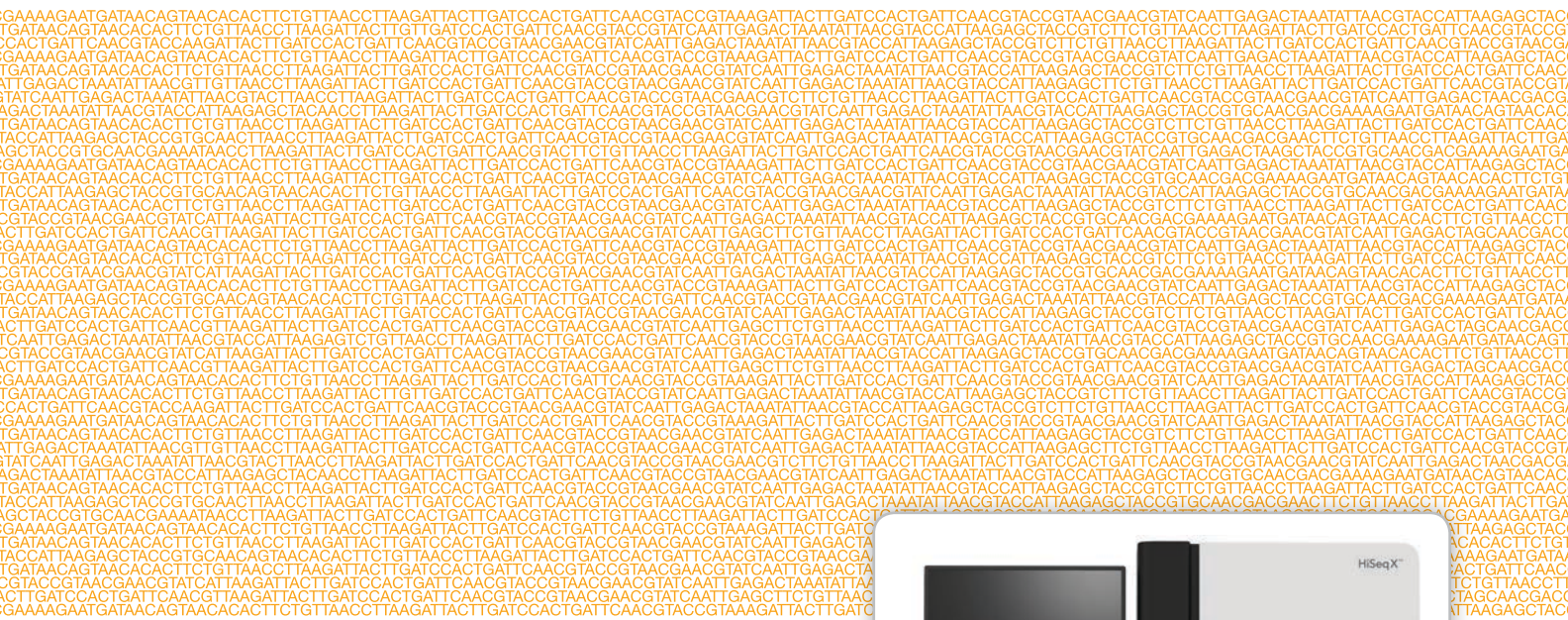




HiSeq X[®] System Guide



研究目的での使用に限定。診断での使用はできません。

ILLUMINA PROPRIETARY

資料番号：20013048
文書番号：15050091 v03 JPN
2017年3月

カスタムプロトコルセレクターで短い端から端までのワークフローガイドをカスタマイズ
support.illumina.com/custom-protocol-selector.html



本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づくいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての指示を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があります。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina、BaseSpace、HiSeqX、パンプキンオレンジ色および流動ベースデザインは、米国および/またはその他の国におけるIllumina, Inc. およびその関連会社の商標です。本文書に含まれるその他すべてのブランドおよび名称は、それら個別の所有者に帰属する所有物です。

改訂履歴

文書	日付	変更内容
資材番号：20013048 文書番号：15050091 v03 JPN	2016年 9月	<p>カスタムプロトコルセレクターを追加リソースに追加。 SeqClin洗浄溶液として、Sigma-Aldrich（カタログ番号：SRE0076）を追加。 洗浄ボトルとチューブを新品交換する、おおよその頻度を記載。 装置の起動に関する説明を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> オペレーティングシステムにログオンした後でなく、ログオンする前に、システムがロードするのを待つ。 装置の機器の構成時間とDoNotEjectの初期化時間を1分から3分に延長。 適切な作動のためには、ハードドライブは空の状態である必要があることを記載。 <p>クイックフォーマットの説明にスクラッチ（S:\）ドライブを含めるよう更新。 ログファイルへのアクセスに関する説明を修正。</p>
資材番号：20007156 文書番号：15050091 v02 JPN	2016年 5月	<p>以下のようにHiSeq Control Software v3.3.76のソフトウェア説明を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> BaseSpace Enterprises サブスクリプション契約者がドメインを設定するための説明を追加。 BaseSpace Sequence Hubのデータ転送ステータスを表示するセンサーインジケータの情報を追加。 [Pause] ボタンの使用を含めるように交互に行うランの説明を更新。 <p>BaseSpaceをBaseSpace Sequence Hubに名称変更。 クラスターの参照用として『cBot 2 System Guide』（文書番号：15065681）を追加。 オペレーティングシステムにログオンするために必要なデフォルトのユーザー名とパスワードを削除。イルミナではサイト固有の認証情報を使用することを推奨。 このガイドのカタログ番号を削除。</p>
資材番号：20002066 文書番号：15050091 v01	2015年 12月	<p>出力ファイルのフォルダ構成とランフォルダに関する情報を追加。 年間の予防メンテナンスサービス推奨を追加。 メンテナンスウォッシュの予定される容量の修正。</p>

文書	日付	変更内容
パーツ番号：15050091 Rev.E	2015年 7月	<p>以下のようにHiSeq X Control Software v3.3のソフトウェア説明を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> メンテナンスウォッシュプロトコルを更新。Tween 20およびProClin 300での洗浄を3-step NaOH洗浄に変更。 Flow Cell Setup画面に、フローセルタイプHiSeq X HD v2をフローセルタイプHiSeq Xに変更。 RunCopyService Softwareにデータ転送ステータスを示すセンサーインジケータに関する情報を追加。 <p>インデックスおよびペアエンド再合成に使用される試薬の調製とシーケンスプライマーの手順を追加。</p> <p>イルミナSeqLabのワークフローの違いの章を追加し、イルミナSeqLabを使用している場合、試薬の調製とシーケンスの手順を確認する場所を記載。</p> <p>HiSeq X v2.5キットのカタログ番号を追加し、リハイブリダイゼーションキットのカタログ番号を更新。</p> <p>フローセルAとフローセルBで交互に行うランについての説明を更新。</p> <p>カスタマイズシステム設定の手順でシステム設定の記載を変更。</p> <p>トラブルシューティングの情報を付録Aに、Real-Time Analysis Softwareの情報を付録Bに移動。</p> <p>シーケンス出力の一覧表からオフセットファイルとフェージングファイルを削除。RTA2ではこれらのファイルの作成は中止。</p> <p>追加リソースから『HiSeq X Five Lab Setup and Site Prep Guide』（パーツ番号：15067045）を削除。HiSeq X Ten、HiSeq X Five、およびイルミナSeqLabのラボセットアップとサイト調製の情報が『HiSeq X System Lab Setup and Site Prep Guide』（文書番号：15050093）で利用可能。</p>
パーツ番号：15050091 Rev.D	2015年 1月	<p>最初の25サイクルに許容される0.6未満のベースコールの数を2から1に修正。</p> <p>HiSeq X Ten試薬キットとHiSeq X Five試薬キットを含めるように、HiSeq X試薬キットのリストを更新。</p> <p>20パックキットの名前を10パックキットに変更（名前のみの変更。内容は変更なし）。</p> <p>追加リソースに『HiSeq X Five Lab Setup and Site Prep Guide』（パーツ番号：15067045）を追加。</p>

文書	日付	変更内容
パーツ番号：15050091 Rev. C	2014年 10月	<p>以下のようにHiSeq X Control Software v3.1のソフトウェア説明を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> • フローセルタイプHiSeq X HD v2を [Flow Cell Setup] 画面に追加。 • 各ラン後にメンテナンスウォッシュまたはウォーターウォッシュのどちらかを行うオプションを追加。各ラン後にメンテナンスウォッシュを推奨するが、必須ではない。各メンテナンスウォッシュでガasketを交換する必要はない。代わりに、10日ごとに行う必須のメンテナンスウォッシュを開始する前にガasketを交換。 • SBS試薬位置のみを洗浄するオプションを追加。 • [Reagents] 画面からインデックス試薬キットIDを削除。インデックス試薬を、HiSeq X HD試薬キット内のペアエンド試薬とともに包装。 • [Welcome] 画面のシーケンスコマンドを更新。 <p>HiSeq X HD (v1) フローセルおよびHiSeq X HD v2フローセルを、フローセルAおよびフローセルBとして同時にシーケンスできることに注意。</p> <p>保存と解析のためにBaseSpaceに接続された時でも、出力フォルダを指定することが必要であることに注意。</p> <p>キャップを交換し、SBS試薬をロードする前に各ボトルを数回反転させることの留意点を追加。</p> <p>アルコールワイプのVWRカタログ番号を95041-714に更新</p> <p>製品安全データシート (SDS) のURLを support.illumina.com/sds.html に更新。</p>
パーツ番号：15050091 Rev. B	2014年 5月	<p>以下の情報を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> • パターン化フローセルの特性に基づいてフィルターを通過するクラスターの説明を追加。 • Qスコアピンニングの説明を追加。 • 利用可能なディスク領域の要件を更新。 • 装置デバイスを初期化するための待機時間が1分以上であることを注意。 • 各ラン後にO:\のクイックフォーマットを行うベストプラクティスを追加。 • ワークフロー図での『HiSeq X HD Reagent Kit Reference Guide』のパーツ番号を15050092に修正。
パーツ番号：15050091 Rev. A	2014年 3月	初版リリース

目次

改訂履歴	iii
目次	vii
第1章概要	1
はじめに	2
追加リソース	3
装置のコンポーネント	4
シーケンス消耗品の概要	9
第2章はじめに	11
HiSeq Xの起動	12
システム設定のカスタマイズ	13
装置のデータの表示および送信	15
ユーザーが用意する消耗品	16
第3章試薬の調製	17
はじめに	18
SBS試薬の調製	19
インデックスおよびペアエンド試薬の調製	20
第4章シーケンス	21
はじめに	22
シーケンスワークフロー	23
ランパラメーターの入力	24
試薬のロードおよびプライム	27
シーケンスフローセルのロード	32
ランのモニタリング	35
試薬の取り外し	36
ウォーターウォッシュの実施	37
出力ドライブとスクラッチドライブのクイックフォーマット	38
第5章メンテナンス	39
はじめに	40
メンテナンスウォッシュの実施	41
装置の待機	44
装置のシャットダウン	45
付録Aトラブルシューティング	47
ログファイル	48
ランセットアップ時に起こりうる問題	49
送液チェックの実施	50
HiSeq Xでのランの一時停止または終了	51
フローセルAとフローセルBでの交互ラン	53
実行可能なリード1プライマリーハイブリダイゼーション	54
付録B Real-Time Analysis	55
Real Time Analysis概要	56
Real-Time Analysisワークフロー	58

付録C出力ファイルとフォルダ	63
シーケンス出力ファイル	64
出力フォルダの構成	65
タイル番号付け	66
索引	67
テクニカルサポート	71

概要

はじめに	2
追加リソース	3
装置のコンポーネント	4
シーケンス消耗品の概要	9



はじめに

HiSeq X[®]システムは、革新的エンジニアリングに実績のあるSBS技術と、集団スケールのヒト全ゲノムシーケンスを可能にする能力とを組み合わせています。

機能

- ▶ **デュアルサーフェスイメージング**：HiSeq Xは、デュアルサーフェスイメージングを行うため、最先端の走査技術を備えた2台のカメラ、4個のセンサーを備えた落射蛍光システムを使用しています。
- ▶ **パターン化フローセル**：パターン化フローセルは整列した配置でのシーケンスクラスター形成を可能にし、出力リードとデータを増加させます。
- ▶ **高容量試薬チラー**：試薬コンパートメントは、シーケンスラン全体に対して十分な試薬を保持する高容量チラーです。
- ▶ **ペアエンドラン用の統合された流路**：統合されたペアエンド流路は、リード2再合成のためとインデックスされたシーケンスのために試薬コンパートメントからフローセルに試薬を供給します。
- ▶ **インターフェース制御オプション**：装置ソフトウェアインターフェースは、タッチスクリーンモニターまたは統合キーボードを用いてランを設定し、装置を操作するためのオプションを提供します。
- ▶ **リアルタイムベースコーリング**：装置ソフトウェアは装置のコンピューター上で画像から強度を抽出し、クオリティスコアを付加したベースコーリングを行います。これによって、ラン中の品質メトリクスのモニタリングを可能にし、その後のデータ解析の時間を節約します。
シーケンスデータの下流の解析を、カスタムインフラストラクチャ上のイルミナ解析ソフトウェアまたはサードパーティー製ソフトウェアで行うことができます。
- ▶ **BaseSpace[®] Sequence Hub 統合**：シーケンスワークフローは、データ解析、保管および共有するためにイルミナゲノミクス計算環境であるBaseSpace Sequence Hubで統合されます。ランが進むと、出力ファイルは同時にBaseSpace Sequence Hubにストリームされます。

