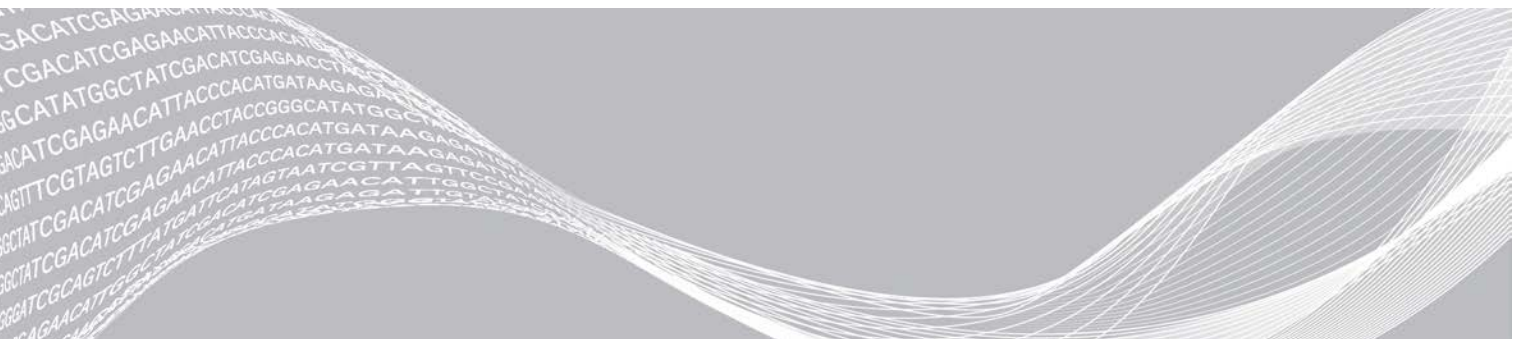


NovaSeq 6000

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

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

本文書に含まれるすべての説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

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

© 2018 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	日付	変更内容
資材番号：20020483 文書番号：1000000019358 v08	2018年 9月	NovaSeq 6000 S4 Kit（200サイクル）の情報を追加。 ユーザーアカウント情報を追加。 シングルセルローディング濃度を追加。 ランの交互スタートの手順を更新。 BaseSpaceのサインインの手順を更新。 プレランチェックの手順を更新。 シャットダウンまたは再起動を承認するための要件に関する注記を追加。 未完了のポストランウォッシュに関する注記を追加。 メンテナンスウォッシュ情報を明確化。 ソフトウェアのアップデート情報を明確化。
資材番号：20020483 文書番号：1000000019358 v07	2018年 4月	シークエンス前の効率化ステップで、試薬を混合するためのライブラリーチューブの使用法を明確化。 消耗品あるいは消耗品のパッケージ上の記号のための記号説明表を追加。 ランセットアップモードのセクションでのIllumina Proactive モニタリングサービスに関する情報を追加。 NovaSeq LIMS APIに関する情報を追加。 NovaSeq Control Software v1.4.0のソフトウェア説明を更新。 S2フローセルの場合のフィルターを通過する通常のリード数を更新。 NovaSeq Xpワークフローの場合の推奨ローディング濃度を更新。 フローセルパッケージの開封手順を更新。 フローセルへのライブラリーのローディング手順を明確化。 メンテナンスウォッシュを開始する装置の利用可能度に関する注意を追加。 交互スタートカウントダウンタイマーに関する情報を追加。 SRP ルールの追加および削除の方法の手順を更新。

文書	日付	変更内容
文書番号：1000000019358 v06	2018年 2月	<p>「フローセル」のセクションに、S1フローセル使用時にはソフトウェアバージョン1.3.1が必須であることの注意を追加。「ライブラリーローディングの方法」の表の説明および標準容量を更新。</p> <p>「試薬キット構成」内に警告を追加。</p> <p>消耗品の表に0.5および1.5 mLのチューブ、20、200、1000 µLピペット用のピペットチップを追加。機器の表にメスシリンダを追加。</p> <p>4章と5章に「フローセルの準備」のセクションを追加し、6章にあった手順をこれらのセクションに移動。</p> <p>4章のS1フローセルの総容積を更新。</p> <p>「ライブラリーのプールプレックス推奨数」の表を4章の「ノーマライズされたライブラリープールの作成」に追加。</p> <p>4章と5章の「SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解」の手順を更新。</p> <p>「フローセルの準備」の融解手順を明確化。</p> <p>「NovaSeq Xpの推奨ローディング濃度」の融解情報を更新。</p> <p>5章の「ノーマライズされたライブラリープールの作成」にある「ライブラリーのプールプレックス推奨数」の表を更新。フローセルはパッケージから取り出してから12時間以内に使用することを明記する文章を「NovaSeq Xpワークフローの要約」および「フローセルの準備」に追加。</p>
文書番号：1000000019358 v05	2017年 12月	<p>シーケンスワークフローの図中に、Xpの空のライブラリーチューブについて明確化する情報を追加。</p> <p>標準ワークフローの場合の変性ライブラリーおよびオプションのPhiXコントロールにおける、ステップ5の表中のTris-HClの分量を更新。</p> <p>NovaSeq Xpワークフローの場合のExAmpマスターミックスの調製の部分に、最善の結果のためにボルテックスする必要があることを示す注意をステップ4の後に追加。</p> <p>NovaSeq Xpワークフローの場合のフローセルへのライブラリーのロードの部分に、サンプルをゆっくりとロードすることの確認をステップ3の後に追加。</p>
資材番号：20023471 文書番号：1000000019358 v04	2017年 10月	<p>装置機能一覧に個々のレーンへのローディングについて追加。</p> <p>消耗品：NovaSeq Xp 2-Lane KitおよびNovaSeq Xp 4-Lane Kitを追加。NovaSeq Xp 2-Lane Manifold PackおよびNovaSeq 4-Lane Manifold Packを追加。</p> <p>機器：NovaSeq Xpワークフロー用のNovaSeq XpフローセルドックおよびP200ピペットを追加。</p> <p>NovaSeq Xpワークフロー用の「消耗品の準備」の章を追加。</p> <p>廃液ボトルを空にするの内容をシーケンスの章からNovaSeq標準ワークフローおよびNovaSeq Xpワークフローの章の開始部分に移動。</p> <p>標準ワークフローの場合のライブラリーのプールの濃度表および推奨ローディング濃度の表を更新。</p>

文書	日付	変更内容
資材番号：20020483 文書番号：1000000019358 v03	2017年 9月	<p>S1およびS4フローセルのサポートを含むNovaSeq Control Software v1.2のソフトウェアの説明を更新。</p> <p>S1およびS4フローセルのデュアルフローセルのランに必要な空きディスクの要件を追加。</p> <p>いくつかの*.jsonファイルのファイル命名要件を指定。</p> <p>「キットおよびアクセサリー」の章のキット概要の情報を再編成。この章では、試薬およびライブラリーローディングキットの構成、構成品ならびに適合性ラベリングについて説明。</p> <p>ユーザーが用意する消耗品に、NovaSeq 6000 Reagent Kitを追加。</p> <p>S1およびS4フローセルの情報を含めるため、ライブラリーのプールおよび変性の説明を更新。</p> <p>S1およびS2用2時間水槽、およびS4用4時間水槽を必要とする試薬カートリッジの融解方法を更新。</p> <p>S4構成品を含めるため、ライブラリーチューブ、試薬カートリッジおよびフローセルの説明を更新。</p> <p>自動ソフトウェアアップデートのセクションを「メンテナンス」章に追加。</p> <p>参照先を『Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint』（出版番号：970-2012-013）から『NovaSeq Series and HiSeq X Ten Data Quality Comparison』（出版番号：770-2017-010）に変更。</p> <p>6章のランパラメーターの入力のステップ3に注意を追加。</p> <p>S1およびS4のタイトル情報を記載するため、「フローセルタイトル」セクションを更新。</p>

文書	日付	変更内容
資材番号：20018871 文書番号：1000000019358 v02	2017年 4月	以下の情報を追加： <ul style="list-style-type: none"> • ランに必要なイルミナ提供の消耗品。 • 試薬キット構成品の保存条件。 • ライブラリーローディング濃度の推奨値。 • 2フローセル用のNaOHの希釈液。 • ローディング前にフローセルを室温に戻すためのステップ。 • 廃液ボトルを空にした後の手袋交換のステップ。 • サードパーティLIMSシステムのためのLIMSアウトプットの設定。 • サンプルシートの命名規則。 • Process Managementアイコンおよびトラブルシューティング。 • Windowsセキュリティ機能および設定手順を記載した付録。 • テクニカルサポートのための連絡先情報。 試薬カートリッジ融解時間を4時間に増加。 1% PhiXの添加分量を0.9 μ Lに変更し、10 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて10 nM PhiXを希釈するようにPhiX添加手順を変更。 微粒子が目視可能な場合のみの、フローセルおよびフローセルステージの清掃手順の更新。 メンテナンスウォッシュの頻度を14日おきに変更。 連続性を改善するための、消耗品の準備手順の再編成および統合。 フレンチドアを液体コンパートメントドアに改名。
資材番号：20018406 文書番号：1000000019358 v01	2017年 3月	[Process Management] 画面の列名をSequencingに修正。
資材番号：20015871 文書番号：1000000019358 v00	2017年 2月	初版リリース

目次

第1章 概要	1
はじめに	1
追加リソース	2
シーケンス概要	2
シーケンスワークフロー	3
装置のコンポーネント	5
第2章 キットおよびアクセサリー	11
キット概要	11
試薬キット構成	12
NovaSeq Xp Kitの構成	16
NovaSeq Xpフローセルドック	16
記号説明	17
第3章 はじめに	19
装置の起動	19
設定	20
ユーザーが用意する消耗品および機器	25
第4章 標準ワークフロー：消耗品の準備	29
方法	29
ライブラリーのガイドライン	29
SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解	29
廃液ボトルを空にする	30
フローセルの準備	31
シーケンスのためのライブラリーのプールおよび変性	32
第5章 NovaSeq Xpワークフロー：消耗品の準備	36
NovaSeq Xpワークフローの要約	36
方法	37
ライブラリーのガイドライン	37
SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解	38
廃液ボトルを空にする	38
フローセルの準備	39
シーケンスのためのライブラリーのプール、変性、およびロード	40
第6章 シーケンス	48
シーケンスランのセットアップ	48
ランの進捗状況のモニタリング	54
ランの交互スタート	55
ランの削除	55
位置番号30の取り外し	56
自動ポストランウォッシュ	57

第7章 メンテナンス	58
Preventive Maintenance (PM)	58
メンテナンスウォッシュの実施	58
ソフトウェアのアップデート	61
付録A トラブルシューティング	63
トラブルシューティングリソース	63
トラブルシューティングファイル	63
プレランチェックのエラー	63
Process Managementのトラブルシューティング	64
クラスタリング前のラン失敗	65
ランの強制終了	66
装置のシャットダウン	66
付録B Real-Time Analysis	67
Real-Time Analysis概要	67
Real-Time Analysisワークフロー	69
付録C 出力フォルダーとファイル	72
シーケンス出力フォルダーの構成	72
シーケンス出力ファイル	72
付録D Windowsセキュリティ	74
セキュリティ設定	74
パスワード要件	74
Windowsファイアウォール	74
Enhanced Mitigation Experience Toolkit	74
ソフトウェア制限ポリシー	75
索引	78
テクニカルサポート	84

第1章 概要

はじめに	1
追加リソース	2
シーケンス概要	2
シーケンスワークフロー	3
装置のコンポーネント	5

はじめに

Illumina® NovaSeq™ 6000シーケンサーシステムは、高効率で経済性を備えたベンチトップシステムであり、生産規模のプラットフォームとしてスループットの拡張性およびシーケンステクノロジーの柔軟性を兼ね備えています。

機能

- ▶ **拡張性のあるシーケンス**：NovaSeq 6000は、広範なアプリケーションのための高品質データを生産レベルシーケンスまで拡張することができます。
- ▶ **調整可能な出力**：NovaSeq 6000は広い出力範囲に対応できるデュアルフローセルシステムです。フローセル1枚でのシーケンスや、フローセル2枚で異なるリード長の同時シーケンスができます。3種類のフローセルと異なったリード長の組み合わせでシーケンス可能です。
- ▶ **整列化フローセル**：整列化フローセルにより、スペース効率の高いクラスターが形成されます。ナノウェル間の距離を短縮したことで、クラスター密度およびデータ出力を増加させることができます。
- ▶ **機器上でExAmp試薬混和**：NovaSeq 6000は、機器上でExAmp試薬とライブラリーを混和、増幅、およびクラスター形成することで、効率化されたシーケンスワークフローを実現します。
- ▶ **個々のレーンへのローディング**：NovaSeq Xpフローセルドックを用いることで、フローセルの個々のレーンへのライブラリーの事前ローディングが可能なため、ライブラリーのローディング量を削減できます。
- ▶ **ハイスループットラインスキャン**：NovaSeq 6000は、2色チャンネル同時でのフローセルの迅速な画像取得を可能にするため、双方向スキャンテクノロジーを搭載したカメラを採用しました。
- ▶ **Real-Time Analysis(RTA)**：NovaSeq 6000はRTA3と呼ばれるRTAを実行します。この統合ソフトウェアは画像解析とベースコールを行います。
- ▶ **BaseSpace™ Sequence Hub integration**：シーケンスワークフローはデータの解析、保管および共有を行うために、イルミナゲノミクス計算環境であるBaseSpace Sequence Hubで統合されます。ランの進行とともに、出力ファイルはリアルタイムでこの環境に転送されます。
- ▶ **BaseSpace Clarity LIMS対応**：サンプルと試薬のエンドツーエンドのトラッキング、ワークフローの自動化、装置操作の統合により、効率性が向上します。

追加リソース

イルミナウェブサイトの[NovaSeq 6000 Sequencing System サポートページ](#)に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、互換性のある製品、および以下の文書が含まれます。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 』	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、解析手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。
『 NovaSeq Series Site Prep Guide 』 (文書番号：1000000019360)	ラボスペース、電源要件、および環境とネットワークの考慮点に関する仕様を示します。
『 NovaSeq Series Safety and Compliance Guide 』 (文書番号：1000000019357)	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 Compliance Guide 』 (文書番号：1000000002699)	装置のRFIDリーダーについて、コンプライアンス認証、安全検討事項などの情報を提供します。
『 NovaSeq Series Custom Primers Guide 』 (文書番号：1000000022266)	イルミナシーケンスプライマーをカスタムシーケンスプライマーに変更する際の情報を提供します。

シーケンス概要

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すると同時に増幅されてクラスターを形成します。標準ワークフローの場合、ExAmpマスターミックスはクラスター形成前に装置上でライブラリーと混合されます。NovaSeq Xpワークフローの場合、ExAmp試薬およびライブラリーは装置外で混合され、フローセルに送液されます。分量はフローセルタイプとワークフローにより異なります。

シーケンス

クラスターは双方向スキャンおよび2色チャンネルシーケンスケミストリーを用いてイメージングされます。カメラは赤色光と緑色光を検出するセンサーを用いて、各スワスをイメージングし、同時に全体のスワスの赤色イメージと緑色イメージを生成します。イメージング後、各クラスターの緑色シグナルに対する赤色の比率に基づいた（整列化フローセルにより決定された位置に基づく）各タイル内のクラスターについて、ベースコーリングが行われます。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。

解析

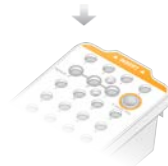
ラン実行中に、データ解析のために、NovaSeq Control Software (NVCS) が自動的にベースコール (*.cbcl) ファイルを指定の出力フォルダーの場所に転送します。

アプリケーションに応じて、複数の解析方法が利用できます。詳細については、[イルミナウェブサイトの BaseSpace Sequence Hub サポートページ](#)を参照してください。

シーケンスワークフロー



SBSカートリッジ およびクラスター試薬カートリッジを融解します。



ライブラリーのプールおよび変性をします。標準ワークフローの場合は、ライブラリーをライブラリーチューブに添加します。NovaSeq Xpワークフローの場合は、ExAmp/ライブラリーミックスをフローセルにロードします。いずれのワークフローの場合も、ライブラリーチューブを融解済みのクラスターカートリッジにロードします。



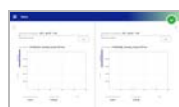
ソフトウェアインターフェースで **[Sequence]** を選択し、デュアルまたはシングルフローセルランを指定します。



前回のランの消耗品を取り出し、実行するラン用の新しい消耗品をロードします。



[Run Setup] 画面でランパラメーターを指定します。BaseSpace Sequence Hubが設定されている場合は、[Log In] 画面からサインインします。プレランチェックが終了すると、ランは自動的に開始します。



ランのモニタリングは、[Sequence] 画面から、ランのモニタリングが有効な場合はBaseSpace Sequence Hubから、あるいはSequencing Analysis Viewerを使ってネットワークコンピューターから行います。データは、指定した出力フォルダーに転送されます。



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。

ライブラリーローディングの方法

ライブラリーは、選択したワークフローに応じた次の2つの方法のうちの1つを用いて、NovaSeq 6000フローセルにロードされます。シーケンスランのセットアップは、ワークフローによって異なります。選択した方法の手順に必ず従ってください。29ページの「標準ワークフロー：消耗品の準備」および36ページの「NovaSeq Xpワークフロー：消耗品の準備」を参照してください。

表1 ライブラリーローディングの方法

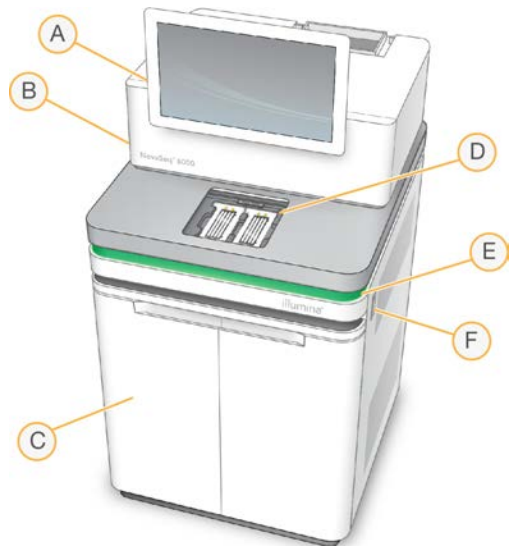
ワークフロー	ライブラリーのプールのローディングおよびExAmp混合手法	個々のレーンのアドレス可能性およびデータ解析	ローディング量* S1-S2-S4モード (μL)
標準	単一のライブラリーのプールはライブラリーチューブにロードされ、ライブラリーチューブ内で装置上のExAmp試薬と混合され、クラスタリングおよびシーケンスのために、フローセルに自動送液されます。シーケンス前の効率化ステップでは、クラスターカートリッジおよびライブラリーチューブ中の試薬を用いて、クラスタリング効率向上を支援するコンディショニングミックスが調製されます。	単一のライブラリーのプールはフローセルの全レーンで分注およびシーケンスされます。レーンすべてのリードは集約されて分析されます。	150-225-465 μL (フローセル全体)
NovaSeq Xp	1つまたは複数のライブラリー（ライブラリー数はフローセルレーン数に相当）が、装置外でExAmp試薬と手動で混合され、NovaSeq Xpフローセルドックを用いて、フローセルの個々のレーンに直接ロードされます。その後、充填済みのフローセルは、クラスタリングおよびシーケンスのために装置にローディングされます。シーケンス前の効率化ステップでは、空のライブラリーチューブを用いて、クラスターカートリッジ内の試薬を混合し、クラスタリング効率向上を支援するコンディショニングミックスが調製されます。	ライブラリーはそれぞれ、フローセルの個別のレーンにロードされた後、シーケンスされます。異なるプール、同じプールの部分標本、または任意の組み合わせを使用することができます。異なるレーンからのリードは、個々にまたは集約して、しかるべく解析されます。	27-33-45 μL (各レーン)

*NovaSeq Xpワークフローでは、標準ワークフローと比較して、25~50%低い濃度の変性されたライブラリーが必要です。

装置のコンポーネント

NovaSeq 6000シーケンサーシステムには、タッチスクリーンモニター、ステータスバー、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。

図1 外部コンポーネント



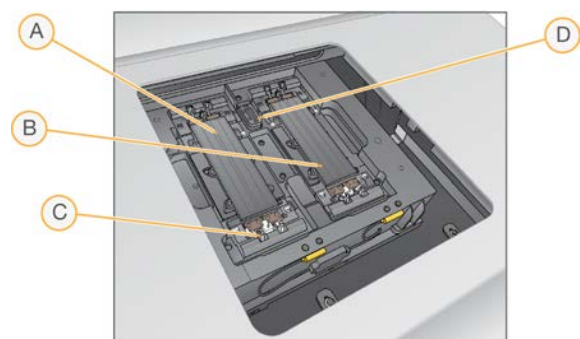
- A **タッチスクリーンモニター**：システム構成とランセットアップおよびモニタリング用のNVCSインタフェースを表示します。
- B **光学コンパートメント**：フローセルのデュアルサーフェスイメージングを可能にする光学的構成物が入っています。
- C **液体コンパートメント**：試薬、バッファーおよび廃液ボトルが入ります。
- D **フローセルコンパートメント**：フローセルが保持されます。
- E **ステータスバー**：フローセルステータスを示し、シーケンス準備完了は緑、処理中は青、注意が必要な場合はオレンジになります。
- F **電源とUSBポート**：電源ボタンおよび周辺の機器とのUSB接続ができます。

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があり、左側にフローセルA、右側にフローセルBを保持します。各側にフローセルを自動的に配置し固定するためのクランプが4個あります。

フローセルステージに搭載された光学アライメントターゲットにより、光学上の問題は診断され補正されます。NVCSのプロンプトが表示されたら、光学アライメントターゲットはシステムを再調整しカメラのフォーカスを調節して、シーケンス結果を向上させます。

