：[「イルミナ 2 色法 SBS シーケンステクノロジー」](#)
[「イルミナ CMOS Chip および 1 色法 SBS ケミストリー」](#)

Intensityの確認方法

- Analysis/ChartsタブのData By Cycleから、サイクルごとのIntensityを見ることができます

version 2.4 (例)MiSeq・4色法の場合



version 3.0 (例)NextSeq 550・2色法の場合



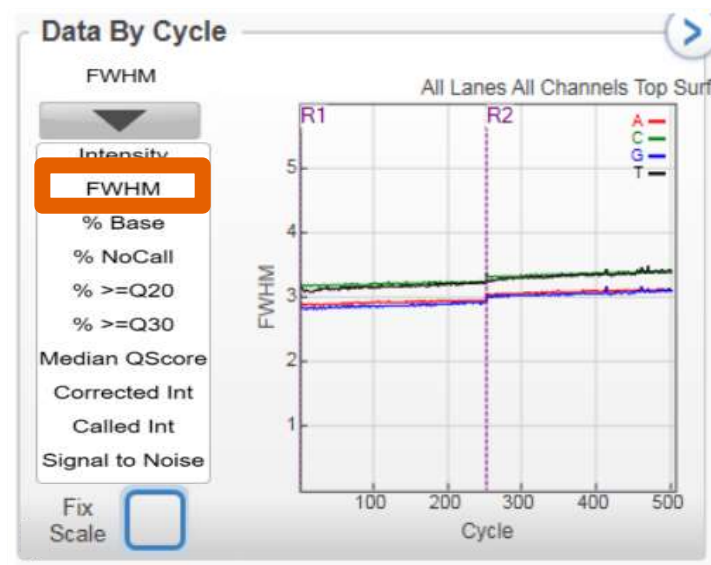
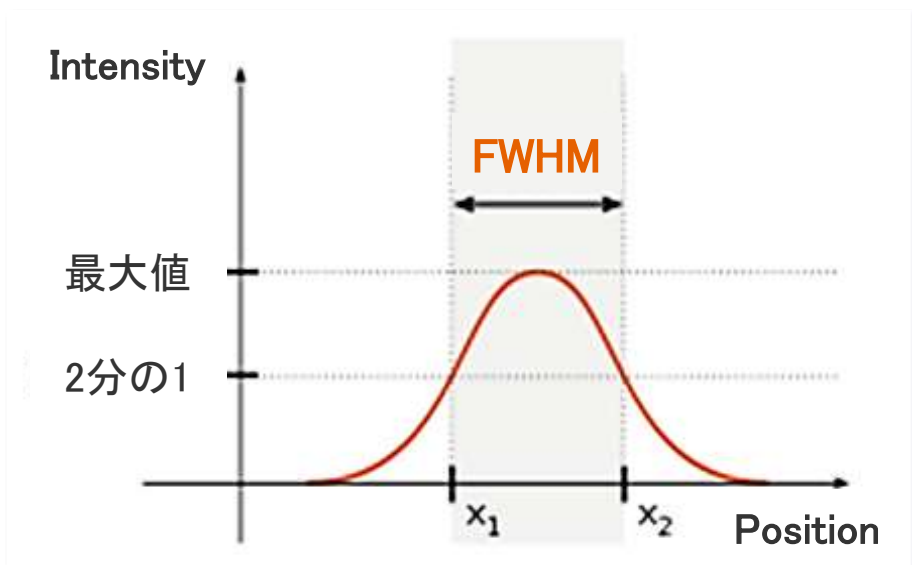
ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 %AlignedとError Rate

