

illumina®

NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems

System Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号 : 15069765 v08 JPN

2023 年 6 月

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、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プレ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。

© 2023 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： 20006831 文書番号： 15069765 v08	2023 年 6 月	文書名を『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems System Guide』に変更。 「フローセルの準備」セクションの手順を再編成。 「フローセルの準備」セクションに、こすり傷や外観上の軽微な不良は使用上問題ないことを明記。 シャットダウン後の Quick Wash の要件を削除。 Local Run Manager についての説明を削除。 「ユーザーが用意する消耗品および機器」セクションで、エアフィルター（部品番号：20022240）を新しいエアフィルター（部品番号：20063988）に更新。
資材番号： 20006831 文書番号： 15069765 v07	2021 年 10 月	「シーケンスラン実行時間」でランの最大長を更新。 「1 リード内のサイクル数」セクションを更新。 「フローセルの準備」セクションの手順を再編成。 手動洗浄に新しいカートリッジと従来のカートリッジを記載。 「エアフィルターの交換」セクションに3つの予備エアフィルターについての説明を追加。 「システムチェック」セクションを LRM の認証情報についての説明を含めて更新。
資材番号： 20006831 文書番号： 15069765 v06	2019 年 6 月	ランセットアップ中の BaseSpace Sequence Hub について、ワークグループの情報を追加。 出力フォルダーの UNC パス情報を追加。 ネットワークストレージのエラーに対するトラブルシューティングを追加。 エアフィルターに関する手順は、背面パネルからアクセス可能なフィルター付き装置用であることを明記。 ルートフォルダーにあったファイルの場所を、出力フォルダーのラン固有のフォルダーに更新。

文書	日付	変更内容
資材番号： 20006831 文書番号： 15069765 v05	2018 年 12 月	<p>NextSeq Control Software (NCS) 4.0 用のソフトウェアの説明、画面、およびワークフローを更新。</p> <p>NCS 4.0 に関する以下の追加情報を更新。</p> <ul style="list-style-type: none"> • Local Run Manager ソフトウェアに関する情報を追加。 • BaseSpace Sequence Hub に対する BaseSpace の情報を更新。[BaseSpace Prep] タブおよび BaseSpace Onsite は今後利用できません。 • Local Run Manager または Manual ランモードの選択についての説明を追加。Manual モードが、一部の修正を加えてスタンドアロンモードに置き換わります。 • BaseSpace Sequence Hub で装置ソフトウェアのアップデートをチェックするオプションを追加。 • System Suite バンドルの説明に Local Run Manager、Universal Copy Service、および Direct Memory Access ドライバーを追加。BaseSpace Broker および SAV を削除。 • Run Copy Service は現在の Universal Copy Service。 • 試薬カートリッジをロードする際にカスタムレシピを有効にするオプションを追加。 • ランの進捗状況をモニタリングする際のフローセルイメージの説明を削除。 • キオスクおよび Windows モードの特定のスタートアップオプションを削除。 • MethylationEPIC v1.0 を互換性のある BeadChip タイプとして追加。 • エアフィルター付き装置のメンテナンス方法を追加。 • 注意、情報、および NCS の最小化の新しいアイコンを追加。 • ラン設定およびシステム設置のカスタマイズに関する説明を更新。 • 装置性能データの送信オプションを更新。 • データ転送アイコンを更新。 • スキャンを行うために、転送用にキューされたファイルには時間制限がないことを明記。 • 動作チェック情報の BSM のリファレンスを Buffer Straw Mechanism に修正。 • Windows パスワードの 6 カ月の有効期限情報を追加。 <p>装置メンテナンス用の試薬または分光光度グレードのメタノールまたはイソプロピルアルコール (99%) を追加。</p>

文書	日付	変更内容
資材番号： 20006831 文書番号： 15069765 v04	2018 年 5 月	NextSeq v2.5 試薬のサポートを追加。 NextSeq v2.5 Reagent Kit のフローセルの室温配送について保管 / 配送情報を更新。NextSeq v2.5 フローセルは引き続き以前の保管条件が必要となります。NextSeq v2.5 Reagent Kit はソフトウェアのバージョンを 2.2 に更新する必要がある旨の情報を追加。 Mid Output Kit のローディング濃度に関する注意を追加。 フローセルの保存に関する注意を追加。 High Output フローセルをシステムチェックに使用することを推奨する注意を追加。
資材番号： 20006831 文書番号： 15069765 v03	2018 年 3 月	オペレーティングシステムにログオンするために必要な既定のユーザー名とパスワードを削除。イルミナではサイト固有の認証情報を使用することを推奨します。「BaseSpace 構成の選択」セクションに Illumina Proactive モニタリングサービスに関する情報を追加。 RTA2 への RTA v2 ソフトウェアリファレンスを更新。
資材番号： 20006831 文書番号： 15069765 v02	2016 年 3 月	「インデックスの検討」のセクションを追加。 フローセルを点検するステップを削除。 「試薬カートリッジへのライブラリーのロード」のステップに、ローディング量および濃度を明記。
資材番号： 20001843 文書番号： 15069765 v01	2015 年 10 月	NaOCl の推奨サプライヤーと同等のものは、ラボラトリーグレードと同等であることを明記。 年 1 回の Preventive Maintenance (PM) サービスの推奨を追加。 「概要」および「はじめに」の章の情報を再編成。 システム設定のカスタマイズ手順を追加。 「トラブルシューティング」の章から Live Help 手順を削除。この機能はコントロールソフトウェアから削除されました。
文書番号： 15069765 Rev. B	2015 年 5 月	試薬カートリッジの予備リザーバーの説明を修正。
文書番号： 15069765 Rev. A	2015 年 5 月	初版リリース。

