

NovaSeq™ 6000: ラン成功のためのベストプラクティス とよくあるトラブルの対処法

仲 健太、富田 みなみ

サービス・サポート部

2022年11月22日

Agenda

- 1 NovaSeq 6000の紹介
- 2 ベストプラクティス
- 3 よくお問い合わせをいただく症状と対処法
- 4 参考資料

NovaSeq 6000の紹介



NovaSeq 6000の紹介

- 1 NovaSeq 6000シーケンスシステム
- 2 パターン化フローセルテクノロジー
- 3 フローセルタイプ
- 4 シーケンス仕様
- 5 シーケンスワークフロー
(Standard vs Xp)

NovaSeq 6000シーケンスシステムの特徴



- パターン化フローセル
- 2色法
- カートリッジベースの試薬
- RFIDベースの消耗品読み込み
- シンプルなユーザーインターフェース
- LIMS対応

【NovaSeq 6000製品ページ】

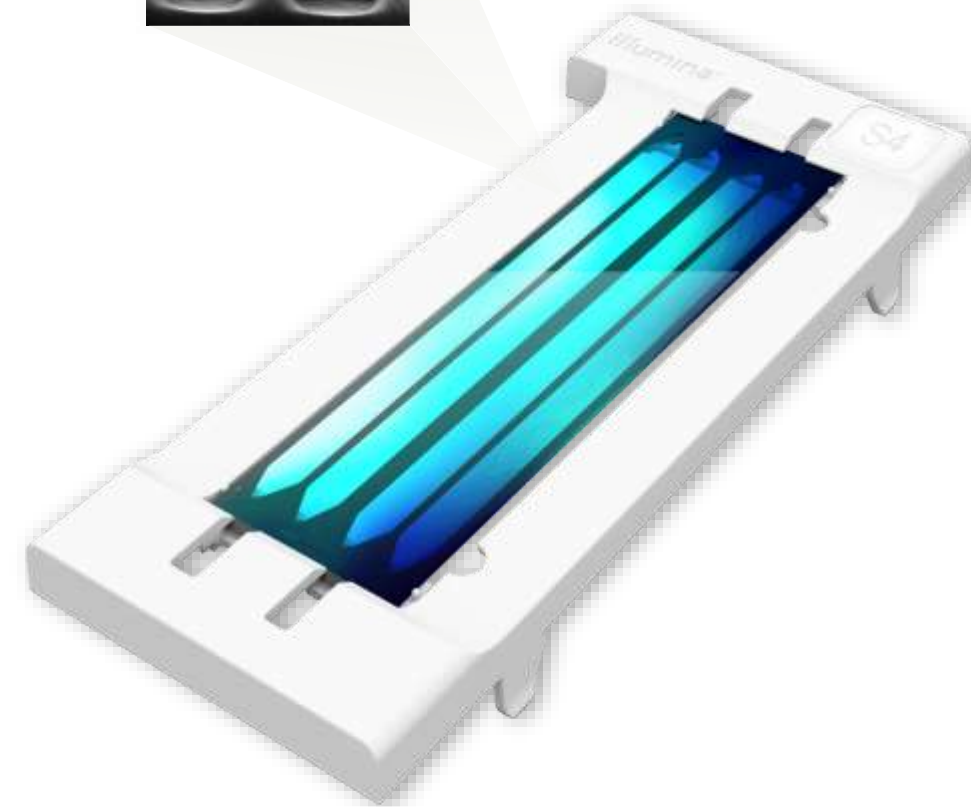
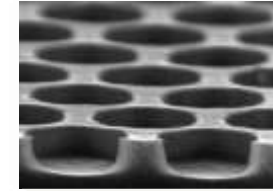
<https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html>

【NovaSeq 6000データシート（日本語）】

<https://jp.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-6000-spec-sheet-m-gl-00271/novaseq-6000-spec-sheet-m-gl-00271-jpn.pdf>

NovaSeq 6000パターン化フローセルテクノロジー

- フローセル上にナノウェルを成形
- クラスター密度を最大化
- ExAmp 試薬によって1ウェルに1分子DNA由来のクラスターを形成
- クラスター位置情報を取得する時間が不要

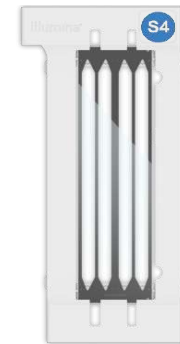


【Patterned Flow Cell Technology】

<https://jp.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology/patterned-flow-cells.html>

NovaSeq 6000フローセルタイプ

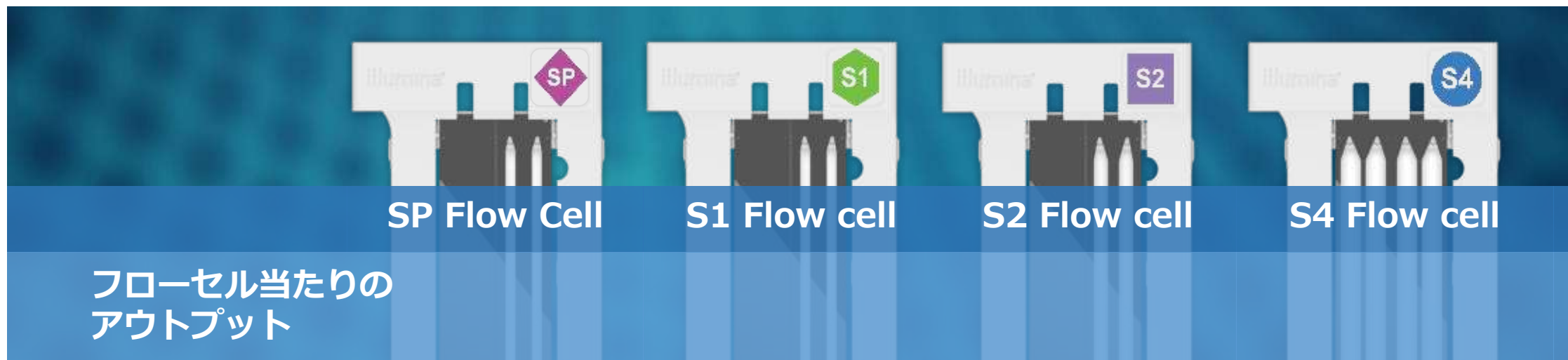
	SP Flow Cell	S1 Flow cell	S2 Flow cell	S4 Flow cell
レーン	2	2	2	4
フローセル当たりの のアウトプット	65 – 400 Gb	134 – 500 Gb	333 – 1250 Gb	280 – 3000 Gb
シングルリード (Passing Filter)	6.5 – 8 億	13 – 16 億	33 – 41 億	80 – 100 億
ラン時間	13 – 38 時間	13 – 25 時間	16 – 36 時間	14 – 44 時間



最小2x50 cyclesランから、最大2x150 cyclesランまでのリード長に対応

NovaSeq 6000シーケンス仕様

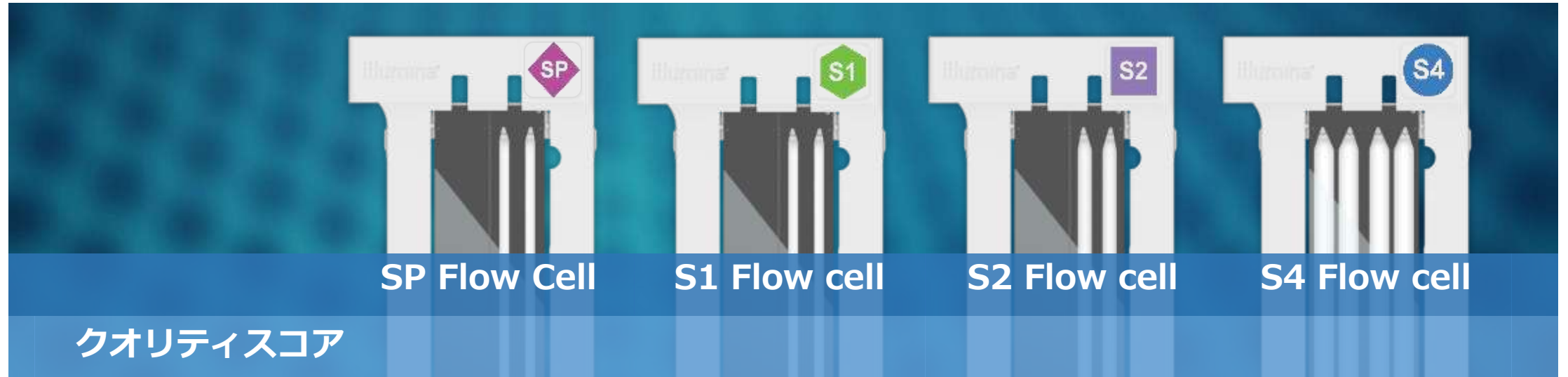
出力データ量



1 × 35 bp	N/A	N/A	N/A	280 – 350 Gb
2 × 50 bp	65 – 80 Gb	134 – 167 Gb	333 – 417 Gb	N/A
2 × 100 bp	134 – 167 Gb	266 – 333 Gb	667 – 833 Gb	1600 – 2000 Gb
2 × 150 bp	200 – 250 Gb	400 – 500 Gb	1000 – 1250 Gb	2400 – 3000 Gb
2 × 250 bp	325 – 400 Gb	N/A	N/A	N/A

