

MiSeq

System Guide



本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づ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連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 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
資材番号：20000262 文書番号：15027617 v06	2021年 1月	MCS v4.0 および Local Run Manager v3.0 へのアップグレードをサポートするために更新。 システムの Windows 10 へのアップグレードをサポートするために更新。 UI の変更を反映するために、画像とテキストを更新。 メンテナンスウォッシュ情報を更新。 互換性が失われているため、BaseSpace Onsite に関する情報を削除。 互換性が失われているため、Illumina Experiment Manager への参照を削除。 当該バージョンのサポートが終了しているため、MiSeq Reagent Kits v1 への参照を削除。
資材番号：20000262 文書番号：15027617 v05	2019年 6月	インデックスサイクルの情報を更新。 資材番号を修正。
資材番号：20000262 文書番号：15027617 v04	2018年 7月	Local Run Manager、サンプルシート、およびマニュアルシーケンスモードのための新規のラン設定オプションを追加。 MiSeq Reporter を Local Run Manager に参照変更。 トラブルシューティング付録に「チラー温度範囲の解決」を追加。
資材番号：20000262 文書番号：15027617 v03	2018年 5月	オペレーティングシステムにログオンするために必要なデフォルトのユーザー名とパスワードを削除。イルミナではサイト固有の認証情報を使用することを推奨します。 システム設定のカスタマイズセクションに Illumina Proactive モニタリングサービスに関する情報を追加。 必要なチラーの温度範囲に関して試薬コンパートメントに注意を追加。 MiSeq Reporter を追加し直し、Local Run Manager の記述を削除。 本ガイド名を『MiSeq Sequencing System Guide』から『MiSeq System Guide』に変更。 軽微な文章編集。
資材番号：20000262 文書番号：15027617 v02	2018年 1月	Local Run Manager、サンプルシート、およびマニュアルシーケンスモードのための新規のラン設定オプションを追加。 MiSeq Reporter を Local Run Manager に参照変更。 トラブルシューティング付録に「チラー温度範囲の解決」を追加。 システム設定のカスタマイズのトピックで、装置性能データ収集のための新規手順を追加。 本ガイド名を『MiSeq System Guide』から『MiSeq Sequencing System Guide』に変更。

文書番号	日付	変更内容
資材番号：20000262 文書番号：15027617 v01	2015年 9月	<p>本ガイドの名称を『MiSeq System User Guide』から『MiSeq System Guide』に変更。MCS v2.6の新機能として、BaseSpace Onsiteに関する情報を追加。画面ではなくタスクに関連させてガイド情報を再整理。</p> <p>[Welcome] 画面に関する記述をすべて [Home] 画面に変更。</p> <p>フローセルタイプ、試薬カートリッジの内容物、および試薬カートリッジ融解手順など、『MiSeq Reagent Kit Reagent Prep Guides』内に情報を追加。その他のMiSeq Reagent Kitの情報については、イルミナのウェブサイト support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.html を参照してください。</p> <p>メンテナンスウォッシュの予測される洗浄容積を 17.25 mL から 51.75 mL に修正。最初に試薬カートリッジを調製し、必要な場合にライブラリーを変性させて希釈するようワークフローステップの順序を更新。</p> <p>トラブルシューティング情報を付録 A に移動。</p> <p>出力フォルダー情報およびフローセルタイトル情報を付録 B に移動。</p> <p>ファイル管理に関する情報を「メンテナンス」章に移動。</p> <p>ポストランウォッシュの手順を「メンテナンス」章から「シーケンス」章に移動。</p> <p>「ランの実行」章の名称を「シーケンス」に変更。</p> <p>一次解析に関する記述を RTA ソフトウェアによる解析に変更。</p> <p>テンプレートライン洗浄によるポストランウォッシュ手順の希釈指示内容を 6% の NaOCl から 5% の NaOCl に更新。</p> <p>5%NaOCl のパーツ番号をユーザーが用意する消耗品リストに追加。</p>
パーツ番号：15027617 改訂 O	2014年 9月	<p>以下の情報を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● MCS v2.5 の新機能として、テンプレートライン洗浄を含むポストランウォッシュオプションを更新。 ● 次亜塩素酸ナトリウム液を用いポストランウォッシュ用の指示内容をテンプレートライン洗浄に変更。 ● ポストランウォッシュの予測される洗浄容積を追加。 <p>追加リソース、ランオプション、二次解析オプション、装置洗浄、およびフローセルキャップの色に関する VeriSeq PGS ワークフロー情報を追加。</p>
パーツ番号：15027617 改訂 N	2014年 6月	<p>VeriSeq PGS ワークフローに適用可能な情報を追加。</p> <p>クラスター形成および密度といったランメトリクス情報を更新。</p> <p>アンチウイルスソフトウェアに関する情報を削除。『MiSeq System Site Preparation Guide』を参照してください。</p>

文書番号	日付	変更内容
パーツ番号：15027617 改訂 M	2014 年 1 月	MCS v2.4 において以下のように変更： トラブルシューティングファイルを送信するためのバンドルログ機能を追加。
パーツ番号：15027617 改訂 L	2013 年 10 月	プレランの手順としてシステムソフトウェアの再起動を追加。 ユーザーが用意する消耗品のリストにマイクロ遠心チューブを追加。 MiSeq Software の個別の章を削除し、内容をガイド内に分散して表記。 カスタムレシピのフォルダーに関する情報を削除。 MiSeq Reagent Kits のためのクラスター密度の推奨範囲に関する情報を削除。 MiSeq Reagent Kits に関する詳細を削除し、試薬キット機能の概要を追加。詳細については、ご利用になるキットのサンプル調製キットのマニュアルを参照してください。 商標権記載欄に内容を追加。
パーツ番号：15027617 改訂 K	2013 年 8 月	形式のエラーを修正。
パーツ番号：15027617 改訂 J	2013 年 8 月	MCS v2.3 と MiSeq Reagent Kit v3 のランの説明を追加。 以下の情報を更新： <ul style="list-style-type: none"> ● 試液キットとバージョン互換性に MiSeq Reagent Kit v3 を含める。 ● カスタムレシピフォルダーの説明に v3 サブフォルダーを含める。 ● v2 のクラスター密度を変更し、v3 の範囲を追加。 ● イメージファイルの出力パス。 ナノフローセル (D) とマイクロフローセル (G) のフローセルのバーコードを修正。 内容物とフローセルタイプを含む、MiSeq Reagent Kit に関する情報を削除。詳細については、『MiSeq Reagent Preparation Guide』(文書番号：15044983) を参照してください。
パーツ番号：15027617 改訂 H	2013 年 3 月	解析ワークフロー、マニフェストファイル、およびサンプルシートについて紹介する「MiSeq の概念」というセクションを追加。 FASTQ ファイル生成に関する情報、マニフェストファイル形式に関する情報、解析ワークフローの詳細、およびサンプルシートの詳細を削除。これらのトピックの詳細については、『MiSeq Reporter User Guide』(パーツ番号 15028784) または『MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide』(パーツ番号 15028392) を参照してください。 カスタムプライマーを調製するための手順を削除。詳細については、『Using Custom Primers on the MiSeq』(パーツ番号 15041638) を参照してください。

文書番号	日付	変更内容
パーツ番号：15027617 改訂 G	2013 年 1 月	DNA ライブラリーを変性させて希釈し、イルミナ PhiX コントロールを調製するための手順を削除。『Preparing DNA Libraries for Sequencing on the MiSeq』（パーツ番号 15039740）を参照してください。 500 mL ではなく 475 mL のラボラトリーグレード水に 25 mL の 10% Tween 20 を添加するよう指示するために、装置洗浄の手順を更新。
パーツ番号：15027617 改訂 F	2012 年 11 月	以下の新しい情報を追加： <ul style="list-style-type: none"> • 新しい MiSeq Reagent Kits (MiSeq Reagent Nano Kit および MiSeq Reagent Micro Kit) に対してキットの説明を追加。 • フローセルタイプの概要を追加。 • Enrichment 解析ワークフローの説明を追加。 以下の情報を更新： <ul style="list-style-type: none"> • MCS v2.1 の新機能で、ポストランウォッシュのオプションとシッパーを持ち上げるコマンドを追加するために [Perform Wash] 画面を更新。 • ナノキットおよびマイクロキットとの依存関係を含めるために互換性の表を更新。 • 新しい試薬キットを含めるために互換性に関する情報を更新。
パーツ番号：15027617 改訂 E	2012 年 10 月	以下の情報を更新： <ul style="list-style-type: none"> • PhiX コントロール調製手順を修正し、調製された PhiX コントロールの想定クラスター密度を 1,000 ~ 1,200 K/mm² に修正。 • ライブラリーを変性させて希釈するための手順である「ライブラリーの調製」が Nextera XT ライブラリーと TruSeq Amplicon ライブラリーに適用されないことを注記。 • アップグレード名を MiSeq Expansion Pack から MiSeq ハードウェアアップグレードに変更。 • 『MiSeq Reporter User Guide』を追加リソースリストに追加。

文書番号	日付	変更内容
パーツ番号：15027617 改訂 D	2012 年 7 月	<p>ソフトウェアの記述を MCS v2.0 に変更。</p> <p>以下の新しい情報を追加：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● ソフトウェアの新機能、インターフェースの変更、およびワークフローの変更に ついて説明するために、「MCS の新機能」というセクションを追加。 ● MiSeq Reagent Kit v2, 500 Cycles のカタログ番号と説明を追加。 ● バージョンの互換性および要件のセクションを追加。 ● MiSeq Expansion Pack (14 タイルのデュアルサーフェスフローセルイメージ ングに必要) の説明を追加。 ● デュアルサーフェスフローセルタイルの番号付けの説明を追加。 ● Nextera XT ライブラリーの PCR Amplicon 解析ワークフローを追加。 ● 10% Tween 20 の使用を洗浄の手順に追加し、期待される洗浄液の量を示す。 ● RFID リードエラーの手順に試薬カートリッジバージョンを追加。 <p>以下の情報を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● IMF、CMF、および AMX の試薬の頭字語をそれぞれ v2 の試薬名である IMS、 CMS、および AMS に変更。 ● PhiX の濃度を 8 pM から 12.5 pM に変更。 ● 最終溶液で推奨される最高 NaOH 濃度を 1 mM に変更。 ● スタンバイモードから装置を取り外して後続のランをセットアップするステップ を開始するには、メンテナンスウォッシュが必要であることを注記。 ● 「サンプルシートパラメーター」セクションおよびサンプルシートセットアップの 手順をワークフローから削除。イルミナでは、サンプル調製の前にサンプルシ ートを作成することを推奨しています (『MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide』 (パーツ番号 15028392) および 『Illumina Experiment Manager User Guide』 (パーツ番号 15031335) を参照)。

文書番号	日付	変更内容
パーツ番号：15027617 改訂 C	2012 年 4 月	<p>ソフトウェアの記述を MCS v1.2 に変更。</p> <p>以下の新しい手順とセクションを追加： 「BaseSpace の概要」、「カスタムプライマーの使用」、「FASTQ ファイルの生成」、「流量エラーのトラブルシューティング」、「容積テストの実施」、「メンテナンスウォッシュの実施」、「装置のアイドリング」（スタンバイウォッシュを含む）。</p> <p>以下の情報を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> • Amplicon ワークフローから Custom Amplicon に名称を変更し、DenovoAssembly ワークフローから Assembly に名称を変更し、GenerateFASTQ ワークフローを追加。 • ランフォルダーおよびランファイルの説明を追加し、ランフォルダーの命名規則を更新し、出力ファイルのサイズを追加。 • アンプリコンシーケンスに必要なゲノムフォルダーをサンプルシートパラメーターに一覧表示。 • ライブラリーを変性させるために NaOH を希釈する手順を追加。 • MiSeq Self-Service の手順を含む RFID リードエラーの解決方法を更新。 • ラン性能のトラブルシューティングに使用するファイルとフォルダーのリストを表示。
パーツ番号：15027617 改訂 B	2011 年 12 月	<p>ソフトウェアの記述を MCS v1.1 に変更。</p> <p>ウイルス対策保護に関する情報を追加。</p> <p>以下の情報を更新：</p> <ul style="list-style-type: none"> • RFID エラーを解決するための手順。 • ライブラリーの調製：0.2 N NaOH に変更。 • ランフォルダーの命名規則。 • 必要なディスクスペースおよび記憶域容量。 • ランセットアップのステップ：サンプルシートをセットアップするための詳細情報を追加。 • ランセットアップのステップ：残った PR2 の廃棄に関する注意を追加。 • 解析の実行時間：2 時間を超える解析の場合を追加。 • 解析のインプット要件：TruSeq Custom Amplicon ライブラリーで必須であるマニフェストファイルを一覧表示。 • MiSeq Reagent Kit の内容物である HT1 チューブのサイズを修正。 • iCom に関する記述を Myllumina に変更。
パーツ番号：15027617 改訂 A	2011 年 9 月	初回リリース。

目次

第 1 章 概要	1
はじめに	1
追加リソース	1
コンポーネント	2
MiSeq の概念	4
システムソフトウェア	5
二次解析オプション	6
Sequencing Analysis Viewer	7
必要なディスクスペース	8
MiSeq Reagent Kit の概要	8
第 2 章 はじめに	11
MiSeq の起動	11
システム設定のカスタマイズ	11
BaseSpace 最新版の通知の設定	12
電子メール情報の設定	12
デフォルトフォルダーロケーションの設定	12
消耗品	13
第 3 章 シーケンス	14
はじめに	14
ラン実行時間	14
クラスター形成	15
シーケンス	15
解析	15
試薬カートリッジの融解	15
試薬カートリッジの点検	16
ライブラリーの変性と希釈	16
サンプルライブラリーのロード	16
MCS を使用したランのセットアップ	17
フローセルの洗浄	19
フローセルのロード	20
試薬のロード	21
ランの開始	23
ランのモニタリング	24
ポストランウォッシュの実施	26

第 4 章 メンテナンス	30
メンテナンスの頻度	30
VeriSeq PGS ワークフローのためのメンテナンス頻度	30
メンテナンスウォッシュの実施	31
スタンバイウォッシュの実施	33
ファイルの管理	34
ソフトウェアの更新	36
装置のシャットダウン	36
付録 A トラブルシューティング	37
はじめに	37
トラブルシューティングのためのバンドルログ	37
システムチェックの実施	38
ランの一時停止または停止	38
試薬カートリッジシッパーの手動による持ち上げ	40
ランセットアップエラーの解決	40
RFID リードエラーの解決	40
容積テストの実施	41
期待される洗浄液の量の測定	41
試薬チラーの温度エラーの解決	42
Local Run Manager 解析エラーの解決	42
システム設定値の設定	42
付録 B 出力ファイルとフォルダー	43
ランフォルダー	43
MiSeqOutput フォルダーの内容	43
RTA フォルダーおよびファイル	45
索引	47
テクニカルサポート	50

第1章 概要

はじめに	1
追加リソース	1
コンポーネント	2
MiSeq の概念	4
システムソフトウェア	5
二次解析オプション	6
Sequencing Analysis Viewer	7
必要なディスクスペース	8
MiSeq Reagent Kit の概要	8

はじめに

Illumina® MiSeq™ システムでは、実績のある SBS (Sequencing by Synthesis) 技術と、最短 8 時間で DNA を解析してデータ化できる革新的なワークフローが組み合わされています。MiSeq はクラスター形成、シーケンス、およびデータ解析が単一装置上で統合されています。