図2 フローセルステージ



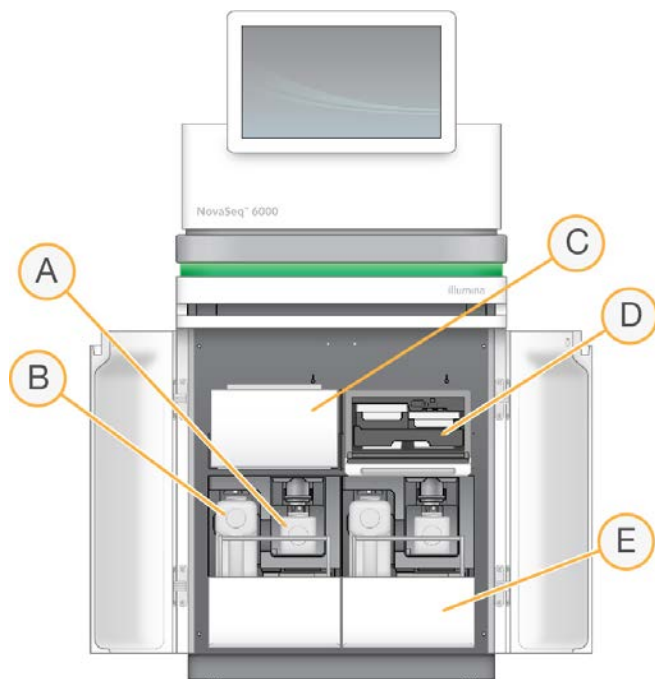
- A フローセルホルダー-A
- B フローセルホルダー-B
- C フローセルクランプ (片側当たり4個中の1個)
- D 光学アライメントターゲット

フローセルコンパートメントのドアの開閉は、ソフトウェアによって制御されます。ドアは、ランまたはメンテナンスウォッシュの際にフローセルをロードするために自動的に開きます。ローディング後、コンパートメントドアが閉じ、フローセルが所定の位置に移動して、クランプおよびバキュームシールが適用されます。センサーにより、フローセルの存在および互換性が確認されます。

液体コンパートメント

ランをセットアップするには、液体コンパートメントにアクセスして試薬およびバッファーをロードし、廃液ボトルを空にする必要があります。液体コンパートメントは2つのドアにより開閉でき、フローセルAおよびフローセルB用に2分割されています。

図3 液体コンパートメントのコンポーネント



- A 廃液ボトル (小) : クラスターカートリッジの使用済みの試薬が入ります。簡単に保管できるようにキャップホルダーが付いています。
- B 廃液ボトル (大) : SBSカートリッジとバッファーカートリッジの使用済みの試薬が入ります。簡単に保管できるようにキャップホルダーが付いています。
- C 試薬チラー : SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジを保冷します。
- D 試薬チラー引き出し : 色分けされた位置で、左側 (灰色ラベル) にSBSカートリッジを保持し、右側 (オレンジラベル) にクラスターカートリッジを保持します。
- E バッファー引き出し : 左側に廃液ボトル (大) を保持し、右側にバッファーカートリッジを保持します。

使用済み試薬

流路システムは廃液ボトル (小) に、危険性のあるクラスターカートリッジ試薬を送液するよう設計されています。SBSカートリッジとバッファーカートリッジからの試薬は廃液ボトル (大) に送液されます。しかし、使用済み試薬の流れの間でクロスコンタミネーションが生じるおそれがあります。安全のため、両方の廃液ボトルに、危険性のある化学物質が含まれるとみなします。安全データシート (SDS) に詳細なケミストリー情報が記載されています。



注意

使用済み試薬を外部に送液するようにシステムが設定されている場合、廃液ボトル (大) への流れは外部に向けられます。クラスターカートリッジ試薬は、常に廃液ボトル (小) に入ります。

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。





- ▶ **NovaSeq Control Software (NVCS)** : シーケンスランのセットアップ、装置オペレーションの制御、およびランの進行中の統計値の表示をする手順をガイドします。消耗品の正しいアンロードおよびローディング方法を示すために、NVCSではランセットアップ中に説明ビデオが再生されます。
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : ラン実行中にイメージ解析およびベースコーリングを実施します。NovaSeq 6000では、最適な性能を発揮するためのアーキテクチャー、セキュリティを始めとした機能強化が行われているRTA3を用います。詳細については、[67ページの「Real-Time Analysis」](#)を参照してください。
- ▶ **Universal Copy Service (UCS)** : ラン全体にわたり、RTA3およびNVCSの出力ファイルを出力フォルダーにコピーします。該当する場合、このサービスによりBaseSpace Sequence Hubにもデータが転送されます。Universal Copy Serviceがラン中に中断された場合、本サービスは数回にわたり再接続を試み、自動でデータ転送を再開します。

ステータスアイコン

NVCSインタフェース上のステータスアイコンはランステータスを示します。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化すると、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。

表2 NVCSステータスアイコン

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。
	警告	警告が発せられたので、注意が必要です。 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。

Process Management

この [Process Management] 画面からCompute Engine (CE) やハードドライブ (C:\) にアクセスすることができます。この画面でランの進捗状況モニタリングやランの削除以外にディスクスペースの管理ができます。C:ドライブからファイルやフォルダーを直接削除しないでください。

[Process Management] には、利用可能なディスクスペース、CEとC:ドライブ上での使用済みスペース、およびディスクスペースを使用中のランのステータスが表示されます。[Run Date] と [Name] 列で各ランを特定します。[Run Status]、[BaseSpace]、および [Network] 列にはランの各プロセスのステータスが表示されます。

表3 Process Managementステータスアイコン

プロセスの概要	アイコン	内容説明
ランステータス	 Running	ランが実行中です。
	 Complete	ランのシーケンスが終了しました。
ネットワーク	 Copying	ファイルがネットワーク上の出力フォルダーにコピーされています。
	 Complete	ファイルはすべてネットワーク上の出力フォルダーにコピーされました。
	N/A	ランがネットワーク上の出力フォルダーにアップロードするよう設定されていないか、アップロードステータスが不明なため、該当しません。トラブルシューティングに関しては、64ページの「Process Managementのトラブルシューティング」を参照してください。
BaseSpace	 Uploading	ファイルがBaseSpace Sequence Hubにアップロードされています。
	 Complete	ファイルはすべてBaseSpace Sequence Hubにアップロードされました。
	N/A	ランがBaseSpace Sequence Hubにアップロードするよう設定されていないか、アップロードステータスが不明なため、該当しません。トラブルシューティングに関しては、64ページの「Process Managementのトラブルシューティング」を参照してください。

フローセルランが開始される前に、CEとC:\に必要な最小領域を満たされなければなりません。



注意

シングルフローセルランの場合に必要な最小空き容量は以下の表に示されるものの半分です。

表4 デュアルフローセルラン用のCEとC:\に必要な最小空き容量

フローセル	サイクルごとの必要CE空き容量	フローセルペアごとの必要C:\空き容量
S1	1.35 Gb	20 Gb
S2	2.7 Gb	20 Gb
S4	4.3 Gb	40 Gb

ラン用にCEに必要な空き容量の総合計を計算するには、「サイクルごとの必要CE空き容量」の下にリストされた値に、リード1、リード2、インデックス1、およびインデックス2の長さの値の合計を掛けます（52ページの「ランパラメーターの入力」を参照）。例えば、ペアエンド150サイクル、デュアルフローセルのS4ランで両インデックスが8塩基長の場合、必要CE空き容量は、 $(151 * 2 + 8 * 2) * 4.3 = 1.37 \text{ Tb}$ になります。

ディスクスペースの消去については、55ページの「ランの削除」を参照してください。

第2章 キットおよびアクセサリー

キット概要	11
試薬キット構成	12
NovaSeq Xp Kitの構成	16
NovaSeq Xpフローセルドック	16
記号説明	17

キット概要

NovaSeq 6000システムでランを行うには、NovaSeq 6000 Reagent Kitが必要です。NovaSeq Xpワークフローには、さらにNovaSeq Xp Kitが必要です。これらのキットは以下の構成で利用可能です。

ランに必要なアイテムリスト完全版は、25ページの「ユーザーが用意する消耗品および機器」を参照してください。



表5 キット構成


キット名	イルミナカタログ番号
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300サイクル)	20012866
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (200サイクル)	20027466
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (300サイクル)	20012860
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (200サイクル)	20012861
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (100サイクル)	20012862
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (300サイクル)	20012863
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (200サイクル)	20012864
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (100サイクル)	20012865
NovaSeq Xp 2-Lane Kit	20021664
NovaSeq Xp 4-Lane Kit	20021665

適合性ラベリング

適合するキット構成を特定するため、フローセルおよびカートリッジにはキットモードを示す **S1**、**S2**、**S4**、または**SP**の記号ラベルがついています。NovaSeq Xp マニフォールドは複数のモードをサポートし、2レーン（S1およびS2フローセルの場合）または4レーン（S4フローセルの場合）のいずれかのラベルが付けられています。

異なるモードの構成は、同一ランの中では用いることができません。例えば、S1用カートリッジとS2用フローセルをペアで使用できません。

キットモード	ラベルのマーク表示	内容説明
S1キット構成		S1フローセルでは、リード長2 × 150 bpで最大500 Gbのデータ出力でフィルターを通過するシングルリードを最大16億産出します。S1キットでは、ハイスループットアプリケーションの大半のためのサンプル量のより少ない高速シーケンスを行うことができます。
S2キット構成		S2フローセルでは、リード長2 × 150 bpで最大1250 Gbのデータ出力でフィルターを通過するシングルリードを最大41億産出します。また、S2フローセルは最もハイスループットのアプリケーションでS1フローセルより多数のリード数および迅速シーケンスを提供し、より多いシーケンスデータを出力します。

キットモード	ラベルのマーク表示	内容説明
S4キット構成		S4フローセルでは、2 × 150 bpで最大3000 Gbの出力でフィルターを通過するシングルリードを最大100億産出します。S4フローセルは、最大出力用に設計された4レーンバージョンのフローセルです。幅広い種やカバレッジ深度で費用効果の高い全ゲノムシーケンスを実現します。

各モードの詳細仕様については、イルミナウェブサイトの[NovaSeq用試薬キット製品ページ](#)を参照してください。

試薬キット構成

各NovaSeq 6000 Reagent Kitには以下の構成が含まれています。各構成には、消耗品の正確なトラッキングおよび適合性のために、RFID（無線自動識別）タグが用いられています。

キットを受け取ったら、適切な性能を保証するため、構成を指定の温度で保管します。

表6 キット構成

数量	キット構成	保存温度
1	ライブラリーチューブ	15°C～30°C
1	フローセル	2°C～8°C
1	バッファカートリッジ	15°C～30°C
1	クラスターカートリッジ	-25°C～-15°C
1	SBSカートリッジ	-25°C～-15°C



警告

カートリッジを落とさないこと。落下により負傷する可能性があります。試薬がカートリッジから漏れた場合、皮膚刺激が生じる場合があります。カートリッジは使用前に亀裂がないことを点検してください。

ライブラリーチューブ

NovaSeq 6000ライブラリーチューブは、クラスターカートリッジの位置番号8に入る16 mmのチューブです。位置番号8は **[Library Tube]** とラベル付けされており、オレンジの輪で容易に識別できます。このチューブには、必要な場合にライブラリーの保管ができるよう、ねじ式のキャップが付いています。クラスターカートリッジへのロード前に、キャップが取り外されていることを確認してください。

図4 ライブラリーチューブ



ライブラリーチューブはワークフローに応じて2つのうちの1つの方法で用います。

- ▶ **標準**： プールおよび変性されたライブラリーはライブラリーチューブに添加された後、キャップを外してクラスターカートリッジにロードされます。ラン開始後、ライブラリーは装置によってライブラリーチューブの中でExAmp試薬と混合された後、フローセルに自動移送されます。
- ▶ **NovaSeq Xp**： 空でキャップの外されたライブラリーチューブがクラスターカートリッジにロードされます。試薬はラン中にライブラリーチューブ内で混合されてから、フローセルに分注されます。

フローセル

NovaSeq 6000フローセルはカートリッジ内に封入された整列化フローセルです。このフローセルは、規則正しく配置された数十億のナノウェルを含むガラス基板です。これにより、出力リード数およびシーケンスデータ量が増加します。クラスターは後にシーケンスが起きるナノウェル内で形成されます。

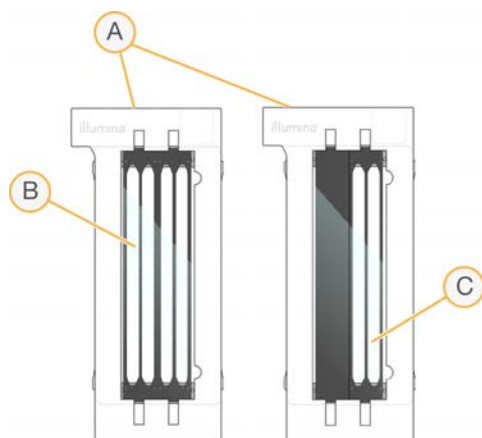
各フローセルには、プールされたライブラリーシーケンス用レーンが複数ついています。S1およびS2フローセルには各2レーン、S4フローセルには4レーンついています。各レーンは複数のスワスに分けてイメージングされます。その後、ソフトウェアにより、各スワスのイメージがタイルと呼ばれる小さな部分に分割されます。詳細については、[68ページの「フローセルタイル」](#)を参照してください。



注意

S1フローセルを用いる場合、NVCS v1.3.1またはそれ以降の使用を確認してください。

図5 フローセル



- A フローセルカートリッジ
- B 4レーンフローセル (S4)
- C 2レーンフローセル (S1およびS2)

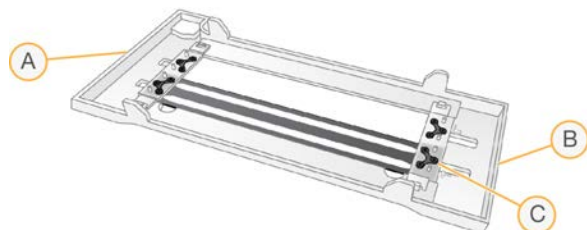
各フローセルの裏側には4つのガスケットがついています。ライブラリーおよび試薬はフローセル注入口のガスケットを通り、フローセルレーンに進入します。使用済みの試薬はレーンから排出口のガスケットを通過して放出されます。



注意

フローセルを扱う際は、ガスケットに触れないでください。

図6 フローセル裏側





- A 排出口
- B 注入口
- C ガスケット (4個中の1個)


バッファー、クラスター、およびSBSカートリッジ

NovaSeq 6000のバッファーカートリッジ、クラスターカートリッジ、およびSBSカートリッジには、試薬、バッファー、および洗浄溶液があらかじめ充填されたホイルシールリザーバーが用意されています。各カートリッジタイプのうちの1つには試薬キットが含まれています。

カートリッジは装置に直接ロードでき、ローディングエラーを軽減するために色分けされ、ラベル付けされています。試薬チラーおよびバッファー引き出しのガイドにより、正しい方向に確実に動かすことができます。

表7 試薬カートリッジ

カートリッジ	内容説明
<p>NovaSeq 6000バッファーカートリッジ</p> 	<p>シーケンスバッファーがあらかじめ充填されており、重量は最大6.8 kg (15 lbs) です。プラスチック製のハンドルがあり、運搬やローディング、アンローディングに役立ちます。トッププレート内の刻み目を使って、カートリッジを積み上げることができます。</p>
<p>NovaSeq 6000クラスターカートリッジ</p> 	<p>クラスタリング試薬、インデックス試薬およびペアエンド試薬が、洗浄溶液と同様にあらかじめ充填されています。ライブラリーチューブの専用位置があります。クラスターカートリッジは、オレンジラベルでSBSカートリッジと区別することができます。</p>

カートリッジ	内容説明
 <p>NovaSeq 6000 SBSカートリッジ</p>	<p>キットがサポートするサイクル数（300、200、あるいは100）に合った分量のシーケンス試薬があらかじめ充填されています。3つの試薬位置にそれぞれ隣接している位置は、自動ポストラッシュのためのもので、SBSカートリッジはグレイのラベルでクラスターカートリッジと区別することができます。</p>

クラスターカートリッジリザーバー

取り外し可能リザーバー

位置番号30の変性試薬はホルムアミドを含んでおり、これは有機アミド化合物で生殖毒性があります。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。



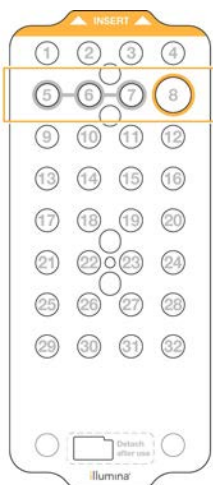
注意

クラスターカートリッジの上にSBSカートリッジを積み上げないでください。位置番号30が外れるおそれがあります。

指定のリザーバー

カスタムプライマー用の予備として3つのリザーバーが、ライブラリーチューブ用として空の位置1つが確保されます。サンプルのトレーサビリティのために、ライブラリーチューブがランセットアップ中にクラスターカートリッジにロードされ、ラン終了までカートリッジに留まります。

図7 番号がふられたリザーバー



位置	用に確保
5、6、7	オプションのカスタムプライマー
8	ライブラリーチューブ

カスタムプライマーについては、『NovaSeq Series Custom Primers Guide』（文書番号：1000000022266）を参照してください。

NovaSeq Xp Kitの構成

NovaSeq Xp Kitはそれぞれ使い捨てで、次の構成品を含みます。キットを受け取ったら、適切な性能を保証するため、構成品を指定の温度で保管します。

表8 NovaSeq Xp Kitの構成

数量	キット構成	保存温度
1	DPX1	-25°C~-15°C
1	DPX2	-25°C~-15°C
1	DPX3	-25°C~-15°C
1	NovaSeq Xp マニフォールド	キットと共に静置するか室温で保管してください。

DPX1、DPX2、およびDPX3試薬

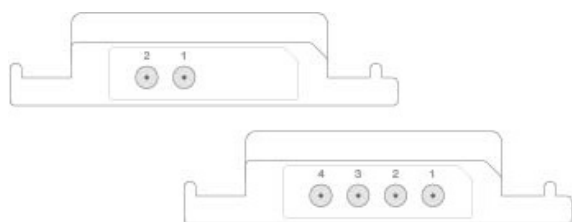
DPX1、DPX2、およびDPX3はNovaSeq Xpワークフロー用の個々のチューブ内に供給されるExAmp試薬です。これらの試薬を混合することで、ExAmpマスターミックスが作成され、ライブラリーのプールと混合した後、フローセルにロードされます。

NovaSeq Xp マニフォールド

NovaSeq Xp マニフォールドがNovaSeq Xp フローセルドックに配置されることで、個々のフローセルレーンにライブラリーのプールを直接ローディングすることができます。NovaSeq Xp マニフォールドの両側のアームは、ドック上に容易に配置できるように設計されています。

NovaSeq Xp マニフォールドは2ウェルおよび4ウェルの設定で提供されており、2レーンおよび4レーンのフローセルに合わせるすることができます。各ウェルが1つのフローセルレーンに対応します。フローセルはNovaSeq Xp フローセルドックに倒置されてロードされるため、ウェルは右から左に採番され、倒置されたフローセルのレーン番号と一致するようになっています。

図8 NovaSeq Xp マニフォールドおよび採番されたウェル

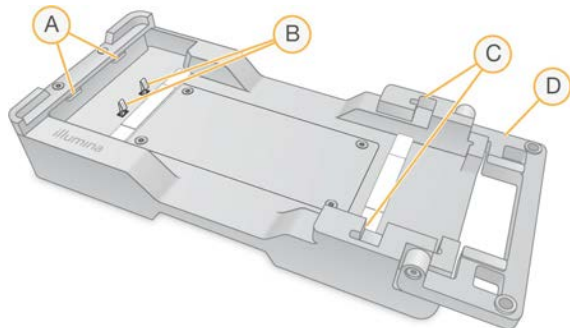


NovaSeq Xp フローセルドック

NovaSeq Xp フローセルドックは、ライブラリーをフローセルに直接ロードするための再利用可能なアクセサリです。フローセルは倒置されてドックにロードされ、NovaSeq Xp マニフォールドはフローセル上にはめ込まれます。

2つのオーバーハング（ブラケットの下）および2つのスプリングがフローセルの挿入をガイドし、確実に適切な方向に向けます。カットアウトにより、NovaSeq Xp マニフォールドアームは適切な方向を向き水平に保持されます。磁気クランプは180°回転でき、フローセル上部にNovaSeq Xp マニフォールドを固定します。

図9 NovaSeq Xpフローセルドック



- A ローディングをガイドするオーバーハング（ブラケットの下）
- B フローセルの位置合わせのためのスプリング
- C NovaSeq Xpマニフォールドアームを固定するカットアウト
- D フローセルとNovaSeq Xpマニフォールドを固定するクランプ

記号説明

次の表は消耗品または消耗品のパッケージに関する記号を記載しています。

記号	内容説明
	消耗品の使用期限。最良の結果を得るには、この日付以前の消耗品を使用してください。
	製造者（イルミナ）を示します。
	使用目的は研究に限定されます（RUO）。
	消耗品を識別することができる部品番号を示しています。 ¹
	消耗品が製造されたバッチまたはロットを特定するためのバッチコードを示しています。 ¹

記号	内容説明
	<p>シリアルナンバーを示します。</p>
	<p>光または熱からの保護が必要なことを示します。日光から遠ざけて保管してください。</p>
	<p>健康に有害であることを示しています。</p>
	<p>危険性の警告を示します。</p>
	<p>保存温度はセ氏温度の範囲です。示した範囲内で消耗品を保存します。²</p>

¹ REFは個々のコンポーネントを識別するのに対し、LOTはコンポーネントが属するロットまたはバッチを識別します。

² 保存温度は配送温度と異なる場合があります。

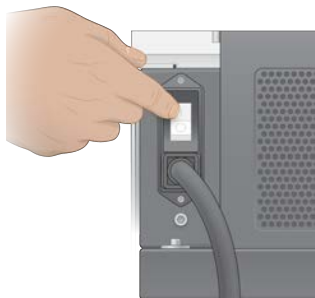
第3章 はじめに

装置の起動	19
設定	20
ユーザーが用意する消耗品および機器	25

装置の起動

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

図10 電源スイッチの位置



- 2 装置の右側の電源ボタンが青く点灯するのを待って、電源ボタンを押します。

図11 電源ボタンの位置



ユーザーアカウント

NVCS v1.5および新しいバージョンでは、管理者およびユーザーの2種類のアカウントがあります。各種アカウントに対する許可は次の表に示しています。

許可	管理者	ユーザー
シーケンスランのセットアップ、スタート、およびモニタリング	レ	レ
ソフトウェアのダウンロードおよび更新	レ	
別のユーザーが開始した有効なランのステータスの確認	レ	
反応しないUCS プロセスの終了	レ	