NovaSeq 6000シーケンス仕様

クオリティスコア



NovaSeq 6000システムワークフロー



Standard ワークフロー

能率化された操作性

- より少ないハンズオンタイム
- ExAmp の混合ステップ自動化

Xp ワークフロー

柔軟性を増強

- レーンごとに手法、もしくはプロジェクトを分ける
- レーン内でマルチプレックスすることでIndex数を最大化
- より少ないサンプルinput量



NovaSeq 6000の ベストプラクティス



ベストプラクティス

ライブラリー準備・ ラン計画

- 1) ライブラリーローディング濃度の最適化
- 2) ライブラリーQC・アダプターダイマーの影響

ランセットアップ

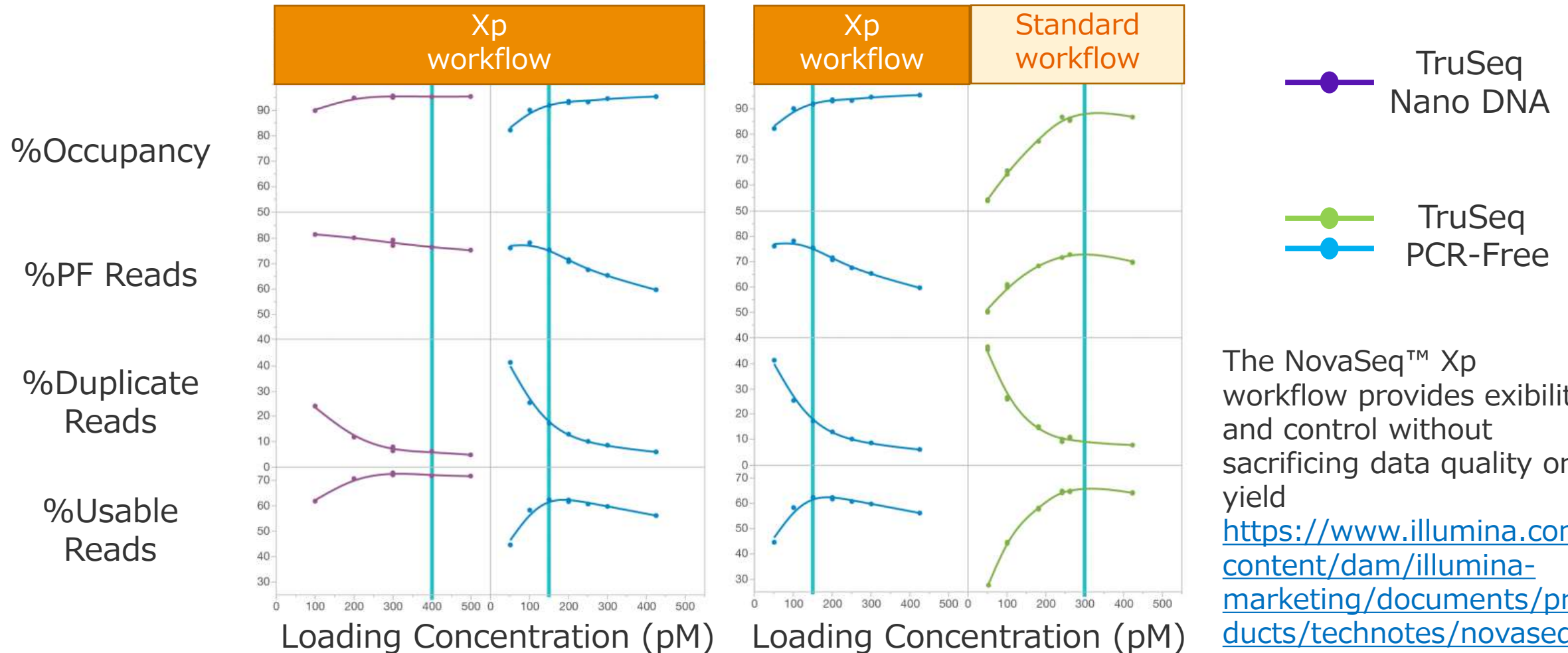
- 3) カートリッジ試薬の混合
- 4) ライブラリーロードステップ
- 5) Xpワークフローの注意点
- 6) スタッガーリングランスタート
(開始時間をずらしたランスタート)

メンテナンス

- 7) ストレージマネージメント
- 8) Washと装置のメンテナンス

1) ライブラリーローディング濃度の最適化

ライブラリー特性、ワークフローごとに最適ローディング濃度を検討する必要があります



The NovaSeq™ Xp workflow provides exhibity and control without sacrificing data quality or yield
<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/novaseq-xp-workflow-tech-note-770-2018-014.pdf>

1) ライブラリーローディング濃度の最適化

ライブラリー種類ごとの推奨ローディング濃度 (Standard vs Xp)

ライブラリータイプ	最終ローディング濃度 (pM)		プール済ライブラリー濃度 (nM)	
	Standard	Xp	Standard	Xp
PhiX (validation)	250	100	1.25	0.5
Illumina DNA PCR-free	400 - 600	300 - 400	2 - 3	1.5 - 2.0
TruSeq DNA PCR-Free	175 - 350	115 - 235	0.875 - 1.75	0.575 - 1.175
DNA PCR-amplified library	300 - 600	200 - 400	1.5 - 3.0	1.0 - 2.0
Single Cell*	250 - 500	175 - 275	1.25 - 2.5	0.875 - 1.375

*シングルセルはXpワークフローでのみ検証

< ライブラリーインサートサイズ >

- ~ 450 bpの場合、推奨濃度でローディング
- < 450 bpの場合、推奨濃度レンジの下限値でローディング
- > 450 bpの場合、ローディング濃度の検討が必要

【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>

1) ライブラリーローディング濃度の最適化

最適ローディング濃度の検討



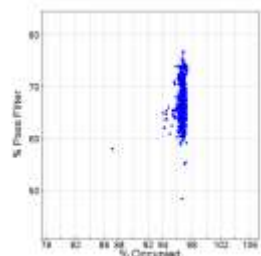
【ランを成功させるための最適なクラスター密度を得る方法】
<https://jp.illumina.com/events/webinar/2019/webinar-191225-j.html>

SAVで“%PF vs %Occupied”Plotを作成、評価

Under Loaded
 • Diagonal line

Optimal Loading
 • Oval

Over Loaded
 • Vertical line

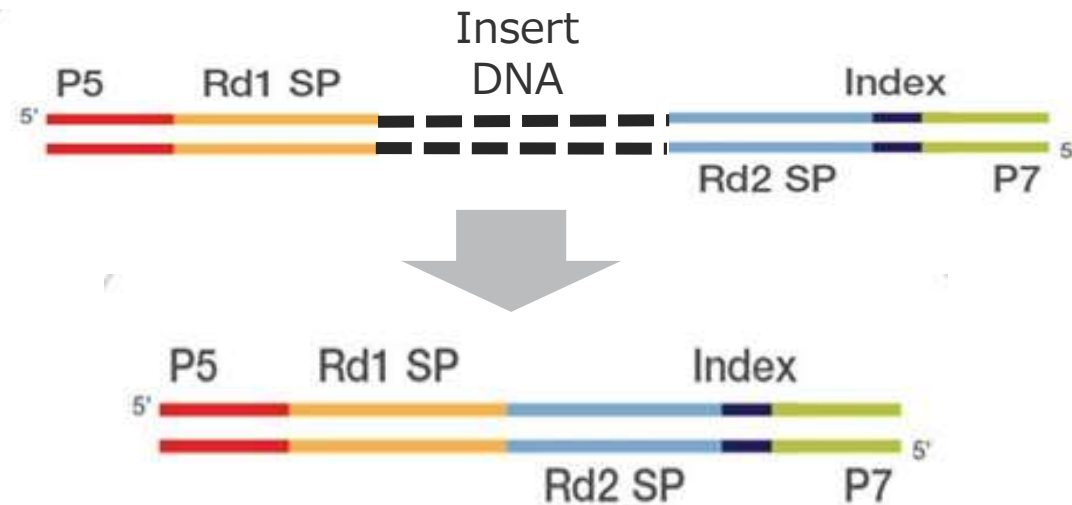


<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/novaseq-qc-iseq-app-note-770-2018-019.pdf>

2) ライブラリーQC・アダプターダイマーの影響

アダプターダイマー

インサートDNAがなく、P5、P7アダプターが結合したときに形成されます



アダプターダイマーの原因

低品質のInput DNA

ビーズハンドリングの失敗

Input DNA量が不十分

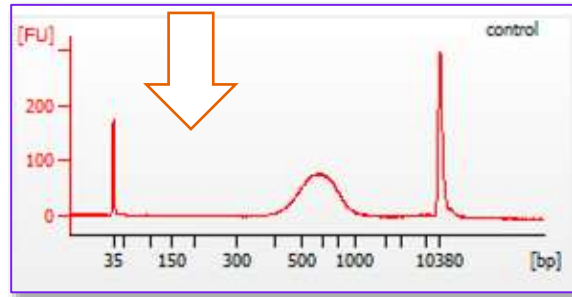
酵素反応不良

- ライブラリーのQCは毎回ご実施ください
- 1:1の比率のビーズクリーンアップもしくははゲル精製でアダプターダイマーを除いてください

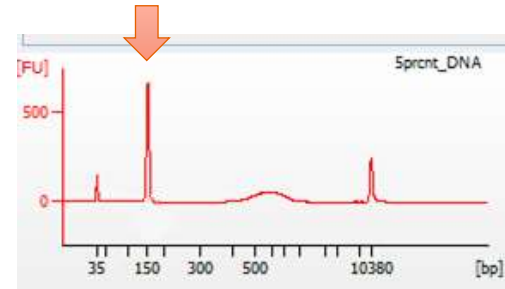
2) ライブラリーQC・アダプターダイマーの影響

アダプターダイマーをスパイクインした実験

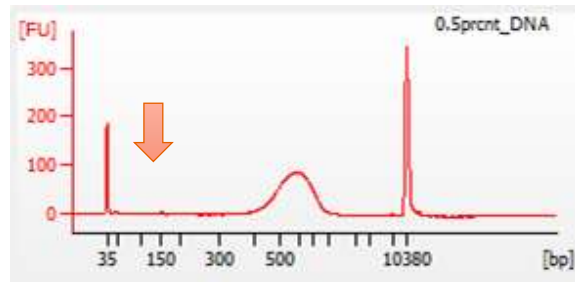
0%
Adapter
Dimer



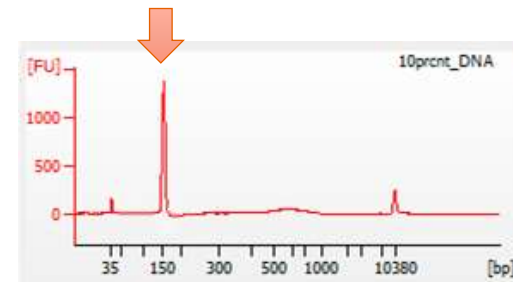
5%
Adapter
Dimer



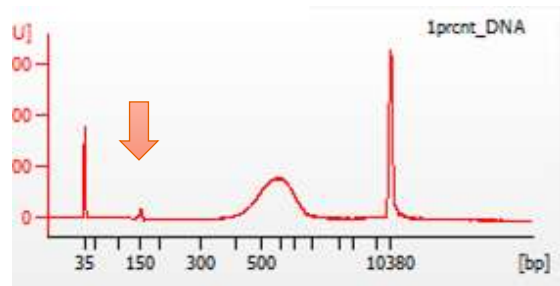
0.5%
Adapter
Dimer



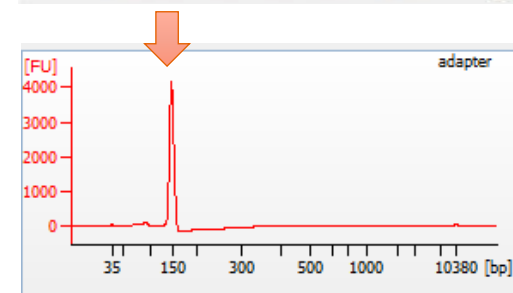
10%
Adapter
Dimer



1%
Adapter
Dimer

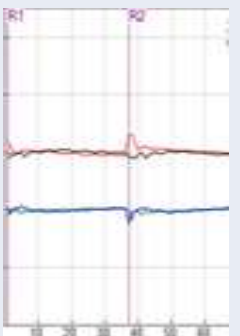
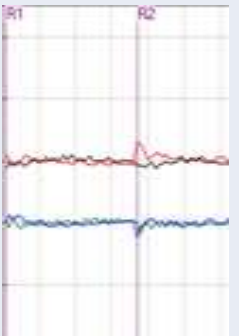
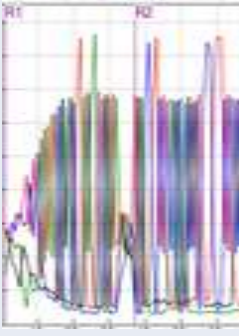
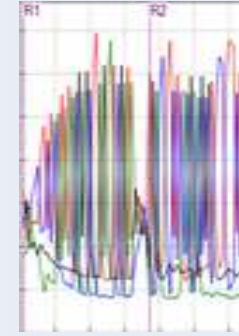
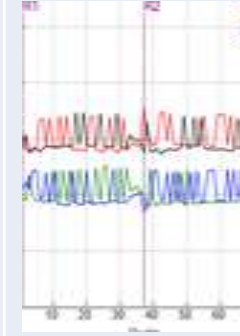
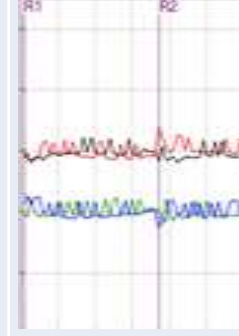



