

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を使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づくいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

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

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

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

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved. 本製品は研究目的での使用に限定されます。

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDx, MiSeq FGx, NeoPrep, NextBio, Nextera, NextSeq, Powered by Illumina, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, パンプキンオレンジ色および遺伝子エネルギーの流れをベースとしたデザインは、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。本文書に含まれるその他すべてのブランドおよび名称は、それら個別の所有者に帰属する所有物です。

目次

目次	iii
第1章 概要	1
はじめに	2
追加リソース	3
装置のコンポーネント	4
シーケンス消耗品の概要	7
インストール済みデータベースとゲノム	10
第2章 はじめに	11
装置の起動	12
システム設定のカスタマイズ	13
解析設定の構成	15
ユーザーが用意する消耗品および機器	17
第3章 シーケンス	19
はじめに	20
シーケンスワークフロー	21
消耗品の準備	23
シーケンスのライブラリー調製	25
シーケンスランのセットアップ	26
ランの進捗状況のモニタリング	34
自動的なラン後の洗浄	36
位置番号9からの使用済みリザーバーの取り出し	37
第4章 メンテナンス	39
はじめに	40
手動による装置の洗浄の実施	41
ソフトウェアの更新	44
付録A トラブルシューティング	47
トラブルシューティングファイル	48
自動チェック時のエラー	50
RTAエラー	52
リハイブリダイゼーションのワークフロー	53
システムチェック	55
ネットワーク構成の設定	58
カスタムゲノム	60
装置のシャットダウン	61
付録B Real-Time Analysis	63
Real Time Analysis概要	64
入力および出力ファイル	65
Real Time Analysisワークフロー	66
付録C 出力ファイルとフォルダ	69
シーケンス出力ファイル	70
シーケンス出力フォルダの構成	71

解析入力ファイルの要件	72
索引	73
テクニカルサポート	77

概要

はじめに	2
追加リソース	3
装置のコンポーネント	4
シーケンス消耗品の概要	7
インストール済みデータベースとゲノム	10



はじめに

イルミナ®MiniSeq™システムは、使用が簡単で費用効果の高いデスクトップシステムで、高品質、業界標準のイルミナシーケンス技術を提供します。

機能

- ▶ **ハイクオリティシーケンス**：MiniSeqシステムでは、少量のライブラリーで小さいゲノム、アンプリコン、標的濃縮、およびRNAシーケンスを可能にします。
- ▶ **MiniSeqシステムソフトウェア**：MiniSeqシステムには、装置の操作の管理、画像の処理、およびベースコールの生成をする統合されたソフトウェア一式が入っています。この中には装置上のデータ解析ソフトウェアと、BaseSpaceのような他のオプションでの解析に使用するためのデータ転送ツールが含まれます。
- ▶ **装置上のデータ解析**：Local Run Managerソフトウェアは、ラン指定の解析モジュールに従ってランのデータを解析します。解析モジュール一式が、ソフトウェアに含まれます。
- ▶ **BaseSpace®統合**：シーケンスワークフローが、ランのモニタリング、データ解析、保存、共有のためのイルミナのゲノムコンピューター環境であるBaseSpaceに統合されています。出力ファイルが、解析のために、リアルタイムでBaseSpaceまたはBaseSpace Onsiteにストリームされます。
- ▶ **簡便な消耗品のロード**：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ときに適切な位置に配置します。あらかじめ充填された使い切りの試薬カートリッジは、ランおよび後の装置の洗浄に必要な試薬を提供します。フローセルと試薬カートリッジには、正確に追跡できるよう統合した識別が入っています。

追加リソース

文書、ソフトウェアのダウンロード、トレーニングリソースおよびイルミナ製品の互換性に関する情報については、イルミナウェブサイトのMiniSeqサポートページを参照してください。

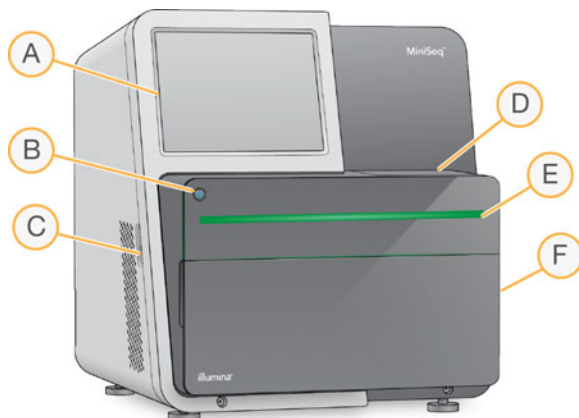
以下の文書は、イルミナのウェブサイトからご覧いただけます。

リソース	内容説明
『Custom Protocol Selector』	シーケンスランに使用するライブラリー調製法、ランパラメーター、解析法に合わせてカスタマイズされたエンドツーエンドの文書を生成するウィザードです。
『MiniSeq System Site Prep Guide』 (文書番号: 1000000002696)	ラボスペース、電源要件、環境検討事項に関する仕様を示します。
『MiniSeq System Safety and Compliance Guide』 (文書番号: 1000000002698)	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。
『RFID Reader with External Antenna 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。
『MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』 (文書番号: 1000000002697)	シーケンスラン用に調製したライブラリーを変性させ、希釈する方法と、任意でPhiXコントロールを調製する方法を提供します。
『Local Run Manager Software Guide』 (文書番号: 1000000002702)	Local Run Managerソフトウェアの使用および利用できる解析オプションについて情報を提供します。

装置のコンポーネント

MiniSeqシステムには、タッチスクリーンモニター、ステータスバー、フローセルコンパートメント、試薬コンパートメントがあります。

図1 装置のコンポーネント

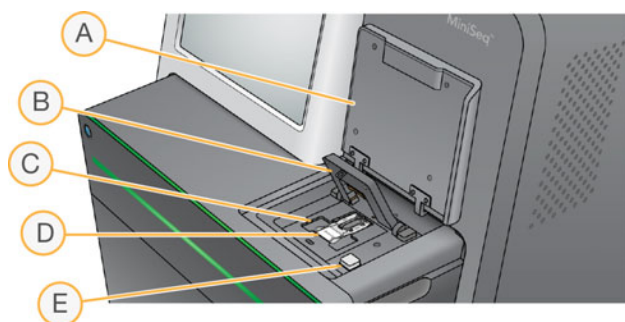


- A **タッチスクリーンモニター**：コントロールソフトウェアインターフェースにより装置の構成およびセットアップができるようにします。
- B **電源ボタン**：装置に組み込まれているコンピューターと操作システムの電源を入れます。
- C **USBポート**：周辺のコンポーネントへ簡単に接続します。
- D **フローセルコンパートメント**：シーケンスランの間、フローセルを保持します。
- E **ステータスバー**：装置のステータスを示します。シーケンス処理中（青）、装置に対する対処が必要（オレンジ）、シーケンスの準備ができている（緑）、24時間以内に洗浄が行われるべきとき（黄色）。
- F **試薬コンパートメント**：試薬カートリッジおよび廃液ボトルを保持します。

フローセルコンパートメント

フローセルステージには、フローセルラッチが内蔵されており、これを閉じるとフローセルを保持します。ラッチが閉じると、ラッチ底付近にあるピンによってフローセルポートを送液接続部との位置決めをします。

図2 フローセルコンパートメント



- A フローセルコンパートメントのドア
- B フローセルラッチ
- C フローセルステージ
- D フローセル
- E フローセルラッチ解除ボタン

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温度の変化を管理します。



注意
フローセルコンパートメント付近の装置の上に物を置かないでください。

試薬コンパートメント

MiniSeqシステムでシーケンスランをセットアップするには試薬コンパートメントにアクセスして、ランの消耗品をロードし、廃液ボトルを空にします。

図3 試薬コンパートメント



- A 廃液ボトル：移動時に廃液がこぼれないようねじ付きキャップが付いています。
- B 試薬カートリッジ：あらかじめ充填された使い切りの消耗品として試薬を準備します。
- C 試薬コンパートメントドア：試薬コンパートメントにアクセスします。

装置の底縁でヒンジから外側に向かって試薬コンパートメントドアを開けます。ドアを開けるには、ドアの側端から前方へゆっくりと引っ張ってください。



注意
試薬コンパートメントドアの上に物を置かないでください。コンパートメントドアは棚として使用する作りにはなっていません。

電源ボタン

装置の前面にある電源ボタンを押すと、装置および装置のコンピューターの電源が入ります。電源ボタンは、装置の電源状況により以下の動作を実行します。

電源状況	動作
装置の電源がオフ	ボタンを軽く押し電源を入れます。
装置の電源がオン	ボタンを軽く押し電源をオフにします。ダイアログボックスが画面に表示され、通常のシャットダウンを確認します。
装置の電源がオン	電源ボタンを10秒間押すと、装置および装置のコンピューターが強制終了します。 この方法は装置がフリーズした場合にのみ使用してください。

**注意**

通常の状態では、装置の電源をオフにしないでください。

シーケンスラン中に装置をオフにすると、ただちにランが終了します。ランの終了は最終的なものです。ランの消耗品は再利用することができません。シーケンスデータは保存されません。






システムソフトウェア

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

- ▶ **MiniSeqコントロールソフトウェア**：コントロールソフトウェアは、シーケンスランのセットアップのステップをガイドし、装置の操作を管理し、ランの進行と同時にランの統計の概要を示します。
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA) ソフトウェア**：RTAは、ラン実行中、イメージ解析およびベースコーリングを実施します。64ページの「Real Time Analysis概要」を参照してください。
- ▶ **Local Run Manager**：シーケンスの前に、Local Run Managerでランのパラメータおよび解析方法を指定してください。シーケンス後、装置上のデータ解析が自動で開始されます。詳細については、『Local Run Manager Software Guide』（文書番号：1000000002702）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イス画面の右端上部にあるステータスアイコンは、ランセットアップ中またはラン実行中の状態の変化を示します。

ステータスアイコン	ステータス名	内容説明
	ステータスOK	システムは正常です。
	プロセス中	システムは処理中です。
	注意	注意が必要です。
	警告	警告が発生しています。 警告によるラン停止、または措置の要求はありません。
	エラー	エラーが生じています。 ランを続行する前にエラーに対する措置を講じる必要があります。

状態に変化が起こると、関連するアイコンが点滅し、警告します。アイコンを選択し、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受け入れ、[Close]を選択してダイアログボックスを閉じます。

シーケンス消費品の概要

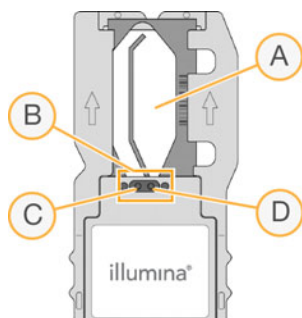
MiniSeqシステムでシーケンスランを実行するには、使い切りのMiniSeqキットが必要です。各キットには、シーケンスランの実行に必要なフローセルと試薬が含まれています。

フローセルおよび試薬カートリッジは、正確な消耗品の追跡と指定したランパラメーターの互換性を確実にするために無線自動識別（RFID）を使用します。

フローセル

フローセルは、クラスター形成とシーケンス反応が実行されるガラス製の基質です。フローセルはフローセルカートリッジに入っています。

図4 フローセルコンポーネント



- A イメージング領域
- B フローセルガasket
- C アウトレットポート
- D インレットポート

試薬はインレットポートからフローセルに入り、シングルレーンのイメージング領域を通過し、その後、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。

フローセルはホイルパッケージで覆われたフローセルチューブに入っており乾燥した状態で出荷されます。フローセルは使用するときまで、2° C~8° Cで密閉されたホイルパッケージの中に保管してください。詳細については、23ページの「フローセルの準備」を参照してください。

試薬カートリッジの概要

試薬カートリッジは使いきりの消耗品で、ホイルで密閉されたリザーバーを持っています。リザーバーにはクラスター試薬、シーケンス試薬、洗浄試薬があらかじめ充填されています。

図5 試薬カートリッジ



試薬カートリッジには調製したライブラリーをロードするために決められたリザーバーが含まれています。ランを開始した後、ライブラリーは自動で試薬カートリッジからフローセルへ移されます。



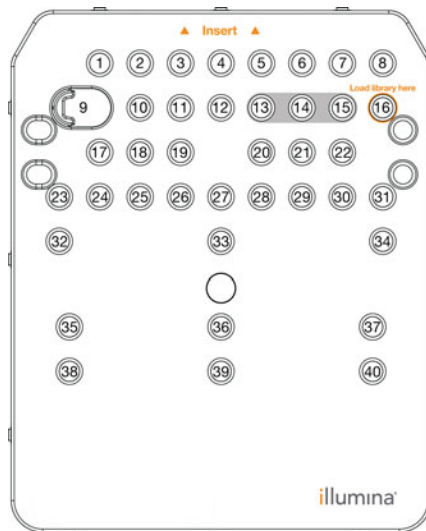
警告

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

使用するときまで -25°C ~ -15°C で試薬カートリッジを保管してください。詳細については、23ページの「試薬カートリッジの準備」を参照してください。

指定のリザーバー

図6 番号がふられたリザーバー



位置	内容説明
13、14、15	カスタムプライマーに対してオプションで指定できる
16	ライブラリーのロード

位置番号9の取り出し可能なリザーバー

あらかじめ充填された試薬カートリッジには、位置番号9にホルムアミドが入った変性試薬が含まれています。シーケンスラン後、すべての未使用の試薬を安全に廃棄するため、このリザーバーは取り出すことが可能です。詳細については、37ページの「位置番号9からの使用済みリザーバーの取り出し」を参照してください。