アプリケーションデータファイルはC:/ProgramDataに保存されています。アプリケーションはC:/Program Filesにインストールされています。NVCSはどちらのアカウントに対してもフルスクリーンアプリとして起動します。

システムへのログオン

- 1 オペレーティングシステムがロードされたら、自施設用のユーザー名とパスワードを使用して、Windowsにログオンします。
- 2 NVCSを開きます。
ソフトウェアが起動され、システムを初期化します。初期化が完了すると、[Home] 画面が表示されます。

NVCSがユーザーアプリとして起動します。ソフトウェアアップデートなどの管理者の許可を必要とする機能の使用を試み、管理者としてログインしていない場合、管理者としてログインするようプロンプトが表示されます。

シーケンスランの進行に関する情報の入手を継続するには、NVCSがランニング中でシーケンスランが進行中の間はログインを維持してください。

NVCSがランニング中にシャットダウンまたは再起動を開始する場合、シャットダウンまたは再起動の進行前に、ユーザーはこのアクションを承認する必要があります。

設定

NVCSには以下の設定があります。

- ▶ ランモード（ [manual] または [file-based] ）
- ▶ NovaSeq Xp ワークフロー
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ ソフトウェアのアップデート



注意

[Mode Selection] が設定されていることを確認してから、[Workflow Selection] または [Automatic Checks for Software Updates] を設定してください。

ランセットアップモード

- ▶ **Manual**：初期設定のモードで、後続の解析のために指定の出力フォルダーにデータを送信します。
- ▶ **File-Based**：BaseSpace Clarity LIMSあるいは他のLIMSシステムのファイルを用いてランパラメーターを定義するための代替モードです。詳細については、[22ページの「LIMSアウトプットの設定」](#)を参照してください。

ランセットアップモードを設定する場合、ランセットアップフォルダーの既存のロケーションを指定する必要があります。このフォルダーは必須であり、ロケーションが無効の場合、指定されたロケーションが存在しないことを示すメッセージが表示されます。

両ランセットアップモードに、解析用のデータをBaseSpace Sequence Hubに転送するオプションがあります。

Manualモードの設定

- 1 [Main Menu] から [Settings] を選択します。
[Settings] 画面は [Mode Selection] タブに開きます。
- 2 [Manual] を選択します。
- 3 (オプション) 出力フォルダーに適したネットワークロケーションを入力または参照してください。

C:\、D:\またはZ:\ドライブ上のロケーションは指定しないでください。指定すると、無効なドライブエラーとなります。

この設定が初期設定のロケーションです。出力フォルダーのロケーションは、ラン単位で変更可能です。

- 4 (オプション) [Send Instrument Performance Data to Illumina] を選択すると、Illumina Proactiveモニタリングサービスが有効化されます。ソフトウェアインタフェースでのこの設定の名称は、ご使用のNVCSのバージョンに応じて、このガイドでの名称とは異なる場合があります。この設定をオンにすると、システム性能データがイルミナに送信されます。このデータは、事前のメンテナンスを可能にし、システムの動作可能時間を最大限にするため、イルミナによる問題解決をより簡単にし、潜在的な故障の検出に役立ちます。本サービスの利点について詳しくは、『Illumina Proactive Technical Note』（文書番号：1000000052503）を参照してください。
本サービスは：
 - ▶ シーケンスデータを送信しません。
 - ▶ インターネットアクセスできるネットワークへの装置の接続が要求されます。
 - ▶ 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] の設定を無効にします。
- 5 [Save] を選択します。

File-Basedモードの設定

- 1 [Main Menu] から [Settings] を選択します。
[Settings] 画面は [Mode Selection] タブに開きます。
- 2 [File-Based] を選択します。
- 3 LIMSファイルが入っているランセットアップフォルダーに、任意のネットワークロケーションを入力または参照してください。
ランのセットアップ前に適切なLIMSファイルがランセットアップフォルダーに追加されていることを確認します。ランセットアップの間、ソフトウェアはライブラリーチューブIDまたはフローセルIDを用いて実行中のランのファイルを位置付けます。
- 4 (オプション) 出力フォルダーに適したネットワークロケーションを入力または参照してください。
C:\、D:\またはZ:\ドライブ上のロケーションは指定しないでください。指定すると、無効なドライブエラーとなります。
出力フォルダーのロケーションは、ラン単位で変更可能です。
- 5 (オプション) [Send Instrument Performance Data to Illumina] を選択すると、Illumina Proactiveモニタリングサービスが有効化されます。ソフトウェアインタフェースでのこの設定の名称は、ご使用のNVCSのバージョンに応じて、このガイドでの名称とは異なる場合があります。この設定をオンにすると、システム性能データがイルミナに送信されます。このデータは、事前のメンテナンスを可能にし、システムの動作可能時間を最大限にするため、イルミナによる問題解決をより簡単にし、潜在的な故障の検出に役立ちます。本サービスの利点について詳しくは、『Illumina Proactive Technical Note』（文書番号：1000000052503）を参照してください。
本サービスは：
 - ▶ シーケンスデータを送信しません。
 - ▶ インターネットアクセスできるネットワークへの装置の接続が要求されます。
 - ▶ 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] の設定を無効にします。
 このオプションが有効化されると、外部インターネット接続が要求されます。
- 6 [Save] を選択します。

LIMSアウトプットの設定

システムがファイルベースモードに設定されており、BaseSpace Clarity LIMS以外のLIMSソフトウェアを使用する場合、ランセットアップファイルを (*.json) フォーマットで作成するようにLIMSを設定してください。標準ワークフローの場合、ファイル名はライブラリーチューブIDと一致させる必要があります。ファイルのフローセルIDフィールドはブランクのままにすることができます。NovaSeq Xpワークフローの場合、ファイル名はフローセルIDと一致させる必要があります。フローセルIDおよびライブラリーIDはファイル内に指定されなければなりません。ファイル名および値は大文字、小文字の区別をしません。

外部LIMSソフトウェアは、NovaSeq 6000とのやりとりのためにNovaSeq LIMS APIを用いることができます。API エンドポイントについては、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。

フィールド名	値
run_name	任意のラン名。英数文字、ハイフン、およびアンダースコアが利用できます
run_mode	次のいずれかを選択します： • S1 • S2 • S4
workflow_type	[NoIndex]、[SingleIndex]、または [DualIndex]
librarytube_ID	ライブラリーチューブのRFID
rehyb*	[True] または [False]
sample_loading_type	[NovaSeqStandard] または [NovaSeqXp]
Flowcell_ID	フローセルの ID
paired_end	[True] または [False]
read1	151までの値
read2	151までの値
index_read1	20までの値
index_read2	20までの値
output_folder	エスケープシーケンス用の2つのバックスラッシュ付きの出力フォルダーへのパス
samplesheet	サンプルシート、あるいはその他のファイルでエスケープシーケンス用の2つのバックスラッシュ付きの (*.csv) フォーマットのものへのパス
use_basespace	[True] または [False]
basespace_mode	[RunMonitoringOnly] または [RunMonitoringAndStorage]
use_custom_read1_primer	[True] または [False]
use_custom_read2_primer	[True] または [False]
use_custom_index_read1_primer	[True] または [False]

* リハイブリダイゼーションはNVCS v1.4.0またはそれ以前のバージョンでは使用できません。

(*.json) ファイルの例：

```
{
  "run_name": "Test Experiment",
  "run_mode": "S2",
  "workflow_type": "DualIndex",
```

```

"flowcell_ID": "1234567",
"librarytube_ID": "VY9999999-TMP",
"rehyb": false,
"paired_end": true,
"read1": 151,
"read2": 151,
"index_read1": 8,
"index_read2": 8,
"output_folder": "\\Lab-NAS\\Outputfolder",
"samplesheet": "\\Lab-NAS\\SampleSheet.csv",
"use_basespace": true,
"basespace_mode": "RunMonitoringAndStorage",
"use_custom_read1_primer": false,
"use_custom_read2_primer": false,
"use_custom_index_read1_primer": false
}

```

NovaSeq標準およびNovaSeq Xpワークフロー

NovaSeq標準およびNovaSeq Xpワークフローは双方ともイルミナ独自のExAmpケミストリーを使用します。

▶ 標準ワークフロー

NovaSeq標準ワークフローは、装置に搭載されたイルミナ独自のExAmpクラスター形成ケミストリーのきわめて重要な2ステップを自動化します。

- ▶ ExAmpマスターミックスの調製
- ▶ マスターミックスのフローセルへの送液

マスターミックスを装置上で調製し送液することで、ユーザーとのやりとりを最低限に抑え、調製されるミックスのばらつきを軽減します。

標準ワークフロー用のランセットアップの一環として、変性および中和されたライブラリーの推奨濃度でのプールが入ったライブラリーチューブをクラスターカートリッジの位置番号8に挿入します。ラン開始後、後続のステップは装置が行い、ユーザーとのやりとりは必要ありません。これには、ExAmp試薬のクラスターカートリッジからライブラリーチューブへの送液、試薬およびライブラリーのプールミックスの調製、および調製済みミックスのフローセルの全レーンへの送液が含まれます。

装置上でのクラスタリングの後、両ワークフローに共通の一連のステップが行われます。これらのステップには、コンディショニングミックスのクラスター形成したフローセルへの適用、および sequencing by synthesisのためにクラスターを調製するための追加のケミストリーステップが含まれます。コンディショニングミックスはクラスターカートリッジ内の試薬と、ランセットアップ中に挿入されたライブラリーチューブを用いて、クラスタリングプロセス中に調製されます。コンディショニングミックスは、NovaSeq装置上でのクラスタリング効率を高めるのに役立ちます。

▶ NovaSeq Xpワークフロー

NovaSeq Xpワークフローでは、NovaSeq Xpフローセルドックおよびフローセル固有の消耗品キット

(NovaSeq Xp 2-Lane KitまたはNovaSeq Xp 4-Lane Kit) を用いて、NovaSeqフローセルの個々のレーンに、異なるライブラリーやライブラリーのプールをローディングすることができます。NovaSeq Xp Kitには、クラスタリングに必要なExAmp試薬と、レーンのローディングに必要なNovaSeq Xpマニフォールドが含まれます。

ExAmp/ライブラリーミックスは、NovaSeq XpフローセルドックおよびNovaSeq Xpマニフォールドを用いて、フローセルの個々のレーンに調製およびロードされます。自動化液体ハンドラーを用いて、ExAmp/ライブラリーミックスの調製および自動吸入式フローセル用のマニフォールドへの送液を行うことができます。フローセルへのサンプルローディングが終わると、空のライブラリーチューブはクラスタカートリッジの位置番号8に挿入され、フローセルが装置上に置かれ、シーケンスランが開始されます。

ランの開始後、両ワークフローに共通の一連のステップが行われます。これらのステップには、コンディショニングミックスのクラスタ形成したフローセルへの適用、およびsequencing by synthesisのためにクラスタを調製するための追加のケミストリーステップが含まれます。コンディショニングミックスはクラスタカートリッジ内の試薬を用いてクラスタリングプロセス中に調製され、ランセットアップ中に挿入された空のライブラリーチューブで混合されます。コンディショニングミックスは、NovaSeq装置上でのクラスタリング効率を高めるのに役立ちます。

NovaSeq Xpワークフローの設定

- 1 [Main Menu] から [Settings] を選択します。
[Settings] 画面は [Mode Selection] タブに開きます。
- 2 [Workflow Selection] タブを選択します。
- 3 NovaSeq Xpワークフローを有効化するには、[Enable Workflow Selection] を選択します。
- 4 (オプション) NovaSeq Xpをデフォルトのワークフローにするには、[NovaSeq Xp] を選択します。
- 5 [Save] を選択します。

BaseSpace Sequence Hubの設定

次の手順を用いて、BaseSpace Sequence Hub用の初期設定値を設定してください。ランのセットアップ中にBaseSpace Sequence Hubを無効にするか、ランのモニタリングおよび保存用の変更の設定が可能です。BaseSpace Sequence Hubとの接続にはインターネット接続が必要です。

- 1 [Main Menu] から [Settings] を選択します。
[Settings] 画面は [Mode Selection] タブに開きます。
- 2 [BaseSpace Sequence Hub] チェックボックスを選択します。
- 3 [Configuration] オプションを選択します。
 - ▶ **Run Monitoring and Storage** : リモートモニタリングおよびデータ解析のためにランデータをBaseSpace Sequence Hubに送信します。このオプションでは、ランにサンプルシートをアップロードする必要があります。
 - ▶ **Run Monitoring Only** : ランをリモートモニタリングできるようにBaseSpace Sequence HubにInterOp、ログをはじめとする非CBCLランファイルを送信します。
- 4 [Hosting Location] ドロップダウンメニューで、[EU (Frankfurt)] または [USA (N. Virginia)] を選択します。
このオプションによりデータのアップロード先を指定することができます。
- 5 BaseSpace Enterprise利用者である場合 :

- a **[Private Domain]** チェックボックスを選択してください。
- b ドメイン名は、BaseSpace Sequence Hubへのシングルサインオン用のものを入力します。

6 **[Save]** を選択します。

サンプルシート名

NVCS v1.3.1またはそれ以前のバージョンを実行する場合、NovaSeq 6000ランに使用され、BaseSpace Sequence Hubにアップロードされるサンプルシートは、SampleSheet.csv（大文字小文字を区別）と命名する必要があります。サンプルシート名が間違っており、**[Run Monitoring and Storage]** が有効化されると、BaseSpace Sequence Hubは対象のランに注意のためのフラグを立てます。**[More | Fix Sample Sheet and Requeue]** を選択し、適切なサンプルシートを入力することで、フラグが立てられたランはFASTQ生成のキューに入れられます。サンプルシートが提供されるまで、シーケンスデータはFASTQファイルに変換することができません。

bcl2fastq2 Conversion Software v2.19以降を用いて、データをローカルでFASTQファイルに変換する場合、コマンドラインオプションの `--sample-sheet` を用いると、任意のCSVファイルを任意のロケーションに指定することができます。コマンドラインでは、任意のファイル名の使用が可能です。

ソフトウェアアップデートの設定

デフォルトでソフトウェアアップデートの自動チェックが有効になっています。設定からアップデートの自動チェックを無効または有効に変更可能です。

- 1 **[Main Menu]** から **[Settings]** を選択します。
- 2 **[Software Update]** を選択します。
- 3 **[If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available]** チェックボックスを選択します。
- 4 **[Save]** を選択します。

ユーザーが用意する消耗品および機器

以下のユーザーが用意する消耗品および機器は、消耗品の準備、シーケンスとシステムメンテナンスのために使用されます。

消耗品

消耗品	サプライヤー	目的
1N NaOH	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリー変性用に0.2 Nに希釈。
10 mM Tris-HCl, pH8.5	一般的なラボ用品サプライヤー	変性前のライブラリーとオプションのPhiXコントロールの希釈用。
400 mM Tris-HCl, pH 8.0	一般的なラボ用品サプライヤー	変性後のライブラリーとオプションのPhiXコントロールの中和反応用。
遠心用ボトル、500 mL	一般的なラボ用品サプライヤー	メンテナンスウォッシュ用のTween 20の希釈。
遠心チューブ、30 mL	一般的なラボ用品サプライヤー	メンテナンスウォッシュ用のNaOClの希釈。
パウダーフリーの使い捨て手袋	一般的なラボ用品サプライヤー	一般的な用途。

消耗品	サプライヤー	目的
70%イソプロピルアルコール ワイブ または 70%エタノールアルコール ワイブ	VWR、カタログ番号：95041- 714または同等品 一般的なラボ用品サプライヤー	ラン前のコンポーネントの洗浄および一般的な用途。
ラボ用リントフリー紙	VWR、カタログ番号：21905- 026または同等品	フローセルステージの乾燥および一般的な用途。
遠心チューブ、1.5 mL	VWR、カタログ番号：20170- 038または同等品	NaOHとライブラリーの希釈の際の容量の混合。
NaOCl、5%	Sigma-Aldrich、カタログ番 号：239305	メンテナンスウォッシュの実施。
NovaSeq 6000 Reagent Kit	イルミナ。カタログ番号につい ては11ページの「キット概要」 を参照	シーケンスランの実施。
ピペットチップ、20 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの希釈およびローディングを行うためのピペット操作。
ピペットチップ、200 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの希釈およびローディングを行うためのピペット操作。
ピペットチップ、1000 µL	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリーの希釈およびローディングを行うためのピペット操作。
試薬または分光光度グレードの イソプロピルアルコール (99%)、100 mLボトル	一般的なラボ用品サプライヤー	光学的構成物の定期的洗浄と対象の洗浄カートリッジのサポート用。
Tween 20	Sigma-Aldrich、カタログ番 号：P7949	メンテナンスウォッシュの実施。
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	ライブラリー変性用のNaOHの希釈。 メンテナンスウォッシュ用のTween 20および次 亜塩素酸ナトリウムの希釈。
(NovaSeq Xpワークフロー) 以下のキットのうちの1つ： • NovaSeq Xp 2-Lane Kit • NovaSeq Xp 4-Lane Kit	イルミナ： • カタログ番号：20021664 • カタログ番号：20021665	ライブラリーのフローセルへの手動ローディング： • S1およびS2のフローセル用の2レーンキット • S4フローセル用の4レーンキット
(NovaSeq Xpワークフロー) 0.5 mLおよび1.7 mLチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー	ExAmp混合のために必須。
(NovaSeq Xpワークフロー) (オプション) 以下のマニ フォールドパックのうちの1 つ： • NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack • NovaSeq Xp 4-Lane Manifold Pack	イルミナ： • カタログ番号：20021666 • カタログ番号：20021667	ライブラリーのフローセルへの手動ローディングのための予備のNovaSeq Xp マニフォールド。
(オプション) PhiX Control v3	イルミナ、カタログ番号：FC- 110-3001	PhiXコントロールの添加。

イルミナキットの消耗品

1フローセルのシーケンスには、1組のNovaSeq 6000 Reagent Kitが必要です。各キットは、以下にリストする複数の消耗品で構成されています。デュアルフローセルのランには、2キットを使用します。

表9 NovaSeq 6000 Reagent Kitの消耗品

消耗品 (各1)	目的
バッファカートリッジ	ランにシーケンスバッファを供給します。
クラスターカートリッジ	ランに必要なクラスター形成試薬、インデックス試薬、およびペアエンド試薬を供給します。
フローセル	フローセルでクラスター形成とシーケンスの反応が起こります。
SBSカートリッジ	ランにシーケンス試薬を供給します。
ライブラリーチューブ	空のチューブで、プールおよび変性されたライブラリー（顧客が用意したもの）を保持するために用いられるもの、あるいはシーケンスのクラスターリング効率を高めるためのコンディショニングミックスの調製に用いられるものです。

NovaSeq Xpワークフローに従ってフローセルにライブラリーを直接ロードする場合は、NovaSeq Xp Kit1組で各試薬キットを補ってください。NovaSeq Xp Kitはそれぞれ以下の消耗品で構成されます。

表10 NovaSeq Xp Kitの消耗品

消耗品 (各1)	目的
DPX1	ExAmpマスター ミックスの調製。
DPX2	
DPX3	
NovaSeq Xp マニフォールド	フローセルへのライブラリーのローディング。

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品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
- ▶ 分子生物学用グレード水

機器

アイテム	ソース
冷凍庫、-25°C~-15°C	一般的なラボ用品サプライヤー
メスシリンダー、500 mL、滅菌済み	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
ピペット、20 µL	一般的なラボ用品サプライヤー
ピペット、200 µL	一般的なラボ用品サプライヤー
ピペット、1000 µL	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
タブ、水槽*	一般的なラボ用品サプライヤー
(NovaSeq Xpワークフロー) NovaSeq Xpフローセル ドック	イルミナ、カタログ番号：20021663

* 2個の試薬カートリッジが収納できる、適切な水位を保てるタブを用いてください。例、(61 cm × 91.4 cm × 25.4 cm) (24インチ × 36インチ × 10インチ)。

第4章 標準ワークフロー：消耗品の準備

方法	29
ライブラリーのガイドライン	29
SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解	29
廃液ボトルを空にする	30
フローセルの準備	31
シーケンスのためのライブラリーのプールおよび変性	32

方法

サンプルまたは消耗品の準備を始める前に、NVCSのバージョンが以下の表に示すソフトウェアの最低要件を満たすことを確認してください。

表11 ソフトウェアの最低要件

フローセル	ソフトウェアの最低バージョン
S1	1.3.1
S2	すべて
S4	1.2.0

- ▶ 必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。25ページの「ユーザーが用意する消耗品および機器」を参照してください。
- ▶ 消耗品を準備する場合は、必ずラベルをチェックして、構成品間の互換性を確認してください。S1、S2およびS4の構成品を組み合わせないでください。
- ▶ 指定の容量、濃度、温度および所要時間で、以下に示される順序で指示に従ってください。
- ▶ 指示内容にストップポイントが指定されていない場合、ただちに次の手順に進んでください。

ライブラリーのガイドライン

すべての手順は、サポート対象のライブラリー調製手法に適用でき、サポート対象のNovaSeq 6000アプリケーション用の代表的なインサートサイズを前提とします。

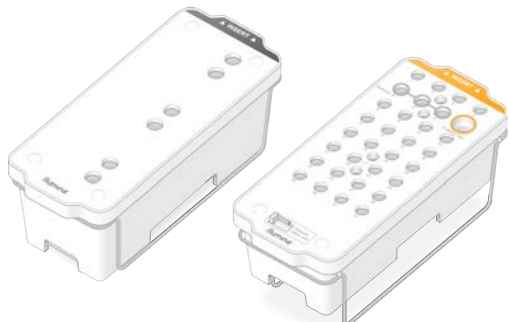
- ▶ 最善の結果を得るため、ライブラリーをプールし変性したら、ただちにシーケンスを行ってください。
- ▶ ライブラリーをアプリケーションに合ったローディング濃度に希釈します。ローディング濃度が低過ぎたり高過ぎたりすると、フィルターを通過するクラスターの割合（%PF）に悪影響を与えます。ライブラリー濃度が低いと、シーケンスデュプリケートが増加します。ライブラリー濃度が高すぎると、%PFが低下します。
- ▶ 最適な%PFを達成するには、ライブラリーの精確な定量化と適切な品質管理が必要です。推奨については、お手元のライブラリー調製キットの記述を参照してください。

SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解

- 1 シーケンスランが進行中の場合は、融解の完了時に装置の両側が利用可能になることを確認します。
- 2 -25°C~-15°Cの保管庫からSBSカートリッジおよびクラスターカートリッジを取り出します。

- 融解用ワイヤーラックに各カートリッジを置きます。
ラックは機器とともに準備し、水槽に転倒させないようにします。

図12 融解用ワイヤーラック内のカートリッジ



- 室温の水槽（19°C～25°C）で融解します。
カートリッジのおよそ下半分を浸します。
- 融解所要時間の判断のために下表を用います。



警告

試薬の融解に熱湯を用いると、データ品質の低下やランの失敗が引き起こされる場合があります。

カートリッジ	融解時間
S1およびS2 SBSカートリッジ	4時間
S1およびS2クラスターカートリッジ	最大2時間
S4 SBS カートリッジ	4時間
S4クラスターカートリッジ	最大4時間

- ペーパータオルを用いて、カートリッジのベースを完全に乾かします。ウェル間を乾かし、水分を取り除きます。
- ホイルシールの水分付着を検査します。水分がある場合、リントフリー紙で吸い取ります。
- 各カートリッジの下部を点検して、リザーバーに氷がないこと、すなわち試薬が融解していることを確認します。
- 各カートリッジを10回転倒混和し、試薬を混合します。
- ベンチに各カートリッジの底を軽くタップして、気泡を減らします。
- 試薬を4時間以内に装置にローディングできない場合、2°C～8°Cで最長24時間保管してください。

廃液ボトルを空にする

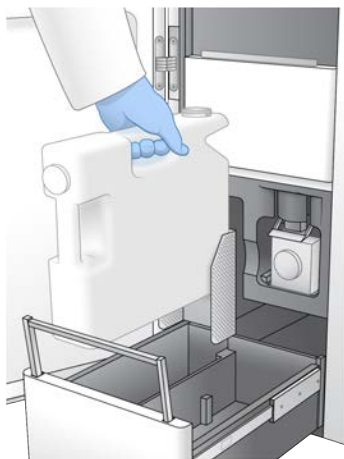
以下の手順を用いて、シーケンスランごとに廃液ボトルを空にしてください。使用済み試薬を外部に送液するようにシステムが設定されている場合でも、廃液が廃液ボトル（小）に移送され、シーケンスランごとに空にする必要があります。廃液ボトル（大）は所定の場所になければなりません。

**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。

- 1 廃液ボトル（小）を以下のとおりに取り外して空にします。
 - a レバーを上げて廃液ボトル（小）を装置内の所定位置から外します。ボトルは側面で持ちます。
 - b ボトルの正面のキャップホルダーからねじ式のキャップを取り外します。
 - c キャップで、ボトルの開口部を密封し、溢れるのを防ぎます。
 - d 中身を他のボトルの中身から遠ざけ、適切な基準に従って廃棄します。
 - e 蓋の開いたボトルを装置内の所定位置に戻した後、レバーを下げます。キャップホルダーにキャップを保管します。
- 2 廃液ボトル（大）を以下のように取り外して空にします。
 - a 先端のハンドルを使用して、廃液ボトル（大）をバッファー引き出しの左側から取り外します。
 - b ボトルの正面のキャップホルダーからねじ式のキャップを取り外します。
 - c ねじ式のキャップで、ボトルの開口部を密封し、溢れるのを防ぎます。
 - d 適応規格に従って中身を廃棄してください。空にする際、両方のハンドルをつかみます。
 - e 蓋の開いたボトルをバッファー引き出しに戻します。キャップホルダーにキャップを保管します。

図13 空きボトルの再装填



- 3 新しいパウダーフリーの手袋を装着することで、装置の表面を汚染しないようにします。
- 4 バッファー引き出しを閉じた後、液体コンパートメントドアを閉じます。

**警告**

廃液ボトルを空にししないと、ランの停止やオーバーフローを招くおそれがあり、それによって装置が破損し、安全上のリスクが生じます。

フローセルの準備

- 1 2°C~8°Cの保管庫から新しいフローセルのパッケージを取り出します。

- 2 密封されたフローセルパッケージを10~15分間放置して、フローセルを室温にします。フローセルはパッケージから取り出してから12時間以内に用いてください。

シーケンスのためのライブラリーのプールおよび変性

ノーマライズされたライブラリープールの作成

以下に示す手順を用いて、ライブラリーを適切な濃度にノーマライズしてから、プールしてください。同じフローセル上でシーケンスされたライブラリーは、単一のノーマライズされたプールに混合する必要があります。

- 1 アプリケーションおよびフローセルタイプごとの通常のリード数およびプレックス推奨数に関しては次の表を参照してください。

表12 ライブラリーのプールプレックス推奨数

アプリケーション	フローセルタイプ	フローセルあたりのフィルターを通過するペアエンドリード (B)	フローセルあたりのライブラリー
ヒトゲノム	S1	2.6-3.2	~4
	S2	6.6-8.2	~8
	S4	16-20	~24
エクソーム	S1	2.6-3.2	~40
	S2	6.6-8.2	~100
	S4	16-20	~240
トランスクリプトーム	S1	2.6-3.2	~32
	S2	6.6-8.2	~82
	S4	16-20	~192

プールするためのライブラリーのノーマライズ

- 1 希望の最終ローディング濃度に基づいて、必要なプールライブラリー濃度を決定してください。[33ページの「推奨ローディング濃度」](#)を参照してください。

最終ローディング濃度 (pM)	プールされたライブラリーの濃度 (nM)
100	0.50
150	0.75
200	1
250	1.25
300	1.50
350	1.75
400	2
450	2.25
500	2.50

- 2 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて、希望のプールライブラリー濃度にライブラリーをノーマライズしてください。
適切な濃度へのライブラリーの希釈について詳しくは、[イルミナウェブサイトの「Pooling Calculator」](#)を参照してください。

推奨ローディング濃度

最適なDNAローディング濃度はライブラリータイプおよびインサートサイズごとに異なります。インサートサイズが450 bp以下のイルミナライブラリーの推奨DNAローディング濃度を下表に示します。推奨範囲の低域ではインサートサイズの小さなライブラリーをローディングしてください。450 bpを超えるライブラリーの場合は、高濃度のローディング濃度が必要な場合があります。



注意

イルミナのライブラリー調製手法以外で生成されたライブラリーの場合は、最善の%PFのための最適なクラスタ増幅効率を得るために、特定のライブラリータイプの滴定を最初に行う必要があります。最適なローディング濃度が決定されたら、それ以降、同一のライブラリータイプに適用することができます。

表13 標準ワークフローの推奨ローディング濃度 (ソフトウェアバージョン1.1以降)

ライブラリーのタイプ	最終ローディング濃度 (pM)	プールされたローディング濃度 (nM)
PhiX ¹	250	1.25
DNA PCRフリーライブラリープール	175-350	0.875-1.75
DNA PCR増幅ライブラリープール	300-600	1.5-3.0
シングルセル ²	250-500	1.25-2.5

¹ PhiXのみのランの場合

² シングルセルはXpワークフローのみ検証されています。

HiSeq™ X、HiSeq™ 4000、またはHiSeq™ 3000用に最終ローディング濃度を最適化している場合、NovaSeq 6000に対しては、その濃度を1.5倍して使用してください。例えば、HiSeq X用の最終ローディング濃度が200 pMの場合は、NovaSeq 6000には300 pMを使用してください。

ノーマライズ済みライブラリーのプールおよびオプションのPhiXコントロールの添加

- 1 適量のノーマライズされた各ライブラリーを新たな遠心チューブで混合し、最終的に以下の量になるようにします。

モード	最終量 (μL)
S1	100
S2	150
S4	310

例えば、6-PlexのライブラリープールおよびS2モードの場合、同じ濃度にノーマライズした各ライブラリーの25 μLを混合します。または、4-PlexのライブラリープールおよびS1モードの場合、ノーマライズした各未変性ライブラリーの25 μLを混合します。

- 2 (オプション) プールされていないライブラリーの残りを-25°C~-15°Cで保管します。
3 (オプション) 1%の未変性のPhiXを以下の要領で添加します。

- a 10 nM PhiXを2.5nMに、10 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて希釈します。
- b 適量の未変性のPhiX 2.5 nMを未変性のライブラリープールのチューブに添加します。

モード	未変性のPhiX 2.5 nM (μL)	未変性のライブラリープール (μL)
S1	0.6	100
S2	0.9	150
S4	1.9	310

PhiXを添加する場合、1%がバランスの良いライブラリーのための推奨量です。多様性の低いライブラリーにはさらに多く必要な可能性があります。多様性の低いライブラリーにPhiXコントロールを用いるには、イルミナテクニカルサポートに連絡してガイダンスを受けてください。

新鮮なNaOHの調製

新鮮な0.2 N NaOHの希釈液を調製し、シーケンス用にライブラリーを変性します。軽微なピペッティングエラーで最終NaOH濃度に影響を与えないよう、多めの量を調製します。



警告

用時調製された0.2 Nの希釈NaOHは変性プロセスにとって不可欠です。変性が正しく行われないと、収率が下がる可能性があります。

- 1 遠心チューブに以下の分量を混合し、1 N NaOHを0.2 Nに希釈します。

表14 S1/S2モード

試薬	1フローセルの分量 (μL)	2フローセルの分量 (μL)
ラボラトリーグレード水	40	80
ストック 1 N NaOH	10	20

分量としては、1フローセルの場合は0.2 N NaOHが50 μL、2フローセルの場合は0.2 N NaOHが100 μLとなります。

表15 S4モード

試薬	1フローセルの分量 (μL)	2フローセルの分量 (μL)
ラボラトリーグレード水	80	160
ストック 1 N NaOH	20	40

分量としては、1フローセルの場合は0.2 N NaOHが100 μL、2フローセルの場合は0.2 N NaOHが200 μLとなります。

- 2 数回、転倒混和するか、十分にボルテックスします。チューブには蓋をして保管し、**12時間**以内に使用します。

ライブラリーのプールおよびオプションのPhiXコントロールの変性

- 1 0.2 NのNaOHを、以下のように未変性ライブラリーのプールおよびPhiX (オプション) の入ったチューブに添加します。

フローセル	0.2 N NaOH	未変性 ライブラリープール (μL)	最終量
S1	25	100	125 μL、125.6 μL (PhiX添加)
S2	37	150	187 μL、187.9 μL (PhiX添加)
S4	77	310	387 μL、388.9 μL (PhiX添加)

- 2 キャップを閉じた後、短時間ボルテックスします。
- 3 最大1分間、280 × gで遠心します。
- 4 変性させるため、室温で8分間インキュベートします。
- 5 中和させるため、400 mMの Tris-HCL (pH 8.0) を以下のように添加します。

モード	400 mM Tris-HCl, pH 8.0 (μL)	最終量
S1	25	150 μL、150.6 μL (PhiX添加)
S2	38	225 μL、225.9 μL (PhiX添加)
S4	78	465 μL、466.9 μL (PhiX添加)

- 6 キャップを閉じた後、短時間ボルテックスします。
- 7 最大1分間、280 × gで遠心します。
- 8 NovaSeq 6000試薬キットに付属のライブラリーチューブに、変性されたライブラリーの全量、または変性されたライブラリーおよびPhiXを移送します。
- 9 ただちにライブラリーチューブのクラスターカートリッジへのローディングに進み、ランをセットアップします。
ライブラリーチューブおよび試薬カートリッジは、**30分**以内に装置にローディングする必要があります。
- 10 **(オプション)** ただちに進められない場合、ライブラリーチューブに蓋をして、-25°C～15°Cで最長3週間保管します。解凍後は再冷凍しないでください。



警告

ライブラリーチューブは必要な場合にのみ保管してください。-25°C～-15°Cで長期保管するとデュプリケートが増える可能性があります、収率が下がることになります。

SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの調製

- 1 各カートリッジの下部を点検して、リザーバーに氷がないこと、すなわち試薬が融解していることを確認します。
- 2 各カートリッジを10回転倒混和し、試薬を混合します。
- 3 ベンチに各カートリッジの底を軽くタップして、気泡を減らします。

ライブラリーチューブのロード

- 1 底部のライブラリーをかき乱さないようにして、クラスターカートリッジのライブラリーチューブ位置番号8に蓋を外したライブラリーチューブを挿入します。

図14 蓋が外され、位置番号8にロードされたライブラリーチューブ



第5章 NovaSeq Xpワークフロー：消耗品の準備

NovaSeq Xpワークフローの要約	36
方法	37
ライブラリーのガイドライン	37
SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解	38
廃液ボトルを空にする	38
フローセルの準備	39
シーケンスのためのライブラリーのプール、変性、およびロード	40

NovaSeq Xpワークフローの要約

サンプルまたは消耗品の準備を始める前に、NVCSのバージョンが以下の表に示すソフトウェアの最低要件を満たすことを確認してください。

表16 ソフトウェアの最低要件

フローセル	ソフトウェアの最低バージョン
S1	1.3.1
S2	すべて
S4	1.2.0

注意

NVCSは新しいランの交互スタートをサポートします。55ページの「ランの交互スタート」を参照してください。

NovaSeq Xpワークフローのステップを指定順にすべて完了することを確認してください。

注意

ステップ1~5は並行して終了でき、ステップ6に進む前に終わらせる必要があります。

- 1 SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジを融解します。
- 2 廃液ボトルを空にします。
- 3 ライブラリーをノーマライズします。
- 4 ライブラリーをプールしてPhiXコントロールを添加します。
- 5 密封されたフローセルパッケージを10~15分間放置して、フローセルを室温にします。フローセルはパッケージから取り出してから12時間以内に用いてください。

注意

ステップ6~12を指定順に完了させます。

- 6 ExAmp試薬を融解します。
- 7 新鮮なNaOH溶液を用意します。
- 8 ライブラリーのプールを変性および中和します。
- 9 フローセルおよびドックを準備します。
- 10 ExAmpマスターミックスを調製します。

- 11 フローセルにExAmp/ライブラリーミックスをロードします。
- 12 空のライブラリーチューブをクラスターカートリッジの位置番号8にロードします。

方法

- ▶ 必要な消耗品および機器が揃っていることを確認してください。25ページの「ユーザーが用意する消耗品および機器」を参照してください。
- ▶ 装置がオンの状態で、ラン用の十分な空き容量があることを確認してください。9ページの「Process Management」を参照してください。
- ▶ 装置の両側の自動ポストランウォッシュが終了していることを確認してから、ワークフローのステップ6を開始します（36ページの「NovaSeq Xpワークフローの要約」を参照）。
- ▶ 消耗品を準備する場合は、必ずラベルをチェックして、構成品間の互換性を確認してください。装置の片面で、S1、S2、およびS4の構成品、または2レーンおよび4レーンの構成品を混合しないでください。
- ▶ 指定の容量、温度および所要時間で、以下に示される順序で指示に従ってください。
- ▶ 混合操作をしない場合、氷上に試薬およびライブラリーをすべて静置してください。
- ▶ 指示内容にストップポイントが指定されていない場合、ただちに次の手順に進んでください。
- ▶ 2レーンフローセルでシーケンスを開始するには、両レーンとも充填する必要があります。4レーンフローセルでシーケンスを開始するには、1つのレーンを部分的に充填するか空にすることが可能です。
- ▶ 手動でExAmp試薬を混合したときに生じる結果のばらつきのもっとも主要な要因は、送液するExAmp構成量の不正確さと混合が不十分であることです。混合は十分に行ってください。



注意

シーケンスランは、フローセルにライブラリーをロードした直後、可能であれば30分以内に開始してください。

ライブラリーのガイドライン

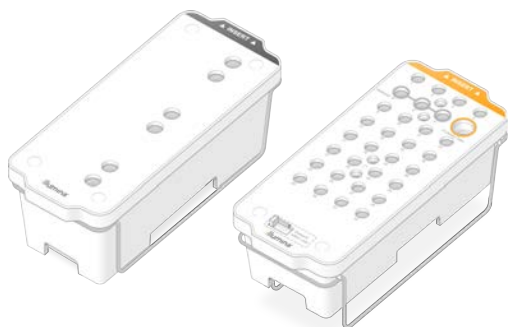
すべての手順は、サポート対象のライブラリー調製手法に適用でき、サポート対象のNovaSeq 6000アプリケーション用の代表的なインサートサイズを前提とします。

- ▶ 最善の結果を得るため、ライブラリーのプールおよび変性はシーケンスの直前に行ってください。
NovaSeq Xpワークフローの場合、ExAmpマスターミックスはシーケンスの準備ができるまで調製しないでください。
- ▶ ライブラリーをアプリケーションに合ったローディング濃度に希釈します。ローディング濃度が低過ぎたり高過ぎたりすると、フィルターを通過するクラスターの割合（%PF）に悪影響を与えます。ライブラリー濃度が低いと、シーケンスデュプリケートが増加します。ライブラリー濃度が高いと、%PFが低下する可能性があります。
- ▶ 最適な%PFを達成するには、ライブラリーの精確な定量化と適切な品質管理が必要です。推奨については、お手元のライブラリー調製キットの記述を参照してください。
- ▶ 空のライブラリーチューブをクラスターカートリッジの位置番号8にロードしてから、シーケンスランをセットアップしてください。空のライブラリーチューブを用いて、コンディショニングミックスをフローセルへの分注前に調製します。コンディショニングミックスにより、シーケンスのクラスタリング効率を高めることができます。

SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの融解

- 1 シーケンスランが進行中の場合は、融解の完了時に装置の両側が利用可能になることを確認します。
- 2 -25°C ～ -15°C の保管庫からSBSカートリッジおよびクラスターカートリッジを取り出します。
- 3 融解用ワイヤーラックに各カートリッジを置きます。
ラックは機器とともに準備し、水槽に転倒させないようにします。

図15 融解用ワイヤーラック内のカートリッジ



- 4 室温の水槽（ 19°C ～ 25°C ）で融解します。
カートリッジのおよそ下半分を浸します。
- 5 融解所要時間の判断のために下表を用います。



警告

試薬の融解に熱湯を用いると、データ品質の低下やランの失敗が引き起こされる場合があります。

カートリッジ	融解時間
S1およびS2 SBSカートリッジ	4時間
S1およびS2クラスターカートリッジ	最大2時間
S4 SBS カートリッジ	4時間
S4クラスターカートリッジ	最大4時間

- 6 ペーパータオルを用いて、カートリッジのベースを完全に乾かします。ウェル間を乾かし、水分を取り除きます。
- 7 ホイルシールの水分付着を検査します。水分がある場合、リントフリー紙で吸い取ります。
- 8 各カートリッジの下部を点検して、リザーバーに氷がないこと、すなわち試薬が融解していることを確認します。
- 9 各カートリッジを10回転倒混和し、試薬を混合します。
- 10 ベンチに各カートリッジの底を軽くタップして、気泡を減らします。
- 11 試薬を4時間以内に装置にローディングできない場合、 2°C ～ 8°C で最長24時間保管してください。

廃液ボトルを空にする

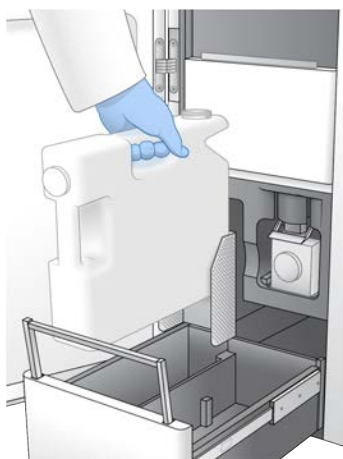
以下の手順を用いて、シーケンスランごとに廃液ボトルを空にしてください。使用済み試薬を外部に送液するようにシステムが設定されている場合でも、廃液が廃液ボトル（小）に移送され、シーケンスランごとに空にする必要があります。廃液ボトル（大）は所定の場所になければなりません。

**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。

- 1 廃液ボトル（小）を以下のとおりに取り外して空にします。
 - a レバーを上げて廃液ボトル（小）を装置内の所定位置から外します。ボトルは側面で持ちます。
 - b ボトルの正面のキャップホルダーからねじ式のキャップを取り外します。
 - c キャップで、ボトルの開口部を密封し、溢れるのを防ぎます。
 - d 中身を他のボトルの中身から遠ざけ、適切な基準に従って廃棄します。
 - e 蓋の開いたボトルを装置内の所定位置に戻した後、レバーを下げます。キャップホルダーにキャップを保管します。
- 2 廃液ボトル（大）を以下のように取り外して空にします。
 - a 先端のハンドルを使用して、廃液ボトル（大）をバッファー引き出しの左側から取り外します。
 - b ボトルの正面のキャップホルダーからねじ式のキャップを取り外します。
 - c ねじ式のキャップで、ボトルの開口部を密封し、溢れるのを防ぎます。
 - d 適応規格に従って中身を廃棄してください。空にする際、両方のハンドルをつかみます。
 - e 蓋の開いたボトルをバッファー引き出しに戻します。キャップホルダーにキャップを保管します。

図16 空きボトルの再装填



- 3 新しいパウダーフリーの手袋を装着することで、装置の表面を汚染しないようにします。
- 4 バッファー引き出しを閉じた後、液体コンパートメントドアを閉じます。

**警告**

廃液ボトルを空にししないと、ランの停止やオーバーフローを招くおそれがあり、それによって装置が破損し、安全上のリスクが生じます。

フローセルの準備

- 1 2°C~8°Cの保管庫から新しいフローセルのパッケージを取り出します。

- 2 密封されたフローセルパッケージを10~15分間放置して、フローセルを室温にします。フローセルはパッケージから取り出してから12時間以内に用いてください。

シーケンスのためのライブラリーのプール、変性、およびロード

ExAmp試薬の融解

- 1 -25°C~-15°Cで保管されているDPX1、DPX2、およびDPX3を、チューブを各1本ずつ取り出します。
- 2 室温で10分間融解します。
- 3 氷の上に置いておきます。