100%
Adapter
Dimer



2) ライブラリーQC・アダプターダイマーの影響

アダプターダイマーをスパイクインした実験 - HiSeq X

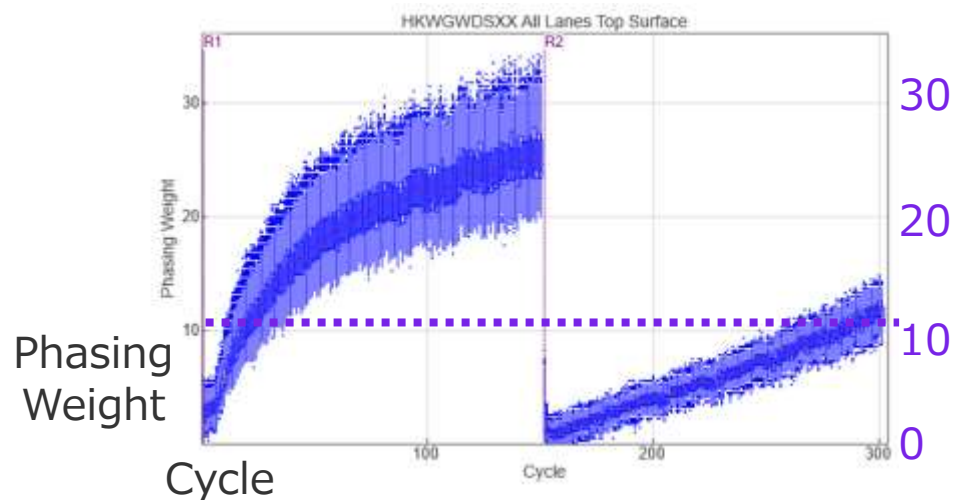
	Control	Control	10%	5%	1%	0.50%	0.10%
%PF	63.2	69.54	10.87	21.39	51.88	55.4	66.09
% Base							
下流解析によって同定されたアダプターダイマーの割合	0.27	0.24	84.25	60.44	6.46	2.71	0.81

少量のアダプターダイマーのコンタミネーションでも、%PF低下につながり、データ出力量に大きな影響を与えます

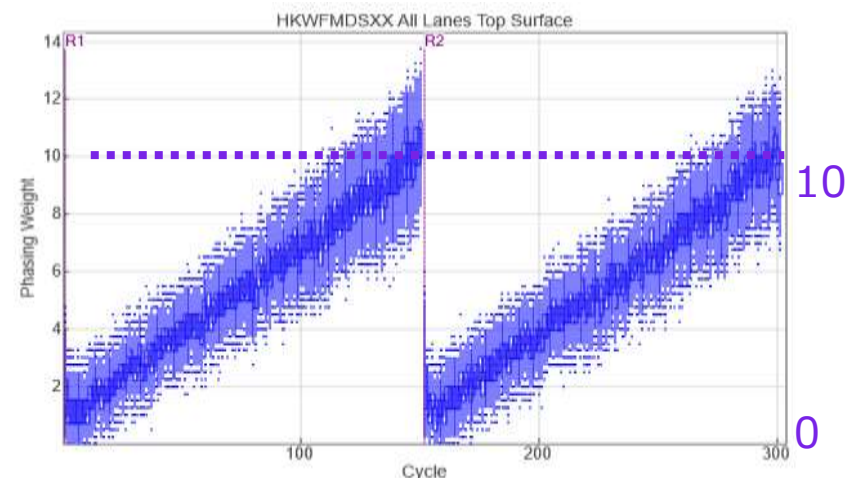
3) カートリッジ試薬の混合

- 試薬カートリッジ (SBS、およびcluster) は完全に融解後、**10回しっかり転倒混和**ください
- 混合が不十分な場合、ランクオリティに影響することがあります

SBS Cartridge**混和なし**



SBS Cartridgeを10回転倒混和



Read 1

Lane	Tiles	Density (K/mm ²)	Cluster PF (%)	Legacy Phasing/Prephasing Rate	Phasing slope/offset	Prephasing slope/offset	Cluster Count Raw (M)	Cluster Count PF (M)	% >= Q30	% >= Q30 (Last 10 Cycles)	Yield (G)	Cycles Err Rated	Aligned (%)	Error Rate (%)
1	936	2961 ± 0	69.40 ± 7.79	0.668 / 0.024	0.220 / 13.160	0.098 / -1.792	3830.02	2657.99	70.43	54.02	398.69	0 - 151	9.92 ± 1.07	3.36 ± 2.32
2	936	2961 ± 0	70.02 ± 6.44	0.725 / 0.026	0.222 / 13.878	0.097 / -1.793	3830.02	2681.84	68.62	51.99	402.27	0 - 151	10.31 ± 0.93	3.90 ± 2.57
3	936	2961 ± 0	72.29 ± 6.24	0.667 / 0.024	0.219 / 12.847	0.096 / -1.855	3830.02	2768.54	70.52	54.61	415.04	0 - 151	10.83 ± 0.78	3.23 ± 2.02
4	936	2961 ± 0	71.16 ± 5.79	0.672 / 0.017	0.212 / 13.388	0.090 / -1.840	3830.02	2725.50	68.75	52.40	408.51	0 - 151	11.62 ± 0.75	3.70 ± 2.00

4) ライブラリーロードステップ

ライブラリーロード量 (Standard vs Xp)

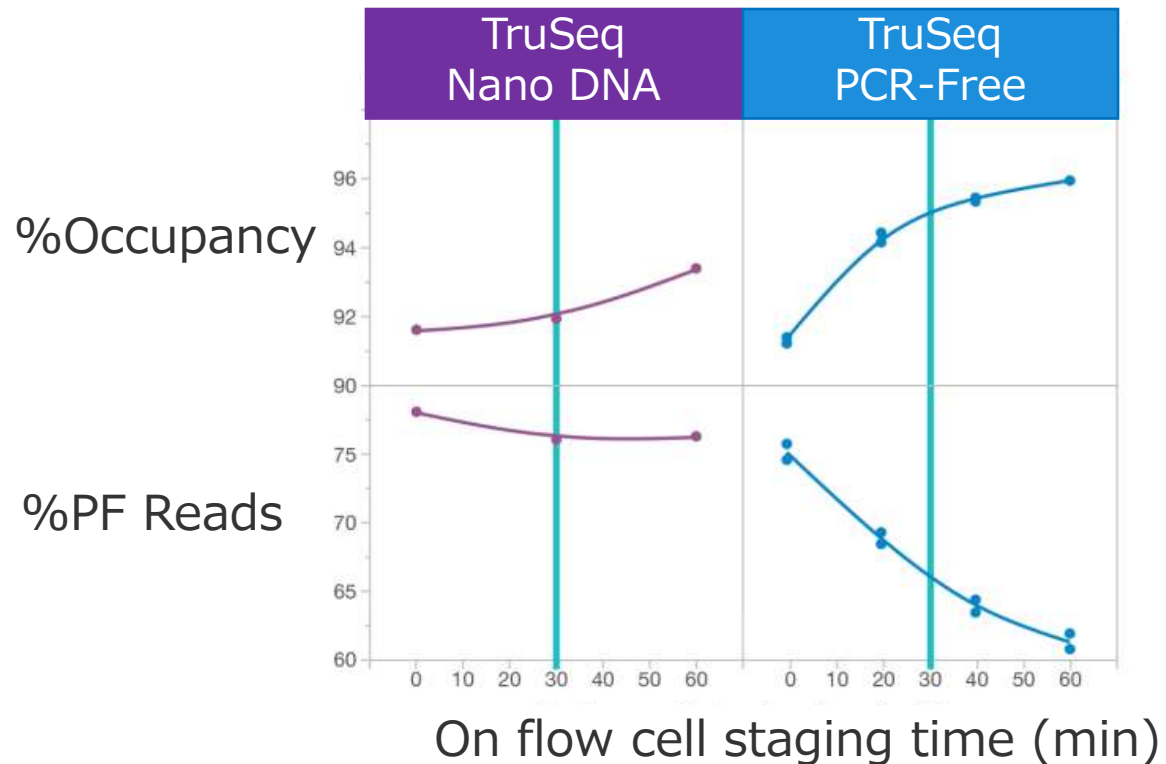
フローセルタイプ	Standardワークフロー* (μ l)	Xpワークフロー** (μ l)
SP/S1	100	18
S2	150	22
S4	310	30