目次

概要	1
装置のコンポーネント	2
シーケンス消耗品の概要	6
装置の起動	12
システム設定のカスタマイズ	14
ラン設定のカスタマイズ	16
シーケンス	17
クラスター形成	17
シーケンス	17
解析	17
シーケンスラン実行時間	17
1リード内のサイクル数	18
Local Run Managerソフトウェアによるランの作成	18
NCSによるランの作成	18
試薬カートリッジの準備	18
フローセルの準備	19
シーケンスのためのライブラリー調製	20
シーケンスランのセットアップ	21
ランの進捗状況のモニタリング	27
自動ポストランウォッシュ	29
スキャン (NextSeq 550のみ)	30
Decode File Client	30
マニフェストファイルおよびクラスターファイル	30
DMAP フォルダのダウンロード	31
アダプターへのBeadChipのロード	32
スキャンのセットアップ	33
スキャンの進捗状況のモニタリング	34
メンテナンス	36
Preventive Maintenance	36
手動洗浄の実施	36
エアフィルターの交換	39
ソフトウェアのアップデート	41
装置のシャットダウン	42
トラブルシューティング	43
トラブルシューティングファイル	43
自動チェック時のエラーの解決	45
廃液タンクが満杯の場合	47
リハイブリダイゼーションのワークフロー	48
BeadChipおよびスキャンエラー	50
カスタムレシピおよびレシピフォルダー	52

システムチェック.....	52
RAIDエラーメッセージ.....	54
ネットワークストレージのエラー.....	55
システムセッティングの設定.....	55
Real-Time Analysisの概要.....	58
RTAへの入力.....	58
RTA v2の出力ファイル.....	58
エラー処理.....	59
Real-Time Analysisのワークフロー.....	59
シーケンス出力ファイル.....	63
フローセルタイトル.....	64
シーケンス出力フォルダーの構造.....	67
スキャン出力ファイル.....	68
スキャン出力フォルダーの構造.....	69
NextSeq 550Dx研究（RUO）モードの検討事項.....	70
NextSeq 550Dxの消耗品の適合性.....	70
NextSeq 550Dxの装置モードインジケータ.....	70
NextSeq 550Dxの再起動およびシャットダウンオプション.....	71
追加リソース.....	72

概要

Illumina® NextSeq™ 500 および NextSeq 550 システムは、ハイスループットシーケンスのパワーと卓上型シーケンス装置の簡易さを兼ね備えています。

はじめに

- **ハイスループットシーケンス**：NextSeq 500 システムおよび NextSeq 550 システムはエクソーム、全ゲノムおよびトランスクリプトームのシーケンスを可能にし、TruSeq™、TruSight™ および Nextera™ ライブラリーをサポートします。
- **フローセルタイプ**：High Output および Mid Output 構成のフローセルが利用可能です。各フローセルタイプに適合する試薬カートリッジがキットとして付属しています。
- **Real-Time Analysis (RTA)**：この統合解析ソフトウェアは装置上でデータ解析を行います。これには、イメージ解析、ベースコーリングなどが含まれます。NextSeq は RTA v2 と呼ばれる RTA の実装版を使用しており、重要なアーキテクチャと機能の変更が含まれています。詳細については、[58 ページの「Real-Time Analysis の概要」](#)を参照してください。
- **BaseSpace™ Sequence Hub によるクラウドベース解析**：シーケンスワークフローは BaseSpace Sequence Hub (ランのモニタリング、データ解析、保存、共有を可能にするイルミナのクラウドゲノムコンピューティング環境) に統合されています。ランの進行中、出力ファイルは解析のためにリアルタイムで BaseSpace Sequence Hub に転送されます。
- **装置上のデータ解析**：Local Run Manager ソフトウェアは、指定した解析モジュールに従ってランデータを解析します。

アレイスキャン機能 (NextSeq 550 のみ)