注意

未開封のExAmp試薬を再凍結しなければならない場合は、融解直後に再凍結してください。ExAmp試薬の再凍結は1回に限られます。残った試薬は凍結および混合することはできません。

ノーマライズされたライブラリープールの作成

以下に示す手順を用いて、ライブラリーを適切な濃度にノーマライズしてから、プールしてください。同じレーン上でシーケンスされたライブラリーは、単一のプールに混合する必要があります。ノーマライズされたプールそれぞれのレーンごとの総容積を以下の表に示します。同じプールが1レーンを超えてシーケンスされる場合は、表17の値にレーン数を掛けてください。

表17 プールされたライブラリーの総容積

モード	レーンあたりの総プール量 (μL)
S1	18
S2	22
S4	30

Xpワークフローの場合、データ出力はレーンごとに得られますが、標準ワークフローでは全レーンが集約されて得られます。その結果、Xpワークフローのライブラリーのプール内のライブラリー数は、標準ワークフローと比較して少なくなります。

- 1 アプリケーションおよびフローセルタイプごとの通常のリード数およびプレックス推奨数に関しては次の表を参照してください。

表18 ライブラリーのプールプレックス推奨数

アプリケーション	フローセルタイプ	レーンあたりのフィルターを通過するペアエンドリード (B)	レーンあたりのライブラリー
ヒトゲノム	S1	1.3-1.6	~2
	S2	3.3-4.1	~4
	S4	4.0-5.0	~6
エクソーム	S1	1.3-1.6	~20
	S2	3.3-4.1	~50
	S4	4.0-5.0	~60
トランスクリプトーム	S1	1.3-1.6	~16
	S2	3.3-4.1	~41
	S4	4.0-5.0	~48

プールするためのライブラリーのノーマライズ

- 1 希望の最終ローディング濃度に基づいて、必要なプールライブラリー濃度を決定してください。
41ページの「推奨ローディング濃度」を参照してください。

最終ローディング濃度 (pM)	プールされたライブラリーの濃度 (nM)
100	0.5
150	0.75
200	1.0
250	1.25
300	1.5
350	1.75
400	2.0
450	2.25
500	2.5

- 2 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて、希望のプールライブラリーローディング濃度にライブラリーをノーマライズしてください。
適切な濃度へのライブラリーの希釈について詳しくは、support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.htmlの「Pooling Calculator」を参照してください。

推奨ローディング濃度

最適なDNAローディング濃度はライブラリータイプおよびインサートサイズごとに異なります。インサートサイズが450 bp以下のイルミナライブラリーの推奨DNAローディング濃度を下表に示します。推奨範囲の低域ではインサートサイズの小さなライブラリーをローディングしてください。450 bpを超えるライブラリーの場合は、高濃度のローディング濃度が必要な場合があります。

表19 推奨ローディング濃度

ライブラリーのタイプ	最終ローディング濃度 (pM)	プールされたローディング濃度 (nM)
PhiX ¹	100	0.5
DNA PCRフリーライブラリープール	115-235	0.575-1.175
DNA PCR増幅ライブラリープール	200-400	1.0-2.0
シングルセル	175-275	.875-1.375

¹ PhiXのみのランの場合

HiSeq™ X、HiSeq™ 4000、またはHiSeq™ 3000用にローディング濃度を最適化している場合、NovaSeq Xpワークフローには、ほぼ同じ濃度を使用してください。NovaSeq標準ワークフロー用にローディング濃度を最適化している場合、NovaSeq Xpワークフローにはおよそ1/3未満を使用してください。



注意

ライブラリーは最適なクラスタ増幅効率を得るために、滴定される必要があります。最適なローディング濃度が決定されたら、同一のライブラリータイプに適用することができます。

ノーマライズ済みライブラリーのプールおよびオプションのPhiXコントロールの添加

- 1 適量のノーマライズされた以上の各ライブラリーを新たな遠心チューブで混合し、最終的に以下に示すレーンごとに適切な量になるようにします。

モード	レーンあたりの総プール量 (μL)
S1	18
S2	22
S4	30

例えば、6-PlexのライブラリープールおよびS4モードの場合、同じ濃度にノーマライズした各ライブラリーの5 μLを混合します。

- 2 (オプション) プールされていないライブラリーの残りを-25°C~-15°Cで保管します。
- 3 (オプション) 1%の未変性のPhiXを以下の要領で添加します。

- a 10 nM PhiXを0.25 nMに、10 mM Tris-HCl (pH 8.5) を用いて希釈します。
- b 適量のPhiXを未変性のライブラリープールのチューブに添加します。

モード	未変性のPhiX 0.25 nM (μL)	未変性のライブラリープール (μL)
S1	0.7	18
S2	0.8	22
S4	1.1	30

PhiXを添加する場合、1%がバランスの良いライブラリーのための推奨量です。多様性の低いライブラリーにはさらに多く必要な可能性があります。多様性の低いライブラリーにPhiXコントロールを用いるには、イルミナテクニカルサポートに連絡してガイダンスを受けてください。

新鮮なNaOHの調製

新鮮な0.2 N NaOHの希釈液を調製し、シーケンス用にライブラリーを変性します。NaOHの最終濃度に影響するおそれのあるピペット操作エラーを最低限に抑えるためには、希釈NaOH溶液をフローセルあたり30 μL以上調製してください。デュアルフローセルの場合は、60 μLの希釈NaOHを調製します。



警告

用時調製された0.2 Nの希釈NaOHは変性プロセスにとって不可欠です。変性が正しく行われないと、収率が下がる可能性があります。

- 1 フローセルが1つの場合は、遠心チューブに以下の分量を混合し、1 NのNaOHを0.2 Nに希釈します。
 - ▶ ラボラトリーグレード水 (24 μL)
 - ▶ ストック 1 N NaOH (6 μL)
 これらの分量は30 μLの0.2N NaOHになります。フローセルが2つの場合は、分量を2倍にしてください。
- 2 数回、転倒混和するか、十分にボルテックスします。チューブには蓋をして保管し、**12時間**以内に使用します。

ライブラリーのプールおよびオプションのPhiXコントロールの変性

- 0.2 NのNaOHを、以下のように未変性ライブラリーのプールおよびPhiX（オプション）の入ったチューブに添加します。

モード	0.2 N NaOH (μL)	未変性のライブラリープール (μL)	最終量
S1	4.0	18.0	22.0 μL、22.7 μL (PhiX添加)
S2	5.0	22.0	27.0 μL、27.8 μL (PhiX添加)
S4	7.0	30.0	37.0 μL、38.1 μL (PhiX添加)

- キャップを閉じた後、短時間ボルテックスします。
- 最長1分間、最大280 × gで遠心します。
- 変性させるため、室温で8分間インキュベートします。
- 以下の要領で、400 mMのTris-HCl、pH 8.0を添加して中和します。

モード	400 mM Tris-HCl, pH 8.0 (μL)	最終量
S1	5.0	27.0 μL、27.7 μL (PhiX添加)
S2	6.0	33.0 μL、33.8 μL (PhiX添加)
S4	8.0	45.0 μL、46.1 μL (PhiX添加)

- キャップを閉じた後、短時間ボルテックスします。
- 最長1分間、最大280 × gで遠心します。
- 変性されたライブラリーは、ExAmpマスターミックスの添加準備ができるまで氷上に静置します。
- (オプション)** ただちに進められない場合、チューブに蓋をして、-25°C~-15°Cで最長3週間保管します。解凍後は再冷凍しないでください。



警告

変性ライブラリーのプールは必要な場合にのみ保管してください。長期間保管するとデュプリケートが増加する場合があります、データ収量が減ることになります。

フローセルおよびドックの準備

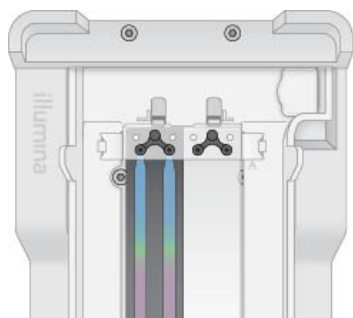
- NovaSeq Xp フローセルドックを平面上に置きます。フローセルは、装置にロードされるまで、水平を維持してください。
- ドックを点検して、微粒子がないことを確認します。
- 新しいパウダフリーの手袋を装着することで、フローセルのガラス面を汚染しないようにします。
- フローセルホイールパッケージを平面上に置き、角にあるタブからホイールを開きます。
- フローセルを覆っているプラスチック製の保持器を取り外します。
- パッケージからフローセルを取り出します。ガラスまたは裏面のガスケットに触れないよう、フローセルの両脇を持ちます。
- ガラス面のいずれかに微粒子が目視可能な場合は、リントフリーのアルコールワイプで微粒子のある側面を拭き、ラボ用リントフリー紙で乾かします。
- パッケージは適切に廃棄してください。

**注意**

フローセル上のこすり傷および他の軽微な表面上の傷は正常範囲内であり、データ品質に影響しません。

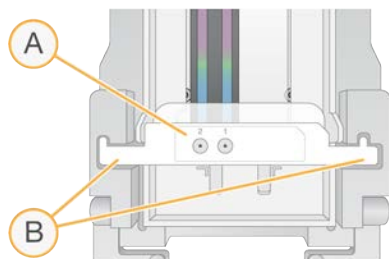
- 9 フローセルをTop面が下方を向くように裏返しにします。
- 10 ブラケットの下にフローセルの排出口を滑らせて、ドック上に置きます。「13ページの「フローセル」および16ページの「NovaSeq Xpフローセルドック」を参照してください。

図17 フローセルの配置



- 11 ウェル面を上に向けて、フローセルの注入口の上にNovaSeq Xp マニフォールドをロードします。NovaSeq Xp マニフォールドのアームが、ドックのカットアウトにしっかりとハマることを確認します。

図18 NovaSeq Xp マニフォールドの配置



- A 上に向けられたNovaSeq Xp マニフォールドウェル面
 B ドックのカットアウトに配置されたNovaSeq Xp マニフォールドアーム

- 12 クランプを閉じて、フローセルおよびNovaSeq Xp マニフォールドを固定し、ガスケットを密閉します。
- 13 ライブラリーのプールをフローセルにロードしたら、NovaSeq Xp マニフォールドを廃棄します。NovaSeq Xp マニフォールドは単回使用に限定されます。

ExAmp マスターミックスの調製

ExAmp マスターミックスを調製する場合、必要量の2倍以上の容量がある遠心チューブを使用します。

- ▶ 2レーンフローセルの場合は、0.5 mLまたは1.7 mLのチューブを使用します。
- ▶ 4レーンフローセルの場合は、1.7 mLのチューブを使用します。

手動でExAmp試薬を混合したときに生じる結果のばらつきの最も主な要因は、送液された分量の不正確さと混合が不十分であることです。混合は十分に行ってください。

- 1 短時間、転倒混和またはボルテックスを行ってDPX1とDPX2を混合します。
- 2 DPX3を短時間ボルテックスして混合します。

ExAmp試薬は保管庫内で分離するおそれがあります。この種の試薬は高い粘性を示します（特にDPX2およびDPX3）。その高い粘性により、倒置してもDPX3は容易に混合しません。

- 3 DPX1、DPX2、およびDPX3を短時間遠心します。
- 4 以下に示す分量を適切な遠心チューブの中で指定順に混合します。

添加順序	試薬*	2レーンフローセルの分量 (S1/S2) (μL)	4レーンフローセルの分量 (S4) (μL)
1	DPX1	126	315
2	DPX2	18	45
3	DPX3	66	165

*DPX試薬チューブのキャップは色分けされている場合があります（DPX1、DPX2、およびDPX3がそれぞれ、赤色、黄色および青色）。チューブキャップの交換の際に、色分けが維持されることを確認してください。

これらの分量は、S1またはS2モードの場合はExAmpマスターミックス210 μL、S4モードの場合はマスターミックス525 μLになります。これらの分量は適用するモードに十分な量です。含まれている余分な分量は、フローセルへのライブラリーのロードの際のピペット操作エラーに対応するためのものです。

- 5 ピペットを用いてゆっくりと分注することで、気泡の発生を回避し、チップから全量を確実に排出することができます。
- 6 20～30秒、または十分に混合されるまでボルテックスします。



注意

ExAmpマスターミックスはボルテックスしても安定しています。

その混合液は濁ることがありますが、正常な状態です。

- 7 最長1分間、最大280 × gで遠心します。
- 8 シーケンスの性能を最善にするために、ただちに次のステップに進みます。必要な場合、理想的には、マスターミックスを氷上に1時間以内保管します。室温で保管する場合は30分以内に使用してください。

フローセルへのライブラリーのロード

最善の結果を得るため、以下の手順に従います。

- ▶ ロードしたフローセルは室温で維持します。冷却したり、氷上に静置したりしないでください。
 - ▶ インキュベーションが長引くと、フィルターを通過するクラスターの割合（%PF）が低下します。
 - ▶ プールしたライブラリーがフローセルにロードされてから30分以内にランを開始します。
 - ▶ ExAmp/ライブラリーミックスを即時に用いることで、最善の結果を得ることができます。
- 1 ExAmpマスターミックスを、変性したライブラリーのプールそれぞれに、以下の要領で添加した後、20～30秒間ボルテックスして混合します。
チューブストリップを用いる場合、均質になるまでピペットで混合します。

モード	変性したライブラリーのプール (μL)	ExAmpマスターミックス (μL)	最終量 (μL)
S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 2 最長1分間、最大280 × gで遠心します。
- 3 p200 μLピペットを用いて、適量のExAmp/ライブラリー混合液を各NovaSeq Xpマニフォールドウェル

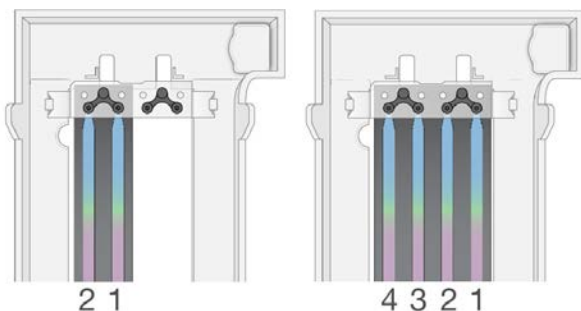
に添加します。

- ▶ 気泡の生成を防ぐには、サンプルをゆっくりロードします。
- ▶ 目的のレーンに対応するウェルにライブラリー/ExAmp混合液が添加されることを確認します。
- ▶ ピペットを操作する際に、ウェル底部にあるフィルターに接触しないようにしてください。
- ▶ 1つのレーンが完全に充填されるまで、残りのマニフォールドウェルへの混合液の添加を待つ必要はありません。

モード	ウェルあたりのライブラリー/ExAmp混合液 (μL)
S1	80
S2	95
S4	130

NovaSeq Xp マニフォールドウェルの番号はフローセルのレーン番号と一致します。フローセルが倒置されると、レーンの採番は逆になります。

図19 倒置されるレーンの採番



- 4 ExAmp/ライブラリー混合液をマニフォールドウェルすべてに添加したら、およそ2分間待って、混合液を各レーンの反対端に到着させます。
レーンの排出口の小さな気泡は正常です。少量の混合液がレーン充填後にマニフォールドウェルに残る場合があります。



警告

レーンの充填や気泡の有無の判断のためにフローセルを傾けないでください。傾けると、ExAmp/ライブラリー混合液がフローセルから漏れる可能性があります。レーンが完全に充填されていない場合、修正しようとししないでください。部分的に充填されたレーンからのデータ収率は低下するおそれがあります。フローセルからサンプルを取り出そうとししないでください。



注意

フローセルは輸送時に傾けないでください。

SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジの調製

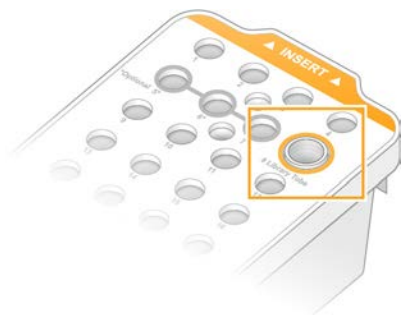
- 1 各カートリッジの下部を点検して、リザーバーに氷がないこと、すなわち試薬が融解していることを確認します。
- 2 各カートリッジを10回転倒混和し、試薬を混合します。
- 3 ベンチに各カートリッジの底を軽くタップして、気泡を減らします。

空のライブラリーチューブのロード

- 1 NovaSeq 6000 Reagent Kitに付属のライブラリーチューブの蓋を外します。
- 2 蓋を外した、空のライブラリーチューブをクラスターカートリッジのライブラリーチューブ 位置番号8に挿入します。

空のライブラリーチューブはRFID スキャンや装置上での試薬混合の際に所定の位置にある必要があります。ライブラリーチューブのバーコードはLIMSファイルに指定されたバーコードに対しては有効ではありません。RFID が有効となり、チューブが使用されていないことが確認されます。

図20 蓋が外され、位置番号8にロードされたライブラリーチューブ



第6章 シーケンス

シーケンスランのセットアップ	48
ランの進捗状況のモニタリング	54
ランの交互スタート	55
ランの削除	55
位置番号30の取り外し	56
自動ポストランウォッシュ	57

シーケンスランのセットアップ

イルミナでは、NVCSがランニング中でシーケンスランが進行中の間はログインを維持することを推奨しています。

- 1 装置の表面に何かある場合は取り除きます。
シーケンスラン中は装置の表面をきれいに保ち、装置にもたれかからないようにします。フローセルドアに圧力がかかると、ドアが開くおそれがあり、ランが停止してしまいます。ランを停止すると、再開することができません。



注意

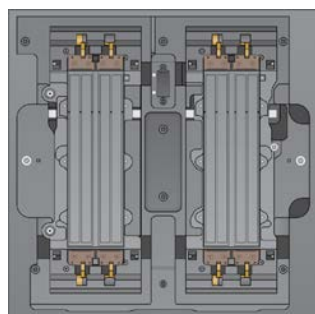
新しいランの交互スタートはサポートされます。交互スタートタイマーは交互スタートランが開始できる時間を示しています。詳細については、55ページの「ランの交互スタート」を参照してください。

- 2 [Home] 画面から、[Sequence] を選択した後、シングルフローセルランまたはデュアルフローセルランを選択します。
 - ▶ A+B：デュアルフローセルランをセットアップ
 - ▶ A：A側にシングルフローセルランをセットアップ
 - ▶ B：B側にシングルフローセルランをセットアップソフトウェアにより、[Load] 画面からはじまる一連のランセットアップ画面が開始されます。
- 3 [OK] を選択して、警告を確認しフローセルのドアを開けます。

装置へのフローセルのロード

- 1 前回のランのフローセルが残っている場合は取り出します。
- 2 微粒子がフローセルステージ上に目視可能な場合は、アルコールワイプで、流体インターフェースおよび光学アライメントターゲットのガラス面を含むステージ全体を拭き取ります。リントフリー紙で吸い取ります。

図21 フローセルステージ



- 3 (標準ワークフロー) フローセルをパッケージから以下の要領で取り出します。

- a 新しいパウダーフリーの手袋を装着することで、フローセルのガラス面を汚染しないようにします。
- b 平面上にパッケージを置き、角にあるタブからホイルを開きます。
- c フローセルを覆っているプラスチック製の保持器を取り外します。
- d パッケージからフローセルを取り出します。ガラスまたは裏面のガスケットに触れないよう、フローセルの両脇を持ちます。
- e ガラス面のいずれかに微粒子が目視可能な場合は、リントフリーのアルコールワイブで微粒子のある側面を拭き、ラボ用リントフリー紙で乾かします。
- f パッケージは適切に廃棄してください。

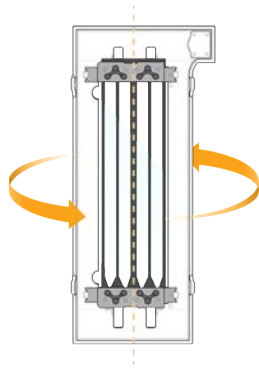


注意

フローセル上のこすり傷および他の軽微な表面上の傷は正常範囲内であり、データ品質に影響しません。

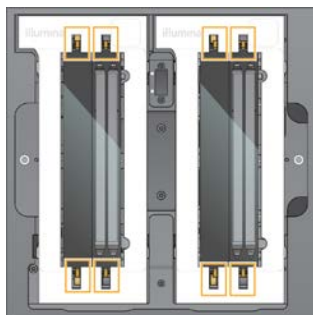
- 4 (NovaSeq Xpワークフロー) フローセルをドックからの以下の要領でアンロードします。
 - a フローセルとマニフォールドの固定用クランプを開きます。
 - b 液体がフローセル上に滴下しないようにして、マニフォールドを慎重に取り外して廃棄します。
 - c 液体がフローセル上に滴下した場合、リントフリーのアルコールワイブで拭き、ラボ用のリントフリー紙で乾かします。
 - d フローセルの両側を持って、ドックから取り外します。フローセルは水平を維持してください。
 - e ガスケット上に残留物質がある場合は、4つのフローセルガスケットをリントフリー紙で拭き取ります。ガスケットには触らないでください。
 - f フローセルをTop面が上を向くようにして、長軸を中心に回転混和します。

図22 フローセルを長軸を中心に回転混和



- g ドックを保管庫に戻す前に点検して、微粒子がないことを確認します。
- 5 突起しているクランプ4個にフローセルを位置合わせして、フローセルステージに置きます。

図23 クランプに位置合わせされロードされたフローセル



- 6 [Close Flow Cell Door] を選択します。
フローセルドアが閉じ、センサーとRFIDがチェックされ、フローセルIDが画面に表示されます。

SBSカートリッジおよびクラスターカートリッジのロード

注意

NovaSeq Xpワークフローの場合、クラスターカートリッジのロード前に、蓋を外した空のライブラリーチューブがカートリッジにロードされていることを確認してください。