イルミナSeqLabのワークフローの違い

イルミナSeqLabのコンポーネントとしてHiSeq Xを使用している場合、ユーザーのワークフローはこのガイドに記載したワークフローとは異なります。違いはClarity LIMS X Editionで説明されています。ライブラリー調製からシーケンスまで、すべてのステップに関係します。イルミナウェブサイトのイルミナSeqLabサポートページを参照し、お使いの実験用のカスタムワークフローガイドを作成してください。

追加リソース

以下の文書は、イリミナウェブサイトからダウンロードできます。

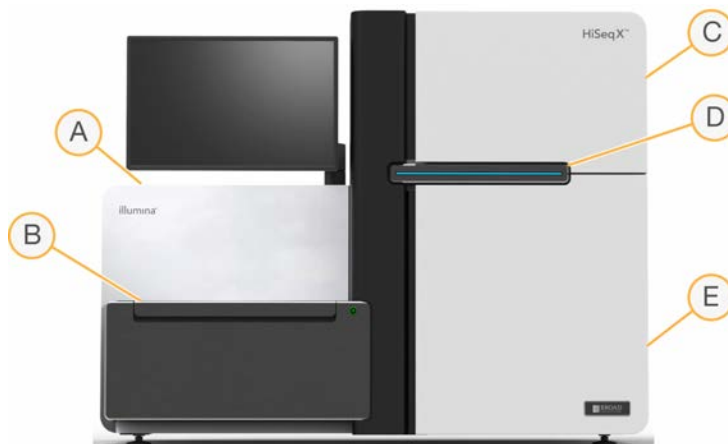
リソース	内容説明
『Custom Protocol Selector』	シーケンスランに使用するライブラリー調製法、ランパラメーター、解析法に合わせてカスタマイズされたエンドツーエンドの文書を生成するウィザードです。
『HiSeq X System Lab Setup and Site Prep Guide』 (文書番号：15050093)	ラボスペース、電源要件、環境検討事項に関する仕様を示します。
『HiSeq X System Safety and Compliance Guide』 (文書番号：15050094)	装置ラベリング、コンプライアンス認証、安全検討事項についての情報を示します。

文書へのアクセス、ソフトウェアダウンロード、オンライントレーニング、よくある質問については、イリミナウェブサイトのHiSeq Xサポートページを参照してください。イリミナSeqLabの詳細については、イリミナSeqLabサポートページを参照してください。

装置のコンポーネント

HiSeq Xシステムは、装置、モニター、装置制御コンピューター、およびキーボード、マウス、バーコードスキャナーなどの付属品で構成されています。装置は、光学モジュール、フローセルコンパートメント、送液コンパートメント、試薬コンパートメントの4つの主要コンパートメントを含みます。照明ステータスバーは操作ステータスを示します。

図1 外部コンポーネント

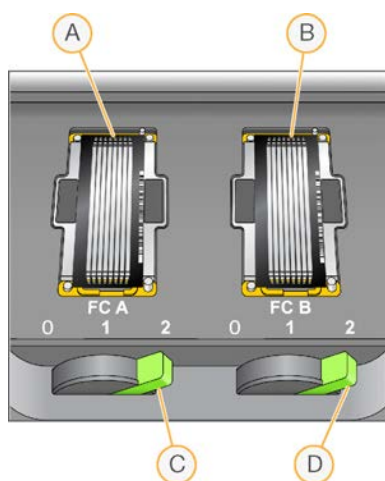


- A **光学モジュール**：フローセルのデュアルサーフェスイメージングを可能にする光学的構成物と、落射蛍光を用いたA、C、G、Tの同時イメージングです。励起レーザービームが対物レンズを通過し、同じ対物レンズから蛍光を同時に収集します。
- B **フローセルコンパートメント**：バキューム制御されたフローセルステージを含み、これによってシーケンスランの間、フローセルを所定の位置に保持します。
- C **送液コンパートメント**：試薬をフローセルに送り、その後、廃液容器に送る送液ポンプを含みます。
- D **ステータスバー**：3つの色で、装置の状況を示します。青色は装置が運転中であることを示し、オレンジ色は装置に注意が必要なことを示し、緑色は装置が次のランを始める準備が整っていることを示します。
- E **試薬コンパートメント**：シーケンスランのための試薬と、装置洗浄のための洗浄溶液を収める試薬ラックを含みます。

フローセルコンパートメント

フローセルコンパートメントは、フローセルステージ、サーマルステーション、バキュームシステム、そして各フローセルへの送液接続部を収納します。

図2 2つのフローセルを備えたフローセルステージ



- A フローセルA
- B フローセルB
- C フローセルレバーA
- D フローセルレバーB

フローセルAは左、フローセルBは右にあります。各フローセルはフローセルステージに取り付けられ、コントロールソフトウェアの指示通りにこのフローセルステージが光学モジュールを往復します。フローセルコンパートメントのドアを開き、フローセルを脱着するには、フローセルステージが最も前方の位置にある必要があります。

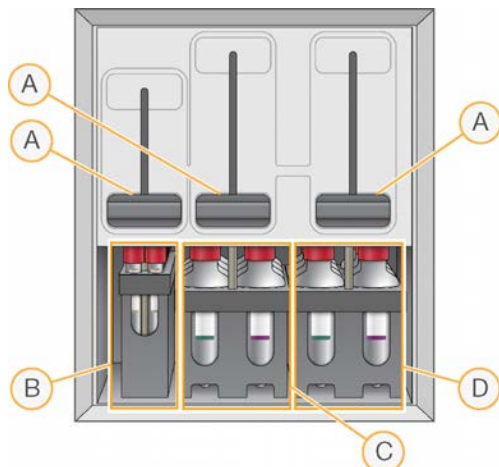
フローセルを、インレットポートとアウトレットポートが下を向いた状態でフローセルホルダーに置きます。フローセルは各フローセルホルダーの真下に設置されているバキュームで所定の位置に保持されます。各フローセルホルダー前にある照明フローセルレバーでバキュームを制御します。バキュームシールが確保されると、フローセルレバーが緑色に変わります。

試薬コンパートメント

試薬コンパートメントは、次の3つの試薬ラックを保持する高容量試薬チラーです：SBS試薬用2つ、インデックスおよびペアエンド試薬用1つです。シッパーハンドルでシッパーを試薬ボトルの中に下げます。

- ▶ **SBS試薬ラック**：250 mLコニカルボトルを収めます。フローセルA用試薬ラックは中央に位置し、フローセルB用のラックは一番右側に位置します。各試薬ラックには、内部試薬切替弁の接続部に対応する番号の付いた位置があります。
- ▶ **インデックスおよびペアエンド試薬ラック**：左側に位置します。ペアエンド試薬およびインデックス試薬を含む15 mLコニカルチューブを収める2列の番号の付いた位置があります。左側の列はフローセルA用で、右側の列はフローセルB用です。
- ▶ **試薬チラー**：試薬チラーは試薬ラックを収納し、2°C~8°Cの内部温度を維持します。

図3 試薬コンパートメント



- A シッパーハンドル
- B インデックスおよびペアエンド試薬用試薬ラック
- C フローセルAのSBS試薬用試薬ラック
- D フローセルBのSBS試薬用試薬ラック




HiSeq X Software



3つのソフトウェアアプリケーションが装置のコンピューターに内蔵されています。

- ▶ **HiSeq X Control Software** : HiSeq Control Software (HCS) インターフェースはシーケンスランの設定の際に、各ステップでガイドします。ラン中、コントロールソフトウェアが装置ハードウェアを操作し、送液を制御し、温度を設定し、そして品質統計のサマリーを可視化します。
- ▶ **Real-Time Analysis Software** : コントロールソフトウェアと統合されており、Real-Time Analysisはベースコーリングを行い、各サイクルの各ベースにクオリティスコアを割り当てます。詳細については、「Real-Time Analysis」(55ページ)を参照してください。
- ▶ **Sequencing Analysis Viewer Software** : Sequencing Analysis Viewer (SAV) が品質統計の詳細を示します。

ステータスアイコン

各画面の右上隅にあるステータスアイコンは、ランセットアップとラン中の状態の変化、エラー、または警告を示します。

ステータスアイコン	ステータス名	内容説明
	ステータスOK	変化なし。システムは正常です。
	情報	情報のみ。措置を講じる必要はありません。
	注意	注意が必要な可能性がある情報。

ステータスアイコン	ステータス名	内容説明
	警告	警告によるランの停止はありませんが、続行する前に措置を講じる必要が生じる場合があります。
	エラー	エラーは通常、ランを停止し、ほとんどの場合においてランを続行する前に措置を講じる必要があります。

状態に変化が起これると、関連するアイコンが点滅し、警告します。

- ▶ アイコンを選択し、ステータスウィンドウを開き、表示されている状態を確認します。
- ▶ [Acknowledge] を選択してメッセージを受け入れ、[Close] を選択してダイアログボックスを閉じます。

アクティビティおよびセンサーインジケータ

[Welcome] 画面には画面の右下隅に一連のアイコンがあり、装置のアクティビティと装置のセンサーに基づいて特定のコンポーネントのステータスを示します。

図4 アクティビティインジケータ



左から右に、アクティビティインジケータはX、Y、Z軸のモーター、電子機器の機能、カメラ、流路システム、処理機能を表します。

図5 センサーインジケータ



左から右に、センサーインジケータはフローセルAの温度、試薬チラー温度、データ転送ステータス、BaseSpace Sequence Hub クラウドステータス、フローセルBの温度を表します。



データ転送ステータス



HiSeq X Softwareスイートには、Run Copy Serviceが含まれており、出力フォルダへのデータ転送を管理します。BaseSpaceオプションでは、装置の動作およびシーケンスデータをBaseSpace Sequence Hubへ送信します。

ソフトウェアインターフェースのセンサーインジケータのうち2つは、Run Copy ServiceとBaseSpace Sequence Hubの転送ステータスを示します。

Run Copy Service






Run Copy Serviceの転送ステータスは、新しいランを開始できるか、または安全に出力ドライブをフォーマットできるかに影響します。

ステータスアイコン	内容説明
	データを転送しています。転送が終了するまで出力ドライブをフォーマットしないでください。
	データを転送していますが、ネットワーク接続の速度が落ちています。転送が終了したら、シーケンスランを設定し、出力ドライブをフォーマットすることができます。

ステータスアイコン	内容説明
	Run Copy Serviceはオフです。
	Run Copy Serviceはオンですが、データを転送しません。

BaseSpace Sequence Hub

BaseSpaceセンサーインジケータは、BaseSpace Sequence Hubのステータスを示します。青色クラウドは、アクティブ接続を示します。灰色クラウドは、ソフトウェアが接続できないことを示します。以下の表は、各ステータスアイコンについて追加の詳細を提供しています。

ステータスアイコン	内容説明
	BaseSpace Sequence Hubに接続されていません。
	BaseSpace Sequence Hubに接続されますが、データを転送しません。
	BaseSpace Sequence Hubに接続され、4ラン以下のデータを転送します。
	BaseSpace Sequence Hubに接続され、5ラン以上のデータを転送します。 このアイコンが表示されている間は、コントロールソフトウェアはすべての新しいランをBaseSpace Sequence Hubに接続することはできません。
	データを転送のためにキューしたままBaseSpace Sequence Hubから切断されます。

シーケンス消費品の概要

イルミナ試薬キットは、HiSeq Xでのシーケンスが必要です。各キットには、cBotで使用するクラスター試薬、HiSeq Xで使用するSBS試薬、インデックス試薬、およびペアエンド試薬が入っています。

- ▶ **シングルパックキット**：各キットには2枚のフローセルまたはデュアルフローセル1ラン分のシーケンスのための消耗品が含まれています。消耗品には試薬一式が2セット梱包され、各セットがフローセル1枚に対応します。
- ▶ **10パックキット**：各キットには20枚のフローセルまたはデュアルフローセル10ラン分のシーケンスのための消耗品が含まれています。消耗品は、同時に4枚のフローセルに対応するように梱包されています。

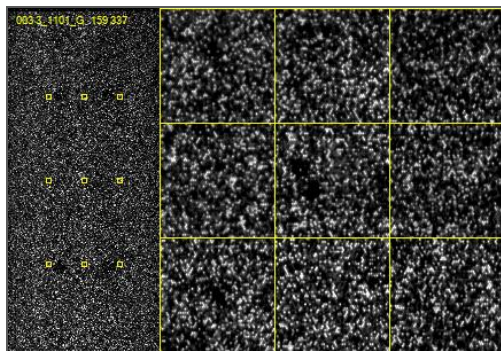
HiSeq Xキット名	カタログ番号
HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5 (300サイクル)	FC-501-2501
HiSeq X Ten Reagent Kit v2.5 (300サイクル)、10パック	FC-501-2521
HiSeq X Five Reagent Kit v2.5 (300サイクル)	FC-502-2501
HiSeq X Five Reagent Kit v2.5 (300サイクル)、10パック	FC-502-2521

パターン化フローセル

HiSeq Xは、決められた位置に数十億ものナノウェルが存在するパターン化フローセルを使用しており、ナノウェルはフローセルのガラスに生成されています。決められた配置により、出力リード数と作成されるシーケンスデータが増加します。