- **コントロールソフトウェアに統合されたアレイスキャン機能**：NextSeq 550 は、同一の装置とコントロールソフトウェアでアレイスキャンとハイスループットシーケンスを切り替えて使用可能です。
- **拡張イメージング機能**：NextSeq 550 のイメージングシステムには、BeadChip スキャンに対応するための広い表面積のイメージングを可能にするソフトウェアとステージの改良が含まれます。
- **BeadChip タイプ**：互換性のある BeadChip タイプには、CytoSNP-12、CytoSNP-850K、Karyomap-12、および MethylationEPIC v1.0 があります。
- **BeadChip アダプター**：再使用可能な BeadChip アダプターにより、装置への BeadChip のロードが簡単に行えます。
- **データ解析**：BlueFuse® Multi ソフトウェアを使って、アレイデータを解析します。

RUO モードの NextSeq 550Dx

本ガイドの手順は、最新バージョンの RUO システムソフトウェアで研究 (RUO) モードを使用する際の NextSeq 550Dx システムにも適用されます。例外およびその他の検討事項の概要については、[70 ページの「NextSeq 550Dx 研究 \(RUO\) モードの検討事項」](#)を参照してください。

装置のコンポーネント

NextSeq 550 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、および 4 つの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から装置の構成およびセットアップができます。
- B. **ステータスバー**：装置のステータスを示します。シーケンスの処理中は青、注意が必要な場合はオレンジ、シーケンスの準備完了時は緑、24 時間以内に洗浄する必要がある場合は黄になります。
- C. **バッファコンパートメント**：バッファカートリッジおよび廃液タンクが収納されます。
- D. **試薬コンパートメント**：試薬カートリッジが収納されます。
- E. **電源ボタン**：装置と、装置のコンピューターの電源のオン / オフを行います。
- F. **イメージングコンパートメント**：シーケンスラン中にフローセルを収容します。
- G. **エアフィルターコンパートメント**：フィルター付き装置では、ここにエアフィルターが収容されており、背面パネルからアクセスできます。

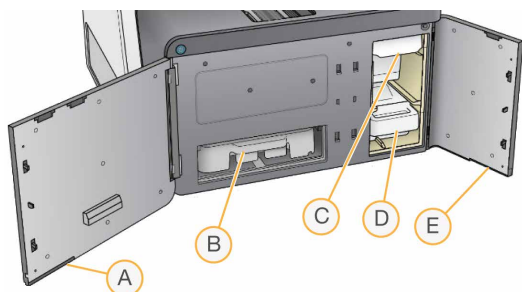
イメージングコンパートメント

イメージングコンパートメントにはステージが収容されており、シーケンス用のフローセルの位置決めをする 3 本のアライメントピンや、スキャン用の BeadChip アダプターが含まれます。フローセルまたは BeadChip アダプターがロードされると、イメージングコンパートメントドアが自動的に閉じて、コンポーネントが所定の位置に移動します。

試薬コンパートメントおよびバッファークンパートメント

NextSeq 550 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とバッファークンパートメントにアクセスし、ランの消耗品をロードして、廃液タンクを空にする必要があります。

図 2 試薬コンパートメントおよびバッファークンパートメント



- A. **試薬コンパートメントドア**：右下端にラッチが付いているドアで、試薬コンパートメントを覆います。試薬コンパートメントには試薬カートリッジが収容されます。試薬は、シッパーからフルイディクスシステムを通してフローセルへと送液されます。
- B. **試薬カートリッジ**：試薬カートリッジは、あらかじめ充填された使い捨ての消耗品です。
- C. **バッファークンパートメント**：バッファークンパートメントは、あらかじめ充填された使い捨ての消耗品です。
- D. **廃液タンク**：使用済みの試薬は、各ランの後で廃棄処分のために収集されます。
- E. **バッファークンパートメントドア**：左下端にラッチが付いているドアで、バッファークンパートメントを覆います。

エアフィルターコンパートメント

フィルター付き装置では、エアフィルターコンパートメントにエアフィルターが収容されており、背面パネルからアクセスできます。エアフィルターは 90 日ごとに交換してください。フィルターの交換については、[39 ページの「エアフィルターの交換」](#)を参照してください。

NextSeq ソフトウェア

装置のソフトウェアには、シーケンスランまたはアレイスキャンを実行するアプリケーションが統合されています。







- **NextSeq Control Software (NCS)**：装置の操作を制御し、シーケンスランまたはアレイスキャンをセットアップする手順をガイドします。
 - このソフトウェアは NextSeq にプリインストールされており、装置上で稼働します。NCS は Local Run Manager のソフトウェアモジュールまたは NCS に指定されたパラメーターに従ってランを実施します。
 - シーケンスランの開始前に、Local Run Manager モジュールまたは NCS で作成したランを選択します。NCS ソフトウェアインターフェースがフローセルと試薬をロードする手順をガイドします。
 - ラン中、ソフトウェアは、フローセルステージの操作、試薬の分注、フルイディクスの管理、温度の設定、フローセル上のクラスターのイメージの収集、および品質統計データの視覚的なサマリーの提供を行います。NCS または Local Run Manager でランをモニタリングすることができます。