インストール済みデータベースとゲノム

ほとんどの解析法で、リファレンスはアライメントの実施が必要です。いくつかのリファレンスデータベースとリファレンスゲノムが装置のコンピューターにインストール済みです。

インストール済み	内容説明
データベース	<ul style="list-style-type: none"> ・ miRbaseヒト用 ・ dbSNPヒト用 ・ RefGeneヒト用
ゲノム	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>Arabidopsis thaliana</i> ・ ウシ (<i>Bos taurus</i>) ・ <i>E. coli</i>株DH10B ・ <i>E. coli</i>株MG1655 ・ ショウジョウバエ (<i>Drosophila melanogaster</i>) ・ ヒト (<i>Homo sapiens</i>) build番号 hg19 ・ マウス (<i>Mus musculus</i>) ・ PhiX ・ ラット (<i>Rattus norvegicus</i>) ・ <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1 ・ yeast (酵母S288C) ・ <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325

はじめに

装置の起動	12
システム設定のカスタマイズ	13
解析設定の構成	15
ユーザーが用意する消耗品および機器	17

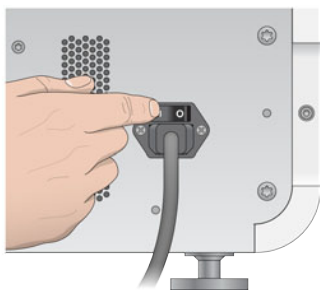


装置の起動

装置が適正に設置され、イニシャライズされていることを確認し、装置のセットアップが完了していることを確認してください。準備が整う前に装置を起動するとシステムが損傷することがあります。

- 1 電源トグルスイッチを [I] (オン) の位置にいます。

図7 装置背面にある電源スイッチ



- 2 試薬コンパートメント上部にある電源ボタンを押します。
装置に組み込まれているコンピューターと操作システムの電源が入ります。

図8 装置前面にある電源ボタン



- 3 オペレーティングシステムが読み込みを終えるまで待ちます。
MiniSeqコントロールソフトウェアが自動でシステムを起動およびイニシャライズします。イニシャライズのステップが終了したらホーム画面が開きます。
- 4 デフォルトのユーザー名とパスワードを入力しログインします。
 - ▶ ユーザー名 : [sbsuser]
 - ▶ パスワード : [sbs123]または、ユーザーの指定した認証情報を入力しログインします。

システム設定のカスタマイズ

コントロールソフトウェアには、装置識別用にカスタマイズ可能な設定が含まれています。以下のワークフローを選択優先してください。

- ▶ ランの終了時に、消耗品をパージ
- ▶ プレランチェックの確認をスキップし、ランを自動開始
- ▶ ランセットアップステップに画面上のキーボードを使用
- ▶ 音声案内対応

装置識別をカスタマイズ

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Customization] を選択します。
- 2 装置にアバター画像を割り当てるために [Browse] を選択し、希望する画像へ移動します。
- 3 [Nick Name] フィールドで、装置の名前を入力してください。
- 4 [Save] を選択して設定を保存し、画面を進めます。
画像と名前は、各画面の左上端に表示されます。

自動パージオプションの設定

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Customization] を選択します。
- 2 [Purge consumables at end of run] のチェックボックスを選択します。
この設定により、各ラン後に、試薬カートリッジから廃液ボトルに、未使用の試薬を自動的にパージします。この設定を行わない場合、未使用の試薬は試薬カートリッジ内に残ったままになります。



注意

消耗品のパージは、自動的に追加の時間をワークフローに加えます。たとえば、300サイクルラン (2 × 151) 後の試薬のパージには、約50分要します。

- 3 [Save] を選択して設定を保存し、画面を終了します。

自動開始オプションの設定

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Customization] を選択します。
- 2 [Skip pre-run check confirmation] のチェックボックスを選択します。
この設定により、自動チェックが成功した後、シーケンスランを自動的に開始します。この設定を行わない場合、ラン前チェックの後、手動でランを開始します。
- 3 [Save] を選択します。

ソフトウェア更新の自動チェック設定

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Customization] を選択します。
- 2 [Automatically check for software updates on BaseSpace] のチェックボックスを選択します。
インターネット接続が必要です。
- 3 [Save] を選択して設定を保存し、画面を終了します。

画面上のキーボードオプションの設定

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Customization] を選択します。
- 2 [Use on-screen keyboard] のチェックボックスを選択します。
この設定により、ランセットアップステップ中、入力に画面上のキーボードが使用できません。
- 3 [Save] を選択します。

音声案内対応

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Customization] を選択します。
- 2 [Play audio] のチェックボックスを選択し、以下の場合に音声案内をオンにします。
 - ▶ 装置のイニシャライズ
 - ▶ ランが開始したとき
 - ▶ エラーが生じたとき
 - ▶ ユーザーインタラクションが必要なとき
 - ▶ ランが終了したとき
- 3 [Save] を選択します。

解析設定の構成

コントロールソフトウェアはデータの転送およびその後の解析をするために以下のオプションを提供します。

- ▶ **BaseSpace** : BaseSpace解析用にデータをイルミナのBaseSpaceに送ります。
- ▶ **BaseSpace Onsite** : サーバー解析用にデータをBaseSpace Onsite LTサーバーに送ります。
- ▶ **Local Run Manager** : Local Run Managerモジュールを使用する解析用に、データを指定の出力フォルダに送ります。
- ▶ **Standalone** : 後の解析用にデータを指定の出力フォルダに送ります。

BaseSpaceの選択

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Configuration] を選択します。
- 2 [Analysis Configuration] を選択します。
- 3 [BaseSpace] を選択します。
- 4 (オプション) 以下のようにデフォルトのBaseSpaceログイン認証情報を指定します。
 - a [User name] と [Password] を入力します。
 - b [Save the credentials as the default] のチェックボックスを選択します。
 - c [Bypass Analysis Method login screen] のチェックボックスを選択します。
- 5 (オプション) [Output Folder] のチェックボックスを選択して、[Browse] を選択し、希望する出力フォルダの場所に移動します。
この設定はベースコール (BCL) ファイルのコピーを指定の場所に保存します。
- 6 (オプション) [Send instrument health information to Illumina] を選択し、イルミナにログファイルを送信します。インターネット接続が必要です。
- 7 [Save] を選択します。

BaseSpace Onsiteの選択

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Configuration] を選択します。
- 2 [Analysis Configuration] を選択します。
- 3 [BaseSpace Onsite] を選択します。
- 4 (オプション) 以下のようにデフォルトのBaseSpace Onsiteのログイン認証情報を指定します。
 - a [User name] と [Password] を入力します。
 - b [Save the credentials as the default] のチェックボックスを選択します。
 - c [Bypass Analysis Method login screen] のチェックボックスを選択します。
- 5 サーバーネームフィールドに、BaseSpace Onsiteサーバーのフルパスを入力します。
- 6 (オプション) [Output Folder] のチェックボックスを選択して、[Browse] を選択し、希望する出力フォルダの場所に移動します。
この設定はベースコール (BCL) ファイルのコピーを指定の場所に保存します。

- 7 (オプション) [Send instrument health information to Illumina] を選択し、イルミナにログファイルを送信します。インターネット接続が必要です。
- 8 [Save] を選択します。

Local Run Managerの選択

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Configuration] を選択します。
- 2 [Analysis Configuration] を選択します。
- 3 [Local Run Manager] を選択します。
- 4 (オプション) 以下のようにデフォルトのLocal Run Managerログイン認証情報を指定します。
 - a [User name] と [Password] を入力します。
 - b [Save credentials as the default] のチェックボックスを選択します。
 - c [Bypass Analysis Method login screen] のチェックボックスを選択します。
- 5 (オプション) [Use Run Monitoring] を選択し、BaseSpaceで可視化ツールを使用しランをモニタリングします。BaseSpaceログインおよびインターネット接続が必要です。
- 6 (オプション) 以下のようにデフォルトのBaseSpaceログイン認証情報を指定します。
 - a [User name] と [Password] を入力します。
 - b [Save credentials as the default] のチェックボックスを選択します。
- 7 [Browse] を選択し、希望する出力フォルダの場所に移動します。
- 8 (オプション) [Send instrument health information to Illumina] を選択し、イルミナにログファイルを送信します。インターネット接続が必要です。
- 9 [Save] を選択します。

Standaloneの選択

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Configuration] を選択します。
- 2 [Analysis Configuration] を選択します。
- 3 [Standalone] を選択します。
- 4 (オプション) [Use Run Monitoring] を選択し、BaseSpaceで可視化ツールを使用しランをモニタリングします。BaseSpaceログインおよびインターネット接続が必要です。
- 5 (オプション) 以下のようにデフォルトのBaseSpaceログイン認証情報を指定します。
 - a [User name] と [Password] を入力します。
 - b [Save credentials as the default] のチェックボックスを選択します。
- 6 [Browse] を選択し、希望する出力フォルダの場所に移動します。
- 7 (オプション) [Send instrument health information to Illumina] のチェックボックスを選択し、イルミナにログファイルを送信します。インターネット接続が必要です。
- 8 [Save] を選択します。

ユーザーが用意する消耗品および機器

MiniSeqシステムでは以下の消耗品および機器を使用します。

シーケンスランでユーザーが用意する消耗品

消耗品	サプライヤー	目的
1 N NaOH (水酸化ナトリウム)	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの変性、0.1 Nに希釈
200 mM Tris-HCl、pH7	一般的なラボ用品サプライヤー	変性後のライブラリーの中和
70%イソプロピルアルコールワイプ または 70%エタノール	VWR、カタログ番号：95041-714 (または同等のもの) 一般的なラボ用品サプライヤー	フローセルの洗浄と一般的な用途
使い捨て手袋、パウダーフリー	一般的なラボ用品サプライヤー	一般的な用途
ラボ用リントフリー紙	VWR、カタログ番号：21905-026 (または同等のもの)	フローセルの洗浄

装置のメンテナンスにユーザーが用意する消耗品

消耗品	サプライヤー	目的
NaOCl、5% (次亜塩素酸ナトリウム)	Sigma-Aldrich、カタログ番号：239305 (またはラボラトリーグレードの同等品)	手動でラン後の洗浄を実施するため、0.12%に希釈
Tween 20	Sigma-Aldrich、カタログ番号：P7949	手動で装置の洗浄を実施するため、0.05%に希釈
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	手動で装置の洗浄を実施

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には、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のもののみを使用してください。

- ▶ 脱イオン水
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18メガオーム (MΩ) 水
- ▶ Milli-Q水
- ▶ Super-Q水
- ▶ 分子生物学グレード水

ユーザーが用意する機器

アイテム	ソース
冷凍庫、-25° C~-15° C、霜取り不要	一般的なラボ用品サプライヤー
アイスバケット	一般的なラボ用品サプライヤー
冷蔵庫、2° C~8° C	一般的なラボ用品サプライヤー

シーケンス

はじめに	20
シーケンスワークフロー	21
消耗品の準備	23
シーケンスのライブラリー調製	25
シーケンスランのセットアップ	26
ランの進捗状況のモニタリング	34
自動的なラン後の洗浄	36
位置番号9からの使用済みリザーバーの取り出し	37



はじめに

MiniSeqシステムでシーケンスランを実行するには、ランの消耗品を準備し、ソフトウェアの指示に従ってシーケンスランを設定します。

ワークフローの概要

クラスター形成

クラスター形成中は、単一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を形成します。

シーケンス

クラスターは2色チャンネルシーケンスケミストリーおよび各蛍光標識チェーンターミネーターに特異的なフィルターを組み合わせて画像化されます。フローセル上のタイルの画像化が終了した後、次のタイルが画像化されます。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ル、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

ランを実行中、データ解析のために、コントロールソフトウェアが自動的に、ベースコール（BCL）ファイルを、指定の出力場所に転送します。お使いのアプリケーションやお使いのシステム用に選択した解析構成によっていくつかの解析法がご利用になれます。詳細については、15ページの「解析設定の構成」を参照してください。

シーケンスラン継続時間

シーケンスラン継続時間は実施されるサイクル数によって決まります。最大のラン長は、150サイクルのペアエンドランに最大2つのインデックスリード（各8サイクル）を加えたものです。

予定される継続時間や他のシステムの仕様については、イルミナウェブサイトのMiniSeqシステムの仕様を参照してください。

1リード内のサイクル数

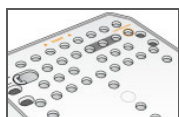
シーケンスランにおいて、1リードで実行したサイクル数は、解析されたサイクル数より1サイクル多くなります。たとえば、150サイクルのペアエンドランを実行するには、1リードあたり151サイクル（ 2×151 ）、合計302サイクルを実行するようにランを設定します。ランの終了時に、 2×150 サイクルが解析されます。各リードの余分のサイクルは、フェージングとプレフェージングの算出に使用されます。