機能

- ▶ **自動化による簡単操作**：充填済試薬カートリッジ、バッファーボトル、およびフローセルのローディングを含むランのセットアップが終了した後は、追加の操作時間は必要ありません。
- ▶ **充填済試薬カートリッジ**：クラスター形成およびシーケンスのための試薬（ペアエンドシーケンス試薬やインデックス試薬など）があらかじめ充填されている、専用設計された使い切りのカートリッジです。統合 RFID（無線自動識別）タグにより、消耗品の正確な追跡が可能となっています。
- ▶ **インターフェースコントロール**：MiSeq Control Software (MCS) インターフェースにより、装置を設定し、ランのセットアップおよびモニタリングを実行し、メンテナンス手順を実施するためのコントロールを行うことができます。
- ▶ **便利なフローセルローディング**：クランプメカニズムにより、フローセルを装置にロードするだけで、自動的に位置決めされます。統合 RFID（無線自動識別）タグにより、消耗品の正確な追跡が可能となっています。
- ▶ **革新的なフルイディクスアーキテクチャー**：MiSeq フルイディクスシステムにより、シーケンス中の化学サイクルタイムにおいて類まれな効率性が発揮されます。
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)**：この統合解析ソフトウェアにより、シーケンスラン中にリアルタイムで装置上でのデータ解析（イメージ解析とベースコーリングを含む）が実行されるため、貴重な下流解析時間を節約できます。
- ▶ **Local Run Manager**：この統合二次解析ソフトウェアは、RTA 解析データを処理し、アライメントを実施して、各解析対象サンプルの情報をレポートします。

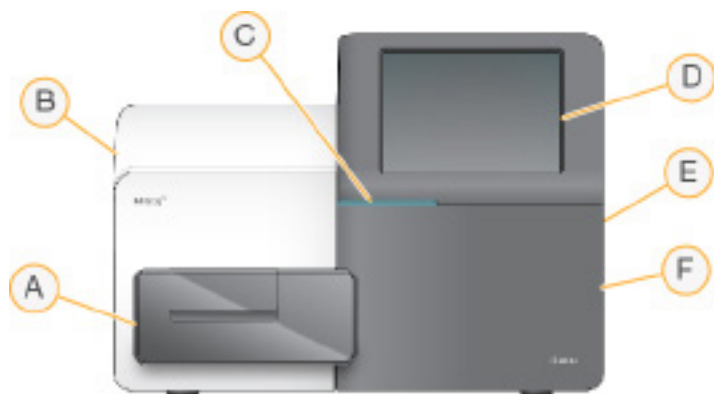
追加リソース

イルミナウェブサイトの MiSeq 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。常に最新バージョンのサポートページを参照してください。

リソース	内容説明
[Custom Protocol Selector]	<p>ご使用になるライブラリー調製法、ランパラメーターや解析法までの手順を、詳細なレベルを調整するオプション付きで、全体の手順の指示書として生成するツールです。</p>
『MiSeq System Site Prep Guide』 (文書番号：15027615)	<p>ラボスペース、電源要件、および環境とネットワークの検討事項に関する仕様を示しています。</p>
『MiSeq System Safety and Compliance Guide』 (文書番号：15027616)	<p>操作の安全検討事項、コンプライアンス規範、装置のラベルに関する情報を提供します。</p>
『MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide』 (文書番号：15028392)	<p>サンプルシートへのサンプルシート設定の追加に関する情報が記載されています。</p>
『MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』 (文書番号：15039740)	<p>MiSeq でシーケンスを行う前に調製済みサンプルライブラリーを変性させて希釈する手順と、PhiX コントロールを調製する手順について説明しています。このステップは大部分の種類のリブラリーに適用されます。</p>
『MiSeq Custom Primers Guide』 (文書番号：15041638)	<p>カスタムプライマーを調製してロードする手順と、カスタムプライマー用にサンプルシートを編集する手順について説明しています。</p>
『Local Run Manager v3 Software Guide』 (文書番号：1000000111492)	<p>Local Run Managerソフトウェアの概要、ソフトウェア機能の使用手順、および解析モジュールの装置コンピューターへのインストール手順について説明しています。</p>
『BaseSpace User Guide』 (文書番号：15044182)	<p>BaseSpace を使用するための手順と、各解析ワークフローに対して生成されるグラフについて説明しています。</p>

コンポーネント

MiSeq には、タッチスクリーンモニター、ステータスバー、電源ボタンとその横の USB ポート、および 3 つのコンパートメントがあります。



- A **フローセルコンパートメント**：ランを通してフローセルを収納するフローセルステージがあります。フローセルステージモーターは、フローセルをロードするために密閉式光学モジュールの外にステージを移動させ、ランが始まるとステージを戻します。
- B **密閉式光学コンパートメント**：フローセルのイメージングを可能にする光学的構成物が内蔵されています。
- C **ステータスバー**：フローセルのステータスを示します。シーケンス準備完了時は緑、処理中は青、注意が必要なときはオレンジになります。
- D **タッチスクリーンモニター**：システム設定やランセットアップ用のコントロールソフトウェアインターフェースを表示します。
- E **外部 USB ポート**：タッチスクリーンモニターを使用して装置のコンピューターにファイルやデータを容易に移行できます。
- F **試薬コンパートメント**：適正温度の試薬、洗浄溶液、および使用済み試薬用のボトルが含まれます。磁気ラッチが試薬コンパートメントドアを固定します。

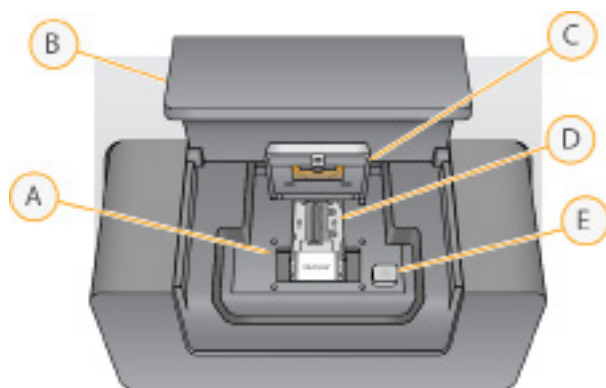
MiSeq インターフェースによる手順ガイドに従い、タッチスクリーンモニターを用いてランをセットアップすることができます。ランコンポーネントをロードするには、試薬コンパートメントとフローセルコンパートメントにアクセスする必要があります。

フローセルコンパートメント

フローセルコンパートメントには、フローセルステージ、サーマルステーション、およびフローセルへの送液接続部があります。フローセルステージがフローセルを保持し、フローセルクランプがフローセルを固定し、位置を合わせます。フローセルクランプが閉じられると、クランプヒンジ付近にある 2 つのピンによってフローセルは自動的に位置決めされます。

フローセルステージの下に位置するサーマルステーションは、クラスター形成およびシーケンスに必要なフローセル温度の変化を制御します。

図 1 フローセルコンパートメント



- A フローセルステージ

- B フローセルコンパートメントのドア
- C フローセルランプ
- D フローセル
- E フローセルランプ解除ボタン

試薬コンパートメント

試薬コンパートメント内には、試薬チラーと、洗浄バッファー（PR2）ボトルおよび廃液ボトルをセットする場所があります。一定温度を維持するために、指示された場合に限り、試薬チラーを開閉してください。



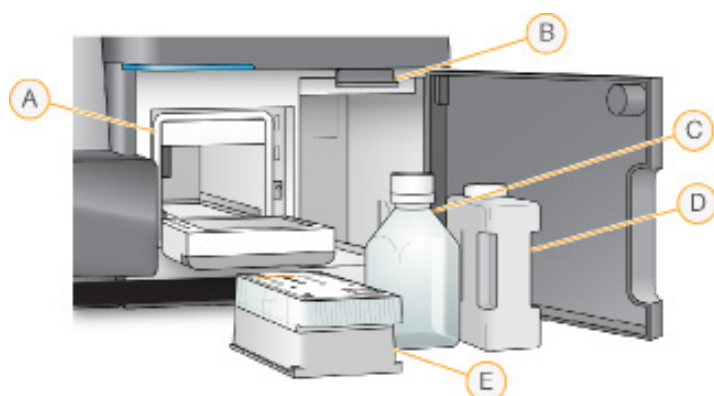
注意

試薬チラーの温度範囲は 2℃～ 11℃である必要があります。

試薬チラーは、ランの実行中に、使い切りの試薬カートリッジを保持します。また、装置の洗浄中は洗浄トレイを保持します。実行中の処理に応じてソフトウェアが自動的に、ラン中の適切なタイミングで試薬カートリッジの各リザーバーの中にシッパーを下ろします。

試薬チラーの右側には、PR2 ボトルと廃液ボトルに形状が合うように作られたスロットがあります。シッパーハンドルは所定の位置にボトルを固定し、各ボトルの中に該当するシッパーを下げます。試薬は、シッパーからフルイディクスラインを通してフローセルへと送液されます。処理を通して、試薬の廃液は廃液ボトルに送られます。

図2 試薬コンパートメントのコンポーネント



- A 試薬チラー
- B シッパーハンドル（上がっている状態）
- C PR2 ボトル
- D 廃液ボトル
- E 試薬カートリッジ

MiSeq の概念

以下の概念および用語は MiSeq のランセットアップステップに共通のものです。

概念	内容説明
解析ワークフロー	Local Run Manager により実行される二次解析手順。各ランの解析ワークフローは、サンプルシートまたは選択モジュールによって指定されます。

概念	内容説明
マニフェスト	アライメントのステップで使用されるリファレンスゲノムとターゲットリファレンス領域を指定するファイル。マニフェストを必要とするワークフローの場合は、マニフェストファイルがサンプルシートで指定され、MCSで指定したマニフェストフォルダーにコピーされます。マニフェストファイルも、二次解析で使用するためにLocal Run Managerにロードすることができます。
リファレンスゲノム	解析中に使用されるゲノムシーケンスを含むFASTA形式ファイル。ほとんどの解析ワークフローに対しては、リファレンスゲノムファイルがサンプルシートで指定されます。
ランフォルダー	RTAソフトウェアによって格納されるフォルダー構造 (MiSeqOutput フォルダー) または Local Run Manager によって格納されるフォルダー (MiSeqAnalysis)。詳細については、 43 ページの「ランフォルダー」 を参照してください。
サンプルシート	シーケンスランのセットアップと解析に用いられる情報 (サンプルおよびインデックスシーケンスのリストを含む) を格納するカンマ区切り値ファイル (*.csv)。サンプルシートは MiSeq のランセットアップのステップを通じて準備することもできます。ランが開始すると、サンプルシートは SampleSheet.csv という名前に変更され、ランフォルダー (MiSeqTemp、MiSeqOutput、および MiSeqAnalysis) にコピーされます。

解析ワークフローおよびマニフェストファイル形式の詳細については、『Local Run Manager v3 Software Guide』(文書番号: 1000000111492) を参照してください。

サンプルシートの詳細については、『MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide』(文書番号: 15028392) を参照してください。

システムソフトウェア

装置のソフトウェア一式には、シーケンスラン、装置上の解析、および関連機能を実行するアプリケーションが統合されています。

- ▶ **MiSeq Control Software (MCS)** : 装置の操作をコントロールします。ラン開始前のフローセルと試薬をロードする際に、MiSeq Control Software (MCS) インターフェイスが手順を示します。ランが進むにつれて、品質統計値の概要が表示されます。
- ▶ ラン中、MCS はフローセルステージを操作し、試薬を分注して、フローセル温度を管理し、フローセル上のクラスターのイメージを撮像します。MCS は Local Run Manager ソフトウェアで指定されたパラメーターに従ってランを実行します。
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA) ソフトウェア** : イメージ解析とベースコーリングを実行し、各サイクルの各塩基にクオリティスコアを割り当てます。イメージは、RTA で処理されるためにランフォルダー内に一時的に格納されますが、RTA 解析が完了すると自動的に削除されます。
- ▶ **Local Run Manager** : 装置に組み込まれた、ランの作成、ステータスのモニタリング、シーケンスデータの解析、結果の表示を行うための統合ソリューションです。Local Run Manager により、サンプル情報を追跡し、ユーザー権限を制御することができます。このソフトウェアは装置のコンピューター上で Windows サービスとして稼働し、ウェブブラウザにより表示されます。詳細については、[7 ページの「Local Run Manager ソフトウェア」](#)を参照してください。




装置外で使用するオプションのソフトウェアには、Sequencing Analysis Viewer (SAV) があります。詳細については、[7 ページの「Sequencing Analysis Viewer」](#)を参照してください。

ステータスアイコン

コントロールソフトウェアインターフェース上のステータスアイコンは、ランセットアップ中またはラン中の状況変化を示します。アイコン上の数字はステータスの状態の数を示します。

ランステータスが変わると、アイコンは点滅して警告を発します。アイコンを選択し、状態の内容を確認してください。[Acknowledge] を選択してメッセージを消去した後、[Close] を選択してダイアログボックスを閉じます。

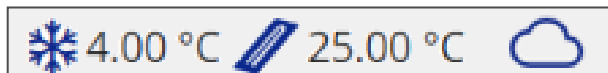
ステータスウィンドウに表示されるメッセージは、ウィンドウの上余白にあるアイコンを選択して、タイプ別にフィルターできます。アイコンを選択して、状態の表示または非表示を切り替えます。

ステータスアイコン	ステータス名	内容説明
	ステータス OK	変化なし。システムは正常です。
	警告	警告はランを停止しません。ただし、一部の警告は続行する前に措置を講じる必要があります。
	エラー	エラーは通常、ランを停止し、ほとんどの場合においてランを続行する前に措置を講じる必要があります。

センサーインジケーター

センサーインジケーターは、各インターフェース画面の底部に表示され、装置コンポーネントのステータスを表します。

図 3 センサーインジケーター



センサーインジケーターは左から右に、以下のコンポーネントを表します。

- ▶ 試薬チラーの温度 (°C)
- ▶ フローセルの温度 (°C)
- ▶ BaseSpace® への接続のステータス (BaseSpace ステータスインジケーターの詳細については、6 ページの「BaseSpace の概要」を参照)

二次解析オプション

MiSeq シーケンスデータは、装置のコンピューター上の Local Run Manager またはクラウド上の BaseSpace を用いて解析することができます。これらのアプリケーションはいずれも、要求された各ゲノムおよびマルチサンプルランの各サンプルのアライメント、変異、およびコンティグのアセンブリに関する情報を生成します。

BaseSpace の概要

BaseSpace® は、イルミナのクラウドコンピューティング環境です。

シーケンスランを設定する際は、BaseSpace にログインしてください。BaseSpace を用いる場合、ランデータをローカルに保存する追加のオプションがあります。詳細については、11 ページの「システム設定のカスタマイズ」を参照してください。

シーケンスランを開始すると、アイコンが、MiSeq が BaseSpace に接続されていることと、データファイルが指定の場所に転送されていることを示すように変更されます。

BaseSpace の利用時、転送に際してデータファイルは暗号化され、解析中に複合されたのち、格納時に再度暗号化されます。

ランの終了時、または RTA 解析ファイルがすべて転送されると、BaseSpace は MiSeq から自動的に切断されます。インターネット接続が中断された場合は、接続が復元された後、切断が発生した時点からの解析ファイルのアップロードが続行します。

最新のベースコールファイルが BaseSpace にアップロードされるとすぐにデータの二次解析が開始されます。BaseSpace でサポートされる解析ワークフローは、Local Run Manager を使用した装置上の解析で使用されるワークフローと同じです。

BaseSpace には basespace.illumina.com からアクセスできます。Myllumina アカウントでログインしてください。BaseSpace についての詳細は、『BaseSpace User Guide』（文書番号：15044182）およびイルミナのウェブサイトにある BaseSpace のサポートページを参照してください。