- ラン中は、NCS または Local Run Manager でモニタリングすることができ、NCS は以下の機能を実行します。
 - フローセルステージの操作
 - 試薬の分注
 - フルイディクスの管理
 - 温度の設定
 - フローセル上のクラスターのイメージの収集
 - 品質統計データの視覚的なサマリーの提供
- **Local Run Manager ソフトウェア**: ランの作成と結果の解析（二次解析）を行うための統合ソフトウェアソリューション。このソフトウェアではサンプルの追跡に加えて、ユーザー権限の制御もできます。
- **Real-Time Analysis (RTA) ソフトウェア**: シーケンスランでは、RTA がラン中にイメージ解析とベーススコリングを行います。NextSeq 550 は RTA v2 を使用し、これまでのバージョンとは異なる重要なアーキテクチャーや機能が搭載されています。詳細については、[58 ページの「Real-Time Analysis の概要」](#)を参照してください。
- **Universal Copy Service**: ランフォルダーから、出力フォルダーと BaseSpace Sequence Hub（該当する場合）にシーケンス出力ファイルをコピーします。

Real-Time Analysis および Universal Copy Service はバックグラウンド処理のみ実行します。

ステータスアイコン

コントロールソフトウェアインターフェース画面の右上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。
	処理中	システムは処理中です。
	警告	警告が発生しました。 警告が発生してもランは停止せず、処理を続行するために何らかの対処を行う必要はありません。
	エラー	エラーが発生しました。 ランの処理を続行する前に、エラーに対処する必要があります。
	注意	注意が必要な通知が発生しました。詳細情報についてはメッセージを参照してください。
	情報	情報関連のメッセージのみ。何らかの対処を行う必要はありません。

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

i | メッセージを受け入れると、アイコンがリセットされ、メッセージがグレーアウトします。アイコンを選択してもメッセージは消えませんが、NCS が再起動するとメッセージは消えます。

ナビゲーションバーアイコン

NCS の最小化アイコンはコントロールソフトウェアインターフェースの右上にあります。

アクセスアイコン	アイコン名	内容説明
	NCS の最小化	NCS を最小化して Windows アプリケーションやフォルダーにアクセスする場合に選択します。

電源ボタン

NextSeq 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	ボタンを軽く押すと、電源がオンになります。
装置の電源がオン	ボタンを軽く押すと、電源がオフになります。正常な装置のシャットダウンを確認するためのダイアログボックスが、画面に表示されます。
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。 装置が反応しない場合にのみ、この方法を使用して装置をオフにしてください。

i | 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。ランの終了は最終措置です。ランの消耗品は再利用することができません。また、ランのシーケンスデータは保存されません。

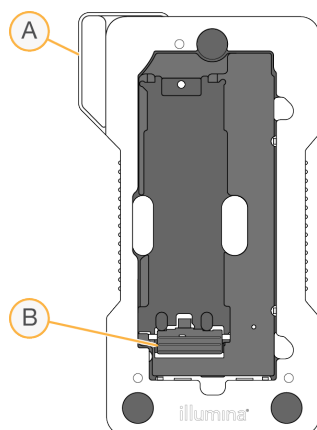
Windows パスワードの要件

オペレーティングシステムは Windows パスワードを 180 日ごとに変更するよう要求します。プロンプトが表示された場合、Windows パスワードを更新してください。解析用に Local Run Manager を使用する場合は、Local Run Manager の Windows アカウントのパスワードも更新してください。『Local Run Manager v4 Software Guide』(文書番号: 200036672) の「Specify Service Account Settings」(サービスアカウントの設定) セクションを参照してください。

再使用可能な BeadChip アダプターの概要

再使用可能な BeadChip アダプターはスキャン中に BeadChip を保持します。BeadChip は、リテンションクリップ付きのアダプターの凹部 (埋め込みシェルフ) に固定されます。その後、BeadChip アダプターはイメージングコンパートメントのステージにロードされます。

図 3 再使用可能な BeadChip アダプター



- A. BeadChip アダプター
B. リテンションクリップ

シーケンス消耗品の概要

NextSeq 550Dx システムのランに必要なシーケンス消耗品は、使い捨てのキットで別途提供されます。各キットには、フローセル、試薬カートリッジ、バッファークートリッジ、およびライブラリー希釈バッファが1つずつ含まれます。詳細については、NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)、NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)、または NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles) の Package Insert を参照してください。

消耗品を正確に追跡し、適合性を把握するために、フローセル、試薬カートリッジ、およびバッファークートリッジには RFID（無線自動識別）が使用されています。

! NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 Kit では、装置が v2.5 フローセルカートリッジを受け入れるために NOS 1.3 以降が必要です。試薬やサンプルが無駄にならないように、サンプルおよび消耗品を準備する前に、ソフトウェアアップデートを完了させてください。

i 使用する準備が整うまで、シーケンス消耗品は箱に入れておいてください。

試薬キット構成成分および保管要件

NextSeq のランに必要なシーケンス消耗品は、使い捨てのキットで別途提供されます。各キットには、フローセル、試薬カートリッジ、バッファークートリッジ、およびライブラリー希釈バッファが1つずつ含まれます。NextSeq 500/550 Kit の納品時は、次の点に注意してください。