シーケンスワークフロー

ランセットアップステップは、ランに指定した解析構成によって異なります

- ▶ **Standalone** : 消耗品を準備およびローディングした後、すべてのランパラメーターは MiniSeq Control Software インターフェースで指定されます。
- ▶ **BaseSpace、BaseSpace Onsite、または Local Run Manager** : 装置でランのセットアップをする前に、BaseSpace Prep Tab または Local Run Manager ソフトウェアでラン名を付け、ランパラメーターを指定します。消耗品を準備した後、MiniSeq Control Software からラン名を選択します。その後ランの消耗品をロードします。

ワークフロー (Standalone構成)



新しい試薬カートリッジの準備：融解と確認をします。
新しいフローセルの準備：室温に戻し、開封します。



ライブラリーを変性および希釈します。『MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：100000002697）を参照してください。



希釈ライブラリーを試薬カートリッジのリザーバー番号16にロードします。



ソフトウェアインターフェースから、[Sequence] を選択します。



フローセルと試薬カートリッジをロードします。
廃液ボトルを空にし、リロードします。



ランセットアップ画面でランパラメーターを指定します。
自動チェックの後 [Start] を選択します。



ランのモニタリングが可能な場合はBaseSpaceからSequencing Analysis Viewerでネットワークワークコンピュータから、または装置の画面でランをモニタリングします。
データは、指定した出力フォルダに転送されます。

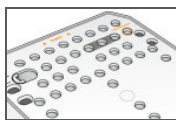


シーケンスが終了すると、自動で装置の洗浄が開始します。

ワークフロー（BaseSpaceまたはLocal Run Manager構成）



BaseSpace、BaseSpace OnsiteまたはLocal Run Managerでランパラメーターを指定します。



新しい試薬カートリッジの準備：融解と確認をします。
新しいフローセルの準備：室温に戻し、開封し、点検します。



ライブラリーを変性および希釈します。『MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000002697）を参照してください。



希釈ライブラリーを試薬カートリッジのリザーバー番号16にロードします。



ソフトウェアインターフェースから、[Sequence] を選択して、ランセットアップステップを開始します。



BaseSpace、BaseSpace OnsiteまたはLocal Run Managerに指定したラン名を選択します。



フローセルをロードします。
試薬カートリッジをロードします。
廃液ボトルを空にし、リロードします。



ランセットアップ画面でランパラメーターを見直します。
自動チェックの後 [Start] を選択します。



装置の画面、BaseSpaceまたはネットワーク接続したコンピューターのSequencing Analysis Viewerでランをモニタリングします。データは、BaseSpace、BaseSpace Onsiteまたは指定した出力フォルダに転送されます。



シーケンスが終了すると、自動で装置の洗浄が開始します。

消耗品の準備

試薬カートリッジの準備

- 1 -25° C~-15° Cの保存状態から試薬カートリッジを取り出します。
- 2 以下の水槽のオプションから選択して試薬を融解します。カートリッジを水につけないでください。融解したら、次に進む前にベースを乾かします。

方法	融解時間	安定限界
37° Cの水槽	35分	最大2時間
室温の水槽 (19° C~25° C)	90分	最大24時間

複数のカートリッジを同じ水槽で融解する場合、融解時間は長くなります。もう一つの方法として、以下のオプションを選択して試薬を融解します。

方法	融解時間	安定限界
室温空気 (19° C~25° C)	5時間	最大24時間
2° C~8° Cで冷蔵	18時間	最大72時間

- 3 カートリッジを5回転倒混和し、試薬を混ぜ合わせます。
- 4 カートリッジの底から大きいリザーバーを点検し、試薬が融解していることと、リザーバーに氷晶が付いていないことを確認します。
- 5 ベンチの上でカートリッジを軽くたたき気泡を減らします。

フローセルの準備


- 1 2° C~8° Cの保管場所から新しいフローセルのパッケージを取り出します。
 - 2 室温で30分、未開封のフローセルのパッケージを静置します。
-  **注意**
フローセルを繰り返し冷却および加温しないでください。
- 3 ホイルパッケージからフローセル容器を取り出します。
 - 4 新しいパウダーフリー手袋をつけます。
 - 5 フローセルのプラスチック製カートリッジの端部をつまみ、フローセル容器から取り出します。

図9 フローセルの取り出し



- 6 細かいごみの出ないアルコールワイプを使用してフローセルのガラス表面をきれいにします。

- 7 レンズクリーニング用リントフリー紙を使用して乾かします。黒いフローセルガスケット付近に注意してください。
- 8 フローセルポートが塞がれていないことを点検します。ガスケットが適切に設置されていることを確認します。

シーケンスのライブラリー調製

ライブラリーの変性と希釈

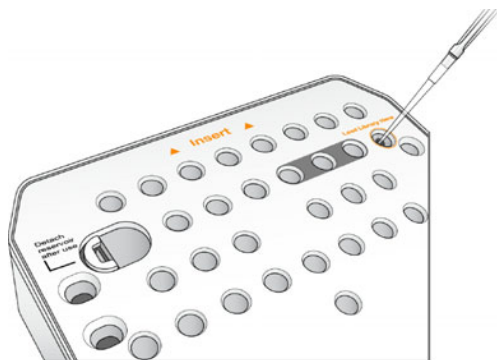
試薬カートリッジにライブラリーをロードする前に、ライブラリーを変性および希釈し、オプションのPhiXコントロールを追加します。詳細については、『MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：1000000002697）を参照してください。

MiniSeqシステムのロード分量は、ロード濃度1.8 pMで500 μ Lです。しかし、ロード濃度は、ライブラリー調製および定量法により異なることがあります。

試薬カートリッジへのライブラリーのロード

- 1 リントフリー紙を使用して、[Load library here] というラベルが付いているリザーバー [#16] を密閉しているホイルシールをきれいにします。
- 2 清潔な1 mLピペットチップを使用してシールに穴を開けます。
- 3 リザーバー [#16] に500 μ Lの調製ライブラリーを加えます。ライブラリーを分注するときはホイルシールに触れないでください。

図10 ライブラリーのロード



シーケンスランのセットアップ

ランセットアップのステップはシステム構成により異なります。

- ▶ **Standalone解析**：コントロールソフトウェアランセットアップ画面でランパラメーターを定義することを求められます。
- ▶ **BaseSpaceまたはLocal Run Manager構成**：ログインし、BaseSpaceまたはLocal Run Managerに既定したランの一覧から選択を求められます。

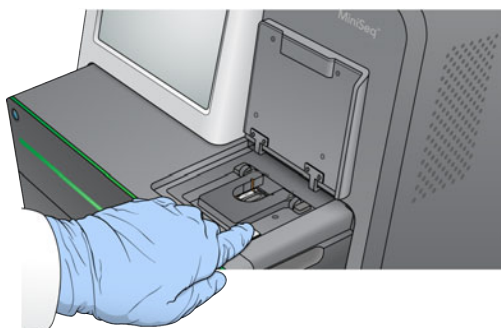
ランのセットアップ（スタンドアロン構成）

- 1 ホーム画面から、[Sequence] を選択します。
シーケンスコマンドが前回のランの消耗品を取り外し、一連のランセットアップ画面を開けます。

フローセルの装填

- 1 フローセルコンパートメントのドアを開けます。
- 2 フローセルラッチの右側にある取り外しボタンを押します。

図11 フローセルラッチを開けます。



- 3 以前のランで使用したフローセルがもしあれば、取り出します。
- 4 フローセルステージが清浄されていることを確認します。デブリがあれば、アルコールワイプでフローセルステージを清浄します。
- 5 フローセルステージのアライメントピン上にフローセルを置きます。

図12 ステージへフローセルを置く



- 6 フローセルを固定するためフローセルラッチを閉じます。

図13 フローセルラッチを閉じる



- 7 フローセルコンパートメントのドアを閉じます。

試薬カートリッジの装填

- 1 試薬コンパートメントドアを開けます。
- 2 使用済み試薬カートリッジがもしあれば、取り出します。

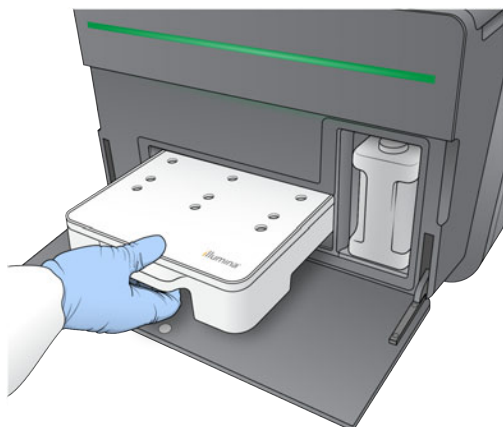


注意

ホルムアミドが含まれている未使用の試薬を安全に破棄するために、位置番号9のリザーバーは取り外すことができます。37ページの「位置番号9からの使用済みリザーバーの取り出し」を参照してください。

- 3 試薬カートリッジが止まるまで試薬コンパートメントにカートリッジをスライドさせます。

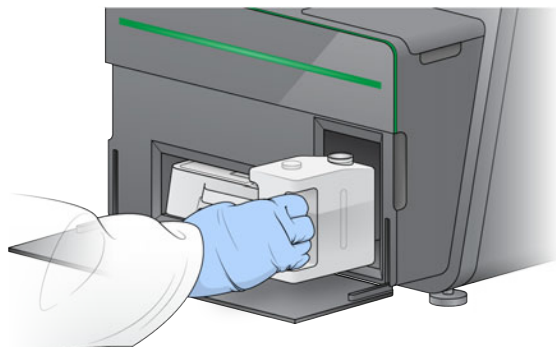
図14 試薬カートリッジの装填



廃液ボトルを空にする

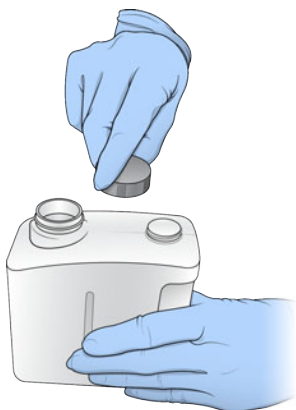
- 1 コンパートメントから廃液ボトルを取り出します。

図15 廃液ボトルを取り出します。



- 2 廃液ボトルを運ぶとき、溶液をこぼさないために、ねじ付きキャップでボトルの口を密閉してください。

図16 廃液ボトルの密閉



- 3 適応規格に従って中身を廃棄してください。

**警告**

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

- 4 ねじ付きキャップを外して、空の廃液ボトルが止まるまでコンパートメントにスライドさせます。
- 5 コンパートメントドアを閉め、[Next] を選択します。

ランパラメーターの入力

- 1 希望するラン名を入力します。
- 2 (オプション) 希望するライブラリーIDを入力します。
- 3 レシピのドロップダウンリストから、レシピを選択します。互換性のあるレシピのみ一覧表示されます。
- 4 [Single read] または [Paired end] のいずれかのリードタイプを選択します。
- 5 シーケンスランの各リードのサイクル数を入力します。
 - ▶ Read 1 : 151サイクルまでの値を入力します。

- ▶ **Index 1** : インデックス1 (i7) プライマーに必要なサイクル数を入力します。
- ▶ **Index 2** : インデックス2 (i5) プライマーに必要な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、リード1と同じサイクル数です。

コントロールソフトウェアは以下の基準で指定したサイクル数を確認します。

- ▶ 総サイクルは、ラン用にロードした試薬カートリッジに基づき最大可能サイクル数を超えません。
- ▶ リード1のサイクルは、テンプレート形成に必要とされる5サイクルより大きくなりません。
- ▶ インデックスリードサイクルはリード1およびリード2のサイクルを超えません。



注意

実行しているシーケンスライブラリーの正確なインデックスリードサイクル数を指定していることを確認してください。詳細については、ライブラリー調製文書を参照してください。

- 6 (オプション) カスタムプライマーを使用する場合、使用するプライマーのチェックボックスを選択します。
 - ▶ **Read 1** : Read 1用カスタムプライマー
 - ▶ **Index 1** : インデックス1用カスタムプライマー
 - ▶ **Index 2** : インデックス2用カスタムプライマー
 - ▶ **Read 2** : Read 2用カスタムプライマー
- 7 (オプション) 現在のランの設定を変更するには **[Advanced Settings]** を選択します。
 - ▶ **このランの消耗品をパージする** : 現在のラン実行後、自動で消耗品を清掃するよう設定を変更します。
 - ▶ **このランに対するランのモニタリングを使用** : BaseSpaceでランのモニタリングを使用し設定を変更します。有効にする場合、BaseSpaceログインとインターネット接続が必要です。
 - ▶ **レシピ** : このラン用のカスタムレシピを選択します。
 - ▶ **[Output folder]** : 現在のランに対する出力フォルダの場所を変更します。**[Browse]** を選択し、フォルダの場所に移動します。
- 8 **[Next]** を選択します。