パターン化フローセルはHiSeq X試薬キットで提供されます。

図6 パターン化フローセル上のクラスターの例



はじめに

HiSeq Xの起動	12
システム設定のカスタマイズ	13
装置のデータの表示および送信	15
ユーザーが用意する消耗品	16



HiSeq Xの起動

- 1 装置制御コンピューターを起動します。
- 2 システムがロードするまで待ってから、オペレーティングシステムにログオンしてください。必要に応じて、ユーザー名とパスワードをお使いの施設の管理者にお問い合わせください。
- 3 装置の左側にある電源スイッチを探し、ONにします。
- 4 装置の機器が設定され、DoNotEjectと呼ばれる装置ドライブが初期化されるまで、3分以上お待ちください。
- 5 DoNotEjectが初期化されたら、開いているウィンドウを閉じます。ウィンドウが開かない場合、[MyComputer] を使用してDoNotEjectドライブを確認します。



注意

決して、装置シャーシ内部にあるDoNotEjectフラッシュドライブを取り出したり、そこに入っているファイルを修正しないでください。このドライブはハードウェアコンフィグレーションファイルを含み、装置の電源を入れるたびに初期化します。

- 6 十分なディスク領域を確保するために、装置のコンピューター上の前のランのデータをネットワークロケーションにアーカイブします。O:\ドライブとS:\ドライブのクイックリフォーマットを実行し、残りのデータをすべて削除します。
ハードドライブは、ソフトウェアが適切に作動するためには、空の状態でなければなりません。
- 7 デスクトップ上にあるショートカットアイコンを用いてHCSを開きます。
ソフトウェアの初期化が完了すると[Welcome]画面が開き、画面の右下隅に初期化アイコンが表示されます。

装置と制御コンピューターのベストプラクティス

- ▶ 装置が動作している間にコンピューターの電源を入れしないでください。必ずコンピューターの電源を入れた後に、装置の電源を入れてください。
- ▶ 装置コントロールソフトウェアの実行中に装置の電源を切らないでください。
- ▶ 装置の電源を切ってから再び入れるまで、1分ほどお待ちください。
- ▶ 装置用USBケーブル、モニター、キーボードをコンピューターの背面に接続した後に、コンピューターの電源を入れてください。
- ▶ コンピューターの前面にあるUSBポートにバーコードスキャナーとマウスを接続します。

システム設定のカスタマイズ

コントロールソフトウェアには、ランフォルダとLIMSプリファレンス、およびドメインのカスタマイズ可能なシステム設定が含まれています。[Menu Options] ウィンドウでは、ランIDテンプレートやデフォルトのフォルダの場所を定義するための設定をしたり、イルミナに装置の動作情報を送信したかどうか、さらにはLIMSの認証、およびBaseSpace Enterpriseのドメインを設定したりします。

インターフェースの表示をカスタマイズするには、[Menu|View] を選択します。フル画面またはウィンドウでインターフェースを表示するか、あるいは最小化にするか選択できません。

ランフォルダ設定の定義

- 1 [Welcome] 画面から、[Menu|Tools|Options] を選択し、[Menu Options] ウィンドウを開きます。
- 2 ランフォルダ名の命名規則をカスタマイズするには、[Run ID Template] フィールドで設定を変更します。[Reset] を選択し、フィールドをクリアします。
- 3 デフォルトの出力場所を設定するには、以下の各フォルダの場所を入力します。
 - ▶ [Default Output Folder] : フローセルAでのランのためのデフォルト出力フォルダ。
 - ▶ [Default Output Folder2] : フローセルBでのランのためのデフォルト出力フォルダ。



注意

イルミナでは、出力フォルダをネットワーク上に保存することを推奨します。しかし、その場所がHiSeq Tempフォルダと異なる場合、O:\ ドライブ上に場所を指定することができます。S:\ ドライブまたはC:\ ドライブは使用しないでください。S:\ ドライブは、装置を操作するための予備であり、C:\ ドライブでは小さすぎます。

- 4 LIMSサンプルフォームの場所を設定するには、[Run Setup Folder] フィールドの場所を入力します。
- 5 [OK] を選択して作業を保存し、[Menu Options] ウィンドウを閉じます。[Cancel] を選択すると、保存せずに閉じます。

LIMSプリファレンス設定

- 1 [Welcome] 画面から、[Menu|Tools|Options] を選択し、[Menu Options] ウィンドウを開きます。
- 2 以下のLIMS設定を入力します：
 - ▶ [LIMS Server] : イルミナLIMSでサポートしているインタラクション用のサーバー名。
 - ▶ [LIMS User Name] : イルミナLIMSへの認証時に使用されるユーザー名。
 - ▶ [LIMS Password] : イルミナLIMSへの認証時に使用されるパスワード。
- 3 [OK] を選択して作業を保存し、[Menu Options] ウィンドウを閉じます。[Cancel] を選択すると、保存せずに閉じます。

ドメインの設定

BaseSpace Enterpriseをサブスクリプション契約している場合は、以下の手順でドメインを設定してください。

- 1 [Welcome] 画面から、[Menu|Tools|Options] を選択し、[Menu Options] ウィンドウを開きます。
- 2 BaseSpace Sequence Hubサーバー用のドメインを入力します。
- 3 [OK] を選択して作業を保存し、[Options] ウィンドウを閉じます。[Cancel] を選択すると、保存せずに閉じます。

装置のデータの表示および送信

[Welcome] 画面の [Menu] ボタンと [Menu Options] ウィンドウは装置のデータを表示および送信するためのオプションを提供します。

- ▶ 装置のハードウェア、ソフトウェアのバージョン、テクニカルサポートの連絡先についての情報を表示するには [Menu|About] を選択します。
- ▶ 各ランのBaseSpace Sequence Hubに装置が情報を送信できるようにするには（推奨）、[Menu|Tools|Options] を選択します。次に、[Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products] チェックボックスを選択します。すべての情報の機密は保たれます。

ユーザーが用意する消耗品

ユーザーが用意する消耗品の総合的なリストについては、『HiSeq X System Lab Setup and Site Prep Guide』（文書番号：15050093）を参照してください。

消耗品	サプライヤー	目的
アルコールワイブ、70%イソプロピル またはエタノール、70%	一般的なラボ用品サプライヤー VWR、カタログ番号： 95041-714	フローセルおよびフローセルステージの洗浄。
少なくとも6リットル用のガラスビン	一般的なラボ用品サプライヤー Corning、カタログ番号：430776	メンテナンスウォッシュ溶液の調製。
手袋、パウダーフリー	一般的なラボ用品サプライヤー	一般用途。
ラボ用リントフリー紙	VWR、カタログ番号： 21905-026	フローセルホルダーの洗浄。
ProClin300、50 mL*	Sigma-Aldrich、カタログ番号： 48912-U	メンテナンスウォッシュ。
SeqClin洗浄溶液、5倍濃縮、1リットル*	Sigma-Aldrich、カタログ番号 SRE0076	メンテナンスウォッシュ。
チューブ、遠心、250 mL	一般的なラボ用品サプライヤー Corning、カタログ番号：430776	装置洗浄。 SBS試薬ラック、PW1が入っている位置に設置。
チューブ、コニカル、15 mL	一般的なラボ用品サプライヤー Corning、カタログ番号：430052	廃液の収集およびその量の測定。 PE試薬ラック、PW1が入っている位置に設置。
Tween20、粘性液体、100 mL	Sigma-Aldrich、カタログ番号： P7949	メンテナンスウォッシュ。
ピンセット、四角形のプラスチック製先端	McMaster-Carr、カタログ番号： 7003A22	フローセルガスキットの取り外し。
水、ラボラトリーグレード、18 MΩ	Millipore	ウォーターウォッシュ。 SBS試薬ラックおよびPE試薬ラック、PW1が入っている位置に設置。

*ProClin300は体外診断での使用に限定されており、質問票への記入が必要となります。
ProClin300およびTween20を希釈ブレンドしたSeqClinは、ProClin300およびTween20の代わりに使用できます。

試薬の調製

はじめに	18
SBS試薬の調製	19
インデックスおよびペアエンド試薬の調製	20



はじめに

ランを設定する前に、シーケンス用すべての試薬（SBS試薬、インデックス試薬、およびペ
アエンド試薬）を調製します。試薬調製の説明は、キットのバージョンにかかわらず同じも
のです。すべての試薬は、ランセットアップ中に、ソフトウェアによる要求でロードされま
す。ラン実行中に装置に戻り、リロードする必要はありません。

シーケンス試薬はクラスター形成中に調製することができます。フローセルの調製、クラス
ター試薬の調製、クラスター形成の実施についての説明は、『cBot 2 System Guide』（文書
番号：15065681）または『cBot System Guide』（文書番号：15006165）を参照してくださ
い。

SBS試薬の調製

以下の方法を用いて、SBS試薬を融解および点検してください：PSM、PIM、およびPCM保管庫から直接PB1とPB2を使用します。

該当するSBS試薬ボトルの数を調製します。

試薬	1フローセルの場合 (シングルフローセルラ ン)	2フローセルの場合 (デュアルフローセルラ ン)	4フローセルの場合 (2デュアルフローセルラ ン)
PB1	1	2	4
PB2	3	6	12
PCM	1	2	4
PIM	1	2	4
PSM	1	2	4

SBS試薬の融解

- 1 -25°C~-15°Cの保存状態からPSM、PIM、およびPCMのそれぞれのボトル4本取り出します。
- 2 約16時間2°C~8°Cで融解します。
もう一つの方法として、PSMとPIMを室温の脱イオン水の水槽で約90分間融解します。別の水槽でPCMを融解します。



注意

PCMを処理した後は、常時手袋を交換してください。

- 3 各ボトルを転倒混和します。
- 4 PSMを点検し、旋回パターンが目視されないことを確認します。
- 5 PSMとPIMを氷の上に置きます。
- 6 クロスコンタミネーションを防ぐために、PCMは別にして氷の上に置きます。

インデックスおよびペアエンド試薬の調製

インデックス試薬およびペアエンド試薬は、ペアエンドシーケンスランのリード2再合成ステップ中に使用されます。

インデックス試薬およびペアエンド試薬の該当するチューブ数を調製します。

試薬	1フローセルの数量 (シングルフローセルのラン)	2フローセルの数量 (デュアルフローセルのラン)	4フローセルの数量 (2デュアルフローセルのラン)
PRM	1	2	4
PLM2	1	2	4
PAM	1	2	4
PPM	1	2	4
PDR	1	2	4
HP11	1	2	4
HP12	1	2	4



警告

この試薬のセットには、生殖毒性がある可能性の高い脂肪族アミドであるホルムアミドが含まれています。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。目を保護するもの、手袋、ラボ用衣服など、保護服を着用してください。化学廃棄物などの使用済み試薬を処理および廃棄する際には、各地域の法令で定められた安全基準に従ってください。環境、健康、安全性に関する情報については、support.illumina.com/sds.htmlにある本キットのSDSを参照してください。

インデックスおよびペアエンド試薬の融解

- 1 -25°C~-15°Cの保存状態から以下の試薬を取り出します：PRM、PLM2、PAM、PPM、PDR、HP11、およびHP12インデックスなしのライブラリーの場合、HP12は必要ありません。
- 2 室温の脱イオン水の水槽で約20分間融解します。
- 3 PRM、PLM2、およびPAMを氷の上に置きます。

PRM、PLM2、PAM、PPM、PDR、HP11、およびHP12の調製

- 1 各チューブを転倒混和します。
- 2 1,000 rpmで1分間遠心します。
- 3 PRM、PLM2、およびPAMを氷の上に置きます。
- 4 PPM、PDR、HP11、およびHP12を室温で置いておきます。

シーケンス


はじめに	22
シーケンスワークフロー	23
ランパラメーターの入力	24
試薬のロードおよびプライム	27
シーケンスフローセルのロード	32
ランのモニタリング	35
試薬の取り外し	36
ウォーターウォッシュの実施	37
出力ドライブとスクラッチドライブのクイックフォーマット	38



はじめに

HiSeq Xでランを実行するには、すべての試薬を調製し、その後、ソフトウェアの指示に従ってランを設定します。ランセットアップのステップには、ランパラメータの入力、試薬のロードとプライミング、フローセルのロード、送液チェックの実施を含みます。

ランセットアップのステップは [Run Configuration]、[Pre-Run Setup]、[Initiate Run] の3つのタブに整理されています。

- ▶ [Run configuration] 画面には、ドロップダウンリスト、チェックボックス、またはランパラメーター用のテキストフィールドが含まれます。ハンディタイプのバーコードスキャナーを用いてフローセルまたは試薬キットIDをスキャンするか、タッチスクリーンキーボードを用いてIDを入力します。キーボードアイコンはテキストフィールドの右にあります。 
- ▶ [Next] を選択して次の画面に移動するか、[Back] を選択して前の画面に戻ります。
- ▶ ランセットアップのステップの間どの時点でも、[Cancel] を選択するとランセットアップを終了し、[Welcome] 画面に戻ります。

ランの期間やその他の性能仕様の情報については、イリミナウェブサイトのthe HiSeq X仕様ページを参照してください。

Staggering Runs(交互ラン)

隣接フローセルでランを実行中でも、フローセルAまたはフローセルBのどちらかで新規ランを開始できます。詳細については、「フローセルAとフローセルBでの交互ラン」(53ページ)を参照してください。