- 指示があるまで、フローセルのホイルパッケージを開けないでください。
- 適切な性能を保証するために、構成成分を指定の温度で直ちに保管してください。
- カートリッジはパッケージのラベルを上にして保管してください。

消耗品	数量	保管温度	内容説明
試薬カートリッジ	1	-25℃ ~ -15℃	クラスター形成試薬およびシーケンス試薬を含む
バッファークートリッジ	1	15℃ ~ 30℃	バッファークートリッジおよび洗浄溶液を含む
HT1	1	-25℃ ~ -15℃	ハイブリダイゼーションバッファーク
フローセル	1	2℃ ~ 8℃ *	使い捨てのフローセル

*NextSeq v2.5 Reagents Kit の場合は、室温で発送されます。

試薬は感光性があります。試薬カートリッジおよびバッファークートリッジは遮光して暗所で保管してください。

消耗品を正確に追跡し、適合性を把握するために、フローセル、試薬カートリッジ、およびバッファークートリッジには RFID（無線自動識別）が使用されています。

その他すべてのキットでは、デュアルインデックスシーケンスプライマーおよび NaOCl があらかじめカートリッジに充填されています。追加のステップは必要ありません。

! | NextSeq v2.5 Reagent Kit には NCS v2.2 以降が必要です。サンプルおよび消耗品を準備する前に、ソフトウェアアップデートが完了していることを確認してください。

キットの適合性およびラベリング

キット構成は、色分けされたインジケータでラベル付けされており、フローセルと試薬カートリッジ間の適合性を示しています。適合性のある試薬カートリッジおよびフローセルを必ず使用してください。バッファークートリッジはすべてのキットタイプで共通です。

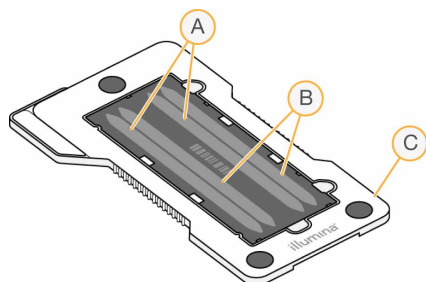
各フローセルおよび試薬カートリッジには **[High]** または **[Mid]** のラベルが付いています。ランのために消耗品を準備する際は、必ずラベルを確認してください。

キットタイプ	ラベル上のマーク
High Output Kit の構成	
Mid Output Kit の構成	

研究 (RUO) モードの NextSeq 550Dx システムには、その他にも適合性の検討事項があります。[70ページの「NextSeq 550Dxの消耗品の適合性」](#)を参照してください。

フローセルの概要

図 4 フローセルカートリッジ



- A. レーンペア A：レーン 1 および 3
- B. レーンペア B：レーン 2 および 4
- C. フローセルカートリッジのフレーム

フローセルは使い捨てのガラス基板で、この上でクラスターが形成され、シーケンス反応が行われます。フローセルはフローセルカートリッジに封入されています。

フローセルには、ペアでイメージングされる 4 つのレーンが含まれます。

- レーン 1 および 3 (レーンペア A) は同時にイメージングされます。
- レーン 2 および 4 (レーンペア B) は、レーンペア A のイメージングが完了するとイメージングされます。

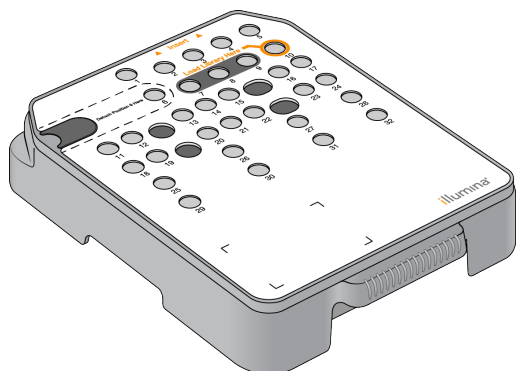
フローセルには 4 つのレーンがありますが、1 つのライブラリーまたはプールされたライブラリーのセットのみがフローセルでシーケンスされます。ライブラリーは 1 つのリザーバーから試薬カートリッジにロードされ、フローセルの 4 レーンすべてに自動的に送液されます。

各レーンは、タイルと呼ばれる小さなイメージングエリアでイメージ化されます。詳細については、[64 ページの「フローセルタイル」](#)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捨ての消耗品で、RFID で追跡されています。ホイルシールで密閉されたリザーバーには、クラスター形成試薬とシーケンス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