Local Run Manager ソフトウェア

Local Run Manager ソフトウェアはランの作成、ステータスのモニタリング、データ解析、および結果の表示を行うための、装置上の統合ソリューションです。このソフトウェアは MCS と統合され、初期解析中に生成されるベースコールを処理します。Local Run Manager はシーケンスランが終了すると、二次解析を自動的に行います。

Local Run Manager を用いてライブラリー調製中のサンプル情報を登録することができ、プロセス全体にわたって明確なサンプルトラッキングを確実にを行い、各サンプルに関する情報を作成することができます。

さらに、Local Run Manager により、ユーザー認証を制御して（有効化された場合）、ユーザーにさまざまなアクセスレベル権限を与えることができます。権限はデータベースファイル内に保存され、MiSeq で参照することができます。Local Run Manager ではシーケンスランをモニタリングすることもできます。詳細については、『Local Run Manager v3 Software Guide』（文書番号：1000000111492）を参照してください。

解析中のシーケンス

MiSeq システムのコンピューティングリソースは、シーケンスまたは解析のどちらかのみ利用を想定しています。

Local Run Manager の場合、先行のランの二次解析が完了する前に MiSeq で新しいシーケンスランを開始すると、確認用のダイアログボックスが表示されます。新しいシーケンスランを開始することを確認した後、先行のランの二次解析は、新しいランがシーケンスを終えるまで停止します。

新しいランがシーケンスを終えたら、先行のランの二次解析が再び初めから自動的に開始されます。

Sequencing Analysis Viewer

イルミナ Sequencing Analysis Viewer (SAV) を使用すると、ランを妨げることなく、ランをより詳しくモニタリングできます。MiSeq とは別のコンピューターから SAV を用いて進行中の一次解析結果を参照するには、お使いの MiSeq がネットワークに接続されている必要があります。

SAV を使用すると、メトリクスが生成されているランの間も、ランが完了した後もメトリクスを表示できます。SAV は、装置に接続されているのと同じネットワークにアクセス可能な MiSeq とは別のコンピューターにインストールしてください。ソフトウェアの起動後に、ランに対する出力フォルダーを参照してください。

テンプレート形成後、SAV は、RTA によって生成されたメトリクスにより、プロット、グラフ、および表を準備します。



注意

SAV はすべてのイルミナシーケンスシステム（大半は 8 レーンフローセルを使用）で利用可能です。一部のビューには、レーン 1～8 を表示したドロップダウンリストが含まれます。MiSeq フローセルはシングルレーンであるため、**[All]** または **[Lane 1]** を選択します。詳細については、『Sequencing Analysis Viewer User Guide』（文書番号：15020619）を参照してください。

必要なディスクスペース

装置に組み込まれているコンピューターには、約 550 GB の記憶域容量があります。

ランを開始する前に、ソフトウェアは使用可能なディスクスペースをチェックします。ランのためのディスクスペースが十分でない場合、必要なディスクスペースを示すメッセージが表示されます。

利用可能なディスクスペースを確保するよう要求された場合は、古いランフォルダーを適宜移動または削除してください。詳細については、34 ページの「ファイルの管理」を参照してください。フォルダーを整理して十分なディスクスペースを確保した後、**[Restart Check]** を選択します。

MiSeq Reagent Kit の概要

MiSeq Reagent Kit はシーケンスランの実行に必要な使い捨ての試薬キットです。さまざまな種類やサイズが用意されています。MiSeq Reagent Kit の各タイプには、キットに固有なフローセルタイプと、1 回のランの実行に必要な試薬がすべて含まれています。

消耗品を正確に追跡し、互換性を保つために、キットに含まれているフローセル、PR2 ボトル、および試薬カートリッジには RFID（無線自動識別）が使用されています。

必ずフローセルタイプに関連付けられている試薬カートリッジを使用してください。試薬カートリッジに互換性がない場合は、ランセットアップのステップ中にメッセージが表示され、互換性のある試薬カートリッジをロードするように要求されます。

使用可能な試薬キットの詳細については、イルミナのウェブサイトの [MiSeq Reagent Kit の製品ページ](#) を参照してください。

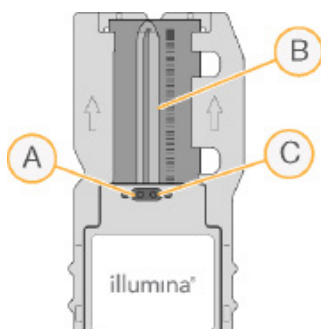
フローセル

MiSeq フローセルは、クラスターが形成され、シーケンス反応が行われる使い切りのガラス基板です。

試薬は、インレットポートを通じてフローセルへと入り、シングルレーンのイメージング領域を通過した後、アウトレットポートを通じてフローセルから排出されます。フローセルから出る廃液は、廃液ボトルへと送られます。

ライブラリーは、ランのセットアップ前に試薬カートリッジにロードされ、ランの開始後にフローセルへと自動的に送液されます。

図 4 MiSeq フローセル



- A アウトレットポート
- B イメージング領域
- C インレットポート

フローセルのキャップの色

フローセル容器のキャップの色によって、フローセルタイプがわかるようになっています。

フローセル	フローセルのキャップの色
標準フローセル PGS フローセル	透明
マイクロフローセル	緑
ナノフローセル	黄

試薬カートリッジの概要

MiSeq 試薬カートリッジは使い切りの消耗品で、ホイルで密閉されたリザーバーを持っています。リザーバーには、1回のフローセルのシーケンスに十分なクラスター試薬およびシーケンス試薬があらかじめ充填されています。

カートリッジの各リザーバーには、番号が付けられています。サンプルライブラリーは、カートリッジの位置 17（[Load Samples] と表記されている）にロードします。



警告

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、地域、国およびローカルに適用されている法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報については、support.illumina.com/sds.html に掲載の SDS を参照してください。

指定のリザーバー

図5 番号付きリザーバーが付いた試薬カートリッジ

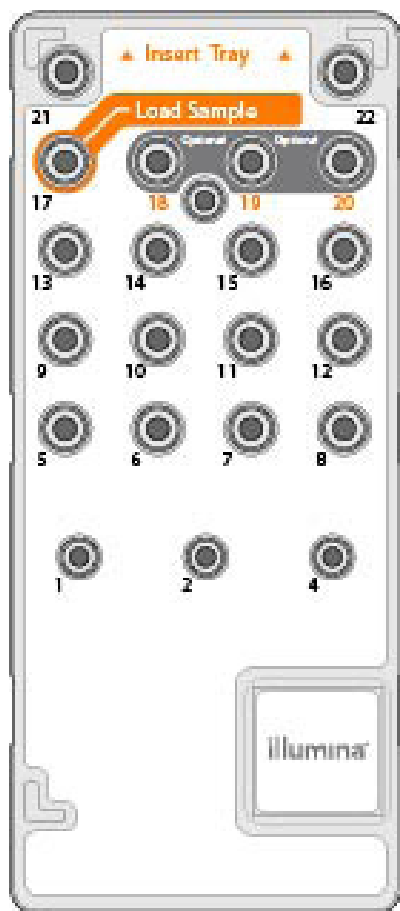


表1 試薬カートリッジリザーバー

位置	試薬名	内容説明
8	LDR	変性試薬（ホルムアミド）
17	配備	Load Sample （サンプルライブラリー用に配備）
18	予備	カスタム Read 1 プライマーのための予備（オプション）
19	予備	カスタム Index Read プライマーのための予備（オプション）
20	予備	カスタム Read 2 プライマーのための予備（オプション）



注意

MiSeq 試薬カートリッジでのカスタムプライマーの使用に関する詳細については、『MiSeq Custom Primers Guide』（文書番号：15041638）を参照してください。

第2章 はじめに

MiSeq の起動	11
システム設定のカスタマイズ	11
BaseSpace 最新版の通知の設定	12
電子メール情報の設定	12
デフォルトフォルダーロケーションの設定	12
消耗品	13

MiSeq の起動

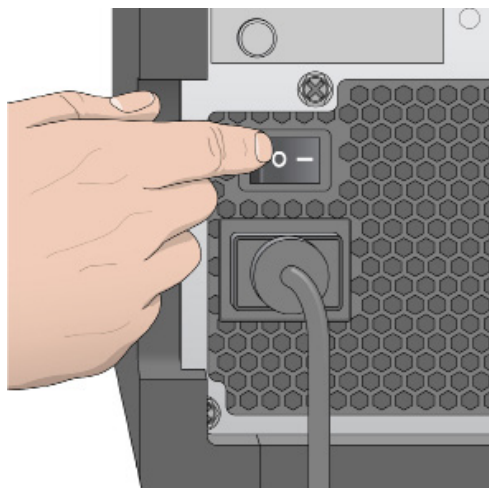
- 1 装置の背面にあるトグル電源スイッチを | (ON) の位置に切り替えます。



注意

パフォーマンスを最善にするには、装置を常時 ON にしておいてください。ただし、装置の電源を OFF にする必要がある場合には、36 ページの「装置のシャットダウン」を参照してください。少なくとも 60 秒待ってから、電源スイッチを ON の位置に戻します。

図 6 電源スイッチの位置



- 2 システムがロードされるまで待つてから、オペレーティングシステムにログオンします。必要に応じて、ユーザー名とパスワードをお使いの施設の管理者にお問い合わせください。オペレーティングシステムがロードされると、MiSeq Control Software (MCS) が自動的に起動され、システムを初期化します。
- 3 Local Run Manager については、ユーザー管理が有効になっている場合、Local Run Manager のユーザー名とパスワードでログインしてから、[Next] を選択します。

システム設定のカスタマイズ

- 1 [Main Menu] から [System Settings] を選択します。
- 2 [Run] タブを選択します。
- 3 [Post Run Wash] または [Maintenance Wash] を選択します。
各ランの終了後には装置洗浄が必要です。ソフトウェアは後続のランをセットアップする前に洗浄を実施することを要求します。[Post-Run Wash Option] では、デフォルトで実施される洗浄タイプを指定します。ポストランウォッシュの所要時間は約 30 分です。メンテナンスウォッシュには約 90 分かかります。

- 4 (オプション) ランを自動的に開始するには、[**Start run after pre-run check. Do not prompt for confirmation**] を選択します。
- 5 [**BaseSpace**] タブを選択します。
- 6 装置を接続する BaseSpace の地域を選択します。この設定は、データの適切なストレージが Illumina Proactive サポートおよびモニタリングサービスに送信されるようにするために用いられます。
- 7 [**Send Instrument Performance Data to Illumina to aid technical support**] を選択して、Illumina Proactive モニタリングサービスを有効にします。ソフトウェアインターフェースにおける本設定名は、ご使用の MCS のバージョンによって、本ガイドの名前と異なる場合があります。この設定をオンにすると、装置性能データがイルミナに送信されます。このデータは、イルミナによる問題解決をより容易にし、潜在的な故障の検出をするだけでなく、積極的なメンテナンスを可能にし、システムの操作可能時間を最大限にすることができます。このサービスの利点の詳細については、『Illumina Proactive Technical Note』（文書番号：1000000052503）を参照してください。本サービスは、次のようになっています。
 - ▶ シーケンスデータは送信しません。
 - ▶ システムのインターネットアクセスによるネットワーク接続を必要とします。
 - ▶ デフォルト設定でオンになっています。このサービスの設定を外すには [**Send Instrument Performance Data to Illumina to aid technical support**] の設定を無効にします。

BaseSpace 最新版の通知の設定

- 1 [Main Menu] から [**Software Update**] を選択します。
- 2 [**Automatically check for new software updates on BaseSpace**] を選択します。

電子メール情報の設定

MiSeq では、RTA 解析の完了時、装置上の二次解析の完了時、あるいは MiSeq ソフトウェアに重大なエラーが発生した場合に、電子メール通知を送信するよう設定できます。

- 1 [Main Menu] から [**System Settings**] を選択します。
- 2 [**Email Notifications**] タブを選択します。
- 3 以下の情報を入力します。
 - ▶ **Local SMTP email server address**：画面上のキーボードを使用して、ローカル SMTP 電子メールサーバーのアドレスを入力します。必要に応じて、施設の管理者にアドレス情報を問い合わせてください。
 - ▶ **Sender address**：画面上のキーボードを使用して、送信元の電子メールアドレスを入力します。このアドレスは、電子メール通知を送信するために指定するもので、ご自身の電子メールアドレスなどになります。
 - ▶ **Recipient addresses**：画面上のキーボードを使用して、通知を受け取る各送信先の電子メールアドレスを入力します。各電子メールアドレスはカンマで区切ります。[**Test**] を選択して、テスト用の電子メールを通知受信者に送信します。
 - ▶ **Notify via email when**：通知を送信する条件となる各ランイベントのチェックボックスを選択します。

デフォルトフォルダーロケーションの設定

フォルダーはローカルネットワーク上または装置のコンピューター上に置くことができます。

- 1 [Main Menu] から [**System Settings**] を選択します。
- 2 [**Folders**] タブを選択します。
- 3 次のフォルダーのデフォルトの場所を入力します。

- ▶ **Output Folder**: 解析出力ファイルのデフォルトの場所を設定します。共有および長期保存の場合は、デフォルト出力フォルダーをネットワークの場所に変更してください。詳細については、[43 ページの「ランフォルダー」](#)を参照してください。
- ▶ **Sample Sheet Folder**: サンプルシートのデフォルトの場所を設定します。サンプルシートはライブラリー調製前に作成され、ランのパラメーターを含んでいます。

消耗品

ランを開始する前に、ユーザーが用意する消耗品がすべてあることを確認してください。

消耗品	サプライヤー	目的
ストック 1.0 N NaOH、 分子生物学グレード	一般的なラボ用品サプライヤー	サンプルライブラリーと PhiX コントロール DNA の変性
アルコールワイプ、 70% イソプロピル または 70% エタノール	VWR、カタログ番号： 95041-714* 一般的なラボ用品サプライヤー	フローセルホルダーの洗浄
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	一般用途
ラボ用リントフリー紙	VWR、カタログ番号： 21905-026*	フローセルステージおよびロードサンプルリザーバーを覆っているホイルシールの洗浄
レンズ用ティッシュ、 約 10 x 15 cm	VWR、カタログ番号： 52846-001*	フローセルの洗浄
マイクロ遠心チューブ	一般的なラボ用品サプライヤー	サンプルライブラリーおよび PhiX コントロール DNA の変性と希釈
MiSeq チューブ	イルミナ、 パーツ番号：MS-102-9999	テンプレートラインの洗浄、VeriSeq PGS ワークフローで使用（その他のワークフローではオプション）
NaOCl、5%	Sigma-Aldrich、カタログ番号： 239305*	テンプレートラインの洗浄、VeriSeq PGS ワークフローで使用（その他のワークフローではオプション）
Tween 20	Sigma-Aldrich、カタログ番号： P7949	装置の洗浄
ピンセット、プラスチック製で 四角形の先端（オプション）	McMaster-Carr、カタログ番号： 7003A22*	フローセル輸送容器からのフローセルの取り出し
水、ラボラトリーグレード	一般的なラボ用品サプライヤー	装置の洗浄

* またはラボラトリーグレードの同等品

ラボラトリーグレード水のガイドライン

装置の手順を実行する際は、常にラボラトリーグレード水または脱イオン水を使用してください。水道水は決して使用しないでください。以下のグレードの水または同等品のみを使用してください。

- ▶ 脱イオン水
- ▶ イルミナ PW1
- ▶ 18メガオーム (MΩ) 水
- ▶ Milli-Q 水
- ▶ Super-Q 水
- ▶ 分子生物学用グレード水