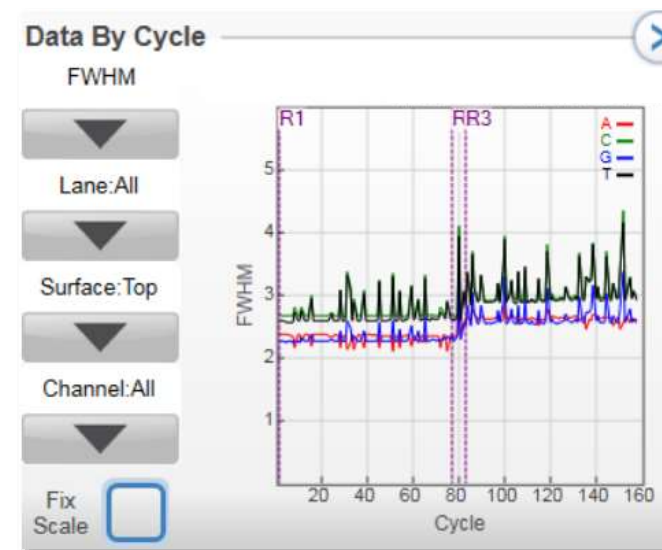
FWHMとは？

- FWHM (Full Width Half Maximum) とは、Intensityが最大値の半分の値をとる時のクラスターの幅を示す値で、フォーカス精度に関連する指標となります
- ライブラリーの塩基多様性に影響を受けて、波形に乱れが生じることもあります

Analysis/ChartsタブのData By Cycleから、サイクルごとのFWHMを見ることができます



正常なラン



波形に乱れのあるラン

ランメトリクス

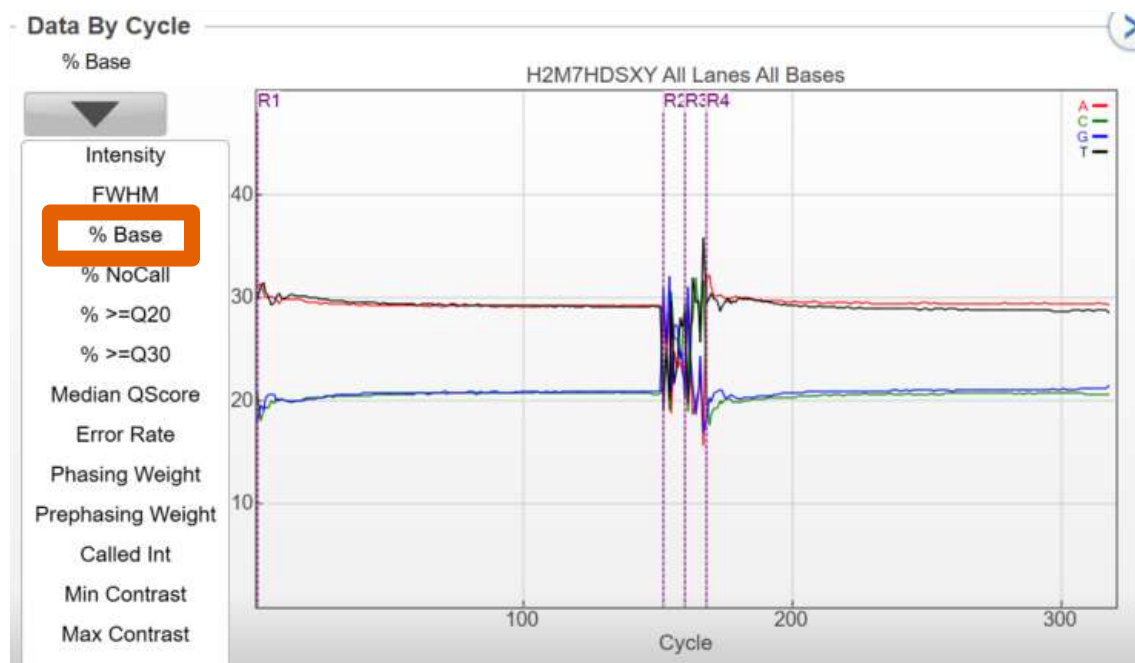
- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 %AlignedとError Rate