*プール済み未変性ライブラリー量

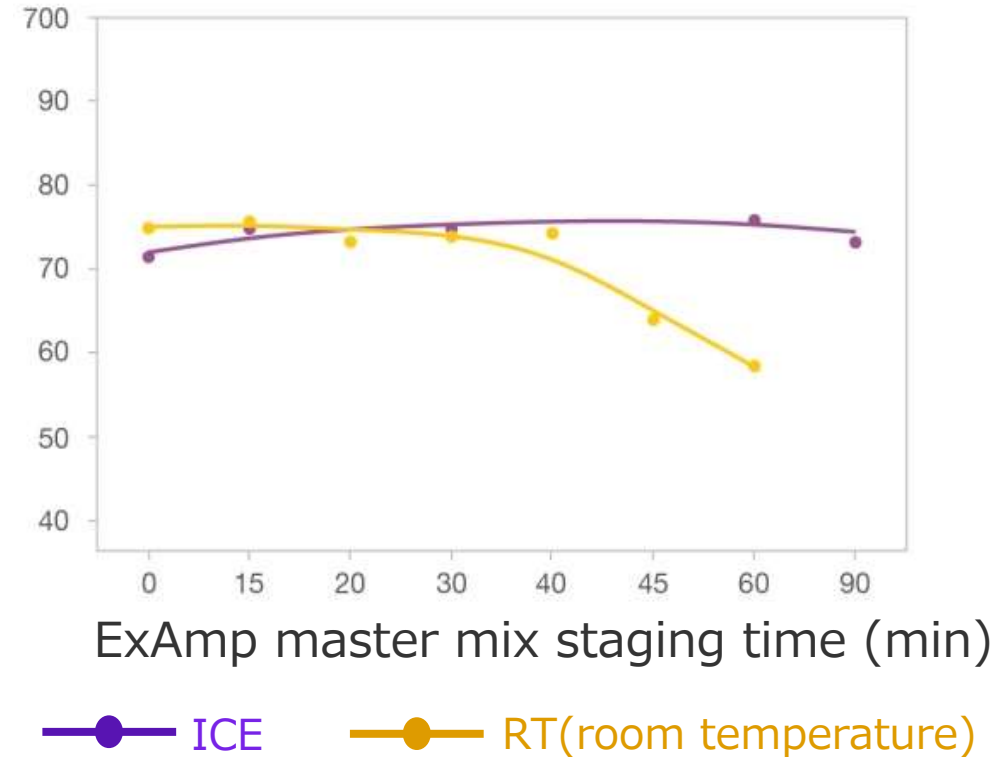
**レーン当たりのプール済み未変性ライブラリー量

- 毎回新しく調製した0.2N NaOHを変性にご使用ください
ストック1N NaOHは、定期的にpHが12.5以上あることをご確認ください
- ライブラリーは、変性ステップ後速やかにロードください
 時間経過によって二次構造を形成しクラスター形成に影響することがあります
- 変性ステップの各液量は公式ガイドをご参照ください (Appendix 2参照)
[NovaSeq 6000 Denature and Dilute Libraries Guide](#)

5) Xpワークフローの注意点



%PF Reads



- フローセルセット後、**30分以内**にランをスタートすることが重要です
- ライブラリーをフローセルにロードする前にフローセルのみ装置にセットし、RFIDチェックを事前に実施することでライブラリーロード済みフローセルがパスすることを確認します

The NovaSeq™ Xp workflow provides exhibity and control without sacrificing data quality or yield

<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/novaseq-xp-workflow-tech-note-770-2018-014.pdf>

6) スタッガーリングランスタート

開始時間をずらしたランスタート

2フローセルをランする場合には、同時スタートが推奨！
 予期せずラン開始時間がずれる場合、次のスライドの条件をご参考の上、ご実施ください

Run ステータス	クラスター 形成	Read1/inde x1 シーケンス	逆鎖合成	Read2/inde x2 シーケンス	ポストラ ンウォッシュ
スタッガー リング ステータス	Unavailable (約130分)	Available	Unavailable (約40分)	Available	Unavailable (約80分)

- **Available** : スタッガーリングランスタートが**可能**
 スタッガーリングスタートが実施できなくなるステップまでの時間が表示されます
- **Unavailable** : スタッガーリングランスタートが**不可**
 スタッガーリングスタートが可能になるステップまでの時間が表示されます
- **Waiting...** : スタッガーリングランスタートステータスが“Unavailable”時、ランをスタートしようとする
 と表示される。“Available”ステータスまでに要する時間が表示されます

もしスタaggerリングランスタートを実施する場合 注意点

Xpワークフローを2ndランで実施することを推奨しておりません！

1st ラン	2nd ラン	推奨
Xp	Standard	○
Standard	Xp	X

Standard & Xpワークフローの場合

Xpワークフローを先にシーケンスを開始し、Standardワークフローをスタaggerリングスタートしてください

7) ストレージマネジメント

データ出力先の設定

- NovaSeq 6000では装置外への出力先を設定する必要があります
 - BaseSpace™ Sequence Hub
 - ネットワークストレージ
- 出力先はUNC (Universal Naming Convention) パスが推奨

例 : ¥¥111.222.333.444¥Runs¥Jul-Aug

The screenshot shows a configuration window with the following sections:

- 1. Run setup mode:** Radio buttons for Manual and File-Based.
- 2. Default output location:** An input field labeled "Output Folder" with the placeholder text "Select output folder" and a "Browse" button to its right.
- BaseSpace Sequence Hub:** A checked checkbox BaseSpace Sequence Hub. To its right, "Configuration:" has two radio buttons: Run Monitoring and Storage and Run Monitoring Only.
- Hosting Location:** A dropdown menu with a red asterisk next to the label "Hosting Location".
- Private Domain:** An unchecked checkbox Private Domain.
- 3. Illumina product improvement:** A checked checkbox Send Instrument Performance Data to Illumina and a "View Terms" link.

At the bottom, there are "Cancel" and "Save" buttons.

NovaSeq Control Softwareにおける出力先の設定方法

<https://jp.support.illumina.com/bulletins/2018/02/how-to-set-the-output-location-in-the-novaseq-control-software.html>

7) ストレージマネジメント ディスクスペースの管理

Process Management

Settings

Software Update

About

Minimize

Shutdown Instrument

Exit Application

CE Drive Used: 46.09 GB Available: 2923.51 GB

RUN DATE	NAME	SIDE	ID	RUN STATUS	NETWORK	BASESPACE	SPACE USED CE	SPACE USED C	
5/12/2017		None	7	Complete	Complete	N/A	0.41 GB	0.83 GB	Delete Run

Runs deleted through Process Management are deleted from the local drives (C: and CE)

Done

表示内容:

- Available : 利用可能なディスクスペース
- RUN DATE : 日付、ラン名
- RUN STATUS、NETWORK : 各プロセスの進捗状況

- ローカルドライブ (C、およびZ) は、S4 300サイクルのデータを2ラン分保存できる容量 (3 Tb)
- Process Managementから、**ローカルドライブ上のデータをラン毎に消去することをお勧めします**

8) Washとメンテナンス



Maintenance
Wash

◆ マニュアルメンテナンスウォッシュ

- **手動でのWashが必要になる場合**
 - アイドル状態が15日以上続いた場合
 - 過去14日間に4-laneのシーケンスランが実施されなかった場合
 - シーケンスランがwashなしで終了した場合
- **Washのベストプラクティス**
 - 毎回新しく調製した0.05% Tween 20 および 0.25% NaOCl 液を使用
 - 使用していないWash cartridgeは逆さにしておく
 - Wash後のフローセル、試薬及びバッファークार्टリッジは次のランまで**そのまま装置内に置いておく**



Instrument
Shutdown

◆ NovaSeq 6000のシャットダウン

- 基本的に**常時電源オン**の状態が推奨

ベストプラクティス まとめ

- 最適ローディング量は、ライブラリー特性、ワークフローごとに%Occupancy、%PF Reads、%Duplicate Reads、%Usable Readsを考慮し、検討する必要があります。
- ライブラリーに混入したアダプターダイマーはできるだけ除いてください。
- Xpモードでシーケンスする場合、フローセルセット後、30分以内にランをスタートすることが重要です。
- Xpモードでスタaggerリングランシーケンスする場合、Xpワークフローを初めにシーケンスすることを推奨しています。
- シーケンスデータ出力先をネットワークストレージへ設定する場合、UNC (Universal Naming Convention) パスが推奨です。
- シーケンス前にディスクスペースが十分あることを確認してください。

よくお問い合わせを
いただき症状と対処法

3

よくお問い合わせいただく症状

ラン前

- 1) イニシャライゼーションの失敗
- 2) フローセルの傷
- 3) フローセルロード時のエラー
- 4) プレランチェックの失敗

ラン中

- 5) “A Component has failed”エラー
- 6) “Unable to register the fiducial on the flow cell”エラー