注意

自動チェックもしくはシーケンスラン実行中は、試薬コンパートメントドアまたはフローセルコンパートメントドアを開けないでください。

自動チェックのレビュー

- 1 自動チェックの結果を見直します。
 - ▶ 実行中にチェックを停止するには **[Cancel]** を選択します。
 - ▶ パスしない項目がある場合、続行するには操作が必要です。50ページの「自動チェック時のエラー」を選択してください。
 - ▶ チェックを再スタートするには、**[Retry]** を選択します。チェックが不完全または失敗した時点でチェックを再開します。
- 2 ランを開始するには、以下のオプションから選択します。
 - ▶ チェックが成功した後に、システムが自動で開始する構成でない場合は **[Start]** を選択します。
 - ▶ チェックが成功した後に、システムが自動で開始する構成の場合は、自動でシーケンスランが開始します。ユーザーがその場にいる必要はありません。しかし、チェック中にエラーが生じた場合、ランは自動で開始しません。

ランのセットアップ（BaseSpaceまたはLocal Run Manager構成）

- 1 ホーム画面から、[Sequence] を選択します。
シーケンスコマンドが前回のランの消耗品を取り外し、一連のランセットアップ画面を開けます。

BaseSpaceまたはLocal Run Managerへログインします。

- 1 ユーザー名とパスワードを入力します。
- 2 [Next] を選択します。

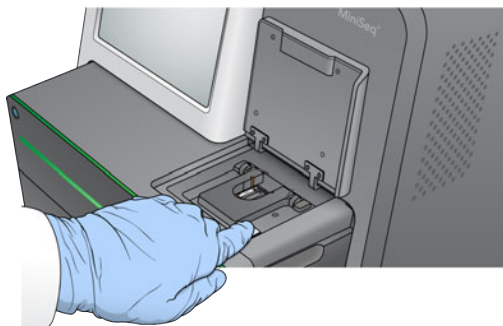
利用可能なランを選択

- 1 利用可能なランの一覧からラン名を選択します。
上下矢印で一覧をスクロールするか検索フィールドでラン名を入力します。
- 2 [Next] を選択します。

フローセルの装填

- 1 フローセルコンパートメントのドアを開けます。
- 2 フローセルラッチの右側にある取り外しボタンを押します。

図17 フローセルラッチを開けます。



- 3 以前のランで使用したフローセルがもしあれば、取り出します。
- 4 フローセルステージが清浄されていることを確認します。デブリがあれば、アルコールワイプでフローセルステージを清浄します。
- 5 フローセルステージのアライメントピン上にフローセルを置きます。

図18 ステージへフローセルを置く



- 6 フローセルを固定するためフローセルラッチを閉じます。

図19 フローセルラッチを閉じる



- 7 フローセルコンパートメントのドアを閉じます。

試薬カートリッジの装填

- 1 試薬コンパートメントドアを開けます。
- 2 使用済み試薬カートリッジがもしあれば、取り出します。

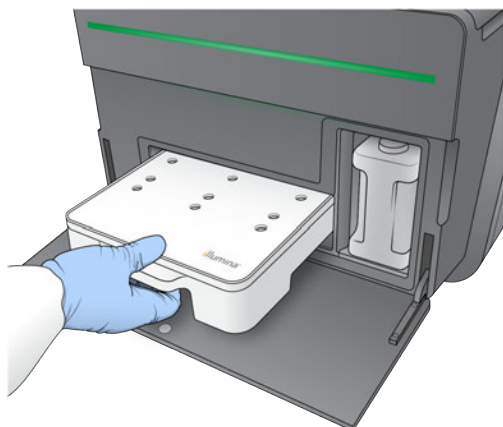


注意

ホルムアミドが含まれている未使用の試薬を安全に破棄するために、位置番号9のリザーバーは取り外すことができます。37ページの「位置番号9からの使用済みリザーバーの取り出し」を参照してください。

- 3 試薬カートリッジが止まるまで試薬コンパートメントにカートリッジをスライドさせます。

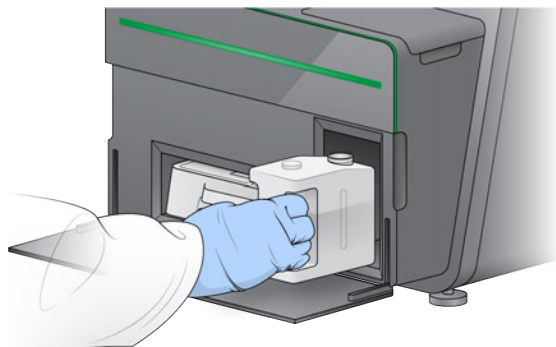
図20 試薬カートリッジの装填



廃液ボトルを空にする

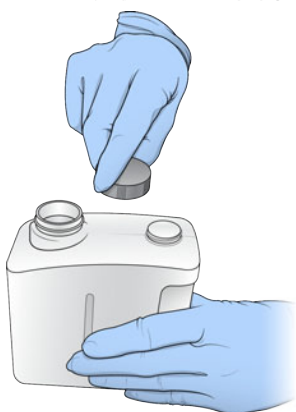
- 1 コンパートメントから廃液ボトルを取り出します。

図21 廃液ボトルを取り出します。



- 2 廃液ボトルを運ぶとき、溶液をこぼさないために、ねじ付きキャップでボトルの口を密閉してください。

図22 廃液ボトルの密閉



- 3 適応規格に従って中身を廃棄してください。



警告

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

- 4 ねじ付きキャップを外して、空の廃液ボトルが止まるまでコンパートメントにスライドさせます。
- 5 コンパートメントドアを閉め、[Next] を選択します。

ランパラメーターの確認

- 1 ランパラメーターを確認します。
コントロールソフトウェアは以下の基準で指定したサイクル数を確認します。
 - ▶ 総サイクルは、ラン用にロードした試薬カートリッジに基づき最大可能サイクル数を超えません。
 - ▶ リード1のサイクルは、テンプレート形成に必要とされる5サイクルより大きくなりません。
 - ▶ インデックスリードサイクルはリード1およびリード2のサイクルを超えません。

**注意**

実行しているシーケンスライブラリーの正確なインデックスリードサイクル数を指定していることを確認してください。詳細については、ライブラリー調製文書を参照してください。

- 2 (オプション) ランパラメーターを変更するには [Edit] を選択します。終了したら [Save] を選択します。
 - ▶ このランの消耗品をパージする：現在のラン実行後、自動で消耗品を清掃するよう設定を変更します。
 - ▶ ランパラメーター：リードタイプまたはリード当たりのサイクル数を変更します。
 - ▶ カスタムプライマー：カスタムプライマーの設定を変更します。
- 3 [Next] を選択します。

**注意**

自動チェックもしくはシーケンスラン実行中は、試薬コンパートメントドアまたはフローセルコンパートメントドアを開けないでください。

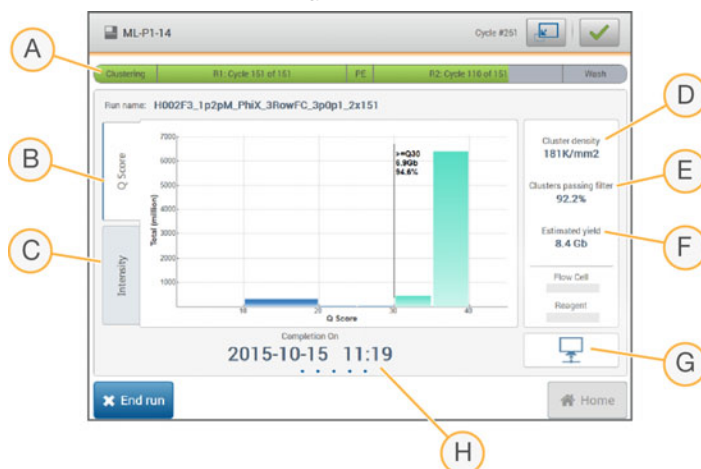
自動チェックのレビュー

- 1 自動チェックの結果を見直します。
 - ▶ 実行中にチェックを停止するには [Cancel] を選択します。
 - ▶ パスしない項目がある場合、続行するには操作が必要です。50ページの「自動チェック時のエラー」を選択してください。
 - ▶ チェックを再スタートするには、[Retry] を選択します。チェックが不完全または失敗した時点でチェックを再開します。
- 2 ランを開始するには、以下のオプションから選択します。
 - ▶ チェックが成功した後に、システムが自動で開始する構成でない場合は [Start] を選択します。
 - ▶ チェックが成功した後に、システムが自動で開始する構成の場合は、自動でシーケンスランが開始します。ユーザーがその場にいる必要はありません。しかし、チェック中にエラーが生じた場合、ランは自動で開始しません。

ランの進捗状況のモニタリング

- 1 画面にパラメーターが表示されたとき、ランの進捗状況、強度、クオリティスコアをモニタリングします。

図23 シーケンスランの進捗状況およびパラメーター



- A ランの進捗状況：各リードに対して現在のステップおよび完了したサイクル数を示します。進捗バーは各ステップのラン比率に比例しません。
- B Qスコア：クオリティスコア（Qスコア）の分布を示します。68ページの「クオリティスコアリング」を参照してください。
- C 強度：各タイトルの90パーセンタイルのクラスター強度値を示します。プロット色はそれぞれの塩基を示します：赤はA、緑はC、青はG、黒はT。
- D クラスター密度 (K/mm²)：ラン実行中に検出したクラスター数を示します。
- E パスフィルターしたクラスター (%)：パスフィルターしたクラスターの割合を示します。68ページの「パスフィルターしたクラスター」を参照してください。
- F 予定収量 (Gb)：ラン実行中、推定される塩基数を示します。
- G データ転送状況：解析構成に基づいたデータ転送の状況を示します。
- H 完了時間：ランが完了する日付および時間を示します (yyyy-mm-dd hh:mm)。



注意

ホームを選択した後、ランパラメーターを見直すために戻ることはできません。しかし、ランパラメーターには、Sequencing Analysis Viewer, でネットワークコンピューターのBaseSpaceから、またはLocal Run Managerでネットワークコンピューターからアクセスすることができます。

ランパラメーターのサイクル

ランパラメーターはラン内の異なるポイントで表示されます。

- ▶ クラスター形成ステップ中は、パラメーターは表示されません。
- ▶ テンプレート形成用に最初の5サイクルが保存されます。
- ▶ サイクル6で、生のクラスター密度とサイクル1の強度が利用可能です。
- ▶ サイクル25の後、パスフィルターしたクラスター、収量、クオリティスコアが利用可能です。

















Sequencing Analysis Viewer

Sequencing Analysis Viewerソフトウェアは、ラン実行中に生成されたシーケンスパラメーターを表示します。パラメーターがRTAで生成されたデータおよびInterOpファイルに書き込まれたデータに基づいてプロット、グラフおよび図の形式で表示されます。パラメーターはランの進捗に合わせて更新されます。ラン中にいつでも[Refresh]を選択して、更新したパラメーターを表示することができます。詳細については、『Sequencing Analysis Viewer User Guide』（パーツ番号：15020619）を参照してください。

Sequencing Analysis Viewerは、装置のコンピューターにインストールされたソフトウェアの中に含まれています。同じネットワークにリンクされている別のコンピューターにも、リモートでランのパラメーターをモニタリングする装置としてSequencing Analysis Viewerをインストールすることができます。

データ転送ステータス

選択した解析構成に応じて、ラン中にアイコンが画面上に表示され接続状況を示します。

ステータス	BaseSpace	BaseSpace Onsite	Local Run Manager	Standalone
接続				
データ転送中				
切断				
無効				

画面上に複数のアイコンが現れることがあります。たとえば、ランデータがBaseSpaceと追加の出力フォルダ先に転送中の場合、BaseSpaceアイコンとStandaloneアイコンが表示されます。

Run Copy Service

MiniSeqシステムソフトウェアスーツにはRun Copy Serviceが含まれています。RTAがファイルを生成すると、サービスは指定した出力フォルダ先にファイルをコピーします。

ラン中に、データ転送が妨げられた場合、データは一時的に装置のコンピューターに保存されます。接続が回復すると、ラン中に、自動的にデータ転送が再開されます。ラン終了前に接続が回復しない場合、手動でデータを希望する先に移動します。

BaseSpaceへの転送

BaseSpace BrokerはランデータをBaseSpaceに転送します。BaseSpaceへの接続が妨げられた場合、ブローカーは7日間、データをアップロードします。7日後も接続が回復しない場合、ランデータは消去されます。

ランデータに追加の場所を指定する場合は、ブローカーの状態にかかわらず、データは指定の場所に転送されます。

自動的なラン後の洗浄

シーケンスランが終了したら、ソフトウェアが試薬カートリッジ内の洗浄溶液およびNaOClを使用して、自動でラン後の洗浄を開始します。

自動的なラン後の洗浄の所要時間は約90分です。洗浄が終了したら、ホームボタンがアクティブになります。シーケンスの結果は洗浄中でも画面で確認が可能です。

洗浄の後

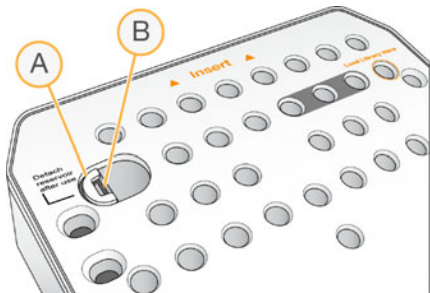
洗浄後、空気がシステム内に入らないようにシッパーが下がったままとなります。次回ランを実行するまでカートリッジを置いたままにしてください。

