



NextSeq 1000 and 2000

Sequencing System Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000109376 v05 JPN

2021 年 8 月

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。

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き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説明を熟読せず、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、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

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。

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

改訂履歴

文書番号	日付	変更内容
1000000109376 v05	2021 年 8 月	NextSeq 1000/2000 P1 reagent に関する情報を追加。 NextSeq 1000/2000 Control Software のバージョン 番号を v1.3 以降に更新。 ソフトウェアアップデートのインストール手順を更新 し、追加のステップを記載。 NextSeq 2000 P3 reagents の命名規則を整合性が取 れるように更新。 「ハードドライブスペースのクリア」のハードドライブ スペースに関する推奨事項を、最大限のスペースを使 用するように更新。 NextSeq 2000 P3 の 300 サイクルのカートリッジに ついてサイクル数を明記。
1000000109376 v04	2021 年 4 月	ベースラインファイルのインポート手順を追加。 DRAGEN DNA Amplicon ワークフローを追加。 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 の機能を 追加。 プロキシサーバーの選択に関する情報を追加。 RSB with Tween 20 の配送温度と保管温度を更新。 DRAGEN RNA ワークフローを更新し、遺伝子発現差 に関する情報を追加。 シーケンス出力フォルダーの構造を更新。 サンプルシート v2 形式に関する推奨事項を更新。
1000000109376 v03	2020 年 11 月	カタログ番号を修正。 新規ユーザーの追加に関する情報を追加。

文書番号	日付	変更内容
1000000109376 v02	2020 年 10 月	NextSeq 2000 P3 Reagents kit を追加。 DRAGEN Single Cell RNA ワークフローを追加。 DRAGEN Enrichment ワークフローを追加。 FASTQ 圧縮オプションを追加。 DRAGEN パイプラインのインストールとライセンスのアップデートの手順を追加。 カスタムリファレンスゲノムのインポート手順を追加。 ライブラリータイプのローディング量とローディング濃度を更新。 ライブラリーの希釈手順を更新。 試薬カートリッジの自動パージに関する手順を追加。 サポートされるサイクル数の情報を更新。 装置のカスタマイズオプションを更新。 Instrument Run Setup の手順を更新。 DRAGEN のシーケンス出力構造を更新。 DRAGEN QC レポートに関する情報を追加。 ハードドライブからのカスタムリファレンスゲノムの削除に関する情報を追加。 システムチェックの実行に関する情報を追加。 サンプルシート v2 の設定を更新。

文書番号	日付	変更内容
1000000109376 v01	2020 年 6 月	NextSeq 1000/2000 Control Software の説明を更新。 ガイド全体で、クラウド、ハイブリッド、ローカル、スタンドアロンの各モードの違いを明記。 カートリッジの保管方法と融解方法を更新。 サポートされるサイクル数の情報を更新。 二次解析のセットアップ手順を更新。 試薬キットのカタログ番号を更新。 シーケンスプロトコールのダイアグラムを更新。 ネットワークドライブをデフォルト出力フォルダーとして指定する手順を更新。 サポートされているライブラリータイプの表を更新。 カスタムリファレンスゲノムのインポート手順を追加。 カスタムインデックスキットとカスタムライブラリー調製キットを使用したランのセットアップ手順を追加。 ユーザーアカウント要件とパスワード要件を更新。 DRAGEN 出力フォルダーの構成に関する詳細情報を追加。 使用済み試薬のカートリッジからの排出方法を明記。 Q テーブルに関する背景情報を追加。 コントロールソフトウェアアップデートのインストールに関する手順を更新。 ランのリキュー方法についての説明を追加。 DRAGEN のパイプラインとライセンスのアップデートについての説明を追加。 装置のカスタマイズ手順を追加。 新しいラベルを反映するように図を更新。 ガイド全体でドアをバイザーに変更。 2 つのイーサネットポートの説明を追加。
1000000109376 v00	2020 年 3 月	初版リリース。

目次

システムの概要	1
追加リソース	1
装置のハードウェア	2
統合ソフトウェア	5
Process Management	6
シーケンスプロトコールのダイアグラム	7
シーケンスの仕組み	7
システム構成	9
ユーザアカウント要件	9
BaseSpace Sequence Hub および Proactive サポートの設定	11
デフォルト出力フォルダーの場所の指定	12
カスタムリファレンスゲノムのインポート	15
ノイズベースラインファイルのインポート	16
ランモードの設定	17
装置のカスタマイズ	18
消耗品および機器	20
シーケンス消耗品	20
補助的な消耗品	23
補助的な機器	25
プロトコール	26
シーケンスに関する考慮事項	26
BaseSpace Sequence Hub でのシーケンスランの計画	27
袋入りカートリッジの融解とフローセル	35
ライブラリーの希釈	37
消耗品のカートリッジへのロード	39
シーケンスランの開始	41
シーケンスの出力	52
Real-Time Analysis の概要	52
Real-Time Analysis のワークフロー	55
シーケンス出力ファイル	58
DRAGEN による二次解析の出力ファイル	59
DRAGEN による二次解析の出力フォルダーの構成	66

メンテナンス.....	70
ハードドライブスペースのクリア.....	70
ソフトウェアのアップデート	70
DRAGEN のワークフローおよびライセンスのアップデート.....	72
エアフィルターの交換	74
トラブルシューティング	76
エラーメッセージの解消.....	76
消耗品を保管庫に戻す	77
ランの取り消し	77
ランのリキュー	78
装置の再起動	78
システムチェックの実施.....	79
工場出荷時の設定に戻す	80
インストール済みイメージの取得.....	80
取得したイメージの回復.....	80
リソースおよび参考資料	81
サンプルシート v2 の設定.....	81
ダークサイクルシーケンス.....	92
索引	94
テクニカルサポート.....	98

システムの概要

Illumina® NextSeq™ 1000 システムおよび Illumina® NextSeq™ 2000 システムは、NGS¹ にターゲット化したアプローチを提供します。このアプリケーション集約型のシステムは、イルミナのシーケンステクノロジーをコスト効率の良いデスクトップ型装置として統合しており、次のような機能を備えています。

- アクセスのしやすさと高い信頼性：NextSeq 1000/2000 は、DRAGEN によるローカル解析と、装置上での変性および希釈機能を備えています。イメージングモジュールはシステムに搭載され、フルイディクスコンポーネントは消耗品に組み込まれているため、装置のメンテナンスが簡単です。
- 1 回のステップで消耗品をロード：使い捨てのカートリッジには、ランに必要なすべての試薬があらかじめ充填されています。ライブラリーとフローセルをカートリッジに直接ロードした後、カートリッジを装置にロードします。RFID が統合されており、正確な追跡が可能です。
- NextSeq 1000/2000 ソフトウェア：統合されたソフトウェアスイートが動作の制御やイメージの処理を行い、ベースコールを生成します。
 - クラウドモード：BaseSpace Sequence Hub 上の Instrument Run Setup を使用してランを計画します。選択した解析ワークフローは、クラウド内で自動的に開始されます。ランデータと解析結果もクラウドで提供されます。
 - ハイブリッドモード：BaseSpace Sequence Hub 上の Instrument Run Setup を使用してランを計画します。選択した解析ワークフローは、装置上の DRAGEN を介して開始されます。
 - ローカルモード：サンプルシート v2 ファイル形式を使用してローカルでランを計画します。選択した解析ワークフローは、装置上の DRAGEN を介して自動的に開始されます。
 - スタンドアロンモード：サンプルシートを使用せずにランを計画します。

このセクションでは、ハードウェア、ソフトウェア、データ解析に関する情報など、システムの概要について説明します。また、本文書全体で使用されている主要な概念と用語をまとめています。詳細な仕様、データシート、アプリケーション、関連製品については、イルミナウェブサイトの [NextSeq 1000/2000 システムサポートページ](#) を参照してください。

追加リソース

イルミナウェブサイトの [NextSeq 1000/2000 システムサポートページ](#) で追加のシステムリソースを提供しています。これらのリソースには、ソフトウェア、トレーニング、適合製品、および以下の添付資料を含みます。サポートページを定期的に確認して最新バージョンを入手してください。

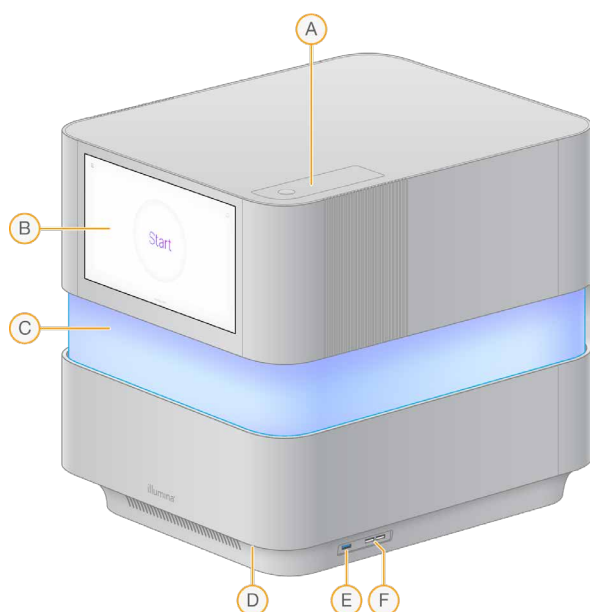
¹ 次世代シーケンス

リソース	内容説明
『Custom Protocol Selector』	ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーター、および解析方法と、詳細な設定を調整するためのオプション。
『NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems Safety and Compliance Guide』 (文書番号：1000000111928)	操作の安全性検討事項、コンプライアンスステートメント、装置のラベルに関する情報を提供します。
『RFID Reader Module Compliance Guide』 (文書番号：1000000002699)	装置の RFID リーダー、コンプライアンス認証、安全検討事項に関する情報を提供します。
『NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide』 (文書番号：1000000139235)	調製済みライブラリーをシーケンスランのために手動で変性させて希釈する手順と、オプションの PhiX コントロールを調製する手順について説明します。
『NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide』 (文書番号：1000000139569)	イルミナシーケンスプライマーをカスタムシーケンスプライマーに置き換えるための情報を提供します。
『NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing System Guide』 (文書番号：1000000109376)	装置のコンポーネントの概要、装置の操作方法、メンテナンスとトラブルシューティングの手順について説明します。
『NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing System Site Prep Guide』 (文書番号：1000000109378)	ラボスペースに関する仕様、電源要件、および環境とネットワークの検討事項を示しています。
BaseSpace ヘルプ (help.basespace.illumina.com)	BaseSpace™ Sequence Hub と使用可能な解析オプションの使用に関する情報を提供します。
『Index Adapters Pooling Guide』 (文書番号：1000000041074)	プーリングガイドラインとデュアルインデックスの方法について説明しています。
『Illumina Adapter Sequences』 (文書番号：1000000002694)	イルミナライブラリー調製キットのアダプターシーケンスの一覧表を提供します。

装置のハードウェア

NextSeq 1000/2000 システムは、電源ボタン、モニター、ステータスバー、消耗品コンパートメント、USB ポートから構成されています。

図 1 外部システムコンポーネント



- A. エアフィルターコンパートメント：交換可能なエアフィルターにアクセスできます。
- B. タッチスクリーンモニター：コントロールソフトウェアインターフェースから装置の設定およびセットアップができます。
- C. ステータスバー：ワークフローの進捗状況に合わせて光の色が変化します。青と紫は双方向性（ブレンチェックなど）を示し、マルチカラーは注意を要する事象やデータがあること（シーケンスの完了など）を示します。重大なエラーは赤い光で示します。
- D. 電源ボタン：装置の電源を制御します。システムがオンの場合は点灯、オフの場合は消灯し、システムはオフであるが電源トグルスイッチがオンになっている場合は点滅します。
- E. USB 3.0 ポート：データ転送用の外部ポータブルドライブを接続します。
- F. USB 2.0 ポート：マウスとキーボードを接続します。

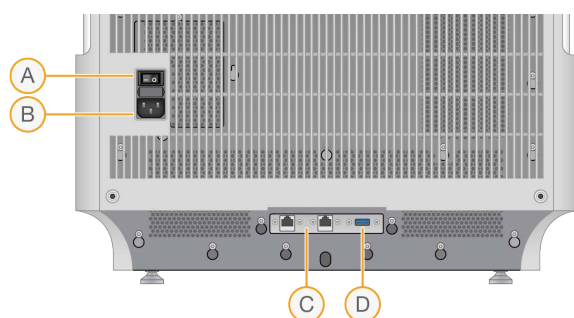
電源と補助装置の接続

装置をゆっくりと動かすことで、装置の背面にある電源スイッチ、USB ポート、その他の補助装置の接続部にアクセスできます。

装置の背面には、電源コードの差込口（インレット）、装置への電力供給を制御するスイッチ、オプションのイーサネット接続用のイーサネットポート（2 つ）があります。USB 3.0 ポートには、必要に応じてデータ転送用の外部ポータブルドライブを接続できます（この Linux ベースのプラットフォームでは、exFAT はサポートされていません）。

NextSeq 1000/2000 システムにはイーサネットポートが 2 つ搭載されており、システムの機能と柔軟性が向上します。例えば、一方のイーサネットポートを内部ネットワークドライブとの通信に使用し、もう一方を BaseSpace Sequence Hub や Proactive サポートなどの外部通信に使用できます。

図 2 背面パネルコンポーネント

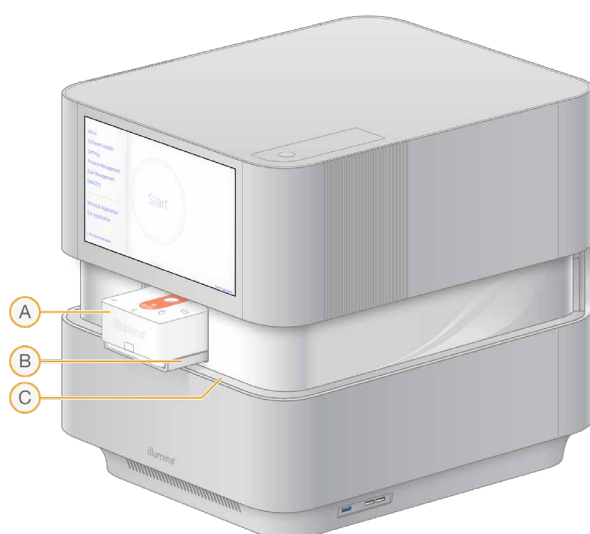


- A. トグルスイッチ：装置への電力供給をオンまたはオフにします。
- B. 電源インレット：電源コードを接続します。
- C. イーサネットポート（2 つ）：オプションのイーサネットケーブルを接続します。
- D. USB 3.0 ポート：データ転送用の外部ハードドライブを接続します。

消耗品コンパートメント

消耗品コンパートメントには、シーケンスランを実行するときにはフローセルと希釈済みライブラリーを含むカートリッジが収納されます。

図 3 ロードした消耗品コンパートメント



- A. カートリッジ：フローセル、ライブラリー、試薬が含まれており、ラン中に使用済み試薬を回収します。
- B. トレイ：シーケンス中にカートリッジを保持します。
- C. バイザー：消耗品コンパートメントにアクセスするときに開きます。

統合ソフトウェア

システムソフトウェアスイートには、シーケンスランおよび解析を実行するアプリケーションが統合されています。

- NextSeq 1000/2000 Control Software：装置の動作を制御し、システムの設定、シーケンスランのセットアップ、シーケンス進行中のラン統計のモニタリングを行うためのインターフェースを提供します。
- Real-Time Analysis (RTA3)：ランの実行中にイメージ解析とベースコーリングを行います。詳細については、[52 ページの「シーケンスの出力」](#)を参照してください。
- Universal Copy Service：ランフォルダーにあるシーケンス出力ファイルを BaseSpace Sequence Hub（該当する場合）および出力フォルダーにコピーします。コピー先でこれらの出力ファイルにアクセスできます。

コントロールソフトウェアは、インタラクティブに操作できるだけでなく、自動バックグラウンドプロセスも実行します。Real-Time Analysis と Universal Copy Service は、バックグラウンドプロセスのみを実行します。

システム情報

左上にあるコントロールソフトウェアのメニューを選択し、[About] セクションを開きます。[About] セクションには、イルミナの問い合わせ情報と、以下のシステム情報が表示されます。

- 装置のシリアルナンバー
- コンピューター名
- システムスイートのバージョン
- イメージ OS のバージョン
- 総ラン数

注意事項およびアラート

注意事項アイコンは右上にあります。警告またはエラーが発生すると、画面の右側にパネルが現れて注意事項が表示されます。注意事項アイコンはいつでも選択できます。このアイコンを選択すると、現在の注意事項または注意事項の履歴のリストが表示され、警告とエラーを確認できます。

- 警告は注意する必要がありますが、ランを停止する必要はありません。確認以外の操作は不要です。
- エラーはランの開始前または進行中に対処する必要があります。

コントロールソフトウェアの最小化

他のアプリケーションにアクセスする際は、コントロールソフトウェアを最小化します。例えば、File Explorer を使用して出力フォルダーを見るときやサンプルシートを探すときに最小化します。

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Minimize Application] を選択します。
コントロールソフトウェアが最小化されます。
2. コントロールソフトウェアを最大化するには、ツールバーから [NextSeq 1000/2000 Control Software] を選択します。

Process Management

[Process Management] 画面には、`/usr/local/illumina/runs` に保存されている一時的なランが表示されます。各ランは、ランの日付、名前、ID で識別されます。ラン、二次解析、出力フォルダー、クラウドのステータスなどの情報も、ランごとに表示されます。ランを選択して、ワークフロー、% Q30 の平均値、PF 全リード、総収量などの詳細を見ることができます。ランを削除してスペースを空けるには、[70 ページの「ハードドライブスペースのクリア」](#)を参照してください。装置上の解析をリキューするには、[78 ページの「ランのリキュー」](#)を参照してください。

Status of Run

このセクションには、シーケンスランのステータスが表示されます。

- In Progress : シーケンスランが進行中です。
- Complete : シーケンスランが完了しました。
- Stopped : シーケンスランが停止しました。
- Errored : シーケンスランにエラーがあります。

Status of Secondary Analysis

このセクションには、装置に搭載されている DRAGEN による二次解析のステータスが表示されます。解析が BaseSpace Sequence Hub で行われている場合、ここには [N/A] と表示されます。

- Not Started : DRAGEN による解析はまだ開始されていません。
- In Progress : DRAGEN による解析が進行中です。
- Stopped : DRAGEN による解析が停止しました。
- Errored : DRAGEN による解析にエラーがあります。
- Complete : DRAGEN による解析が完了しました。

Status of Output Folder

このセクションには、出力フォルダーにコピーされるファイルのステータスが表示されます。

- In Progress : ファイルが出力フォルダーにコピーされています。
- Complete : ファイルが出力フォルダーに正常にコピーされました。

Status of Cloud (BaseSpace Sequence Hub)

このセクションには、クラウド経由で BaseSpace Sequence Hub にアップロードされるファイルのステータスが表示されます。

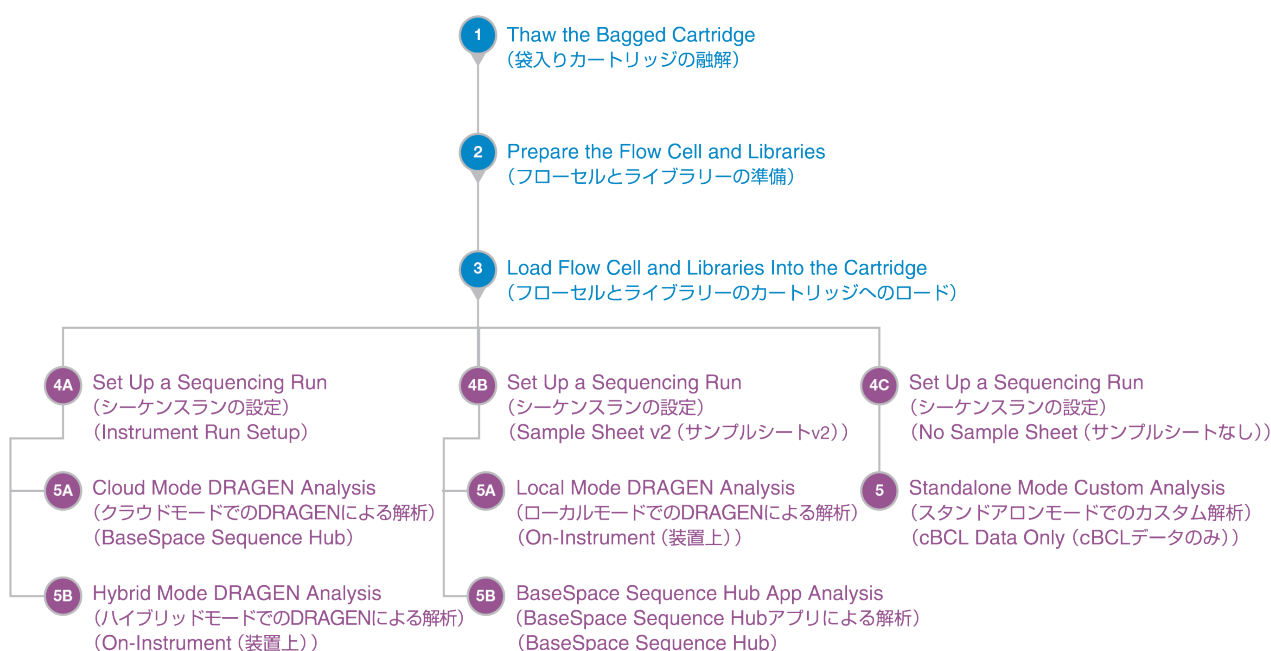
- In Progress : コントロールソフトウェアによってファイルが BaseSpace Sequence Hub にアップロードされています。
- Complete : ファイルが BaseSpace Sequence Hub に正常にアップロードされました。

ステータス問題のトラブルシューティング

- ランが進行中の場合は、いったん [Process Management] 画面を閉じ、5 分ほど待ってから再び画面を開きます。
- ランが進行中ではない場合は、装置を再起動した後、[Process Management] 画面を再び開きます。
78 ページの「装置の再起動」を参照してください。

シーケンスプロトコールのダイアグラム

次のダイアグラムは、NextSeq 1000/2000 を使用したシーケンスの手順を示します。



シーケンスの仕組み

NextSeq 1000/2000 システムでのシーケンスは、クラスター形成、シーケンス、解析のステップで構成されています。それぞれのステップはシーケンスランの実行中に自動的に行われます。システム設定によっては、ランの完了後に装置外で引き続き解析が実行されます。

クラスター形成

ライブラリー¹は装置上で自動的に一本鎖に変性され、さらに希釈されます。

クラスター形成中、単一の DNA 分子がフローセルの表面に結合し、増幅されてクラスター²を形成します。クラスター形成には約 4 時間かかります。

¹ シーケンス用にアダプターが付加された DNA または RNA 由来のサンプル。調製方法にはさまざまな種類があります。

² 1つのシーケンスリードを生成する、フローセル上の単一クローンの DNA 鎖のグループ。フローセル上の個々の DNA 鎖がテンプレートのシードとなり、これが増幅されて数百、数千のコピーから成るクラスターが形成されます。例えば、10,000のクラスターから成るフローセルは、10,000のシングルリード、または20,000のペアエンドリードを産出します。

シーケンス

クラスターは2色チャンネルケミストリー（緑色のチャンネルと青色のチャンネル）を使ってイメージングされ、4つのヌクレオチドのデータにエンコードされます。フローセル上の1つのタイルのイメージングが終了した後、次のタイルがイメージングされます。このプロセスがシーケンスサイクルごとに繰り返されます（1サイクルあたり約5分）。イメージ解析の後、Real-Time Analysis ソフトウェアがベースコーリング¹、フィルタリング、およびクオリティスコアリング²を行います。

一次解析

ランの実行中に、コントロールソフトウェアがデータ解析用のベースコールファイル³ (*.cbcl) を自動的に指定の出力フォルダーに転送します。シーケンスラン中に、Real Time Analysis (RTA3) ソフトウェアがイメージ解析、ベースコーリング、およびデマルチプレックス⁴を行います。シーケンスが完了すると、二次解析が開始されます。データの二次解析の方法は、選択したアプリケーションとシステム設定によって異なります。

二次解析

BaseSpace Sequence Hub は、ランモニタリング、データ解析、保管、共有を目的としたイルミナのクラウドコンピューティング環境です。DRAGEN と BaseSpace Sequence Hub アプリをホストし、シーケンスの一般的な解析方法をサポートします。

最初のシーケンス解析が完了すると、DRAGEN が使用可能ないずれかの解析パイプラインを使用して二次解析を実行します。

クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用する場合、DRAGEN は BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup からサンプルシート、リファレンスゲノム、ランの入力ファイルを取得します。クラウドモードの場合、cBCL データは BaseSpace Sequence Hub に自動的にアップロードされ、BaseSpace Sequence Hub が DRAGEN による二次解析を開始します。ハイブリッドモードの場合、DRAGEN による二次解析は装置上で行われ、出力ファイルは選択したフォルダーまたはクラウドに保存できます。