第3章 シーケンス

はじめに	14
ラン実行時間	14
クラスター形成	15
シーケンス	15
解析	15
試薬カートリッジの融解	15
試薬カートリッジの点検	16
ライブラリーの変性と希釈	16
サンプルライブラリーのロード	16
MCS を使用したランのセットアップ	17
フローセルの洗浄	19
フローセルのロード	20
試薬のロード	21
ランの開始	23
ランのモニタリング	24
ポストランウォッシュの実施	26

はじめに

MiSeq でシーケンスランを行うには、本章で説明するセットアップ手順に従ってください。

以下の3種のランセットアップオプションがあります。

- ▶ Local Run Manager : Local Run Manager で準備されたランを選択します。
- ▶ Sample Sheet : サンプルシートを使用してランを作成します。サンプルシートは Local Run Manager でバリデーションされています。
- ▶ Manual : 各リードのサイクル数 (~ 10 サイクル) を手動で入力してランを作成します。このオプションを選択した場合、二次解析は行われません。

ランが始まると、ユーザーによる追加の介入は一切必要ありません。

シーケンスランをモニタリングするには、以下のいずれかを行います。

- ▶ BaseSpace Sequence Hub を使用します。
- ▶ 装置上で行うには、[Sequencing] 画面を使用します。
- ▶ 遠隔で行うには、Sequencing Analysis Viewer (SAV) を使用します。このオプションのアプリケーションは、イルミナのウェブサイトからダウンロードできます。
- ▶ 遠隔で行うには、Local Run Manager を使用します。

シーケンスランが完了した後、装置の洗浄を行います。

ラン実行時間

ラン実行時間は実施されるサイクル数に基づきます。MCS v2.3以降では、ペアエンドランを最大301 x 2シーケンスサイクルと、任意の Index Read を実行できます。

また、ラン実行時間は、使用している MiSeq 試薬のバージョンおよび装置にインストールされている任意の性能拡張アップグレードに基づきます。

予想される実行時間やその他の仕様については、イルミナのウェブサイトにある [MiSeq システム仕様のページ](#)を参照してください。

1 リード内のサイクル数

シーケンスランにおいて、1リード内で実行されるサイクル数は、解析対象のサイクル数より1サイクル多くしてください。追加のサイクルはフェージングおよびプレフェージングの計算に必要です。

例えば、300サイクルの1つのペアエンドランでは、301サイクルのリード2つ（ 301×2 ）、合計602サイクルを実施します。ランの終了時に、 300×2 サイクルが解析されます。

クラスター形成

クラスター形成中に、単一DNA分子がフローセルの表面に結合され、クラスターを形成するためにブリッジ増幅されます。

シーケンス

クラスター形成後に、4つの蛍光標識された各ジデオキシヌクレオチドに固有であるLEDとフィルターの組み合わせを使用して、クラスターがイメージ化されます。1つのタイルのイメージングが完了すると、次のタイルのイメージングが行われるようにフローセルは移動されます。このプロセスは各シーケンスサイクルで繰り返し行われます。イメージ解析に続いて、ソフトウェアがベースコーリング、フィルタリング、およびクオリティスコアリングなどの一次解析を行います。

解析

Local Run Manager または Sample Sheet モードでランが終了すると、Local Run Manager 解析ソフトウェアが自動的に起動し、アライメントやバリエーションコーリングを含む二次解析を実行します。二次解析は、別のコンピューターからインターネット接続を介してモニタリングできます。詳細については、17ページの「Local Run Manager オプションの設定」を参照してください。

試薬カートリッジの融解

室温のウォーターバス内で試薬カートリッジを融解させます。



注意

あるいは、 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ の保冷庫で試薬を一夜融解させてください。試薬はこの温度で保管すると、1週間まで安定しています。

- 1 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ の保管庫から試薬カートリッジを取り出します。
- 2 試薬カートリッジの底がつかのりに十分なだけの室温の脱イオン水が入っているウォーターバスに、試薬カートリッジを置きます。水が試薬カートリッジに印刷されている最高水位線（Maximum Water Line）を超えないようにしてください。

図7 最高水位線



- 3 完全に融解されるまで、室温のウォーターバス内で試薬カートリッジを融解させます。
 - ▶ MiSeq v3 カートリッジ：約60～90分
 - ▶ MiSeq v2 カートリッジ：約60分
- 4 ウォーターバスからカートリッジを取り出し、作業台の上で優しく叩き、カートリッジの下部から水を除去します。カートリッジの下部を乾燥させます。

試薬カートリッジの点検

- 1 試薬カートリッジを 10 回転倒混和して、融解された試薬を混ぜ合わせてから、すべての位置の試薬が融解していることを点検します。
- 2 位置 1、2、4 の試薬を点検し、完全に混ざっていて沈殿がないことを確認します。
- 3 作業台の上でカートリッジを優しく叩き、試薬中の気泡を減らします。



注意

MiSeq シッパーチューブは、試薬を吸引する際、各リザーバーの底部に入られます。そのため、リザーバーに気泡がないようにすることが重要になります。

- 4 ランをセットアップする準備ができるまで、試薬カートリッジは最長 6 時間氷の上に置いておくか、または 2°C ~ 8°C で保管しておきます。最良の結果を得るために、サンプルをロードしてランをセットアップする手順へと直接進みます。



警告

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、地域、国およびローカルに適用されている法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報については詳しくは、support.illumina.com/sds.html に掲載の SDS を参照してください。

ライブラリーの変性と希釈

ライブラリータイプに必要な場合は、ライブラリーを変性させて希釈し、オプションの PhiX コントロールを添加します。『MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：15039740）を参照してください。VeriSeq PGS ワークフローを実行する場合は、『VeriSeq PGS Library Preparation Guide』（文書番号：15052877）を参照してください。

このステップは、すべてのライブラリータイプに適用されるわけではありません。一部のイルミナサンプル調製方法では、ノーマライズされた濃度のプーリングされたライブラリーが用意されるため、そのまま使用できます。サンプルライブラリーを調製するために使用するキットについては、サンプル調製ガイドを参照してください。



注意

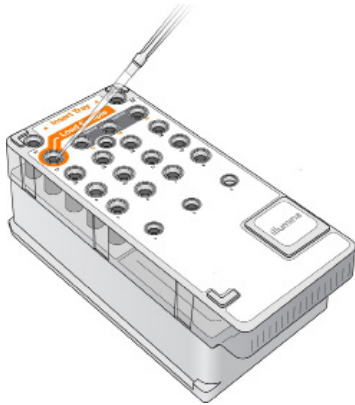
カスタムプライマーを使用する場合は、『MiSeq Custom Primers Guide』（文書番号：15041638）に従ってプライマーの調製とサンプルシートのセットアップを行ってください。

サンプルライブラリーのロード

試薬カートリッジを完全に融解し、使用する準備ができたなら、調製したライブラリーをカートリッジにロードします。

- 1 [Load Samples] と表記されたリザーバーを覆っているホイルシールをラボ用リントフリー紙で拭きます。
- 2 清潔な 1 mL ピペットを使用してホイルシールに穴を開けます。
- 3 調製済みライブラリー 600 μ L をピペットで [Load Samples] リザーバーに注入します。ホイルシールには触れないでください。

図 8 ライブラリーのロード



- 4 MiSeq Control Software (MCS) インターフェースを使用して、ランセットアップのステップに直接進みます。

MCS を使用したランのセットアップ

- 1 [Main Menu] から [**Reboot**] を選択してシステムソフトウェアを再起動します。
- 2 (オプション) [Folders] タブで、MiSeqOutput、レシピ、サンプルシート、およびマニフェストのフォルダーの場所をチェックします。詳細については、12 ページの「デフォルトフォルダーロケーションの設定」を参照してください。
- 3 [Home] 画面から [**Sequence**] を選択して、ランセットアップステップを開始します。
[Home] 画面の [**Sequence**] を選択すると、一連のランセットアップ画面が [Sequence Mode Selection] ([Local Run Manager]、[Sample Sheet]、[Manual])、[BaseSpace Option]、[Load Flow Cell]、[Load Reagents]、[Review]、[Pre-Run Check] の順に表示されます。

Local Run Manager オプションの設定

- 1 [Home] 画面から [**Sequence**] を選択します。
- 2 [Sequence Mode Selection] 画面から [**Local Run Manager**] を選択します。
- 3 (オプション) [BaseSpace Options] 画面から [**Use BaseSpace™**] を選択します。
詳細については、18 ページの「BaseSpace オプションの設定」を参照してください。
- 4 [**Next**] を選択します。
- 5 使用可能なランの一覧からラン名を選択します。
- 6 (オプション) [**Preview Samples**] を選択して、解析に関連するサンプルを表示します。
- 7 [**Next**] を選択して、20 ページの「フローセルのロード」に進みます。



注意

ローディング前にフローセルを洗浄します。詳細については、19 ページの「フローセルの洗浄」を参照してください。

[Sample Sheet] オプションの設定

- 1 [Home] 画面から [**Sequence**] を選択します。
- 2 [Sequence Mode Selection] 画面から [**Sample Sheet**] を選択します。
- 3 (オプション) [BaseSpace Options] 画面から [**Use BaseSpace™**] を選択します。
詳細については、18 ページの「BaseSpace オプションの設定」を参照してください。

- 4 [Next] を選択します。
- 5 対象のサンプルシートファイルを参照して選択します。
ファイルはバリデーションまたはランの作成のために Local Run Manager に送信されます。
- 6 (オプション) [Disable Local Run Manager Secondary Analysis] を選択して、Local Run Manager の二次解析を省略します。
- 7 サンプルシートにエラーがある場合はエラーを修正してください。
- 8 [Next] を選択して、20 ページの「フローセルのロード」に進みます。



注意

ローディング前にフローセルを洗浄します。詳細については、19 ページの「フローセルの洗浄」を参照してください。

BaseSpace オプションの設定

オプションで、BaseSpace を使って二次解析を実施することができます。

Local Run Manager または Sample Sheet シーケンスモードが選択されている場合、オプションで、BaseSpace を用いて二次解析を実行することができます。

- 1 [BaseSpace Options] 画面から [Use BaseSpace™] を選択します。
このオプションを選択しても、MiSeq 上にこのランからの生データが保管されます。
- 2 以下のいずれかを選択します。
 - ▶ Send all run data to BaseSpace Sequence Hub for remote monitoring and data analysis.
 - ▶ Only send run information files to BaseSpace Sequence Hub so runs can be monitored remotely.
- 3 Myllumina アカウントの認証情報を入力します。
- 4 [Next] を選択します。

[Manual] オプションの設定

- 1 [Home] 画面から [Sequence] を選択します。
- 2 [Sequence Mode Selection] 画面から [Manual] を選択します。
- 3 (オプション) [Use run monitoring only] を選択し、Myllumina 認証情報を入力します。



注意

BaseSpace Sequence Hub Analysis and Storage オプションはマニュアルモードでは使用できません。

- 4 [Next] を選択します。
- 5 すべてのサイクルのリードタイプ、リード長、およびカスタムプライマーを設定します。各 Index Read のサイクル数（最大 10 サイクル）を入力します。
- 6 [Next] を選択して、20 ページの「フローセルのロード」に進みます。



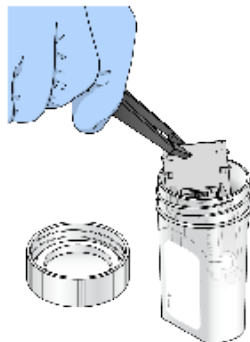
注意

ローディング前にフローセルを洗浄します。詳細については、19 ページの「フローセルの洗浄」を参照してください。

フローセルの洗浄

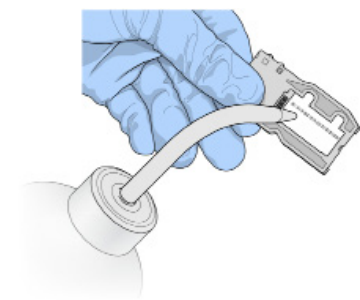
- 1 新しいパウダーフリー手袋をつけます。
- 2 プラスチック製ピンセットを使用してプラスチック製カートリッジの端をつまみ、フローセル容器からフローセルを取り出します。

図9 フローセルの取り出し



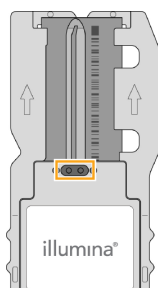
- 3 ラボラトリーグレード水を使用してフローセルを軽い水流ですすぎ、ガラスとプラスチックカートリッジの両方から余分な塩分を完全に洗い流します。
余分な塩分が残っていると、装置上のフローセルの設置位置に影響を与える場合があります。イメージング領域で塩分が乾燥すると、イメージングにも影響する可能性があります。

図10 フローセルのすすぎ



- 4 黒色のフローセルポートガスケット周辺に注意しながら、リントフリーのレンズクリーニング用ティッシュを使用してフローセルとカートリッジを拭き、完全に乾かします。ガスケット部、およびガラスの周辺部は、軽く叩くようにして水分を吸い取ります。

図11 フローセルポートとガスケット



- 5 フローセルのガラスをアルコールワイプで拭きます。ガラスに条痕、指紋、細かいごみやティッシュ繊維がないことを確認します。



注意

フローセルポートガスケットにはアルコールワイプを使用しないでください。

図 12 フローセルの水分の拭き取り

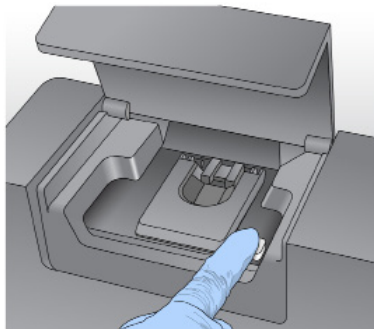


- 6 リントフリーのレンズ用ティッシュで余分なアルコールを拭き取ります。
- 7 フローセルポートが塞がれていないこと、およびガスケットがフローセルポートの周囲に密着していることを確認します。
ガスケットが外れそうに見える場合、フローセルポート周辺にしっかりと収まるまで所定の位置に優しく押し戻します。

フローセルのロード

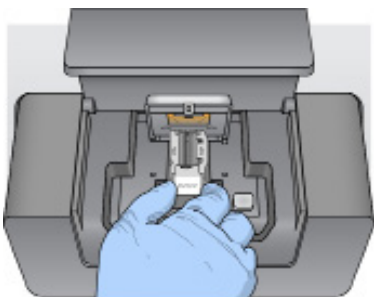
- 1 フローセルコンパートメントドアを持ち上げて、フローセルクランプの右の解除ボタンを押します。フローセルクランプが開きます。

図 13 フローセルクランプを開く



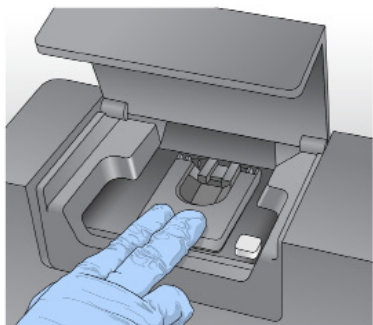
- 2 フローセルステージに細かいごみがないことを確認します。細かいごみまたはその他の残屑が存在する場合、アルコールワイブ、あるいはエタノールまたはイソプロパノールで湿らせたリントフリー紙を用いてフローセルステージを洗浄します。清潔になり、乾燥するまで、フローセルステージの表面を慎重に拭き取ります。
- 3 フローセルの端を持ってフローセルステージに置きます。

図 14 フローセルをステージに置く



- 4 フローセルクランプを静かに押し下げてフローセルに覆いかぶせます。フローセルクランプが閉じると、アライメントピンがフローセルを位置調節します。カチッと音がして、フローセルクランプが固定されたことがわかります。