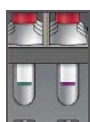
シーケンスワークフロー



ランのためのフローセルと試薬を調製します。



コントロールソフトウェアインターフェースのプロンプトを用いて、ランパラメーターを入力します。



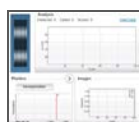
リード1とリード2のSBS試薬をロードします。必要に応じて、インデックスおよびペアエンド試薬をロードします。



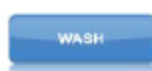
使用済みフローセルで、流れが適切かどうかを確認します。SBS試薬をプライムし、プライミング廃液を測定します。



クラスター形成したHiSeq Xフローセルをロードし、流れが適切かどうかを確認します。



シーケンスランを開始します。
(オプション) サイクル2の後、First Base Reportを確認し、その後、リード1を続行します。



ランが完了したら、試薬を取り外します。装置の洗浄を行います。

ランパラメーターの入力

[Run Configuration] タブ上の一連の画面からランパラメーターを入力してランセットアップを開始します。ソフトウェアは各画面を通して、BaseSpace Sequence Hubの接続性を特定するとき、消耗品のIDを入力するとき、インデックスオプションを選択するとき、ラン実行中に他のパラメーターを記録するときユーザーをガイドします。

[Storage]画面

- 1 [Welcome] 画面から、[Sequence] を選択し、[Storage] 画面を開きます。
- 2 (オプション) 以下のとおりBaseSpace Sequence Hubに接続します。
 - a [Connect to BaseSpace] を選択します。
 - b 以下のBaseSpaceオプションから選択してください：
 - ▶ [Storage and Analysis] : リモートモニタリングおよびデータ解析のためにランデータをBaseSpace Sequence Hubに送信します。このオプションにはサンプルシートが必要です。
 - ▶ [Run Monitoring Only] : InterOp ファイルのみをBaseSpace Sequence Hubに送信します。これによって、ランをリモートでモニタリングできるようになります。
 - c MylluminaメールアカウントおよびパスワードでBaseSpace Sequence Hubにログオンします。
- 3 [Browse] を選択し、希望する出力フォルダの場所に移動します。
- 4 サムネイル設定が [Save All Thumbnails] であることを確認します。ソフトウェアは自動ですべてのサムネイル画像を保存します。サムネイルは、タイルまたはスワスの各列にある多くのタイルからの画像のサンプリングであり、1つの画像に組み合わせられます。
- 5 [Next] を選択します。

[Flow Cell Setup]画面

[Flow Cell Setup] 画面は、ランに使用されるフローセルについての情報を記録します。すべてのフィールドが必須です。

- 1 シーケンスを行うフローセルをスキャンするか、またはフローセルID (バーコード番号) を入力します。
- 2 フローセルタイプが [HiSeq X] または [HiSeq XHD] であることを確認します。



注意

HiSeq XフローセルおよびHiSeq XHDフローセルを、フローセルAおよびフローセルBとして同時にシーケンスできます。

- 3 実験名を入力し各画面に表示して、設定中のランを特定し易くします
- 4 ユーザー名を入力します。
- 5 [Next] を選択します。

[Advanced]画面

- 1 (オプション) **[Confirm First Base]** チェックボックスを選択します。
First Base Reportがサイクル2の後にランごとに自動作成され、ランフォルダの直下に置かれます。このオプションを選択することでランを進める前にFirst Base Reportを確認できるようになります。選択しない場合には、確認ダイアログボックスが表示されることなくランは継続されます。
- 2 (オプション) フローセル画像から、ランから取り除きたいレーンを選択します。
デフォルトではすべてのレーンが含まれます。すべてのレーンに対してPhiXアライメントを自動的に行います。



注意
専用コントロールレーンは必要ないか、またはオプションです。

- 3 **[Next]** を選択します。

[Recipe]画面

[Recipe] 画面で入力された情報からレシピが自動的に作成されます。

- 1 インデックスタイプのオプションを選択します。
 - ▶ **[No Index]** : インデックス付けなしペアエンドランを行います。
 - ▶ **[Single Index]** : 8bpインデックスリードでペアエンドランを行います。
- 2 リード1とリード2の、そして該当する場合はインデックスリードのサイクル数を入力します。
- 3 以下の設定を確認し、選択したインデックスタイプに応じて自動追加されます：
 - ▶ **[SBS: HiSeq X SBS]** : リード1とリード2に使用されるSBSの化学反応を表示します。
 - ▶ **[Index: HiSeq X Sequencing Primer]** : 該当する場合は、インデックスリードに使用される化学反応を表示します。
 - ▶ **[PE turnaround: HiSeq X PE]** : ペアエンド再合成に使用される化学反応を表示します。

[Sample Sheet]画面


BaseSpace Sequence Hubを使用してデータ解析を行う場合を除き、サンプルシートはオプションです。

- 1 **[Browse]** を選択し、サンプルシートを探します。
- 2 **[Next]** を選択します。

[Reagents]画面

[Reagents] 画面は、ランに使用される試薬キットについての情報を記録します。

- 1 [SBS Reagent Kit ID] フィールドで、以下のSBSキットボックスからいずれかの試薬キットバーコードIDをスキャンするか、または入力します：
 - ▶ **[Single-pack kit]** : SBSキットボックス1または2
 - ▶ **[10-pack kit]** : SBSキットボックスA~F
- 2 [PE Reagent Kit ID] フィールドで、以下のPEクラスターキットボックスからのペアエンド試薬キットバーコードIDをスキャンするか、または入力します：
 - ▶ **[Single-pack kit]** : PEクラスターキットボックス2
 - ▶ **[10-pack kit]** : PEクラスターキットボックスC
- 3 **[300 Cycles]** を選択します。残りのサイクルはデフォルトで310サイクルになります。



注意
ソフトウェアが、[Cycles Remaining] フィールドから入力されたサイクル数をカウントダウンします。サイクル数が少なくなると、新しい試薬をロードするようにソフトウェアが促します。
- 4 **[Prime SBS Reagents]** を選択すると、試薬をプライムします。
クラスター形成したフローセルをロードする前には、必ず試薬をプライムします。
- 5 **[Next]** を選択します。

[Review]画面

- 1 [Review] 画面でランパラメーターを確認します。
- 2 **[Next]** を選択して続行するか、または **[Back]** を選択してパラメーターを変更します。

試薬のロードおよびプライム

ランパラメーターを入力した後、ラン用のSBS、インデックス、およびペアエンド試薬をロードし、その後、流路システムを通じて試薬をプライムします。[Pre-Run Setup] タブにある一連の画面のこれらのステップを通じて、ソフトウェアが案内します。

SBS試薬をロード

- 1 各ボトルを転倒混和します。



警告

他のすべての試薬をロードした後、PCMを最後に混合およびロードし、クロスコンタミネーションを防ぎます。手袋はその都度廃棄し、PCMを扱った後は、新しい手袋に取り替えます。

- 2 ファンネルキャップで各ボトルのキャップを取り替えます。
- 3 試薬コンパートメントドアを開けます。
- 4 SBS試薬ラック用シッパーを以下のとおり引き上げます。
 - a シッパーハンドルを手前へ引っ張り、その後、シッパーハンドルを上げます。
 - b 溝の上端の-slot内 でハンドルを放します。ハンドルがスロット内でしっかりと静止するようにします。
- 5 ラックハンドルを使用して、試液ラックを試薬コンパートメントからスライドして取り出します。
- 6 各ボトルを、対応する番号付けされた位置で、ラックに置きます。ボトルの円錐形の端がラックの土台にあるくぼみに置かれていることを確かめます。

表1 SBS試薬の位置

位置	試薬	内容説明
1	PIM	Patterned Incorporation Mix
2	PW1	25 mLのPW1またはラボラトリグレード水
3	PSM	Patterned Scan Mix
4	PB1	Patterned SBS Buffer 1
5	PB2	Patterned SBS Buffer 2
6	PB2	Patterned SBS Buffer 2
7	PCM	Patterned Cleavage Mix
8	PB2	Patterned SBS Buffer 2

- 7 新しいパウダーフリーラテックス手袋をつけます。
- 8 試薬コンパートメントの床にある高くなったガイドにラックを合わせながら試薬コンパートメントに試薬ラックを滑り込ませます。
- 9 以下のようにSBS試薬ボトルの中にシッパーを下げます。
 - a シッパーハンドルを手前へ引っ張り、その後、シッパーハンドルを下げます。
 - b シッパーを確認し、ファンネルキャップの中に下りて行くにしたがって折れていないかを確認します。
 - c 溝の下端の-slot内 でハンドルを放します。

インデックスおよびペアエンド試薬のロード

- 1 ペアエンド試薬ラック用シッパを以下のとおり引き上げます。
 - a ハンドルを手前へ引っ張り、引き上げます。
 - b 溝の上端のロット内でハンドルを放します。ハンドルがロット内でしっかりと静止するようにします。
- 2 ラックハンドルを使用して、試薬ラックを試薬コンパートメントからスライドして取り出します。
- 3 10 mLのPW1またはラボラトリーグレード水で満たした15 mLコニカルチューブをペアエンドラックのポジション12、18および19にロードします。
- 4 試薬チューブのキャップを取り外し、各チューブを、対応する番号付けされた位置または一致するラベルの色で、ラックに置きます。

表2 ペアエンド試薬の位置

位置	試薬	内容説明
10	PRM	Patterned Resynthesis Mix
11	PLM2	Patterned Linearization Mix 2
12	PW1	10 mLのPW1またはラボラトリーグレード水
13	PAM	Patterned Amplification Mix
14	PPM	Patterned Amplification Premix
15	PDR	Patterned Denaturation Mix (ホルムアミドを含む)
16	HP11	プライマーミックス、リード2
17	HP12*	プライマーミックス、インデックス1リード
18	PW1	10 mLのPW1またはラボラトリーグレード水
19	PW1	10 mLのPW1またはラボラトリーグレード水

*HP12はインデックスランのみに必要とされます。HP12を使用しない場合、10 mL PW1またはラボラトリーグレード水で満たされた15 mLコニカルチューブを装填します。

- 5 試薬コンパートメントの床にある高くなったガイドにラックを合わせながら試薬コンパートメントに試薬ラックを滑り込ませます。
- 6 以下のようにペアエンド試薬チューブの中にシッパを下げます。
 - a ハンドルを手前へ引っ張り、下げます。
 - b シッパを確認し、チューブの中に下りて行くにしたがって折れていないかを確認します。
 - c 溝の下端のロット内でハンドルを放します。
- 7 [PW1 (25 mL) loaded in Position 2] のチェックボックスを選択し、続いて [Next] を選択します。

試薬のプライム

試薬のプライミングのステップには、プライムフローセルのロード、流れが適切かどうかの確認、そしてその後のプライムの開始が含まれます。



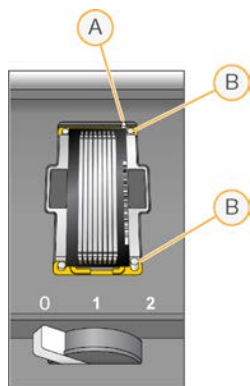
警告

試薬をプライムする際、常時使用済みフローセルを使用します。後のランでの試薬のプライムまたはラン後の洗浄に、前のランのフローセルを使用することができます。

プライミングフローセルのロード

- 1 プライミングフローセルをスキャンするか、またはID（バーコード番号）を入力します。
- 2 ラボラトリグレード水でプライミングフローセルを洗います。レンズクリーニング紙またはリントフリー紙で乾かします。
- 3 アルコールワイプまたはレンズクリーニング紙できれいにします。
- 4 インレットポートとアウトレットポートが下を向き、右側にバーコードがある状態でフローセルホルダーの上に置きます。流れの方向を示すフローセルの左端にある矢印が装置の方を指していることを確認します。
- 5 上と右のガイドピンの方へ止まるまでフローセルを優しく滑り込ませます。

図7 上と右のガイドピンに対して位置を合わせたフローセル



- A 上のガイドピン
- B 右のガイドピン

- 6 フローセルから手を離し、アライメントのずれを防ぎます。
- 7 フローセルレバーをポジション1にゆっくりと移動させ、バキュームを作動させ、フローセルを確保します。
フローセルレバーが緑色に点滅している時は、バキュームが作動しています。レバーが緑色ではない場合、「ランセットアップ時に起こりうる問題」（49ページ）を参照してください。
- 8 約5秒間待ち、その後、フローセルレバーをポジション2にゆっくりと移動させます。
フローセルレバーが緑色に点灯している時は、マニフォールドが所定の位置にあり、フローセルの準備が整っています。
- 9 **[Vacuum Engaged]** チェックボックスを選択していることを確認し、続いて **[Next]** を選択します。

流れが適切かどうかの確認

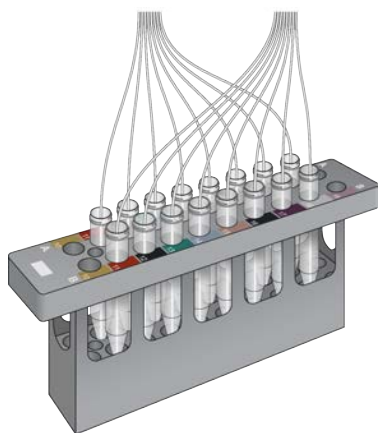
フローセルとガスケットが適切に設置され、マニフォールドが噛み合っていることを確認するため、流れが適切かどうかを判断します。