位置番号9からの使用済みリザーバーの取り出し

試薬カートリッジの位置番号9にあるリザーバーにはホルムアミドが含まれます。使用済み試薬カートリッジを廃棄する前に、リザーバーを位置番号9から取り出し、分けて廃棄することができます。

- 1 手袋を着用し、位置番号9にある白い分離タブを下方に押し、3つある接続ポイントを解放します。

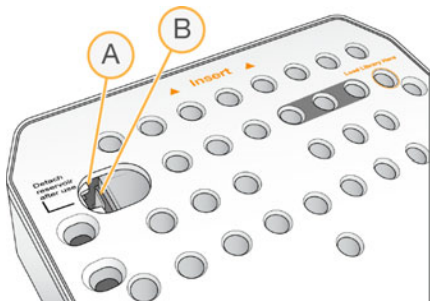
図24 位置番号9にある分離タブ



- A 何もしていない状態の分離タブ
- B リザーバークリップ

- 2 カートリッジの左縁方向に分離タブをスライドさせます。これにより分離タブはカートリッジカバーの下にスライドします。

図25 解放タブが外れると、リザーバークリップが現れます。



- A カートリッジカバーの下にある分離タブ
- B リザーバークリップ

- 3 清潔なプラスチックリザーバークリップを下に押し、左方向に動かします。試薬カートリッジの下からリザーバーが解放されます。
- 4 適用規格に従いリザーバーを廃棄してください。



警告

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

メンテナンス

はじめに	40
手動による装置の洗浄の実施	41
ソフトウェアの更新	44



はじめに

メンテナンスの手順には、手動による装置の洗浄および入手可能な場合、システムソフトウェアの更新が含まれます。その他の定期的なメンテナンスは不要です。

- ▶ **装置の洗浄**：各シーケンスランの後に、自動的にラン後の洗浄が行われ、装置の性能を維持します。しかし、手動による装置の洗浄が一定の条件下で必要になります。41ページの「手動による装置の洗浄の実施」を参照してください。
- ▶ **ソフトウェアの更新**：新しいバージョンのシステムソフトウェア一式が入手可能になると、BaseSpaceに接続して自動で、またはイルミナのウェブサイトからインストーラをダウンロードして手動でソフトウェアを更新することができます。44ページの「ソフトウェアの更新」を参照してください。

予防メンテナンス

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

手動による装置の洗浄の実施

手動による装置の洗浄のオプションにはQuick WashとManual Post-Run Washの洗浄があります。

洗浄タイプ	内容説明
Quick Wash 時間：20分間	クイック洗浄は、装置を使用していないまたは装置のシャットダウン後に、7日ごとに必要です。 ユーザーが用意するラボラトリーグレード水とTween 20の洗浄溶液でシステムを洗浄します。
Manual Post-Run Wash 時間：90分間	手動によるラン後の洗浄は、ランが早く終了したときやフローセルをその後のリハイブリダイゼーションのために保存したときなど、自動によるラン後の洗浄が実施されないときに必要です。 ユーザーが用意する0.12%次亜塩素酸ナトリウムとラボラトリーグレード水とTween 20の洗浄溶液でシステムを洗浄します。

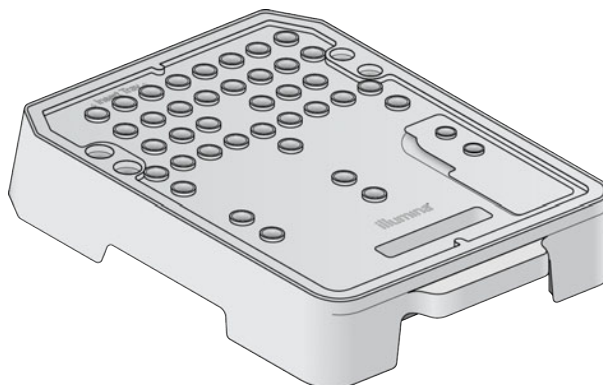


注意

24時間以内に用意した新しいNaOClの希釈液を必ず使用してください。1 mLを超える量を作る場合は、次の24時間以内で使用するため残った希釈液を2° C~8° Cで保管してください。あるいは、残ったNaOClの希釈液は廃棄してください。

手動による装置の洗浄は、装置に付随した洗浄カートリッジと洗浄フローセルが必要です。もう一つの方法として、使用済みフローセルを使用することができます。

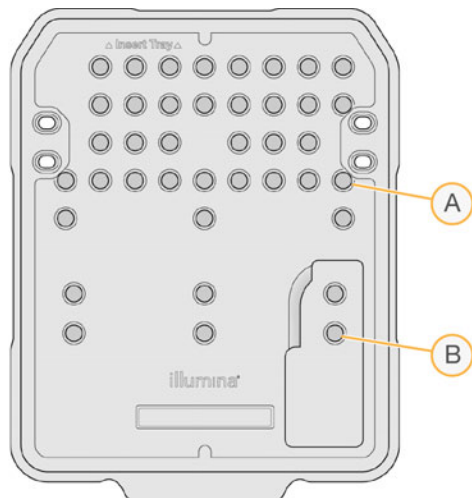
図26 洗浄カートリッジ



Manual Post-Run Washの準備

- 以下の分量を組み合わせると、0.12%NaOClができます。
 - ▶ 5% NaOCl (31 μ L)
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (1269 μ L)
- 洗浄カートリッジに0.12%NaOClを1.3 mL加えます。
正しいリザーバーはあらかじめ充填された試薬カートリッジの位置番号31に相当します。

図27 NaOClおよび洗浄溶液の位置



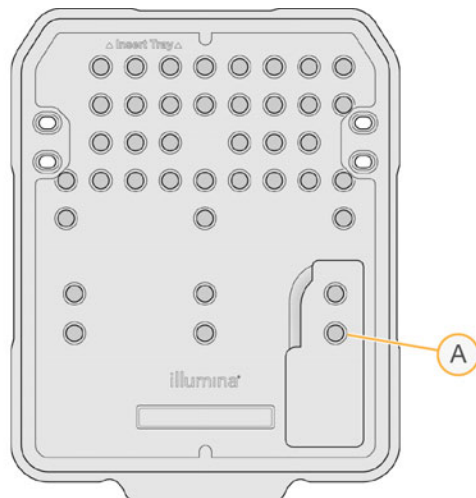
- A 0.12% NaOCl
B 洗浄溶液

- 3 以下の分量を組み合わせると、0.05% Tween 20の洗浄溶液ができます。
 - ▶ 100% Tween 20 (40 μ L)
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (80 mL)
- 4 80 mLの洗浄溶液を洗浄カートリッジに加えます。
正しいリザーバーは、あらかじめ充填された試薬カートリッジの位置番号40に相当します。
- 5 ホーム画面から、[Perform Wash] を選択し、[Manual post-run wash] を選択します。

Quick Washの準備

- 1 以下の分量を組み合わせると、0.05% Tween 20の洗浄溶液ができます。
 - ▶ 100% Tween 20 (20 μ L)
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (40 mL)
- 2 40 mLの洗浄溶液を洗浄カートリッジに加えます。
正しいリザーバーは、あらかじめ充填された試薬カートリッジの位置番号40に相当します。

図28 洗浄溶液の位置



A 洗浄溶液

- 3 ホーム画面から、[Perform wash] を選択し、[Quick Wash] を選択します。

洗浄フローセルと洗浄カートリッジのロード

- 1 洗浄フローセルをロードします。フローセルクランプとフローセルドアを閉じます。



注意

もう一つの方法として、使用済みフローセルをロードすることができます。

- 2 以前のランで使用した試薬カートリッジがもしあれば、取り出します。
- 3 準備した洗浄カートリッジをロードします。
- 4 廃液ボトルを取り出し適用規格に従って中身を廃棄してください。



警告

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

- 5 空の廃液ボトルが止まるまでコンパートメントにスライドさせます。
- 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。

洗浄の開始

- 1 チェックが完了したら [Start] を選択します。
- 2 洗浄が完了したら [Home] を選択します。

洗浄の後

洗浄後、空気がシステム内に入らないようにシッパーが下がったままとなります。次回ランを実行するまでカートリッジを置いたままにしてください。


ソフトウェアの更新

ソフトウェアの更新はシステムスーツと呼ばれるソフトウェアバンドルに梱包されており、以下のソフトウェアが入っています。

- ▶ MiniSeq Control Software
- ▶ MiniSeq recipes
- ▶ RTA2
- ▶ Local Run Manager
- ▶ MiniSeq Service Software
- ▶ Sequencing Analysis Viewer
- ▶ BaseSpace Broker

ソフトウェアリリースノートは、イルミナのウェブサイトのMiniSeqシステムサポートページで入手できます。

インターネット接続をして自動で、またはネットワークの場所もしくはUSBの場所から手動でソフトウェアの更新をインストールすることができます。

- ▶ **自動更新**：装置がインターネットアクセスでネットワークに接続する装置では、更新が可能なおき、ホーム画面の装置管理ボタン上に注意の  アイコンが表示されます。
- ▶ **手動更新**：イルミナのウェブサイトのMiniSeqシステムサポートページからシステムスーツインストーラをダウンロードします。



注意

インストールの前に更新をキャンセルすると、インストール中の時点で更新を完全に停止します。キャンセルした時点までの変更はいずれもアンインストールされません。また以前のバージョンに戻りません。

自動的なソフトウェアの更新

- 1 [Manage Instrument] を選択します。
- 2 [Software Update] を選択します。
- 3 [Install the update already downloaded from BaseSpace] を選択します。
- 4 [Update] を選択し、アップデートを開始します。コマンドを確認するダイアログボックスが開きます。
- 5 インストールウィザードの指示に従います。
 - a ライセンスに同意します。
 - b アップデートに含まれるソフトウェアの一覧を確認します。

アップデートが終了したら、コントロールソフトウェアが自動で再起動します。



注意

ファームウェアのアップデートが含まれる場合、ファームウェアのアップデート後に、自動でのシステムの再起動が必要です。

手動によるソフトウェアの更新

- 1 イルミナのウェブサイトからシステムスーツインストーラをダウンロードして、ネットワークの場所に保存します。もう一つの方法として、ポータブルUSBドライブにソフトウェアインストールファイルをコピーすることもできます。
- 2 [Manage Instrument] を選択します。

- 3 [Software Update] を選択します。
- 4 [Manually install the update from the following location] を選択します。
- 5 [Browse] を選択してソフトウェアインストールファイル場所を指示し、[Update] を選択します。
- 6 インストールウィザードの指示に従います。
 - a ライセンスに同意します。
 - b アップデートに含まれるソフトウェアの一覧を確認します。

アップデートが終了したら、コントロールソフトウェアが自動で再起動します。



注意

ファームウェアのアップデートが含まれる場合、ファームウェアのアップデート後に、自動でのシステムの再起動が必要です。

トラブルシューティング

トラブルシューティングファイル	48
自動チェック時のエラー	50
RTAエラー	52
リハイブリダイゼーションのワークフロー	53
システムチェック	55
ネットワーク構成の設定	58
カスタムゲノム	60
装置のシャットダウン	61



トラブルシューティングファイル

イルミナテクニカルサポートでは、トラブルシューティングの問題に対してラン指定またはスキャン指定のファイルのコピーを求めることがあります。通常、トラブルシューティングには以下のファイルを使用します。

キーファイル	フォルダ	内容説明
ランの情報ファイル (RunInfo.xml)	ルートフォルダ	以下の情報を含みます。 <ul style="list-style-type: none"> ・ ラン名 ・ ランのサイクル数 ・ 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 ・ フローセル上のスワストとタイルの数
ランパラメータファイル (RunParameters.xml)	ルートフォルダ	ランパラメータおよびランコンポーネントに関する情報を含みます。RFID、シリアルナンバー、ロットナンバー、有効期限に関する情報を含みます。
RTA構成ファイル (RTAConfiguration.xml)	Data¥Intensities	ランのRTA構成設定を含みます。 RTAConfiguration.xmlファイルは、ランの開始時に生成されます。
InterOpファイル (*.bin)	InterOp	Sequencing Analysis Viewerに使用されるバイナリレポートファイルです。 ラン全体を通じてInterOpファイルが更新されます。
ログファイル	ログ	ログファイルは各サイクルに対して装置で実行した各ステップを記載し、ランで使用したソフトウェアおよびファームウェアバージョンを一覧表示します。[InstrumentName]_CurrentHardware.csvと命名されているファイルは、装置のコンポーネントのシリアルナンバーを一覧表示します。
エラーログファイル (*ErrorLog*.txt)	RTAログ	RTAエラーのログ エラーログファイルはエラーが生じた場合に常に更新されます。
グローバルログファイル (*GlobalLog*.tsv)	RTAログ	すべてのRTAイベントのログ ラン全体を通じてグローバルログファイルが更新されます。
レーンログファイル (*LaneLog*.txt)	RTAログ	RTA実行イベントのログ ラン全体を通じてレーンログファイルが更新されます。