ラン後

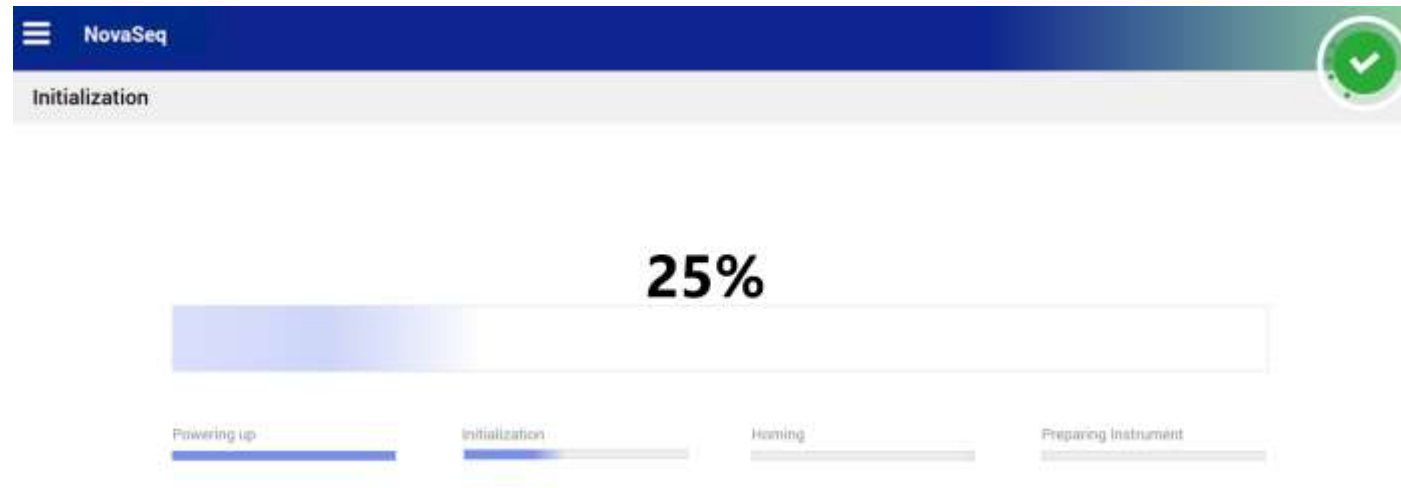
- 7) データ転送の遅延または停止

1) イニシャライゼーションの失敗

システムのイニシャライゼーション

NovaSeq 6000システム起動後に、各パーツのイニシャライゼーションが行われる

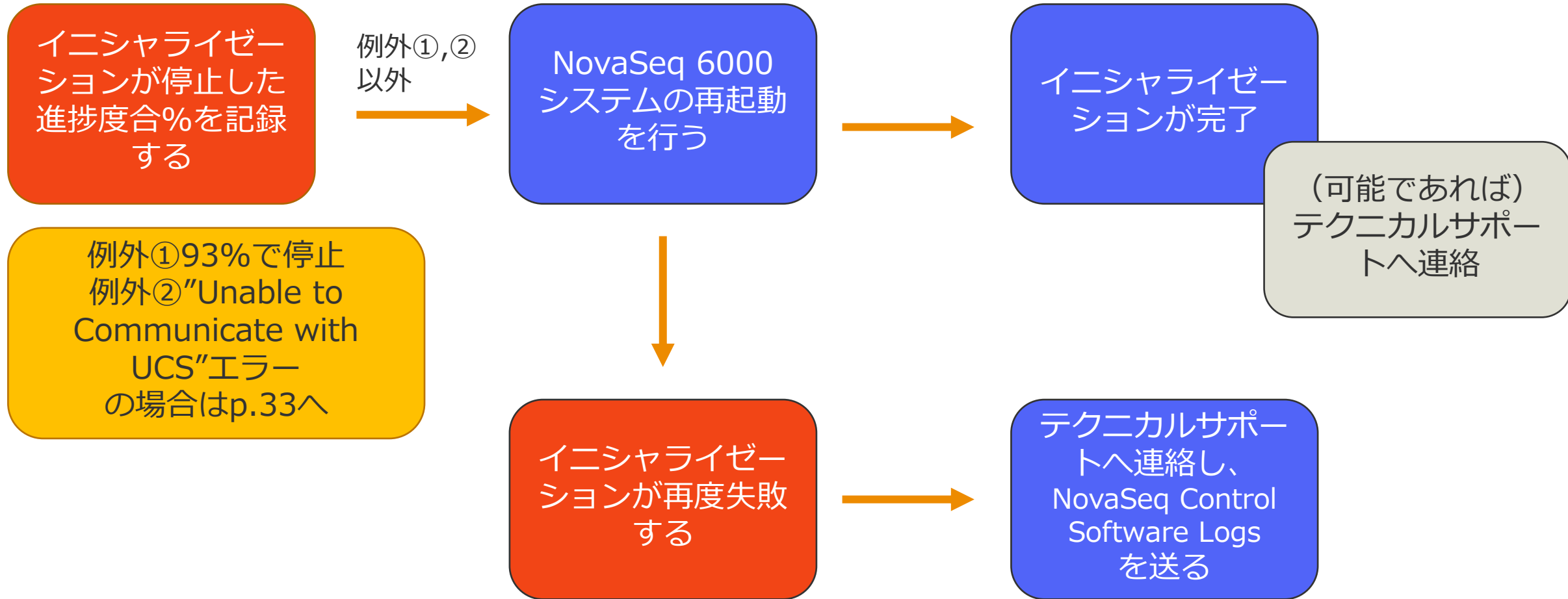
- イニシャライゼーションは、進捗割合(%)がControl Software上で表示される
- 進捗割合(%)は、実際にその時イニシャライゼーションを行っているパーツと関連する



イニシャライゼーションに失敗すると、Control Software上で何%で停止したか表示される

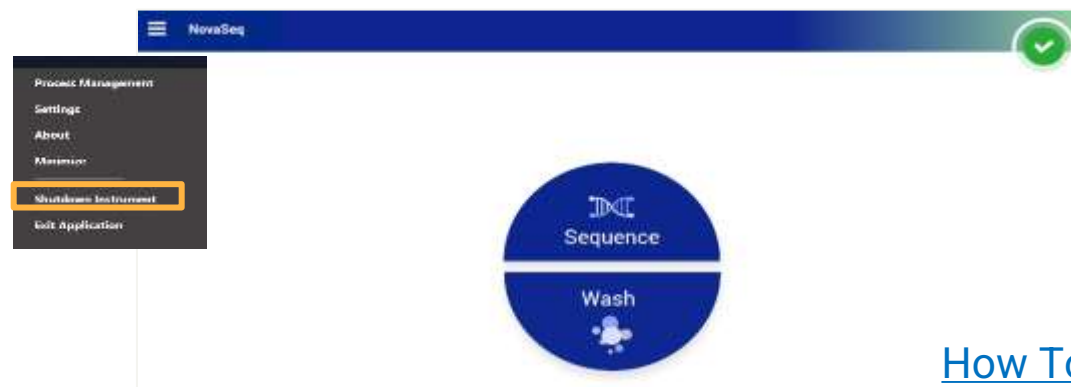
1) イニシャライゼーションの失敗

対処法



NovaSeq 6000システムの再起動

- 通常NovaSeq 6000システムの再起動は不要
- 装置のトラブルシューティング時に必要な場合がある
- 再起動の方法:
 1. メインメニューから Shutdown Instrumentを選択
 2. 画面が暗くなった後、装置の背面にあるトグル電源スイッチをオフ (O)に切り替える
 3. 5分待ち、背面の電源スイッチを再度入れる (I)
 4. 装置の右側の電源ボタンが青く点灯するまで待ってから、電源ボタンを押す



[How To Power Cycle The NovaSeq™ 6000](#)

イニシャライゼーションに失敗した場合の対処法

- 例外 -

例外①

93%で停止する場合

例外②

“Unable to Communicate with UCS*” のエラーが表示される場合

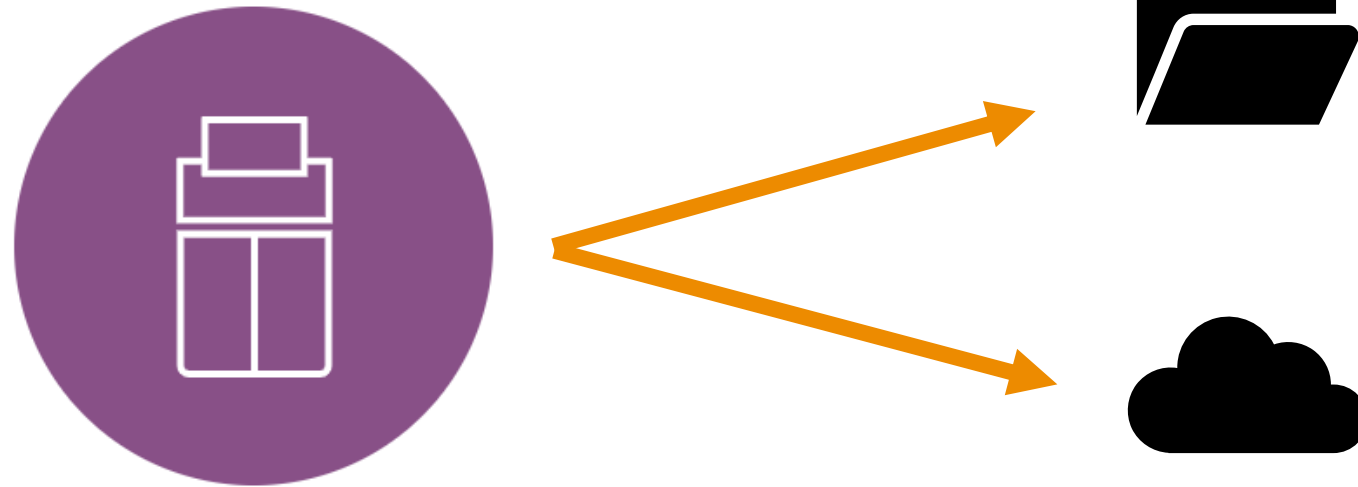
*Universal Copy Service

例外① イニシャライゼーションが93%で停止する場合

- イニシャライゼーション中NovaSeq Control Softwareがレーザー出力を測定する
 - 装置起動後、レーザー出力が閾値に達するまでに時間を要する
 - 出力が閾値に達していない場合、イニシャライゼーションが停止する
 - NovaSeq Control Software v1.7の場合93%で停止する
- **対処法**
 - **装置再起動は行わない**
 - メインメニューから Exit Applicationを選択し、Control SoftwareをClose、5-10分ほど待った後にControl Softwareを再起動する
 - 時間をおいても症状が再発する場合、テクニカルサポートへ連絡する

例外② “Unable to Communicate with UCS”の エラーがイニシャライゼーション中に表示される場合

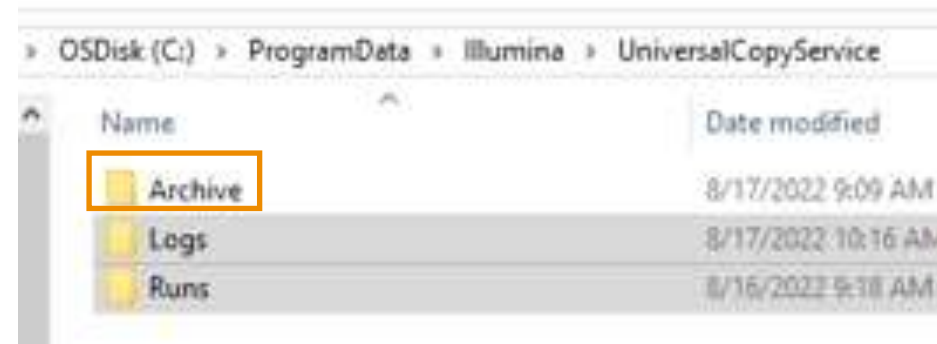
- Universal Copy Service (UCS) は装置本体からLocal networkやBaseSpace へのデータ転送を担う
- 装置本体の再起動では解決しないことが多い



例外② “Unable to Communicate with UCS”の エラーがイニシャライゼーション中に表示される場合

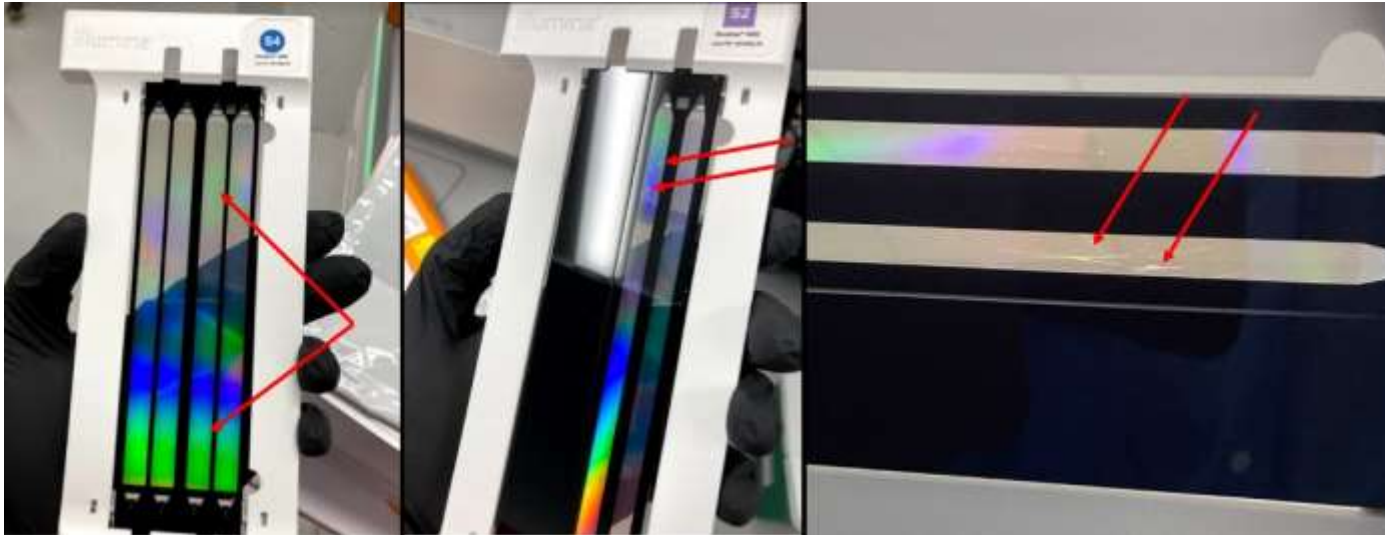
• 対処法

- NovaSeq Control SoftwareをCloseする
- Windows Task Managerを起動し“ucs.exe”がrunningになっていないことを確認する
(runningの場合、“End task”でUCSを止める)
- C:\ProgramData\Illumina\UniversalCopyServiceのフォルダを開き、“Archive”等の名前でフォルダを新規作成する
- “Runs” フォルダおよび“Logs”フォルダ内の全ファイルを新規作成したフォルダに移動する
- NovaSeq Control Softwareを起動する