ローカルモードを使用する場合、DRAGEN は NextSeq 1000/2000 システムから提供されたサンプルシート、リファレンスゲノム、ランの入力ファイルを取得します。DRAGEN による二次解析は装置上で行われ、出力ファイルは選択した出力フォルダーに保存されます。[Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、シーケンス完了後に BaseSpace Sequence Hub アプリを介して解析を開始することもできます。

スタンドアロンモードを使用する場合は、サンプルシートを使用せずにランをセットアップします。このワークフローは、cBCL データから開始するカスタム解析ワークフローの場合に推奨されます。

- BaseSpace Sequence Hub の詳細については、『[BaseSpace Sequence Hub Online Help](#)』を参照してください。
- DRAGEN の詳細については、[DRAGEN Bio-IT Platform のサポートページ](#)を参照してください。
- すべてのアプリケーションの概要については、『[BaseSpace Apps](#)』を参照してください。

¹ 特定のサイクルにおいて、1つのタイル上にあるすべてのクラスターの塩基（A、C、G、T）を決定します。

² ベースコールごとにいくつかのクオリティ予測因子を計算し、その値を基に Q スコアを割り当てます。

³ 各シーケンスサイクルのすべてのクラスターのベースコールとその関連するクオリティスコアが含まれます。

⁴ プール内のライブラリーごとにリードを区別する解析プロセス。

システム構成

このセクションでは、ソフトウェア設定の説明など、システムのセットアップ手順について説明します。

これらの手順では、主にコントロールソフトウェアについて説明し、ネットワークとオペレーティングシステムの設定に関する情報も示します。

i | 装置で Google Chrome を使用すると、ログインキーリングのロック解除を求めるプロンプトが表示されますが、このプロンプトは無視してキャンセルしても問題ありません。

ユーザーアカウント要件

Linux オペレーティングシステムには、次の 3 つのアカウントがあります。

- root (スーパー管理者)
- ilmnadmin (管理者)
- ilmnuser (ユーザー)

管理者アカウントは、NextSeq 1000/2000 Control Software のアップデートなどのシステムアップデートを適用する場合、または IT 担当者が永続的ネットワークドライブをマウントする場合に使用することのみを目的とします。

シーケンスなど、その他すべての機能はユーザーアカウントから実行してください。

パスワード要件

装置の設置の完了後に、フィールドサービスエンジニアが 3 つすべてのアカウントのパスワード変更を開始します。180 日ごとにパスワードの更新を求めるメッセージが表示されるので、その都度各パスワードを変更してください。

表 1 デフォルト設定でのパスワードポリシー

ポリシー	設定
パスワード履歴の管理	5 個のパスワードを記憶
ロックアウトのしきい値	10 回の無効なログオン試行
最短パスワード長	10 文字
文字の種類の最小構成	数字、大文字、小文字、記号のうち、3 種類を使用
繰り返し可能な最大文字数	3 文字
パスワードの複雑性要件の遵守	無効
可逆的な暗号化を用いたパスワードの保管	無効

新規ユーザーの追加

1. ilmnadmin でログインします。
2. 電源ボタンを選択し、ilmnadmin ドロップダウンを開きます。
3. [Account Settings] を選択します。

4. [Unlock] を選択し、ilmnadmin のパスワードを入力します。
5. [Add User] を選択します。
6. [Standard] アカウントタイプを選択し、新規ユーザーのユーザー名を入力します。
7. [Set password now] を選択し、パスワードを入力します。
8. [Add] を選択します。
新規ユーザーがユーザーリストに追加されます。
9. 以下の手順に従って、新規ユーザーに NextSeq 1000/2000 Control Software に対するアクセス権を付与します。
 - a. ターミナルを開きます。
 - b. 次のように入力します。

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <新規ユーザー名>
```
 - c. プロンプトが表示された場合は、ilmnadmin のパスワードを入力します。
10. 以下の手順に従って、ユーザーのアクセス許可が正常に設定されたことを確認します。
 - a. 新規ユーザーのアカウントでログインします。
 - b. NextSeq 1000/2000 Control Software に移動します。
 - c. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
 - d. [Default Output Folder] で、出力フォルダーのパスを選択して保存できることを確認します。エラーが発生せずに出力フォルダーのパスを選択して保存できた場合、アクセス許可は正常に設定されています。

パスワードのリセット

このセクションでは、ilmnuser、ilmnadmin、または root のパスワードをリセットする方法について説明します。パスワードの回復はできません。間違ったパスワードで何度もログインに失敗すると、パスワードのリセットではアカウントのロックアウトを回避できなくなります。その場合、パスワードのリセットやログインの試行が可能になるまで、10 分ほど待つ必要があります。

ilmnuser のパスワードのリセット

ilmnadmin または root のパスワードを知っているユーザーは、ilmnuser のパスワードをリセットできます。

1. ilmnadmin でログインします。
2. ターミナルを開きます。
3. 「sudo passwd ilmnuser」と入力します。
4. プロンプトに対して ilmnadmin のパスワードを入力します。
5. プロンプトに対して ilmnuser の新しいパスワードを入力します。
6. パスワード確認のため、プロンプトに対して ilmnuser の新しいパスワードをもう一度入力します。

ilmnadmin のパスワードのリセット

root のパスワードを知っているユーザーは、ilmnadmin のパスワードをリセットできます。

1. root でログインします。
2. ターミナルを開きます。
3. ilmadmin のパスワードを変更する場合は「passwd ilmnadmin」と入力し、ilmnuser のパスワードを変更する場合は「passwd ilmnuser」と入力します。
4. プロンプトに対して新しいパスワードを入力します。
5. パスワード確認のため、プロンプトに対して新しいパスワードをもう一度入力します。

root のパスワードのリセット

root のパスワードをリセットするには、次のいずれかの方法を使用します。

- OS イメージを最後に取得した時点のパスワードを覚えている場合は、保存されているイメージに戻します。
- パスワードを覚えていない場合は、イルミナのテクニカルサポートに連絡してください。

BaseSpace Sequence Hub および Proactive サポートの設定

以下の手順に従って、BaseSpace Sequence Hub および Proactive サポートをシステムに設定します。BaseSpace Sequence Hub のアカウントをセットアップするには、『[BaseSpace Sequence Hub Online Help](#)』を参照してください。

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. [BaseSpace Sequence Hub and Proactive Support Settings] で、以下のいずれかのオプションを選択します。

オプション	説明および必要事項
Proactive Support Only*	迅速なトラブルシューティングが行えるように、装置性能データがイルミナに送信されます。インターネット接続が必要です。
Proactive and Run Monitoring	リモートランモニタリングのために、InterOp ファイルとログファイルを BaseSpace Sequence Hub に送信します。このオプションがデフォルト設定です。BaseSpace Sequence Hub アカウントとインターネット接続が必要になります。
Proactive, Run Monitoring and Storage	リモートモニタリングと解析のために、InterOp ファイル、ログファイル、ランデータを BaseSpace Sequence Hub に送信します。BaseSpace Sequence Hub アカウント、インターネット接続、サンプルシートが必要です。
None	ランを BaseSpace Sequence Hub アカウントから切り離し、Illumina Proactive サポートに装置性能データを送信しません。

* コントロールソフトウェアのバージョンによっては、上記のソフトウェアインターフェースの設定名は本ガイドに示された名前と異なる場合があります。

[None] 以外のオプションを選択すると、Proactive サポートが有効になります。この無料サービスを有効にすると、ユーザーが Myllumina カスタマーダッシュボードで性能データを確認できるほか、イルミナのサービスチームが問題のトラブルシューティングを迅速に行えるようになります。

- 1** | デフォルト設定では [Proactive and Run Monitoring] がオンになっています。このサービスを利用しない場合は、[None] を選択します。
3. ステップ 2 で [None] を選択した場合は、[Save] を選択して終了します。そうでない場合は、ステップ 6 に進みます。
4. [Hosting Location] リストから、データのアップロード先となる BaseSpace Sequence Hub サーバーの場所を選択します。
装置が設置されている地域または最も近い地域にある Hosting Location を使用してください。
5. 企業向けサブスクリプションに加入している場合は、BaseSpace Sequence Hub アカウントに使用するドメイン名 (URL) を入力します。
例 : <https://yourlab.basespace.illumina.com>
6. [Save] を選択します。

デフォルト出力フォルダーの場所の指定

このセクションの手順に従って、デフォルト出力フォルダーの場所を選択します。各ランの出力フォルダーは、ランセットアップ中に変更できます。この出力フォルダーには、cBCL ファイル¹ とその他のランデータが保存されます。

出力フォルダーは、BaseSpace Sequence Hub の設定で [Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合を除き、必須です。デフォルト出力フォルダーには、外部ドライブまたはネットワークドライブを使用してください。装置上のフォルダーを出力フォルダーとして使用すると、シーケンスランに悪影響が及びます。

外部ドライブを出力フォルダーに指定

以下の手順に従って、デフォルト出力フォルダーとして外部ポータブルドライブを選択します。NTFS 形式または GPT/EXTA 形式にフォーマットされた電源内蔵型のドライブを使用することを推奨します。

1. 装置の側面または背面にある USB 3.0 ポートを使用して、外部ポータブルドライブを接続します。外部ポータブルドライブへの書き込みが許可されていることを確認してください。読み取り専用で設定されているドライブにはデータを保存できません。
2. 外部ポータブルドライブに新しいフォルダーを作成します。このフォルダーが、デフォルト出力フォルダーの場所になります。
NextSeq 1000/2000 Control Software がこの場所を外部ポータブルドライブとして認識するためには、少なくとも 2 階層分ネストしたフォルダーが必要です。
3. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
4. [Default Output Folder] で既存のフォルダーのパスを選択し、外部ポータブルドライブの新しいフォルダーに変更します。

¹ 各シーケンスサイクルのすべてのクラスターのベースコールとその関連するクオリティスコアが含まれます。

5. (オプション) [Run Mode] で [Online Run Setup] を選択している場合、[Hosting Location] ドロップダウンメニューからオプションを選択します。
6. [Save] を選択します。

ネットワークドライブをデフォルトの出力フォルダーに指定

以下の手順に従って、永続的ネットワークドライブをマウントし、デフォルト出力フォルダーの場所として指定します。ネットワークドライブを NextSeq 1000/2000 に永続的にマウントする方法としてサポートされているのは、Server Message Block (SMB) /Common Internet File Systems (CIFS) と Network File System (NFS) のみです。

SMB/CIFS のマウント手順

1. NextSeq 1000/2000 Control Software が開いている場合は、[Minimize Application] を選択します。
2. ilmnadmin でログインします。
3. [Applications] を選択します。
4. [Favorites] で [Terminal] を選択します。
5. 「`sudo touch /root/.smbcreds`」と入力し、[Enter] を選択します。
6. パスワードの入力を求められたら、ilmnadmin のパスワードを入力します。
sudo コマンドを使用するたびに、ilmnadmin のパスワードの入力が必要になります。
7. 「`sudo gedit /root/.smbcreds`」と入力して [Enter] を選択し、smbcreds という名前のテキストファイルを開きます。
8. .smbcreds テキストファイルが開いたら、ネットワークログイン認証情報を次の形式で入力します。

```
username=<ユーザー名>
password=<パスワード>
domain=<ドメイン名>
```

ユーザー名、パスワード、およびドメインの認証情報に括弧は含めないでください。ドメインの認証情報が必要となるのは、リモートアカウントがドメインの一部になっている場合のみです。
9. [Save] を選択して、ファイルを閉じます。
10. SMB/CIFS サーバーのサーバー名と共有名を特定します。
サーバー名と共有名にはスペースを使用できません。次に例を示します。
サーバー名：192.168.500.100 または Myserver-myinstitute-03
共有名：/share1
11. ターミナルで「`sudo chmod 400 /root/.smbcreds`」と入力して [Enter] を選択し、.smbcreds テキストファイルに読み取りアクセス権を付与します。
12. 「`sudo mkdir /mnt/<ローカル名>`」と入力します。
<ローカル名> はネットワークドライブの新しいディレクトリの名前で、スペースを使用できます。これは装置上から見えるディレクトリです。
13. [Enter] を選択します。

14. 「`sudo gedit /etc/fstab`」 と入力し、[Enter] を選択します。
15. `fstab` ファイルが開いたら、ファイルの末尾に次の行を入力して [Enter] を選択します。

```
//<サーバー名>/<共有名> /mnt/<ローカル名> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. [Save] を選択して、ファイルを閉じます。
17. ターミナルで 「`enter sudo mount -a -vvv`」 と入力し、[Enter] を選択します。
 これで、ネットワークドライブが `/mnt/<ローカル名>` としてマウントされます。
18. 正常にマウントされたかどうかを確認するため、「`df | grep <ローカル名>`」 と入力して [Enter] を選択します。正常にマウントされていれば、ファイル共有名が表示されます。
19. 「`sudo mkdir /mnt/<ローカル名>/<出力ディレクトリ>`」 と入力し、ローカルディレクトリ内にサブフォルダーを作成します。＜出力ディレクトリ＞が、デフォルト出力フォルダーの場所になります。NextSeq 1000/2000 Control Software がこの場所をマウントされたネットワークドライブとして認識するためには、少なくとも2階層分ネストしたフォルダーが必要です。
20. 装置を再起動します。78 ページの「[装置の再起動](#)」を参照してください。
21. 永続的にマウントされたネットワークドライブをデフォルト出力フォルダーとして設定します。15 ページの「[永続的ネットワークドライブをデフォルト出力フォルダーとして指定](#)」を参照してください。

NFS のマウント手順

1. NextSeq 1000/2000 Control Software が開いている場合は、[Minimize Application] を選択します。
2. `ilmnadmin` でログインします。
3. NFS サーバーのサーバー名を特定します。
 サーバー名にはスペースを使用できません。次に例を示します。
 サーバー名：192.168.500.100 または `Myserver-myinstitute-03`
4. [Applications] を選択します。
5. [Favorites] で [Terminal] を選択します。
6. 「`sudo mkdir /mnt/<ローカル名>`」 と入力し、[Enter] を選択します。
 ＜ローカル名＞はネットワークドライブの新しいディレクトリの名前です。
7. 「`sudo gedit /etc/fstab`」 と入力し、[Enter] を選択します。
8. `fstab` ファイルが開いたら、次の行を入力して [Enter] を選択します。

```
サーバー名 : /share //mnt/<ローカル名> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0
```
9. [Save] を選択して、ファイルを閉じます。
10. ターミナルで 「`sudo mount -a -vvv`」 と入力し、[Enter] を選択します。
 これで、ネットワークドライブが `/mnt` ディレクトリの ＜ローカル名＞ フォルダーとしてマウントされます。

11. <ローカル名> フォルダ内に、新しい<サブフォルダー>を作成します。このサブフォルダーが、デフォルト出力フォルダーの場所になります。
NextSeq 1000/2000 Control Software がこの場所をマウントされたネットワークドライブとして認識するためには、少なくとも 2 階層分ネストしたフォルダーが必要です。
12. 装置を再起動します。78 ページの「装置の再起動」を参照してください。
13. 永続的にマウントされたネットワークドライブをデフォルト出力フォルダーとして設定します。15 ページの「永続的ネットワークドライブをデフォルト出力フォルダーとして指定」を参照してください。

永続的ネットワークドライブをデフォルト出力フォルダーとして指定

1. ilmnuser でログインします。
2. NextSeq 1000/2000 Control Software メニューから [Settings] を選択します。
3. [Default Output Folder] で、永続的にマウントされたネットワークドライブにある /mnt/<ローカル名>/<出力ディレクトリ>を選択します。
4. (オプション) [Run Mode] で [Online Run Setup] を選択している場合、[Hosting Location] ドロップダウンメニューからオプションを選択します。
5. [Save] を選択します。

カスタムリファレンスゲノムのインポート

新しいカスタムリファレンスゲノムをインポートするには、管理者アカウントを使用する必要があります。適合するすべてのリファレンスゲノムの一覧については、NextSeq 1000/2000 の Compatible Products ページをご覧ください。

1. Illumina Instruments BaseSpace Sequence Hub アプリ向け Reference Builder を使用して、リファレンスゲノムを作成します。詳細については、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。
2. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[Process Management] を選択します。
3. シーケンスランや装置上の二次解析が進行中でないことを確認します。
4. コントロールソフトウェアのメニューから [Minimize Application] を選択します。
5. ilmnadmin でログインします。
6. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[DRAGEN] を選択します。
7. [Genome] セクションで [View Installed Genomes] を選択し、現在インストールされているすべてのイルミナゲノムとカスタムゲノムのリストを表示します。
8. モーダルウィンドウを閉じます。
9. [Import New Reference Genomes] で [Choose] を選択し、ポータブルドライブまたはマウントされたネットワークドライブにあるリファレンスゲノムファイル (*.tar.gz) の場所に移動して [Open] を選択します。
10. [Import] を選択します。

ノイズベースラインファイルのインポート

DRAGEN Enrichment ワークフローを体細胞モードで使用する場合、ノイズベースラインファイルを使用してシーケンスノイズやシステム的なノイズを除去できます。[イルミナサポートサイト](#)から標準カスタムノイズファイルをダウンロードすることも、カスタムノイズベースラインファイルを作成することもできます。

カスタムノイズベースラインファイルの生成

体細胞モードを使用する場合、カスタムノイズベースラインファイルを生成できます。ノイズベースラインファイルは、サンプルが由来する対象と一致しない正常サンプルを使用して作成します。正常サンプルの推奨の数は 50 です。

カスタムノイズベースラインファイルを生成するには、以下のいずれかの方法を使用します。

- DRAGEN Bio-IT Platform サーバーを使用します。手順については、『DRAGEN Bio-IT Platform Online Help』を参照してください。
- BaseSpace Sequence Hub で DRAGEN Baseline Builder アプリを使用します。BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup で BCL 変換パイプラインを使用して、FASTQ ファイルを生成します。シーケンスランが完了し、50 サンプルが利用可能になったら、DRAGEN Baseline Builder アプリに FASTQ ファイルを入力します。

ユーザーインターフェースを使用したベースラインファイルのインポート

ベースラインファイルをインポートした後に、DRAGEN Enrichment ワークフローを体細胞モードで使ってシーケンスランをセットアップできます。

1. [イルミナサポートサイト](#)から標準ベースラインファイルをダウンロードするか、DRAGEN サーバーまたは DRAGEN Baseline Builder アプリからカスタムベースラインファイルをダウンロードします。
2. コントロールソフトウェアのメニューから [Minimize Application] を選択します。
3. ilmnadmin でログインします。
4. [Applications] を選択した後で、[Favorites] を選択します。
5. [+Other Locations] を選択した後で、[Computer] を選択します。
6. usr をダブルクリックした後で、local をダブルクリックします。
7. illumina をダブルクリックした後で、aux_files をダブルクリックします。
8. ノイズベースラインファイルを aux_files にドラッグします。

ターミナルを使用したベースラインファイルのインポート

ベースラインファイルをインポートした後に、DRAGEN Enrichment ワークフローを体細胞モードで使用してシーケンスランをセットアップできます。

1. [イルミナサポートサイト](#)から標準ベースラインファイルをダウンロードするか、DRAGEN サーバーまたは DRAGEN Baseline Builder アプリからカスタムベースラインファイルをダウンロードします。
2. コントロールソフトウェアのメニューから [Minimize Application] を選択します。
3. ilmnadmin でログインします。
4. [Applications] を選択します。
5. [Favorites] で [Terminal] を選択します。
6. 以下のコマンドを入力します。

```
cp [/path/to/baselinefile] /usr/local/illumina/aux_files
```

ランモードの設定

ランモードはすべてのランに適用され、ランパラメーターが入力される場所およびデータの解析方法を規定します。

クラウドモードまたはハイブリッドモード

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. [BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support] で [Online Run Setup] を選択します。
3. 以下を選択して、追加の設定を適切に行います。
 - a. [Proactive and Run Monitoring] または [Proactive, Run Monitoring and Storage]。
 - b. [Hosting Location] のドロップダウンメニュー。
 - c. (オプション) [Private Domain Name] にプライベートドメイン名を入力します。
4. [Save] を選択します。

ローカルモードまたはスタンドアロンモード

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. [BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support] で [Local Run Setup] を選択します。
3. 以下を選択して、追加の設定を適切に行います。
 - a. [Proactive Support Only]、[Proactive and Run Monitoring]、[Proactive, Run Monitoring and Storage]、または [None]。

1 | BaseSpace Sequence Hub では、[Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合のみリキューが許可されます。サンプルシートが無効な場合、サンプルシートを修正してデマルチプレックス解析をリキューすることができます。装置上のリキュー機能については、[78 ページの「ランのリキュー」](#)を参照してください。

b. [Hosting Location] のドロップダウンメニュー。

c. (オプション) [Private Domain Name] にプライベートドメイン名を入力します。

4. [Save] を選択します。

ローカルモードまたはスタンドアロンモードのサンプルシートに関する考慮事項

DRAGEN を使用して解析するには、サンプルシート v2 ファイル形式を使用する必要があります。サンプルシート v2 ファイル形式は、DRAGEN の機能を利用しない BaseSpace Sequence Hub アプリにも対応します。v2 ファイル形式でのサンプルシートの作成については、[81 ページの「サンプルシート v2 の設定」](#)を参照してください。

装置のカスタマイズ

このセクションでは、装置をカスタマイズするための設定について説明します。デフォルト出力フォルダーを設定するには、[12 ページの「デフォルト出力フォルダーの場所の指定」](#)を参照してください。

装置に名前を付ける

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. [Instrument Nickname] を選択し、装置の名前を入力します。
入力した名前は各画面の上部に表示されます。
3. [Save] を選択します。

変性および希釈に関する設定

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. ライブラリーを装置上で自動的に変性して希釈するかどうかを選択します。前回のランで選択したオプションが既定値に設定されます。
 - ライブラリーを装置上で自動的に変性して希釈するには、[Denature and Dilute On Board] チェックボックスを選択します。
 - ライブラリーを手動で変性して希釈するには、[Denature and Dilute On Board] チェックボックスの選択を解除します。
ライブラリーを手動で変性して希釈する方法については、『NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000139235）を参照してください。

試薬の自動パージに関する設定

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. ラン完了後の試薬の廃液処理を効率化するため、各ランの終了後に未使用の試薬を使用済み試薬コンパートメントに自動的にパージするかどうかを選択します。
 - 自動的にパージするには、[Purge Reagent Cartridge] チェックボックスを選択します。
 - 自動パージを省略するには、[Purge Reagent Cartridge] チェックボックスの選択を解除します（これがデフォルト設定です）。未使用の試薬をパージすると、ワークフローが最大で 2 時間長くなります。
3. [Save] を選択します。

ソフトウェアアップデートの設定

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. ソフトウェアアップデートの有無を自動的に確認するかどうかを選択します。
 - 自動的に確認するには、[Autocheck for software updates] チェックボックスを選択します。
 - 手動で確認するには、[Autocheck for software updates] チェックボックスの選択を解除します。ソフトウェアアップデートの自動確認にはインターネット接続が必要です。ソフトウェアアップデートのインストールの詳細については、[70 ページの「ソフトウェアのアップデート」](#)を参照してください。
3. [Save] を選択します。

LCD の明るさの変更

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. [LCD Brightness] スライダーを動かして目的のパーセンテージに設定します。
3. [Save] を選択します。

プロキシサーバーの設定

プロキシサーバーは、NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降でのみサポートされます。

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Settings] を選択します。
2. 現在のプロキシ設定を選択して [Proxy Settings] 画面を開きます。
3. [Enable Proxy] チェックボックスを選択し、サーバーの IP ポートアドレスを入力します。
4. (オプション) プロキシサーバーに認証が必要な場合、[Requires Username and Password] チェックボックスを選択して、ユーザー名とパスワードを入力します。
5. [Save] を選択し、プロキシの情報を保存して検証します。
6. 以下のいずれかの方法を選択します。
 - [Yes, I'm Finished] を選択し、システムを再起動して新しいプロキシ設定を適用します。
 - [No, Take Me Back] を選択し、[Settings] 画面に戻ります。新しいプロキシ設定は保存されますが、システムを再起動するまで適用されません。

消耗品および機器

このセクションでは、試薬キットに付属するすべてのアイテムとその保管条件を示します。さらに、プロトコールの実施とメンテナンスおよびトラブルシューティングに必要な補助的な消耗品と機器についても説明します。

シーケンス消耗品

NextSeq 1000/2000 でシーケンスを実行するには、使い捨ての Illumina NextSeq 1000/2000 P1 Reagents kit、使い捨ての Illumina NextSeq 1000/2000 P2 Reagents kit、または使い捨ての Illumina NextSeq 2000 P3 Reagents kit が 1 つ必要です。NextSeq 1000/2000 P1 Reagents kit には 1 種類のサイズ（300 サイクル）、NextSeq 1000/2000 P2 Reagents kit には 3 種類のサイズ（100 サイクル、200 サイクル、300 サイクル）が用意されています。NextSeq 2000 P3 Reagents kit には 4 種類のサイズ（50 サイクル、100 サイクル、200 サイクル、300 サイクル）が用意されています。