トラブルシューティングリソース

テクニカルに関するお問い合わせは、イルミナのウェブサイトのMiniSeqシステムサポートページを参照してください。サポートページでは、文書へのアクセス、ソフトウェアダウンロード、よくある質問について提供しています。

サポート案内にアクセスするにはMyIlluminaのアカウントにログインしてください。

ランの品質や性能の問題については、イリミナテクニカルサポートにお問い合わせください。77ページの「テクニカルサポート」

トラブルシューティングを簡単にするため、イリミナテクニカルサポートとBaseSpaceのランサマリーのリンクを共有することを検討してください。

実行状況

MiniSeqコントロールソフトウェアでは、システムのTempフォルダに少なくとも3ランの状況を一覧表示します。[Manage Instrument] 画面から、[Process status] を選択します。

各ラン名に、システムが以下のコンポーネントの状況を一覧表示します。

- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : BCLファイルの実行に基づく
- ▶ **Local Run Manager** : Local Run Managerがランに使用された場合
- ▶ **ファイルコピー** : ランコピーサービスを使用したファイル転送に基づく
- ▶ **BaseSpace** : BaseSpaceがランに使用された場合

シーケンスアーカイブフォルダ

MiniSeqコントロールソフトウェアは、装置で実行した各ランのランサマリーファイルを、D:\¥Illumina¥MiniSeq Sequencing Archiveでシステムコンピューターに保存します。

このフォルダには、装置で実行した各ランのサブフォルダがあり、以下のファイルを含みます。

- ▶ **RunCompletionStatus.xml** : 終了ステータス、ランフォルダ名、計画および実行したサイクル数、クラスター密度、パスフィルターしたクラスター、ランの予想収量が含まれます。
- ▶ **RunParameters.xml** : ランパラメータおよびランコンポーネントに関する情報を含みます。RFID、シリアルナンバー、ロットナンバー、有効期限に関する情報を含みます。

自動チェック時のエラー

自動によるラン前チェック中にエラーが生じた場合、エラーを解消するために以下の推奨措置を行います。

ラン前チェックが失敗した場合、試薬カートリッジのRFIDはロックされず、次のランのために使用することができます。しかし、ホイールシールに穴が開いた後、RFIDはロックされません。

システムチェック	推奨措置
Doors closed	コンパートメントドアが閉じられていることを確認します。
Consumables loaded	消耗品のセンサーが記録できていません。各消耗品が正確にロードされていることを確認してください。 ランセットアップ画面で、[Back] を選択し、ローディングステップに戻り、ランセットアップを繰り返します。
Required software	ソフトウェアの重要なコンポーネントがありません。 手動でソフトウェアの更新を実施し、すべてのソフトウェアコンポーネントを回復させます。
Instrument disk space	装置のハードドライブにランを実行するのに十分なディスクスペースがありません。 装置のハードドライブからランデータを消去してください。
Network connection	出力フォルダの指定場所への接続が切断されています。 チェックはネットワーク接続と表記されていますが、システムチェックは、サーバー、外付けハードドライブ、またはローカルドライブ上の出力フォルダの指定場所すべての接続をチェックします。 指定した出力フォルダ先への接続状態をチェックしてください。
Network disk space	出力フォルダの指定場所の容量がいっぱいです。チェックはネットワークディスクスペースと表記されていますが、システムチェックは、サーバー、外付けハードドライブ、またはローカルハードドライブ上の出力フォルダの指定場所すべてをチェックします。 指定した出力フォルダ先のディスクスペースを整理してください。

温度	推奨措置
Temperature ramp	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。
Temperature sensors	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。
Fans	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。

画像システム	推奨措置
Imaging limits	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。
Z step-and-settle	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。

画像システム	推奨措置
Bit error rate	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。
Flow cell registration	フローセルが正確に設置されていない可能性があります。 <ul style="list-style-type: none"> ランセットアップの画面で [Back] を選択しフローセルステップに戻ってください。 正確に設置されたことを確認するためフローセルをアンロードおよびリロードします。

試薬送液	推奨措置
Valve response	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。
Pump	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。

ハードドライブスペース

装置のコンピューターのハードドライブは、以下のランパラメーターを使用して生成したランデータをもとに、約45ランを保存することができます。

- ▶ 150サイクルのペアエンドランには約5~6 GBのスペースが必要です。
- ▶ Local Run ManagerのResequencing解析モジュールを使用する場合、解析ファイルにはさらに10 GBのスペースが必要です。

実行した各ランには、ソフトウェア動作の一部としてランのテンポラリフォルダが作成されます。ファイルがランのテンポラリフォルダに書き込まれると、そのファイルは出力フォルダにコピーされます。したがって、装置のハードドライブに出力フォルダの場所を指定する場合は、そのランのコピーが2つ、ハードドライブに書き込まれます。ソフトウェアには直近3つのランのテンポラリフォルダが保存されます。

Local Run Managerの解析ソフトウェアを使用する場合、デフォルト設定ではテンポラリファイルは消去されません。保持ポリシーはLocal Run Managerのシステム設定画面から手動で設定します。

最終的には、テンポラリファイルによりハードドライブのスペースがいっぱいになることがあります。ユーザーが実行するラン数に基づいて、ランデータ用のネットワークロケーションの使用や適切なLocal Run Managerの保持ポリシーを設定することを検討してください。

RTAエラー

RTAエラーのトラブルシューティングには、まずRTALogsフォルダに保存されているRTAのエラーログを確認します。このファイルは、ランが成功した場合は存在しません。イルミナのテクニカルサポートに問題を報告する際はエラーログも含めてください。

エラー処理

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

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

- ▶ *GlobalLog*.tsvには重要なランイベントが要約されています。
- ▶ *LaneNLog*.tsvには処理イベントが一覧表示されます。MiniSeqフローセル上では、Nは常に1です。
- ▶ *Error*.tsvにはラン中に生じたエラーが一覧表示されます。
- ▶ *WarningLog*.tsvにはラン中に生じた警告が一覧表示されます。

リハイブリダイゼーションのワークフロー

最初の数サイクル中に生成されたパラメーターが2500よりも低い強度を示した場合、リハイブリダイゼーションのランが必要になることがあります。多様性が低いライブラリーでは、1000よりも低い強度を示すものがあり、これは予測されるもので、リハイブリダイゼーションで解決することができません。



注意

エンドランのコマンドが最終コマンドです。ランを再開することができません。ランの消耗品を再利用することはできません。ランからシーケンスデータは保存されません。

ランを終わらせてフローセルを保存するとき、ソフトウェアはラン終了前に以下のステップを実行します。

- ▶ 安全な状態にフローセルを置きます。
- ▶ 後から実行するランのためにフローセルのRFIDをアンロックします。
- ▶ リハイブリダイゼーションの使用期限をフローセルに割り当てます。
- ▶ 終了したサイクルのランのログを書き込みます。通常は時間がかかります。
- ▶ 自動でのラン後の洗浄をスキップします。

リハイブリダイゼーションのランを開始すると、ソフトウェアはランを実行するために以下のステップを実行します。

- ▶ 特定のランの名前にもとづきランのフォルダを作成します。
- ▶ フローセルのリハイブリダイゼーションの期限が切れていないことを確認します。
- ▶ 試薬をプライムします。通常は時間がかかります。
- ▶ クラスタ形成ステップをスキップします。
- ▶ 以前のリード1プライマーを取り除きます。
- ▶ 新しいリード1プライマーをハイブリダイズします。
- ▶ 指定したランのパラメーターに基づいてリード1と残りのランを継続します。

リハイブリダイゼーションのためのラン終了のポイント

以下のポイントでランを終了する場合のみ、後でリハイブリダイゼーションを行うことができます。

- ▶ **サイクル5の後**：強度はテンプレート登録後に表示されますが、これには最初の5サイクルのシーケンスが必要です。サイクル1の後でランを終了すると安全ですが、サイクル5の後で終了することを推奨します。クラスタ形成中にランを終了しないでください。
- ▶ **リード1またはインデックス1リード**：ペアエンドが再合成される前にランを終了してください。ペアエンドの再合成が開始した後は、フローセルをその後のリハイブリダイゼーションのために保存することはできません。

必要な消耗品

リハイブリダイゼーションのランには、どこでランが停止したかにかかわらず、新しいMiniSeq試薬カートリッジが必要です。

現在のランの終了

- 1 [End Run] を選択します。コマンドの確認を求められたら、[Yes] を選択します。
- 2 フローセルの保存を求められたら、[Yes] を選択します。リハイブリダイゼーションの使用期限に注意してください。
- 3 リハイブリダイゼーションのランのセットアップの準備ができるまで、保存したフローセルを取り出し、2° C~8° Cで静置します。

**注意**

フローセル容器に入れて蓋を閉めた状態で、2° C~8° Cで最長7日間フローセルを保存できます。最良の結果を得るために、保存したフローセルは3日以内にリハイブリダイゼーションしてください。

手動洗浄の実施

- 1 ホーム画面から [Perform Wash] を選択します。
- 2 洗浄選択画面から [Manual Post-Run Wash] を選択します。41ページの「手動による装置の洗浄の実施」を参照してください。

**注意**

停止されたランから試薬カートリッジをまだ取り出していない場合、手動洗浄に試薬カートリッジを使用することができます。そうでない場合は、洗浄カートリッジで手動洗浄を実施します。

BaseSpace Prep tabでの新しいランのセットアップ

- 1 装置がBaseSpaceまたはBaseSpace Onsite用に構成されている場合、もとのランと同じパラメーターを使用してPrep tabで新しいランをセットアップします。

**アドバイス**

プールタブをクリックし、以前のランの設定を保持した適切なプールIDを選択し、新しいランに特定の名前を付けます。

装置のランのセットアップ

- 1 新しい試薬カートリッジを準備します。
- 2 保存したフローセルが保管されていた場合、室温に戻します（15~30分）。
- 3 保存したフローセルを洗浄およびロードします。
システムは保存したフローセルとしてフローセルのRFIDを読み込み、リハイブリダイゼーションの使用期限を確認します。
- 4 廃液ボトルを取り出し、中身を適正に廃棄してください。次に、空の容器をリロードします。
- 5 新しい試薬カートリッジをロードします。
- 6 ランセットアップ画面から、以下のオプションを選択してください。
 - ▶ **BaseSpace、BaseSpace OnsiteまたはLocal Run Manager構成**：ランを選択し、ランのパラメーターを確認します。
 - ▶ **Standalone構成**：ラン名を入力し、元のランと同じパラメーターを指定します。
- 7 [Next] を選択し、ラン前チェックに進みランを開始します。

システムチェック

システムチェックは、通常の操作または装置のメンテナンスには必要ありません。しかし、イルミナのテクニカルサポートでは、トラブルシューティングを目的としたシステムチェックの実行を確認することがあります。

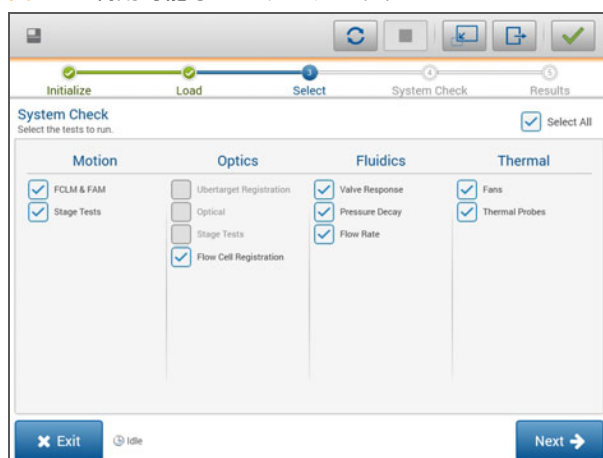


注意

装置の洗浄を要求されている場合は、システムチェックを開始する前に実行してください。

システムチェックが開始すると自動でコントロールソフトウェアが終了し、MiniSeqサービスソフトウェアが開始します。サービスソフトウェアが起動し、ロード画面が開きます。この画面は、高度のロードオプションを使用するように設定されています。

図29 利用可能なシステムチェック

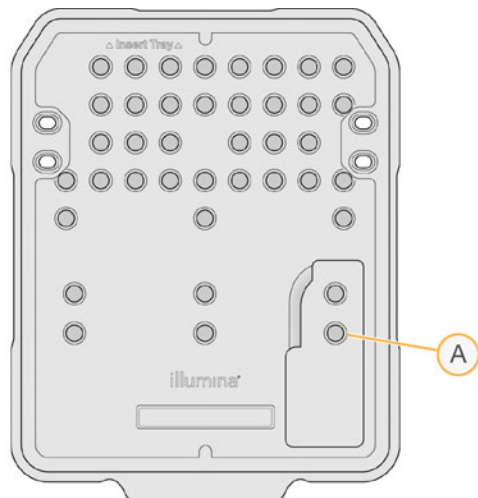


消耗品をロードした後、選択画面が開き、利用可能なシステムチェックが一覧表示されます。選択画面の非アクティブのチェックボックスはイルミナ担当者のサポートを必要とするテストを示します。