- 1 ドロップダウンリストからポジション2を選択します。
- 2 以下のデフォルト値を確認します：
 - ▶ 容量：125
 - ▶ 吸引速度：250
 - ▶ 分注速度：2,000
- 3 [Pump] を選択します。
- 4 気泡がレーンを通過しているか、またマニフォールドの近くに漏れがないかについてフローセルを検査します。
- 5 過剰な気泡がある場合、以下のとおり実行します。
 - a ガスケットに障害物がないかを確認します。
 - b 吸引速度を100に落とします。
 - c 再度125 μ Lの水をフローセルに送液します。
 - d 問題が継続する場合、フローセルを取り外し、洗浄ステップを繰り返し、フローセルをリロードします。

チューブの位置合わせとプライムの開始

- 1 廃液容器から各フローセル用の廃液チューブを取り外します。

図8 チューブの位置合わせ



- 2 個別の空の15 mLチューブの中に各チューブを入れます。
- 3 **[Start Prime]** を選択します。プライミング画面でプライミングの進行をモニタリングします。
- 4 プライミングが完了したら、廃液を測定し、各チューブの容量が**1.75 mL**であることを確認します。各フローセルに対してボトル1本でプライミング量を収集する場合、量が**14 mL**であることを確認します。
 以下のように量を計算します：
 - ▶ ポジション2を除いて各SBSポジションに対して250 μ L (250 \times 7=1.75 mL)
 - ▶ 各レーンに対して1.75 mL (1.75 \times 8=14 mL)
- 5 廃液容器に廃液チューブを戻します。
- 6 **[Next]** を選択します。

シーケンスフローセルのロード

シーケンス用にクラスター形成したフローセルをロードするためのステップには、プライミングフローセルの取り出し、フローセルホルダーの清掃、クラスター形成したフローセルのロード、適正なフローの確認が含まれます。

使用済みフローセルの取り外し

- 1 フローセルレバーをポジション1にゆっくりと動かして、マニフォールドを解除します。
- 2 フローセルレバーをポジション0にゆっくりと動かして、バキュームシールを引き離し、フローセルを解放します。
- 3 フローセルホルダーから使用済みフローセルを持ち上げます。

フローセルホルダーの洗浄

- 1 新しいパウダーフリーラテックス手袋をつけます。
- 2 ラボラトリーグレード水で湿らせたリントフリー紙を用いて、フローセルホルダーの表面を拭き、塩分を取り除きます。
- 3 エタノールまたはイソプロパノールで湿らせたアルコールワイプまたはリントフリー紙を用いて、フローセルホルダーの表面を拭きます。バキュームホールの中またはマニフォールドの周辺にアルコールが滴り落ちないようにしてください。
- 4 必要に応じて、ラボ用リントフリー紙でステージを乾かします。
- 5 フローセルホルダーを検査して、細かいごみ、バキュームホールに障害物がないことを確認します。

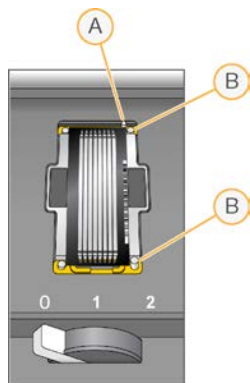
図9 バキュームホールを点検



シーケンスフローセルのロード

- 1 インレットポートとアウトレットポートが下を向き、右側にバーコードがある状態でフローセルホルダーの上にフローセルを置きます。流れの方向を示すフローセルの左端にある矢印が装置の方を指していることを確認します。
- 2 上と右のガイドピンの方へ止まるまでフローセルを優しく滑り込ませます。

図10 上と右のガイドピンに対して位置を合わせたフローセル



A 上のガイドピン
B 右のガイドピン

- 3 フローセルから手を離し、時間と共に起こるアライメントのずれを防ぎます。
- 4 フローセルレバーをポジション1にゆっくりと移動させ、バキュームを作動させ、フローセルを確保します。
フローセルレバーが緑色に点滅している時は、バキュームが作動しています。レバーが緑色ではない場合、「ランセットアップ時に起こりうる問題」(49ページ)を参照してください。
- 5 約5秒間待ち、その後、フローセルレバーをポジション2にゆっくりと移動させます。
フローセルレバーが緑色に点灯している時は、マニフォールドが所定の位置にあり、フローセルを使用する準備が整っています。
- 6 [Vacuum Engaged] チェックボックスを選択していることを確認し、続いて [Next] を選択します。

流れが適切かどうかの確認

フローセルとガスケットが適切に設置され、マニフォールドが噛み合っていることを確認するため、流れが適切かどうかを判断します。

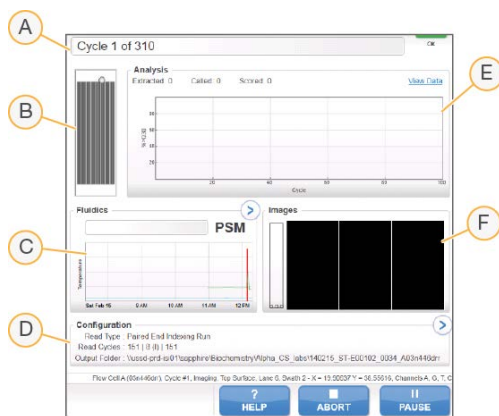
- 1 ドロップダウンリストからポジション5を選択します。
- 2 以下の値を入力します：
 - ▶ 容量：250
 - ▶ 吸引速度：250
 - ▶ 分注速度：2,000
- 3 [Pump] を選択します。
- 4 気泡がレーンを通過しているか、あるいはマニフォールドの近くに漏れがないかについてフローセルを検査します。
- 5 過剰な気泡がある場合、以下のとおり実行します。
 - a マニフォールドガスケットに障害物がないかを確認します。
 - b ポジション5の消耗を避けるため、ポジション6を用いてこのプロセスを繰り返します。
 - c 吸引速度を100に落とします。
 - d 再度250 μ Lをフローセルに送液します。
- 6 [Next] を選択します。

- 7 フローセルレバーが緑色であることを確認し、フローセルコンパートメントのドアを閉めます。
- 8 [Vacuum Engaged] と [Door Closed] チェックボックスが選択されていることを確認し、その後、[Next] を選択します。
- 9 [Start] を選択し、シーケンスランを開始します。

ランのモニタリング

- 1 [Run Overview] 画面からランのメトリクスをモニタリングします。

図11 [Run Overview] 画面



- A [Progress bar] : 完了したサイクル数をモニタリングします。
- B [Flow cell image] : どのレーンを画像化したかをモニタリングします。
- C [Fluidics graph] : 送液セクションを拡大し、化学反応ステップをモニタリングします。
- D [Run Configuration] : 現在のランのパラメーターを確認します。
- E [Analysis graph] : サイクルごとのクオリティスコアをモニタリングします。
- F [Images graph] : サイクルごとの強度をモニタリングします。スキャンされた各スワスに対して、1つのサムネイル画像が表示されます。ソフトウェアインターフェースには他の画面は表示されません。

First Base Report

ランセットアップ中に [confirm first base] を選択した場合、2番目のサイクルのイメージングが完了した後、[first base confirmation] ダイアログボックスが自動的に開きます。このステップでランは一時停止します。

- 1 [confirmation] ダイアログボックスでFirst Base Reportを確認します。
- 2 満足する結果の場合、[Continue] を選択します。

ランメトリクスの表示

ランメトリクスが入手できる場合、Sequencing Analysis Viewer (SAV) が自動的に開き、ランメトリクスを表示します。メトリクスはプロット、グラフ、および表の形式で表示されます。詳細については、『Sequencing Analysis Viewer User Guide』（文書番号：15051736）を参照してください。

- 1 更新したメトリクスを表示するには、ラン中の任意のタイミングで [Refresh] を選択します。

試薬の取り外し

- 1 ランが完了したら、試薬コンパートメントドアを開けます。
- 2 以下のとおり、該当するSBSラック用およびペアエンドラック用のシッパーを引き上げます。
 - a シッパーハンドルを外側へ引っ張ります。
 - b シッパーハンドルを外側へ引っ張りながら、引き上げます。
 - c 溝の上端のロット内でシッパーハンドルを放します。シッパーハンドルがロット内でしっかりと静止するようにします。
- 3 ラックハンドルを用いて、試薬コンパートメントから各試薬ラックを引き出します。
- 4 各試薬ラックから各ボトルを取り出します。



警告

この試薬のセットには、生殖毒性がある可能性の高い脂肪酸アミドであるホルムアミドが含まれています。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。目を保護するもの、手袋、ラボ用衣服など、保護服を着用してください。化学廃棄物などの使用済み試薬を処理および廃棄する際には、各地域の法令で定められた安全基準に従ってください。環境、健康、安全性に関する情報については、support.illumina.com/sds.htmlにある本キットのSDSを参照してください。

ウォーターウォッシュの実施

ウォーターウォッシュは、システムの洗浄と送液チェックのためシーケンスランごとに必要とされます。メンテナンスウォッシュはラン後の洗浄として、任意選択（推奨）できます。手順については、「メンテナンスウォッシュの実施」（41ページ）を参照してください。

1日以上の間、装置が待機状態であった後には、新しいシーケンスランを開始する前にウォーターウォッシュを行います。

- 1 [Welcome] 画面から、[Wash|Water] を選択します。
- 2 [Yes] を選択し、ペアエンド試薬位置を洗浄します。次に [Next] を選択します。
- 3 ラボラトリーグレード水で装置をロードします。
 - a SBSボトル8本に250 mLのラボラトリーグレード水を充填します。
 - b PEチューブ10本に12 mLのラボラトリーグレード水を充填します。



注意

洗浄ボトルとチューブは通常6カ月ごとに交換しますが、洗浄水はおおむね毎週交換します。

- 4 使用済みフローセルを必ずロードするようにします。必要に応じて、使用済みフローセルをロードします。
- 5 [Next] を選択します。
- 6 送液チェックを行います：
 - a ドロップダウンリストから溶液2を選択します。デフォルトのポンプ値を使用します。
 - b [Pump] を選択します。
 - c 気泡がレーンを通過しているか、またマニフォールドの近くに漏れがないかについてフローセルを検査します。
- 7 廃液容器から該当するフローセル用の廃液チューブを取り外します。
- 8 パラフィルムで廃液チューブを束ねます。すべての末端がそろうようにします。
- 9 束ねたチューブ末端を250 mLボトルの中に入れます。
- 10 [Next] を選択し、ウォーターウォッシュを開始します。

位置	実行時間（概算）
8箇所のSBS位置	20分
8箇所のSBS位置と10箇所のペアエンド位置	60分

- 11 洗浄が完了したら、送液量を測定します。

位置	総送液量	レーンあたりの送液量
8箇所のSBS位置	32 mL	4 mL
8箇所のSBS位置と10箇所のペアエンド位置	72 mL	9 mL

- 12 廃液チューブの束を解き、廃液ボトルにチューブを戻します。

出力ドライブとスクラッチドライブのクイックフォーマット

データ転送が完了した後は、出力ドライブ (O:\) とスクラッチ (S:\) ドライブのクイックフォーマットを実施します。クイックフォーマットは、重要なシステムまたは装置のメンテナンスファイルを削除せずに、次のランのためにドライブを消去します。

〔デュアルフローセル〕 ランのためには、ランを開始する前に最低2TBが必要になります。ラン中にディスク領域が安全な閾値を下回った場合、ソフトウェアはランを一時停止し、フローセルを安全な状態に置きます。ディスク領域を使用できるようにした後、ランが自動的に再開します。



注意

装置メンテナンスログはC:\ドライブに保存されます。そのため、装置洗浄を行っている間にO:\ドライブとS:\ドライブのクイックフォーマットを行うことは安全です。

- 1 Windowsから [Computer] を開き、コンピューター上のドライブのリストを表示します。
- 2 O:\ドライブを右クリックし、[Format] を選択します。
- 3 [Format] ダイアログボックスから、[Quick Format] チェックボックスを選択します。
- 4 [Start] を選択します。
- 5 上記1～4を繰り返してS:\ドライブを消去します。

メンテナンス

はじめに	40
メンテナンスウォッシュの実施	41
装置の待機	44
装置のシャットダウン	45



はじめに

メンテナンス作業は、継続した装置の性能を保証します。

- ▶ 使用していない期間は、装置をシャットダウンまたは待機状態にします。
- ▶ 送液を維持するため、定期的なメンテナンスウォッシュでランの終了時に実施されるウォーターウォッシュを追加します。

定期的な装置の洗浄は、流路システムの洗浄、塩分の集積の防止、試薬のクロスコンタミネーションの防止により装置の性能を維持します。

予防メンテナンス

イルミナでは、予防メンテナンスサービスを毎年行うことを推奨しています。保守契約を締結されていない場合、営業担当またはイルミナテクニカルサポートに問い合わせ、予防メンテナンスサービスを手配してください。

メンテナンスウォッシュの実施

10日ごとまたはラン実施後にソフトウェアが要求したとき、メンテナンスウォッシュがウォーターウォッシュのために任意選択するとき（推奨）メンテナンスウォッシュを実施します。メンテナンスウォッシュに要する時間は約90分で、Tween 20およびProClin 300でシステムを洗浄します。