- 液体コンパートメントドアを開けてから、試薬チラードアを開けます。
- 使用済みのSBSカートリッジとクラスターカートリッジを取り外します。
使用済みのカートリッジのホイールシールには穴が開いています。
- 適切な基準に従って未使用の中身を廃棄してください。
クラスターカートリッジの位置番号30の安全な廃棄については、56ページの「位置番号30の取り外し」を参照してください。
- 準備ができたカートリッジを試薬チラー引き出しにロードし、[Insert] ラベルが装置の背面を向くようにします。
 - ▶ SBSカートリッジ（灰色ラベル）を左の位置に置きます。
 - ▶ 右側の位置に、蓋を外したライブラリーチューブを含むクラスターカートリッジ（オレンジラベル）を入れます。

図24 ロード済みの試薬カートリッジ

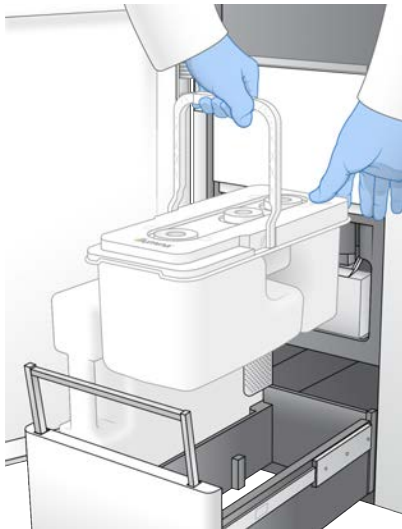


- 5 チラーに引き出しをスライドさせた後、試薬チラードアを閉じます。
センサーとRFIDがチェックされます。ライブラリーチューブおよびカートリッジ2個のIDが画面に表示されます。

バッファークートリッジのロード

- 1 金属ハンドルを引いてバッファークートリッジを引き出しを開けます。
- 2 使用済みのバッファークートリッジをバッファークートリッジの右側から取り除きます。
使用済みバッファークートリッジのホイルシールは穴が開いています。
- 3 バッファークートリッジに新しいバッファークートリッジを入れ、**[Illumina]** のラベルが引き出しの正面を向くようにします。カートリッジを引き出しの床および側面の隆起したガイドの位置に合わせます。
正しくロードされると、バッファークートリッジは水平に置かれ、引き出しを閉じることができます。

図25 バッファークートリッジのロード



- 4 廃液ボトルが両方とも空になっている場合は、両方の廃液ボトルが空であることの確認用のチェックボックスを選択します。



警告

廃液ボトルを空にしないと、ランの停止やオーバーフローを招くおそれがあり、それによって装置が破損し、安全上のリスクが生じます。

- 5 利用可能なボタンを選択します。
 - ▶ **Log In** : BaseSpace Sequence Hubにサインインするために [Log In] 画面を開きます。
[BaseSpace Sequence Hubへのサインイン] に進みます。
 - ▶ **Run Setup** : BaseSpace Sequence Hubをスキップし、ランパラメーターを入力するために [Run Setup] 画面を開きます。52ページの「ランパラメーターの入力」に進みます。
 利用可能になるボタンは、システムがBaseSpace Sequence Hub用に設定されているか否かで異なります。

BaseSpace Sequence Hubへのサインイン

NVCSを開いた際に、BaseSpace Sequence Hubのデフォルトワークグループは任意のワークグループとして選択されています。デフォルトを指定しない場合、個人のワークグループが選択されます。

- 1 **(オプション)** 実行中のランのBaseSpace Sequence Hub設定を更新します :
 - ▶ BaseSpace Sequence Hubを無効にするには、**[BaseSpace Sequence Hub]** チェックボックスの選択を解除した後、**[Run Setup]** を選択してサインインせずに進みます。

- ▶ リモートモニタリングおよびデータ解析のためにBaseSpace Sequence Hubにランデータを送信するには、**〔Run Monitoring and Storage〕** を選択します。このオプションにはサンプルシートが必要です。
 - ▶ ランのリモートモニタリングのためにInterOp ファイル、runinfo.xmlファイルおよびrunParameters.xmlファイルをBaseSpace Sequence Hubに送信する場合は、**〔Run Monitoring Only〕** を選択します。
- 2 BaseSpace Sequence Hubのユーザー名およびパスワードを入力した後、**〔Sign In〕** を選択します。
 - 3 プロンプトが表示されたら、ランデータをアップロードするワークグループを選んだ後、**〔Run Setup〕** を選択します。
複数のワークグループに属する場合のみ、プロンプトが表示されます。

ランパラメーターの入力

- 1 NovaSeq Xpワークフローを有効化したら、ワークフロータイプを選択します。
 - ▶ **〔NovaSeq Xp〕** を選択する場合、空のライブラリーチューブがロードされていることを確認します。
 - ▶ **〔NovaSeq Standard〕** を選択する場合、サンプルがライブラリーチューブにロードされていることを確認します。
- 2 **〔Run Name〕** フィールドには、実行中のランを識別するための任意の名前を入力します。ラン名には英数文字、ハイフン、およびアンダースコアを使用できます。
- 3 シーケンスランの各リードおよびインデックス長に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) プライマー用に20サイクルまでの値を入力します。
 - ▶ **Index 2** : インデックス2 (i5) プライマー用に20サイクルまでの値を入力します。
 - ▶ **Read 2** : 151サイクルまでの値を入力します。この値は通常、Read 1の値と同じです。



注意

リード1およびリード2で分析されたサイクル数は、入力値より1サイクル少ない数です。例えば、ペアエンドの150サイクルラン (2 × 150 bpラン) を実行するには、リード1およびリード2には151サイクルの値を入力します。

入力された4つの値の合計は、選択された試薬キットの表示されたサイクル数を、ペアエンドランの場合は最大23サイクル、シングルリードランの場合は最大30サイクル超過することができます。

- 4 実行中のランに追加の設定を適用するには**〔Advanced Options〕** を開きます。指示のある場合を除き、これらの設定はオプションです。
 - ▶ **Custom Primers** : **〔Custom Primers〕** チェックボックスを選択した後、適切なチェックボックスを選びます。
 - ▶ **Read 1** : リード1用カスタムプライマーを使用します。
 - ▶ **Read 2** : リード2用カスタムプライマーを使用します。
 - ▶ **Custom Index** : インデックス1用カスタムプライマーを使用します。
 - ▶ **Output Folder** : **〔Browse〕** を選択し、実行中のラン用の出力フォルダーを変更します。出力フォルダーが必要とされるのは、ランの保管用にBaseSpace Sequence Hubが接続されていない場合です。
 - ▶ **Samplesheet** : **〔Browse〕** を選択し、サンプルシートをアップロードします。これは、ランのモニタリング、保管、あるいは他のCSV ファイルのために、BaseSpace Sequence Hubを用いる場合に必須です。CSV ファイルは出力フォルダーにコピーされますが、ランパラメーターに影響を与えることはありません。

- ▶ **Custom Recipe** : [Custom Recipe] を選んだ後、 [Browse] を選択して、このランのXML フォーマットにカスタムレシピを使用します。



注意

カスタムレシピのクラスタリングステップの修正はサポートされません。

- 5 [Review] を選択します。
ソフトウェアは設定されたパラメーターが、レシピに適切であることを確認します。

ランパラメーターの確認

- 1 [Review] 画面に表示されたランパラメーターを確認します。
- 2 (オプション) [Back] を選択し [Run Setup] 画面に戻り、ランパラメーターを編集します。
- 3 [Start Run] を選択します。
プレランチェックが自動的に開始されます。

プレランチェックの確認

- 1 プレランチェックが完了するまで約5分間待機します。
正常に完了すると、ランが自動的に開始します。



注意

ハードドライブの容量オーバーを防ぐために、ラン開始後、C:ドライブにはデータを一切コピーしないでください。

- 2 フローセル非検出などのセンサーエラーによってプレランチェックが失敗した場合、ワークフローを終了し、再開する必要があります。
- 3 その他のプレランチェックが失敗したら、 [Retry] を選択して失敗した項目のみをやり直すか、 [Retry All] を選択して全項目をやり直します。
ランを開始するには、エラーを解消する必要があります。トラブルシューティングについて詳しくは、63ページの「プレランチェックのエラー」を参照してください。
- 4 [Error] アイコンを選択してエラーの詳細を参照します。
- 5 アライメントチェックが失敗した場合は、以下のとおりにエラーを解消してください。
 - a [Reload] を選択した後、 [OK] を選んで [Load] 画面に戻ることを確認します。
 - b 装置上部からすべてのアイテムを取り外し、 [OK] を選択します。
 - c フローセルをリロードした後、 [Run Setup] を選択します。
 - d 各画面に進み、各RFIDを再度読んで [Pre-Run Checks] 画面に戻ります。
 - e チェックをやり直します。

ランの進捗状況のモニタリング

- 画面にメトリクスが表示されると、ランの進捗状況、蛍光強度、クオリティスコアをモニタリングできます。
ランメトリクスの詳細については、67ページの「Real-Time Analysis」を参照してください。

図26 シーケンスランの進捗状況およびメトリクス



- A 完了時間：ランが完了する日付および時間 (yyyy-mm-dd hh:mm)。
 B ランの進捗状況：実行中のランのステップ。進捗バーのサイズは各ステップのラン比率に比例しません。
 C Q-scores：クオリティスコア (Qスコア) の分布。
 D Intensity：各タイトルの90パーセンタイルのクラスター蛍光強度値。プロット色は赤および緑のチャンネルを示します。
 E Clusters passing filter (%)：フィルターを通過するクラスターの割合。
 F Estimated yield (Gb)：実行中のランの推定取得塩基数。
 G Q30：Qスコアが30以上のベースコールの割合。



注意

NVCSがランニング中にシャットダウンまたは再起動を開始する場合、シャットダウンまたは再起動の進行前に、ユーザーはこのアクションを承認する必要があります。

ランメトリクス

ソフトウェアにより、ラン実行中に生成されたメトリクスが表示されます。RTA3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、メトリクスがプロット、グラフ、および表の形式で表示されます。

クラスタリングには約2時間かかり、その後、サイクル1からシーケンスが始まります。メトリクスはシーケンスの進捗とともに更新されます。サイクル26の後、フィルターを通過するクラスター、収量、およびクオリティスコアが利用可能です。

処理ステータス

[Process Management] 画面には各ランのステータスがリストされます。[Main Menu] から [Process Management] を選択します。

[Process Management] 画面にラン名ごとに次のプロセスのステータスがリストされます：

- ▶ **Run Status**：CBCLファイルの処理に基づきます。
- ▶ **Network**：Universal Copy Serviceを用いたファイル転送に基づきます。
- ▶ **BaseSpace**：該当する場合に、BaseSpace Sequence Hubのファイルアップロードに基づきます。

プロセスが完了すると、緑のチェックマークが表示されます。詳細は、9ページの「Process Management」を参照してください。

ランの交互スタート

装置の片側でランが進行中の間に、アイドル中のもう片側でランを設定し開始することができます。これを交互スタートと呼びます。次の開始カウントダウンタイマーのステータスの表示に従って、ラン実行中の特定の時間で交互ランのセットアップを行います。

- ▶ **ラン開始：有効**：交互スタートは現在利用できます。日付と時刻は交互スタートが無効になる時を示しています。[Sequence] を選択すると、進行中のサイクルの完了後に新たな交互ランが開始されます。
- ▶ **ラン開始：無効**：交互スタートは現在利用できません。日付と時刻は、装置のもう片側で交互スタートが有効になる時を示しています。
- ▶ **待機中**：交互スタートが無効の際に新しいランを行うとした場合、ステータスは待機中となり、日付と時刻が表示され、装置が新しいランの準備を整うおおよその時を表示します。交互スタートが有効になると、装置はランセットアップに進みます。

新しいランをセットアップする場合、ソフトウェアは必要に応じて自動的に一時停止となり、隣のフローセルのランを再開します。システムは一時停止時に安全な状態に置かれます。

手順

- 1 [Home] 画面から、[Sequence] を選んだ後、[A] または [B] を選択します。
選択した方は現在アイドル中である必要があります。
- 2 隣のフローセルのランが一時停止するのを待ちます。新しいランをキャンセルし既存のランの一時停止をさせないためには、[Cancel] を選択します。
隣のランでクラスター形成、ペアエンド再合成、イメージング、または洗浄が行われている場合、ソフトウェアは一時停止前に実行中のステップを完了します。
- 3 隣のランが一時停止し、フローセルドアが開いたら、新しいランを設定します。
新しいランの開始時に、一時停止されたランは自動的に再開され、次に新たなランが始まります。

ランの削除

データ転送完了後、現在のランをProcess Managementから削除して次のランのためにスペースをクリアすることができます。ランを削除すると、CEとC:\はクリアされますが、システムメンテナンスファイルは削除されず、ネットワークやBaseSpace Sequence Hubコピーに影響が及ぶことはありません。シーケンス中のランは削除できません。

- 1 [Main Menu] から [Process Management] を選択します。

- 2 (オプション) ランのプロセスそれぞれに緑のチェックマークが表示され、データ転送が完了したことを確認してください。
ネットワークやBaseSpace Sequence Hubへの転送が未完了の場合、ランを削除することができますが、全ランデータが失われます。
- 3 [Delete Run] を選択した後、[Yes] を選択して確認します。
- 4 [Done] を選択します。

位置番号30の取り外し

クラスターカートリッジの位置番号30のリザーバーにはホルムアミドが含まれます。これは使用済みのクラスターカートリッジから取り除かれ、別途廃棄されます。



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。

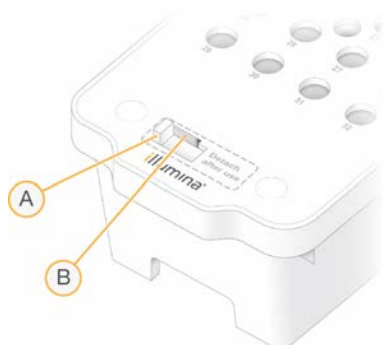
- 1 手袋を着用したままで、[Detach after use] とラベル付けされた白いプラスチックタブを右へ押しします。
- 2 手または固体表面をリザーバーの下に置き、透明なプラスチックタブをイルミナのラベルに向かって押し下し、クラスターカートリッジの下からリザーバーをリリースします。



注意

クラスターカートリッジを重ねて保管しないこと。重ねると、リザーバーが偶発的に剥離する場合があります。

図27 位置番号30の取り外し可能リザーバー



- A 取り外し用のプラスチック製の白いタブ
- B リリース用のプラスチック製の透明のタブ

- 3 適切な基準に従ってリザーバーを廃棄してください。

自動ポストランウォッシュ

シーケンスが完了すると、ソフトウェアは約80分かかる自動ポストランウォッシュを開始します。位置番号17から0.24%の次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) が圧送され、0.12%に希釈されます。0.12%のNaOClはフローセルを通過して、ExAmp試薬およびライブラリー位置に圧送された後、廃液ボトルに達します。この洗浄によって、クロスコンタミネーションを防ぐためにシステムからテンプレートが洗い流されます。

洗浄が完了すると、システムは安全な状態になり、[Home] ボタンが有効になります。次回のラン実行まで消耗品を置いたままにしてください。洗浄後、空気がシステム内に入らないようにSBSカートリッジとクラスタカートリッジ内にシッパーが下がったままとなります。バッファカートリッジ内のシッパーが上がると、廃液ボトルを空にすることができるようになります。



注意

自動ポストランウォッシュの間にエラーが生じた場合、およびポストランウォッシュが未完全の場合、メンテナンスウォッシュが必要になります。

第7章 メンテナンス

Preventive Maintenance (PM)	58
メンテナンスウォッシュの実施	58
ソフトウェアのアップデート	61

Preventive Maintenance (PM)

イルミナでは、PM（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、PMサービスを手配してください。

メンテナンスウォッシュの実施

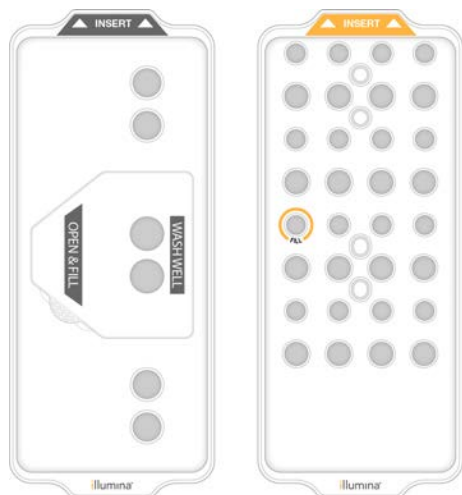
次の場合、ソフトウェアプロンプトでメンテナンスウォッシュが要求されます。

- ▶ 過去14日以内にポストランウォッシュを行った4レーンランがない場合。
- ▶ 過去14日以内にメンテナンスウォッシュが行われていない場合。
- ▶ ポストランウォッシュの失敗または未完了の場合。

メンテナンスウォッシュでは、ユーザーが用意するTween 20とNaOClの希釈液を用いてシステムを洗浄します。希釈液は洗浄カートリッジからフローセル、廃液ボトルおよび各カートリッジリザーバーに圧送され、すべてのシッパーを洗浄します。洗浄時間はおよそ80分です。

メンテナンスウォッシュには、使用済みバッファークートリッジおよびSBS洗浄カートリッジ、クラスター洗浄カートリッジ、および装置に付属の4レーン洗浄フローセル（または使用済みの4レーンフローセル）が必要です。試薬カートリッジと同様に、洗浄カートリッジはローディングエラーを防ぐために色分けされています。SBS洗浄カートリッジには、Tween 20の希釈のためにセンターウェルがあります。NaOCl希釈液はクラスター洗浄カートリッジのリザーバーに添加されます。

図28 SBS洗浄カートリッジ（左）およびクラスター洗浄カートリッジ（右）



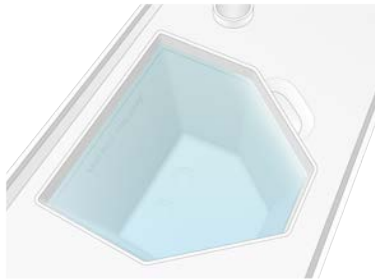
洗浄溶液の調製

- 1 ラボラトリーグレード水400 mLを500 mLの遠心ボトルに添加します。
- 2 100% Tween 20を0.2 mL添加して、0.05% Tween 20洗浄溶液を400 mL以上調製します。

用時調製されたTween 20の希釈液を用いることで、バイオ汚染物質の流路システムへの侵入を制限します。

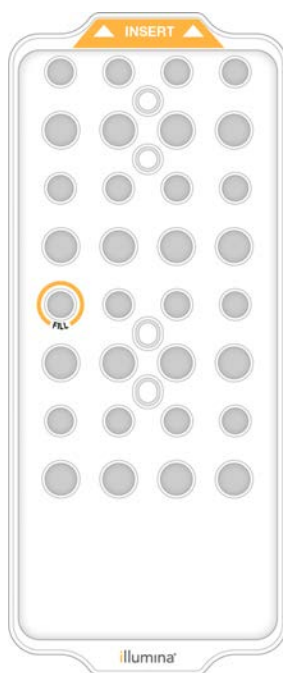
- 3 転倒混和します。
- 4 SBS洗浄カートリッジのセンターウェルから蓋を取り除きます。
- 5 センターウェルに洗浄溶液を添加します。洗浄溶液の最低必要容量を示す充填ラインまでは充填してください。
その他のリザーバーは空のままです。

図29 [MIN FILL VOLUME] のラインまで充填されたセンターウェル



- 6 30 mLの遠心チューブに次の分量を混ぜて、0.25%のNaOClを20 mL調製します：
 - ▶ 5% NaOCl (1 mL)
 - ▶ 脱イオン水 (19 mL)
- 7 転倒混和します。
- 8 クラスター洗浄カートリッジに0.25% NaOClを5 mL添加します。
その位置には [Fill] と印字され、オレンジ色の円で囲まれ示されています。その他のリザーバーはすべて空のままです。

図30 0.25% NaOCl用の位置



洗浄フローセルのロード

- 1 装置の表面に何かある場合は取り除きます。
メンテナンスウォッシュ中は表面をきれいに保ち、装置にもたれかからないようにします。フローセルドアに圧力がかかると、ドアが開くおそれがあり、洗浄が停止してしまいます。
- 2 [Home] 画面で [Wash] を選択し洗浄する側を選びます。
 - ▶ A+B：両側を同時に洗浄
 - ▶ A：A側のみの洗浄
 - ▶ B：B側のみの洗浄
 ソフトウェアにより、一連の洗浄画面が開始されます。



注意

片側のメンテナンスウォッシュは、もう片側が待機状態かSBSのリードサイクルを実行中の場合のみ開始することができます。NVCS交互スタート時間は、新しいランまたはウォッシュを開始するために装置が使用可能であることを示しています。55ページの「ランの交互スタート」を参照してください。

- 3 [OK] を選択して、警告を確認しフローセルのドアを開けます。
- 4 洗浄フローセル、または使用済みの4レーンフローセルがまだない場合は、1つロードします。
- 5 [Close Flow Cell Door] を選択します。
ドアが閉じ、センサーとRFIDがチェックされ、フローセルIDが画面に表示されます。

洗浄カートリッジのロード

洗浄カートリッジはメンテナンスウォッシュに必要です。使用済みのSBSカートリッジとクラスターカートリッジは使用しないでください。

- 1 液体コンパートメントドアを開けてから、試薬チャードアを開けます。
- 2 使用済みのSBSカートリッジおよびクラスター試薬カートリッジを取り外します。適切な基準に従って未使用の中身を廃棄してください。
クラスターカートリッジの位置番号30の安全な廃棄については、56ページの「位置番号30の取り外し」を参照してください。
- 3 洗浄カートリッジを試薬チャラー引き出しにロードし、[Insert] ラベルが装置の背面を向くようにします。
 - ▶ SBSカートリッジ（灰色ラベル）を左の位置に置きます。
 - ▶ クラスターカートリッジ（オレンジラベル）を右の位置に置きます。
- 4 チャラーに引き出しをスライドさせた後、試薬チャードアを閉じます。
センサーはチェックされ、各カートリッジのRFIDはスキャンされて画面上に表示されます。
- 5 バッファードアを開けます。
- 6 まだロードされていない場合は、使用済みのバッファードアカートリッジをロードします。