2) フローセルの傷

- こすり傷や軽微な見た目の傷がみられることがある
- 正常範囲内であり、データ品質や収量が損なわれることなく、通常どおり使用できる



使用してよいか判断に迷ったら、フローセルの写真を添付の上テクニカルサポートへメールにてご連絡ください。

参考：[Best practices for preparing and inspecting NovaSeq 6000 flow cells for sequencing](#)

3) フローセルロード時のエラー

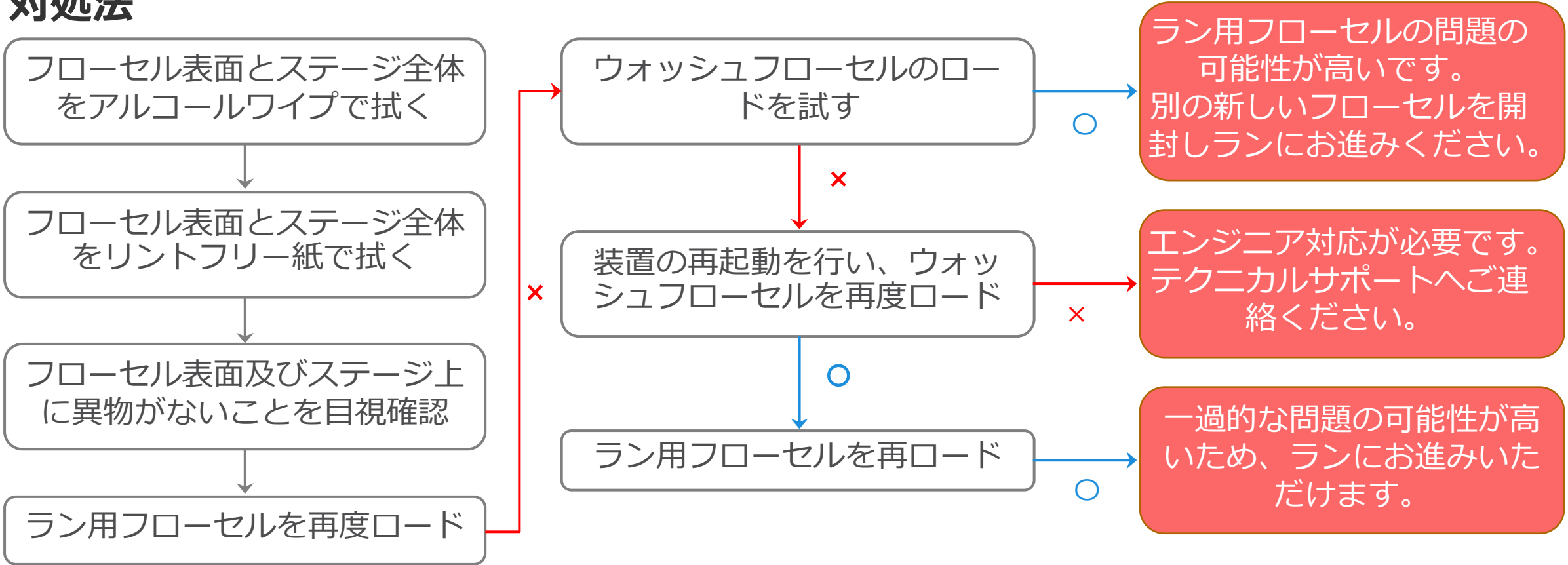
- フローセルのロード時、以下のメッセージが表示されることがある

- “Unable to Read the RFID. Load a new flow cell.”
- “Consumable Loading Error”
- “The Flow Cell Clamp/Vacuum is Unable to Engage”

- フローセルのロード後クランプが閉じ、バキュームによりフローセルが固定されRFIDの読み取りが行われる
- いずれのステップに問題が生じて、次のセットアップに進めない

3) フローセルロード時のエラー

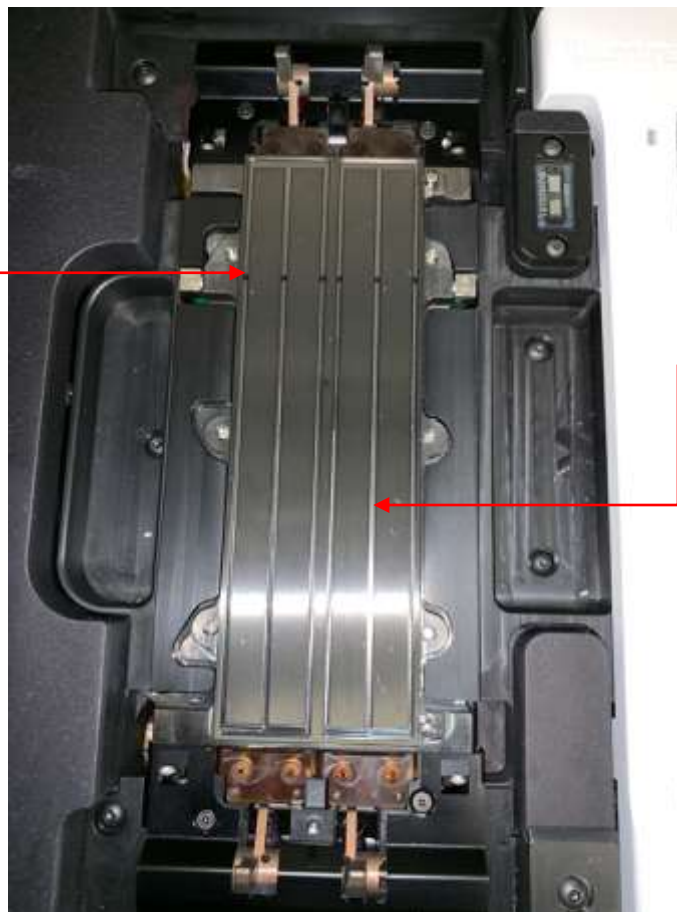
対処法



[What should I do if the NovaSeq™ 6000 flow cell cannot be loaded during run setup?](#)

フローセルステージのクリーニング

バキューム
がかかる部分



レーン間の溝

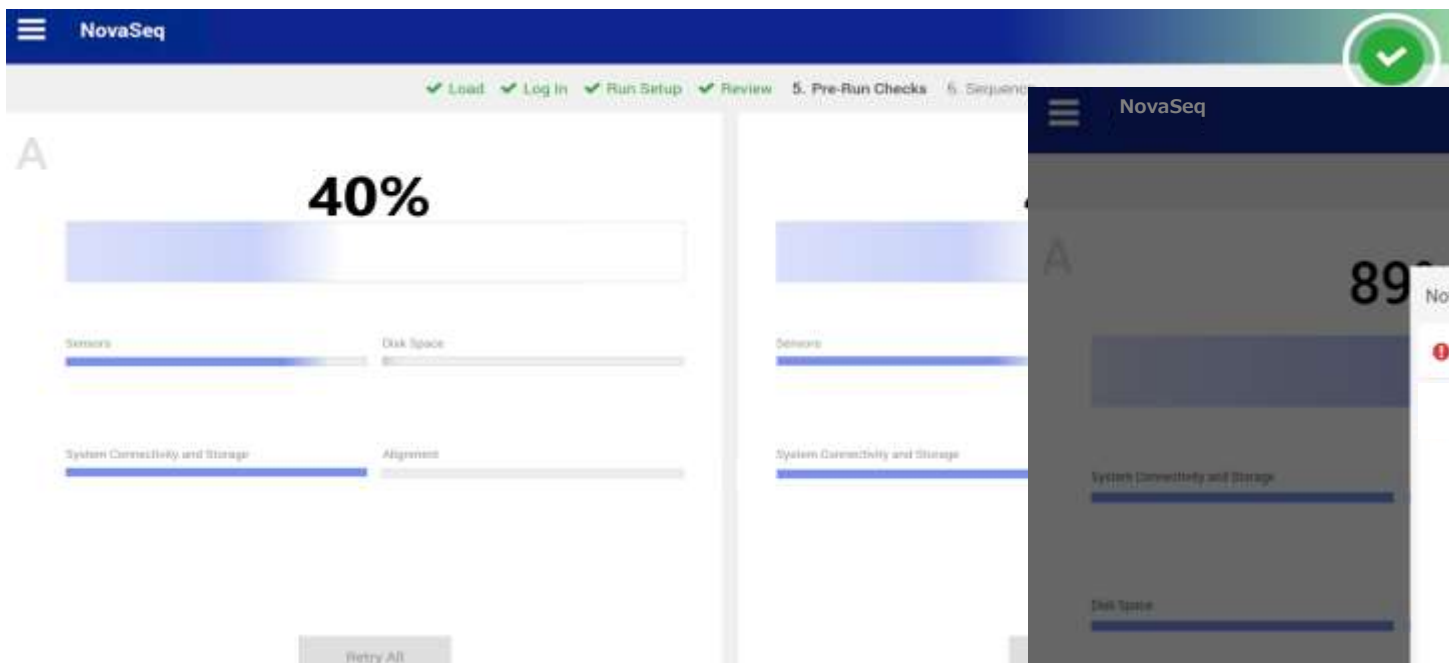
[Troubleshooting NovaSeq 6000 flow cell loading issues](#)

ランを開始できなかった場合の試薬・ライブラリーの保管

- もう一方の側または（あれば）別の機器でフローセルのローディングを試す。
- クラスタカートリッジ、SBSカートリッジは1回までであれば再凍結が可能。
- （Xpワークフローの場合）ExAmp試薬は未開封で融解直後であれば、1回まで再凍結が可能。
- 変性済みライブラリーはライブラリーチューブに蓋をして、-20℃で3週間まで保管可能。