%Baseとは？

- 各サイクルでコールされた塩基のうち、A/C/G/Tの塩基が占める各割合を%Baseといい、ライブラリーの塩基多様性の確認に役立ちます

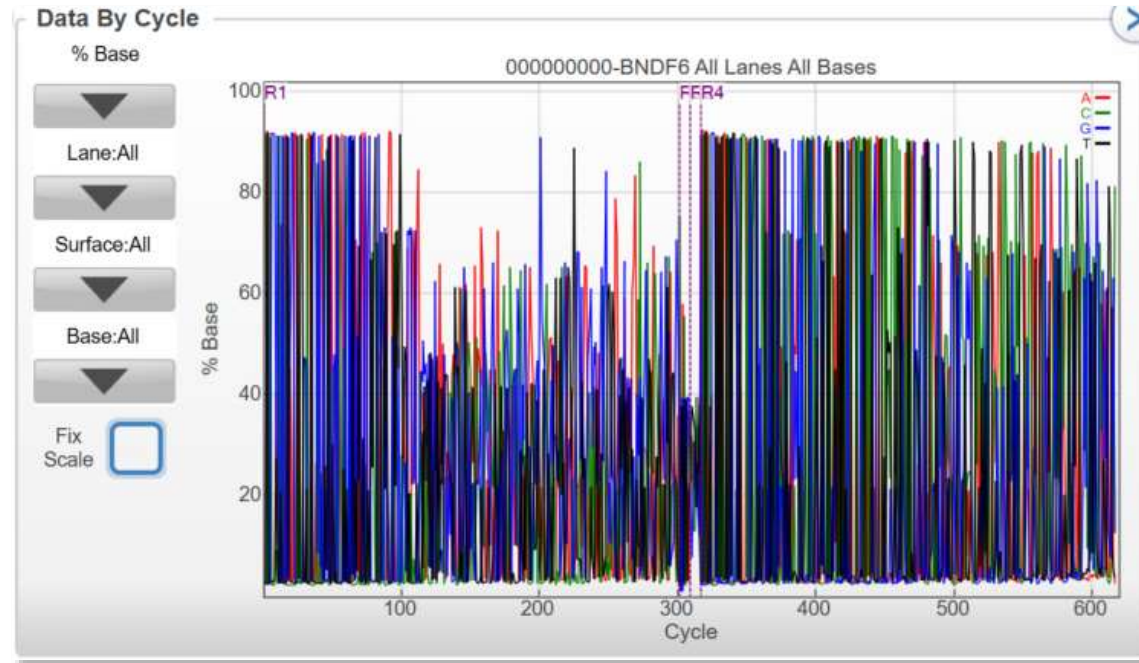
Analysis/ChartsタブのData By Cycleから、サイクルごとの%Baseを見ることができます