NextSeq 2000 P3 Reagents kit は、NextSeq 2000 システムにのみ対応しています。

試薬キットには、シーケンス用のカートリッジとフローセルが含まれています。試薬キットが届いたら、以下のことに注意してください。

- 適切な性能を確保するため、キット構成部品を表記されている温度ですぐに保管します。
- 指示があるまで銀色のホイルバッグを開けないでください。
- ホイルバッグが破れたり穴が開いたりしないように、カートリッジは箱に入れたまま保管します。
- カートリッジを保管する際は矢印を上に向けて置きます。

! | カートリッジのラベルを上に向けないと、シーケンスデータに悪影響が及びます。

表 2 キット構成部品

消耗品	数量	保管温度	寸法
カートリッジ	1	-25°C ~ -15°C	29.2 cm × 17.8 cm × 12.7 cm (11.5 インチ × 7 インチ × 5 インチ)
フローセル	1	2°C ~ 8°C *	21.6 cm × 12.7 cm × 1.9 cm (8.5 インチ × 5 インチ × 0.75 インチ)
RSB with Tween 20*	1	2°C ~ 8°C	4 cm × 6.6 cm × 5 cm (1.6 インチ × 2.6 インチ × 2 インチ)

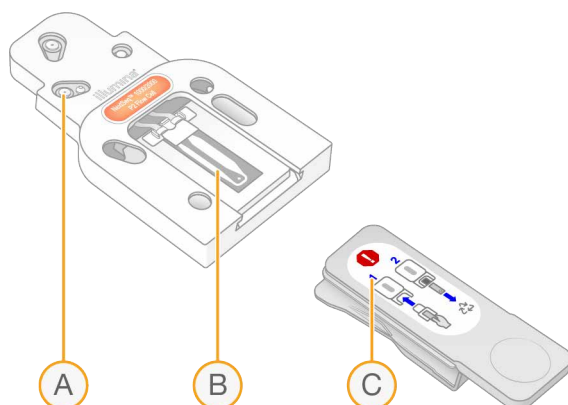
* 室温で配送されます。

どちらの消耗品にも、追跡および互換性確認用の識別子が付いています。カートリッジとフローセルには RFID¹ が使用されています。

¹ 無線自動識別

フローセル

フローセルはシングルレーンのパターン化フローセルです。ガラス製のフローセルがプラスチックのカートリッジに入っています。安全に取り扱えるように、フローセルはグレーのツマミで覆われており、このツマミがフローセルから突き出ています。

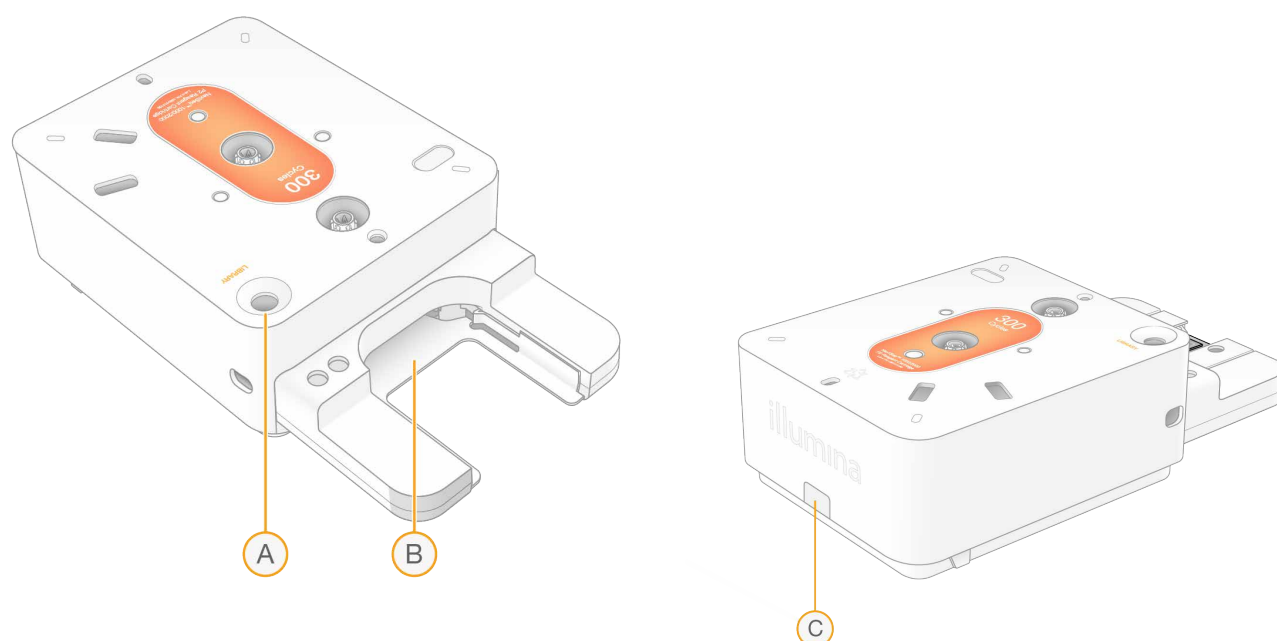


- A. プラスチックカートリッジ
- B. フローセル
- C. グレーのツマミ

フローセルの内側表面は数百万個のナノウェルで覆われています。これらのナノウェル内でクラスターが形成された後、シーケンス反応が実行されます。ナノウェルが整列して配置されていることで、出力されるリード数とデータが増加しています。

カートリッジ

シーケンス試薬カートリッジには、クラスター試薬、シーケンス試薬、ペアエンド試薬、インデックス試薬があらかじめ充填されています。ホイルでシールされたリザーバーはライブラリー専用で、前面にフローセルを差し込むスロットが付いています。



- A. ライブラリーリザーバー
- B. フローセルスロット
- C. 排液プラグ

カートリッジには、ランに必要なすべての消耗品（試薬、ライブラリー、フローセル）が含まれています。融解したカートリッジにライブラリーとフローセルをロードした後、カートリッジを装置にロードします。ランの開始後、試薬とライブラリーは自動的にカートリッジからフローセルに移送されます。

カートリッジには、ポンプとバルブ、およびシステム用のすべてのフルイデックス（使用済み試薬を回収するための下面のリザーバーなど）が含まれています。カートリッジはラン後に廃棄するため、装置洗浄は必要ありません。

サポートされるサイクル数

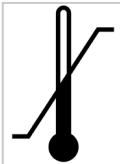
カートリッジのラベルに表記されている数字は、解析可能なサイクル数を示します。実行可能なサイクル数ではありません。フローセルはすべてのサイクル数とすべてのリードタイプに対応しています。

Illumina NextSeq 2000 P3 Reagents kit の 300 サイクルのカートリッジには、27 サイクル分の試薬が追加で含まれています。これを除くすべてのカートリッジには、38 サイクル分の試薬が追加で含まれています。例えば、Illumina NextSeq 1000/2000 P2 Reagents kit の 200 サイクルのカートリッジには、最大 238 サイクルのシーケンスを実行できる量の試薬が入っています。シーケンスのサイクル数については、[27 ページの「リードのサイクル数」](#)を参照してください。

記号の説明

次の表に、消耗品または消耗品のパッケージに付いている記号を示します。

記号	内容説明
	消耗品の使用期限。最良の結果を得るには、この日付以前の消耗品を使用してください。
	製造者（イルミナ）を示します。
	使用目的は研究に限定されます（RUO）。
	消耗品を識別するための部品番号を示します。
	消耗品が製造されたバッチまたはロットを特定するためのバッチコードを示します。

記号	内容説明
	健康に有害であることを示します。
	保管温度範囲（摂氏）。表記された範囲内で消耗品を保管してください。

補助的な消耗品

シーケンスとメンテナンス用に以下の消耗品を購入してください。

シーケンス用の消耗品

表 3 シーケンス用の消耗品

消耗品	サプライヤー	目的
パウダーフリーの使い捨て手袋	一般的なラボ用品サプライヤー	一般的な用途。
NextSeq 1000/2000 P1 Reagents kit	イルミナ： カタログ番号：20050264 (300 サイクル)	シーケンスとデュアルインデックスをサポートするための試薬をキットとして提供します（最大 1 億のシングルリード）。NextSeq 1000/2000 試薬カートリッジ、NextSeq 1000/2000 P1 フローセル、および RSB with Tween 20 が含まれます。この試薬キットは v3 の試薬に基づいています。NextSeq 1000/2000 に適合します。
NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (v3) kit	イルミナ： カタログ番号：20046811 (100 サイクル) カタログ番号：20046812 (200 サイクル) カタログ番号：20046813 (300 サイクル)	シーケンスとデュアルインデックスをサポートするための試薬をキットとして提供します（最大 4 億のシングルリード）。NextSeq 1000/2000 試薬カートリッジ、NextSeq 1000/2000 P2 フローセル、および RSB with Tween 20 が含まれます。NextSeq 1000/2000 に適合します。

消耗品	サプライヤー	目的
NextSeq 2000 P3 Reagents kit	イルミナ： カタログ番号：20046810 (50 サイクル) カタログ番号：20040559 (100 サイクル) カタログ番号：20040560 (200 サイクル) カタログ番号：20040561 (300 サイクル)	シーケンスとデュアルインデックスをサポートするための試薬をキットとして提供します（最大 12 億のシングルリード）。NextSeq 2000 試薬カートリッジ、NextSeq 2000 P3 フローセル、および RSB with Tween 20 が含まれます。この試薬キットは v3 の試薬に基づいています。NextSeq 2000 にのみ適合します。
1.5 mL マイクロ遠心チューブ	Fisher Scientific、カタログ番号：14-222-158 または同等の低吸着チューブ	ローディング濃度へのライブラリーの希釈。
ピペットチップ、10 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの希釈。
ピペットチップ、20 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの希釈およびローディング。
ピペットチップ、200 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの希釈。
ピペットチップ、1,000 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーリザーバーホイルの穴開け。
(オプション) PhiX Control v3	イルミナ、カタログ番号：FC-110-3001	PhiX のみのランを行うか PhiX コントロールのスプライクイン用。
(オプション) ペーパータオル	一般的なラボ用品サプライヤー	ウォーターバス使用後のカートリッジの乾燥。

メンテナンス用の消耗品

表 4 メンテナンス用の消耗品

消耗品	サプライヤー	目的
パウダーフリーの使い捨て手袋	一般的なラボ用品サプライヤー	一般的な用途。
交換用 NextSeq 1000/2000 エアフィルター *	イルミナ、カタログ番号：20029759	6 カ月ごとのエアフィルター交換用。

* 1 つは装置に装着されており、もう 1 つは予備として装置と一緒に配送されています。保守外の場合、交換品はユーザーが用意します。使用するまでパッケージから出さないでください。

補助的な機器

シーケンス用に以下の機器を購入してください。

アイテム	ソース	目的
冷凍庫、-25℃～-15℃	一般的なラボ用品サプライヤー	カートリッジの保管。
アイスバケット	一般的なラボ用品サプライヤー	シーケンスまでのライブラリー保管。
ピペット、10 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ローディング濃度へのライブラリーの希釈。
ピペット、20 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ローディング濃度へのライブラリーの希釈と、ライブラリーのカートリッジへのロード。
ピペット、200 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ローディング濃度へのライブラリーの希釈。
冷蔵庫、2℃～8℃	一般的なラボ用品サプライヤー	フローセルの保管またはカートリッジの融解。
(オプション) 25℃を保持できる、以下の温調されたウォーターバスのいずれかまたは同等品 ● Thermo Scientific Precision 35L 循環式ウォーターバス (同時に5カートリッジを保持) ● SHEL LAB 22L デジタル循環式ウォーターバス (同時に3カートリッジを保持) ● Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：TSCIR 35 ● Shel Lab、カタログ番号：SWBC22		カートリッジの融解。

プロトコール

このセクションでは、消耗品の準備方法、ライブラリーの希釈方法、および 4 種類のランモード（クラウド、ハイブリッド、DRAGEN または BaseSpace Sequencing Hub を使用したローカルモード、スタンドアロンモード）のいずれかでシーケンスランをセットアップする方法の手順を具体的に説明します（スタンドアロンモードは、cBCL データの生成のみを目的としたカスタム解析ワークフロー専用のスタンドアロンランです）。

試薬およびその他の化学薬品を取り扱うときは、保護メガネ、ラボコートおよびパウダーフリーの手袋を装着してください。プロトコールを開始する前に必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。[20 ページの「消耗品および機器」](#)を参照してください。

指定の量、温度、および所要時間に従い、記載された順序でプロトコールを実施してください。

シーケンスに関する考慮事項

プロトコールを開始する前に、以下の情報に従ってライブラリーの希釈とランのセットアップを準備します。シーケンスと解析を正しく行うには、ローディング濃度を最適にすることが重要です。リードのサイクル数を適切に入力することで、最適なデータ出力が得られます。

ローディング量とローディング濃度

ローディング量は 20 μ L です。ローディング濃度はライブラリーのタイプによって異なります。

ライブラリータイプ	ローディング濃度 (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1,000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1,000
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1,200
TruSeq DNA Nano 550	1,500
TruSeq Stranded mRNA	1,000

その他のライブラリータイプの推奨される開始ローディング濃度は、650 pM です。その後、ランの実行を通じてこの濃度を最適化し、仕様を満たすデータを一貫して産生するローディング濃度を決定してください。

i ローディング濃度を最適化するには、ランの完了後に生成された PrimaryAnalysisMetrics.csv 出力ファイルを開いて、% Loading Concentration のメトリクスを確認します。% Loading Concentration が 95% 未満の場合は、後続のランでローディング濃度を 100 pM ずつ増やします。

リードのサイクル数

各リードに対して入力するサイクル数を 26～151 サイクルの範囲にすると、データ品質の確保に役立ちます。適切なサイクル数は実験に応じて異なります。Read 1 には少なくとも 1 サイクルが必要ですが、Read 1 のサイクル数が 26 未満の場合は警告が表示されます。

Read 1、Index 1、Index 2、Read 2 のサイクル数の合計は、キットでサポートされているサイクル数に 38（100 サイクルおよび 200 サイクルのキットの場合）または 27（P3 の 300 サイクルのキットの場合）を足した数より大きくすることはできません。Index 1 および Index 2 のサイクル数が 6 サイクル未満の場合は、警告が表示されます。ただし、Index 1 または Index 2 が 0 サイクルの場合、警告は表示されません。

最小および最大サイクル数には、余剰の 1 サイクルが含まれます。フェージングとプレフェージングの影響を補正するため、必ず目的のリード長に 1 サイクルを加えてください。リード長とは、Read 1 と Read 2 のシーケンスサイクル数のことです。リード長には余剰のサイクルとインデックスサイクルは含まれません。詳細については、[55 ページの「Real-Time Analysis のワークフロー」](#)の「フェージングの補正」を参照してください。

ランセットアップの例：

- リード長が 35（シングルリード）の場合は、[Read 1] フィールドに「36」と入力します。
- リード長が 1 リードあたり 150（ペアエンド）の場合は、[Read 1] フィールドに「151」、[Read 2] フィールドに「151」と入力します。

BaseSpace Sequence Hub でのシーケンスランの計画

BaseSpace Sequence Hub 内で Instrument Run Setup を使用して、ラン設定の作成および設定をします。クラウドモードまたはハイブリッドモードでランをセットアップする場合は、[Planned Runs] タブにある BaseSpace Sequence Hub アカウントの [Planned Runs] のリストにラン設定を送信します。NextSeq 1000/2000 システムでのシーケンスに使用可能なランは、[Planned Runs] タブに表示されます。ローカルモードでランをセットアップする場合は、Instrument Run Setup を使用して v2 ファイル形式でサンプルシートを作成し、出力します。別の方法として、BaseSpace Sequence Hub を使用せずに、提供されたテンプレートを基にサンプルシートを作成することもできます。その場合は、[81 ページの「サンプルシート v2 の設定」](#)を参照してください。

BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup でサポートされている最大サンプル数は 1,536 です。

ランのセットアップ

1. BaseSpace Sequence Hub に移動します。
2. 電子メールアドレスと BaseSpace Sequence Hub のパスワードを入力し、[Sign In] を選択します。
3. [Runs] タブを選択し、[New Run] ドロップダウンを選択します。
4. [NextSeq 1000/2000] を選択します。
5. [Run Name] フィールドに、セットアップするランを識別するための固有の名前を入力します。ラン名には、最大 225 文字の英数字、スペース、ダッシュ、アンダースコアを使用できます。

6. 解析場所として次のいずれかを選択します。

- BaseSpace：クラウドでシーケンスデータを解析します。
- Local：装置上でシーケンスデータを解析するか、ローカルモードまたはハイブリッドモード用のサンプルシート v2 を生成します。

7. 解析タイプとバージョンを選択します。

二次解析の詳細については、[59 ページの「DRAGEN による二次解析の出力ファイル」](#) または BaseSpace Sequence Hub アプリのドキュメントを参照してください。DRAGEN Single Cell RNA 解析を選択した場合は、NextSeq 1000/2000 の Products Files ページでサードパーティ製のシングルセル RNA ライブラリー調製キットの互換性を確認してください。

i 装置上の解析では、装置にインストールされている DRAGEN のバージョンと同じバージョンを選択する必要があります。装置にインストールされている DRAGEN のバージョンを確認するには、[72 ページの「DRAGEN のワークフローおよびライセンスのアップデート」](#) を参照してください。

8. (オプション) 以下の手順に従って、カスタムインデックスキットをセットアップします。

複数のライブラリーを使用する場合、それらのライブラリーはインデックスリード長が同じである必要があります。

- a. [Index Adapter Kit] ドロップダウンで [Add Custom Index Adapter Kit] を選択します。
- b. テンプレートのタイプを選択し、キット名、アダプターシーケンス、インデックス手法、インデックスシーケンスを入力します。
2 番目のインデックス (i5) のアダプターシーケンスが順方向であることを確認してください。
- c. [Create New Kit] を選択します。

9. (オプション) 以下の手順に従って、カスタムライブラリー調製キットをセットアップします。

- a. [Library Prep Kit] ドロップダウンで [Add Custom Library Prep Kit] を選択します。
- b. カスタムライブラリー調製キットの名前、リードタイプ、既定のリードサイクル、対応するインデックスアダプターキットを入力します。
- c. [Create New Kit] を選択します。

10. 以下の装置設定を選択します。ライブラリー調製キットに応じて、推奨されるオプションが自動的に選択されます。一部のライブラリー調製キットではインデックスリードの数とリードタイプがハードコード化されており、変更できません。

- ライブラリー調製キット
- インデックスアダプターキット
- インデックスリードの数
- リードタイプ
- リードあたりのシーケンスサイクル数

i ライブラリー調製キットに対して [Not Specified] を選択した場合は、[Sample Data] セクションにインデックスシーケンスを入力するまで、インデックスリードの数は更新されません。

11. 以下のオプションのいずれかを使用して、サンプル情報をサンプルデータスプレッドシートに入力します。下流の解析中にサンプルをグループ化してデータを集約するには、[Project] 列にグループの名前を割り当てます。

- [Import Data] を選択し、サンプルシートを選択します。サンプルシートが形式の要件を満たしていることを確認します。[81 ページの「サンプルシート v2 の設定」](#)を参照してください。初めのダウンロードの後にサンプルシートを変更すると、解析が失敗する可能性があります。
- サンプル ID と、インデックスプレートのウェルポジションまたは i7 インデックスと i5 インデックスのいずれかを、外部ファイルから直接貼り付けます。貼り付ける前に、[Rows] フィールドにサンプル行の数を入力し、[+] を選択します。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字、ハイフン、アンダースコアを使用できます。

1 | 固定レイアウトのインデックスプレートでは、ウェルポジションを入力する必要があります。固定レイアウトを持たないインデックスでは、i7 インデックスと i5 インデックスを入力する必要があります。i5 インデックスは順方向に入力する必要があります。

- サンプル ID と、対応するウェルポジションまたはインデックスを手動で入力します。ライブラリー調製キットに対して [Not Specified] を選択した場合は、インデックス 2 (i5) のシーケンスを順方向に入力します。

12. [Next] を選択します。

二次解析のセットアップ

ランに選択した解析タイプの設定を行います。DRAGEN 解析ワークフローの詳細については、[59 ページの「DRAGEN による二次解析の出力ファイル」](#)を参照してください。

Illumina DRAGEN BCL 変換

以下の手順に従って、Illumina DRAGEN BCL 変換解析を設定します。

1. 以下のオプション設定を入力します。

設定	内容説明
AdapterRead1	Read 1 のアダプターシーケンス。イルミナライブラリー調製キットを使用する場合、[AdapterRead1] フィールドは空白にします。
AdapterRead2	Read 2 のアダプターシーケンス。イルミナライブラリー調製キットを使用する場合、[AdapterRead2] フィールドは空白にします。
BarcodeMismatchIndex1	1 番目のインデックスリードとインデックス配列の間で許容されるミスマッチの数。デフォルト設定は 1 です。バーコードが 6 bp の場合、推奨値は 0 です。
BarcodeMismatchIndex2	2 番目のインデックスリードとインデックス配列の間で許容されるミスマッチの数。デフォルト設定は 1 です。バーコードが 6 bp の場合、推奨値は 0 です。

設定	内容説明
OverrideCycles	UMI サイクルを指定し、リードのサイクルをマスクアウトするための文字列。次の値を使用できます。 • N：無視するサイクルを指定します。 • Y：シーケンスサイクルを指定します。 • I：インデックスサイクルを指定します。 • U：トリムされる UMI サイクルを指定します。 各要素はセミコロンで区切ります。以下は OverrideCycles の入力例です。 <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

- FASTQ ファイルのコピーを保存するかどうかを選択します。FASTQ ファイルは、FASTQ ファイルを保存することを選択した場合にのみ生成されます。
- FASTQ 出力形式オプションとして次のいずれかを選択します。
 - gzip：FASTQ ファイルを gzip 形式で保存します。
 - DRAGEN：FASTQ ファイルを ora 形式で保存します。
- ラン設定を完了します。
 - ラン設定を BaseSpace Sequence Hub アカウントに送信するには、[Submit Run] を選択します。BaseSpace Sequence Hub に送信されたランは、[Planned Runs] のリストに表示され、クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用するシステムで使用できます。
 - ラン設定を v2 ファイル形式のサンプルシートとして保存するには、[Submit Run] ドロップダウンリストから [Export Sample Sheet] を選択します。システムでローカルモードを使用してランを開始するには、サンプルシートが必要になります。このオプションを使用できるのは、解析場所として [Local] を選択した場合のみです。

Illumina DRAGEN Enrichment

以下の手順に従って、Illumina DRAGEN Enrichment 解析を設定します。

- リファレンスゲノムを選択します。
可能であれば、alt aware のあるリファレンスゲノムを使用します。
- ターゲットとする領域を含む *.bed ファイルを選択するか、新しいカスタムファイルをアップロードします。BED ファイルのリファレンスゲノムが、ステップ 1 で選択したリファレンスゲノムと一致していることを確認します。新しいカスタム BED ファイルを使用する場合は、ファイル名の書式を `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed` にします。
 - ローカルモード：1 回だけのラン用にアップロードする場合は [Select Custom File (Local)] を選択し、繰り返し使用する場合は [Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。
 - クラウドまたはハイブリッドモード：[Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。カスタム BED ファイルを使用できるのは、アップロード先のワークグループ内のみです。
- 生殖細胞系列または体細胞系列のバリエーションコーラーを選択します。
- (オプション) 体細胞系列のバリエーションコーラーを使用する場合、ノイズベースラインファイルを選択します。詳細については、16 ページの「ノイズベースラインファイルのインポート」を参照してください。

5. マッピング/アライメントの出力形式を選択します。
6. FASTQ ファイルのコピーを保存するかどうかを選択します。FASTQ ファイルは、FASTQ ファイルを保存することを選択した場合にのみ生成されます。
7. FASTQ 出力形式オプションとして次のいずれかを選択します。
 - gzip : FASTQ ファイルを gzip 形式で保存します。
 - DRAGEN : FASTQ ファイルを ora 形式で保存します。
8. ラン設定を完了します。
 - ラン設定を BaseSpace Sequence Hub アカウントに送信するには、[Submit Run] を選択します。BaseSpace Sequence Hub に送信されたランは、[Planned Runs] のリストに表示され、クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用するシステムで使用できます。
 - ラン設定を v2 ファイル形式のサンプルシートとして保存するには、[Submit Run] ドロップダウンリストから [Export Sample Sheet] を選択します。サンプルシートおよび二次解析サポートファイルは *.zip フォルダでダウンロードされます。これらは、システムでローカルモードを使用してランを開始する場合に必要となります。このオプションを使用できるのは、解析場所として [Local] を選択した場合のみです。