メンテナンスウォッシュ前に [Load Gasket] 画面が開く場合、洗浄を続ける前に前方マニフォールドと後方マニフォールドのガスケットを交換します。

メンテナンスウォッシュ溶液の調製

1つの装置で使用するメンテナンスウォッシュ溶液5リットルを調製します。溶液は室温で最大30日間保存が可能で、この期間に3回までで使い切ります。地域の政府が定める安全基準に従って洗浄溶液を廃棄します。

SeqClin洗浄溶液は、メーカーの取扱説明書通りに希釈して調製します。SeqClinをご使用ではない場合、以下の説明にしたがい、Tween 20とProClin 300を希釈してメンテナンスウォッシュ溶液を調製します。

- 1 水を最初に加え、以下の容量を合わせてTween 20を希釈します。
 - ▶ ラボラトリーグレード水（225 mL）
 - ▶ Tween 20（25 mL）これらの容量では約10%のTween 20が得られます。
- 2 少なくとも6リットル用の空のガラスビンに攪拌子を入れます。
- 3 水を最初に加え、ガラスビンの中に以下の容量を合わせます。
 - ▶ ラボラトリーグレード水（750 mL）
 - ▶ 10% Tween 20（250 mL）
 - ▶ ProClin 300（1.5 mL）これらの容量では約2.5%のTween 20および0.15%のProClin 300の溶液が得られます。
- 4 攪拌プレートの上で十分に混ぜ合わせます。
- 5 4リットルのラボラトリーグレード水を加えます。
これらの容量では約0.5%のTween 20および0.03%のProClin 300の溶液が得られます。
- 6 十分に混ざるまで攪拌を続けます。
- 7 室温で密閉した容器の中に置きます。

Tween 20およびProClin 300での洗浄

- 1 [Welcome] 画面から、[Wash|Maintenance] を選択します。
- 2 新しいメンテナンスウォッシュ溶液を使用する場合、以下のとおり溶液で装置をロードしてください。
 - a SBSボトル8本に250 mLの新しい洗浄溶液を装填します。
 - b PEチューブ10本に12 mLの新しい洗浄溶液を装填します。
 - c 試薬ラックに各ボトルとチューブを配置します。その後の各洗浄にはこれらの配置を維持して、シッパーにある試薬によるクロスコンタミネーションを防ぎます。
- 3 前回のランからメンテナンスウォッシュ溶液を保存する場合は、以下の手順に従って装置にロードしてください。
 - a 保存した溶液を補充し、転倒混和します。最初に使用した後は、2回以上転倒混和しないでください。
 - b 配置した試薬ラックの位置に、ボトルとチューブをロードします。

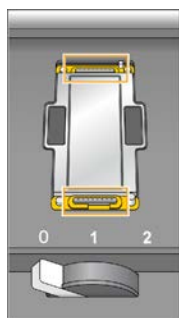


注意

通常、洗浄ボトルとチューブは毎月交換すれば十分です。

- 4 廃液ボトルを空にします。
- 5 [Next] を選択します。
- 6 フローセルステージからフローセルを取り外し、フローセルを脇に置きます。
- 7 新しいパウダーフリーラテックス手袋をつけます。
- 8 前方ガasketの片方のサイドが持ち上がるまで、もう片方のサイドを軽く押します。ピンセットを用いてガasketをつまみ、取り外します。同様にして後部のガasketを取り外します。

図12 使用済みマニフォールドガasketを取り外す



- 9 フローセルホルダーの前端と後端にある各溝に新しいガasketを置きます。その位置に軽く押し込みます。
- 10 新しいガasketを取り付けるために取り外したフローセルを再びロードします。
- 11 [Vacuum Engaged] チェックボックスを選択していることを確認し、続いて [Next] を選択します。
- 12 デフォルトのポンプ値を使用して送液チェックを実施します：
 - a ドロップダウンリストから溶液2を選択します。
 - b [Pump] を選択します。

- c 気泡がレーンを通過しているか、またマニフォールドの近くに漏れがないかについてフローセルを検査します。
- d 気泡が一定に流れているのを確認した場合、ガスケットを置き換え、送液チェックを繰り返します。

- 13 廃液容器から該当するフローセル用の廃液チューブを取り外します。
- 14 パラフィルムで廃液チューブ8本を束ねます。チューブを水平に保ちます。
- 15 束ねたチューブ末端を250 mLボトルの中に入れます。
- 16 **[Next]** を選択し、洗浄を開始します。
- 17 洗浄が完了したら、**[Return to Start]** を選択します。
- 18 送液量を測定します。

位置	送液量
8箇所のSBS位置	74 mL
10箇所のペアエンド位置	52 mL
すべての位置	レーン当たり15.75 mL



注意

すべてのボトルとチューブが容量を満たし、シッパーが洗浄されたことを確認します。しかし、各位置によって送液量は異なるため、洗浄が完了したとき、ボトルとチューブに入っている容量は違います。

- 19 廃液チューブの束を解き、廃液容器にチューブを戻します。

装置の待機

以下の方法を用いて、最長10日間、装置を待機状態にする準備をします。10日以上期間がある場合、代わりに装置をシャットダウンしてください。

- 1 メンテナンスウォッシュを完全に行い、システムを洗い流します。
- 2 フローセルレバーのポジション2で、フローセルをフローセルステージ上に置いておきます。マニフォールドを高い位置に置いておきます。
- 3 ラボラトリーグレード水10 mLを試薬ラックの各位置にロードし、次にシッパを下げます。
- 4 装置を再び使用する前に、ウォーターウォッシュを行います。

装置のシャットダウン

以下の手順を用いて、送液を安全に準備してシステムをシャットダウンします。今後10日以上の間を使用する予定がない場合に限り、装置をシャットダウンします。今後10日以内に装置を使用する予定がある場合は、代わりに装置を待機します。

- 1 メンテナンスウォッシュを完全に行い、システムを洗い流します。
- 2 フローセルステージからフローセルを取り外します。
- 3 エタノールまたはイソプロパノールで湿らせたアルコールワイプまたはリントフリー紙を用いて、フローセルホルダーの表面を拭きます。



警告

バキュームホールの中またはマニフォールドの周辺にアルコールが滴り落ちないようにしてください。必要に応じて、ラボ用リントフリー紙を使用してステージを乾かします。

- 4 ラボラトリーグレード水10 mLを試薬ラックの各位置にロードし、次にシッパーを下げます。
- 5 装置の電源を切ります。
- 6 装置を再起動するために：
 - a すべての試薬の位置に水をロードします。
 - b 装置の電源を入れます。
 - c ウォーターウォッシュを実施します。

トラブルシューティング

ログファイル	48
ランセットアップ時に起こりうる問題	49
送液チェックの実施	50
HiSeq Xでのランの一時停止または終了	51
フローセルAとフローセルBでの交互ラン	53
実行可能なリード1プライマーリハイブリダイゼーション	54



ログファイル

ログファイルは、コントロールソフトウェアで生じたエラーを一覧表示します。トラブルシューティングの目的でこのファイルを使用します。

- 1 [Welcome] 画面から、[Menu|Tools|Show Log] を選択します。

ランセットアップ時に起こりうる問題

問題	考えられる原因	措置
ソフトウェアが初期化しない。	ソフトウェアが内部ハードウェアデバイスを初期化できなかった。	エラーメッセージを閉じ、装置ソフトウェアを再起動する。 問題が継続する場合、装置のコンピューターを再起動する。コンピューターを再起動する場合、まず装置をシャットダウンし、DoNotEjectドライブが正しく認識されるようにする。 装置のコンピューターを再起動した後も問題が継続する場合、装置をシャットダウンし、60秒以上待ち、その後、装置を再起動する。
フローセルレバーがオレンジ色である。	フローセルが正しく取り付けられていない。 バキュームが密着されない。 マニフォールドが上がらない。	フローセルを取り外し、洗浄ステップを繰り返す。 ガスケットがあり、正しく取り付けられていることを確認する。 フローセルをリロードする。 前述の手順で問題解決しない場合、ガスケットの交換を試み、その後、フローセルをリロードする。
フローセルレバーがオレンジ色に点滅している。	バキュームが提供されているが、十分ではない。	フローセルを取り外し、洗浄ステップを繰り返す。 ガスケットがあり、正しく取り付けられていることを確認する。 フローセルをリロードする。 前述の手順で問題解決しない場合、ガスケットの交換を試み、その後、フローセルをリロードする。
フローセルレバーが緑色に点滅している。	バキュームプレッシャーが良好である。	フローセルレバーをポジション2に切り替える。
廃液量が少ない。	システム内に気泡がある可能性がある。	フローセルの位置を合わせ直し、穴が下を向いていることを確認する。 ガスケット周辺に白色の沈殿物がないかどうかを調べる。沈殿物がある場合、ガスケットを交換する。装置のメンテナンスウォッシュ前に必ずガスケットを交換する。 シッパーアセンブリが十分に下がっていて、各シッパーが試薬と接触していることを確認する。

送液チェックの実施

装置の設置中と、送液の問題のトラブルシューティングの場合、送液チェックを行います。

- 1 [Welcome] 画面の [Check] を選択します。
- 2 プライミングフローセルをスキャンするか、または洗浄フローセルID (バーコード番号) を入力します。このステップでは、使用済みフローセルを使用していることを確認します。
- 3 装置に使用済みフローセルをロードします。
- 4 PW1またはラボラトリーグレード水をSBSボトル8本に満たし、SBS試薬ラックにボトルをロードします。
- 5 ドロップダウンリストから溶液2を選択します。
- 6 以下のデフォルト値を確認します：
 - ▶ 容量：250
 - ▶ 吸引速度：250
 - ▶ 分注速度：2,000
- 7 [Pump] を選択します。
- 8 気泡がレーンを通過しているか、またマニフォールドの近くに漏れがないかについてフローセルを検査します。
- 9 過剰な気泡がある場合、マニフォールドガスケットに障害物がないかを確認し、吸引速度を100に落とし、再度250 μ Lの水をフローセルに送液します。

HiSeq Xでのランの一時停止または終了

ランを終了させると、データを保存する、またはランを再開するオプションは利用できません。ランを一時停止すると、ランコンポーネントを確認するか、または隣接するフローセルでのランを設定する必要がある場合があります。

ランの一時停止

必要に応じて、ランを一時停止し、試薬の容量などランのコンポーネントを確認します。通常の操作では、ランを一時停止する必要はありません。

RTA2は、一時停止したランが再開した後、自動的に再開するため、データを失うことなくランを再開できます。詳細については、「Real-Time Analysis」(55ページ)を参照してください。

- 1 [Run Overview] 画面から [Pause|Normal Pause] を選択します。
- 2 [Yes] を選択し、コマンドを確認します。
ソフトウェアが現在のケミストリーまたはイメージングコマンドを完了し、フローセルを安全な状態に置きます。
- 3 [Resume] を選択すると、ランを再開します。

ラン中の試薬の交換

不十分な量の試薬でランを開始した場合、[Change Reagents] 機能を使用してランを一時停止し、試薬を補充します。



注意
プライミングは必要ありません。

- 1 [Run Overview] 画面から [Pause] を選択し、一時停止メニューを開きます。
- 2 [Change Reagents] を選択します。
- 3 [Yes] を選択し、一時停止コマンドを確認します。
ソフトウェアが現在の化学反応またはイメージングコマンドを完了し、フローセルを安全な状態に置き、[Reagents] 画面を開きます。
- 4 以下のパラメーターを入力します：
 - ▶ 新しい試薬の試薬キットID。
 - ▶ 試薬が続けて使用できると予想されるサイクル数。
- 5 [Next] を選択し、試薬のロードに進みます。

ランの終了

RTA2を終了すると、ソフトウェアは処理を再開せず、ランデータが保存されません。そのため、ランを停止した後にランの再開はできません。



警告

HiSeq Xでランを終了することが最終事項となります。

- 1 ランを終了するには、[Abort] を選択します。コマンドを確定するかまたはキャンセルします。
- 2 コマンドを確定すると、[Welcome] 画面が表示されます。
- 3 ポストランの手順に進みます。



注意

リード1の間にランが停止された場合、cBotでプライマーリハイブリダイゼーションを行うことができます。プライマーリハイブリダイゼーションの後、HiSeq Xで新規ランを開始し、フローセルをシーケンスします。

フローセルAとフローセルBでの交互ラン

- 1 [Pause| NormalPause] を選択します。
- 2 ソフトウェアが現在の反応ステップまたは画像ステップを完了するまで待ちます。システムは自動的に安全な状態に置かれます。
- 3 ランが一時停止されることを確認します。ランが一時停止したら、[Resume] ボタンが現れます。
- 4 新しいランをセットアップします。
- 5 新規ラン用に新しいフローセルをロードした後、コンパートメントのドアを閉じます。
- 6 [Start] を選択し、新しいランを開始します。
- 7 隣接するフローセル上に、[Resume] を選択すると、一時停止したランを再開します。ソフトウェアが両方のフローセルでの化学反応とイメージングプロセスを自動的に制御します。

実行可能なリード1プライマーリハイブリダイゼーション

リード1ランメトリクスでクラスター数が少ない、蛍光強度が弱い、あるいは他の懸念事項が示された場合、フローセルを再利用するためにリード1プライマーリハイブリダイゼーションを行います。リード1プライマーリハイブリダイゼーションはcBotで行われ、フローセル上のクラスターには損傷を与えません。