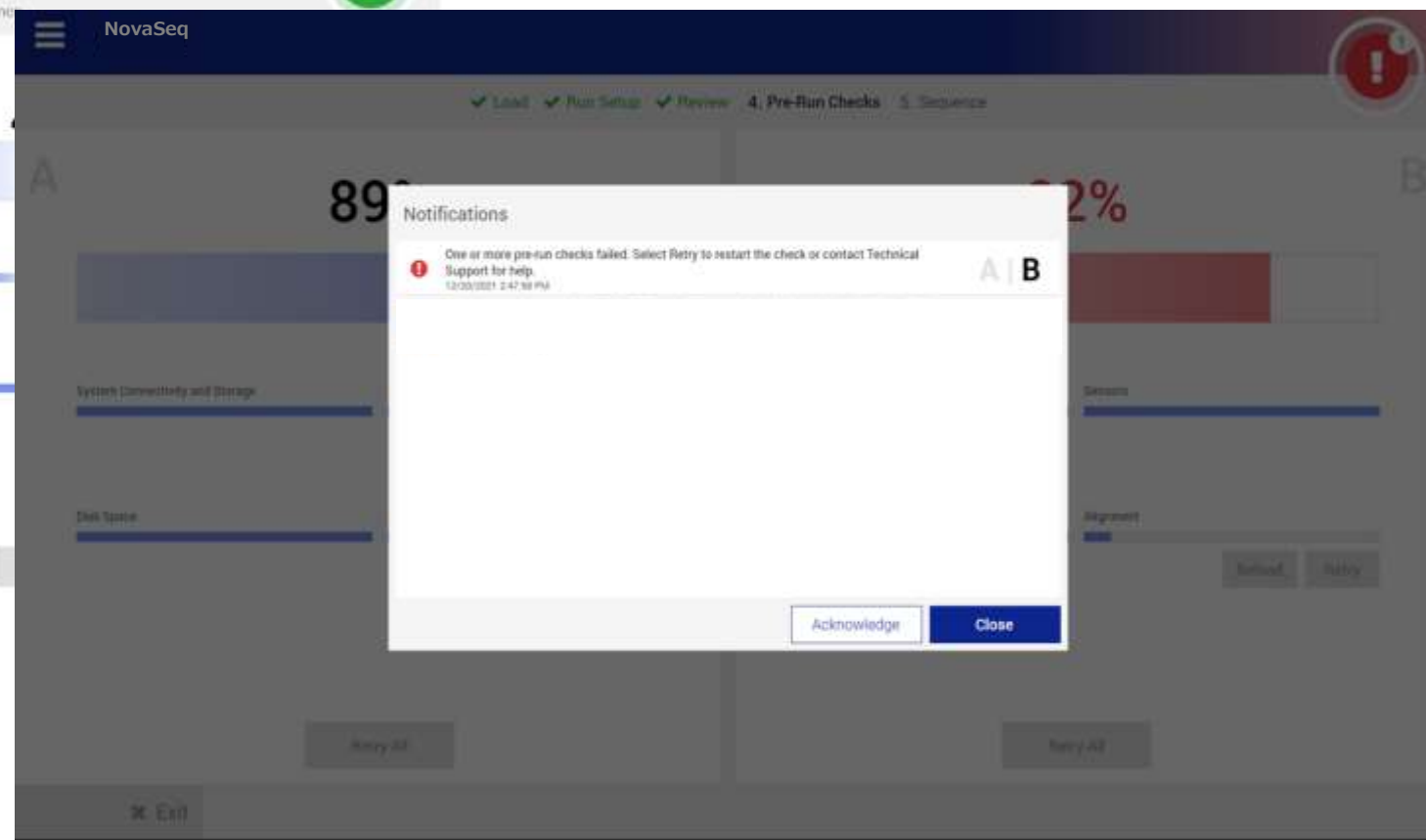
4) プレランチェットの失敗



プレランチェット中の画面

チェットの項目

- ✓ System Connectivity
- ✓ Sensors
- ✓ Disk Space
- ✓ Alignment



プレランチェットに失敗した画面

4) プレランチェックの失敗

Sensorsまたは**System Connectivity**

- **失敗理由**

Sensors : コンパートメントドアが開いているか、正しくロードされていない消耗品があるか、またはセンサーが機能していない

System Connectivity : RTA3への接続、流路システム、またはその他の接続が中断された

- **対処法**

a) 「Retry」を選択し、再チェックを試す。

b) 「Retry」でも解決しない場合、装置の再起動を行い、再度ランのセットアップ、プレランチェックを試す。

4) プレランチェックの失敗

Disk Space

- **失敗理由**

ローカルドライブ（CまたはZ）の空き容量不足、ネットワーク出力先フォルダが存在しないかアクセスできない

- **対処法**

a) Process Managementの「Delete Run」より、ローカルドライブの不要なランデータを削除する

【重要】過去のランデータはすべてLocal Driveより消していただいた上でランへお進みください。

b) CおよびZドライブに十分な空き容量があることを確認する

c) ネットワーク出力先にアクセスできることを確認する

d) NovaSeq Control Softwareの再起動または装置再起動

e) 再度ランのセットアップ、プレランチェックを試す

4) プレランチェックの失敗

Alignment

- **失敗理由**

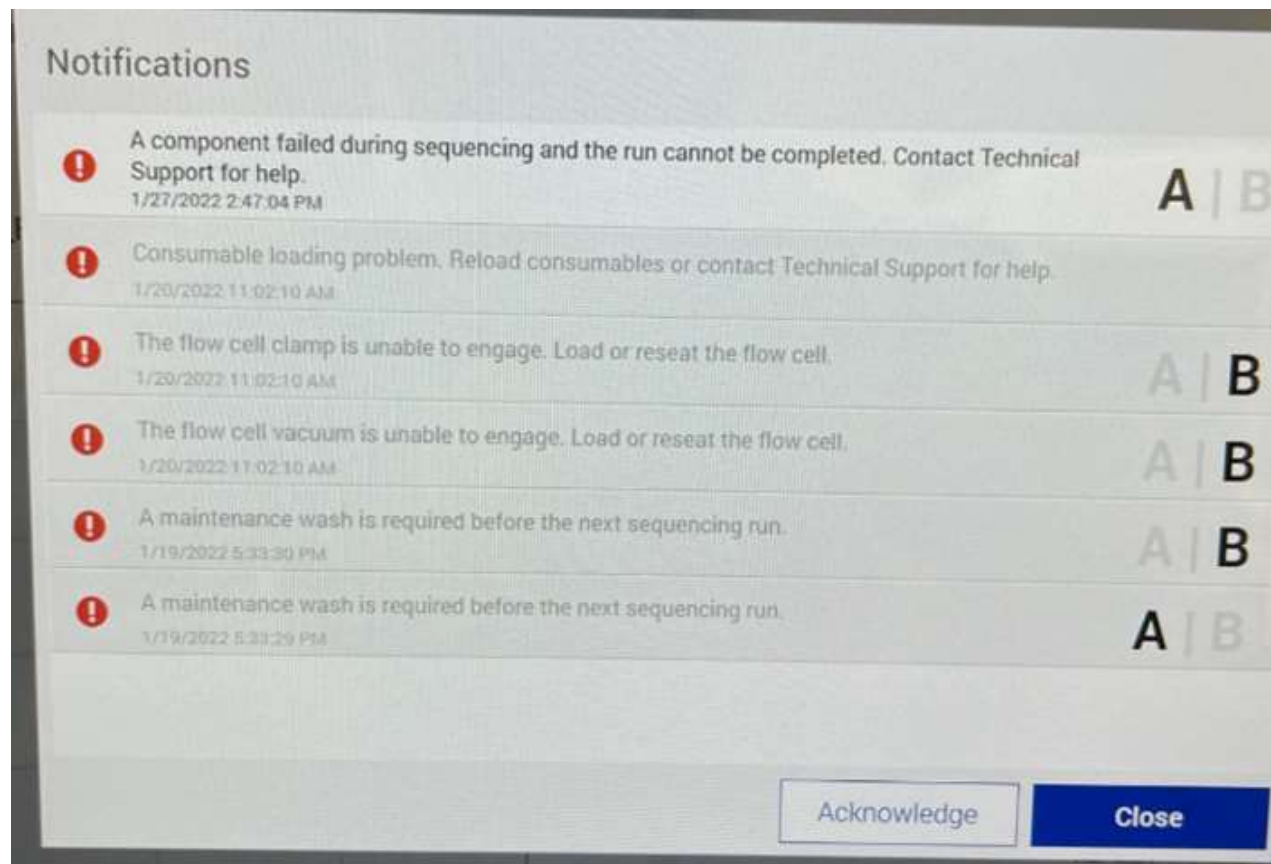
フローセルが正しくセットされていない、または装置光学系の問題

- **対処法**

- a) 「Reload」 > 「OK」 を選択しフローセルロード画面まで戻る
- b) フローセルを再ロードし、ランのセットアップに進む
- c) プレランチェックの画面まで再度ランのセットアップを進める
- d) プレランチェックを再実施する

5) "A Component failed"エラー

- コミュニケーションエラーまたは機器の不具合の可能性がある
- ラン開始直後（10分以内）またはラン中に発生する



5) "A Component failed"エラー

ラン開始直後（10分以内）に発生した場合

片側のみでランを行っていた場合、
ランの再開が可能な場合がある

装置再起動を行い、同じ試薬・フ
ローセルで再度ランのセットアッ
プを行う。



再度エラーが発生した場合、テク
ニカルサポートへご連絡ください。
詳細な調査のためログを回収いた
します。

もう一方の側でも同時にランを
行っていた場合、**ランの再開が
できない**

もう一方の側のラン完了を待ち、
装置再起動を行いイニシャライ
ゼーションが完了するかどうか
確認する。



テクニカルサポートへご連絡くだ
さい。詳細な調査のためログを回
収いたします。

5) “A Component failed”エラー ラン中に発生した場合

片側か両側かに関わらず、**ランの再開はできない**

(片側ランの場合) ポストランウォッシュの完了を待ち、装置の再起動
(両側ランの場合) もう一方の側のラン及びポストランウォッシュの完了を待ち、
装置の再起動
イニシャライゼーションが正常に完了するかどうか確認する



詳細なトラブルシューティングのため、テクニカルサポートへご連絡ください。

6) "Unable to register the fiducial on the flow cell" エラー

- フローセル上の“Fiducial”（目印）を認識できなかったことを示すエラー
- ランの再開はできない
- 主な原因
 - クラスタ形成不良（流路や温度制御の不具合、ライブラリー由来の問題）
 - ステージまたは光学系の不具合
 - 蛍光強度不足（試薬や光学系の問題）
 - フローセルのクオリティの問題
- **このエラーが発生した場合、まずテクニカルサポートへご連絡ください。**
＜ライブラリーに関する確認事項＞
 - 変性に使用したNaOHのpHが12.5以上あるかどうか
 - カスタムシーケンスプライマー使用の有無、使用されている場合設定が誤っていないか

7) データ転送の遅延または停止

The screenshot shows the NovaSeq software interface. On the left, a menu is open with 'Process Management' highlighted. The main window displays a table of runs. One run is highlighted with a red box, showing a status of 'Incomplete' in the 'NETWORK' column. A red text overlay explains this status.