塩基多様性の高いライブラリー (例) Whole Genome Sequence



ランを通してA/C/G/Tの割合が同程度

塩基多様性の低いライブラリー (例) PCRアンプリコン



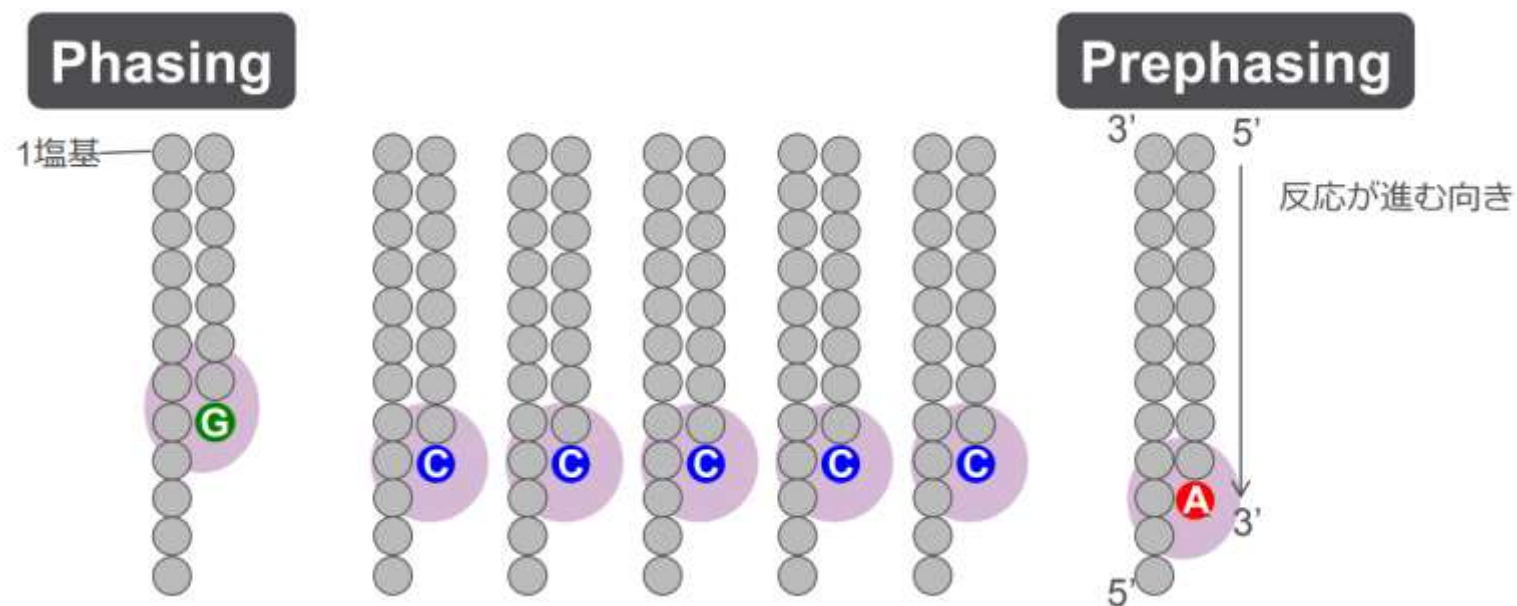
サイクルごとの塩基の偏りが大きい

ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 **Phasing / Prephasing**
- 8 %AlignedとError Rate

PhasingとPrephasingとは？

- シーケンス反応では1サイクルごとに、1塩基の伸長・塩基の読み取りが行われます
- **Phasing**は、クラスター内の一部のライブラリー分子の一塩基伸長反応が遅れたときに、**Prephasing**は、一塩基伸長反応が進みすぎたときに発生します



Phasing/Prephasing率が高くなる原因の例

- 不適切な室温
- 装置の温度制御系のトラブル
- 装置のWashが不十分
- シーケンス試薬の期限切れ

Phasing/Prephasing率の確認方法

- Summary/Metricsタブから、Laneごと・Readごとの「Legacy Phasing/Prephasing Rate」から Phasing/Prephasing率を見ることができます
- Phasing/Prephasing率は、各Readの25サイクル目時点で算出される推定値です

version 2.4

Analysis | Imaging | **Summary** | Indexing | Subtle Grid | Event Metrics | Run Information | Run Diagnostics

Cycle Status
 Extracted: 168 Called: 168 Scored: 168 Error Rate: 0

Run Summary

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% >= Q30	% >= Q30 (Last 10 Cycles)
Read 1	38.47	38.47	0.00	NaN	1340	89.58	85.52
Read 2 (I)	4.74	4.74	0.00	NaN	7867	93.11	93.11
Read 3 (I)	4.74	4.74	0.00	NaN	7016	92.25	92.25
Read 4	38.46	38.46	0.00	NaN	600	89.33	84.68
Non-indexed Total	70.93	70.93	0.00	NaN	1003	89.95	85.17
Total	86.42	86.42	0.00	NaN	4222	89.36	89.73