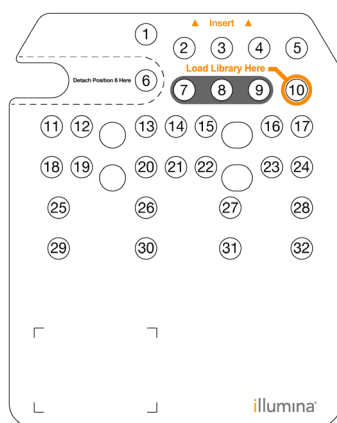
試薬カートリッジには調製したライブラリーをロードするための指定のリザーバーが含まれています。ランを開始した後、ライブラリーはリザーバーからフローセルへ自動的に送液されます。

いくつかのリザーバーは自動ポストランウォッシュ用に確保されています。洗浄溶液は、ポンプによってバッファカートリッジから予備のリザーバーへと送られ、システムを通り、最後に廃液タンクへと送液されます。

! この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。有害物質を含む試薬を扱う際は、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。

指定のリザーバー

図 6 各リザーバーの位置番号



位置	内容説明
7、8、9	オプションのカスタムプライマー
10	ライブラリーのロード

カスタムプライマーの詳細については、『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Custom Primers Guide』（文書番号：15057456）を参照してください。

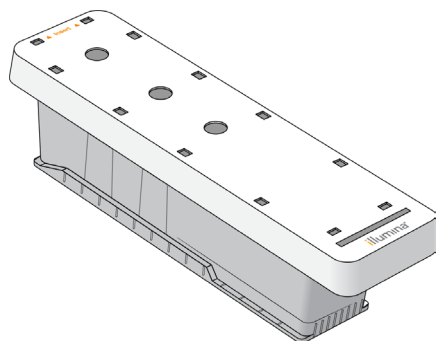
位置番号 6 の取り外し可能なリザーバー

充填された試薬カートリッジには、位置番号 6 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、位置番号 6 のリザーバーは取り外すことができます。詳細については、26 ページの「位置番号 6 からの使用済みリザーバーの取り外し」を参照してください。

バッファークートリッジの概要

バッファークートリッジは使い捨ての消耗品で、バッファーと洗浄溶液があらかじめ充填されている3つのリザーバーを含みます。バッファークートリッジには、1つのフローセルのシーケンスに十分な量が入っています。

図7 バッファークートリッジ



ユーザーが用意する消耗品および機器

NextSeq 550 では以下の消耗品および機器を使用します。

シーケンス用の消耗品

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、0.2 N に希釈
10 mM Tris-HCl, pH 8.5	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
200 mM Tris-HCl, pH 7.0	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
アルコールワイプ、 70% イソプロピル または 70% エタノール	VWR、カタログ番号：95041-714 (または同等品) 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
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)	フローセルの洗浄

メンテナンスおよびトラブルシューティング用の消耗品

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)	手動ポストランウォッシュによる 装置の洗浄、0.12%に希釈
Tween 20	Sigma-Aldrich、 カタログ番号：P7949	手動洗浄オプションによる装置の 洗浄、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	装置の洗浄（手動洗浄）
試薬グレードまたは分光分 析用グレードのメタノー ルまたはイソプロピルアル コール（99%）、100 mL ボトル	一般的なラボ用品サプライヤー	光学系パーツの定期的洗浄と対物 レンズ洗浄カートリッジの補助
エアフィルター	イルミナ、カタログ番号： 20063988	背面パネルからアクセス可能なエ アフィルター付きのシステム用、 装置が冷却用に取り込む空気の清 浄化

ラボラトリーグレード水のガイドライン

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

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

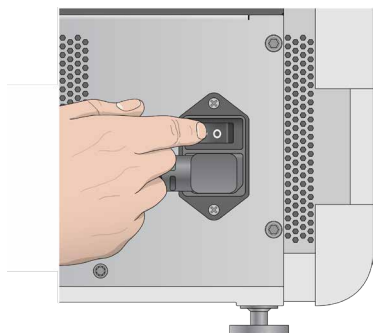
ユーザーが用意する機器

アイテム	ソース	目的
冷凍庫、-25°C ~ -15°C、 霜取り不要のもの	一般的なラボ用品サプライヤー	カートリッジの保管
アイスバケット	一般的なラボ用品サプライヤー	ライブラリー調製時に使用
冷蔵庫、2°C ~ 8°C	一般的なラボ用品サプライヤー	フローセルの保管

装置の起動

1. 電源トグルスイッチをI（ON）の位置に入れます。

図 8 装置背面にある電源スイッチ



- i** | 研究（RUO）モードで NextSeq 550Dx システムを起動するには、13 ページの「[NextSeq 550Dx システムの起動](#)」を参照してください。

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。電源ボタンを押すと装置の電源が入り、装置に組み込まれているコンピューターとソフトウェアが起動します。