図 15 フローセルクランプを閉じる



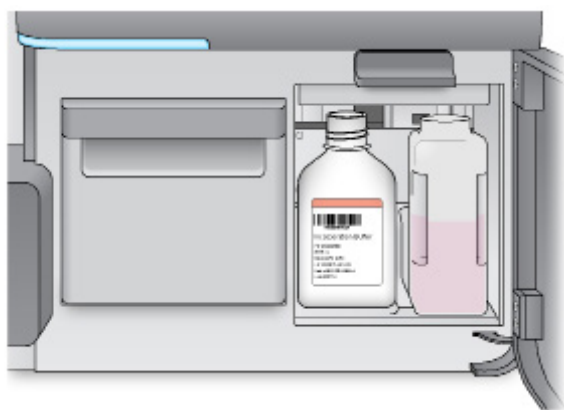
- 5 ソフトウェアがフローセルの RFID を検出しない場合は、40 ページの「RFID リードエラーの解決」を参照してください。
- 6 フローセルコンパートメントドアを閉じます。
- 7 [Next] を選択します。

試薬のロード

PR2 のロードおよび廃液ボトルのチェック

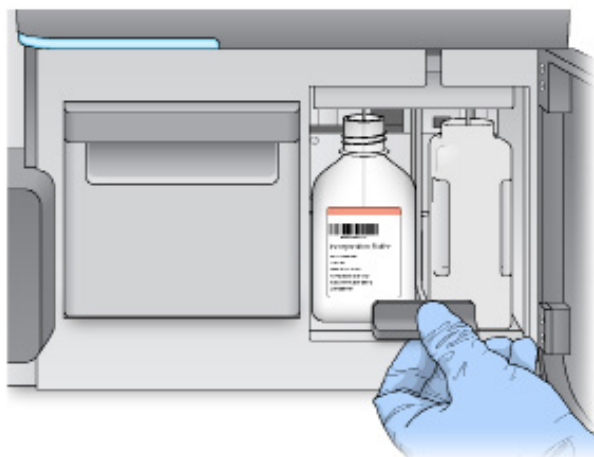
- 1 2°C～8°Cの保管庫から PR2 のボトルを取り出します。転倒混和し、蓋を取り外します。
- 2 試薬コンパートメントドアを開けます。
- 3 シッパーハンドルを固定される位置まで持ち上げます。
- 4 洗浄ボトルを取り出して PR2 ボトルをロードします。

図 16 PR2 ボトルのロード



- 5 廃液ボトルの中身を適切な廃液容器に出して空にします。
- 6 シッパーハンドルをゆっくりと下げます。シッパーが PR2 ボトルと廃液ボトルの中に下がっていることを確認してください。

図 17 シッパーハンドルを下げる



- 7 ソフトウェアが PR2 ボトルの RFID を検出しない場合は、40 ページの「RFID リードエラーの解決」を参照してください。
- 8 **[Next]** を選択します。

試薬カートリッジのロード

- 1 試薬チラードアを開けます。



注意

試薬チラードアを長時間開けたままにしないでください。

- 2 試薬カートリッジのイルミナラベルが付いた方の端を持って試薬カートリッジを試薬チラーに差し入れ、カートリッジが止まるまで押し込みます。
ロードしたフローセルのタイプに関連付けられている試薬カートリッジを必ず使用してください。試薬カートリッジに互換性がない場合は、メッセージが画面に表示されます。**[Back]** を選択して適切な試薬カートリッジをロードするか、**[Home]** を選択して **[Home]** 画面に戻ります。

図 18 試薬カートリッジのロード



- 3 試薬チラードアを閉じます。
- 4 ソフトウェアが試薬カートリッジの RFID を検出しない場合は、40 ページの「RFID リードエラーの解決」を参照してください。

- 5 試薬カートリッジにフローセルとの互換性がない場合は、メッセージが表示されます。[Back] を選択して互換性のあるカートリッジをロードするか、[Exit] を選択して [Home] 画面に戻ります。
- 6 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 7 [Next] を選択します。

ランの開始

フローセルと試薬をロードしたら、ランを開始する前にランパラメーターの見直しとプレランチェックを実行してください。



注意

[Run Settings] で [Start run after pre-run check] オプションが選択されている場合、ランは自動的に開始されます。詳細については、11 ページの「システム設定のカスタマイズ」を参照してください。

ランパラメーターの見直し

- 1 実験名、モジュール名、リードタイプ、リード長、およびカスタムプライマーを見直します。これらのパラメーターは、サンプルシートで指定されています。
- 2 (オプション) Local Run Manager または Manual モードの場合は、[Edit] を選択してリードタイプ、リード長、またはカスタムプライマーを変更した後、[Save] を選択します。



注意

インデックスへの変更はサンプルシートで実施する必要があります。[Sample Sheet] モードの場合、元のサンプルシートを変更してから、再ロードする必要があります。

- 3 [Change Folder] を選択してフォルダーの場所を見直します。
- 4 必要に応じて変更した後、[Save and Continue] を選択します。
- 5 [Next] を選択します。

フォルダーの変更

フォルダーの場所を変更するには、[Change Folder] を選択し、希望する場所を指定します。[Review] 画面からのこのオプションを用いると、後続のランすべてのフォルダーの場所が変更されます。

プレランチェックのレビュー

システムは、ランを開始する前にすべてのランコンポーネント、ディスク容量、およびネットワーク接続のチェックを行います。

プレランチェックでいずれかの項目に問題がある場合は、エラーの修正方法を説明するメッセージが画面に表示されます。詳細については、40 ページの「ランセットアップエラーの解決」を参照してください。

プレランチェックですべての項目に問題がなければ、[Start Run] を選択します。

ラン開始前の重要な注意事項



警告

MiSeq は振動に敏感です。ランを開始した後に装置に触れると、シーケンス結果に悪影響を及ぼす可能性があります。

[Start Run] を選択した後、フローセルコンパートメントまたは試薬コンパートメントのドアを開けないでください。また、ランを一時停止する場合以外は装置モニターに触れないでください。詳細については、39 ページの「ランの一時停止」を参照してください。



警告

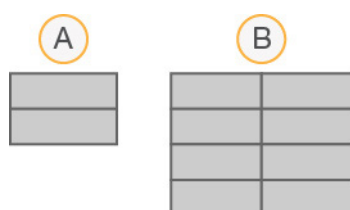
ラン開始前には MiSeq 上の全ファイルを必ず閉じ、ランの最中はファイルを開かないでください。

ランのモニタリング

ランの進行中、装置上の [Sequencing] 画面を使用してランの詳細をモニタリングします。[Sequencing] 画面は表示専用です。

ランをモニタリングするために次のようなオプションがあります。

- ▶ 装置のコンピューターと独立したコンピューターにインストールした Sequencing Analysis Viewer (SAV)。ネットワーク接続が必要です。詳細については、7 ページの「Sequencing Analysis Viewer」を参照してください。あるいは、BaseSpace に接続されている場合には、BaseSpace の SAV を用いてランをモニタリングすることができます。
 - ▶ 装置が同じネットワークに接続されている場合、遠隔でランをモニタリングする Local Run Manager。Local Run Manager はランの進捗およびシーケンス情報（合計クラスター、クラスター PF の比率（%）、Read 1 および Read 2 の Q30 以上の比率（%）、最新スコアサイクル）を表示します。詳細については、7 ページの「Local Run Manager ソフトウェア」を参照してください。
- 1 装置の [Sequencing] 画面で、ランの進捗、強度、およびクオリティスコアをモニタリングします。
- ▶ **Run Progress**：ランの進捗をステータスバーで示し、完了したサイクル数を一覧表示します。
 - ▶ **Intensity**：各タイルの 90 パーセントタイルのクラスター強度値を示します。
- 蛍光強度領域のグラフは、イメージ化されるタイルの数とサーフェースの数を表しています。
- ▶ フローセルが上面でのみイメージ化される場合は、1 列のグラフが表示されます。
 - ▶ フローセルが上面と底面でイメージ化される場合は、2 列のグラフが表示されます。



- A 2 タイル、上面のみを示す
 B 4 タイル、上面と底面を示す

- ▶ **Q-Score All Cycles**：クオリティスコア（Q スコア）が Q30 を超えた塩基の平均パーセンテージを示します。Q スコアはベースコールが誤りである確率に関する推定値です。Q スコアはサイクル 25 の後に計算されます。

Q スコア	ベースコールが誤りである確率
Q40	10,000 分の 1
Q30	1,000 分の 1

Q スコア	ベースコールが誤りである確率
Q20	100 分の 1
Q10	10 分の 1

- ▶ **Cluster Density (K/mm²)** : ランの平方ミリメートルあたりのクラスターの数を示します。
- ▶ **Clusters Passing Filter (%)** : イルミナの Chastity フィルターに基づいてフィルターをパスしたクラスターのパーセンテージを示します。これによって品質を測定します。このデータはサイクル 25 の後にのみ表示されます。



注意

ベースコールの Chastity は、一番強いシグナルを 1 番目と 2 番目のシグナルの合計値で割り算した蛍光強度の比率です。最初の 25 サイクル中に Chastity の値が 0.6 未満であるベースコールが 2 つ以上ある場合、リードはクオリティフィルターをパスしません。

- ▶ **Estimated Yield (Mb)**: ランでコールされた塩基数の推定値を Mb(メガベース)で示します。このデータはサイクル 25 の後にのみ表示されます。

2 ランが完了したら、[Next] ボタンが表示されます。次へ進む前に [Sequencing] 画面で結果を見直します。



注意

[Next] を選択するまでは、[Sequencing] 画面が引き続き表示されます。[Next] を選択した後に [Sequencing] 画面に戻ることはできません。

3 [Next] を選択して [Sequencing] 画面を終了し、ポストランウォッシュに進みます。

テンプレート形成

テンプレート形成とは、フローセル表面全体におけるクラスターの位置が X 座標位置と Y 座標位置に従って定義されるプロセスです。Real-Time Analysis (RTA) では、テンプレート形成のために、ランの初頭のサイクルが使用されます。

クラスター位置のテンプレートが生成されると、後続する各サイクルで取得されたイメージはテンプレートに対してアライメントされます。4 つのヌクレオチドのカラーチャンネルすべてにおいて個々のクラスター強度が抽出され、ノーマライズされたクラスター強度からベースコールが生成されます。

ランメトリクス

ランのさまざまな時点で、ランメトリクスが [Sequencing] 画面に表示されます。クラスター形成ステップの間、メトリクスは表示されません。

シーケンスが始まった後、記載のサイクルで、以下のメトリクスが表示されます。

メトリクス	キット	サイクル
強度	MiSeq Reagent Kit, v3	サイクル 1 ~ 7
	MiSeq Reagent Kit, v2	サイクル 1 ~ 4
		サイクル 1 ~ 4
強度およびクラスター密度	MiSeq Reagent Kit, v3	サイクル 8 ~ 25
	MiSeq Reagent Kit, v2	サイクル 5 ~ 25
		サイクル 5 ~ 25
強度、クラスター密度、% PF、収量および Q スコア	MiSeq Reagent Kit, v3	サイクル 26 からラン完了まで
	MiSeq Reagent Kit, v2	

MiSeq ランの仕様については、イルミナのウェブサイトにある MiSeq システム仕様のページ (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn) を参照してください。

RTA 解析結果

シーケンスランからの RTA 解析出力は、クオリティスコア化されたベースコールファイル (*.bcl) のセットです。ベースコールファイルは raw イメージファイルから生成されます。RTA ファイルとフォルダーのリストについては、[45 ページの「RTA フォルダーおよびファイル」](#)を参照してください。

ポストランウォッシュの実施

ポストランウォッシュはシーケンスランとランの間で行われる標準の装置洗浄です。ランが完了したら、装置の洗浄を必ず実施してください。ソフトウェアのプロンプトに従って、洗浄コンポーネントをロードして、洗浄を行います。ポストランウォッシュの所要時間は約 20 分です。

ランの完了直後に洗浄を始めてください。装置洗浄を実施した後で、後続のランのセットアップが可能になります。ランの直後以外の時機にポストランウォッシュを行う場合は、[Perform Wash] 画面上のコマンドを使用して洗浄を開始します。



注意

使用済みフローセルを装置に残したままにします。装置洗浄を行うには、フローセルが装置にロードされている必要があります。

以下の方法で定期的に装置洗浄を行って、継続的な性能を確保します。

- ▶ フルイディクスラインとシッパーから残留試薬を洗い流す
- ▶ フルイディクスラインとシッパーの中の塩分の集積および結晶化を防止する
- ▶ 前回のランからのクロスコンタミネーションを防ぐ

MCS v2.5 以降をご使用の場合、次亜塩素酸ナトリウム液 (NaOCl) を用いたテンプレートライン洗浄を含むポストランウォッシュを行うオプションがあります。洗浄には約 30 分かかります。[27 ページの「テンプレートライン洗浄を伴う手順」](#)を参照してください。



注意

VeriSeq PGS ワークフローを用いる場合、テンプレートライン洗浄を含むポストランウォッシュを行ってください。[27 ページの「テンプレートライン洗浄を伴う手順」](#)を参照してください。

消耗品

- ▶ Tween 20
- ▶ ラボラトリーグレード水
- ▶ NaOCl (テンプレートライン洗浄を含むポストランウォッシュに使用)
- ▶ MiSeq チューブ (パーツ番号:MS-102-9999) (テンプレートライン洗浄を含むポストランウォッシュ用)

手順

- 1 Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。

- 2 新しい洗浄溶液を使用して洗浄コンポーネントを準備します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
- 3 ランが完了したら、[**Start Wash**] を選択します。
ソフトウェアによって自動的にシッパが試薬チラーまで上がります。
[Post-Run Wash] 画面で [**Perform optional template line wash**] を選択しないでください。テンプレートライン洗浄には別の手順が必要です。27 ページの「[テンプレートライン洗浄を伴う手順](#)」を参照してください。
- 4 試薬コンパートメントドアと試薬チラードアを開け、使用済みの試薬カートリッジをチラーから引き出します。
- 5 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込み、試薬チラードアを閉めます。
- 6 PR2 ボトルと廃液ボトルの手前にあるシッパハンドルを固定される位置まで持ち上げます。
- 7 PR2 ボトルを取り出して洗浄ボトルと交換します。



注意

各ランの後に PR2 ボトルを廃棄します。残った PR2 は再使用しないでください。

- 8 廃液ボトルを取り出し、中身を適切に廃棄します。廃液ボトルを試薬コンパートメントに戻します。



警告

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、地域、国およびローカルに適用されている法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報について詳しくは、support.illumina.com/sds.html に掲載の SDS を参照してください。

- 9 シッパハンドルをゆっくりと下げ、シッパが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
- 10 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 11 [**Next**] を選択します。

洗浄の完了後は、装置に使用済みフローセル、洗浄トレイ、および残りの洗浄溶液の入った洗浄ボトルをそのままにします。



注意

シッパの位置は下がったままですが、これは正常です。洗浄トレイおよび洗浄ボトルの未使用洗浄溶液をそのままにして、シッパが乾燥し、空気がシステムに入るのを防ぎます。

テンプレートライン洗浄を伴う手順

- 1 Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。
- 2 ラボラトリーグレード水を使用して新しい NaOCl 洗浄溶液を準備します。
 - a 36 μ L の 5% NaOCl を 864 μ L のラボラトリーグレード水に添加します。これにより、1 : 25 の NaOCl 希釈液になります。

- b MiSeq チューブ（パーツ番号：MS-102-9999）に入れた 950 μ L のラボトリーグレード水に 50 μ L の 1 : 25 NaOCl 希釈液を添加します。