Read 1

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	Cluster Ph (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)	Cluster Count PF (M)	% >= Q30	% >= Q30 (Last 10 Cycles)
1	216	261 ± 17	77.20 ± 4.5	0.343 / 0.180	1.202 / 2.848	0.068 / 2.785	189.40	130.28	89.58	85.52
2	216	273 ± 23	76.72 ± 6.4	0.326 / 0.171	1.190 / 2.891	0.060 / 2.767	177.16	133.21	89.21	86.11
3	216	258 ± 23	79.27 ± 3.0	0.314 / 0.168	1.190 / 2.878	0.067 / 2.957	188.32	131.41	89.76	86.02
4	216	260 ± 17	78.96 ± 5.1	0.307 / 0.158	1.183 / 3.091	0.067 / 2.928	188.35	132.60	89.70	85.96

version 3.0

Overview | **Metrics** | Charts | Imaging | Indexes

Level	Yield Total (GB)	Projected Yield (GB)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% Intensity Cycle 1	% >= Q30	% Occupied
Read 1	38.47	38.47	0	NaN	1,340.39	31.75	89.56	96.49
Read 2 (I)	4.74	4.74	0	NaN	7,867.07	186.32	93.11	96.49
Read 3 (I)	4.74	4.74	0	NaN	7,015.7	166.16	92.25	96.49
Read 4	38.46	38.46	0	NaN	666.16	15.78	88.33	96.49

Read 1

Lane	Tiles	Density (K/mm2)	% PF	Legacy Phasing / Prephasing Rate	Reads (M)	Reads PF (M)	% >= Q30	Yield (GB)
1	216	261.15 ± 17.03	77.2 ± 4.87	0.34 / 0.18	169.4	130.26	89.58	9.49
2	216	273.11 ± 23.06	75.72 ± 6.44	0.33 / 0.17	177.16	133.21	89.21	9.69
3	216	256.4 ± 23.04	79.27 ± 3.09	0.31 / 0.17	166.32	131.41	89.76	9.6
4	216	259.52 ± 17.05	78.96 ± 3.19	0.31 / 0.16	168.35	132.6	89.7	9.69

ランメトリクス

- 1 データ収量
- 2 クオリティ(% \geq Q30)
- 3 クラスタ密度と%Passing Filter(%PF)
- 4 Intensity
- 5 FWHM
- 6 %Base
- 7 Phasing / Prephasing
- 8 **%AlignedとError Rate**

PhiXに関するメトリクス – %AlignedとError Rate

- PhiXとはコントロールライブラリーであり、通常は2%程度、塩基多様性が低い場合は20%以上やそれ以上の割合でスパイクインいただくことをおすすめしています
- 「%Aligned」と「Error Rate」は、PhiXコントロールライブラリーをスパイクインした場合のみ表示される数値です

%Aligned

- フィルターをパスしたクラスターのうち、PhiXゲノムにアライメントされたリードの割合
(例)PhiXコントロールライブラリーをモル比で25%スパイクインした場合、
%Alignedは25%に近い値をとることが期待されます

期待値より低い場合: 相対的にPhiXコントロールライブラリー由来のクラスターの割合が低い
→ サンプル由来のライブラリー濃度が**想定より高い**可能性

期待値より高い場合: 相対的にPhiXコントロールライブラリー由来のクラスターの割合が高い
→ サンプル由来のライブラリー濃度が**想定より低い**可能性

Error Rate

- PhiXゲノムにリードがアライメントされる時に算出されるエラー率です
- Error Rateにイルミナの仕様値はありません

%AlignedとError Rateの確認方法

- Summary/Metricsタブから、Readごとの%AlignedとError Rateを見ることができます

version 2.4

Analysis Imaging **Summary** Indexing Run Information Run Diagnostics

Cycle Status
Extracted: 616 Called: 616 Scored: 616 Error Rated: 615

Run Summary

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% >= Q30	% >= Q30 (Last 10 Cycles)
Read 1	4.46	4.46	9.36	2.03	5	72.41	33.11
Read 2 (I)	0.10	0.10	0.00	NaN	20	83.47	83.47
Read 3 (I)	0.10	0.10	0.00	NaN	33	88.42	88.42
Read 4	4.46	4.46	9.50	2.41	9	67.38	4.92
Non-Indexed Total	8.92	8.92	9.43	2.22	2	69.89	19.01
Total	9.13	9.13	9.43	2.22	99	70.26	46.57