システムチェックの実施

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Check] を選択します。コントロールソフトウェアを終了することを求められたら、[Yes] を選択します。
- 2 40 mLの脱イオン水を洗浄カートリッジに加えます。
正しいリザーバーは、あらかじめ充填された試薬カートリッジの位置番号40に相当します。

図30 洗浄溶液の位置



A 洗浄溶液

- 3 以下のように消耗品をロードします。
 - a 使用したフローセルが装置にすでにない場合、使用したフローセルをロードします。
 - b 廃液ボトルを空にして装置に戻します。
 - c 洗浄カートリッジをロードします。
- 4 [Load] を選択します。
ソフトウェアがフローセルと洗浄カートリッジを位置に移動させます。
- 5 [Next] を選択します。システムチェックが開始します。
- 6 (オプション) システムチェックが終了したら、チェック名のとなりにある [View] を選択し、各チェックに関連する値を確認します。
- 7 [Next] を選択します。
システムチェックレポートが開きます。
- 8 [Save] を選択し、レポートをZIPファイルに保存します。ネットワークロケーションを指示しファイルを保存します。
- 9 終了したら、[Exit] を選択します。
- 10 サービスソフトウェアを閉じてコントロールソフトウェアを再起動することを要求されたら [Yes] を選択します。
自動でコントロールソフトウェアが再スタートします。

Motion Checks

システムチェック	内容説明
FCLM & FAM	Flow Cell Load Mechanism (FCLM) およびFluidics Automation Module (FAM)のゲインと距離をチェックし、モジュールが正しく動いていることを確認します。
Stage Tests	XYステージとZステージの移動限界、およびパフォーマンスを確認します。

Optics Check

システムチェック	内容説明
Flow Cell Registration	正確な画像位置で、光学面のフローセルの傾きの測定、カメラ機能のテスト、画像モジュールのテスト、フローセルの登録確認をします。

Fluidics Checks

システムチェック	内容説明
Valve Response	バルブとポンプの動きの正確度の確認およびポンプシリンジの可動範囲をテストします。
Pressure Decay	密閉された流路システムの漏れ率を調べ、フローセルがシーケンス位置に適切に取り付けられていることを確認します。
Flow Rate	バブルセンサーの機能を調べ、試薬ラインの空気の検出に使用します。流量を測定し、閉鎖または漏れを確認します。

Thermal Checks

システムチェック	内容説明
Fans	1分当たりのパルス (PPM) でシステムファンのスピードをチェックし、ファンの機能を確認します。ファンが機能しないと、負の値に戻ります。
Thermal Probes	各サーマルセンサーの平均温度を確認します。サーマルセンサーが機能しないと負の値を返します。

ネットワーク構成の設定

インストール中にネットワーク設定を構成します。システムを再構成する必要がある場合は、ネットワーク構成画面で設定を変更するか、設定をリセットすることができます。構成の設定には、IPアドレス、ドメイン名サーバー（DNS）アドレス、ドメイン名が含まれます。

ネットワーク構成の設定

- 1 [Manage Instrument] 画面から、[System Configuration] を選択します。
- 2 [Network configuration] を選択します。
- 3 [Obtain an IP address automatically] を選択し、使用しているDHCPサーバーで使用するIPアドレスを入手します。



注意

Dynamic Host Configuration Protocol (DHCP) は、ネットワーク構成パラメーターを動的に割り当てるための、IPネットワーク上で使用される標準的なネットワークプロトコルです。

もう一つの方法として、[Use the following IP address] を選択し、以下のように装置を手動でもう一方のサーバーに接続します。施設固有のアドレスについてはネットワーク管理者に相談してください。

- ▶ IPアドレスを入力します。IPアドレスは数字4組をドットで区切ったもので、たとえば 168. 62. 20. 37のような番号です。
 - ▶ サブネットマスクを入力します。これはIPネットワークのサブディビジョンです。
 - ▶ デフォルトのゲートウェイを入力します。これはインターネットに接続するネットワークのルーターです。
- 4 [Obtain a DNS server address automatically] を選択し、IPアドレスに関連するドメイン名サーバーに装置を接続します。
もう一つの方法として、[Use the following DNS server addresses] を選択し、以下のように手動でドメイン名サーバーに装置を接続します。
 - ▶ 優先DNSアドレスを入力します。DNSアドレスはドメイン名をIPアドレスに転送するために使用されるサーバー名です。
 - ▶ 代替DNSアドレスを入力します。優先DNSアドレスが、特定のドメイン名をIPアドレスに転送することができない場合は、代替DNSを使用します。
 - 5 [Save] を選択します。

コンピュータドメインの構成



注意

装置のコンピュータ名は、製造時に装置のコンピュータに割り当てられます。コンピュータ名のどのような変更も、接続に影響を及ぼすことがあり、ネットワーク管理者を必要とします。

- 1 以下のように、装置のコンピュータをドメインまたはワークグループに接続してください。
 - ▶ **装置をインターネットに接続する場合**：[Member of domain] を選択し、施設のインターネット接続に関連するドメイン名を入力します。



注意

ドメインの変更には管理者のユーザー名およびパスワードが必要です。

- ▶ 装置をインターネットに接続しない場合：[Member of work group] を選択し、ワークグループ名を入力します。ワークグループ名はユーザーの施設独自のものです。
- 2 [Save] を選択します。

カスタムゲノム

FASTAフォーマットのリファレンスを装置のコンピューターにアップロードすることができます。いくつかのシングルFASTAファイルまたは1つのマルチFASTAファイル（推奨）をアップロードすることが可能ですが、両方を組み合わせることはできません。

カスタムゲノムファイルに関するトラブルシューティングについては、以下の要件を確認してください。

- 1 *.faまたは*.fasta 拡張子を使用しているファイルであること、リファレンス用の専用フォルダにそのファイルを保管していることを確認してください。
- 2 染色体名に以下の記号が含まれていないことを確認してください。
- ? () [] / ¥ = + < > : ; " ' , * ^ | &
最良の結果を得るために、染色体名には英数字のみ使用してください。

装置のシャットダウン

通常の状態では、装置をシャットダウンする理由はありません。

- 1 [Manage Instrument] を選択します。
- 2 [Shutdown options] を選択します。
- 3 [Shut down] を選択します。

コマンドが安全にソフトウェアをシャットダウンし、装置の電源をオフにします。装置を再度オンにする前に少なくとも60秒待ちます。次のシーケンスランの前に洗浄が必要です。



警告

装置を移設しないでください。装置を不適切に移動させると光学アライメントに影響を与え、データの整合性が損なわれることがあります。装置の移設が必要な場合は、イルミナの担当者へお問い合わせください。

Real-Time Analysis

Real Time Analysis概要	64
入力および出力ファイル	65
Real Time Analysisワークフロー	66



Real Time Analysis概要

Real Time Analysisは、装置のコンピューターで実行され、ベースコーリングを実行するため画像から強度を抽出し、次に、クオリティスコアをベースコールに割り当てるソフトウェアです。

MiniSeqシステムはRTA2と呼ばれるReal Time Analysisの実行に使用します。システムコントロールソフトウェアおよびRTA2はウェブのHTTPインターフェイスとメモリーファイルの共有を通して通信します。RTA2を終了すると、処理が再開されず、ランデータは保存されません。

入力および出力ファイル

入力ファイル

Real Time Analysisソフトウェアは、実行に以下の入力が必要です。

- ▶ ローカルシステムメモリに含まれるタイル画像。
- ▶ RunInfo.xmlはラン開始時に自動で作成されるRunInfo.xmlファイルです。ラン名、サイクル数、リードがインデックスされたかどうか、フローセルのタイル数を提供します。

Real Time AnalysisソフトウェアはRunInfo.xmlの場所と、オプションの出力フォルダが指定されているかどうかについてコントロールソフトウェアからコマンドを受け取ります。

出力ファイル

各チャンネルの画像は、タイルとしてメモリで渡されます。タイルは、カメラによる表示のフィールドと定義されるフローセル上の小さなイメージング領域です。これらの画像から、クオリティスコア化されたベースコールファイルとフィルターファイルを一組として出力します。出力ファイルは、BaseSpaceの下流の解析またはLocal Run Manager解析モジュールで使用されます。

ファイルタイプ	内容説明
ベースコールファイル	解析される各タイルは、レーンごと、およびサイクルごとに取りまとめられたベースコール (*.bcl) ファイルに解析された各タイルが入れられます。取りまとめたベースコールファイルにはベースコールおよびそのレーンにある全クラスターの関連するクオリティスコアが入っています。
フィルターファイル	フィルター情報はタイルごとに作成され、1レーンにつき1つのフィルターファイル (*.filter) へと取りまとめられます。フィルターファイルは、クラスターがフィルターを通過するかを指定します。
クラスターロケーションファイル	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に対するX、Y座標が入っています。クラスターロケーションファイルは、テンプレート形成中、各レーンに作成されます。
ベースコールインデックスファイル	ベースコールインデックス (*.bci) ファイルは元のタイル情報を保存するために、レーンごとに作成されます。インデックスファイルには、そのタイルのタイル番号とクラスター数を一組にした数値が含まれます。

RTA2は、InterOpファイルとして保存されるランクオリティのリアルタイムパラメーターを提供します。InterOpファイルは、タイル、サイクル、リードレベルパラメーターを含むバイナリ出力です。Sequencing Analysis Viewerでリアルタイムパラメーターを確認するのに使用します。

Real Time Analysisワークフロー

テンプレート形成	クラスターロケーションのマップ
↓	
レジストレーションと強度抽出	フローセル上の各クラスターの場所を記録し、各クラスターの強度値を決定します。
↓	
フェージングの修正	フェージングとプレフェージングの効果を修正します。
↓	
ベースコーリング	すべてのクラスターのベースコールを決定します。
↓	
クオリティスコアリング	すべてのベースコールにクオリティスコアを割り当てます。

テンプレート形成

RTAワークフローの最初のステップはテンプレート形成です。このステップでは、XとY座標を使用したタイルの各クラスターの位置を定義します。

テンプレート形成にはランの最初の5サイクルからの画像データが必要です。テンプレートサイクルの最後のタイルの画像を取得した後、テンプレートが形成されます。



注意

テンプレート形成中、クラスターを検出するために、最初の5サイクルにG以外の塩基が少なくとも1塩基がある必要があります。

このテンプレートは次のステップのレジストレーションと蛍光強度抽出の参照に使用されます。フローセル全体に対するクラスターの位置は、各レーンに1ファイルずつクラスター位置(*.locs) ファイルに書き込まれます。

レジストレーションと強度抽出

レジストレーションと強度抽出はテンプレート形成後に開始します。

- ▶ レジストレーションはテンプレートに対してその後のすべてのサイクルで作成される画像をアライメントします。
- ▶ 強度抽出では、所定の画像に対するテンプレートの各クラスター強度値を測定します。

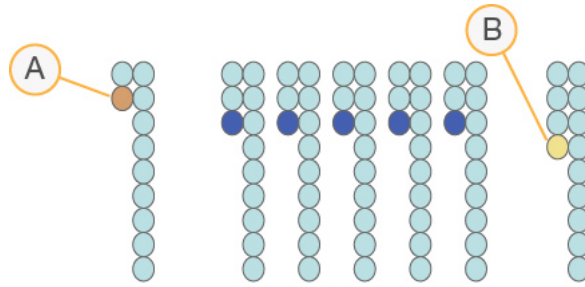
1サイクル中、全ての画像に対してレジストレーションが失敗した場合、強度は抽出されず、全ての塩基が、そのサイクルのタイルに対してNとされます。Sequencing Analysis Viewerを使用して、レジストレーションに失敗したタイルとサイクルを認識します。レジストレーションの失敗は、画像タブのP90カラムの中に0があるタイルおよびサイクルとして簡単に認識されます。

フェージングの修正

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

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

図31 フェージングとプレフェージング



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

RTA2によりフェージングとプレフェージングの影響を修正し、ラン実行中、全てのサイクルでデータ品質を最大限にします。

ベースコーリング

ベースコーリングは、特定サイクルの所定のタイルのすべてのクラスターに関して塩基（A、C、G、またはT）を決定します。MiniSeqシステムでは、2色チャンネルシーケンスを使用し、2つのイメージのみで、4つのDNA塩基のデータをエンコードします。チャンネルは赤と緑です。

別の画像と比較した画像から抽出した強度は、ヌクレオチドにそれぞれ対応する4色の異なる集団によって得られます。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判断します。

図32 クラスター強度の可視化

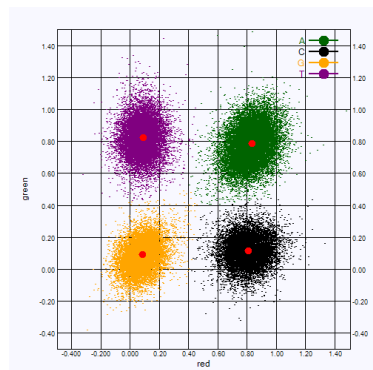


表1 2色チャンネルシーケンス内のベースコール

Base	赤チャンネル	緑チャンネル	結果
A	1 (on)	1 (on)	クラスターは赤と緑のチャンネルで強度を表示。
C	1 (on)	0 (off)	クラスターは赤チャンネルのみで強度を表示。
G	0 (off)	0 (off)	クラスターは既知の場所にある強度なしとして表示。
T	0 (off)	1 (on)	クラスターは緑チャンネルのみで強度を表示。