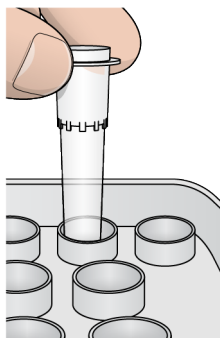


注意

正確な濃度の NaOCl を用いることが重要です。製品ラベルの NaOCl 濃度を必ず確認してください。濃度が高すぎる場合、後続のランでクラスター形成が失敗する可能性があります。5% の NaOCl がない場合は、ラボトリーグレード水で 0.01% NaOCl の 1 mL 溶液を調製します。NaOCl をメンテナンスウォッシュまたはスタンバイウォッシュで使用しないでください。

- 3 新しい洗浄溶液を使用して洗浄コンポーネントを準備します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
- 4 0.01% の NaOCl 洗浄溶液を含む MiSeq チューブを洗浄トレイの位置 17 に挿入し、チューブの首の部分がトレイと同じ高さになるようにします。このチューブにより、位置 17 の Tween 20 とラボトリーグレード水から成る洗浄溶液が置き換えられます。

図 19 MiSeq チューブを洗浄トレイの位置 17 に挿入する



注意

NaOCl を含む MiSeq チューブは、必ず位置 17 のみに挿入してください。別の位置にチューブを挿入すると、後続のランでクラスター形成が失敗する場合があります。MiSeq 装置のフルイディクスシステムが破損するおそれがあります。

- 5 ランが完了したら、[Start Wash] を選択します。ソフトウェアによって自動的にシッパーが試薬チラーまで上がります。
- 6 [Post-Run Wash] 画面で [Perform optional template line wash] を選択します。VeriSeq PGS ワークフローを使用しているときは、[Perform optional template line wash] が最初から選択されています。MCS は、各ラン後に行われたポストランウォッシュのタイプを追跡します。ポストランウォッシュで [Perform optional template line wash] が選択されていない場合、次にシーケンスランを開始するときに [Run Review] 画面に注意喚起のメッセージが表示されます。
- 7 試薬コンパートメントドアと試薬チラードアを開け、使用済みの試薬カートリッジをチラーから引き出します。
- 8 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込み、試薬チラードアを閉めます。
- 9 PR2 ボトルと廃液ボトルの手前にあるシッパーハンドルを固定される位置まで持ち上げます。
- 10 PR2 ボトルを取り出して洗浄ボトルと交換します。



注意

各ランの後に PR2 ボトルを廃棄します。残った PR2 は再使用しないでください。

11 廃液ボトルを取り出し、中身を適切に廃棄します。廃液ボトルを試薬コンパートメントに戻します。



警告

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、地域、国およびローカルに適用されている法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報については、support.illumina.com/sds.html に掲載の SDS を参照してください。

12 シッパーハンドルをゆっくりと下げ、シッパーが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。

13 試薬コンパートメントドアを閉じます。

14 [Next] を選択します。

洗浄の完了後は、装置に使用済みフローセル、洗浄トレイ、および残りの洗浄溶液の入った洗浄ボトルをそのままにします。



注意

シッパーは下の位置に留まります。洗浄トレイおよび洗浄ボトルの未使用洗浄溶液をそのままにして、シッパーが乾燥し、空気がシステムに入るのを防ぎます。

第4章 メンテナンス

メンテナンスの頻度	30
VeriSeq PGS ワークフローのためのメンテナンス頻度	30
メンテナンスウォッシュの実施	31
スタンバイウォッシュの実施	33
ファイルの管理	34
ソフトウェアの更新	36
装置のシャットダウン	36

メンテナンスの頻度

推奨された間隔で次のメンテナンス手順を実施します。



注意

VeriSeq PGS ワークフローを実行する場合は、VeriSeq PGS のメンテナンス頻度ガイドラインに必ず従ってください。30 ページの「VeriSeq PGS ワークフローのためのメンテナンス頻度」を参照してください。

表2 通常時のメンテナンス

作業	頻度
ポストランウォッシュ	毎回ランを実行した後
メンテナンスウォッシュ	毎月
スタンバイウォッシュ	アイドルモード（7日以上未使用の場合）の準備用、装置がアイドルモードのままの場合は30日ごとに実施
装置シャットダウン	必要に応じて

表3 アイドルモード（7日以上未使用）時のメンテナンス

作業	頻度
スタンバイウォッシュ	毎月
装置シャットダウン	必要に応じて

VeriSeq PGS ワークフローのためのメンテナンス頻度

VeriSeq PGS ワークフローを実行する場合は、推奨間隔で次のメンテナンス手順を行ってください。

表4 通常時のメンテナンス

作業	頻度
ポストランウォッシュ	毎回ランを実行した後
メンテナンスウォッシュ	毎月
[Perform Wash] 画面からのポストランウォッシュ	アイドル状態後（3日超未使用）
スタンバイウォッシュ	アイドルモード（7日以上未使用の場合）の準備用、装置がアイドルモードのままの場合は30日ごとに実施
装置シャットダウン	必要に応じて

表5 アイドルモード（7日以上未使用）時のメンテナンス

作業	頻度
スタンバイウォッシュ	毎月
装置シャットダウン	必要に応じて

メンテナンスウォッシュの実施

30 日ごとにメンテナンスウォッシュを行い、最適性能を確保します。

メンテナンスウォッシュは、完了までに約 90 分かかります。この洗浄には、徹底的にシステムを洗浄する 3 回の洗浄ステップが含まれます。

ランとランの間でメンテナンスウォッシュを実施するように装置を構成することができます。詳細については、11 ページの「システム設定のカスタマイズ」を参照してください。


ユーザーが用意する消耗品

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich、カタログ番号：P7949)
- ▶ ラボラトリーグレード水

手順

- 1 使用済みのフローセルが装置にロードされていることを確認します。
- 2 [Home] 画面から [Perform Wash] を選択します。
- 3 [Perform Wash] 画面から [Perform Maintenance Wash] を選択します。
ソフトウェアによって自動的にシッパが試薬チラーまで上がります。

1 回目の洗浄の実施

- 1 Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。
 - 2 新しい洗浄溶液を使用して洗浄コンポーネントを準備します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
 - 3 洗浄トレイと洗浄ボトルを装置にロードします。
 - a 試薬コンパートメントドアと試薬チラードアを開け、使用済みの試薬カートリッジまたは洗浄トレイをチラーから引き出します。
 - b 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込みます。試薬チラードアを閉じます。
 - c PR2 ボトルと廃液ボトルの手前にあるシッパハンドルを固定される位置まで持ち上げ、PR2 ボトルを洗浄ボトルと交換します。
-  **注意**
各ランの後に PR2 ボトルを廃棄します。残った PR2 は再使用しないでください。
- d 廃液ボトルを取り出し、中身を適切に廃棄します。廃液ボトルを試薬コンパートメントに戻します。
 - e シッパハンドルをゆっくりと下げ、シッパが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
 - f 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 4 [Next] を選択します。1 回目の洗浄が始まります。

2 回目の洗浄の実施

各洗浄手順では、必ず新しい洗浄溶液を使用してください。前の洗浄からの洗浄溶液を再利用すると、フルイディクスラインに廃棄物が戻る可能性があります。

- 1 以下の手順に従い、Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。
- 2 1 回目の洗浄が完了したら、洗浄トレイと洗浄ボトルを取り出し、残った洗浄溶液を廃棄します。
- 3 以下の手順に従い、洗浄コンポーネントに新しい洗浄溶液を補充します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
- 4 以下の手順に従い、洗浄トレイと洗浄ボトルをロードします。
 - a 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込みます。試薬チラードアを閉じます。
 - b 洗浄ボトルをロードし、シッパーハンドルをゆっくりと下げてシッパーが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
 - c 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 5 [Next] を選択します。2 回目の洗浄が始まります。

最終洗浄の実施

- 1 Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。
- 2 2 回目の洗浄が完了したら、洗浄トレイと洗浄ボトルを取り出し、残った洗浄溶液を廃棄します。
- 3 洗浄コンポーネントに新しい洗浄溶液を補充します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
- 4 洗浄トレイと洗浄ボトルをロードします。
 - a 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込みます。試薬チラードアを閉じます。
 - b 洗浄ボトルをロードし、シッパーハンドルをゆっくりと下げてシッパーが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
 - c 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 5 [Next] を選択します。最終の洗浄が開始します。

洗浄の後

洗浄の完了後は、装置に使用済みフローセル、洗浄トレイ、および残りの洗浄溶液の入った洗浄ボトルをそのままにします。



注意

シッパの位置は下がったままですが、これは正常です。洗浄トレイおよび洗浄ボトルの未使用洗浄溶液をそのままにして、シッパが乾燥し、空気がシステムに入るのを防ぎます。

スタンバイウォッシュの実施

次の7日以内に装置を使用する予定がない場合、スタンバイウォッシュを実施することによって装置および装置フルディクスラインの準備を実行し、アイドル状態にします。スタンバイウォッシュは30日ごとに実施し、装置をスタンバイ状態にします。

スタンバイウォッシュは、完了までに約2時間かかります。この洗浄では、連続して2回洗浄が行われ、各位置に残った試薬または塩分の集積すべてを洗い流します。各洗浄の所要時間は約60分です。

スタンバイウォッシュが完了すると、装置はスタンバイモードになり、装置の状態を通知する [Home] 画面メッセージが表示されます。装置が待機状態にある場合、シーケンスランを開始する前にメンテナンスウォッシュを行う必要があります。

ユーザーが用意する消耗品

- ▶ Tween 20 (Sigma-Aldrich、カタログ番号：P7949)
- ▶ ラボラトリーグレード水

手順

- 1 使用済みのフローセルが装置にロードされていることを確認します。
- 2 [Home] 画面から [**Perform Wash**] を選択します。
- 3 [Wash Options] 画面から [**Perform Maintenance Wash**] を選択します。
ソフトウェアによって自動的にシッパが試薬チラーまで上がります。

1 回目の洗浄の実施

- 1 Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。
- 2 新しい洗浄溶液を使用して洗浄コンポーネントを準備します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
- 3 洗浄トレイと洗浄ボトルを装置にロードします。
 - a 試薬コンパートメントドアと試薬チラードアを開け、使用済みの試薬カートリッジまたは洗浄トレイをチラーから引き出します。
 - b 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込みます。試薬チラードアを閉じます。
 - c PR2 ボトルと廃液ボトルの手前にあるシッパハンドルを固定される位置まで持ち上げ、PR2 ボトルを洗浄ボトルと交換します。

**注意**

各ランの後に PR2 ボトルを廃棄します。残った PR2 は再使用しないでください。

- d 廃液ボトルを取り出し、中身を適切に廃棄します。廃液ボトルを試薬コンパートメントに戻します。
 - e シッパーハンドルをゆっくりと下げ、シッパーが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
 - f 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 4 [Next] を選択します。1 回目の洗浄が始まります。

2 回目の洗浄の実施

各洗浄手順では、必ず新しい洗浄溶液を使用してください。前の洗浄からの洗浄溶液を再利用すると、フルイディクスラインに廃棄物が戻る可能性があります。

- 1 以下の手順に従い、Tween 20 とラボラトリーグレード水を使用して新しい洗浄溶液を準備します。
 - a 5 mL の 100% Tween 20 を 45 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 10% の Tween 20 になります。
 - b 25 mL の 10% Tween 20 を 475 mL のラボラトリーグレード水に添加します。この量で 0.5% の Tween 20 洗浄溶液になります。
 - c 5 回転倒混和します。
- 2 1 回目の洗浄が完了したら、洗浄トレイと洗浄ボトルを取り出し、残った洗浄溶液を廃棄します。
- 3 以下の手順に従い、洗浄コンポーネントに新しい洗浄溶液を補充します。
 - a 6 mL の洗浄溶液を洗浄トレイの各リザーバーに加えます。
 - b 350 mL の洗浄溶液を 500 mL の洗浄ボトルに加えます。
- 4 以下の手順に従い、洗浄トレイと洗浄ボトルをロードします。
 - a 洗浄トレイを試薬チラーに差し入れて奥まで押し込みます。試薬チラードアを閉じます。
 - b 洗浄ボトルをロードし、シッパーハンドルをゆっくりと下げてシッパーが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
 - c 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 5 [Next] を選択します。2 回目の洗浄が始まります。

洗浄の後

洗浄の完了後は、装置に使用済みフローセル、洗浄トレイ、および残りの洗浄溶液の入った洗浄ボトルをそのままにします。

**注意**

シッパーの位置は下がったままですが、これは正常です。洗浄トレイおよび洗浄ボトルの未使用洗浄溶液をそのままにして、シッパーが乾燥し、空気がシステムに入るのを防ぎます。

ファイルの管理

[Home] 画面の [Manage Files] を選択して、装置のコンピューター上でファイルの移動、アップロード、削除、またはサンプルシート名の変更を行います。

ファイルの削除

- 1 [Manage Files] 画面のいずれかのタブから [Browse] を選択し、装置からアクセス可能なファイルに移動します。

- 2 以下のオプションから選択します。
 - ▶ リスト内の個々のファイルまたはフォルダーの横のチェックボックスを選択します。
 - ▶ [Delete] ボタンの左側のチェックボックスを選択して、リスト内のファイルおよびフォルダーをすべて選択します。このオプションは [Runs]、[Sample Sheets]、[Manifests]、[Genomes]、および [Recipes] で利用可能です。
- 3 [Delete] を選択します。



注意

[Delete] コマンドは、[Bundle Logs] を除くすべてのタブで使用できます。

ランフォルダーの移動

[Move] コマンドはランフォルダーを新しい場所にコピーして、古い場所からフォルダーを削除します。

- 1 [Manage Files] 画面の [Runs] タブから [Browse] を選択し、装置からアクセス可能なファイルに移動します。
- 2 リスト内の個々のファイルまたはフォルダーの横のチェックボックスを選択します。
- 3 [Move] を選択します。
- 4 [Browse Network] を選択し、ファイルまたはフォルダーの移動先を選択します。
- 5 [OK] を選択します。

ファイルのアップロード

アップロードコマンドはサンプルシートおよびゲノムに使用可能です。

MiSeq がネットワークに接続されていない場合は、この機能を使用してファイルを USB ドライブから装置のコンピューターにアップロードします。

- 1 [Manage Files] 画面の [Sample Sheets] または [Genomes] タブから [Browse] を選択し、装置からアクセス可能なファイルに移動します。
- 2 [Upload] を選択します。
- 3 [Browse Network] を選択し、USB ドライブ上のファイルが存在する場所を指定します。
- 4 [OK] を選択します。
ファイルは、[Directory] フィールドに示されたフォルダーにアップロードされます。

サンプルシート名の変更

- 1 [Manage Files] 画面の [Sample Sheets] タブから、以下のオプションを選択します。
 - ▶ 各サンプルシートの横にあるチェックボックスを選択します。
 - ▶ [Delete] ボタンの左にあるチェックボックスを選択して、リスト内のサンプルシートをすべて選択します。
- 2 [Rename] を選択します。
- 3 キーボードアイコンを選択し、画面上のキーボードを使用してサンプルシート名を変更します。
- 4 [Next] を選択します。
- 5 [Back] を選択します。

ソフトウェアの更新

システムがインターネットに接続できるネットワークに接続されている場合、装置ソフトウェアは [Home] 画面から自動的に更新できます。BaseSpace 最新版の有無を自動的にチェックするようソフトウェアを設定することもできます。詳細については、12 ページの「BaseSpace 最新版の通知の設定」を参照してください。

装置がインターネットにアクセスできるネットワークに接続されていない場合は、ソフトウェアは手動で更新できます。

ソフトウェアの自動更新

ソフトウェアの更新ファイルが入手可能になると、[Update Available] ボタンが [Home] 画面に表示されます。そうではない場合、ボタンは表示されません。このオプションを有効にするには、MiSeq がインターネットアクセスできるネットワークに接続されていることを確認してください。