Illumina DRAGEN Germline

以下の手順に従って、Illumina DRAGEN Germline 解析を設定します。

1. リファレンスゲノムを選択します。

可能であれば、alt aware のあるリファレンスゲノムを使用します。
2. マッピング/アライメントの出力形式を選択します。
3. FASTQ ファイルのコピーを保存するかどうかを選択します。FASTQ ファイルは、FASTQ ファイルを保存することを選択した場合にのみ生成されます。
4. FASTQ 出力形式オプションとして次のいずれかを選択します。
 - gzip : FASTQ ファイルを gzip 形式で保存します。
 - DRAGEN : FASTQ ファイルを ora 形式で保存します。
5. ラン設定を完了します。
 - ラン設定を BaseSpace Sequence Hub アカウントに送信するには、[Submit Run] を選択します。BaseSpace Sequence Hub に送信されたランは、[Planned Runs] のリストに表示され、クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用するシステムで使用できます。
 - ラン設定を v2 ファイル形式のサンプルシートとして保存するには、[Submit Run] ドロップダウンリストから [Export Sample Sheet] を選択します。サンプルシートおよび二次解析サポートファイルは *.zip フォルダでダウンロードされます。これらは、システムでローカルモードを使用してランを開始する場合に必要となります。このオプションを使用できるのは、解析場所として [Local] を選択した場合のみです。

Illumina DRAGEN RNA

以下の手順に従って、Illumina DRAGEN RNA 解析を設定します。

1. リファレンスゲノムを選択します。
可能であれば、alt aware のないリファレンスゲノムを使用します。
2. マッピング / アライメントの出力形式を選択します。
3. FASTQ ファイルのコピーを保存するかどうかを選択します。FASTQ ファイルは、FASTQ ファイルを保存することを選択した場合にのみ生成されます。
4. FASTQ 出力形式オプションとして次のいずれかを選択します。
 - gzip : FASTQ ファイルを gzip 形式で保存します。
 - DRAGEN : FASTQ ファイルを ora 形式で保存します。
5. (オプション) Gene Transfer Format (GTF) の RNA アノテーションファイルをアップロードします。
 - ローカルモード : 1 回だけのラン用にアップロードする場合は [Select Custom File (Local)] を選択し、繰り返し使用する場合は [Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。
 - クラウドまたはハイブリッドモード : [Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。GTF ファイルを使用できるのは、アップロード先のワークグループ内のみです。

GTF ファイルを BaseSpace Sequence Hub ワークグループにアップロードしたら、ドロップダウンメニューから RNA アノテーションファイルを選択します。
6. 発現差解析を有効にするかどうかを選択します。
7. 発現差解析を有効にした場合、各サンプルに対して control または comparison の値を選択します。
各比較グループで、control としてマークされた任意のサンプルが、comparison としてマークされたすべてのサンプルと比較されます。サンプルに control または comparison の値を指定しない場合は、値として na を選択します。
8. ラン設定を完了します。
 - ラン設定を BaseSpace Sequence Hub アカウントに送信するには、[Submit Run] を選択します。BaseSpace Sequence Hub に送信されたランは、[Planned Runs] のリストに表示され、クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用するシステムで使用できます。
 - ラン設定を v2 ファイル形式のサンプルシートとして保存するには、[Submit Run] ドロップダウンリストから [Export Sample Sheet] を選択します。オプションの GTF ファイルを提供した場合、サンプルシートおよび二次解析サポートファイルは *.zip フォルダでダウンロードされます。これらは、システムでローカルモードを使用してランを開始する場合に必要となります。このオプションを使用できるのは、解析場所として [Local] を選択した場合のみです。

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

以下の手順に従って、Illumina DRAGEN Single Cell RNA 解析を設定します。

1. リファレンスゲノムを選択します。
可能であれば、alt aware のないリファレンスゲノムを使用します。
2. (オプション) Gene Transfer Format (GTF) の RNA アノテーションファイルをアップロードします。
 - ローカルモード：1 回だけのラン用にアップロードする場合は [Select Custom File (Local)] を選択し、繰り返し使用する場合は [Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。
 - クラウドまたはハイブリッドモード：[Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。GTF ファイルを使用できるのは、アップロード先のワークグループ内のみです。

GTF ファイルを BaseSpace Sequence Hub ワークグループにアップロードしたら、ドロップダウンメニューから RNA アノテーションファイルを選択します。
3. マッピング/アライメントの出力形式を選択します。
4. FASTQ ファイルのコピーを保存するかどうかを選択します。FASTQ ファイルは、FASTQ ファイルを保存することを選択した場合にのみ生成されます。
5. FASTQ 出力形式オプションとして次のいずれかを選択します。
 - gzip：FASTQ ファイルを gzip 形式で保存します。
 - DRAGEN：FASTQ ファイルを ora 形式で保存します。
6. 使用するライブラリー調製キットタイプと一致する設定を選択します。
例えば、ライブラリー調製キットとして Single Cell RNA Library Kit 1 を選択した場合は、[Configuration Type] で [Type 1] を選択します。
7. バーコードの配列を選択します。
8. (オプション) バーコードおよび UMI に含まれる塩基数を編集します。これらの値は、選択したライブラリー調製キットと設定タイプに基づいて自動的に入力されます。
9. ストランドの向きを選択します。
10. (オプション) バーコードシーケンスを含むファイルを選択するか、新しいカスタムファイルをアップロードします。
11. [Advanced/Custom] の設定タイプを使用する場合は、オーバーライドサイクルの数、バーコード位置、および UMI 位置の値を入力します。
12. ラン設定を完了します。
 - ラン設定を BaseSpace Sequence Hub アカウントに送信するには、[Submit Run] を選択します。BaseSpace Sequence Hub に送信されたランは、[Planned Runs] のリストに表示され、クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用するシステムで使用できます。
 - ラン設定を v2 ファイル形式のサンプルシートとして保存するには、[Submit Run] ドロップダウンリストから [Export Sample Sheet] を選択します。オプションの GTF ファイルを提供した場合、サンプルシートおよび二次解析サポートファイルは *.zip フォルダーでダウンロードされます。これらは、システムでローカルモードを使用してランを開始する場合に必要となります。このオプションを使用できるのは、解析場所として [Local] を選択した場合のみです。

Illumina DRAGEN Amplicon

以下の手順に従って、Illumina DRAGEN Amplicon 解析を設定します。

1. リファレンスゲノムを選択します。
2. ターゲットとする領域を含む *.bed ファイルを選択するか、新しいカスタムファイルをアップロードします。BED ファイルのリファレンスゲノムが、ステップ 1 で選択したリファレンスゲノムと一致していることを確認します。新しいカスタム BED ファイルを使用する場合は、ファイル名の書式を `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed` にします。
 - クラウドまたはハイブリッドモード：[Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。カスタム BED ファイルを使用できるのは、アップロード先のワークグループ内のみです。
 - ローカルモード：1 回だけのラン用にアップロードする場合は [Select Custom File (Local)] を選択し、繰り返し使用する場合は [Upload Custom File (BaseSpace)] を選択します。
3. 生殖細胞系列または体細胞系列のバリエーションコーラーを選択します。
4. マッピング / アライメントの出力形式を選択します。
5. (ローカル)FASTQ ファイルのコピーを保存するかどうかを選択します。FASTQ ファイルは、FASTQ ファイルを保存することを選択した場合にのみ生成されます。
6. FASTQ 出力形式オプションとして次のいずれかを選択します。
 - gzip：FASTQ ファイルを gzip 形式で保存します。
 - DRAGEN：FASTQ ファイルを ora 形式で保存します。
7. ラン設定を完了します。
 - ラン設定を BaseSpace Sequence Hub アカウントに送信するには、[Submit Run] を選択します。BaseSpace Sequence Hub に送信されたランは、[Planned Runs] のリストに表示され、クラウドモードまたはハイブリッドモードを使用するシステムで使用できます。
 - (ローカル) ラン設定を v2 ファイル形式のサンプルシートとして保存するには、[Submit Run] ドロップダウンリストから [Export Sample Sheet] を選択します。サンプルシートおよび二次解析サポートファイルは *.zip フォルダでダウンロードされます。これらは、システムでローカルモードを使用してランを開始する場合に必要となります。このオプションを使用できるのは、解析場所として [Local] を選択した場合のみです。

袋入りカートリッジの融解とフローセル

このステップでは、未開封の袋に入っているカートリッジを融解し、フローセルを準備します。袋入りカートリッジの融解には、温調ウォーターバス、冷蔵庫、室温のいずれかの方法を使用します。融解後のカートリッジは、再凍結せずに速やかに使用してください。融解したカートリッジをすぐに使用できない場合は、[77 ページの「消耗品を保管庫に戻す」](#)を参照してください。

図 4 袋入りカートリッジ



温調ウォーターバスでのカートリッジの融解

1. 新しいパウダフリーの手袋をつけ、保管庫からカートリッジを取り出します。
2. 箱からカートリッジを取り出しますが、銀色のホイルバッグは開けないでください。
- ❗ | 破れた袋や穴が開いた袋をウォーターバスで融解すると、シーケンスの失敗につながる可能性があります。その場合は室温または冷蔵庫で融解してください。
3. 袋入りのカートリッジを 25℃の温調ウォーターバスに入れ、6 時間かけて融解します。
 - 融解するカートリッジの数に関係なく、水深は少なくとも 9.5 ~ 10 cm に維持します。
 - 温調ウォーターバスは 25℃に設定します。
 - 袋のラベルを上に向けてウォーターバスに入れます。水中に完全に沈めないでください。
 - ❗ | カートリッジを沈めるためにおもりを載せたりしないでください。袋のラベルが上を向いていない場合、または融解中にカートリッジが裏返しになった場合は、シーケンスデータに悪影響が及びます。
 - ウォーターバスに入れる時間は、8 時間を超えないようにしてください。
 - ウォーターバスでサポートされている数を超えるカートリッジを同時に融解しないでください。適合するウォーターバスについては、[25 ページの「補助的な機器」](#)を参照してください。
 - カートリッジを重ね置きしないでください。
4. カートリッジをウォーターバスから取り出し、ペーパータオルで水分を拭き取ります。

冷蔵庫でのカートリッジの融解

1. 新しいパウダーフリーの手袋をつけます。
2. 予定されているランの前日に、 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ の保管庫からカートリッジを取り出します。
3. 箱からカートリッジを取り出しますが、銀色のホイルバッグは開けないでください。
4. カートリッジを室温にさらします。その際、ラベルを上に向けて置き、側面と上部を空気が循環するようにします。

 袋のラベルが上を向いていない場合、シーケンスデータに悪影響が及びます。

5. 室温で 6 時間融解します。
6. カートリッジを $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫に入れます。その際、ラベルを上に向けて側面を空気が循環するようにします。

 袋のラベルが上を向いていない場合、シーケンスデータに悪影響が及びます。

7. 冷蔵庫で 12 時間融解します。72 時間を超えないようにしてください。

室温でのカートリッジの融解

1. 新しいパウダーフリーの手袋をつけます。
2. $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ の保管庫からカートリッジを取り出します。
3. 箱からカートリッジを取り出しますが、銀色のホイルバッグは開けないでください。
4. ラベルを上に向けてカートリッジを置き、側面と上部を空気が循環するようにします。

 袋のラベルが上を向いていない場合、シーケンスデータに悪影響が及びます。

5. 室温で 9 時間融解します。16 時間を超えないようにしてください。

フローセルとカートリッジの準備

1. 以下の手順に従って、フローセルを準備します。
 - a. $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ の保管庫から新しいフローセルを取り出します。
 - b. 未開封のパッケージを室温で 10 ～ 15 分放置し、パッケージからフローセルを取り出す際の結露を防ぎます。フローセルの温度が室温になったらフローセルの準備を行います。
2. 冷蔵庫を使用して融解した場合は、以下のようになります。
 - a. $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ の保管庫から融解したカートリッジを取り出します。
 - b. シーケンスの前に、未開封のカートリッジを室温で 15 分以上放置します。1 時間を超えないようにしてください。

ライブラリーの希釈

装置上で変性して希釈する場合は、このステップでライブラリーを適切なローディング濃度に希釈します。オプションの 2% PhiX¹ を添加すると、追加のメトリクス、塩基多様性、またはポジティブコントロールが得られます。塩基の多様性が低いライブラリーでは、PhiX の添加割合を増加させる必要があります。

ライブラリーを手動で変性して希釈する場合は、『NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000139235）を参照してください。このステップは、装置上で変性して希釈する場合にのみ適用されます。

ライブラリーを 2 nM に希釈

- （オプション）-25℃～-15℃の保管庫から 10 nM PhiX ストックを取り出します。
PhiX が必要となるのは、オプションで添加する場合または PhiX のみのランを実行する場合のみです。
- （オプション）PhiX を室温で 5 分融解した後、Qubit などの蛍光ベースの方法で定量して PhiX の濃度を確認します。
定量できない場合は、10 nM の濃度で進めます。
- ライブラリーまたは PhiX を軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- 付属の RSB with Tween 20 を希釈溶液として使用し、低吸着マイクロ遠心チューブに 24 µL 以上の 2 nM ライブラリーを調製します。PhiX の添加手順については、[38 ページの「PhiX コントロールの添加（オプション）」](#)を参照してください。
- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。

2 nM ライブラリーをローディング濃度に希釈

- 低吸着マイクロ遠心チューブに以下の量を加えて、適切なローディング濃度に希釈した 24 µL のライブラリーを調製します。

ライブラリータイプ*	ローディング濃度 (pM)	2 nM ライブラリーの量 (µL)	RSB With Tween 20 の量 (µL)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1,000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15

¹PhiX はゲノムサイズが小さい調製済みのイルミナライブラリーであり、バランスの取れた塩基の存在比を示します。

ライブラリータイプ*	ローディング濃度 (pM)	2 nM ライブラリーの量 (μL)	RSB With Tween 20 の量 (μL)
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1,000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1,200	14.4	9.6
TruSeq DNA Nano 550	1,500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1,000	12	12
100% PhiX	650	7.8	16.2

* リストにないライブラリータイプの場合、ローディング濃度を 650 pM から開始し、後続のランで最適化します。この表に示すのは、ローディング濃度の一例です。NextSeq 1000/2000 はイルミナの全ライブラリー調製キットに対応していますが、最適なローディング濃度は変わる場合があります。

- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- シーケンスの準備ができるまで、希釈済みライブラリーを氷上に置いておきます。
ローディング濃度に希釈したライブラリーは、希釈したその日にシーケンスしてください。
- 次のステップは次のとおりです。
 - PhiX を添加する場合は、[38 ページの「PhiX コントロールの添加（オプション）」](#)を参照してください。
 - PhiX を添加しない場合、または PhiX のみのランを実行する場合は、[39 ページの「消耗品のカートリッジへのロード」](#)を参照してください。

PhiX コントロールの添加（オプション）

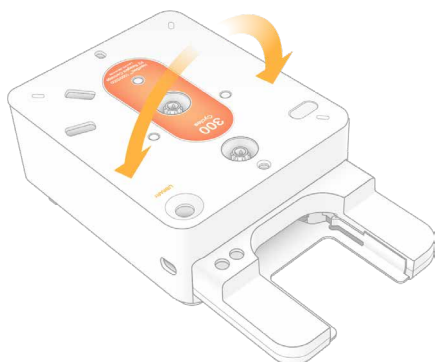
- 低吸着マイクロ遠心チューブに以下の量を加えて、20 μL の 1 nM PhiX を調製します。
 - 10 nM PhiX (2 μL)
 - RSB with Tween 20 (18 μL)
- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- 1 μL の 1 nM PhiX を最終ローディング濃度に希釈した 24 μL のライブラリーに加えます。
この量を加えると、～2% の PhiX を添加したことになります。実際の濃度はライブラリーの品質と量によって異なります。
- シーケンスの準備ができるまで、PhiX を添加したライブラリーを氷上に置いておきます。
PhiX を添加したライブラリーは、希釈したその日にシーケンスしてください。

消耗品のカートリッジへのロード

このステップでは、カートリッジをシーケンスに使用する準備として、あらかじめ充填されている試薬を混ぜ合わせ、希釈済みライブラリーとフローセルをロードします。

カートリッジの準備

1. 上部の両側にある切れ込みから破くかはさみで切って、カートリッジの袋を開きます。
2. 袋からカートリッジを取り出します。袋と乾燥剤を処分します。
3. カートリッジを 10 回転倒混和し、試薬を混ぜ合わせます。
転倒中に内部コンポーネントが音を立てますが、これは正常です。



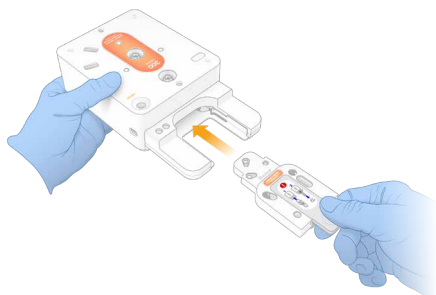
フローセルのロード

1. 上部の両側にある切れ込みから破くかはさみで切って、銀色のホイルパッケージを開きます。
フローセルをすぐに使用できない場合は、[77 ページの「消耗品を保管庫に戻す」](#)を参照してください。
2. フローセルをパッケージから引っ張り出します。
フローセルを保管庫に戻す場合に備えて、ホイルパッケージと乾燥剤は取っておきます。乾燥剤はホイルパッケージの底にある小袋に入っています。シーケンスが開始されたら、パッケージと乾燥剤を処分します。

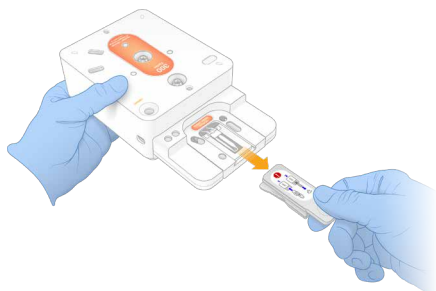


3. ラベルを上に向けてフローセルのグレーのツマミを持ちます。

4. カートリッジの前面のスロットにフローセルを押し込みます。
カチッと音がしてフローセルが固定されます。適切にロードすると、グレーのツマミがカートリッジから突き出た状態になります。

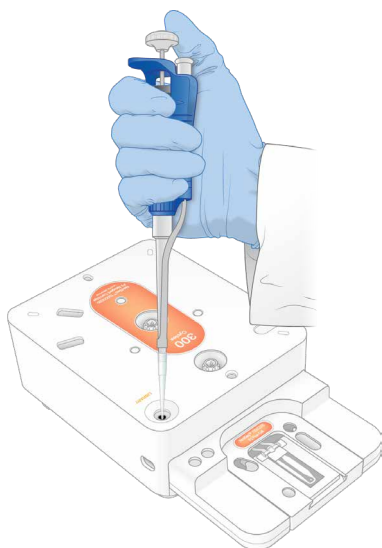


5. グレーのツマミを引っ張って取り外し、フローセルを露出させます。ツマミはリサイクルします。



ライブラリーのロード

1. 新しいP1000 ピペットチップを使用してライブラリーリザーバーに穴を開け、ホイルを端に押して穴を広げます。
2. コンタミネーションを避けるため、ピペットチップを廃棄します。
3. 希釈済みライブラリーの入ったピペットチップをリザーバーの底までゆっくりと下げ、20 μ L の希釈済みライブラリーをリザーバーの底に加えます。ホイルに触れないように注意してください。



シーケンスランの開始

このステップでは、以下の 4 つのモードのいずれかでシーケンスランを開始します。

- クラウドモード：ランは、NextSeq 1000/2000 Control Software の [Planned Runs] のリストから選択されます。シーケンス中に cBCL データが BaseSpace Sequence Hub にアップロードされます。シーケンスが完了すると、BaseSpace Sequence Hub で DRAGEN が自動的に開始されます。
- ハイブリッドモード：ランは、NextSeq 1000/2000 Control Software の [Planned Runs] のリストから選択されます。シーケンスが完了すると、装置上の解析が自動的に開始されます。cBCL データと DRAGEN による二次解析の出力ファイルは、選択した出力フォルダーに保存されます。
- ローカルモード：v2 ファイル形式のサンプルシートを手動で NextSeq 1000/2000 Control Software にインポートします。シーケンスが完了すると、装置上の解析が自動的に開始されます。cBCL データと DRAGEN による二次解析の出力ファイルは、選択した出力フォルダーに保存されます。[Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、シーケンス完了後に BaseSpace Sequence Hub アプリを介して解析を開始することもできます。
- スタンドアロンモード：ランをセットアップし、NextSeq 1000/2000 Control Software の手順に従って cBCL データを生成します。

 | プレランチェック中またはラン中にバイザーを開くと、ランが失敗する可能性があります。

 | バイザーの開閉中は、怪我をしないよう装置に手を近づけないでください。

クラウドランまたはハイブリッドランの開始

1. 17 ページの「ランモードの設定」の説明に従って、ランモードを設定します。
2. [Start] を選択します。
3. BaseSpace Sequence Hub のサインイン認証情報を入力し、[Sign In] を選択します。
4. [Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup で作成したランを含むワークグループを選択します。

 | 間違いを避けるため、ワークグループの選択は必須です。続行する前にワークグループを選択したことを確認してください。

5. [Next] を選択します。
6. ランを選択します。
7. [Analysis]、[Run Length]、[Secondary Analysis] のバージョンが、正しいランと一致していることを確認します。[Analysis] に [Cloud_] と表示され、解析が BaseSpace Sequence Hub で行われることを示します。
8. [Review] を選択します。
9. (オプション) カスタムリードプライマーとカスタムインデックスプライマーの位置を入力します。カスタムプライマーの調製と添加の詳細については、『NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide』（文書番号：1000000139569）を参照してください。使用するライブラリー調製キットの Compatible Products ページを参照して、イルミナカスタムプライマーが必要かどうかを確認してください。

10. (オプション) カスタムレシピを選択します。詳細については、[92 ページの「ダークサイクルシーケンス」](#)を参照してください。
NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降、および Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kit または Illumina Stranded mRNA Prep kit を使用する場合、カスタムレシピが自動的に選択されます。
11. (オプション) ライブラリーを手動で変性して希釈するには、[Denature and Dilute On Board] チェックボックスの選択を解除します。『NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide』(文書番号: 1000000139235) を参照してください。
デフォルト設定は、NextSeq 1000/2000 Control Software の設定に従います。
12. (オプション) 出力フォルダーを変更するには、[Output Folder] フィールドを選択して新しい場所を入力します。[Output Folder] フィールドは既定の設定から自動入力されます。[Proactive, Run Monitoring and Storage] が選択されている場合を除き、出力フォルダーは必須です。
[Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、[Save to BaseSpace Sequence Hub] に [Enabled] と表示されます。
[Proactive and Run Monitoring] を選択した場合は、[Save to BaseSpace Sequence Hub] に [Disabled] と表示されます。
13. ラン情報を確認し、[Prep] を選択します。

ローカルランの開始

1. [17 ページの「ランモードの設定」](#)の説明に従って、ランモードを設定します。
 2. [Start] を選択します。
 3. [Proactive, Run Monitoring and Storage] または [Proactive and Run Monitoring] を選択した場合は、BaseSpace Sequence Hub のサインイン認証情報を入力し、[Sign In] を選択します。
 4. [Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、ランを保存する BaseSpace Sequence Hub のワークグループを選択し、[Next] を選択します。
-  間違いを避けるため、ワークグループの選択は必須です。続行する前にワークグループを選択したことを確認してください。
5. [Start With Sample Sheet] の [Choose...] を選択し、NextSeq 1000/2000 装置、ポータブルドライブ、またはマウントされたネットワークドライブにある v2 形式のサンプルシートの場所に移動します。サンプルシートのファイル名には特殊文字を使用できません。
NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降では、サンプルシートから DRAGEN のバージョンが自動的に検出され、必要に応じてバージョンを切り替えるように指示されます。システムには該当するバージョンの DRAGEN がインストールされている必要があります。インストールについては、[70 ページの「ソフトウェアのアップデート」](#)を参照してください。
 - Instrument Run Setup Used : 該当する場合は、サンプルシート v2 とサポートファイルが入っている .zip フォルダーを選択します。そうでない場合は、サンプルシート v2 を選択します。
 - Instrument Run Setup Not Used : 二次解析サポートファイルがサンプルシート v2 と同じディレクトリにあることを確認します。

- 1** | 選択したサンプルシートは v2 形式でなければなりません。サンプルシート v2 を作成するには、BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup から生成済みのサンプルシートをダウンロードするか、NextSeq 1000/2000 サポートページで提供されているサンプルシート v2 テンプレートを編集します。サンプルシート v2 の形式と要件の詳細については、[81 ページの「サンプルシート v2 の設定」](#)を参照してください。サンプルシートで参照されているすべてのファイルがサンプルシートと同じフォルダーにあることを確認してください。