version 3.0

Overview **Metrics** Charts Imaging Indexes

Cycle status Extracted **616** Called **616** Scored **616** Error rated **615**

Run summary

Level	Yield Total (GB)	Projected Yield (GB)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Int
Read 1	4.46	4.46	9.36	2.03	8
Read 2 (I)	0.1	0.1	0	NaN	17
Read 3 (I)	0.1	0.1	0	NaN	53
Read 4	4.46	4.46	9.5	2.41	5

PhiXコントロールライブラリーにはIndex配列がないため、
Indexリードの%Alignedは0になり
Error Rateは計算されません(NaNと表記されます)

イルミナシーケンサーの仕様値

4

イルミナの仕様と確認方法① – データ収量とクオリティスコア

- イルミナシーケンサーには、「データ収量」と「クオリティスコア」の2つのメトリクスについてラン試薬ごと・ラン条件ごとに仕様値があります (PhiXコントロールライブラリーに基づいた値です)
- 各装置における仕様は、イルミナ社ウェブサイトの製品ページからご確認いただけます

(例) MiSeq Reagent Kit v3, 2 x 300 cycleのランの場合 *2023年5月時点の情報です



[イルミナ社ウェブサイト](https://www.illumina.com)

イルミナの仕様と確認方法② - データ収量とクオリティスコア

(例) MiSeq Reagent Kit v3, 2 x 300 cycleのランの場合

イルミナシーケンスプラットフォーム

イルミナの革新的な次世代シーケンサー (NGS) プラットフォームは、大規模で卓越したデータクオリティと精度を実現します。ベンチトップと生産規模のシーケンサー比較表や、お客様のニーズに合ったプラットフォーム選びに役立つツールをご活用ください。

ベンチトップ シーケンスプラットフォーム

Benchtop Sequencers

Production-Scale Sequencers

iSeq 100システム MiniSeq MiSeqシリーズ NextSeq 550シリーズ

定評のあるアプリケーションおよび手法	主要アプリケーション	主要アプリケーション	主要アプリケーション	主要アプリケーション
大規模全ゲノムシーケンス (ヒト、植物、動物)				

MiSeqシリーズ



MiSeqシステム



MiSeqDxシステム

各国の規制状況	本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。	体外診断用。購入可能地域についてはお問い合わせください。
主なアプリケーション	<ul style="list-style-type: none"> 小規模全ゲノムシーケンス (微生物、ウイルス) ターゲット遺伝子シーケンス (アンプリコン、遺伝子パネル) 16Sメタゲノムシーケンス 	<ul style="list-style-type: none"> 嚢胞性線維症検査 体外診断用 (IVD) アッセイ開発
研究用途	様々な用途に対応するベンチトップシーケンス	MiSeqと同等 (研究モードの使用時)
システムソフトウェア	機器上のデータ解析を含む完全に統合されたエコシステム。IVD アプリケーションはご利用いただけません。	機器上のデータ解析を含む完全に統合されたエコシステム。IVDおよび研究用途にそれぞれ対応するソフトウェア

[MiSeqを詳しく見る](#)

[MiSeqDxを詳しく見る](#)

イルミナの仕様と確認方法③ – データ収量とクオリティスコア

(例) MiSeq Reagent Kit v3, 2 x 300 cycleのランの場合

製品	ソリューション	企業情報	サポート	お気に入りの分野を選択 ①		
ALL SYSTEMS	MiSeq Overview	アプリケーションと手法	Specifications	製品およびサービス	製品資料	お問い合わせはこちら Support

クラスター形成とシーケンス

	MiSeq Reagent Kit v2				MiSeq Reagent Kit v3	
リード長	36bp x 1	25bp x 2	150bp x 2	250bp x 2	75bp x 2	300bp x 2
ラン時間*	~4時間	~5.5時間	~24時間	~39時間	~21時間	~56時間
出力	540~610Mb	750~850Mb	4.5~5.1Gb	7.5~8.5Gb	3.3~3.8Gb	13.2~15Gb