図 9 装置前面にある電源ボタン

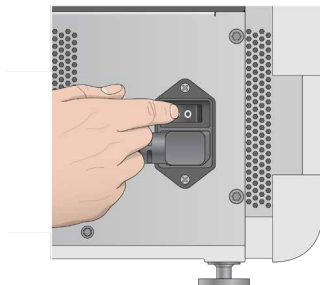


3. オペレーティングシステムがロードされるまで待ちます。
NextSeq Control Software（NCS）が自動的に起動し、システムが初期化されます。初期化ステップが完了すると、[Home] 画面が表示されます。
4. お使いのシステムがログイン認証を必要とするよう設定されている場合、システムがロードされるまで待ってから、オペレーティングシステムにログオンします。必要に応じて、ユーザー名とパスワードを施設の管理者にお問い合わせください。

NextSeq 550Dx システムの起動

電源トグルスイッチを I (ON) の位置に入れます。

図 10 装置背面にある電源スイッチ



1. 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。電源ボタンを押すと装置の電源が入り、装置に組み込まれているコンピューターとソフトウェアが起動します。
初期設定では、装置は診断 (Dx) モードで起動します。

図 11 装置前面にある電源ボタン



2. 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。
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) が自動的に起動し、システムが初期化されます。初期化ステップが完了すると [Home] 画面が表示されます。
3. Local Run Manager のユーザー名とパスワードを入力します。
Local Run Manager のパスワードに関する情報については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号: 1000000009513) を参照してください。
4. [Login] を選択します。
[Home] 画面が開き、[Sequence]、[Local Run Manager]、[Manage Instrument]、および [Perform Wash] アイコンが表示されます。
5. NOS で [Reboot to RUO] コマンドを使用して、装置を安全にシャットダウンし、研究 (RUO) モードで再起動します。
 - [Manage Instrument] を選択します。
 - [Reboot / Shutdown] を選択します。
 - [Reboot to RUO] を選択します。

- 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。
NCS が自動的に起動し、システムが初期化されます。初期化ステップが完了すると [Home] 画面が表示されます。
- お使いのシステムがログイン認証情報を必要とするように構成されている場合は、施設のユーザー名とパスワードを使用して Windows にログインします。

i | 装置がどのモードになっているかわからない場合は、70 ページの「NextSeq 550Dx の装置モードインジケーター」を参照してください。

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、以下のカスタマイズ可能な設定が含まれています。ネットワーク構成の設定を変更するには、55 ページの「システムセッティングの設定」を参照してください。

- 装置識別情報のカスタマイズ（アバターおよびニックネーム）
- キーボードオプションおよびオーディオインジケーターの設定
- カスタムレシピオプションの設定
- BaseSpace Sequence Hub からの装置ソフトウェアアップデートのチェックの設定
- 装置性能データの送信オプションの設定

装置のカスタマイズ（アバターおよびニックネーム）

- [Home] 画面から [Manage Instrument] を選択します。
- [System Customization] を選択します。
- 使用する装置に好みのアバターイメージを割り当てるには、[Browse] を選択して、対象のイメージに移動します。
- [Nickname] フィールドに、装置の名前を入力します。
- [Save] を選択して設定を保存し、画面を進めます。
イメージと名前は、各画面の左上に表示されます。

キーボードオプションおよびオーディオインジケーターの設定

- [Home] 画面から [Manage Instrument] を選択します。
- [System Customization] を選択します。
- [Use on-screen keyboard] チェックボックスを選択すると、装置に入力するためのスクリーンキーボードが起動します。

4. **[Play audio]** のチェックボックスを選択すると、以下の場合にオーディオインジケータが有効になります。
 - 装置の初期化時
 - ランが開始したとき
 - 特定のエラーが発生したとき
 - ユーザーの操作が必要なとき
 - ランが終了したとき
5. **[Save]** を選択して設定を保存し、画面を進めます。

カスタムレシピオプションの設定

1. [Home] 画面から **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[System Customization]** を選択します。
3. **[Enable Custom Recipes]** チェックボックスを選択し、試薬カートリッジをロードする際のカスタムレシピの選択を有効にします。詳細については、[52 ページの「カスタムレシピおよびレシピフォルダー」](#)を参照してください。
4. **[Save]** を選択して設定を保存し、画面を進めます。

BaseSpace からの装置ソフトウェアアップデートのチェックの設定

1. [Home] 画面から **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[System Customization]** を選択します。
3. **[Automatically check for new software updates on BaseSpace]** チェックボックスを選択し、BaseSpace Sequence Hub のアップデートの自動チェックを有効にします。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。アップデートが入手可能な場合、以下の場所に通知が表示されます。
 - ソフトウェアアップデートアイコンの [Manage Instrument] 画面
 - [Home] 画面の [Manage Instrument] ボタン
4. **[Save]** を選択して設定を保存し、画面を進めます。

装置性能データの送信オプションの設定

1. [Home] 画面から **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[System Customization]** を選択します。