6. [Review] を選択します。
7. (オプション) カスタムリードプライマーとカスタムインデックスプライマーの位置を入力します。
カスタムプライマーの調製と添加の詳細については、『NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide』（文書番号：1000000139569）を参照してください。使用するライブラリー調製キットの Compatible Products ページを参照して、イルミナカスタムプライマーが必要かどうかを確認してください。
8. (オプション) カスタムレシピを選択します。詳細については、[92 ページの「ダークサイクルシーケンス」](#)を参照してください。
NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降、および Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kit または Illumina Stranded mRNA Prep kit を使用する場合、カスタムレシピが自動的に選択されます。
9. (オプション) ライブラリーを手動で変性して希釈するには、[Denature and Dilute On Board] チェックボックスの選択を解除します。『NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000139235）を参照してください。
デフォルト設定は、NextSeq 1000/2000 Control Software の設定に従います。
10. (オプション) 出力フォルダーを変更するには、[Output Folder] フィールドを選択して新しい場所を入力します。[Output Folder] フィールドは既定の設定から自動入力されます。[Proactive, Run Monitoring and Storage] が選択されている場合を除き、出力フォルダーは必須です。
[Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、[Save to BaseSpace Sequence Hub] に [Enabled] と表示されます。
[Proactive and Run Monitoring] を選択した場合は、[Save to BaseSpace Sequence Hub] に [Disabled] と表示されます。
11. ラン情報を確認し、[Prep] を選択します。

スタンドアロンランの開始

1. [17 ページの「ランモードの設定」](#)の説明に従って、ランモードを設定します。
2. [Start] を選択します。
3. [Proactive, Run Monitoring and Storage] または [Proactive and Run Monitoring] を選択した場合は、BaseSpace Sequence Hub のサインイン認証情報を入力し、[Sign In] を選択します。
4. [Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合は、ランを保存する BaseSpace Sequence Hub のワークグループを選択し、[Next] を選択します。
5. [Set Up New Run] を選択します。

6. [Run Name] フィールドに、セットアップするランを識別するための固有の名前を入力します。
ラン名には、英数字、ダッシュ、ハイフン、アンダースコアを使用できます。
7. [Read Type] で、実行するシーケンスリードの回数を選択します。
 - Single Read : 1 リードのみを実行します。これは簡便性と速度を重視したオプションです。
 - Paired End : リードを 2 回実行します。2 回のリードを統合することで、高品質なデータが得られ、アライメントの精度が向上します。
8. 各リードで実行するサイクル数を入力します。
インデックスサイクル数に上限はありませんが、リードサイクルとインデックスサイクルの合計数を、カートリッジラベルに記載されているサイクル数に 27 を足した数より小さくする必要があります。

Read 1 : 1 ~ 151 のサイクル数を入力します。

Index 1 : インデックス 1 (i7) プライマーのサイクル数を入力します。PhiX のみのランの場合は、両方のインデックスフィールドに「0」と入力します。

Index 2 : インデックス 2 (i5) プライマーのサイクル数を入力します。

Read 2 : 151 サイクルまでの値を入力します。この値は通常、Read 1 の値と同じです。

9. [Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択した場合、[Choose...] を選択してサンプルシートをインポートします。

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降では、サンプルシートから DRAGEN のバージョンが自動的に検出され、必要に応じてバージョンを切り替えるように指示されます。システムには該当するバージョンの DRAGEN がインストールされている必要があります。インストールについては、[70 ページの「ソフトウェアのアップデート」](#)を参照してください。

- 1** | 選択したサンプルシートは v2 形式でなければなりません。サンプルシート v2 を作成するには、BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup から生成済みのサンプルシートをダウンロードするか、NextSeq 1000/2000 サポートページで提供されているサンプルシート v2 テンプレートを編集します。サンプルシート v2 の形式と要件の詳細については、[81 ページの「サンプルシート v2 の設定」](#)を参照してください。サンプルシートで参照されているすべてのファイルがサンプルシートと同じフォルダーにあることを確認してください。

10. (オプション) カスタムリードプライマーとカスタムインデックスプライマーの位置を入力します。
カスタムプライマーの調製と添加の詳細については、『NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide』（文書番号：1000000139569）を参照してください。使用するライブラリー調製キットの Compatible Products ページを参照して、イルミナカスタムプライマーが必要かどうかを確認してください。
11. (オプション) カスタムレシピを選択します。詳細については、[92 ページの「ダークサイクルシーケンス」](#)を参照してください。
12. (オプション) ライブラリーを手動で変性して希釈するには、[Denature and Dilute On Board] チェックボックスの選択を解除します。『NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000139235）を参照してください。
デフォルト設定は、NextSeq 1000/2000 Control Software の設定に従います。

13. (オプション) 出力フォルダーを変更するには、[Output Folder] フィールドを選択して新しい場所を入力します。[Output Folder] フィールドは既定の設定から自動入力されます。[Proactive, Run Monitoring and Storage] が選択されていない限り、出力フォルダーは必要です。
14. [Prep] を選択します。

消耗品を装置にロード

1. (グレーのつまみを取り外した) フローセルと希釈済みライブラリーをロードする前に、カートリッジがすでに融解していて、10 回転倒混和されていることを確認します。
2. [Load] を選択します。
バイザーが開いてトレイが排出されます。
3. カートリッジをトレイに載せます。その際、ラベルを上に向け、フローセルが装置の中に入るようにします。カートリッジを押し込んで固定します。



4. [Close] を選択します。カートリッジが格納されてバイザーが閉まります。
約 3 分後、スキャンされた消耗品の情報が表示されます。
5. (オプション) [Eject Cartridge] を選択し、カートリッジを取り出します。
1 分後にバイザーが開き、カートリッジが排出されます。
6. [Sequence] を選択します。

プレランチェック

プレランチェックでは、装置チェックの後にフルイディクスチェックが行われます。フルイディクスチェック中にカートリッジのシールに穴が開けられます。このとき、ポンという音が 3～4 回装置から聞こえますが、これは正常です。これで試薬がフローセルを通過できるようになります。

! フルイディクスチェックが始まると、消耗品は再利用できません。

1. プレランチェックが完了するまで 15 分ほど待ちます。
正常に完了すると、ランが自動的に開始します。
2. 装置チェック中にエラーが発生した場合は、[Retry] を選択してチェックをやり直します。
チェックが進行している間、現在のチェック項目を示す円が表示されます。
3. 繰り返し発生するエラーのトラブルシューティングを行うには、[76 ページの「エラーメッセージの解消」](#)を参照してください。

ランの進捗状況のモニタリング

1. [Sequencing] 画面に表示されるランの進捗状況とメトリクスをモニタリングします。
 - Estimated run completion：ランが完了する予想日時。Estimated run completion メトリクスでランの完了日時を正確に計算するには、既にランを 10 回実行している必要があります。
 - Average %Q30：Q スコアが 30 以上であるベースコールの平均比率。
 - Projected Yield：そのランでコールされる塩基の予想数。
 - Total Reads PF：フィルターを通過したペアエンド（該当する場合）クラスターの数（百万単位）。
 - Real Time Demux：Read 1、Index 1、Index 2 のサイクルが完了した後、Read 2 の開始時に行われるデマルチプレクシングのステータス。インデックスサイクルが実行されていない場合でも、ステータスは [Complete] と表示されます。クラウドモードのランでは使用できません。
 - Real Time Alignment：Read 1、Index 1、Index 2 のサイクルが完了した後、Read 2 の開始時に行われる Read 1 のアライメントのステータス。クラウドモードのランでは使用できません。

Q30 と Yield のメトリクスは、26 サイクル以降（ランの開始から約 6 時間後）に表示されます。
2. ランのプロセスをモニタリングするには、コントロールソフトウェアのメニューから [Process Management] を選択します。
3. ランを取り消すには、[End Run] を選択します。ランの取り消しの詳細については、[77 ページの「ランの取り消し」](#)を参照してください。
4. 装置から消耗品を取り出します。カートリッジは 3 日以内に装置から取り出してください。

消耗品の取り出し

1. シーケンスが完了したら、[Eject Cartridge] を選択します。
使用済みのカートリッジが装置から排出されます。
2. トレイからカートリッジを取り出します。
3. フローセルをカートリッジから取り出します。
4. フローセルには電子部品が含まれています。各地域の適切な基準に従って、フローセルを廃棄します。
5. （オプション）適切なエリア（シンクまたは有害液体用廃棄容器）の上でカートリッジ側面のイルミナロゴの下にある排液プラグを外します。その際、プラグを水平または下に向けて自分の顔から離れるようにしてください。各地域の適切な基準に従って、使用済みの試薬を排液します。自動試薬パージを有効にしている場合、排液にかかる時間はカートリッジのサイズによって異なります。

 この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。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。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。
6. カートリッジシェルはリサイクルし、試薬カートリッジは廃棄します。詳細については、[47 ページの「カートリッジのコンポーネントのリサイクル」](#)を参照してください。

7. 試薬カートリッジを廃棄します。

フルイディスクはカートリッジとともに廃棄するため、ポストランウォッシュは必要ありません。

8. [Close Door] を選択し、トレイを再ロードして [Home] 画面に戻ります。

トレイが自動的に再ロードされ、センサーによってカートリッジの取り出しが確認されます。

カートリッジのコンポーネントのリサイクル

カートリッジに使用されているプラスチックは、各地域の固形廃棄物リサイクルガイドラインに従ってリサイクルできる場合があります。各地域の固形廃棄物リサイクル業者に問い合わせるか、自治体が指定するリサイクル手順を確認してください。

カートリッジシェルをリサイクルするには、以下の手順に従います。以下にカートリッジのコンポーネントを示します。試薬ウェルプレートとフローセルはリサイクルできません。



- A. フローセルトレイ
- B. フローセルシェル
- C. ピアッサー
- D. バルブアセンブリ
- E. ローターバルブカバー
- F. 底面シェル
- G. 試薬ウェルプレート
- H. 上面シェル

1. カートリッジから排液されていることを確認します。

2. パンチツールを固定具から取り外します。

3. 固定具の幅が広いほうの端部をベンチトップと平行になるように配置します。

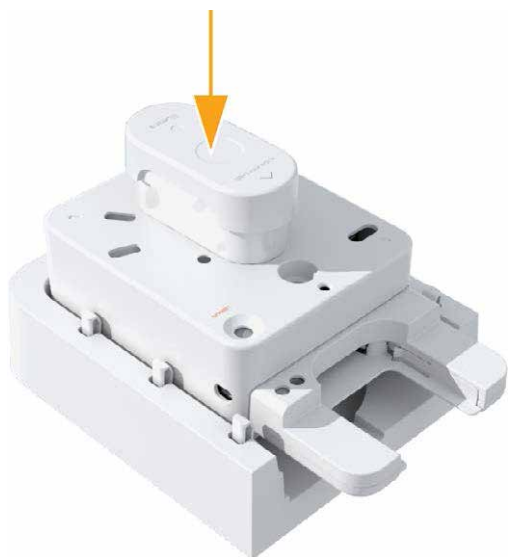
4. 固定具のツメの上にカートリッジを置きます。カートリッジを下に押す必要はありません。



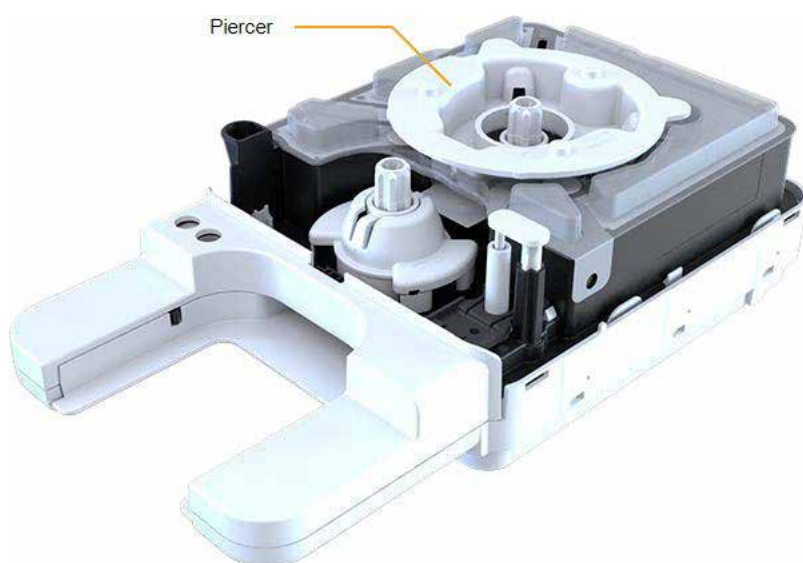
5. カートリッジの位置を後方の2個のツメに合わせます。
6. パンチツールの位置をカートリッジ上面にあるラベルに合わせます。



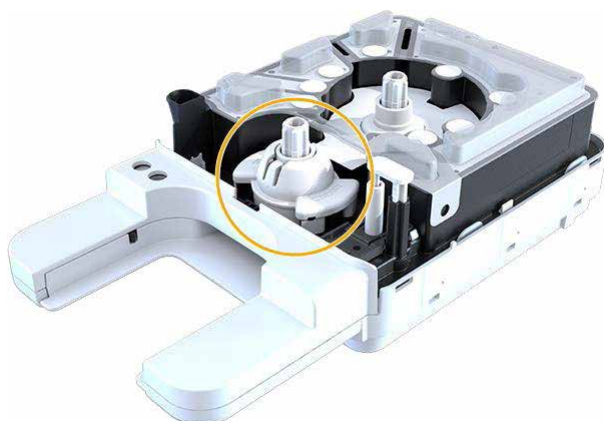
7. パンチツールを強い力ですばやく下に押して、カートリッジシェルを分離します。
カートリッジシェルにかかる力が不十分な場合、シェルが完全に分離されないことがあります。カートリッジシェルが部分的にしか分離されなかった場合、カートリッジを固定具から取り外し、シェルを閉じてから、パンチツールでさらに力をかけます。



8. カートリッジからピアッサーを取り外します。

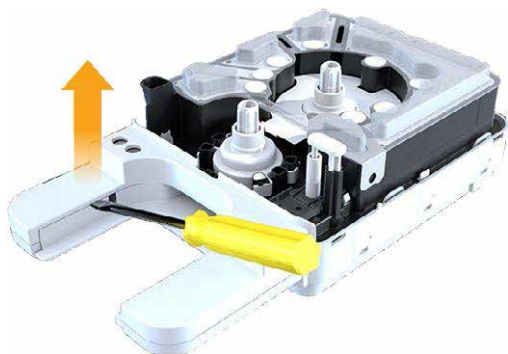


9. ローターバルブアセンブリの前方からカバーを取り外します。



10. フローセルシェルを取り外すには、次のいずれかの方法を実施します。

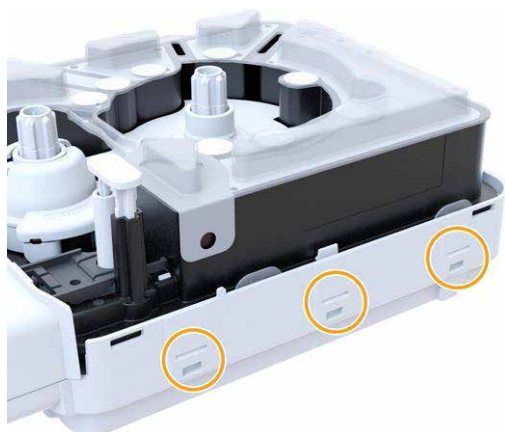
- フローセルシェルと下側アセンブリとの間にマイナスドライバーを差し込み、持ち上げます。



- フローセルシェルを下側アセンブリから引っ張り出します。



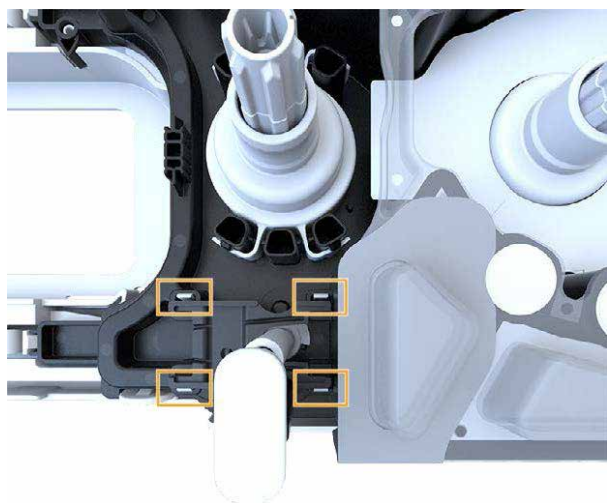
11. 試薬ウェルプレートを下側アセンブリから取り外すには、下側アセンブリの片側にある 1 個のスナップを外し、試薬ウェルプレートを取り外します。



12. フローセルトレイの両方のスナップを外し、フローセルトレイを取り外します。

13. 金属製のスプリングをフローセルトレイから取り外します。

14. バルブアセンブリの 4 個のスナップを、試薬ウェルプレートの端部から離れるように下に向かって押して外します。



15. アセンブリの裏面を引っ張ってバルブアセンブリを取り外します。
16. 各地域の適切な基準に従って、未使用の試薬が残っている可能性のある試薬ウェルプレートを廃棄します。

カートリッジトレイの洗浄

カートリッジトレイの洗浄が必要なのは、カートリッジトレイに試薬が漏れ出した場合のみです。

1. カートリッジを装置から取り出します。
2. 新しいパウダーフリーの手袋をつけ、必要に応じてその他の保護具を着用します。
3. 10% の漂白溶液を布に吹き付けます。
4. 布でカートリッジトレイを拭き、すぐに丈夫なワイプで漂白溶液を拭き取ります。
すぐに拭き取らない場合、カートリッジトレイに漂白剤の跡が残ります。
5. カートリッジトレイに 70% エタノール溶液を吹き付け、すぐに丈夫なワイプで拭き取ります。
6. カートリッジトレイをロード位置に戻します。

シーケンスの出力

このセクションでは、Real-Time Analysis ソフトウェアについて説明します。このソフトウェアは、ベースコーリングを行い、クオリティスコアを割り当て、データを出力します。また、さまざまな出力ファイルタイプと、ラン後にそれらが保存される場所についても説明します。

Real-Time Analysis の概要

NextSeq 1000/2000 システムでは、RTA3（Real-Time Analysis ソフトウェアの実装版）が装置の演算エンジン（CE）で実行されます。RTA3 はカメラから取得したイメージのシグナル強度を抽出し、ベースコーリングを行い、コールされた塩基にクオリティスコアを割り当てます。さらに、PhiX にアライメントし、装置コントロールソフトウェアで参照できるように InterOp ファイルでデータを報告します。

処理時間を最適化するために、RTA3 はメモリーに情報を保持します。RTA3 が中断された場合、処理は再開されず、メモリーに保持された処理中のランデータはすべて失われます。

RTA3 への入力

RTA3 による処理には、ローカルシステムメモリー内のタイルの画像が必要です。RTA3 は、ラン情報と処理コマンドをコントロールソフトウェアから受け取ります。

RTA3 からの出力

各色チャネルのイメージは、タイルとして RTA3 にメモリー内で渡されます。これらのイメージから、クオリティスコアが付加されたベースコールのファイルとフィルターファイルのセットが出力されます。他のすべての出力は出力ファイルをサポートしています。

ファイルタイプ	内容説明
ベースコールファイル	各タイルの解析結果は、連結ベースコール (*.cbcl) ファイルに含まれます。同一レーンかつ同一面のタイルが、レーンおよび面ごとに1つの*.cbcl ファイルに集約されます。
フィルターファイル	クラスターがフィルターをパスしたかどうかを規定するフィルターファイル (*.filter) がタイルごとに生成されます。
クラスターロケーションファイル	クラスターロケーション (*.locs) ファイルには、1つのタイル上の全クラスターの X、Y 座標が記録されています。クラスターロケーションファイルはランごとに生成されます。

出力ファイルは DRAGEN および BaseSpace Sequence Hub での下流の解析に使用されます。

エラー処理

RTA3 はログファイルを生成し、それを Logs フォルダに書き込みます。エラーは *.log ファイル形式のテキストファイルに記録されます。

以下のログファイルが、処理の終了時に最終出力先に転送されます。

info_00000.log には、重要なランイベントの要約が含まれます。

error_00000.log には、ラン中に発生したエラーの一覧が含まれます。

warning_00000.log には、ラン中に発生した警告の一覧が含まれます。

フローセルタイル

タイルはフローセル上の小さなイメージングエリアです。カメラはタイルごとに 1 つのイメージを取得します。

NextSeq 1000/2000 P1 フローセルには合計 32 個のタイルがあります。NextSeq 1000/2000 P2 フローセルには合計 132 個のタイルがあります。NextSeq 2000 P3 フローセルには合計 264 個のタイルがあります。

表 5 フローセルタイル

フローセルの コンポーネント	NextSeq 1000/2000 P1 フローセル	NextSeq 1000/2000 P2 フローセル	NextSeq 2000 P3 フローセル	内容説明
レーン	1	1	2	レーンは光学的に区別できますが、流路的に分離されたチャンネルではありません。
面	2	2	2	P1、P2、P3 フローセルは 2 つの面（上面と底面）でイメージングされます。タイルの上面がまずイメージングされます。
レーンあたりの スワス	4	6	6	スワスはフローセルレーン内の列です。
スワスあたりの タイル数	4	11	11	タイルはスワスの一部であり、フローセル上のイメージングされたエリアを表します。
生成される総タ イル数	32	132	264	レーン × 面 × スワス × スワスあたりのタイル数 = 総タイル数になります。

タイルの命名規則

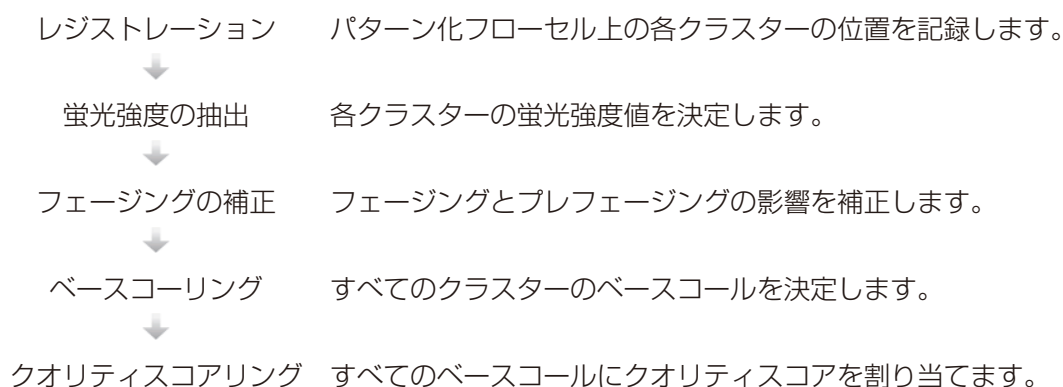
タイル名は、フローセル上のタイル位置を表す 4 桁の番号です。例えば、タイル名 1205 は「上面、スワス 2、タイル 05」を示します。

最初の桁は面を表します。上面が 1、底面が 2 です。

2 桁目はスワス番号を表し、1、2、3、4、5、6 のいずれかになります。

最後の 2 桁はタイル番号を表します。スワス番号 1 ～ 4 については、フローセルの流出口側の 01 から流入口側の 11 までの番号が割り振られます。スワス番号 5 ～ 6 については、流入口側が 01 になり、流出口側が 11 になります。

Real-Time Analysis のワークフロー



レジストレーション

レジストレーションでは、画像と、パターン化フローセル上のナノウェルに対応した錯列四角の配置とが重ね合わされます。ナノウェルは規則正しく配置されているため、タイル内の各クラスターの X 座標と Y 座標はあらかじめ決まっています。各ラン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。

あるサイクルでいずれかのイメージのレジストレーションが失敗した場合、そのサイクルのそのタイルに対してベースコールは行われません。レジストレーションに失敗したイメージは、Sequence Analysis Viewer を使用して特定できます。

蛍光強度の抽出

レジストレーションが完了した後、特定のイメージ中の各ナノウェルの蛍光強度値が計算されます。レジストレーションに失敗した場合、そのタイルの蛍光強度は抽出できません。

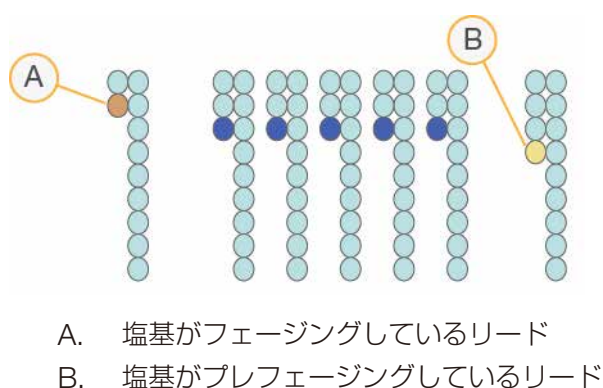
フェージングの補正

シーケンス反応中、クラスター内の各 DNA 鎖はサイクルごとに 1 塩基ずつ伸長します。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こります。