- 1 [Home] 画面から [Update Available] を選択します。
- 2 ダイアログボックスで、更新するコマンドを確認します。
装置を再起動する必要があります。再起動後、更新のインストールが自動的に開始します。

ソフトウェアの手動更新

インストール可能なソフトウェアファイルの場所を参照することにより、MiSeq インターフェースから装置コントロールソフトウェアおよび解析ソフトウェアを更新するには、[Manual Update] 機能を使用します。

- 1 [Main Menu] から [Software Update] を選択します。
- 2 [Browse] を選択して、新しいソフトウェアバージョンのインストール可能ファイルの場所に移動します。
- 3 インストール可能ソフトウェアファイルのパスが画面に表示されたら、[Save and Update] を選択します。
- 4 ダイアログボックスで、更新するコマンドを確認します。
装置を再起動する必要があります。再起動後、更新のインストールが自動的に開始します。

装置のシャットダウン

装置は常時 ON にしておくのが最適です。ただし、装置を OFF にする必要がある場合は、以下の手順に従って、Windows をシャットダウンしてフルディスクラインを準備します。

- 1 メンテナンスウォッシュを実施します。詳細については、31 ページの「メンテナンスウォッシュの実施」を参照してください。
- 2 廃液ボトルを取り出し、中身を適切に廃棄します。廃液ボトルを試薬コンパートメントに戻します。
- 3 試薬コンパートメントドアを閉じます。
- 4 [Home] 画面から [Manage Instrument] を選択します。
- 5 [Shut Down] を選択します。
このコマンドにより、ソフトウェアがシャットダウンされます。
- 6 電源スイッチを OFF の位置に切り替えます。



注意

装置を OFF にした後すぐに ON にする場合は、**少なくとも 60 秒**待ってから電源スイッチを ON の位置に戻してください。

付録 A トラブルシューティング

はじめに	37
トラブルシューティングのためのバンドルログ	37
システムチェックの実施	38
ランの一時停止または停止	38
試薬カートリッジシッパーの手動による持ち上げ	40
ランセットアップエラーの解決	40
RFID リードエラーの解決	40
容積テストの実施	41
期待される洗浄液の量の測定	41
試薬チラーの温度エラーの解決	42
Local Run Manager 解析エラーの解決	42
システム設定値の設定	42

はじめに

本セクションでは、イルミナのテクニカルサポートに問い合わせる前に行う一般的なトラブルシューティングの手順を説明します。ほとんどのエラーに関しては、エラーの修正方法を説明するメッセージが画面に表示されます。

技術的な質問については、イルミナのウェブサイトの MiSeq サポートページにある FAQ にアクセスするか、ご自身の Myllumina アカウントにログインしてサポート掲示板にアクセスしてください。

ランの品質または性能に関する問題については、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。詳細については、50 ページの「テクニカルサポート」を参照してください。

トラブルシューティングを目的とし、ランに固有なファイルのコピーがイルミナのテクニカルサポートの担当者によって要求されることがあります。[Manage Files] 画面の [Bundle Logs] タブを使用して、トラブルシューティングに必要なファイルをまとめて Zip 圧縮することができます。37 ページの「トラブルシューティングのためのバンドルログ」を参照してください。

トラブルシューティングのためのバンドルログ

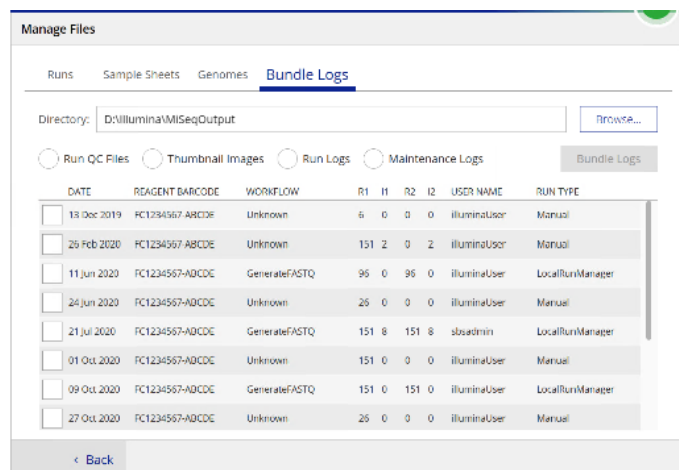
バンドルログは、トラブルシューティングを目的とし、イルミナのテクニカルサポートにバンドルファイルを送信する機能です。[Manage Files] 画面の [Bundle Logs] タブを使用して、[bundle] という名前のファイルグループを選択します。バンドルは自動的に圧縮されます。

[Bundle Logs] 機能では、実行時に特定のランのファイルをまとめて 1 つのバンドルタイプにします。イルミナのテクニカルサポートが要求に応じて各ランおよびバンドルタイプのバンドルログ処置を繰り返してください。

- 1 [Manage Files] 画面で、[Bundle Logs] タブを選択します。
- 2 [Browse] を選択して、MiSeqOutput フォルダに移動します。
- 3 バンドルにするファイルタイプを、[Run QC Files]、[Thumbnail Images]、[Run Logs]、または [Maintenance Logs] の中から選択します。
- 4 ラン名の隣のボックスを選択します。
- 5 [Bundle Logs] を選択します。
[Bundle Files] 画面が開き、バンドルに含まれる個別ファイルのリストなどのバンドルに関する情報が表示されます。
バンドルログ機能の個々のフォルダとファイルの詳細については、『MiSeq Output and Analysis Folders Quick Reference Card』（文書番号：15034791）を参照してください。
- 6 [Next] を選択します。

- 7 Zip 形式のバンドルファイルを保存する場所を指示します。
- 8 **[Save]** を選択します。
ファイルのバンドリングが終了すると、[Bundle Logs] タブが再び開きます。
- 9 作成された Zip 形式のバンドルファイルをイルミナのテクニカルサポートに送信してください。

図 20 [Bundle Logs] タブ



システムチェックの実施

[System Check] 画面は通常、Live Help セッション中に、イルミナのテクニカルサポートの担当者と通信するために使用されます。通常の操作を行っている際や装置のメンテナンスを行うためにこの機能を使用する必要はありません。

イルミナのテクニカルサポートに問い合わせる前に、容積テストなど一部のシステムチェックを実施できます。容積テストでは、気泡がセンサーを通過するときの流量を推定することでフルイディクスシステムの状態を確認します。詳細については、[41 ページの「容積テストの実施」](#)を参照してください。

警告

[Tip/Tilt] および [Full Optics] テストには特別なフローセルが必要であり、イルミナの技術者のみが行う必要があります。

- 1 [Main Menu] から **[System Check]** を選択します。
- 2 以下のいずれかを行います。
 - ▶ 実施対象のテストを個別に選択します。
 - ▶ **[Select All]** を選択して、すべてのテストを実施します。
- 3 **[Next]** を選択します。
完了すると、テスト結果が画面に表示されます。
- 4 (オプション) **[Show Details]** を選択して、テスト結果の要約をソフトウェアインターフェースで確認します。
- 5 (オプション) **[Export Results]** を選択して、テスト結果を *.csv ファイル形式で USB ドライブに出力します。
- 6 **[Done]** を選択します。

ランの一時停止または停止

MiSeq は、ユーザーの介入なしに初めから終わりまでランを完了するよう設計されています。しかし、[Sequencing] 画面からランを一時停止または停止することができます。

ランの一時停止

ランが完了する前に、そのランを一時停止できます。例えば、廃液ボトルが満杯であることが疑われる場合、ランを一時停止することができます。一時停止したランは再開することができます。

[Pause] を選択すると、現在のコマンドが完了してからランが一時停止し、フローセルは安全な状態になります。

[Sequencing] 画面からランを一時停止するには、[Pause] を選択します。ボタンが [Resume] に変わります。ランを再開する準備ができたなら、[Resume] を選択します。

図 21 ランを一時停止したときの [Sequence] 画面

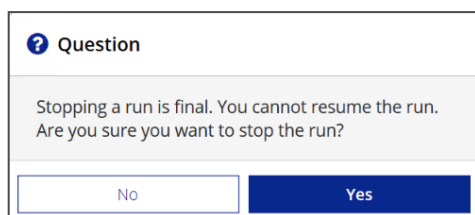


ランの停止

ランが完了する前に、[Sequencing] 画面の [Stop] ボタンを使用してシーケンス中のランを停止できます。不適切にランがセットアップされている場合、データクオリティが低い場合、ハードウェアエラーが生じた場合などに、ランの停止が必要となることがあります。

ランを停止すると、現在のコマンドは完了せず、フローセルステージが前方の位置に移動します。Real-Time Analysis ソフトウェアは、最後に完了したサイクルの解析を継続します。

図 22 ランの停止



ランの終了は最終的なものです。停止したランを再開することはできません。装置洗浄のみに進むことができます。

試薬カートリッジシッパーの手動による持ち上げ

ランが予期せず中断された場合、またはラン中にエラーが生じた場合、試薬カートリッジシッパーは自動的に上昇しない可能性があります。試薬カートリッジを取り外すためには、試薬カートリッジシッパーを手動で持ち上げてください。

- 1 [Home] 画面から [Perform Wash] を選択します。
- 2 [Raise Sippers] を選択します。
- 3 試薬カートリッジを取り出します。

ランセットアップエラーの解決

プレランチェックのいずれかのチェックに問題がある場合、赤色アイコン **X** が項目横に表示されます。そのエラーの説明と解決方法を示すメッセージが画面に表示されます。

エラー	措置
X Free Disk Space	ディスクスペースが不足している場合は、必要なディスクスペースの量を示すメッセージが表示されます。[Manage Files] 機能によって装置のコンピューターからデータを消去して、必要な空き領域を確保します。
X Network Connection Active	ネットワークケーブルが装置に差し込まれていることを確認します。 ネットワーク接続が復旧しない場合は、[Manage Instrument] 画面の [Reboot] を選択してソフトウェアを再起動します。 それでも接続が復旧しない場合は、[Manage Instrument] 画面の [Shut Down] を選択してから、装置の電源スイッチを OFF にします。少なくとも 60 秒待ってから、装置の電源を入れてソフトウェアを起動します。
X Primary Analysis Ready	前のランからの一次解析が完了していません。一次解析のデフォルトの完了待ち時間は 1 時間で、画面にカウントダウンが表示されます。1 時間待つか、[Terminate Analysis] を選択します。未完了のサイクルがあっても、二次解析が停止します。

RFID リードエラーの解決

システムが消耗品の RFID を読み取れない場合は、イルミナのウェブサイトから一時的なバイパスコードを取得できます。仮のバイパスコードは 7 日で期限が切れます。

- 1 先に進む前に、必ず RFID の読み取りをもう一度行います。RFID の読み取りに 2 回失敗した場合は、[Enter Code] を選択します。
- 2 インターネットにアクセス可能なコンピューターで my.illumina.com にアクセスし、ページの最上部にあるツールバーから [Sign In] を選択します。
- 3 Myllumina アカウントにログインします。
ツールバー上の [Sign In] ボタンの代わりに氏名が表示されます。
- 4 氏名にマウスを合わせて [Account] を選択します。[My Tools] カラムの [MiSeq Self-Service] をクリックします。
- 5 [MiSeq Self-Service] ページで、[MiSeq serial number] を入力します。
- 6 [Type of Override Code] ドロップダウンリストから [RFID Override] を選択します。
- 7 コードを生成するには、[Get Code] を選択します。
- 8 MCS インターフェースに戻るには、[Enter Code] を選択します。
- 9 画面上のキーボードを使用して一時的なバイパスコードを入力し、[Next] を選択します。
- 10 フローセル、PR2 ボトル、または試薬カートリッジのバーコード番号を入力します。

消耗品	バーコード番号の場所
フローセル	フローセル容器ラベルのバーコードの上。 フローセルバーコード番号は A (スタンダード)、G (マイクロ)、または D (ナノ) から始まります。 例: A0E61
PR2 ボトル	PR2 ボトルラベルのバーコードの下。 例: MS0011881-PR2
試薬カートリッジ	試薬カートリッジラベルのバーコードの下。 例: MS0010744-300

11 試薬カートリッジのバイパスコードを入力する場合は、キットのバージョン番号を入力します。[**Enter Reagent Kit Barcode**] を選択し、試薬カートリッジのバーコード番号とキットのバージョン番号を手動で入力します。



警告

誤った試薬キットのバージョンを入力すると、シーケンスデータに悪影響が及ぶ可能性があります。

12 [**Enter**] を選択します。

容積テストの実施

フルイディクスラインに障害物があると試薬送液不足を引き起こし、シーケンス結果に影響を及ぼす可能性があります。フルイディクスラインに障害物があることが疑われる場合は、容積テストを行います。

容積テストでは、気泡がセンサーを通り過ぎるときに、その気泡間の容積を予測して、フルイディクスシステムの動作をチェックします。容積テストを実施するには、ラボラトリーグレード水を使用し、洗浄トレイと洗浄ボトルをロードして、使用済みのフローセルが設置されている必要があります。画面に表示される指示に従ってテストを実施してください。

- 1 使用済みのフローセルが装置にロードされていることを確認します。
- 2 [Main Menu] から [**System Check**] を選択します。
- 3 [**Conduct Volume Test**] を選択し、[**Next**] を選択します。
- 4 洗浄トレイの各リザーバーに 6 mL のラボラトリーグレード水を入れます。
- 5 500 mL の洗浄ボトルに 350 mL のラボラトリーグレード水を入れます。
- 6 洗浄トレイと洗浄ボトルを装置にロードします。
 - a 試薬コンパートメントドアと試薬チャードアを開け、洗浄トレイを試薬チャラーに差し入れて奥まで押し込みます。試薬チャードアを閉じます。
 - b 廃液ボトルを取り出し、中身を適切に廃棄します。廃液ボトルを試薬コンパートメントに戻します。
 - c シッパーハンドルをゆっくりと下げ、シッパーが洗浄ボトルと廃液ボトルの中に下りていることを確認します。
- 7 [**Next**] を選択します。
容積テストが完了すると、画面に結果が表示されます。
テストに合格しない場合は、メンテナンスウォッシュを行います。31 ページの「メンテナンスウォッシュの実施」を参照してください。
- 8 メンテナンスウォッシュが完了したら、容積テストを繰り返します。

期待される洗浄液の量の測定

期待される洗浄液の量を測定することで、洗浄の送液が効率的に行われていることを確認します。

- 1 洗浄を開始する前に、廃液ボトルを空にします。
- 2 洗浄が完了したら、廃液ボトルに回収された洗浄液の量を測定します。

洗浄タイプ	期待される洗浄液の量
ポストラノウォッシュ	17.25 mL
テンプレートライン洗浄を含むポストラノウォッシュ	25.5 mL
スタンバイウォッシュ	46 mL
メンテナンスウォッシュ	51.75 mL

試薬チラーの温度エラーの解決

試薬チラーの温度範囲は 2°C ~ 11°C である必要があります。試薬チラーの温度はセンサーインジケータに表示されます。6 ページの「センサーインジケータ」を参照してください。

チラーが規定温度範囲内でない旨のエラーメッセージが表示された場合、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。

試薬チラーの詳細については、4 ページの「試薬コンパートメント」を参照してください。

Local Run Manager 解析エラーの解決

解析エラーに関するトラブルシューティング情報については、『Local Run Manager v3 Software Guide』（文書番号：1000000111492）を参照してください。解析をリキューする方法についての説明を含みます。