廃液ボトルを空にする

以下の手順を用いて、メンテナンスウォッシュごとに廃液ボトルを空にしてください。使用済み試薬を外部に送液するようにシステムが設定されていても、廃液ボトル（小）には廃液が送られ、廃液ボトル（大）は所定の位置に配置されている必要があります。

**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。

- 1 廃液ボトル（小）を取り出し、適切な規格に従って中身を廃棄します。中身を他ボトルの中身から離しておきます。
- 2 廃液容器（小）を装置内の所定位置に戻します。
- 3 廃液ボトル（大）を取り出し、適切な規格に従って中身を廃棄します。
- 4 廃液ボトル（大）をバッファード引き出しに戻します。
- 5 新しいパウダーフリーの手袋をつけます。
- 6 バッファード引き出しを閉じた後、液体コンパートメントドアを閉じます。センサーとRFIDがチェックされます。各洗浄コンポーネントのIDが画面に表示されます。

洗浄の開始

- 1 チェックボックスを選択して両方の廃液ボトルが空であることを確認した後、[Start Wash] を選択します。洗浄が開始され、洗浄完了までの予測時間が表示されます。

**警告**

ボトルを空にしないと洗浄が停止し、オーバーフローが起きる可能性があります。それによって装置が損傷し安全上のリスクが生じます。

- 2 洗浄が完了したら [Home] を選択します。
- 3 次回のラン実行まで消耗品を置いたままにしてください。空気がシステム内に入らないようにSBSカートリッジとクラスターカートリッジ内にシッパーが下がったままとなります。バッファードカートリッジ内のシッパーが上がると、廃液ボトルを空にできません。

ソフトウェアのアップデート

ソフトウェアのアップデートはNVCS v1.4またはそれ以降のバージョンで利用可能です。ソフトウェアのアップデートはNVCSからダウンロードおよびインストールすることができます。デフォルトでソフトウェアアップデートの自動チェックが有効になっています。設定から自動アップデートの無効または有効が可能です。

**注意**

NovaSeq 6000のソフトウェアアップデートの更新チェック、およびアップデートのダウンロードにはインターネットに接続する必要があります。

アップデートの自動チェックは24時間ごとに行われます。アップデートが利用可能な場合は、[Main Menu] に通知が表示されます。アップデート通知はすべてのユーザーが見ることができますが、管理者のみが更新のダウンロードおよびインストールを行うことができます。

NovaSeq Xpワークフローの場合は、サンプルまたは消耗品の準備を始める前に、NVCSのバージョンが以下の表に示すソフトウェアの最低要件を満たすことを確認してください。

表20 ソフトウェアの最低要件

フローセル	ソフトウェアの最低バージョン
S1	1.3.1
S2	すべて
S4	1.2.0

**注意**

シーケンスラン、洗浄、ランセットアップ、または出力フォルダーもしくはBaseSpace Sequence Hubへのファイル転送が進行中の場合、ソフトウェアのアップデートはできません。NovaSeq Xpワークフローが進行中の場合は、ライブラリーがフローセルにロードされ、シーケンスが完了するまで、ソフトウェアのアップデートを待ちます。

手動でアップデートをチェック、ダウンロードおよびインストールするには、次の要領で行ってください。

- 1 [Main Menu] から [Software Update] を選択します。
[Software Update] 画面が表示されます。ソフトウェアアップデートの自動チェックが有効でない場合、手動でアップデートをチェックできますが、自動チェックを有効にすることも可能です。
- 2 アップデートをダウンロードおよびインストールするには、ダウンロードとインストレーションにおよそ30分かかることの確認用のチェックボックスを選択します。
- 3 [Download and Install] を選択します。
ダウンロードが終了したら、NVCSが閉じてインストーラーが開始されます。インストーラーの指示に従いインストールを完了します。
ダウンロードまたはインストール中にエラーが生じた場合は、イリミナテクニカルサポートにご連絡ください。

付録A トラブルシューティング

トラブルシューティングリソース	63
トラブルシューティングファイル	63
プレランチェックのエラー	63
Process Managementのトラブルシューティング	64
クラスタリング前のラン失敗	65
ランの強制終了	66
装置のシャットダウン	66

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、[イルミナウェブサイトのNovaSeq 6000シーケンサーシステムサポートページ](#)を参照してください。サポートページにはマニュアル、ダウンロード、およびFAQが掲載されています。サポート掲示板にアクセスするには、MyIlluminaアカウントにサインインしてください。

ランの品質やパフォーマンスの問題については、イルミナテクニカルサポートにお問い合わせください。84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促進のために、イルミナテクニカルサポートとBaseSpace Sequence Hub内のランサマリーへのリンクの共有をご検討ください。

トラブルシューティングファイル

キーファイル	フォルダー	内容説明
ランの情報ファイル (RunInfo.xml)	ルートフォルダー	以下のラン設定値が含まれます。 <ul style="list-style-type: none">ランあたりのサイクル数ランあたりのリード数リードがインデックスされているかどうかフローセル上のスワスとタイルの数
ランパラメーターファイル (RunParameters.xml)	ルートフォルダー	ラン名ならびにランパラメーターおよびランコンポーネントに関する次のRFID情報などの情報が含まれます。シリアル番号、ロット番号、有効期限、およびカタログ番号。
InterOpファイル (*.bin)	InterOp	Sequencing Analysis Viewerに使用されるバイナリーレポートファイル。 InterOpファイルはラン全体を通じて更新されます。
ログファイル	ログ	ログファイルには各サイクルで装置が実行した各ステップが、使用された試薬を含め記載され、ランで使用され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。[装置名]_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。

プレランチェックのエラー

プレランチェック中にエラーが発生した場合は、次のアクションをとってエラーを解消してください。デュアルフローセルランをセットアップする場合に片側が失敗すると、失敗した側をキャンセルし、成功した側で継続することができます。

プレランチェックが失敗すると、フローセル、試薬、およびバッファのRFIDはロックされないため、消耗品を以降のランに使用することができます。ランが開始されると、シッパーが試薬カートリッジのホイールシールに穴が開き、RFIDはすべてロックされます。

システムチェック	失敗理由	推奨措置
Sensors	コンパートメントドアが開いているか、正しくロードされていない消耗品がある、または少なくとも1つのセンサーが機能していません	[Retry] を選択して、画面上のプロンプトに従ってエラーを解消してください
Disk Space	指定された出力フォルダーのネットワークセッションが一杯で十分なディスクスペースがありません	[Process Management] 画面を用いて、指定の出力フォルダーからディスクスペースをクリアします
System Connectivity	RTA3、流路システム、またはその他の接続が中断されました	[Retry] を選択して、画面上のプロンプトに従ってエラーを解消してください
Alignment	フローセルの位置がイメージングを妨げています	画面上のプロンプトに従ってフローセルをリロードします

リークトレイ

リークトレイは装置の土台に組み込まれており、試薬または冷却液の液漏れや廃液ボトルからのオーバーフローを捕集します。通常はリークトレイは乾いています。液漏れは装置に問題があることを示し、オーバーフローは廃液ボトルが定期的に空にされない場合に発生します。

プレランチェック中に、リークトレイに何らかの液体が入っているかをセンサーが検知します。

- ▶ リークトレイに液体があるが一杯ではない場合、ランは進行できますが、イルミナテクニカルサポートに連絡する必要があります。84ページの「テクニカルサポート」を参照してください。
- ▶ リークトレイが一杯である場合にはランは進行できず、イルミナテクニカルサポートに連絡する必要があります。



警告

ランごとに廃液ボトルを空にしてください。廃液ボトルのいずれかが一杯になると、ランが停止します。廃液ボトルのいずれかからのオーバーフローがあると、装置が破損し、イルミナ担当者のオンサイト対応が必要となり、安全上のリスクが生じます。

Process Managementのトラブルシューティング

[Process Management] 画面の [N/A] アイコンに対するトラブルシューティングのオプションを示します。

- ▶ [N/A] アイコンは [BaseSpace] 列に表示され、ランはBaseSpace Sequence Hubにアップロードするように設定されます。
- ▶ [N/A] アイコンは [Network] 列に表示され、ランはネットワーク上の出力フォルダーをアップロードするように設定されます。

ランステータス	トラブルシューティングアクション
ランが実行中	[Process Management] 画面を閉じて、約5分待ってから画面を再度開きます。
ランが実行中でない	装置をシャットダウンして再立ち上げ後、[Process Management] 画面を再度開きます。

トラブルシューティングアクションを実施後も、[N/A] アイコンが表示されたままの場合、イルミナテクニカルサポートにご連絡ください。84ページの「テクニカルサポート」を参照してください。

クラスタリング前のラン失敗

クラスタリング開始前にソフトウェアがランに失敗した場合、新たなランのために、試薬カートリッジ、ライブラリーチューブ（サンプルを含む）を取りおくことができ、ただちに再使用するのであれば、フローセルも取っておくことができます。クラスタリングが開始すると、シッパーがホイルシールを貫通し試薬がライブラリーチューブおよびフローセルに移送されるため、消耗品やライブラリーを別のランに使用することはできません。

ランの失敗により、取っておいた試薬カートリッジ、ライブラリーチューブ、およびフローセルを用いて、新たなランをセットアップするために2つのオプションがあります。

- ▶ **新しいランをすぐにセットアップ**：失敗したランの4時間以内に新しいランをセットアップします。試薬カートリッジ、ライブラリーチューブおよびフローセルはロードしたままにします。



注意

NovaSeq Xpワークフローで最適な結果を出すためには、新たなランをできるだけ早く開始してください。

- ▶ **新しいランを時間をおいてセットアップ**：失敗したランの3週間以内に新しいランをセットアップします。試薬カートリッジとライブラリーチューブは装置からアンロードし保管してください。取っておいた消耗品には、日付の入ったラベルを貼り、元の状態のまま保管します。



注意

フローセルは再使用不可なため、廃棄しなければなりません。交換用のフローセルの入手については、イルミナテクニカルサポートにご連絡ください。

新しいランをすぐにセットアップ

NovaSeq Xpワークフローでランが失敗した場合は、最適な結果を得るために、できるだけ早く新たなランを開始してください。

- 1 ランが失敗し、装置の反対側が待機状態の場合、装置をリブートしてください。そうでない場合、**[Home]** を選択します。
- 2 新しいランをセットアップします。
- 3 使用中のフローセルは所定の位置のままにします。
- 4 試薬チャロードアおよびバッファの引き出しを開閉して、NVCSIに試薬カートリッジのRFIDを再度読み取ります。
カートリッジ、ライブラリーチューブ、およびフローセルは、ランの失敗から最長4時間装置内に置いておくことができます。
- 5 必要な場合は、廃液ボトルを空にして、装置に戻してください。
- 6 ランセットアップを続けます。

新しいランを時間をおいてセットアップ

- 1 ランが失敗したら、**[Home]** を選択します。
- 2 装置から消耗品をリリースするために新しいランあるいはメンテナンスウォッシュをセットアップします。
- 3 プロンプトが表示されたら、次の消耗品を取り外して保管します：
 - ▶ ライブラリーチューブに蓋をして、-25°C~-15°Cで最長3週間保管できます。
 - ▶ SBSカートリッジとクラスタカートリッジは-25°C~-15°Cの保管庫に戻します。

- ▶ バッファーカートリッジは遮光された室温保管庫に戻します。
貫通されていなければ、カートリッジは新しいランで再使用することができます。

- 4 [End] を選択してランまたはメンテナンスウォッシュをキャンセルした後、[Yes] を選択してコマンドを確認します。
キャンセルする代わりにメンテナンスウォッシュを完了させることもできます。

ランの強制終了

NovaSeq 6000システムでランを終了することは**最終事項**となります。ソフトウェアはランを再開できず、シーケンスデータを保存することができません。消耗品も再使用できません。

- 1 [End] を選択した後、[Yes] を選択してコマンドを確認します。
リード1後にランが終了すると、自動ポストランウォッシュが開始されます。
- 2 プロンプトが表示されたら、次の洗浄オプションを選択します。
 - ▶ **End Run Without Wash**：ランを終了し、メンテナンスウォッシュを開始します。
 - ▶ **End Run and Wash**：ランを終了し、自動ポストランウォッシュを行います。
 - ▶ **Cancel**：現在のランを継続します。
 クラスタ形成完了とリード1完了の間でランが終了した場合、ソフトウェアは洗浄オプションを表示します。そうでない場合は、自動ポストランウォッシュが開始されます。
- 3 [End Run Without Wash] を選択した場合は、ソフトウェアのプロンプトに従ってメンテナンスウォッシュを設定してください。

装置のシャットダウン

装置を安全にシャットダウンすると、ソフトウェアおよびシステムのすべてがシャットダウンし、装置の電源が切れます。ステータスバーは緑から白にだんだんと変化し、シャットダウンの進行状況を示します。

正常な状況下では、装置をシャットダウンする必要はありません。

- 1 [Main Menu] から、[Shutdown Instrument] を選択します。
- 2 画面が空白になったら、装置の背面にあるトグル電源スイッチをオフに切り替えます。
- 3 システムを再度オンにする前に少なくとも60秒待ちます。



警告

装置を移設しないでください。不適切な移設を行うと、光学アライメントが影響を受け、データの健全性が損なわれるおそれがあります。装置の移設のサポートについては、イルミナ担当者にご連絡ください。

付録B Real-Time Analysis

Real-Time Analysis概要	67
Real-Time Analysisワークフロー	69

Real-Time Analysis概要

NovaSeq 6000シーケンサーシステムは、Real-Time AnalysisソフトウェアRTA3を装置上のCompute Engine (CE) 上で作動させます。RTA3はカメラから得たイメージの蛍光強度を抽出し、ベースコーリングを行い、ベースコールにクオリティスコアを割り当てて、PhiXにアラインし、Sequencing Analysis Viewerで参照するためにInterOpファイルの形式でデータをレポートします。

処理時間を最適化するために、RTA3はメモリーに情報を保管します。RTA3が終了した場合、データ処理は再開せず、メモリー内の処理された一切のランデータは失われます。

RTA3への入力

RTA3はローカルシステムメモリー内のタイルイメージを用いて処理を行います。RTA3はNVCSからラン情報および処理の指示を得ます。

RTA3出力

各色チャンネルのイメージは、タイルとしてRTA3にメモリー内で渡されます。これらのイメージから、RTA3が一組のクオリティスコア化されたベースコールのファイルとフィルターファイルのセットを出力します。他のすべてのファイルは出力ファイルをサポートしています。

ファイルタイプ	内容説明
ベースコールファイル	各タイルの解析結果は、連結されたベースコール (*.cbcl) ファイルに含まれます。同一レーンかつ同一表面のタイルは、レーンおよび表面ごとに1 (*.cbcl) ファイルに集約されます。
フィルターファイル	タイルはそれぞれ、フィルターファイル (*.filter) を作成し、フィルターを通過するクラスターかどうか指定されます。
クラスターロケーションファイル	クラスターロケーション (*.locs) ファイルには1つのタイル上の全クラスターのX、Y座標が入っています。クラスターロケーションファイルは各ランで生成されます。

出力ファイルはBaseSpace Sequence Hubでの下流の解析に使用されます。あるいは、bcl2fastq変換ソフトウェアをFASTQ変換、およびサードパーティの解析ソリューションに使用します。NovaSeqファイルにはbcl2fastq2 Conversion Software v2.19以降が必要です。bcl2fastq2の最新バージョンについては、イリミナウェブサイトの[bcl2fastqダウンロードページ](#)を参照してください。

RTA3により、ランクオリティのリアルタイムメトリクスがInterOpファイルとして保管され、バイナリー出力でタイル、サイクル、およびリードレベルメトリクスが含まれます。Sequencing Analysis Viewerを用いて、リアルタイムメトリクスを参照するにはInterOpファイルが必要です。Sequencing Analysis Viewerの最新バージョンについては、イリミナウェブサイトの[Sequencing Analysis Viewerダウンロードページ](#)を参照してください。

エラー処理

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

以下のログファイルは、処理終了時に最終出力先に転送されます。

- ▶ [info_00000.log] には重要なランイベントが要約されます。

- ▶ [error_00000.log] にはラン中に発生したエラーが一覧表示されます。
- ▶ [warning_00000.log] にはラン中に発生した警告が保存されます。

フローセルタイル

タイルはフローセル上の小さなイメージングエリアです。カメラは各スワスの単一イメージを撮影し、ソフトウェアがそれをRTA3処理のためタイルに分割します。タイルの総数は、フローセル上のイメージングされるレーン、スワス、および表面の数によって異なります。

- ▶ S1フローセルには合計で624個のタイルがあります。
- ▶ S2フローセルには合計で1,408個のタイルがあります。
- ▶ S4フローセルには合計で3,744個のタイルがあります。

表21 フローセルタイル

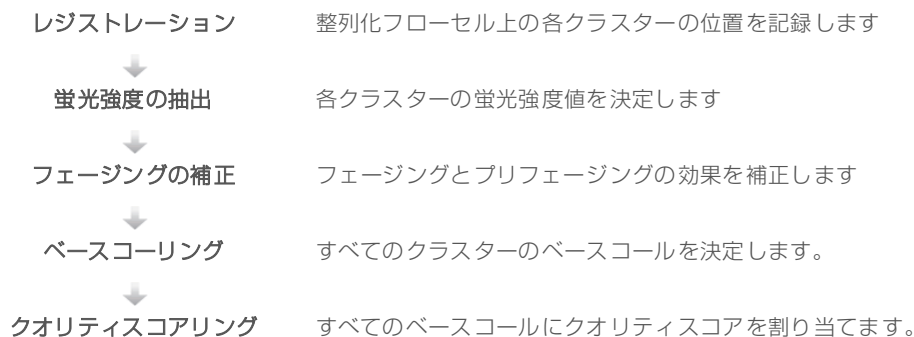
フローセルのコンポーネント	S1	S2	S4	内容説明
レーン	2	2	4	レーンは入力および出力ポートを備えた物理的なチャネルです。
面	2	2	2	フローセルは上面と下面の2つの面でイメージングされます。タイルのTop面がまずイメージングされます。
レーンあたりのスワス	2	4	6	スワスとは、カメラが1つのイメージとしてキャプチャするフローセルレーン内の列です。
スワス当たりのタイル数	78	88	78	タイルとは、スワスの一部で、フローセル上でイメージングされたエリアを表示します。
生成される総タイル数	624	1,408	3,744	レーン × 表面 × スワス × (スワス当たりのタイル) が総タイル数と等しくなります。

タイルの命名規則

タイル名は、フローセル上のタイル位置を表す5桁の番号です。例えば、タイル名「1_1205」はレーン1、Top面、スワス2、タイル5を表します。

- ▶ 最初の桁はレーン番号を表します。
 - ▶ 1または2は、それぞれS1フローセルまたはS2フローセルを表します。
 - ▶ 1、2、3または4はS4フローセルを表します。
- ▶ 2桁目は表面を表します。1がTopで2がBottomです。
- ▶ 3桁目はスワス番号を表します。
 - ▶ 1または2はS1フローセルを表します。
 - ▶ 1、2、3または4はS2フローセルを表します。
 - ▶ 1、2、3、4、5または6は、S4フローセルを表します。
- ▶ 最後の2桁はタイル番号を表します。番号付けはフローセルの奥側の端の01で始まり、手前側の端の88または78までです。
 - ▶ 01~78はS1フローセルまたはS4フローセルを表します。
 - ▶ 01~88はS2フローセルを表します。

Real-Time Analysisワークフロー



レジストレーション

レジストレーションでは、整列化フローセル上のナノウェルの六角形アレイにイメージがアラインされます。ナノウェルは規則正しく配置されているため、タイル内の各クラスターのX座標およびY座標はあらかじめ決まっています。ランごとにクラスターロケーション (s.locs) ファイルにクラスター位置が書き込まれます。

サイクル中のいずれかのイメージのレジストレーションが失敗した場合、そのサイクルのタイルに対してベースコールは行われません。レジストレーションに失敗したイメージの特定には、Sequence Analysis Viewerを用いることができます

蛍光強度の抽出

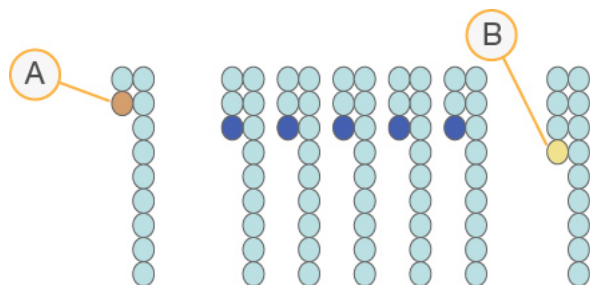
レジストレーション完了後、蛍光強度の抽出では、与えられたイメージ中の各ナノウェルの蛍光強度値が計算されます。レジストレーションに失敗した場合、そのタイルの蛍光強度を抽出することができません。

フェージングの補正

シーケンス反応中は、クラスター中の各DNA鎖はサイクルごとに1ベースずつ伸長します。現在のインコーポレーションサイクルとDNA鎖の位相がずれると、フェージングとプリ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リフェージングが起こります。

図31 フェージングとプリフェージング



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

RTA3はフェージングとプリフェージングの影響を補正し、ラン実行中、すべてのサイクルでデータ品質を最大にします。

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。2色チャンネルシーケンスを使用するNovaSeq 6000シーケンサーシステムでは、赤チャンネルと緑チャンネルからの2つのイメージのみを用いて4つのDNA塩基のデータをエンコードすることができます。

ノーコールはNで識別されます。ノーコールはクラスターがフィルターを通過しないか、レジストレーションが失敗したまたはクラスターがイメージから外れた場合に起こります。

各クラスターの強度は赤や緑のイメージから抽出され、互いに比較され、個別の4集団に分けられます。集団はそれぞれ塩基に対応します。ベースコーリングプロセスにより、各クラスターが属する集団を決定します。