クオリティスコア

	MiSeq Reagent Kit v2	MiSeq Reagent Kit v3
36bp x 1の場合	Q30以上の塩基が90%以上	
25bp x 2の場合	Q30以上の塩基が90%以上	
150bp x 2の場合	Q30以上の塩基が90%以上	
250bp x 2の場合	Q30以上の塩基が75%以上	
75bp x 2の場合		Q30以上の塩基が85%以上
300bp x 2の場合		Q30以上の塩基が70%以上



- データ出力(収量): 13.2~15 Gb
- クオリティスコア(Average): % \geq Q30が70%以上が仕様値となります

装置別 % \geq Q30の仕様値 (PhiXコントロールの場合)

	1x36 bp	1x50 bp	1x75 bp	1x100 bp	2x25 bp	2x50 bp	2x75 bp	2x100 bp	2x150 bp	2x250 bp	2x300 bp
NovaSeq X						$\geq 90\%$		$\geq 85\%$	$\geq 85\%$		
NovaSeq 6000	$\geq 90\%*$					$\geq 90\%$		$\geq 85\%$	$\geq 85\%$	$\geq 75\%$	
NextSeq 1000/2000		$\geq 90\%$				$\geq 90\%$		$\geq 85\%$	$\geq 85\%$		$\geq 80\%$
NextSeq 500/550			$\geq 80\%$				$\geq 80\%$		$\geq 75\%$		
MiniSeq			$\geq 85\%$	$\geq 85\%$			$\geq 85\%$		$\geq 80\%$		
MiSeq	$\geq 90\%$				$\geq 90\%$		$\geq 85\%$		$\geq 80\%$	$\geq 75\%$	$\geq 70\%$
iSeq 100	$\geq 85\%$	$\geq 85\%$	$\geq 80\%$				$\geq 80\%$		$\geq 80\%$		

* 1x35bpの場合の仕様

(2023/05/31時点の情報です)

その他リソース情報

5

SAV全般の関連リンク

- Sequencing Analysis Viewer (SAV) ガイド

https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav/documentation.html

- Sequencing Analysis Viewer (SAV) ダウンロードページ

https://jp.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav/downloads.html

- [参考トレーニング] Sequencing Analysis Viewer (SAV)

<https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sav-overview/story.html>

- [参考ページ] Common Questions Related to Sequencing Analysis Viewer (SAV) software and the NextSeq 1000/2000

<https://knowledge.illumina.com/instrumentation/nextseq-1000-2000/instrumentation-nextseq-1000-2000-faq-list/000007863>

パターン化フローセルの%PF vs %Occupiedプロットングの関連リンク

- [参考ページ] Plotting %Occupied by %PF to optimize loading for the NovaSeq X/X Plus, NovaSeq 6000, and iSeq 100

<https://knowledge.illumina.com/instrumentation/general/instrumentation-general-troubleshooting-list/000002308>

- [参考動画] Plotting %Occupied by %Pass Filter to optimize loading for the NovaSeq 6000 and iSeq 100 Video

https://knowledge.illumina.com/instrumentation/general/instrumentation-general-reference_material-list/000005858