パスフィルターしたクラスター

ラン中に、RTA2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クラスターを削除します。

2色チャンネル解析では、RTA2は集団ベースシステムを使用して、ベースコールに影響するchastityを判断します。最初の25サイクルに許容できないchastity値が1ベースコールまでしか無かった場合、クラスターはパスフィルター（PF）します。パスフィルターしないクラスターは先のサイクルにベースコールされません。

インデックスの検討

インデックスリードのベースコーリングは、他のリードのベースコーリングと異なります。

インデックスリードは必ず、最初の2サイクルのうちの少なくとも1塩基がG以外で始まる必要があります。インデックスリードがGの2ベースコールで開始した場合、シグナル強度は生成されません。デマルチプレックスの性能を保証するために、シグナルは最初の2サイクルのいずれかに存在する必要があります。

デマルチプレックスの精度を上げるために、すべてのサイクルに少なくとも1チャンネル、可能であれば両チャンネルにシグナルを示すインデックスシーケンスを選択してください。このガイドラインに従い、すべてのサイクルでG塩基のみに生じるインデックスの組み合わせを回避します。

▶ 赤チャンネル：AまたはC

▶ 緑チャンネル：AまたはT

ロープレックスサンプルを解析するとき、このベースコーリングプロセスにより正確性が保証されます。

クオリティスコアリング

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

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

QスコアQ (X)	エラーの可能性
Q40	0.0001 (10,000分の1)
Q30	0.001 (1,000分の1)
Q20	0.01 (100分の1)
Q10	0.1 (10分の1)



注意

クオリティスコアリングはPhredアルゴリズムの修正版に基づきます。

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

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

出力ファイルとフォルダ

シーケンス出力ファイル	70
シーケンス出力フォルダの構成	71
解析入力ファイルの要件	72



シーケンス出カファイル

ファイルタイプ	ファイルの説明、場所、名前
ベースコールファイル	<p>解析した各タイルはサイクルごとに集約されてベースコールファイルに入力されます。集約されたファイルには、各クラスターのベースコールおよびエンコードされたクオリティスコアが含まれます。</p> <p>Data¥Intensities¥BaseCalls¥L001 [サイクル].bcl.bgzf [サイクル] は4桁でサイクル数を表します。ベースコールファイルはブロックgzip圧縮形式で圧縮されています。</p>
ベースコールインデックスファイル	<p>バイナリインデックスファイルは、各タイルにおけるオリジナルのタイル番号とクラスター数の値を一組にした情報をリスト化したものです。</p> <p>ベースコールインデックスファイルは、ベースコールファイルが作成された最初の時間に作成されます。</p> <p>Data¥Intensities¥BaseCalls¥L001 s_ [レーン].bci</p>
クラスターロケーションファイル	<p>各タイルでは、すべてのクラスターのXY座標がクラスターロケーションファイルに集約されます。クラスターロケーションファイルはテンプレート形成の結果です。</p> <p>Data¥Intensities¥L001 s_ [レーン].locs</p>
フィルターファイル	<p>フィルターファイルは、クラスターがフィルターを通過したかを指定します。フィルター情報は各リードのフィルターファイルに集約されます。</p> <p>25サイクル目までデータを用いてサイクル26の時にフィルターファイルが作成されます。</p> <p>Data¥Intensities¥BaseCalls¥L001 s_[レーン].filter</p>
InterOpファイル	<p>Sequencing Analysis Viewerに使用されるバイナリレポートングファイルです。ラン全体を通じてInterOpファイルが更新されます。</p> <p>InterOpフォルダー</p>
RTA Configurationファイル	<p>ランの開始時に作成されるRTA Configurationファイルはランの設定を一覧表示します。</p> <p>[ルートフォルダ]、RTAConfiguration.xml</p>
Run Information	<p>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、さらにフローセル上のスワスとタイルの数を一覧表示します。ラン情報ファイルは、ランの開始時に生成されます。</p> <p>[ルートフォルダ]、RunInfo.xml</p>

シーケンス出力フォルダの構成

コントロールソフトウェアが、自動で出力フォルダ一名を生成します。

- 📁 **Configs**
- 📁 **Data**
 - 📁 **Intensities**
 - 📁 **BaseCalls**
 - 📁 **L001** : ベースコールファイル、サイクルごとに集約
 - 📁 **L001** : *.locs ファイルを集約
 - 📁 **Images**
 - 📁 **Focus**
 - 📁 **L001** : フォーカス画像
- 📁 **InstrumentAnalyticsLogs** : 装置解析ステップを記載したログファイル
- 📁 **InterOp** : シーケンス解析ビューアーで使用されたバイナリファイル
- 📁 **Logs** : 操作ステップを記載したログファイル
- 📁 **Recipe** : 試薬カートリッジIDで名前を付けたラン指定のレシピファイル
- 📁 **RTALogs** : 解析ステップを記載したログファイル
- 📄 RTAComplete.xml
- 📄 RTAConfiguration.xml
- 📄 RunInfo.xml
- 📄 RunNotes.xml
- 📄 RunParameters.xml

解析入力ファイルの要件

Local Run Managerでは、解析を実施または解析を再度待ち行列に入れるためにシーケンスラン中に生成される以下のファイルが必要です。いくつかの解析モジュールには、解析を行うため、追加の入力ファイルが必要です。詳細については、使用している解析モジュールのワークフローガイドを参照してください。

ファイル名/タイプ	内容説明
RTAComplete.txt	RTA処理の終了を示すマーカーファイル。このファイルによりLocal Run Managerが解析をキューに入れます。
RunInfo.xml	シーケンスランのリード数やサイクル数など高レベルなランの情報や、リードがインデックスかが含まれます。
ベースコールファイル (* .bcl)	ベースコールと各タイルのすべてのクラスターをエンコードしたクオリティスコアを含み、サイクルごとのファイルに集約されます。
フィルターファイル (* .filter)	クラスターがフィルターを通過したかを明示します。フィルター情報は各リードのフィルターファイルに集約されます。
クラスターロケーションファイル (* .locs)	各タイルのすべてのクラスターのXY座標を含み、クラスターロケーションファイルに集約します。

- 1
- 1リード内のサイクル 20
- 2
- 2色チャンネル画像 67
- B
- BaseSpace 2
 - 転送アイコン 35
 - ログイン 30
- BaseSpace Broker 35
- BaseSpace構成 30
- C
- chastityフィルター 68
- D
- dbSNPデータベース 10
- I
- InterOpファイル 48, 70
- L
- Local Run Manager 6
- locsファイル 70
- M
- miRbaseデータベース 10
- O
- システムユーザ名およびパスワード 12
- Q
- Qスコア 68
- R
- Real Time Analysisソフトウェア 6
 - 結果 70
- Real-Time Analysis software 2
- RefGeneデータベース 10
- RFID追跡 7
- RTA v2
 - 概要 64
 - 終了 64
- RTA2
 - エラー処理 52
- RunInfo.xml 48, 70
- Real Time Analysis
 - フェージング 66
- Run Copy Service 35
- S
- Sequencing Analysis Viewer 20
- ア
- アイコン
 - エラーと警告 6
 - ステータス 6
- イ
- イメージングコンパートメント 4
- インデックスの検討 68
- エ
- エラーと警告 6
 - 出力ファイルに 52
- エラーの可能性 68
- オ
- オンライントレーニング 3
- カ
- 解析
 - 出力ファイル 70
 - ソフトウェア 6
- 解析, プライマリー
 - シグナル純度 68
- 解析構成 26
- 拡張ロードオプション 13
- カスタマーサポート 77
- 画像, 2色チャンネルシーケンス 67
- キ
- 強度 67
- ク
- クオリティスコア 68
 - Phredアルゴリズム 68
- クラスターの位置
 - テンプレート形成 66
- クラスターの場所
 - ファイル 70
- ケ
- 経験的フェージング 66
- コ
- 更新ソフトウェア 44
- 構成設定 58
- 互換性
 - RFID追跡 7
 - フローセル, 試薬カートリッジ 7
- コントロールソフトウェア 6
- コンポーネント
 - イメージングコンパートメント 4
 - 試薬コンパートメント 4
 - ステータスバー 4

フローセルコンパートメント 4

シ

次亜塩素酸ナトリウム, 洗浄 41
 シーケンスワークフロー 66
 システムチェック 55

試薬

- キット化 7
- 適切に廃棄 27, 31

試薬カートリッジ

- 概要 7
- 準備 23
- リザーバー番号 28 41

試薬コンパートメント 4
 出力ファイル 70
 出力ファイル, シーケンス 70
 消耗品 7

シーケンスラン 17

試薬カートリッジ 7

消耗品の洗浄 41

装置のメンテナンス 17

- フローセル 7
- ユーザーが用意 17
- ラボラトリーグレード水 17

消耗品の清掃 13

ス

ステータス警告 6
 ステータスバー 4
 スタンドアロン構成 28

セ

洗浄

- Manual Post-Run Wash 41
- コンポーネント洗浄 41
- 自動 36
- ユーザーが用意する消耗品 41

ソ

装置

- 構成設定 58
- スタートアップ 12
- 電源ボタン 5

装置管理

- シャットダウン 61

装置のシャットダウン 61

装置の洗浄 41

装置のメンテナンス

- 消耗品 17

ソフトウェア

- イメージ解析 6
- 解析 6
- 更新のチェック 13
- 構成設定 58
- 自動更新 44
- 手動による更新 44
- 装置コントロール 6
- ラン継続時間 20
- 初期化 12

テ

データ転送

- Run Copy Service 35
- アクティビティアイコン 35

データの転送

- BaseSpace Broker 35

テクニカルサポート 77

電源スイッチ 12

電源ボタン 5, 12

テンプレート形成 66

データベース, インストール済み 10

ト

トラブルシューティング

- システムチェック 55
- 低クオリティパラメーター 53
- 問い合わせオプション 48
- ハードドライブスペース 51
- ラン指定ファイル 48
- ラン前チェック 50

ハ

ハードドライブスペース 51

パスフィルター (PF) 68

パスフィルターしたクラスター 68

パラメーター

- 強度サイクル 34
- クラスター密度サイクル 34
- ベースコーリング 67

フ

フィルターファイル 70

フェージング, プレフェージング 66

フォルダの場所 28

プライマリーハイブリダイゼーション 53

フローセル

- 概要 7
- 準備 23
- タイプ 2
- リハイブリダイゼーション 53

フローセルクランプ 4

フローセルコンパートメント 4

文書 3, 77

へ

ベースコーリング 6

- 2色チャンネル 67
- インデックスの検討 68

ベースコールファイル 70

ヘルプ

- 文書 3

ヘルプ, 技術的 77

ホ

ホルムアミド, 位置6 37

メ

メンテナンス, 予防 40

ユ

ユーザーが用意する消耗品 17

ユーザ名およびパスワード 12

ヨ

予防メンテナンス 40

ラ

- ラボラトリグレード水ガイドライン 17
- ラン後の洗浄 36
- ランセットアップ, 拡張オプション 13
- ランパラメーター 34
 - BaseSpaceモード 30
 - スタンドアロンモード 28
 - 編集パラメーター 30
- ラン前チェック 29, 33
- ラン前チェックエラー 50
- ラン所要時間 20

リ

- リード長 20
- リハイブリダイゼーション, リード 1 53
- リファレンスゲノム
 - インストール済み 10
 - カスタムゲノム 60
 - ファイルフォーマット 10

ロ

- ログファイル
 - GlobalLog 52
 - LaneNLog 52

ワ

- ワークフロー
 - BaseSpaceモード 30
 - BaseSpaceログイン 30
 - Standaloneモード 28
 - インデックスの検討 68
 - 解析構成 26
 - 概要 21-22
 - 拡張ロードオプション 13
 - 次亜塩素酸ナトリウム 41
 - シーケンス 66
 - 試薬カートリッジ 23, 27, 31
 - 使用済み試薬 27, 31, 43
 - ラン継続時間 20
 - ランパラメーター 34
 - ラン前チェック 29, 33

テクニカルサポート

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

表2 イルミナ一般問合せ先

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

表3 イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	電話番号	地域	電話番号
北米	1. 800. 809. 4566	台湾	806651752
日本	0800. 111. 5011	中国	400. 635. 9898
アイルランド	1. 800. 812949	デンマーク	80882346
イタリア	800. 874909	ドイツ	0800. 180. 8994
英国	0800. 917. 0041	ニュージーランド	0800. 451. 650
オーストラリア	1. 800. 775. 688	ノルウェー	800. 16836
オーストリア	800. 296575	フィンランド	800. 918363
オランダ	800. 0223859	フランス	800. 91185
シンガポール	1. 800. 579. 2745	ベルギー	800. 81102
スイス	800. 563118	香港	800960230
スウェーデン	20790181	その他の国	+44. 1799. 534000
スペイン	900. 812168		

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

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