RUN DATE	NAME	SIDE	ID	RUN STATUS	NETWORK	BASESPACE	SPACE USED CE	SPACE USED C	
5/12/2017		None	7	Incomplete	Incomplete	Copying	0.41 GB	0.83 GB	Delete Run

ネットワーク出力先への転送が未完了 (Incomplete)の状態

7) データ転送の遅延または停止

• 対処法

- a) ネットワーク出力先にアクセスできることを確認
- b) ランが完了している場合、装置を再起動しNovaSeq Control Softwareを再起動
- c-1) Task Managerを開き(Ctrl+Alt+Del)、Processタブよりucs.exeがrunningになっているようであれば、30分待ち、ネットワーク出力先に新しいファイルが転送されるか確認
- c-2) Task Manager上でUCSがrunningになっていない、または出力先に新しいファイルが転送されていないようであれば、以下の手順で**UCS再起動**を試す

<UCSの再起動手順>

- i) “Exit Application”よりNovaSeq Control Softwareを閉じる
- ii) Task Managerを開き、UCSのプロセス (ucs.exeまたはuniversal-copy-service)を“End task”で停止する
- iii) C:¥**ProgramFiles**¥Illumina¥UniversalCopyService¥ucs.exeをダブルクリック、またはNovaSeq Control Softwareを再起動する

a) ~ c)を試しても状況が変わらなければ、テクニカルサポートへご連絡ください。

よくお問い合わせいただく症状と対処法 まとめ

- 以下のトラブルがみられた場合でも、適切に対処することでランに進める可能性があります。
 - イニシャライゼーションの失敗
 - フローセルの傷
 - フローセルロード時のエラー
 - プレランチェックの失敗
 - “A Component failed”エラー（片側のみで実施、かつラン開始直後の場合）
- 上記以外のトラブルが発生した場合は、テクニカルサポートへご連絡ください。

テクニカルサポート直通フリーダイヤル 0800-111-5011
平日9時-17時受付
メールアドレス：techsupport@illumina.com

參考資料

4

参考資料

- [NovaSeq 6000 Sequencing System Guide](#) (システム全般について)
- [NovaSeq 6000 Denature and Dilute Libraries Guide](#) (ライブラリーの変性、希釈手順について)
- [Step-by-step instructions for sequencing library QC with the iSeq 100 System](#) (iSeqを用いたライブラリーQCの進め方について)
- [The NovaSeq Xp workflow provides flexibility and control without sacrificing data quality or yield](#) (StandardとXpワークフローのデータ比較)
- [NovaSeq Xp Workflow Checklist](#) (Xpワークフローチェックリスト)
- [Cluster Optimization](#) (クラスター数の最適化について)

その他NovaSeq関連資料は[こちら](#)から (サポートページ)

その他関連リソース

トレーニングコンテンツ

- [Training Courses](#)
- [NovaSeq: How to Start a Run](#)
- [NovaSeq: Xp Workflow](#)

関連動画

- [Introduction to the NovaSeq Series Workflow](#)
- [Optimal Cluster Density Best Practices](#)
- [Diagnosing Suboptimal Clustering in Patterned Flow Cells](#)

Illumina Knowledge

- [NovaSeq 6000 File paths](#)
- [NovaSeq Troubleshooting list](#)

ご清聴ありがとうございました

仲 健太、富田 みなみ

2022.11.22 | techsupport@illumina.com

Appendix

Appendix

- 1 NovaSeq 6000 Control Software Compatibility
- 2 ライブラリーローディング時の希釈
- 3 Low diversityライブラリーシーケンス
- 4 NovaSeq 6000各種フィルの保存場所
- 5 Illumina Proactiveのご紹介

1) NovaSeq Control Software Compatibility



	v 1.1.0	v 1.2.0	v 1.3.1	v 1.4.0	V 1.6.0	V 1.7.0	V 1.7.5	V 1.8.0
SP Flow cell					✓	✓	✓	✓
S1 Flow cell			✓	✓	✓	✓	✓	✓
S2 Flow cell	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
S4 Flow cell		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Xp Workflow			✓	✓	✓	✓	✓	✓
v1.5 Reagent kits						✓	✓	✓

[NovaSeq Control Software 1.7 Release Notes](#)

[NovaSeq Control Software 1.7.5 Release Notes](#)

[NovaSeq Control Software 1.8 Release Notes](#)



2) ライブラリーローディング時の希釈

S4フローセルへのローディング例：PhiX（最終濃度250 pMへの希釈）



その他の条件は、公式ガイド参照

[NovaSeq 6000 Denature and Dilute Libraries Guide](#)

3) Low diversityライブラリーシーケンス時の注意点

PCR Ampliconなど塩基多様性の低い (low diversity) ライブラリー

Platform	PhiX Aligned (%)†
iSeq™ 100	Minimum 5%
MiniSeq™	10-50%*
MiSeq™ (MCS 2.2 or higher)	Minimum 5%
NextSeq™ 500/550	10-50%*
NextSeq 1000/2000	10-50%*
HiSeq™ 1000/1500/2000/2500 (HCS 2.2.38 or higher)	Minimum 5%
HiSeq 3000/4000 (HCS 3.3.76 or lower)	10-50%*
HiSeq 3000/4000 (HCS 3.4.0 or higher)	5-20%*
NovaSeq™	Minimum 5%

- NovaSeq 6000の場合、最低5% のPhiX spike-inが推奨ですが、ライブラリーによって適正割合は変わりますので、推奨よりも高めの%からの条件検討をお勧めします。
- ライブラリーの種類によってクラスター形成効率が異なるため、ロード時にはさらに多めに混合する必要がある場合があります。
- ライブラリーローディング濃度を低めにすることもお勧めしています。

[How much PhiX spike-in is recommended when sequencing low diversity libraries on Illumina Platforms](#)

【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>

4) NovaSeq 6000 各種データファイルの保存場所

- ランデータ保存場所(初期設定)
 - ネットワークストレージ、あるいはBaseSpace Sequence Hub、または両方
 - 一時的ではないデータ保存場所をご指定ください
- NovaSeq 6000内ローカルランデータ (Local Backup)
 - Z:¥outputfolder¥[run folder]
 - .cbcl filesなどシーケンスラン生データが含まれます
- Run metrics and run logs (Troubleshooting用)
 - C:¥ProgramData¥Illumina¥NovaSeq¥NovaSeqTemp¥Run folder¥
 - トラブルシューティング時に一部データの送付をお願いする場合があります
- NovaSeq Control Software Logs
 - C:¥ProgramData¥Illumina¥NovaSeq¥NovaSeq Control Software¥Logs
 - トラブルシューティング時に一部データの送付をお願いする場合があります

**ProgramData フォルダは隠しフォルダになっている場合があります。

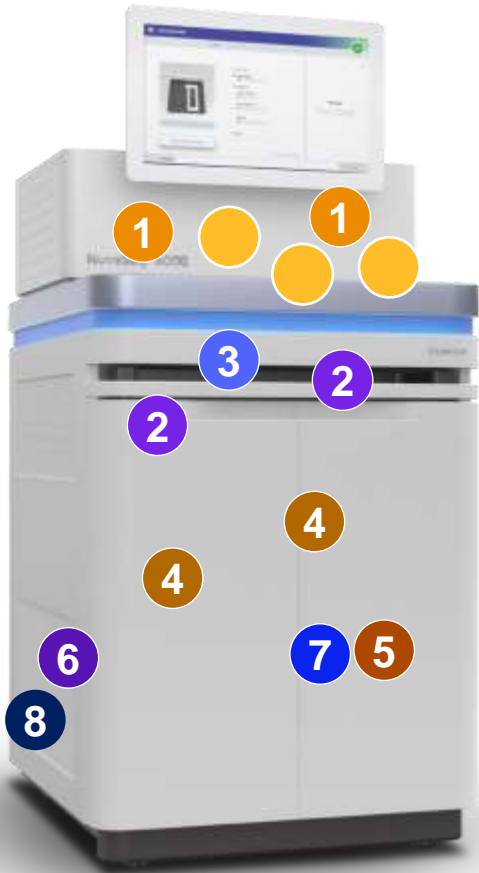
Explorer window で、 **View** タブから**Hidden Items** にチェックを入れる则表示されます。

[Sharing Instrument Performance Data with Illumina Support](#)

5) Illumina Proactiveのご紹介

NovaSeq 6000 Proactive Support

- インターネット上のイルミナサーバーにて、装置性能情報をモニタリングするサービス
- Illumina Proactive をONにすると、下記のパーツ不良検出時に、自動でアラートがイルミナサポートに送信



① Optics Compartment:

● Laser System
Temperature
Power
Current

● Camera System
Camera
Temperature
Camera Intensity

● Focus Tracking
Temperature
Locks
Spot Separation
Focus Model

② Flow Cell:
Heater
Temperature
Air Temperature
Coolant Flow

③ Motion System

④ Chiller Temps (x3)

⑤ Buffer

⑥ Fluidics

⑦ Vacuum Pressure

⑧ Thermal Board

5) Illumina Proactiveのご紹介

特徴と設定

1. Run setup mode

Manual File-Based

2. Default output location

Output Folder

BaseSpace Sequence Hub Configuration: Run Monitoring and Storage Run Monitoring Only

Hosting Location *

Private Domain

3. Illumina product improvement

Send Instrument Performance Data to Illumina [View Terms](#)

- サンプル情報やbcl/FASTQ データなど、PERSONAL DATA は送信されません
- 装置がインターネットに接続されている必要があります
- 初期設定ではONになっています

5) Illumina Proactiveのご紹介

資料

[日本語ウェビナー]トラブル発生時のデータ送信はもう不要！～テレワークにも対応したイルミナリモートサービス

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2020/webinar-0826-j.html>

- WEB Page : [Illumina Proactive Website](#)
- Overviews and Benefits
 - [One Page Overview](#)
 - [Data Security Overview](#)
 - [Illumina Proactive FAQ](#)
 - [MyIllumina Overview](#)
 - [Privacy & Security Statement](#)
- Technical Documents : [Data Security Technical Note](#)
- Videos
 - [MyIllumina Customer Dashboard Overview](#)
 - [Benefits of Illumina Proactive](#)
 - [Keeping your data safe and secure](#)