塩基が遅れる方へずれるとフェージングが起こります。

塩基が先へ進む方へずれるとプレフェージングが起こります。

図 5 フェージングとプレフェージング



RTA3 はフェーシングとプレフェーシングの影響を補正します。これにより、ラン全体のすべてのサイクルでデータ品質が向上します。

ベースコーリング

ベースコーリングでは、特定のサイクルにおいて特定のタイルのすべてのクラスターに対する塩基（A、C、G、T）を決定します。NextSeq 1000/2000 システムは 2 色チャンネルシーケンスを使用するため、緑チャンネルと青チャンネルからの 2 つのイメージのみを使用して 4 つの DNA 塩基のデータをエンコードできます。

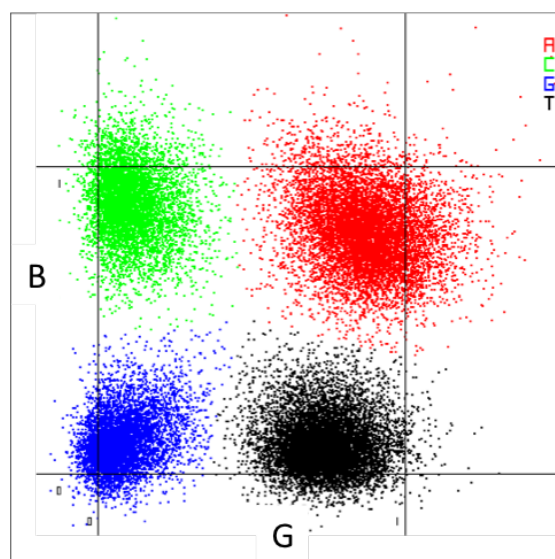
No Call は N で識別されます。No Call は、クラスターがフィルターを通過しなかった場合、レジストレーションが失敗した場合、またはクラスターがイメージから外れた場合に起こります。

各クラスターのシグナル強度が緑と青のイメージから抽出されて互いに比較され、その結果 4 つの集団に分けられます。各集団がそれぞれ 1 つの塩基に対応します。ベースコーリングプロセスは、各クラスターが属する集団を決定します。

表 6 2 色チャンネルシーケンスのベースコール

塩基	緑チャンネル	青チャンネル	結果
A	1 (存在する)	1 (存在する)	緑チャンネルと青チャンネルの両方でシグナル強度を示すクラスター。
C	0 (存在しない)	1 (存在する)	青チャンネルのみでシグナル強度を示すクラスター。
G	0 (存在しない)	0 (存在しない)	既知のクラスター位置でシグナル強度を示さないクラスター。
T	1 (存在する)	0 (存在しない)	緑チャンネルのみでシグナル強度を示すクラスター。

図 6 クラスターシグナル強度の可視化



i 各クラスターの色は、Sequence Analysis Viewer (SAV) および BaseSpace Sequence Hub Run Data by Cycle の %Base プロットに関連しています。緑チャンネルおよび青チャンネルには関連していません。

フィルターを通過するクラスター

ラン中に RTA3 は生データをフィルターして、データクオリティ閾値に満たないリードを除去します。オーバーラップしたり、低品質のクラスターが取り除かれます。

2 色チャンネル解析において、RTA3 は集団ベースの方式を使用してベースコールの Chastity（シグナル強度の純度）を決定します。最初の 25 サイクルのうち、Chastity が所定の閾値を下回るベースコールが 1 つ以下であった場合、そのクラスターはフィルターを通過します（PF）。含まれている場合、PhiX アライメントは、サイクル 26 の時点で、フィルターを通過したクラスターに対応するタイルのサブセット上で実行されます。フィルターを通過しなかったクラスターについては、ベースコールとアライメントは行われません。

クオリティスコア

クオリティスコア（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、ベースコールのクオリティが高く、正しい可能性が高いことを示しています。Q スコアを決定した後、ベースコール（*.cbcl）ファイルに結果が記録されます。

Q スコアは、エラーの確率がどれだけ小さいかを簡潔に伝える指標です。クオリティスコアは Q(X) として表されます（X はスコア）。次の表に、クオリティスコアとエラーの確率の関連性を示します。

Q スコア Q(X)	エラーの確率
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）

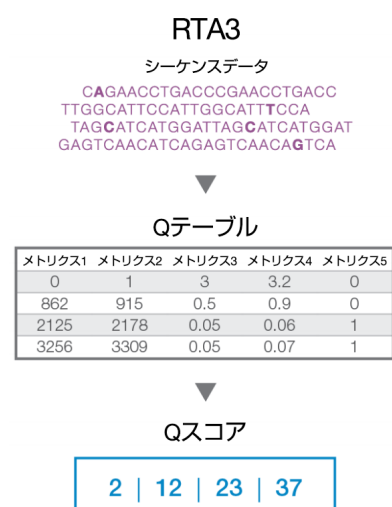
クオリティスコアリングおよびレポーティング

クオリティスコアリングは、ベースコールごとにいくつかの予測因子を計算し、その値を基にクオリティテーブルを参照して Q スコアを割り当てます。クオリティテーブルは、特定のシーケンシングシステム構成とケミストリーバージョンの組み合わせから作成されたランに対して最適なクオリティの予測値を与えるように作られています。

1 | 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いています。

NextSeq 1000/2000 システムの Q テーブルを作成するにあたり、特定の予測的特徴のクラスターリングに基づいて、3 つのベースコールグループを決定しました。ベースコールをグループ化した後、3 つのグループそれぞれの平均エラー率を経験的に計算し、対応する Q スコアを、そのグループに関連する予測的特徴とともに Q テーブルに記録しました。そのため、RTA3 で可能な Q スコアは 3 つだけであり、これらの Q スコアはグループの平均エラー率を表します（58 ページの「RTA3 の簡素化された Q スコアリング」）。その結果、全体的に見て、簡素でありながら精度の高いクオリティスコアリングになっています。Q テーブルの 3 つのグループは最低限（Q15 未満）、中程度（～Q20）、高品質（Q30 超）のベースコールに対応し、それぞれ 12、23、37 というスコアが割り当てられています。さらに、ノーコールには 2 という無効なスコアが割り当てられています。この Q スコアのレポーティングモデルにより、正確さやパフォーマンスに影響を与えずに、必要なストレージ容量と帯域幅が削減されました。

図 7 RTA3 の簡素化された Q スコアリング



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
連結ベースコールファイル	解析された各クラスターは、サイクル、レーン、および面ごとに1つのファイルに集約された連結ベースコールファイルに記録されます。この集約されたファイルには、各クラスターの連結ベースコールとエンコードされたクオリティスコアが含まれます。連結ベースコールファイルは、BaseSpace Sequence Hub または bcl2fastq2 によって使用されます。 Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L [レーン] _ [面] .cbcl (例: L001_1.cbcl)
クラスターロケーションファイル	フローセルごとに作成されるバイナリー形式のクラスターロケーションファイルには、タイル内のクラスターのXY座標が含まれます。フローセルのナノウェルレイアウトと一致する六角形のレイアウトにより、座標はあらかじめ定められています。 Data/Intensities s_ [レーン] .locs
フィルターファイル	フィルターファイルは、クラスターがフィルターを通過したかどうかを示します。サイクル26の時点で、25サイクルまでのデータを使用してフィルターファイルが作成されます。タイルごとに1つのフィルターファイルが生成されます。 Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_ [レーン] _ [タイル] .filter
InterOp ファイル群	このバイナリー形式のレポートファイルは、装置上では装置コントロールソフトウェアを使用して、装置外では SAV または BaseSpace Sequence Hub を使用して表示できます。InterOp ファイルはラン全体を通じて更新されます。 InterOp フォルダー
ラン情報ファイル	ラン名、各リードのサイクル数、リードがインデックスリードであるかどうか、フローセル上のスワスとタイルの番号の一覧が含まれます。ラン情報ファイルは、ランの開始時に生成されます。 [Root フォルダー]、RunInfo.xml

DRAGEN による二次解析の出力ファイル

DRAGEN Bio-IT Platform は、以下のいずれかの解析パイプラインを使用して、シーケンス出力を装置上でさらに解析します。

- BCL 変換
- Germline
- RNA
- Enrichment
- Single Cell RNA
- DNA Amplicon

このセクションでは、出力ファイルの情報など、DRAGEN の各パイプラインについて説明します。DRAGEN は、各パイプラインに固有のファイルを生成するだけでなく、解析から得られたメトリクスを <サンプル名>.metrics.json ファイルおよび [63 ページの「DRAGEN BCL 変換パイプライン」](#) に示すレポートで提供します。DRAGEN の詳細については、[DRAGEN Bio-IT Platform のサポートサイトページ](#) を参照してください。

すべての DRAGEN パイプラインは、入力 BCL ファイルの解凍と出力 BAM/CRAM ファイルの圧縮をサポートします。

出力ファイルに関する考慮事項：

- Germline、RNA、Enrichment、および DNA Amplicon パイプラインを使用して装置上の解析を実行する場合、[Proactive, Run Monitoring and Storage] を選択していても、BAM ファイルは BaseSpace Sequence Hub にアップロードされません。

DRAGEN Enrichment パイプライン

DRAGEN Enrichment パイプラインは、以下の機能をサポートします。DRAGEN 3.7 以降を使用する場合、生殖細胞モードと体細胞（腫瘍のみ）モードの両方がサポートされます。

- サンプルのデマルチプレックス
- マッピングとアライメント（ソートと重複マーキングを含む）
- スモールバリエーションコール
- 構造多型コール

バリエーションコーリングを実行するには、*.bed ファイルをサンプルシートに含めるか、BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup で指定する必要があります。構造多型コールは、ペアエンドリードおよび生殖細胞モードの場合にのみ生成されます。

DRAGEN Enrichment バージョン 3.8 以降を使用する場合、ノイズベースラインファイルを入力して体細胞モードでの性能を改善できます。[16 ページの「ノイズベースラインファイルのインポート」](#) を参照してください。

このパイプラインは、以下の出力ファイルを生成します。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名
マッピング / アライニング	BAM または CRAM	• < サンプル名 >.bam、または • < サンプル名 >.cram
スモールバリエーションコール	VCF および gVCF*	• < サンプル名 >.hard-filtered.gvcf.gz • < サンプル名 >.hard-filtered.vcf.gz
構造多型コール	VCF	• < サンプル名 >.sv.vcf.gz

* gVCF 出力ファイルを使用できるのは、生殖細胞モードの場合のみです。

DRAGEN Germline パイプライン

DRAGEN Germline パイプラインは、以下の機能をサポートします。

- サンプルのデマルチプレックス
- マッピングとアライメント（ソートと重複マーキングを含む）
- スモールバリエーションコール
- ペアエンドリード用構造多型コール
- ヒトゲノム用コピー数バリエーションコール
- ヒトゲノム用リピート伸長
- ヒトゲノム用ホモ接合性領域
- （DRAGEN v3.8 以降）CYP2D6 の検出

構造多型コールは、ペアエンドリードの場合にのみ生成されます。

このパイプラインは、以下の出力ファイルを生成します。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名
マッピング / アライニング	BAM または CRAM	• < サンプル名 >.bam、または • < サンプル名 >.cram
スモールバリエーションコール	VCF および gVCF	• < サンプル名 >.hard-filtered.gvcf.gz • < サンプル名 >.hard-filtered.vcf.gz
構造多型コーラー	VCF	• < サンプル名 >.sv.vcf.gz
コピー数バリエーション	VCF	• < サンプル名 >.cnv.vcf.gz
リピート伸長	VCF	• < サンプル名 >.repeats.vcf.gz
ホモ接合性領域	CSV および BED	• < サンプル名 >.roh_metrics.csv • < サンプル名 >.roh.bed
CYP2D6 の検出	TSV	• < サンプル名 >.cyp2d6.tsv

DRAGEN DNA Amplicon パイプライン

DRAGEN DNA Amplicon パイプラインは、以下の機能をサポートします。

- サンプルのデマルチプレックス
- マッピングとアライメント（ソートと重複マーキングを含む）
- 生殖細胞モードまたは体細胞モードでのスモールバリエントコール

バリエントコーリングを実行するには、*.bed ファイルをサンプルシートに含めるか、BaseSpace Sequence Hub の Instrument Run Setup で指定する必要があります。

このパイプラインは、以下の出力ファイルを生成します。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名
マッピング / アライニング	BAM または CRAM	• < サンプル名 >.bam、または • < サンプル名 >.cram
スモールバリエントコール	VCF および gVCF*	• < サンプル名 >.hard-filtered.gvcf.gz • < サンプル名 >.hard-filtered.vcf.gz

* gVCF 出力ファイルを使用できるのは、生殖細胞モードの場合のみです。

DRAGEN RNA パイプライン

DRAGEN RNA パイプラインは、以下の機能をサポートします。

- サンプルのデマルチプレックス
- マッピングとアライメント（ソートと重複マーキングを含む）
- 遺伝子融合検出
- 転写因子の定量
- （DRAGEN v3.8 以降）遺伝子発現差解析

出力ファイルを生成するには、サンプルシートに GTF ファイルを指定するか、既定の genes.gtf.gz と リファレンスゲノムが存在することを確認します。

このパイプラインは、以下の出力ファイルを生成します。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名	内容説明
マッピング / アライニング	BAM または CRAM	• < サンプル名 >.bam、または • < サンプル名 >.cram	SAM 仕様を満たすアライメント出力。
遺伝子融合検出	プレーンテキスト	• < サンプル名 >.fusion_candidates.preliminary	• フィルターが適用される前の融合候補。
		• < サンプル名 >.fusion_candidates.final	• フィルターが適用された後の融合候補。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名	内容説明
転写因子の定量	プレーンテキスト	- sample_name.quant.genes.sf - sample_name.quant.sf	- 遺伝子レベルでの転写因子の定量結果。 - すべての転写因子の定量結果。
発現差解析	PNG	以下の発現差出力ファイルの表を参照してください。	出力ファイルを生成するには、サンプルシートに比較対象が設定されている必要があります。

発現差解析が有効になっている場合、以下のファイルが出力されます。

ファイル名	内容説明
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	発現差解析メトリクスが含まれます。
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	コントロールグループと比較グループのサンプルごとに、各遺伝子にマップされたリードの数が記載されます。
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	コントロールグループと比較グループのサンプルについて、発現差のある遺伝子の発現を表すヒートマップです。このヒートマップには、調整された p 値が -0.05 未満である、発現差のある遺伝子のみが示されます。発現差のある遺伝子の数が 30 を超える場合、上位 30 位までの発現差のある遺伝子のみが使用されます。DESeq1 が収束に失敗した場合、または発現差のある遺伝子が存在しない場合、ファイルは生成されません。
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	遺伝子発現比のばらつきが平均シグナル強度の関数として示されます。2 つのサンプルの測定値の差を示すために、データが M（ログ比率）スケールと A（平均）スケールに変換され、値がプロットされます。MA プロットでは、すべてのサンプルについて、ノーマライズされたカウントの平均に対する特定の変数に起因する log2 倍率変化が示されます。調整された p 値が 0.1 未満の場合、点は赤色です。ウィンドウの範囲外の点は、白三角でプロットされます。上向き三角は、正の対数倍率変化を表します。下向き三角は、負の対数倍率変化を表します。
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	最も大きい差異を説明する、最初の 2 つの主要要素を示すプロットです。
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	DESeq2 の結果が含まれます。この結果では、発現量の平均値、log2（倍率変化）、log2 の標準誤差、p 値、調整された p 値、各遺伝子の発現状態が示されます。
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	DESeq2 により計算された、正規化された対数変換カウントが含まれます。

DRAGEN Single Cell RNA パイプライン

DRAGEN Single Cell RNA パイプラインは、以下の機能をサポートします。

- サンプルのデマルチプレックス
- マッピングとアライメント（ソートと重複マーキングを含む）
- 細胞および遺伝子の分類

出力ファイルを生成するには、サンプルシートに GTF ファイルを指定するか、既定の `genes.gtf.gz` とリファレンスゲノムが存在することを確認します。

このパイプラインは、以下の出力ファイルを生成します。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名
マッピング / アライニング	BAM または CRAM	• < サンプル名 >.bam、または • < サンプル名 >.cram
細胞 / 遺伝子分類	TSV、CSV、MTX	• < サンプル名 >.scRNA.barcodeSummary.tsv • < サンプル名 >.scRNA.genes.tsv • < サンプル名 >.scRNA.matrix.mtx
解析レポート	HTML	< サンプル名 >.dragen.scrna-report.*.html

DRAGEN BCL 変換パイプライン

DRAGEN BCL 変換パイプラインは、シーケンスランで生成された BCL データとサンプルシートの情報を使用して、各サンプルの FASTQ ファイルを出力します。FASTQ ファイル名は < サンプル名 >.fastq.gz です。

このパイプラインは、以下のレポートを生成します。

コンポーネント	タイプ	出力ファイル名
デマルチプレックス	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
アダプターメトリクス	CSV	• Adapter_Metrics.csv
インデックスホッピング	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
上位の不明なバーコード	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

デマルチプレックス統計レポート

デマルチプレックス統計レポートには、サンプルシート内の各サンプルに割り当てられたパスフィルターリード数に関する情報が含まれています。サンプルと明確に関連付けられていないリードは、「undetermined」と分類されます。また、各サンプルに割り当てられたパスフィルター（PF）リード内の塩基のクオリティスコアに関する情報も含まれます。

このレポートには以下の情報が含まれます。

メトリクス	内容説明
Lane	サンプルをシーケンスしたフローセルのレーン。
SampleID	サンプルシートから取得されたサンプル ID。リードがどのサンプルにも対応しない場合、このフィールドには「undetermined」と表示されます。
Index	サンプルシートの Index Read 1 と Index Read 2 をハイフンで区切って連結したもの。リードがどのサンプルにも対応しない場合、このフィールドには「undetermined」と表示されます。
# Reads	指定したレーンのサンプルに対してデマルチプレックスされた PF リードの数。
# Perfect Index Reads	サンプルシートに指定されているインデックス配列の組み合わせに完全に一致するリードの数。
# One Mismatch Index Reads	サンプルシートに指定されているインデックス配列の組み合わせにおいてエラーが 1 つのリードの数。
# of $\geq$ Q30 Bases (PF)	Q30 クオリティ閾値を超えるリードに対応する塩基（アダプターを含む）の数。
Mean Quality Score (PF)	指定したレーンのサンプルに対応するリードの平均クオリティスコア。この値にはアダプター塩基が含まれます。

アダプターメトリクスレポート

アダプターメトリクスファイルには、各リードに関連するアダプターとサンプル塩基の数が含まれます。このレポートには以下の情報が含まれます。

メトリクス	内容説明
Lane	サンプルをシーケンスしたフローセルのレーン。
Sample_ID	サンプルシートから取得されたサンプル ID。リードがどのサンプルにも対応しない場合、このフィールドには「undetermined」と表示されます。
Index	サンプルシートから取得された Index1 シーケンス。サンプルシートに Index が指定されていない場合、またはサンプル ID の値が「undetermined」の場合、このフィールドはブランクになります。
Index2	サンプルシートから取得された Index2 シーケンス。サンプルシートに Index2 が指定されていない場合、またはサンプル ID の値が「undetermined」の場合、このフィールドはブランクになります。
R1_AdapterBases	サンプルシートの AdapterRead1 に対応する塩基の数。
R1_SampleBases	対応するレーンおよびサンプルの、Read 1 からトリムまたはマスクされた塩基の数。
R2_AdapterBases	サンプルシートの AdapterRead2 に対応する塩基の数。
R2_SampleBases	対応するレーンおよびサンプルの、Read 2 からトリムまたはマスクされた塩基の数。
# Reads	指定したレーンのサンプルに対するリードの数。

インデックスホッピングカウントレポート

インデックスホッピングカウントレポートには、デュアルインデックスランにおいて期待されるインデックスとホッピングが起こったインデックスのリードの数が含まれます。このレポートには、レーンごとの、どちらのインデックスでもバーコードの重複が検出されないユニークデュアルインデックスのみが含まれます。レーンのインデックスホッピングメトリクスを生成するには、各インデックス内のすべてのエントリーペアに少なくとも $2N + 1$ のハミング距離が必要です。ここで N は、そのインデックスに指定されたバーコードの許容されるミスマッチ数を示します。

このレポートには以下の情報が含まれます。

インデックスのないラン、シングルインデックスラン、またはユニークデュアルインデックスを含まないレーンの場合、このファイルにはヘッダーのみが含まれます。

メトリクス	内容説明
Lane	サンプルをシーケンスしたフローセルのレーン。
# Reads	指定したレーンのサンプルに対するリードの数。
SampleID	サンプルシートから取得されたサンプル ID。リードがどのサンプルにも対応しない場合、このフィールドには「undetermined」と表示されます。
Index	サンプルシートから取得された Index1 シーケンス。リードがシングルエンドの場合、またはサンプル ID の値が「undetermined」の場合、このフィールドはブランクになります。
Index2	サンプルシートから取得された Index2 シーケンス。リードがシングルエンドの場合、またはサンプル ID の値が「undetermined」の場合、このフィールドはブランクになります。

上位の不明なバーコードレポート

上位の不明なバーコードレポートには、許容されるミスマッチ数に従って、サンプルシートで識別されなかったレーンごとの上位 100 のインデックスまたはインデックスペアが含まれます。100 番目に高いインデックスカウントエントリーとして配置されたインデックスが複数ある場合、同じカウントのすべてのインデックス値が 100 番目のエントリーとして出力されます。

このレポートには以下の情報が含まれます。

メトリクス	内容説明
Lane	サンプルをシーケンスしたフローセルのレーン。
Index	Index Read 1 の各不明インデックスの配列。不明インデックスがない場合、このフィールドはブランクになります。
Index2	Index Read 2 の各不明インデックスの配列。ランがシングルリードの場合、または不明インデックスがない場合、このフィールドはブランクになります。
# Reads	指定したレーンのサンプルに対するリードの数。

ILLUMINA DRAGEN QC レポート

すべてのパイプラインについて、DRAGEN FastQC による QC プロットがデフォルトで生成されます。集約された QC 結果は `AggregatedFastqcMetrics` フォルダに保存され、サンプルごとの結果は < サンプル名 > フォルダに保存されます。

サンプル数が 512 より多い場合、QC レポートは生成されません。

以下の QC プロットが提供されます。

QC プロット	内容説明
<code>adapter_content</code>	各塩基対のシーケンスの割合。
<code>positional_mean_quality</code>	各リード位置の、Phred スケールのベースクオリティスコアの平均。
<code>gc_content</code>	各シーケンスリードの GC コンテンツの割合。
<code>positional_quality.read_1</code>	Read 1 の特定の位置での、特定のヌクレオチドを持つ塩基の Phred スケールのクオリティ値の平均。
<code>gc_quality</code>	
<code>positional_quality.read_2</code>	Read 2 の特定の位置での、特定のヌクレオチドを持つ塩基の Phred スケールのクオリティ値の平均。
<code>n_content</code>	
<code>read_length</code>	各リードのシーケンス長。
<code>positional_base_content.read_1</code>	Read 1 の特定の位置での、各ヌクレオチドの塩基の数。
<code>read_quality</code>	各シーケンスリードの、Phred スケールのクオリティスコアの平均。
<code>positional_base_content.read_2</code>	Read 2 の特定の位置での、各ヌクレオチドの塩基の数。

DRAGEN による二次解析の出力フォルダーの構成

デフォルト設定では、DRAGEN は [Settings] タブで選択されている出力フォルダーに出力ファイルを生成します。DRAGEN は、各ワークフローについて、`report.html` ファイルにサマリーレポートを生成します。

📁 Data

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr_.txt`

📄 `*stdout_.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `d1m_prev_48_hrs.log`

SampleSheet.csv

ランの入力ファイル (BED ファイル、GTF ファイルなど)

sample_name

enrich_caller、germline_seq、dna_amplicon_seq、rna_seq、または scrna_seq

sample_name

*.png

dragen_*.log

sample_name.*.metrics.csv

[DNA] sample_name.*.vcf.gz

[DNA] sample_name.*.gvcf.gz : DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon (体細胞) パイプラインでは提供されません。

sample_name.*.bam または sample_name.*.cram

Logs

[RNA] sample_name.fusion_candidates.filter_info

[RNA] sample_name.fusion_candidates.final

[RNA] sample_name.quant.genes.sf

[RNA] sample_name.quant.sf

sample_name.metrics.json

[scRNA] sample_dragen-scrna-report.*.html

[scRNA] sample_name.scRNA.barcodeSummary.tsv

[Germline] sample_name.roh_metrics.csv

[Germline] sample_name.roh.bed

[Germline] sample_name.cyp2d6.tsv

sample_name.fastqc_metrics.csv

sample_name.trimmer_metrics.csv

[RNA] DifferentialExpression

Comparison1

Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv

Control_vs_Comparison.genes.counts.csv

Control_vs_Comparison.genes.disp.pdf

Control_vs_Comparison.genes.heatmap.pdf

Control_vs_Comparison.genes.ma.pdf

- Control_vs_Comparison.genes.pca.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.res.csv
- Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv

- ComparisonN

- logs

- *.txt
 - *.csv

- fastq : KeepFastq が true に設定されている場合にのみ存在します。

- *.fastq.gz

- ora_fastq : FastqCompressionFormat が dragen に設定されている場合にのみ存在します。

- *.fastq.ora

- RunInstrumentAnalyticsMetrics

- 0001

- dataset.json
 - fastqc_metrics.csv

- 0002

- dataset.json
 - fastqc_metrics.csv
 - Adapter_Metrics.csv
 - Demultiplex_Stats.csv
 - Index_Hopping_Counts.csv

- Reports

- Demultiplex_Stats.csv
 - RunInfo.xml
 - Trim_Metrics.csv
 - fastq_list.csv
 - SampleSheet.csv
 - Index_Hopping_Counts.csv
 - Top_Unknown_Barcodes.csv

📁 Read1InstrumentAnalyticsMetrics : ペアエンドリードの場合のみ。

📁 0001

📄 dataset.json

📁 0002

📄 dataset.json

📄 Adapter_Metrics.csv

📄 Demultiplex_Stats.csv

📄 Index_Hopping_Counts.csv

📁 Read1Metrics : ペアエンドリードの場合のみ。

📄 Adapter_Metrics.csv

📄 Index_Hopping_Counts.csv

メンテナンス

このセクションでは、正常なシステムを維持するために必要な手順について説明します。ソフトウェアアップデートのインストール方法、エアフィルターの交換方法、その他の定期的なメンテナンス手順の実施方法について記載されています。コントロールソフトウェアを最新の状態に保つことで、最新のバグ修正および機能がシステムにインストールされ、最適な性能が得られます。

ハードドライブスペースのクリア

シーケンスランを実行するには、ローカルハードドライブに最大 600 GB のスペースが必要になる場合があります。ハードドライブの空きスペースが少ないときは、警告通知が表示されます。ハードドライブのスペースを空けるには、以下の手順に従って完了したランとインストールされているリファレンスゲノムを一時的なランフォルダーから削除します。

! ランの削除は、オペレーティングシステムを介して手動で行うのではなく、NextSeq 1000/2000 Control Software を使用して行ってください。手動でランを削除すると、コントロールソフトウェアに悪影響が及ぶ可能性があります。

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Disk Management] を選択します。
[Disk Management] 画面が開き、ローカルハードドライブに保存されているランとリファレンスゲノムのリストが表示されます。
2. 削除するランに対して [Delete Run] を選択します。
ランを削除すると、ローカルのランフォルダーが削除されます。ランフォルダーのコピーである出力フォルダーは残ります。
3. ダイアログボックスで [Yes, Delete Run] を選択してランの削除を確定します。
4. 削除する各ランについて、ステップ 2 と 3 を繰り返します。
5. 削除するゲノムに対して [Delete Genome] を選択します。
6. ダイアログボックスで [Yes, Delete Genome] を選択します。
7. 削除する各ゲノムについて、ステップ 5 と 6 を繰り返します。
8. 終了したら、[Disk Management] を閉じて [Home] 画面に戻ります。

ソフトウェアのアップデート

ソフトウェアをアップデートすると、最新の機能やバグ修正がシステムにインストールされます。ソフトウェアのアップデートはシステムスイートにまとめられています。これには以下のソフトウェアが含まれます。

- NextSeq 1000/2000 Control Software
- NextSeq 1000/2000 recipes
- Universal Copy Service
- Real-Time Analysis

1 | DRAGEN モジュールはシステムスイートに含まれません。必要に応じて個別にインストールしてください。DRAGEN モジュールソフトウェアにはサポートページからアクセスします。

システム設定により、ソフトウェアのアップデートは自動または手動でダウンロードするように指定されています。

- 自動アップデート：アップデートが BaseSpace Sequence Hub から自動的にダウンロードされ、インストールされます。このオプションを使用する場合はインターネット接続が必要ですが、BaseSpace Sequence Hub アカウントは必要ありません。
- 手動アップデート：ウェブから手動でアップデートをダウンロードしてローカルまたはポータブルドライブに保存し、保存した場所からインストールを行います。このオプションを使用する場合、装置はインターネットに接続していなくてもかまいません。

自動でソフトウェアアップデートをインストール

1. シーケンスランや装置上の二次解析が進行中でないことを確認します。
2. ilmnadmin でログインします。
3. コントロールソフトウェアのメニューから [Software Update] を選択します。
自動アップデートが設定されているシステムでは、ソフトウェアのアップデートが入手可能になるとアラートが表示されます。
4. アップデートを確認するには、[Check Online for Software Update] を選択します。
5. [Update Now] を選択し、新しいバージョンのソフトウェアをダウンロードします。
ダウンロードが完了すると、コントロールソフトウェアが終了し、インストールウィザードが表示されます。
6. インストール確認メッセージが表示されるまで、インストールウィザードの指示に従います。
7. 確認メッセージを閉じます。
コントロールソフトウェアが自動的に再起動します。
8. ソフトウェアの再起動後にファームウェアのアップデートを求めるメッセージが表示された場合、アップデートを進めます。ファームウェアのアップデート中は、装置の画面が黒くなります。アップデートが完了すると、完了メッセージが表示されます。
ファームウェアをアップデートした後は必ず装置を再起動します。[78 ページの「装置の再起動」](#)を参照してください。

1 | インストールの開始後にアップデートをキャンセルすることはできません。アップデートをキャンセルできるのはダウンロード中のみです。

手動でソフトウェアアップデートをインストール

1. ilmnadmin でログインします。
2. シーケンスランや装置上の二次解析が進行中でないことを確認します。
3. ソフトウェアアップデートが入手可能な場合、[NextSeq 1000/2000 システムサポートページ](#)からスイートインストーラー (*.tar.gz) をダウンロードします。インストーラーをローカルまたはポータブルドライブに保存します。
4. インストーラーをポータブルドライブに保存した場合、装置の側面および背面にある USB 3.0 ポートにこのドライブを接続します。
5. コントロールソフトウェアのメニューから [Software Update] を選択します。
6. [Choose...] を選択し、インストーラーの場所に移動します。
7. [Update Now] を選択してインストールを開始します。
インストール中はビジーインジケーターが表示されます。インストールが完了すると、インストール確認メッセージが表示されます。
8. 確認メッセージを閉じます。
コントロールソフトウェアが自動的に再起動します。
9. ソフトウェアの再起動後にファームウェアのアップデートを求めるメッセージが表示された場合、アップデートを進めます。ファームウェアのアップデート中は、装置の画面が黒くなります。アップデートが完了すると、完了メッセージが表示されます。
ファームウェアをアップデートした後は必ず装置を再起動します。[78 ページの「装置の再起動」](#)を参照してください。

1 | インストールの開始後にアップデートをキャンセルすることはできません。アップデートをキャンセルできるのはダウンロード中のみです。

DRAGEN のワークフローおよびライセンスのアップデート

DRAGEN ワークフローのインストールと DRAGEN ライセンスの更新ができるのは、システム管理者のみです。

オンラインでの DRAGEN ライセンスの更新

NextSeq 1000/2000 がインターネットに接続されている場合は、以下の手順に従って DRAGEN Bio-IT Platform のライセンスをアップデートします。

1. イルミナのテクニカルサポートに連絡して、新しいライセンスキーを入手します。
2. ライセンスを自動的に更新する場合は、24 時間待ちます。直ちに更新する場合は、以下の手順に従います。
 - a. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[DRAGEN] を選択します。
 - b. [Check Online] を選択し、新しい DRAGEN ライセンスキーが使用可能かどうかを確認します。
 - c. 使用可能な場合は、[Update] を選択します。

オフラインでの DRAGEN ライセンスの更新

NextSeq 1000/2000 がインターネットに接続されていない場合は、以下の手順に従って DRAGEN Bio-IT Platform のライセンスをアップデートします。

1. イルミナのテクニカルサポートに連絡して、新しいライセンスキーを入手します。license.zip ファイルをローカルまたはポータブルドライブに保存します。
2. *.zip ファイルをポータブルドライブに保存した場合、装置の側面および背面にある USB 3.0 ポートにこのドライブを接続します。必要な場合は、背面にアクセスできるようにゆっくりと装置を動かします。
3. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[DRAGEN] を選択します。
4. [Choose] を選択し、*.zip ファイルの場所に移動して [Open] を選択します。

オンラインでの DRAGEN ワークフローのインストール

NextSeq 1000/2000 がインターネットに接続されている場合は、NextSeq 1000/2000 Control Software で直接、DRAGEN ワークフローをインストールできます。オンラインで DRAGEN ワークフローをインストールできるのは、NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降のみです。

1. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[Process Management] を選択します。
2. シーケンスランや装置上の二次解析が進行中でないことを確認します。
3. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[DRAGEN] を選択します。
[Version] の [Available Workflows] セクションに、システムに現在インストールされているワークフローが一覧表示されます。
4. NextSeq 1000/2000 Control Software で DRAGEN ワークフローをインストールするには、[Check Online] を選択します。DRAGEN のバージョンやワークフローによっては、オンラインでのインストールに対応していない場合があります。その他のワークフローについてはオフラインでのインストールを使用してください。
5. インストールするワークフローのチェックボックスを選択します。最新バージョンの BCL 変換がインストールされていない場合は、必ず最初にインストールしてください。
最新バージョンのワークフローに関する情報は、リリースノートで確認できます。
6. [Install] を選択してインストールを開始します。
7. システムパスワードに「ilmnadmin」と入力し、[Authenticate] を選択します。

オフラインでの DRAGEN ワークフローのインストール

1. DRAGEN ワークフローのアップデートが入手可能な場合、[NextSeq 1000/2000 システムサポートページ](#) からインストーラー (*.tar.gz) をダウンロードします。インストーラーをローカルまたはポータブルドライブに保存します。
2. インストーラーをポータブルドライブに保存した場合、装置の側面および背面にある USB 3.0 ポートにこのドライブを接続します。必要な場合は、背面にアクセスできるようにゆっくりと装置を動かします。
3. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[Process Management] を選択します。
4. シーケンスランや装置上の二次解析が進行中でないことを確認します。
5. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[DRAGEN] を選択します。
6. [Version] で [Browse for New Version] を選択し、インストーラーの場所に移動します。
7. [Install] を選択してインストールを開始します。
8. システムパスワードに「ilmnadmin」と入力し、[Authenticate] を選択します。

エアフィルターの交換

以下の手順に従って、使用期限が切れたエアフィルターを6カ月ごとに交換します。

エアフィルターは使い捨ての長方形のカートリッジで、装置右側にあるファンをカバーしています。このフィルターにより、システムが適切に冷却され、システムへの異物の侵入が防止されます。エアフィルターは、最初から装置に1つ装着されており、予備のフィルターが1つ付属しています。追加の予備フィルターは有効な装置サービス契約に含まれており、サービス契約を結んでいない場合はイルミナから個別に購入できます。

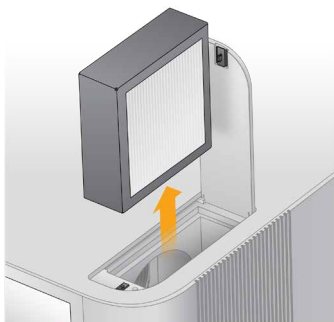
1. 装置上部の右側にあるパネルを下側の図のように押してロックを外します。



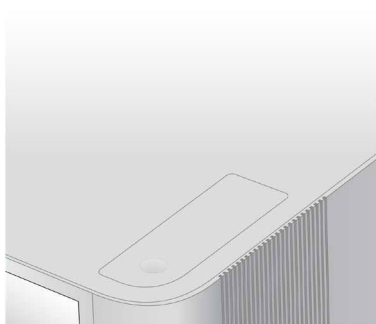
2. パネルを開きます。



3. エアフィルターカートリッジを押して固定を解除し、パネルの中央から取り出します。取り出したカートリッジは処分します。



4. 新しいエアフィルターを挿入し、押して固定します。
5. 上部パネルを閉じ、押して所定位置にはめ込みます。



6. 装置を元の状態に戻します。

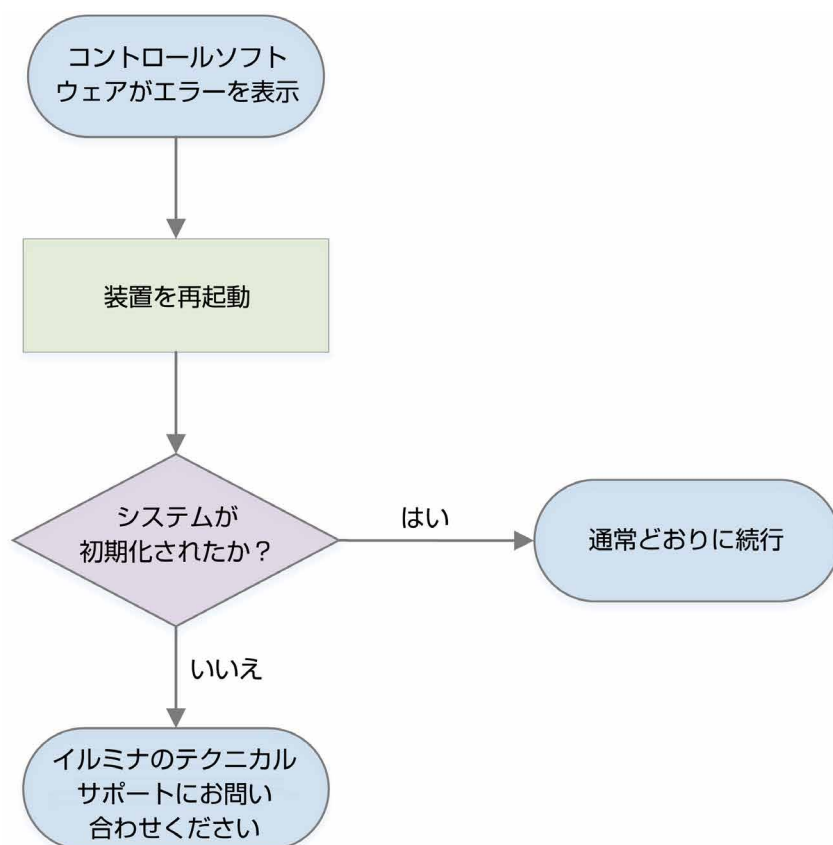
トラブルシューティング

このセクションでは、ランの取り消し、装置の再起動、その他のトラブルシューティングの手順をステップごとに説明します。

エラーメッセージの解消

この付録にはさまざまなトラブルシューティングステップの詳細な説明が記載されています。次のフローチャートは、エラーメッセージが初期化中、ランセットアップ中、またはシーケンス中に表示され、再試行しても解消されない場合のトラブルシューティングの概要を示しています。

エラーの多くは、装置の再起動（いったん電源を切って入れ直す）によって解消されます。装置の再起動の詳細については、[78 ページの「装置の再起動」](#)を参照してください。



消耗品を保管庫に戻す

プレランチェック中のフルイデックスチェックの前に装置のエラーが発生した場合は、以下の手順に従って融解したカートリッジとフローセルを保管します。

1. カートリッジからフローセルを外します。
2. リザーバーから希釈済みライブラリーを排出して廃棄します（最大～18 µL）。
- !** リザーバー内に残っているライブラリーに対してサンプルのクロスコンタミネーションが起こらないようにするため、次のラン用に同じライブラリーの新しい希釈物を調製します。
3. カートリッジを 2℃～8℃の保管庫に入れます。その際、ラベルを上に向けてすべての面を空気が循環するようにします。
72 時間を超えないようにしてください。カートリッジを 12 時間かけて冷蔵庫で融解した場合は、60 時間を超えないようにします。
4. フローセルを元の銀色のホイルパッケージに戻し、乾燥剤を入れます。
5. ホイルパッケージをテープで封止し、2℃～8℃の保管庫に保管します。
72 時間を超えないようにしてください。

ランの取り消し

1. [End Run] を選択します。
2. 試薬カートリッジを自動的にパージするには、[Purge Reagent Cartridge] チェックボックスを選択します。
デフォルト設定は、NextSeq 1000/2000 Control Software の設定に従います。
3. [Yes, end the sequencing run] を選択します。
ランの取り消しは終了を意味します。プレランチェックの装置チェック部分が終了した後は、ランを再開できず、消耗品は再利用できません。
4. [Eject Cartridge] を選択してバイザーを開き、トレイを取り出します。
5. トレイからカートリッジを取り出します。
6. 取り消しを行った時点に応じて、カートリッジを保管または処分します。

状況	例
装置のプレランチェックの前またはプレランチェック中に取り消しを行い、消耗品を再利用する場合	77 ページの「消耗品を保管庫に戻す」を参照してください。
その他すべての場合	46 ページの「消耗品の取り出し」を参照してください。

7. [Close Door] を選択し、トレイを再ロードして [Home] 画面に戻ります。
センサーによってカートリッジの取り出しが確認されます。

ランのリキュー

Process Management の [Status of Secondary Analysis] にエラーが表示された場合、ランをリキューして、生成された cBCL ファイルに対して装置上の DRAGEN による解析を再度実行できます。リキュー機能を使用するには、元のランフォルダーが装置に存在している必要があります。このリキュー機能を使用して、BaseSpace Sequence Hub 上のランをリキューすることはできません。BaseSpace Sequence Hub 上のランをリキューするには、『BaseSpace Sequence Hub Help Center』の「Fix Sample Sheet」を参照してください。

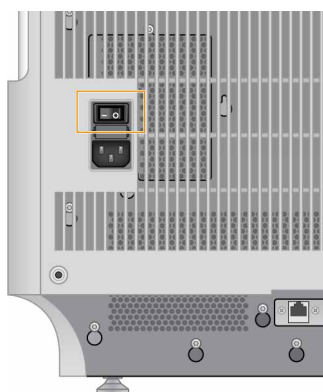
1. サンプルシート v2 を更新し、ポータブルドライブまたはマウントされたネットワークドライブに保存します。
2. サンプルシートをポータブルドライブに保存した場合、装置の側面および背面にある USB 3.0 ポートにこのドライブを接続します。必要な場合は、背面にアクセスできるようにゆっくりと装置を動かします。
3. コントロールソフトウェアのメニューを選択し、[Process Management] を選択します。
4. シーケンスランや装置上の二次解析が進行中でないことを確認します。
5. リキューする完了済みランの横の [Requeue] を選択します。
6. [Choose] を選択し、更新したサンプルシートの場所に移動して [Open] を選択します。
7. [Start Requeue] を選択します。

装置の再起動

装置を再起動すると、システムが安全にシャットダウンしてから再始動します。これは、切断した接続の回復、仕様の調節、初期化時の不具合の解決に役立ちます。ソフトウェアのメッセージは、エラーまたは警告を解決するために再起動すべきタイミングを示します。

1. コントロールソフトウェアのメニューから [Shut Down Instrument] を選択します。
2. システムがシャットダウンしない場合は、装置右側の電源ボタンを光が消えるまで押し続けます。
3. 電源ボタンが点滅したら、背面パネルのトグルスイッチの電源オフ側（O）を押します。電源をオフにした後、電源ボタンが点滅し続ける場合があります。

図 8 トグルスイッチの位置



4. 30 秒待ちます。

5. トグルスイッチの電源オン側 (I) を押します。
6. 電源ボタンが点滅したら、30 秒待ってから、電源ボタンを押します。

図 9 電源ボタンの位置



7. オペレーティングシステムがロードされるまで、5 分ほど待ちます。オペレーティングシステムがロードされたら、システムにログオンします。
コントロールソフトウェアが起動し、システムが初期化されます。システムが初期化されるまで、5 分ほど待ちます。初期化が完了するとホーム画面が表示されます。

システムチェックの実施

正常に動作しているときや装置のメンテナンスのためにシステムチェックを行う必要はありません。ただし、トラブルシューティングの目的でイルミナテクニカルサポートの担当者からシステムチェックを実施するよう求められることがあります。

プレランチェックのエラーやその他の問題を解決するために、4 つのサブシステムを約 58 分でチェックします。これらのテストは、コンポーネントが適切に調整されていて正しく機能するかどうかを確認します。

テスト結果は、`/usr/local/illumina/system-check` にある `system-check` フォルダーに出力されます。

システムチェックを実行する前にカートリッジを必ず取り出してください。

システムチェックの実行

1. コントロールソフトウェアのメニューから [System Check] を選択します。
2. 以下のシステムチェックの中から、実施する項目のチェックボックスを選択します。
 - Network Connectivity：ネットワークの接続状態とパフォーマンスをチェックします。
 - Enclosure：熱システムとバイザーの持ち上げ機構の性能をチェックします。
 - Motion：Z ステージと XY ステージの移動範囲と性能をチェックします。
 - Optics：イメージングモジュールの性能をチェックします。
3. [Start] を選択します。

工場出荷時の設定に戻す

システムを工場出荷時の設定に戻すことで、ソフトウェアのダウングレードや望ましくない設定からの回復を行うことができます。この機能は、イルミナ担当者のみが使用します。

インストール済みイメージの取得

正常に動作しているインストール済みソフトウェアのバックアップを作成するために、システムイメージを取得します。このシステムイメージは後で回復できます。イルミナ担当者が初期インストールを完了してパスワードを変更した直後にシステムイメージを取得することを推奨します。

1. Linux を再起動します。
2. オペレーティングシステムを選択するよう求められたら、[Capture Installed Image] を選択します。
このオペレーティングシステムのオプションは、NextSeq 1000/2000 Control Software に自動的に進む前に短時間だけ表示されます。
1 | メモリー内に保持できるイメージは 1 つだけであるため、新しくイメージを取得すると、以前に取得したイメージは上書きされます。
3. 現在インストールされているイメージの取得が完了するまで、30 分ほど待ちます。
イメージの取得中に数回リブートする場合があります。完了すると、メモリー内に保存された現在のインストール済みイメージによってシステムがリブートします。

取得したイメージの回復

以前に取得したイメージにシステムを回復することで、望ましくない設定から回復することができます。

1. Linux を再起動します。
2. オペレーティングシステムを選択するよう求められたら、[Restore Installed Image] を選択します。
このオペレーティングシステムのオプションは、NextSeq 1000/2000 Control Software に自動的に進む前に短時間だけ表示されます。
1 | パスワードはシステムイメージに関連付けられています。回復後は、回復したイメージのパスワードを使用してシステムにログオンします。
3. 回復が完了するまで 30 分ほど待ちます。
回復中に数回リブートする場合があります。完了すると、回復したイメージによってシステムがリブートします。

リソースおよび参考資料

サンプルシート v2 の設定

ローカルモードに従う場合は、サンプルシート v2 ファイル形式を使用してラン条件を設定できます。サンプルシートを作成するには、Instrument Run Setup を使用するか、NextSeq 1000/2000 システムのサンプルシート v2 テンプレートを編集します。サンプルシートを編集する場合は、以下のセクションとフィールドを記載された順に含め、それぞれの要件に合わせて値を設定します。編集後、ポータブルドライブまたはマウントされたネットワークドライブを使用して、このサンプルシートを NextSeq 1000/2000 システムに転送します。コントロールソフトウェアでサンプルシートの場所を指定すると、装置上のプレランフォルダーにサンプルシートがコピーされます。そのため、ポータブルドライブは取り外してもかまいません。

サンプルシート v2 の設定が以下の要件を満たしていることを確認します。

- サンプルシートの [BCLConvert_Data] セクションに指定したインデックスシーケンスが、NextSeq 1000/2000 で選択したインデックスキットと一致している必要があります。
- NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2 を使用する場合、サンプルシートに指定されているバージョンの DRAGEN がシステムにインストールされており、アクティブである必要があります。インストールについては、[70 ページの「ソフトウェアのアップデート」](#)を参照してください。
- NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降を使用する場合、サンプルシートに指定されているバージョンの DRAGEN がシステムにインストールされている必要があります。コントロールソフトウェアによってサンプルシートから DRAGEN のバージョンが自動的に検出され、必要に応じてアクティブなバージョンを切り替えるように指示されます。インストールについては、[70 ページの「ソフトウェアのアップデート」](#)を参照してください。

DRAGEN を使用する場合は、この他にも設定が必要な項目があります。詳細については、[84 ページの「DRAGEN サンプルシートの設定」](#)を参照してください。

NextSeq 1000/2000 システムサポートページにある Product Files ページから、サンプルシート v2 テンプレートをダウンロードします。Instrument Run Setup を使用してサンプルシートを作成した場合は、最初のダウンロードの後にサンプルシートを変更すると、解析が失敗する可能性があります。

ファイル名には特殊文字を使用できません。

[Header] の要件

[Header] セクションには、ランについての総合的な情報が含まれています。以下に、[Header] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
FileFormatVersion	はい	サンプルシートのバージョン。値「2」を入力します。
RunName	いいえ	重複しない、任意のラン名。RunName には、英数字、アンダースコア、ダッシュ、ピリオドを使用できます。RunName にスペースや特殊文字が含まれていると、解析が失敗します。
RunDescription	いいえ	ランの説明。
InstrumentPlatform	いいえ	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	いいえ	NextSeq 1000/2000