HiSeq Xパターン化フローセルでのリード1プライマーリハイブリダイゼーションには、以下のイルミナの消耗品が必要です：

- ▶ HiSeq X HD cBot Multi-Primer Rehybridization Kit（カタログ番号：GD-305-1001）
- ▶ HiSeq cBot Manifold（カタログ番号：SY-401-2015）

詳細については、『Read 1 Primer Rehyb on a HiSeq X Flow Cell』（文書番号：15053711）を参照してください。

Real-Time Analysis

Real Time Analysis概要	56
Real-Time Analysisワークフロー	58



Real Time Analysis概要

HiSeq XはRTA2というReal Time Analysisソフトウェアを使用します。RTA2は装置のコンピュータ上で実行し、画像から蛍光強度を抽出し、ベースコーリングを行い、クオリティスコアをベースコールに割り当てます。RTA2とコントロールソフトウェアがウェブHTTPインターフェースを通じて通信し、メモリーファイルを共有します。RTA2を終了すると、処理が再開されず、ランデータは保存されません。



注意

デマルチプレックス性能は計算されないため、Sequencing Analysis Viewer (SAV) のインデックスタブは追加されません。

入力ファイル

RTA2には、以下の入力ファイルが必要です。

- ▶ ローカルシステムメモリに含まれるタイル画像。
- ▶ RunInfo.xml。ランの開始時にコントロールソフトウェアがこのファイルを自動的に作成します。このファイルから、RTA2はラン名、サイクル数、リードにインデックスを付けるかどうか、そしてフローセル上のタイル数を読み取ります。
- ▶ RTA.exe.config。このファイルはXML形式のソフトウェア構成ファイルです。

RTA2は、RunInfo.xmlファイルの場所とオプション出力フォルダが指定されているかについての情報を含むコントロールソフトウェアからのコマンドを受け取ります。

出力ファイル

各チャンネルの画像は、タイルとしてRTA2にメモリで渡されます。これらの画像から、RTA2が一組のクオリティスコアベースコールファイルとフィルターファイルとして一次出力を作成します。他のファイルは一次出力ファイルの作成を支援します。

- ▶ **ベースコールファイル**：分析される各タイルに関して、サイクルあたりの各タイルに対して1つの圧縮されたベースコール (*.bcl) ファイルが作成されます。ベースコールファイルにはベースコールと関連するクオリティスコアが含まれます。
- ▶ **フィルターファイル**：各タイルから、各タイルについてラン全体にわたる1つのフィルター (*.filter) ファイルに格納されたフィルター情報が生成されます。フィルターファイルは、クラスターがフィルターを通過するかを指定します。
- ▶ **クラスターロケーションファイル**：1つのクラスターロケーション (s.locs) ファイルは、フローセル上のすべてのクラスターのX、Y座標を含みます。

一次出力ファイルは、その後のデータ解析に使用されます。デマルチプレックスとFASTQ変換のために、bcl2fastq変換ソフトウェアを使用します。HiSeq Xからのデータを変換するには、bcl2fastq v2.14.03.07以降を使用します。最新のソフトウェアバージョンとダウンロード情報は、イルミナウェブサイトのHiSeq Xサポートページを参照してください。

RTA2は、InterOpファイルとして保存されるランクオリティのリアルタイムメトリクスを提供します。InterOpファイルは、タイル、サイクル、およびリードレベルメトリクスを含むバイナリファイルで、Sequencing Analysis Viewerでメトリクスを表示するのに必要とされます。RTA2で生成されたメトリクスを表示するには、SAV v1.8.37以降を使用します。

各出力ファイルについての詳細は、「シーケンス出力ファイル」(64ページ)を参照してください。

エラー処理

RTA2はログファイルを生成し、それらをRTALogsフォルダに書き込みます。エラーは*.tsvファイルフォーマットでエラーファイルに記録されます。

処理終了時に、以下のログファイルおよびエラーファイルが最終出力先に転送されます。

- ▶ *GlobalLog*.tsvには重要なランイベントが要約されています。
- ▶ *LaneNLog*.tsvには各レーンの処理イベントが一覧表示されます。
- ▶ *Error*.tsvにはラン中に起こったエラーが一覧表示されます。
- ▶ *WarningLog*.tsvにはラン中に起こった警告が一覧表示されます。

データ転送

ラン実行中、RTA2は、指定した出力フォルダの場所への転送を管理するソフトウェアであるRun Copy Serviceからデータ転送を要求します。BaseSpace Sequence Hubを使用する場合、BaseSpace BrokerがBaseSpace Sequence Hubへのデータの転送を管理します。ネットワーク接続が中断されても、RTA2は処理を続け、ローカルにデータを書き込みます。接続が修復されると、データ転送を再開します。

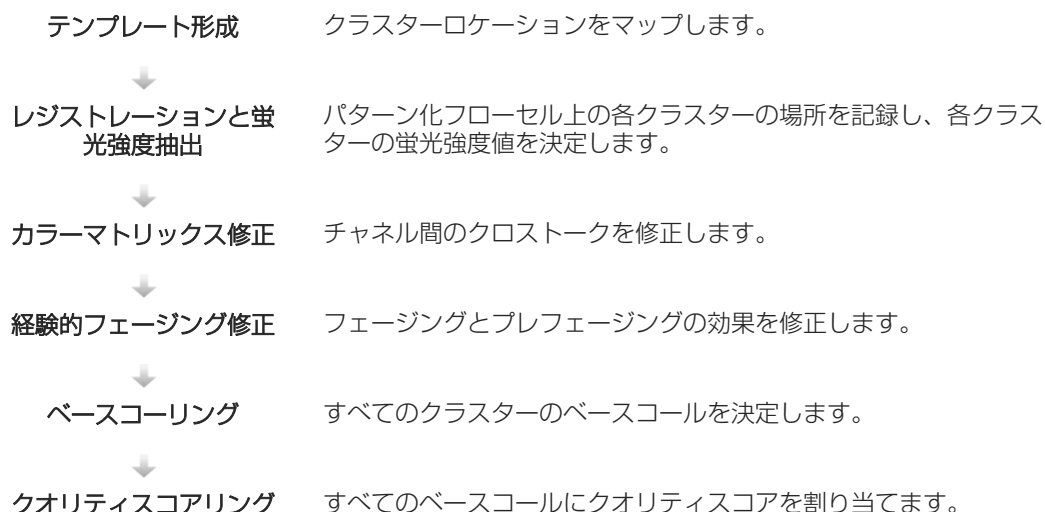


注意

ネットワーク接続がランデータのBaseSpace Sequence Hubへの送信に関する最低要件を満たしていることを確認します。詳細については、『lab setup and site prep guide』を参照してください。

処理が完了した後、RTA2はRTAComplete.txtというマーカーファイルを作成します。このファイルを作成した後にデータ転送が完了します。スクリーンの下部にあるセンサーインジケータは転送ステータスを示します。詳細については、「アクティビティおよびセンサーインジケータ」(7ページ)。

Real-Time Analysisワークフロー



テンプレート形成

テンプレート形成は、XとY座標を用いてタイルでの各クラスターの位置を定義します。このテンプレートは次のステップのレジストレーションと蛍光強度抽出の参照に使用されます。

パターン化フローセル上の配置により、フローセル上の行の数、列の数、およびナノウェル間の距離に従ってクラスター位置が事前に決定されます。詳細については、「パターン化フローセル」(9ページ)を参照してください。

ラン全体に関する1つのクラスターロケーション (s.locs) ファイルにクラスター位置が書き込まれます。

レジストレーションと蛍光強度抽出

クラスター位置のテンプレートが作成された後、レジストレーションと蛍光強度抽出が始まります。

- ▶ レジストレーションでは、クラスターのテンプレートの位置を4色チャンネルのそれぞれの画像上の場所に変換します。
- ▶ 蛍光強度抽出では、所定の画像に対するテンプレートの各クラスター蛍光強度値を測定します。

サイクル中のいずれかの画像に対してレジストレーションを失敗した場合、そのサイクルのそのタイルに対してベースコールは作成されません。SAVを使用して、サムネイル画像を確認し、レジストレーションに失敗した画像を指定します。

カラーマトリックス修正

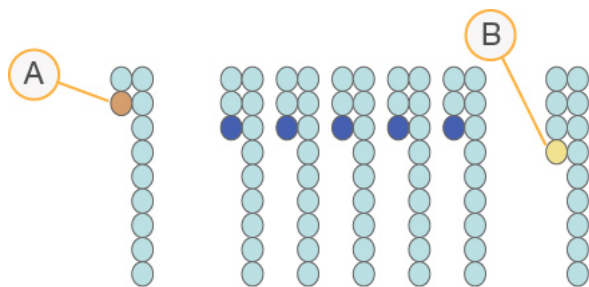
レジストレーションと蛍光強度抽出の後、RTA2はチャンネル間のクロストークを補正します。例えば、クラスターがCチャンネルに蛍光強度を示し、同時にAチャンネルでもある程度の蛍光強度を示す場合にクロストークが起こります。4x4のカラーマトリックスを用いて、RTA2はクロストークが軽減、またはクロストークがないマトリックスで修正された蛍光強度を生成し、カラーチャンネル間の全体的な蛍光強度の差のバランスを取ります。

経験的フェージング修正

シーケンス反応中、クラスター内の各DNA鎖はサイクルあたり1塩基伸長します。現在のインコーポレーションサイクルとDNA鎖の位相がずれると、フェージングとプレフェージングが起きます。

- ▶ 塩基が遅れを取るとフェージングが起きます。
- ▶ 塩基が先へ進むとプレフェージングが起きます。

図13 フェージングとプレフェージング



- A フェージングしている塩基があるリード
- B プレフェージングしている塩基があるリード

RTA2は、経験的フェージング修正アルゴリズムを用いてフェージングとプレフェージングの効果を修正します。これにより、ラン全体を通じたすべてのサイクルでのデータ品質を最大限に引き上げます。

ベースコーリング

未処理の蛍光強度が、クロストーク、フェージング、プレフェージングを修正した後、最も輝度の高い強度を持つ色素チャンネルがそのサイクルのそのクラスターに対するベースコールです。サイクル3の後に、RTA2を用いたHiSeq Xでのベースコーリングを開始します。

ベースコーリングは、特定サイクルの所定のタイルのすべてのクラスターに関して塩基 (A、C、G、またはT) を決定します。ベースコールはベースコール (*.bcl) ファイルに保存されます。このファイルはコールとクオリティスコアあたり1バイトのバイナリファイルです。各ベースコールファイルにはベースコールとベースコールのクオリティスコアが含まれます。ベースコールを作るために、クラスターはChastityフィルターを先ず通過する必要があります。画像がない、またはイメージ登録に失敗したためにフィルターを通過しなかった、またはベースコールが実行されなかったクラスターはNo-callとラベルが付けられます。コールなしは (N) と表されます。

フィルターを通過するクラスター

リード1の最初の25回のサイクルの間、Chastityフィルターが解析結果からクオリティの低いクラスターを取り除きます。最初の25回のサイクルで0.6を下回るChastity値のベースコールが1つ以下の場合、クラスターはフィルターを通過します。Chastityは、最も輝度の高い塩基蛍光強度を、最も輝度の高い塩基と2番目に輝度の高い塩基の蛍光強度の合計で割った割合として定義されます。フィルターを通過するクラスターの比率は%PFとして解析レポートに表されます。

HiSeq Xのパターン化フローセルはクラスターの整列した配列を有します。クラスターのない空のウェルと複数シーケンスが存在するポリクローマルウェルも未処理クラスター数に含まれますが、フィルターを通過しません。そのため、整列した配列を持つパターン化フローセル上では、比較的低い割合のフィルターを通過するクラスターを生じます。

図14 空のウェルとポリクロナルウェル（未処理クラスター数に含まれる）

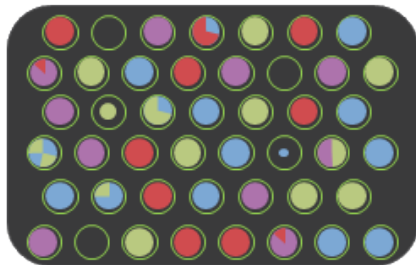
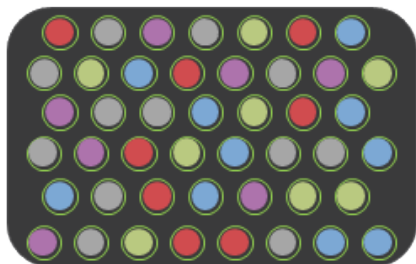


図15 非PFクラスターを含むウェル（グレーで表示）



クオリティスコアリング

クオリティスコア、またはQスコアは不正確なベースコールの確度の予測値です。高いQスコアは、ベースコールの品質が高く、正しい可能性が高いことを示しています。

Qスコアは、エラーの起こり易さを低くするコンパクトな方法として機能します。Xがスコアの場合、クオリティスコアはQ (X) として表されます。以下の表に、クオリティスコアとエラーの起こり易さの関連性を示します。

QスコアQ (X)	エラーの起こり易さ
Q40	0.0001 (10,000分の1)
Q30	0.001 (1,000分の1)
Q20	0.01 (100分の1)
Q10	0.1 (10分の1)