システム設定値の設定

MCS には、システム設定用のコマンドを実行できるいくつかの画面があります。通常の場合、ソフトウェア設定値は MiSeq インストール時に設定されます。

IP と DNS の設定値の設定

ネットワークまたは設備の変更により必要な場合、IP アドレスおよび DNS サーバーアドレスを設定してください。

- 1 [Main Menu] から [System Settings] を選択します。
 - ▶ [Obtain an IP address automatically] または [Use the following IP address] を選択します。
[Use the following IP address] を選択した場合は、IP アドレス、サブネットマスク、およびデフォルトゲートウェイを入力します。
 - ▶ [Obtain DNS address automatically] または [Use the following DNS server addresses] を選択します。
[Use the following DNS server addresses] を選択した場合は、優先 DNS サーバーと代替 DNS サーバーのアドレスを入力します。
- 2 [Save and Continue] を選択します。

付録 B 出力ファイルとフォルダー

ランフォルダー.....	43
MiSeqOutput フォルダーの内容.....	43
RTA フォルダーおよびファイル.....	45

ランフォルダー

MiSeq でのランはそれぞれ特定の目的で、以下の 3 つのランフォルダーを生成します。

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp**: ランが開始されると、一時的なランフォルダーが装置のコンピューターのローカルドライブに作成され、MCS および RTA 用の作業領域として使用されます。MiSeqTemp フォルダーにアクセスする必要はありません。このフォルダーの内容は 7 日後に削除されます。
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqOutput**: MiSeqTemp フォルダー内のファイルは、RTA によって MiSeqOutput フォルダーにコピーされます。一次解析ファイルが生成されると、RTA はファイルを MiSeqTemp フォルダーにコピーし直し、MiSeqAnalysis フォルダーに格納します。フォーカスイメージおよびサムネイルイメージは MiSeqAnalysis フォルダーにコピーされません。[45 ページの「RTA フォルダーおよびファイル」](#)を参照してください。
- ▶ 出力フォルダーの場所は、[Run Options] 画面の [Output Folder] フィールドで変更できます。詳細については、[12 ページの「デフォルトフォルダーロケーションの設定」](#)を参照してください。
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis**: RTA による解析が終了すると、Local Run Manager が装置のローカルドライブの MiSeqAnalysis フォルダーにアクセスして二次解析を開始します。MiSeqAnalysis フォルダーに書き込まれるすべてのファイルは、MiSeqOutput フォルダーにコピーされます。詳細については、[43 ページの「MiSeqOutput フォルダーの内容」](#)を参照してください。

解析をローカルに複製せず、解析に BaseSpace を使用している場合、装置のローカルドライブの MiSeqAnalysis フォルダーは空です。

ルートフォルダーの命名

ルートフォルダー名は、ランの日付、装置番号、およびランに使用されるフローセルを特定します。

フォルダー名では、デフォルトで次の形式を使用します。

YYMMDD_< 装置番号 >_< ラン番号 >_< フローセルバーコード >

ラン番号は、所定の装置でランが実施されるたびに 1 つ増えます。

MiSeqOutput フォルダーの内容

RTA 解析完了後、MiSeqOutput フォルダーには二次解析に必要なファイルが格納されます。二次解析が完了した後、MiSeqOutput フォルダーと MiSeqAnalysis フォルダーの内容はほぼ同じになります。両者の違いは、MiSeqOutput フォルダーにはイメージファイル用の 2 つのサブフォルダー (Images と Thumbnail_Images) が存在する点だけです。これらのサブフォルダーは二次解析には使用されません。

ファイル

出力フォルダーおよび解析フォルダーにコピーされるファイルは、以下のとおりです。

- ▶ **SampleSheet.csv**: ランと後続の解析のパラメーターを提供します。ラン開始時に、サンプルシートがルートフォルダーにコピーされ、SampleSheet.csv と名前が変更されます。Data\Intensities と Data\Intensities\BaseCalls にコピーが作成されます。
- ▶ **runParameters.xml**: ランに関連付けられているフローセルおよび試薬の RFID など、ランパラメーターとランコンポーネントに関する情報の要約が記載されています。
- ▶ **RunInfo.xml**: シーケンスランにおけるリード数やサイクル数、リードにインデックスを付けるかどうかなど、高レベルなラン情報が記載されています。

フォルダー

出力フォルダーおよび解析フォルダーにコピーされるフォルダーには、シーケンスラン中に生成される以下のフォルダーが含まれます。

- ▶ <ランフォルダー名>\Config：ランの構成ファイルを格納します。
- ▶ <ランフォルダー名>\Data：Intensities、BaseCalls、Alignment のサブフォルダーがあります。Local Run Manager から生成されるデータは、アライメントサブフォルダーにあります。
- ▶ <ランフォルダー名>\Data\RTA Logs：各リードに対して RTA が実行した個々のステップが記述されたログファイルを格納します。
- ▶ <ランフォルダー名>\Data\Intensities\BaseCalls：ベースコール (*.bcl) ファイル、マトリックスファイル、およびフェージングファイルを含むサブフォルダーがあります。Local Run Manager は二次解析中にこのフォルダーに FASTQ ファイルを書き込みます。詳細については、『Local Run Manager v3 Software Guide』（文書番号：1000000111492）を参照してください。
- ▶ <ランフォルダー名>\Recipe：ランに使用されたレシピを格納します。
- ▶ <ランフォルダー名>\Logs：各サイクルに対して装置が実行した個々のステップが記述されたログファイルを格納します。
- ▶ <ランフォルダー名>\InterOp：クラスター密度、強度、クオリティスコア、全体的なラン品質などの各種一次解析メトリクスを要約するために Sequencing Analysis Viewer (SAV) によって使用されるバイナリファイルを格納します。

一時的なランフォルダーで作成されるすべての他のファイルおよびフォルダーは、出力フォルダーおよび解析フォルダーにコピーされません。解析やトラブルシューティングに必要な一時ファイルを含みます。

Local Run Manager は二次解析中に、アライメントフォルダーなどの他のフォルダーを追加します。詳細については、『Local Run Manager v3 Software Guide』（文書番号：1000000111492）を参照してください。

RTA フォルダおよびファイル

次の表では、一次解析中に Real-Time Analysis (RTA) によって生成されるフォルダとファイルがリストされています。これらのファイルの多くは Local Run Manager ソフトウェアによる二次解析に使用されます。

キーファイル	サブフォルダ	内容説明
RTAComplete.txt	ルートフォルダ	ベースコール解析が完了すると生成されるマーカーファイル。このファイルが存在することで、二次解析が開始されます。
SampleSheet.csv	ルートフォルダ	このファイルは、ランの前に読み取られてランフォルダにコピーされ、後に二次解析に使用されます。
RunInfo.xml	ルートフォルダ	リードの区切り（インデックスリードを含む）と、ランに対して選択されたクオリティテーブルが特定されます。
*.bcl ファイル	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	各 *.bcl ファイルには、1 サイクルの 1 タイルに対する RTA ベースコーリングと塩基のクオリティスコアリングの結果が含まれます。
*.stats ファイル	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	*.stats ファイルには、特定のサイクル/タイルに対する RTA ベースコーリング統計が含まれます。
*.filter ファイル	Data\ Intensities\BaseCallsA	*.filter ファイルには、タイルごとのフィルター結果が含まれます。
*.txt	Data\RTALogs	一次解析からのログファイル。
*.cif ファイル	Data\ Intensities\L001\CX.X	バイナリ形式の各 *.cif ファイルには、1 サイクルの 1 タイルに対する RTA イメージ解析結果が含まれます。詳細については、 46 ページの「フローセルタイルの番号付け」 を参照してください。
*.locs ファイル	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001	クラスターの座標をレポートします。各 *.locs ファイルは 1 タイルを表します。
*.jpg ファイル	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	それぞれのサイクルと塩基に対して生成されたサムネイルイメージ。ランのトラブルシューティングに使用できます。これらのファイルはイメージ解析に用いられ、解析フォルダにはコピーされません。イメージファイル名については、 46 ページの「フローセルタイルの番号付け」 を参照してください。

フローセルタイル

シーケンスラン中に、フローセルのシングルレーンは、「タイル」と呼ばれる小さなイメージング領域でイメージ化されます。すべての MiSeq フローセルにはシングルレーンがありますが、使用するフローセルのタイプによってタイル数が異なります。

フローセル	MiSeq Reagent Kit	タイル	イメージングサーフェース	イメージ化されるタイルの合計
標準フローセル	MiSeq Reagent Kit, v3	19 タイル	上面と底面	合計 38 タイル
PGS フローセル	MiSeq Reagent Kit v3-PGS	19 タイル	上面と底面	合計 38 タイル
標準フローセル	MiSeq Reagent Kit, v2	14 タイル	上面と底面	合計 28 タイル
マイクロフローセル	MiSeq Reagent Micro Kit, v2	4 タイル	上面と底面	合計 8 タイル
ナノフローセル	MiSeq Reagent Nano Kit, v2	2 タイル	上面のみ	合計 2 タイル

シーケンスラン中にタイルがイメージ化されると、タイルごとに 1 つの出力ファイルが生成されます。詳細については、[46 ページの「フローセルタイルの番号付け」](#)を参照してください。

フローセルタイトルの番号付け

シーケンスラン中にタイトルがイメージ化されると、1 タイルにつき 1 つの出力ファイルが生成され、4 桁の形式でタイトル番号が付けられます。ナノフローセルを除き、フローセルは上面および下面でイメージ化されます。各タイトルの出力ファイルは、ランフォルダー内の Data\Intensities\BaseCalls\L001 にあります。

フローセル	MiSeq Reagent Kit	タイトル	イメージングサーフェース	イメージファイル名
標準フローセル PGS フローセル	MiSeq Reagent Kit、v3	1 ~ 19	上面	1101 ~ 1119
		1 ~ 19	底面	2101 ~ 2119
標準フローセル	MiSeq Reagent Kit、v2	1 ~ 14	上面	1101 ~ 1114
		1 ~ 14	底面	2101 ~ 2114
マイクロフローセル	MiSeq Reagent Micro Kit、v2	1 ~ 4	上面	1101 ~ 1104
		1 ~ 4	底面	2101 ~ 2104
ナノフローセル	MiSeq Reagent Nano Kit、v2	1 ~ 2	上面のみ	1101 ~ 1102

索引

数字

1 リード内のサイクル数 15

B

BaseSpace
 最新版 12
 接続 6

C

CompletedJobInfo.xml 7

I

Illumina Proactive モニタリングサービス 12
InterOp ファイル 5
InterOp フォルダ 44
IP アドレス 42

L

Local Run Manager 1
 概要 7

M

MiSeq Self-Service 40

P

PR2 のロード 21

R

Real-Time Analysis 1
 結果 45
 テンプレート形成 25
 ランフォルダ 43
Real-Time Analysis 5
RFID
 PR2 21
 試薬カートリッジ 22
 追跡 1
 トラブルシューティング 40
RTAcomplete.txt 45
RunInfo.xml 43、45
runParameters.xml 43

S

Sequencing Analysis Viewer 7、24
status.xml 45

U

Universal Copy Service 5

V

VeriSeq PGS ワークフロー
 フローセル 9
 メンテナンスの頻度 30

ア

アイコン
 センサー 6
アイコン、点滅 6

エ

エラー 6

カ

解析ワークフロー
 定義 4
カスタマーサポート 50

ケ

警告 6
ゲノムリファレンス 34

コ

光学モジュール 2
更新ソフトウェア 35
コントロールソフトウェア 5
コンポーネント
 光学モジュール 2
 試薬カートリッジ 9
 試薬コンパートメント 2、4
 フローセル 8、45
 フローセルコンパートメント 2-3

サ

- サポートページ 1
- サンプルシート
 - 装置へのコピー 35
 - 定義 4
 - ランフォルダー内 45

シ

- シーケンス画面 24
- システム設定 42
- シッパーハンドル 4
- 試薬
 - キット 8
- 試薬カートリッジ 9
 - 点検 16
 - 内容 10
 - 融解 15
- 試薬コンパートメント 2、4
- 試薬チラーの温度 6
- 試薬のロード
 - PR2 21
 - カートリッジ 22
- 消耗品 13
 - ラボラトリーグレード水 13

ス

- スタンバイウォッシュ 33

セ

- センサーインジケーター 6
- 洗浄
 - アイドルモードの準備 33
 - 期待される量 41
 - シャットダウンの準備 36
 - スタンバイ 33
 - ポストラン 26
 - ポストランウォッシュの設定 11
 - メンテナンス 31
 - 利点 26
- 洗浄液の量 41

ソ

- 装置のアイドルリング 33
- 装置のシャットダウン 36
- ソフトウェア
 - 更新 35
 - ディスクスペースのチェック 8
 - ラン実行時間 14

- ソフトウェアスイート 5
- ソフトウェアの更新 12

タ

- タイルの番号付け 46

テ

- ディスクスペース
 - チェック 8
- テクニカルサポート 50
- 電子メールアラート 12
- テンプレート形成 7、25
- テンプレートライン洗浄 26
- 点滅、アイコン 6

ト

- ドメイン名 42
- トラブルシューティング
 - RFID 40
 - バンドルログ 34-35、37
 - フルイデックス 41
 - ランに固有のファイル 37
- トレーニング 1

ニ

- 二次解析 7

ネ

- ネットワーク設定 42

ハ

- 廃液ボトル 4
- バンドルログ 34-35、37

フ

- ファイルとフォルダーの移動 34
- ファイルとフォルダーのコピー 34
- ファイルとフォルダーの削除 34
- フォルダーの場所
 - 現在のラン 23
 - デフォルト設定 12
- フルイデックス
 - 洗浄 31、33
 - トラブルシューティング 41

フローセル

概要 8

キャップの色 9

シングルレーン 7

洗浄 18

タイル 45

タイルの番号付け 46

文字指定子 40

フローセルクランプ 3

フローセルコンパートメント 2-3

文書 1、50

へ

ヘルプ、テクニカル 50

ホ

ポストランウォッシュ 26

マ

マニフェストファイル

装置へのコピー 34

定義 4

メ

メンテナンスウォッシュ 31

ヨ

容積テスト 41

ラ

ラボラトリーグレード水のガイドライン 13

ランオプション 11-12

ラン実行時間 14

ランセットアップ画面 17

ランの一時停止 39

ランの停止 39

ランのモニタリング 24

ランフォルダー

一時、出力、解析 43

一次解析ファイル 45

管理 34

内容 43

命名 43

ランフォルダー定義 4

リ

リード長 14-15

リファレンスゲノム

ファイル形式 4

レ

レシピの管理 34

ワ

ワークフロー

ラン実行時間 14

テクニカルサポート

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

ウェブサイト：jp.illumina.com

メール：techsupport@illumina.com

イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	フリーダイヤル	リージョナル
北米	+1.800.809.4566	
オーストラリア	+1.800.775.688	
オーストリア	+43 800006249	+43 19286540
ベルギー	+32 80077160	+32 34002973
中国	400.066.5835	
デンマーク	+45 80820183	+45 89871156
フィンランド	+358 800918363	+358 974790110
フランス	+33 805102193	+33 170770446
ドイツ	+49 8001014940	+49 8938035677
香港 (中国)	800960230	
アイルランド	+353 1800936608	+353 016950506
イタリア	+39 800985513	+39 236003759
日本	0800.111.5011	
オランダ	+31 8000222493	+31 207132960
ニュージーランド	0800.451.650	
ノルウェー	+47 800 16836	+47 21939693
シンガポール	+1.800.579.2745	
韓国	+82 80 234 5300	
スペイン	+34 911899417	+34 800300143
スウェーデン	+46 850619671	+46 200883979
スイス	+41 565800000	+41 800200442
台湾 (中国)	00806651752	
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
その他の国	+44.1799.534000	

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

製品関連文書：support.illumina.com からダウンロードできます。

文書番号：15027617 v06 JPN

資材番号：20000262



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[®]