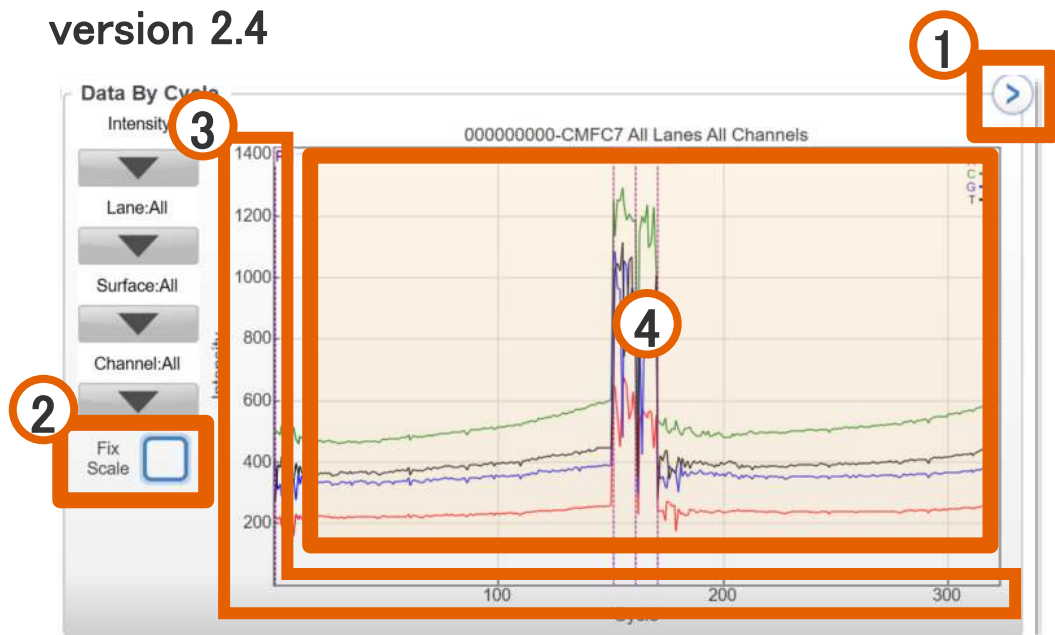
その他

- 他ウェビナー録画一覧

<https://jp.illumina.com/events/webinar-archive.html#/?categories=Webinar&startDate=2011-01-01&endDate=2023-04-04>

Analysis/Chartsタブ 活用のヒント

version 2.4



version 3.0



- ① 右上のアイコンをクリックすると、チャートを拡大することができます
- ② チャートの縮尺を固定することができます
- ③ チャートの軸をスクロールすると、縮尺を変更することができます
変更した縮尺は、チャートを右クリックし「Auto-Scale Axes/Reset zoom」でデフォルトに戻ります
- ④ チャートを右クリックし「Copy To Clipboard」で、クリップボードにイメージをコピーできます

Imagingタブ 活用のヒント

version 2.4



すべての行を選択

テーブルを .txt ファイルにエクスポート

散布図/箱ひげ図を作成する

フィルターの設定/フィルターをクリアする

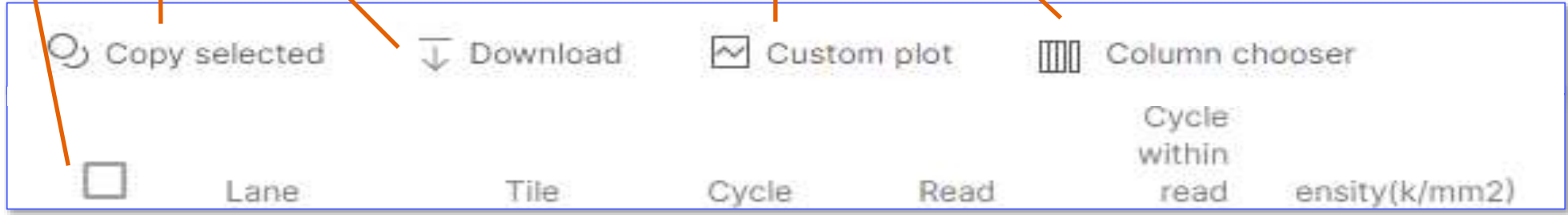
選択した行をクリップボードにコピー

昇順/降順/カスタムで列を並べ替える
V3.0では各列タイトルを選択 (カスタムは不可)

表示する列を選択

選択行を移動(キーボードでも可)

version 3.0



ご清聴ありがとうございました

岩崎 万由子

2023.05.31 | techsupport@illumina.com