注意

クオリティスコアリングはPhredアルゴリズムの修正版に基づきます。

クオリティスコアリングは各ベースコールに対する予測一式を計算した後、予測値を使用して、クオリティテーブルで対応するQスコアを検索します。クオリティテーブルは、特定の構成のシーケンスプラットフォームと化学反応のバージョンで作成されるランに対する最適に正確なクオリティ予測を行うために作成されます。

Qスコアを決定した後、base call (*.bcl) ファイルに結果が記録されます。

Qスコアビンニング

RTA2はクオリティスコアを特定の範囲またはビンで分け、値を各範囲に割り当てます。Qスコアビンニングは、下流のアプリケーションの精度や性能に影響を与えずに記憶領域の要件を大幅に減らします。

Qスコアビンニングは、HiSeq Xの高スループットに関連した解析プロセスの効率とデータ転送の要件に寄与します。圧縮アルゴリズムによってファイルをより効率的に圧縮できるため、結果として生じる*.bclファイルはより小さくなります。ファイルのコピーをより速く行いながら、より少ないデータが装置のコンピューターに書き込まれ、ネットワークロケーションに転送されます。

出力ファイルとフォルダ

シーケンス出力ファイル	64
出力フォルダの構成	65
タイル番号付け	66




シーケンス出力ファイル

ファイルタイプ	ファイルの説明、場所、名前
ベースコールファイル	<p>解析される各タイルは、ベースコールと符号化したクオリティスコアを含むベースコールファイルに含まれます。</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]：ファイルはレーン毎、サイクル毎のフォルダに保存されます。</p> <p>s_[Lane]_[Tile].bcl.gz、ここで、レーンは1桁のレーン番号で、タイルは4桁のタイル番号です。ベースコールファイルは、gzip圧縮形式で圧縮されています。</p>
クラスターロケーションファイル	<p>各タイルに対して、1つのクラスターロケーションファイルがすべてのクラスターのXY座標を格納しています。クラスターロケーションファイルはテンプレート形成の結果です。</p> <p>Data\Intensities：ランに対して1つのファイルがIntensitiesフォルダに保存されます。</p> <p>s.locs</p>
フィルターファイル	<p>フィルターファイルは、クラスターがフィルターを通過するかを指定します。25サイクル目までデータを用いてサイクル26の時にフィルターファイルが作成されます。</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]：ファイルは、各レーンとタイル用の1つのフォルダに保存されます。</p> <p>s_[lane]_[tile].filter</p>
InterOpファイル	<p>Sequencing Analysis Viewerに使用されるバイナリレポートファイルです。ラン全体を通じてInterOpファイルが更新されます。</p> <p>InterOpフォルダ</p>
Real-Time Analysis構成ファイル	<p>ランの開始時に生成されるReal-Time Analysis構成ファイルはランの設定を一覧表示します。</p> <p>[ルートフォルダ]</p> <p>RTAConfiguration.xml</p>
ランの情報ファイル	<p>ラン名、各リードでのサイクル数、リードがインデックス付きリードであるか、そしてフローセル上のスワスとタイルの数を一覧表示します。ラン情報ファイルは、ランの開始時に生成されます。</p> <p>[ルートフォルダ]</p> <p>RunInfo.xml</p>
サムネイルファイル	<p>イメージング中のすべてのサイクルの各スワスでの各チャンネルとタイルのサムネイル画像です。</p> <p>Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]：ファイルは各レーン毎の1つのフォルダと各サイクル用の1つのサブフォルダに保存されます。</p> <p>s_[lane]_[tile]_[channel].jpg：タイルは、表面、スワス、およびタイルを示す4桁の数字で表されます。「タイル番号付け」(66ページ)を参照してください。</p>

タイル番号付け

HiSeq Xパターン化フローセルは、各サイクルで各レーン、top、およびbottomの96個のタイルで画像が取得されます。各8レーンは、スワス当たり24個のタイルで2本のスワスがあります。タイルは位置に従って番号が付けられます。

 **注意**
スワスは、フローセルのレーン内のタイルの列です。

タイル名は、フローセル上の位置を表す4桁の番号です。

- ▶ 最初の桁は表面を表します：
 - ▶ 1はTop
 - ▶ 2はBottom
- ▶ 2番目の桁はスワスを表します：
 - ▶ 1は最初のスワス
 - ▶ 2は2番目のスワス
- ▶ 最後の2桁は01～24までのタイルを表します。タイル番号付けはフローセルの一番端の出口の01で始まり、一番端の入口の24までです。

図16 タイル番号付け



上の例は、フローセルのTop面、2番目のスワス、そして7番目のタイルを表します。

索引

%

PF 59

1

1回目の塩基取り込み 34

B

BaseSpace Broker 57

BaseSpace Enterprise 13

BaseSpace Sequence Hub

アイコン 8

サンプルシート 25

データ転送 57

統合 2

ドメイン設定 13

ランを接続 24

bcl2fastq, バージョン 56

C

chastityフィルター 59

Clarity LIMS X Edition 2

F

FASTQ変換 56

first base report 24

H

HCS 6

エラーログ 48

ビューオプション 13

移動 22

開く 12

I

InterOpファイル 56, 62

L

LIMS

イルミナSeqLab 2

サーバー 13

設定 13

M

Menu Optionsウィンドウ 13

P

PE試薬の位置 28

PhiX

アライメント 25

コントロールレーン 25

PhiXへアライメント 25

PSM, 旋回パターン 19

Q

Qスコア 60

R

RTA 6

RTA2

ランの終了 51

終了 56

入力ファイル 56

Run Copy Service 7, 57

Run Copy Serviceアイコン 7

S

SAV 6

InterOpファイル 62

インデックスタブ 56

バージョン 56

文書 34

SBS試薬の位置 27

SeqClin、調製 41

U

USBケーブル, 接続 12

USBケーブル接続 12

あ

アイコン 6-7

データ転送ステータス 7

アプリケーション, 内蔵 6
 安全性 3

い

位置, 試薬

PE 28
 SBS 27

インデックス 28
 一時停止オプション 51, 53
 イルミナSeqLab 2-3
 色, ステータスバー 4
 インデックススキーム 25
 インデックスのオプション 25
 インデックス試薬の位置 28

う

ウォーターウォッシュ
 期間と頻度 36
 送液量 36

え

エラー 56
 エラーの起こり易さ 60
 エラーログ 48, 56

お

オレンジ色のフローセルレバー 49
 温度, 試薬チラー 5
 オンラインサポート 3

か

ガイドピン 29, 31
 化学反応ステップ, モニタリング 34
 化学反応設定 25
 ガスケット 41
 ガスケット,トラブルシューティング 49
 カスタマーサポート 69
 画像, 保存 24
 カタログ番号

イルミナリハイブキット 54
 イルミナ試薬キット 9
 マニフォールド 54
 ユーザーが用意する消耗品 16

き

キット, 試薬 9
 気泡 29, 32
 強度, モニタリング 34
 強度値 58

く

クオリティスコア 60
 Phredアルゴリズム 60
 モニタリング 34
 クラスタアレイ 59
 クラスタクオリティ 59
 クラスタの場所 58
 クラスタロケーション 9, 58
 クロスコンタミネーション, 防止 19, 41
 クロストーク 58

け

警告
 解決 7
 内容説明 6

こ

光学モジュール 4
 構成ファイル 62
 コールなし (N) 59
 コントロールレーン 25
 コンパートメント 4
 コンプライアンス 3

さ

サイクル数 25
 デフォルト 25
 サイト準備 3, 57

サポートページ	3	スワス	24, 64
サムネイル	24, 62	せ	
サムネイル画像の保存	24	性能仕様	22
サンプルシート, 要求	25	設置, 送液チェック	50
し		設定, ソフトウェア	13
シーケンス消耗品	9	旋回パターン	19
シーケンスステップ, 概要	23	センサー	7
RTA	58	センサーインジケーター	
実験名	24	BaseSpace Sequence Hub	8
試薬		Run Copy Service	7
SBS	19	洗浄	
インデックス	20	ウォーターvs.メンテナンス	40
調製	18	システムの要求	41
ペアエンド	20	システム要件	36
ラン当たりの数量	19-20	ベネフィット	40
ラン後の処理	35	メンテナンスウォッシュ溶液	41
ラン中の交換	51	そ	
試薬キット	9	送液	
試薬キットID, 記録	25	メンテナンス	36
試薬キットIDを記録	25	送液量	
試薬チラー, 温度	5	ウォーターウォッシュ	36
試薬の位置		プライミング	30
PE ラック	28	メンテナンスウォッシュ	43
SBSラック	27	装置の再起動	45
試薬ラック	5	装置の電源を入れる	12
出力ドライブ	37	ソフトウェア	
出力フォルダ		特徴	2
構成	63	トラブルシューティング	49
場所	13, 24	内蔵アプリケーション	6
仕様, 性能	22	ソフトウェアの初期化	12
消耗品		ソフトウェアの初期化, トラブルシューティン	
イルミナ	9	グ	49
ユーザーが用意するもの	16	た	
す		待機, 許容期間	44
水槽	19-20	タイル	56, 64
スクラッチドライブ	37		
ステータスバーの色	4		

て

- ディスク領域をクリア 37
- データ
 - イルミナへ送信 15
 - 圧縮 60
 - 変換 56
- データ消失 51, 56
- データ転送 37, 57
- データ転送ステータス
 - BaseSpace Sequence Hub 8
 - Run Copy Service 7
- テクニカルサポート 69
- デフォルトサイクル 25
- デフォルトのフォルダの場所 13
- デマルチプレックス 56
- テンポラリフォルダ 63

と

- ドメイン, 設定 13

な

- ナノウェル 9
- 名前付け
 - タイトル 64
 - ラン 24
 - ランフォルダ 13

ね

- ネットワーク接続 57
- 残りのサイクル 25

は

- バーコードスキャナー 22
- ハードウェアの特徴 2
- 廃液チューブ 30, 42
- バキュームシステム 4
- パターン化フローセル 2, 9, 58

ひ

- 必要なディスク領域 37

ふ

- ファイルの場所 62-63
- ファンネルキャップ 27
- フェージング 58
- フォルダの構成 63
- フォルダの場所 13, 63
- プライミングフローセル 28
- プライミング調製 30
- プライミング廃液 30
- プレフェージング 58
- フローセル
 - 位置 5, 29, 31
 - 画像 64
 - クラスターアレイ 58-59
 - 検査 29, 32
 - パターン化 9
 - プライミング 28
- フローセルID, 記録
- フローセルIDの記録 24
- フローセルの位置 29, 31
- フローセルレバー 4
 - オレンジ色 49
 - 点滅 49
- フローセルレバーの点滅 49
- フローセル側 5, 63
 - 文書 3, 69

へ

- ベースコールファイル 59
- ヘルプ
 - ヘルプ, 技術的 69
 - SAV 34
 - イルミナSeqLab 2-3
 - クラスター 18
 - プライマリーハイブ 54
 - 文書 3

変換データ 56

ほ

保管容量

最適化 60

ポストランウォッシュ 36

ポリクロナルウェル 59

ま

マーカーファイル 57

め

命名規則

ランフォルダ 13

メモリーファイル 56

メンテナンス, 予防 40

メンテナンスウォッシュ 41

送液量 43

頻度 41

溶液の再利用 41

メンテナンスウォッシュ溶液 41

メンテナンスウォッシュ溶液の再利用 41

メンテナンスウォッシュ溶液保存 41

漏れ 29, 32

よ

予定される容量

ブライミング 30

予定した容量

ウォーターウォッシュ 43

メンテナンスウォッシュ 43

予防メンテナンス 40

ら

ラック, 試薬 5

ラボセットアップ 3, 57

ランのパラメーター 34

ランの情報ファイル 62

ランパラメーター 56

ランパラメーター, 確認 26

ランフォルダ, 一時的 63

ランフォルダの場所 63

ラン中の試薬の交換 51

り

リード1トラブルシューティング 54

リード2再合成 20

リハイブリダイゼーション 52, 54

リモートモニタリング 24

流路システム 4

アクセッション 4

トラブルシューティング 49-50

利用可能なディスク領域 37

隣接するラン 53

れ

レーン

フローセル 25, 64

レジストレーション, トラブルシューティング 58

レシピ 25

レシピ作成 25

レポート, 1回目の塩基取り込み 34

ろ

ログファイル 62

テクニカルサポート

テクニカルサポートについては、イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。

表3 イルミナ一般問合せ先

ウェブサイト	jp.illumina.com
電子メール	techsupport@illumina.com

表4 イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	電話番号	地域	電話番号
北米	1.800.809.4566	台湾	00806651752
日本	0800.111.5011	中国	400.635.9898
アイルランド	1.800.812949	デンマーク	80882346
イタリア	800.874909	ドイツ	0800.180.8994
英国	0800.917.0041	ニュージーランド	0800.451.650
オーストラリア	1.800.775.688	ノルウェー	800.16836
オーストリア	0800.296575	フィンランド	0800.918363
オランダ	0800.0223859	フランス	0800.911850
シンガポール	1.800.579.2745	ベルギー	0800.81102
スイス	0800.563118	香港	800960230
スウェーデン	020790181	その他の国	+44.1799.534000
スペイン	900.812168		

製品安全データシート (SDS) : イルミナのウェブサイト jp.support.illumina.com/sds.html から入手できます。

製品関連文書 : イルミナのウェブサイトからPDF形式でダウンロードできます。
jp.support.illumina.com にアクセスして製品を選び、**[Documentation & Literature]** を選択します。