[Reads] の要件

[Reads] セクションには、ゲノムリード 1 および 2、インデックスリード 1 および 2 に使用するシーケンスサイクルの数を記述します。以下に、[Reads] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Read1Cycles	はい	最初のリードのサイクル数。0 より大きい整数を指定する必要があります。
Read2Cycles	いいえ	2 番目のリードのサイクル数。
Index1Cycles	いいえ	最初のインデックスリードのサイクル数。複数のサンプルのシーケンスを行う場合は必須です。最大サイクル数は 10 です。
Index2Cycles	いいえ	2 番目のインデックスリードのサイクル数。最大サイクル数は 10 です。

[Sequencing_Settings] の要件

[Sequencing_Settings] セクションには、使用しているライブラリー調製キットを指定します。

フィールド	必須	内容説明
LibraryPrepKits	いいえ	使用しているライブラリー調製キット。使用できるライブラリー調製キットは 1 つだけです。 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 以降では、Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kit または Illumina Stranded mRNA Prep kit がライブラリー調製キットに指定されている場合、必要なカスタムレシピが自動的に選択されます。以下のいずれかの値を入力します。 - Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kit : <code>ILMNStrandedTotalRNA</code> - Illumina Stranded mRNA Prep kit : <code>ILMNStrandedmRNA</code>

BCL 変換の要件

BCL 変換セクションでは、BCL 形式から FASTQ 形式にデータを変換するための情報を提供します。BCL 変換オプションは、[BCLConvert_Settings] と [BCLConvert_Data] の 2 つのセクションで定義されます。BCL 変換セクションには、インデックスアダプターシーケンスについての情報が必要となります。個々のリードおよびインデックスに適合するアダプターシーケンスを特定するには、『Illumina Adapter Sequences』（文書番号：1000000002694）を参照してください。

以下に、[BCLConvert_Settings] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。
BarcodeMismatchIndex1	いいえ	1 番目のインデックスリードとインデックス配列の間で許容されるミスマッチの数。設定可能な値は 0、1、2 です。デフォルト設定は 1 です。
BarcodeMismatchIndex2	いいえ	2 番目のインデックスリードとインデックス配列の間で許容されるミスマッチの数。設定可能な値は 0、1、2 です。デフォルト設定は 1 です。
FastqCompressionFormat	いいえ	FASTQ ファイルを *.gz ファイルとして出力する場合は、「gzip」と入力します。FASTQ ファイルを *.ora ファイルとして保存し、DRAGEN Decompression を使用する場合は、「dragen」と入力します。
AdapterRead1	いいえ	Read 1 の末端からトリムまたはマスクするための配列。A、C、G、T を含む Read 1 アダプターシーケンス。デフォルト設定では、AdapterRead1 はトリムを実施します。
AdapterRead2	いいえ	Read 2 の末端からトリムまたはマスクするための配列。A、C、G、T を含む Read 2 アダプターシーケンス。デフォルト設定では、AdapterRead2 はトリムを実施します。
OverrideCycles	いいえ	UMI サイクルを指定し、リードのサイクルをマスクアウトするための文字列。次の値を使用できます。 • N：無視するサイクルを指定します。 • Y：シーケンスサイクルを指定します。 • I：インデックスサイクルを指定します。 • U：トリムされる UMI サイクルを指定します。 各要素はセミコロンで区切ります。以下は OverrideCycles の入力例です。 U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

以下に、[BCLConvert_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字、ハイフン、アンダースコアを使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュまたはアンダースコアで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。
Index	いいえ	サンプルに関連付けられるインデックス配列。A、C、T、G のみを使用できます。複数のサンプルのシーケンスを行う場合は必須です。
Index2	いいえ	サンプルに関連付けられる 2 番目のインデックス配列。A、C、T、G のみを使用できます。2 番目のインデックス (i5) のアダプター配列が順方向であることを確認してください。DRAGEN では、二次解析中に i5 インデックスの逆相補的配列が自動的に作成されます。
Lane	いいえ	フローセルのレーン。レーンは 1 つの整数値で表されます。

DRAGEN サンプルシートの設定

このセクションでは、各 DRAGEN パイプラインに対するサンプルシートの要件について説明します。DRAGEN パイプラインの設定は、サンプルシートの最終セクションとして追加します。使用できる DRAGEN パイプラインは 1 つだけです。

各 DRAGEN パイプラインには、それぞれ個別の設定およびデータセクションが含まれます。

DRAGEN Germline パイプラインの要件

以下に、[DragenGermline_Settings] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。ソフトウェアバージョンは、[BCLConvert_Settings] セクションに指定したバージョンと一致する必要があります。
ReferenceGenomeDir	はい	リファレンスゲノムの名前。「hg19_alt_aware」などの名前を指定します。 /usr/local/illumina/genomes に保存されているリファレンスゲノムの名前を使用します。カスタムリファレンスゲノムを使用するには、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。

フィールド	必須	内容説明
MapAlignOutFormat	いいえ	出力ファイルの形式。許容される値は「bam」または「cram」です。値を指定しない場合は、デフォルト設定で「none」となります。
KeepFastq	いいえ	FASTQ 出力ファイルを保存する場合は、「true」と入力します。FASTQ 出力ファイルを削除する場合は、「false」と入力します。

以下に、[DragenGermline_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字を使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。サンプル ID は、[BCLConvert_Data] セクションに指定した ID と一致する必要があります。

DRAGEN RNA パイプラインの要件

以下に、[DragenRNA_Settings] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。ソフトウェアバージョンは、[BCLConvert_Settings] セクションに指定したバージョンと一致する必要があります。
ReferenceGenomeDir	はい	リファレンスゲノムの名前。「hg38_noalt_with_decoy」などの名前を指定します。 /usr/local/illumina/genomes に保存されているリファレンスゲノムの名前を使用します。カスタムリファレンスゲノムを使用するには、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。
RnaGeneAnnotationFile	いいえ	RNA 遺伝子アノテーションを含むファイル。ファイル名には英数字のみを使用できます。ファイルを指定しない場合は、指定したリファレンスゲノムに含まれるデフォルト設定のアノテーションファイルが使用されます。
MapAlignOutFormat	いいえ	出力ファイルの形式。許容される値は「bam」または「cram」です。値を指定しない場合は、デフォルト設定で「none」となります。

フィールド	必須	内容説明
KeepFastq	いいえ	FASTQ 出力ファイルを保存する場合は、「true」と入力します。FASTQ 出力ファイルを削除する場合は、「false」と入力します。
DifferentialExpressionEnable	いいえ	遺伝子発現差を有効にするには、「true」と入力します。遺伝子発現差を解析から除外するには、「false」と入力します。

以下に、[DragenRna_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字を使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。サンプル ID は、[BCLConvert_Data] セクションに指定した ID と一致する必要があります。
Comparison<N>	いいえ	各サンプルに control または comparison の値を指定します。サンプルに control または comparison の値を指定しない場合、サンプルに na が割り当てられます。control としてマークされたすべてのサンプルが、comparison としてマークされたすべてのサンプルと比較されます。N 値は、サンプルの比較グループを反映します。

DRAGEN Enrichment パイプラインの要件

以下に、[DragenEnrichment_Settings] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。ソフトウェアバージョンは、[BCLConvert_Settings] セクションに指定したバージョンと一致する必要があります。
ReferenceGenomeDir	はい	リファレンスゲノムの名前。「hg38_alt_aware」などの名前を指定します。リファレンスゲノムは /usr/local/illumina/genomes に保存されています。カスタムリファレンスゲノムを使用するには、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。
BedFile	はい	ターゲットとする領域を含む bed ファイル。
GermlineOrSomatic	はい	エンリッチメント生殖細胞解析を行う場合は、「germline」と入力します。エンリッチメント体細胞解析を行う場合は、「somatic」と入力します。

フィールド	必須	内容説明
KeepFastq	いいえ	FASTQ 出力ファイルを保存する場合は、「true」と入力します。FASTQ 出力ファイルを削除する場合は、「false」と入力します。
MapAlignOutFormat	いいえ	出力ファイルの形式。許容される値は「bam」または「cram」です。値を指定しない場合は、デフォルト設定で「none」となります。
AuxNoiseBaselineFile	いいえ	ノイズベースラインファイルの名前。*.txt または *.gz ファイル形式を使用できます。ノイズベースラインファイルを使用できるのは、体細胞モードを使用する場合のみです。詳細については、 16 ページの「ノイズベースラインファイルのインポート」 を参照してください。

以下に、[DragenEnrichment_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字を使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。サンプル ID は、[BCLConvert_Data] セクションに指定した ID と一致する必要があります。

DRAGEN DNA Amplicon パイプラインの要件

以下に、[DragenAmplicon_Settings] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。ソフトウェアバージョンは、[BCLConvert_Settings] セクションに指定したバージョンと一致する必要があります。
ReferenceGenomeDir	はい	リファレンスゲノムの名前。「hg38_alt_aware」などの名前を指定します。リファレンスゲノムは /usr/local/illumina/genomes に保存されています。カスタムリファレンスゲノムを使用するには、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。
DnaBedFile	はい	ターゲットとする領域を含む bed ファイル。bed ファイルは *.txt または *.gz ファイル形式で入力できます。
DnaGermlineOrSomatic	はい	DNA Amplicon 生殖細胞解析を行う場合は、「germline」と入力します。DNA Amplicon 体細胞解析を行う場合は、「somatic」と入力します。

フィールド	必須	内容説明
KeepFastq	いいえ	FASTQ 出力ファイルを保存する場合は、「true」と入力します。FASTQ 出力ファイルを削除する場合は、「false」と入力します。
MapAlignOutFormat	いいえ	出力ファイルの形式。許容される値は「bam」または「cram」です。値を指定しない場合は、デフォルト設定で「none」となります。

以下に、[DragenAmplicon_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字を使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。サンプル ID は、[BCLConvert_Data] セクションに指定した ID と一致する必要があります。
DnaOrRna	はい	実行する Amplicon 解析のタイプ。DRAGEN v3.8 では DNA 解析のみがサポートされます。「dna」と入力します。

DRAGEN Single Cell RNA パイプラインの要件

以下に、[DragenSingleCellRNA_Settings] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。サードパーティ製キットの互換性の詳細については、DRAGEN Bio-IT Platform の Compatible Products サポートページを参照してください。

Single Cell Library Kit 1 ～ 5

以下のサンプルシート設定は、DRAGEN Single Cell Library Kit 1 ～ 5 と同じ遺伝子構造を持つライブラリー調製キットに適用されます。使用するキットの遺伝子構造を確認するには、DRAGEN Bio-IT Platform の Compatible Products サポートページを参照してください。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。ソフトウェアバージョンは、[BCLConvert_Settings] セクションに指定したバージョンと一致する必要があります。
ReferenceGenomeDir	はい	リファレンスゲノムの名前。「hg38_alt_aware」などの名前を指定します。リファレンスゲノムは /usr/local/illumina/genomes に保存されています。カスタムリファレンスゲノムを使用するには、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。

フィールド	必須	内容説明
RnaLibraryType	いいえ	以下のいずれかの値を入力します。 • SF：フォワードストランド。SF がデフォルト設定です。 • SR：リバースストランド。 • U：ストランド情報なし。
RnaGeneAnnotationFile	いいえ	RNA 遺伝子アノテーションを含むファイル。ファイル名には英数字のみを使用できます。ファイルを指定しない場合は、指定したリファレンスゲノムに含まれるデフォルト設定のアノテーションファイルが使用されます。
BarcodeRead	いいえ	バーコードの配列のシーケンスラン内の位置。これにはバーコードと UMI の両方が含まれます。設定可能な値は Read1 または Read2 です。デフォルト設定は Read1 です。
BarcodePosition	はい	BarcodeRead に入力した値における、バーコードに対応する塩基の位置。塩基位置のインデックスはゼロから始まります。BarcodePosition の値は次の形式で入力します。 0_<バーコードの終了位置> 例えば、バーコードに含まれる塩基の数が 16 の場合、値は 0_15 になります。
UmiPosition	はい	BarcodeRead に入力した値における、UMI に対応する塩基の位置。UmiPosition の値は次の形式で入力します。 <UMI の開始位置>_<UMI の終了位置> 例えば、UMI に含まれる塩基の数が 10 で、バーコードに含まれる塩基の数が 16 の場合、値は 16_25 になります。
BarcodeSequenceWhitelist	いいえ	含めるバーコード配列を含むファイルの名前。ファイル名には、英数字、ダッシュ、アンダースコア、ピリオドのみを使用できます。
KeepFastq	いいえ	FASTQ 出力ファイルを保存する場合は、「true」と入力します。FASTQ 出力ファイルを削除する場合は、「false」と入力します。
MapAlignOutFormat	いいえ	出力ファイルの形式。許容される値は「bam」または「cram」です。値を指定しない場合は、デフォルト設定で「none」となります。

以下に、[DrogenSingleCellRNA_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字を使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。サンプル ID は、[BCLConvert_Data] セクションに指定した ID と一致する必要があります。

Single Cell Library Kit 6

以下のサンプルシート設定は、DRAGEN Single Cell Library Kit 6 と同じ遺伝子構造を持つライブラリー調製キットに適用されます。使用するキットの遺伝子構造を確認するには、DRAGEN Bio-IT Platform の Compatible Products サポートページを参照してください。

フィールド	必須	内容説明
SoftwareVersion	はい	システムに現在インストールされている DRAGEN ソフトウェアのバージョン。バージョン名に含まれている 3 つの整数をすべて使用します。例えば「3.5.7」のように指定します。ソフトウェアバージョンは、[BCLConvert_Settings] セクションに指定したバージョンと一致する必要があります。
ReferenceGenomeDir	はい	リファレンスゲノムの名前。「hg38_alt_aware」などの名前を指定します。リファレンスゲノムは /usr/local/illumina/genomes に保存されています。カスタムリファレンスゲノムを使用するには、『Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help』を参照してください。
RnaLibraryType	いいえ	以下のいずれかの値を入力します。 • SF：フォワードストランド。 • SR：リバースストランド。 • U：ストランド情報なし。
RnaGeneAnnotationFile	いいえ	RNA 遺伝子アノテーションを含むファイル。ファイル名には英数字のみを使用できます。ファイルを指定しない場合は、指定したリファレンスゲノムに含まれるデフォルト設定のアノテーションファイルが使用されます。
BarcodeRead	いいえ	バーコードリードのシーケンスラン内の位置。これにはバーコードと UMI の両方が含まれます。設定可能な値は Read1 または Read2 です。デフォルト設定は Read1 です。

フィールド	必須	内容説明
BarcodePosition	はい	BarcodeRead に入力した値における、バーコードに対応する塩基の位置。塩基位置のインデックスはゼロから始まります。BarcodePosition の値は次の形式で入力します。 0_<最初のバーコードの終了位置>+<2 番目のバーコードの開始位置>_<2 番目のバーコードの終了位置>+<3 番目のバーコードの開始位置>_<3 番目のバーコードの終了位置> 例えば、遺伝子構造が以下のような場合、値は 0_8+21_29+43_51 になります。 - 最初のバーコードに 9 個の塩基が含まれる (0_8)。 - 最初のバーコードと 2 番目のバーコードの間に 12 個の塩基がある。 2 番目のバーコードに 9 個の塩基が含まれる (21_29)。 2 番目のバーコードと 3 番目のバーコードの間に 13 個の塩基がある。 3 番目のバーコードに 9 個の塩基が含まれる (43_51)。
UmiPosition	はい	指定した BarcodeRead における、UMI に対応する塩基の位置。次の形式の文字列を入力します。 <UMI の開始位置>_<UMI の終了位置> 例えば、UMI に含まれる塩基の数が 8 で、UMI の前に計 51 個の塩基がある場合、値は 52_59 になります。
BarcodeSequenceWhitelist	いいえ	ホワイトリスト化するバーコード配列を含むファイルの名前。ファイル名には、英数字、ダッシュ、アンダースコア、ピリオドのみを使用できます。
KeepFastq	いいえ	FASTQ 出力ファイルを保存する場合は、「true」と入力します。FASTQ 出力ファイルを削除する場合は、「false」と入力します。
MapAlignOutFormat	いいえ	出力ファイルの形式。許容される値は「bam」または「cram」です。値を指定しない場合は、デフォルト設定で「none」となります。

以下に、[DragenSingleCellRNA_Data] で使用可能なフィールドとそれぞれの説明を示します。

フィールド	必須	内容説明
Sample_ID	はい	サンプルの ID。サンプル ID には、最大 20 文字の英数字を使用できます。ID は大文字と小文字が区別されます。各識別子はダッシュで区切ります。例えば「Sample1-DQB1-022515」のように指定します。サンプル ID は、[BCLConvert_Data] セクションに指定した ID と一致する必要があります。

ダークサイクルシーケンス

このセクションでは、レシピでダークサイクルシーケンスを使用する方法について説明します。

ダークサイクルシーケンスは、シーケンスサイクルのケミストリーステップのみを実施する場合に使用します。[イルミナサポートサイト](#)で使用するライブラリー調製キットの Compatible Products ページを参照して、ダークサイクルシーケンスが必要かどうかを確認してください。

ダークサイクルシーケンスを使用するには、以下の手順に従います。

レシピファイルの編集

1. [イルミナサポートサイト](#)からレシピ XML ファイルをダウンロードします。
2. レシピ XML ファイルを編集します。
 - a. 使用するリードおよびインデックスシーケンスの設定に基づいて、該当するプロトコールセクションを特定します。カスタムレシピで編集可能なプロトコールは6つあります。例えば、インデックスシーケンス設定を持たないシングルリード 1 に対応するプロトコールは、`<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`です。
 - b. `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` および `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` より前に、ダークサイクルステップを示す次の行を入力します。
`<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`
 - c. 必要なすべてのダークサイクルについて、ダークサイクルステップの行を入力します。
3. レシピ XML ファイルを保存します。

ダークサイクルを含むサンプルレシピを以下に示します。

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Transfer" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obdd ChemistryName="Library Denaturation and Dilution" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obcg ChemistryName="Cluster Generation" />
  <ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Read Prep" />
  <DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
  <ReadRef ReadName="Read 1" />
  <SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
```

```
</Protocol>  
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >  
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />  
  <ChemistryRef ChemistryName="2min 60C Vacuum Hold" />  
  ...
```

ランへのレシピの添付

4. コントロールソフトウェアの [Run Setup] で、[Custom Recipe] の [Choose] を選択します。
5. 更新したレシピ XML ファイルの場所に移動します。
6. [Open] を選択します。
7. [41 ページの「シーケンスランの開始」](#)に戻ります。

索引

記号

%PF 57

数字

2 色チャンネルシーケンス 56

アルファベット

A

AC 電源
インレット 4

B

BaseSpace Sequence Hub 1
設定 11
文書 11
bcl2fastq2 52
BCL ファイル 6

C

CBCL ファイル 57
CE 52
Chastity フィルター 57

F

FASTQ 変換 52

H

Hosting Location 11

I

Illumina Proactive サポート 11
InterOp ファイル 52, 58
IP アドレス 5

L

Local Run Manager 5

N

NextSeq 1000/2000 Reagents 23
No Call 55–56

P

PhiX
アライメント 52
PhiX Control v3 23
Phred アルゴリズム 57
Process Management 70

Q

Q スコア 57–58

R

Resuspension Buffer 23
RSB 代替品 23
RunInfo.xml 58

S

Sequence Analysis Viewer 52, 55

U

UNC パス 43
Universal Copy Service 5, 70
USB ポート 4

W

Windows
ログオン 79

かな

あ

アイコン 5
赤チャンネル 56
アラート 70
アルコールワイプ 24

い

- イーサネットケーブル 4
- イーサネットポート 4
- 移動 4
- イメージ 52
- イメージング 52–53
- イメージ解析 5
- インストール、ソフトウェア 70
- インターネット接続 11
- インデックス
 - サイクル 27

え

- エアフィルター
 - 場所 74
 - 予備 24
- エラー 5, 78
 - メッセージ 76
 - 確度 57–58
- エラーログ 53
- 演算エンジン 52

お

- オーディオ設定 18
- オペレーティングシステム 79
- 音量設定 18

か

- カートリッジ
 - ロード方向 45
- 解析
 - 方法 5, 8
- カスタマーサポート 98
- カタログ番号 23
- カメラ 53

き

- キーボード 4
- 企業向けサブスクリプション 11
- キット 23
 - カタログ番号 24

く

- クオリティテーブル 57
- クラウドベース解析 1
- クラスターのフィルタリング 57
- クラスター位置 52, 58
- クラスター強度 55

け

- 警告 5, 78

こ

- 工場出荷時の設定 80
- コンピューター名 5

さ

- サーバーの場所 11
- 再起動 76
- サイクル数 27
- サポートページ 70
- サムネイル 58

し

- シグナル強度値 55
- システムスイートインストーラー 70
- システムチェック 76
- 自動アップデート 70
- シャットダウン 78
- 出力フォルダー 43, 70
- 手動ソフトウェアアップデート 70
- 使用期限 74
- 仕様の調節 78
- 消耗品
 - スキャン 45
 - 追跡 1
- 消耗品コンパートメント 2
- 消耗品の追跡 1
- 初回セットアップ 74, 80
- 初期化 79
 - 不具合 78
- シリアルナンバー 5
- シングルリード 43

す

ステータスバー 2
スワス 53

せ

性能データ 11
切断した接続 78

そ

装置性能データ 11
増幅 7
ソフトウェア
 アップデートアラート 19
 インストール 70
 ダウングレード 80
ソフトウェアスイート 1, 5
ソフトウェアのダウングレード 80

た

ダークサイクルシーケンス 92
タイル 52
タイルの番号付け 54

て

ディスクスペース 6, 70
データ品質 57
テクニカルサポート 98
テストキット 24
デフォルト出力フォルダー 43
電源コード 4
電源ボタン 2, 78
テンプレート形成 55

と

ドア
 閉じる 45
トグルスイッチ 4, 78
ドメイン 11
ドライブ D 70
ドリップトレイ
 パッド 24

な

ナノウェル 55
名前付け
 コンピューター名 5
 装置名 18

に

ニックネーム 18

ぬ

ヌクレオチド 56

は

ハードドライブ 6, 70
パスフィルター (PF) 57
発現差解析 32
 出力 62

ひ

漂白ワイプ 24

ふ

ファン 74
フィルターファイル 52, 58
フェージングとプレフェージング 55
プライベートドメイン 11
文書 98

へ

ペアエンド 43
ベースコーリング 5
ベースコールファイル 8, 52, 58
ヘルプ、テクニカル 98
編集、ランパラメーター 43
変性 7

ほ

保守 24
ホワイトペーパー 57

ま

マウス 4
マップしたドライブ 43

み

緑チャネル 56

め

面の番号付け 54

も

モニター 2

よ

余剰のサイクル 27
予備 74

ら

ライトバー 2
ライブラリー
変性 7
ライブラリーの希釈 7
ラン
メトリクス 52
ランサイズ 70
ランステータス 6
ランセットアップ
例 27
ランの削除 6, 70
ランパラメーター
編集 43
ランフォルダー 70
ラン数 5

り

リードサイクル 27
リード長 27
リブート 80

れ

冷蔵庫の仕様 25
冷凍庫の仕様 25
レーン 53
レジストレーションの失敗 55
レシピ 70
レシピフラグメント 5

ろ

ローカル解析 1
ログファイル 53

テクニカルサポート

技術的な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。

ウェブサイト：jp.illumina.com

電子メール：techsupport@illumina.com

イルミナテクニカルサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	国際
アイルランド	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
イタリア	+39 800 985513	+39 236003759
インド	+91 8006500375	
インドネシア		0078036510048
英国	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
オーストラリア	+61 1800 775 688	
オーストリア	+43 800 006249	+43 1 9286540
オランダ	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
カナダ	+1 800 809 4566	
韓国	+82 80 234 5300	
シンガポール	1 800 5792 745	
スイス	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
スウェーデン	+46 2 00883979	+46 8 50619671
スペイン	+34 800 300 143	+34 911 899 417
タイ	+66 1800 011 304	
台湾（中国）	+886 8 06651752	
中国		+86 400 066 5835
デンマーク	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
ドイツ	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
日本	+81 0800 111 5011	
ニュージーランド	+64 800 451 650	
ノルウェー	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
フィリピン	+63 180016510798	
フィンランド	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110

地域	フリーダイヤル	国際
フランス	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
米国	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
ベトナム	+84 1206 5263	
ベルギー	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
香港（中国）	+852 800 960 230	
マレーシア	+60 1800 80 6789	

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：jp.support.illumina.com からダウンロードできます。



イルミナ株式会社
東京都港区芝 5-36-7
三田ベルジュビル 22 階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
jp.illumina.com

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。

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®