図32 クラスター蛍光強度の可視化

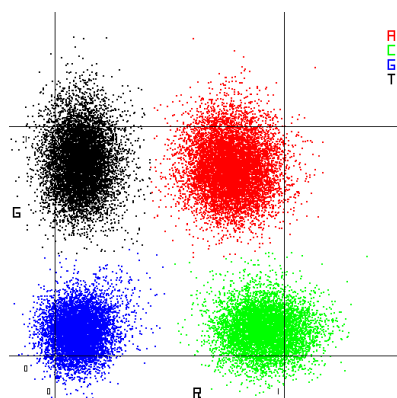


表22 2色チャンネルシーケンスにおけるベースコール

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両チャンネルで強度を示す
C	1 (on)	0 (off)	クラスターは赤チャンネルのみで強度を示す
G	0 (off)	0 (off)	クラスターは既知のクラスター位置で強度を示さない
T	0 (off)	1 (on)	クラスターは緑チャンネルのみで強度を示す

フィルターを通過するクラスター

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

2色チャンネル解析では、RTA3は集団ベースのシステムであり、ベースコールのchastity（強度の純度の測定）を決定します。最初の25サイクルのうち、1ベースコールのchastityが固定の閾値未満であるサイクルが以下の場合に、クラスターはパスフィルター（PF）します。PhiXアライメントはフィルターを通過するクラスターのタイルサブセットを用いてサイクル26の時に実行されます。フィルターを通過しないクラスターはベースコールおよびアライメントされません。

クオリティスコア

クオリティスコア（Qスコア）はベースコールが誤っている確率の予測値です。高いQスコアは、ベースコールのクオリティが高く、正しい可能性が高いことを示しています。Qスコアを決定した後、ベースコール（*.cbcl）ファイルに結果が記録されます。

Qスコアにより、小さなエラーの起こり易さが簡素に表現されます。クオリティスコアはQ(X)として表現され、Xはスコアです。以下の表に、クオリティスコアとエラーの起こり易さの関連性を示します。

Qスコア Q (X)	エラーである確率
Q40	0.0001 (10,000分の1)
Q30	0.001 (1,000分の1)
Q20	0.01 (100分の1)
Q10	0.1 (10分の1)

クオリティスコアリングおよびレポーティング

クオリティスコアリングは、各ベースコールについて、いくつかの予測モデルのセットを計算し、その値をQuality tableから探索しQスコアとして割り当てます。Quality tableは、当該のシーケンシング装置構成とケミストリーバージョンの組み合わせから得られるランに対して、最適なクオリティの予測値を与えるために作られています。



注意

クオリティスコアリングはPhredアルゴリズムの改変版に基づきます。

RTA3はベースコールの信頼度に基づいて、各ベースコールに3クオリティスコアのうちの1つを割り当てます。Qスコアのレポーティングモデルにより、正確さやパフォーマンスに影響を与えずに必要なファイル容量および帯域幅が削減されます。

クオリティスコアリングについて詳しくは、『NovaSeq™ 6000 System Quality Scores and RTA3 Software』（出版番号：770-2017-010）を参照してください。

付録C 出力フォルダーとファイル

シーケンス出力フォルダーの構成	72
シーケンス出力ファイル	72

シーケンス出力フォルダーの構成

NVCSが、自動で出力フォルダー名を生成します。

- 📁 **Config** : ランの構成設定
- 📁 **Logs** : 操作ステップ、装置アナリティクス、およびRTA3のイベントが記述されるログファイル
- 📁 **Data**
 - 📁 **Intensities**
 - 📁 **BaseCalls**
 - 📁 **L00[X]** : レーン、表面、およびサイクルごとに1ファイルに集約されたベースコールファイル (*.cbcl)
 - 📄 s.locs : ラン用のクラスターロケーションファイル
 - 📁 **InterOp** : Sequencing Analysis Viewerで使用するバイナリーファイル
 - 📁 **Recipe** : ラン固有のレシピファイル
 - 📁 **Thumbnail Images** : 10番目のタイルごとのサムネイルイメージ
 - 📁 **LIMS** : ランセットアップファイル (*.json) (該当する場合)
 - 📄 RTA3.cfg
 - 📄 RunInfo.xml
 - 📄 RunParameters.xml
 - 📄 RTAComplete.txt
 - 📄 CopyComplete.txt
 - 📄 SampleSheet.csv : サンプルシートまたは他の添付ファイル (該当する場合)
 - 📄 SequenceComplete.txt

シーケンス出力ファイル

ファイルタイプ	ファイルの説明、場所、名前
ベースコールファイル	分析されたクラスターはそれぞれ、サイクル、レーン、および表面ごとに1ファイルに集約されて、ベースコールファイルに収められます。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。ベースコールファイルはBaseSpace Sequence Hubあるいはbcl2fastq2で使用されます。 Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl (例: L001_1.cbcl)
クラスターロケーションファイル	各フローセルについて、バイナリーのクラスターロケーションファイルに、タイル内のクラスターのXY座標が含まれます。フローセルのナノウェルレイアウトと一致する六角形レイアウトにより、座標があらかじめ定められます。 Data\Intensities s_ [レーン] .locs

ファイルタイプ	ファイルの説明、場所、名前
フィルターファイル	フィルターファイルは、クラスターがフィルターをパスしたかを示します。25サイクルまでの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。タイルあたり、1フィルターファイルが生成されます。 Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
InterOpファイル	Sequencing Analysis Viewerに使用されるバイナリーレポートファイル。InterOpファイルはラン全体を通じて更新されます。 InterOpフォルダー
Run Informationファイル	ラン名、各リードのサイクル数、リードがインデックスリードであるか、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。RunInfoファイルは、ランの開始時に生成されます。 [ルートフォルダー]、 RunInfo.xml
サムネイルファイル	サムネイル設定がenableにされている場合に生成される、各色チャンネル（赤と緑）の10番目のタイルごとのサムネイルイメージ。 Thumbnail_Images\L001\C[X.1]：ファイルは各サイクルのサブフォルダーに保存されます。 s_[lane]_[tile]_[channel].jpg ：サムネイルイメージにはタイル番号が含まれます。

付録D Windowsセキュリティ

セキュリティ設定	74
パスワード要件	74
Windowsファイアウォール	74
Enhanced Mitigation Experience Toolkit	74
ソフトウェア制限ポリシー	75

セキュリティ設定

装置制御コンピューター上で稼働するWindowsオペレーティングシステムには、好ましくないソフトウェアの実行を阻止するセキュリティ設定が組み込まれています。この付録には、その設定内容およびお客様のニーズを満たすためのカスタマイズ方法についての情報が記述されています。

正常な状況下では、セキュリティの初期設定を変更する必要はありません。必要な場合は、経験のある管理者が十分に計画した上で変更管理するようにしてください。



警告

この設定はシステム性能に影響を及ぼし、セキュリティを危険にさらす可能性があるため、設定を変更する必要があるか不明な場合や、影響が不明な場合はイリミナテクニカルサポートにご連絡ください。

パスワード要件

制御コンピューターに必要なパスワードポリシーを下表に示します。初回ログオン時にソフトウェアプロンプトでパスワード変更が要求されます。

表23 初期設定でのパスワードポリシー

ポリシー	セキュリティ設定
パスワード履歴の管理	5世代前までのパスワード
最長パスワード有効期間	180日間
最短パスワード有効期間	0日間
最短パスワード長	10文字
パスワードの複雑性要件の遵守	無効
可逆的な暗号化を用いたパスワードの保管	無効

Windowsファイアウォール

Windowsファイアウォールは、入力トラフィックをフィルターして脅威の可能性のあるものを取り除くことで、制御コンピューターを保護します。ファイアウォールは初期設定で有効化されており、インバウンド接続をすべてブロックします。ファイアウォールを有効のままにして、アウトバウンド接続を許可してください。アウトバウンド接続の詳細については、『NovaSeq Series Site Prep Guide』（文書番号：1000000019360）を参照してください。

Enhanced Mitigation Experience Toolkit

Enhanced Mitigation Experience Toolkit (EMET) は、ソフトウェア脆弱性の悪用を防ぎ、Certificate Trust機能を提供します。この機能は、悪意のある証明書を用いた攻撃を検知し阻止します。

ソフトウェア制限ポリシー

Windowsソフトウェア制限ポリシー（SRP）は、指定したソフトウェアのみ実行を許可するルールを用いています。NovaSeq 6000の場合、SRPルールは証明書、ファイル名および拡張子、ならびにディレクトリーに基づいています。

デフォルトでは、SRPは好まないソフトウェアがコントロールコンピューター上で実行しないようにオンに設定されています。IT 担当者またはシステム管理者が、ルールを追加または削除してセキュリティレベルをカスタマイズすることができます。システムにドメインを加えると、ローカルグループポリシーオブジェクト（GPO）が自動的にルールを修正し、SRPをオフにする場合があります。



警告

ソフトウェア制限ポリシー無効化すると、提供される保護機能が停止します。ルールを変更すると、初期設定の保護内容が無視されます。

許可されているSRPルール

NovaSeq 6000シーケンサーシステムでは、SRPがデフォルトで設定され、以下のルールが適用されます。

証明書

DigitalSystems

Illumina, Inc.

NovaSeq

実行ファイル

Portmon.exe

Procmon.exe

Procmon64.exe

Tcpview.exe

ファイル拡張子

*.bin

*.cbcl

*.cfg

*.config

*.csv

*.dat

*.focus

*.imf1

*.ims

*.jpg

*.json

*.lnk

*.locs

*.log

*.manifest

*.sdf

*.tif

ファイル拡張子

*.txt
*.xml

ディレクトリー

%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%
%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows NT\CurrentVersion\SystemRoot%
C:\CrashDumps\
C:\Illumina\
C:\Illumina Maintenance Logs\
C:\LocalSymbols\
C:\Program Files (x86)\Chromium\Application\
C:\Program Files (x86)\EMET 5.5\
C:\Program Files (x86)\Illumina\
C:\Program Files (x86)\Internet Explorer\
C:\Program Files (x86)\LibreOffice 5\
C:\Program Files\Illumina\
C:\ProgramData\Illumina\
C:\ProgramData\Package Cache\
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix\
C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs\
C:\Users\sbsuser\Desktop\FSE turn over to customer.bat
D:\Illumina\
D:\Illumina*

SRP ルールの追加および削除

SRP ルールを追加または削除し、システムセキュリティをカスタマイズします。本ルールの修正時は一時的にSRPをオフにする必要があります。



警告

SRPのオフはデフォルトの保護設定よりも優先されます。

- 1 オペレーティングシステムにログインします。
- 2 SRPをオフにする：
 - a ディレクトリーC:\Illumina\Securityに移動します。
 - b Disable.regをダブルクリックします。
 - c **[Yes]** を選択し、変更を確認します。



注意

タッチスクリーンインターフェースを使用している場合は、タッピングまたは約2秒間押し続けることで右クリックと同じ動作になります。

- 3 **[Start]** を選択した後、**[Run]** を選択します。
- 4 **[Open]** フィールドで、**[secpol.msc]** を入力します。
- 5 **[Local Security Policy]** ダイアログボックスで、**[Software Restriction Policies]** を展開し、**[Additional Rules]** を選択します。

- 6 ルールを追加するには：
 - a [Action] メニューで、[New Path Rule] を選択します。
 - b [Path] フィールドでは、許可したい証明書、ファイル名、ファイル拡張子またはディレクトリーを入力します。
 - c [Security level] リストでは、[Unrestricted] を選択します。
 - d **(オプション)** [Description] フィールドには、ルール作成理由を入力することができます。
 - e [OK] を選択してルールを追加します。
- 7 ルールを削除するには：
 - a 削除対象のルールを選択し、[Delete] を選択します。
 - b [Yes] を選択し、削除を確認します。
- 8 [Local Security Policy] ダイアログボックスを閉じます。
- 9 直ちにSRPを復帰してください：
 - a ディレクトリーC:\Illumina\Securityに移動します。
 - b Enable.regをダブルクリックします。
- 10 SRP ルールを初めて修正した場合は、ログオフした後再びログオンするとルールが有効になります。

索引

%

%PF 29, 37, 70

[

[Sequencing] 画面 54

2

2色チャンネルシーケンス 2, 70

2レーンフローセル 13

4

4レーンフローセル 13

B

BaseSpace Enterprise 24

BaseSpace Sequence Hub 1, 25

サポート 2

接続および取り外し 51

bcl2fastq2 25, 67

C

calculator, pooling 32, 41

CBCLファイル 2, 55, 70

CE 9, 67

Certificate Trust 74

chastityフィルター 70

Compute Engine 9, 55, 67

D

DPX試薬, 保管 16

E

EMET 74

ExAmp試薬 12, 44

混合手法 3

保管 16

融解 40

ExAmpマスターミックス 2, 45

F

FASTQ転換 67

FASTQ変換 25

G

GPO 75

Group Policy Object 75

I

Illumina Proactiveモニタリングサービス 21

InterOpファイル 8, 63, 67, 72

L

LIMS 1, 20

LIMSセットアップ 21

N

NaOCl 57-58

NovaSeq Xp, 定義済み 3

NovaSeq Xpドック 43, 48

NovaSeq Xpマニフォールド 43

保管 16

NovaSeq Xpマニフォールドウエル, 採番する
16

NovaSeq Xpワークフロー 23

O

output folder name 72

P

PhiX

アライメント 67

カタログ番号 25

添加 33, 42

Phredアルゴリズム 71

plexity 32, 40

Pooling Calculator 32, 41

Preventive Maintenance (PM) 58

Process Management 55

Q

Qスコア 54, 70-71

R

Real-Time Analysis 1, 8
RFID 12, 63
RunInfo.xml 63, 72

S

Sequencing Analysis Viewer 67, 69
SRPデフォルト 75

T

Tween 20 58

U

Universal Copy Service 8-9, 55
USBポート 5

W

Windows
セキュリティ 75

ア

アイコン 9, 17
アイコン, 点滅 8
アイコンの点滅 8
アウトバウンド接続 74
赤チャンネル 70
アプリケーション 1
アライメント失敗 63
安全データシート 7

イ

位置番号30 56, 60
イメージ 67
イメージング 2, 13, 67-68
インサートサイズ 33, 41
インデックスリード 52
インバウンド接続 74

ウ

ウェブサイト, サポート 63
ウエルの採番 45

エ

液体コンパートメント 14
エラー 8, 63
起こり易さ 70-71
エラーログ 67
塩基 70

オ

オーバーフロー 30, 38, 64
オペレーティングシステム 19, 74
オンライントレーニング 2

カ

カートリッジ
積み上げ 15
カートリッジの積み上げ 15
解析 25
解析設定 20
解析方法 2

ガ

ガasket 13, 43, 48
カスタマーサポート 84
ガasket, オーバーフロー 45
カスタムプライマー 2, 15, 52
カタログ番号 11
ユーザーが用意する消耗品 25
カメラ 1, 5, 68
管理者アカウント 76

キ

危険性化学薬品 17
希釈剤 34, 42
キット構成 11
キット構成 26
キャップホルダー 30, 38
気泡 45

ク

クオリティテーブル 71
 クラスター位置 67
 クラスターカートリッジ 12
 クラスター蛍光強度 69
 クラスターのフィルタリング 70
 クラスターロケーション 72
 クラスタリング時間 54
 クランプ, フローセル 5
 クロスコンタミネーション 7, 57

ケ

蛍光強度値 69
 警告 8
 権限 76

コ

光学 5
 光学アライメントターゲット 5, 48
 個々にアドレス可能なレーン 3, 16
 こすり傷, フローセル 43, 48
 コントロールソフトウェア 8
 コンパートメント 5

サ

サードパーティLIMS 22
 サイクル数 52
 サイクル番号 54
 サイト準備 2, 74
 採番する, ウェル 16
 サプライヤー 25
 サポート掲示板 63
 サポートページ 63
 サムネイル 72
 サンプルシート 24, 51-52
 サンプルシートフォーマット 25
 サンプルトラッキング 15

シ

シーケンスサイクル 54

ジ

次亜塩素酸ナトリウム 57-58

シーケンス消耗品 25
 シーケンスステップ 2
 シーケンスラン
 削除 55
 システム接続 63
 時間
 シーケンスラン 54
 シッパー位置 57
 シッパーの位置 61
 自動チェック 63
 試薬カートリッジ
 アンローディング 50
 調製 29, 38
 ラベリング 11
 保管 12, 65
 ラベル 14
 試薬キットの保管 12, 16
 試薬カートリッジのアンローディング 50
 試薬チラー 7
 出力フォルダー 20-21
 試薬カートリッジの保存 65
 シャットダウン後の再スタート 66
 仕様 11
 使用済み試薬の廃棄 7
 収量 54
 使用期限 17
 消耗品
 包装 17
 アンローディング 56-57, 61
 メンテナンスウォッシュ 58
 希釈および変性 25
 ラボラトリーグレード水 27
 使用済み試薬 7, 30, 38, 50
 初期設定値 20
 所要時間
 メンテナンスウォッシュ 58
 クラスター形成 54
 自動ポストランウォッシュ 57
 初期化 19
 シングルリードラン 52
 診断 5

ス

水酸化ナトリウムの希釈 34, 42
 水槽 29, 38
 ステータスバー 5, 66
 水酸化ナトリウム, 希釈 34, 42
 スイッチオン 19
 スワス 2, 13, 68
 スキャン 2

セ

製造元 17
制御コンピューター 74
整列化フローセル 1, 13
セキュリティ 75
 カスタマイズ 76
セキュリティ設定 74
センサー 5, 60, 63
設定, セキュリティ 74
洗浄
 頻度 58
 所要時間 57-58
洗浄カートリッジ 58, 60
洗浄溶液 14
洗浄フローセル 58

ソ

装置性能データ 20-21

ゾ

増幅 2
装置の移設 66
ソフトウェア一式 8
装置の移動 66

タ

タイルの番号付け 68
タイル 2, 13, 67

チ

チラー 7

テ

定量化 29, 37

デ

ディスクスペース 9, 63
データクオリティ 70
データの保管 51
テクニカルサポート 84
データ転送 9, 55
デフォルト設定 24

手袋, 交換 30, 38, 60
添加, PhiX 33, 42
電源 19
電源切断 66
テンプレート形成 69

ド

ドック 43, 48
 構成品 16
ドメイン, BaseSpace Sequence Hub 24
ドリフトトレイ 64

ナ

ナノウェル 69

ニ

入カウエル 16

ノ

ノーコール 69-70
ノーマライゼーション 32, 40

ハ

ハードドライブ 9, 20-21, 55
白書 71

パ

パスフィルター (PF) 70
パスワードポリシー 74

バ

バッチコード 17
バッファークートリッジ 51, 60
バッファークンパートメント 51

ピ

ピペット 28

ヒ

標準, 定義済み 3
 標準ワークフロー 23
 表面の番号付け 68
 品質管理 29, 37

フ

ファイアウォール 74
 ファイル
 ラン固有 63
 ファイルのフィルター 67
 フィルターファイル 72
 フィルターを通過するクラスター 29, 37, 54
 フェージングおよびプリフェージング 69

ブ

部品番号 17

プ

プレランチェック 63
 フローセル
 こすり傷 43, 48
 仕様 11
 洗浄 43, 48
 保管 12, 43
 ラベリング 11
 フローセルステージ 5, 48
 フローセルホルダー 48
 プロット色 54
 文書 2, 84

ベ

ベースコールファイル 67, 72

ヘ

ヘルスデータ 20-21
 ヘルプ 63
 文書 2
 ライブラリーのプール 32, 41
 ヘルプ, テクニカル 84
 変性試薬 34, 42

ホ

保管条件 17
 ホスティングロケーション 24

ポ

ポストラン作業 57
 ホルムアミドの廃棄 15, 56
 ホワイトリスト, SRP 75

ミ

緑チャンネル 70

メ

メンテナンス, 予防 58
 メンテナンスウォッシュ
 消耗品 25, 58
 洗浄溶液 58

モ

モード 11
 漏れ 64

ユ

有害化学物質 7
 融解用ワイヤーラック 29, 38

ラ

ライトバー 5, 66
 ライブラリー
 希釈 34, 43
 定量化 29, 37
 品質管理 29, 37
 保管 34, 43, 65
 ライブラリーチューブ 15, 65
 カートリッジ内保管庫 65
 保管 12, 34, 65
 ライブラリーチューブの保存 65
 ライブラリーの希釈 34, 43
 ライブラリーのプール 32, 41
 ライブラリーの保管 34, 43
 ラベル, キット構成 11
 ラボラトリーグレード水ガイドライン 27

ラン

- 一時停止 55
- 交互ラン 55
- 再開 66
- 削除 9
- メトリクス 54
- モニタリング 24, 51
- ラン実行時間 54
- ラン設定 20
- ランセットアップフォルダー 20-22
- ランの一時停止 55
- ランの再開 66
- ランパラメーター, LIMS 22
- ランメトリクス 67
- ランモード 20

リ

- リード, 数 11
- リード1 66
- リハイブリダイゼーション 22
- 流路システム 7, 58
- 流路問題 64

レ

- 冷蔵庫の規格 28
- 冷凍庫の規格 28
- レーン 13, 68
- レーンの採番 16, 45
- レジストレーション失敗 69

ロ

- ローディング濃度 2, 29, 37
- ローディング容量 2
- ログファイル 63, 67
- ロット番号 17

ワ

- ワークフロー 23
- ワイヤーラック 29, 38

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
電子メール：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	
アイルランド	+353 1800936608	+353 016950506
イタリア	+39 800985513	+39 236003759
オランダ	+31 8000222493	+31 207132960
オーストラリア	+1.800.775.688	
オーストリア	+43 800006249	+43 19286540
シンガポール	+1.800.579.2745	
スイス	+41 565800000	+41 800200442
スウェーデン	+46 850619671	+46 200883979
スペイン	+34 911899417	+34 800300143
デンマーク	+45 80820183	+45 89871156
ドイツ	+49 8001014940	+49 8938035677
ニュージーランド	0800.451.650	
ノルウェー	+47 800 16836	+47 21939693
フィンランド	+358 800918363	+358 974790110
フランス	+33 805102193	+33 170770446
ベルギー	+32 80077160	+32 34002973
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
香港	800.960.230	
台湾	00.806.651.752	
中国	400.066.5835	
日本	0800.111.5011	
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jp.support.illumina.com/sds.htmlから入手できます。

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

文書番号：1000000019358 v08 JPN

資材番号：20023471



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。

© 2018 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]