3. **[Send Instrument Performance Data to Illumina]** を選択し、Illumina Proactive モニタリングサービスを有効にします。この設定のソフトウェアインターフェース上での名称は、使用する NCS のバージョンによって、本ガイドに記載された名称と異なる場合があります。
この設定をオンにすると、装置性能データがイルミナに送信されます。このデータは、イルミナによる問題解決をより容易にするだけでなく、潜在的な故障の検出をするなど、事前のメンテナンスを可能にすることで、装置の動作可能時間を最大限にします。このサービスの利点の詳細については、『Illumina Proactive Technical Note』（文書番号：1000000052503）を参照してください。本サービスは、次のようになっています。
 - シーケンスデータは送信しません。
 - 装置をインターネットにアクセス可能なネットワークに接続させる必要があります。
 - 初期設定でオンになっています。このサービスを無効にするには **[Send Instrument Performance Data to Illumina]** の設定をオフにします。
4. **[Save]** を選択して設定を保存し、画面を進めます。

ラン設定のカスタマイズ

コントロールソフトウェアには、好みのランセットアップおよび未使用試薬のページに関するカスタマイズ可能な設定が含まれています。

ランセットアップオプションの設定

1. [Home] 画面から **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[System Customization]** を選択します。
3. **[Use Advanced Load Consumables]** チェックボックスを選択して、1つの画面でランのすべての消耗品をロードするオプションを有効にします。
4. **[Skip Pre-Run Check Confirmation]** チェックボックスを選択して、自動チェックの成功後に、シーケンスまたはスキャンが自動的に開始するようにします。
5. **[Save]** を選択して設定を保存し、画面を終了します。

自動ページオプションの設定

1. [Home] 画面から **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[System Customization]** を選択します。
3. **[Purge Consumables at End of Run]** チェックボックスを選択して、各ランの後に未使用の試薬が試薬カートリッジから廃液タンクへ自動的にページされるようにします。

i | 消耗品のページでは、自動的にワークフローに処理時間が追加されます。

4. **[Save]** を選択して設定を保存し、画面を終了します。

シーケンス

NextSeq 550 でシーケンスランを実施するには、試薬カートリッジおよびフローセルを準備します。その後、ソフトウェアのプロンプトに従って、セットアップを行いランを開始します。クラスター形成とシーケンスは装置上で実行されます。ラン終了後、すでに装置にロードされている試薬キット構成で、装置洗浄が自動的に始まります。

クラスター形成

クラスター形成中、単一の DNA 分子がフローセルの表面に結合した後で、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ることでイメージングされます。フローセル上のタイルのイメージングが終了した後、次のタイルがイメージングされます。このプロセスは各シーケンスサイクルで繰り返し行われます。イメージ解析に続いて、ソフトウェアがベースコーリング、フィルタリング、およびクオリティスコアリングなどの一次解析を行います。

以下の場所でランの進捗状況および統計データをモニタリングします。

- NCS インターフェース
- BaseSpace Sequence Hub
- Local Run Manager
- Sequencing Analysis Viewer (SAV) ソフトウェアを使用するネットワーク接続コンピューター。
[29 ページの「Sequencing Analysis Viewer」](#) を参照してください。

解析

ランの実行中に、コントロールソフトウェアがベースコール (BCL) ファイルを自動的に BaseSpace Sequence Hub、Local Run Manager、または二次解析用の指定した出力場所に転送します。

複数の解析方法が用意されており、どの方法を使用するかはアプリケーションによって異なります。詳細については、BaseSpace ヘルプまたは『Local Run Manager v4 Software Guide』（文書番号：200036672）を参照してください。

シーケンスラン実行時間

ランの最大長は、各リードの 150 サイクルのペアエンドラン (150 × 2) に、2 つのインデックスリードそれぞれに対して最大 10 サイクルを加えたものです。

予想される実行時間やその他のシステム仕様については、イリミナのウェブサイトにある [NextSeq 550 の仕様ページ](#) を参照してください。

1 リード内のサイクル数

シーケンスランにおいて、1リード内で実行されるサイクル数は、解析対象のサイクル数より1サイクル多くしてください。例えば、150 サイクルのペアエンドランでは、151 サイクルのリード (151 × 2)、合計 302 サイクルを実施します。ランの終了時に、150 × 2 サイクルが解析されます。追加したサイクルは、フェーシングおよびプレフェーシングの計算に必要です。

Local Run Manager ソフトウェアによるランの作成

Local Run Manager でのランおよび解析パラメーターのセットアッププロセスは、使用する特定の解析ワークフローモジュールによって異なります。ランの作成に関する具体的な方法については、Local Run Manager のモジュールガイドを参照してください。

1. [Home] 画面から [**Edit Runs**] を選択します。
2. Local Run Manager のダッシュボードから [**Create Run**] を選択し、解析モジュールを選択します。
3. ラン名を入力し、ラン用のサンプルを入力します。該当する場合は、マニフェストをインポートします。
4. ランを保存し、Local Run Manager のダッシュボードウィンドウを閉じます。

Local Run Manager ソフトウェアを使用せず NCS でランを作成するには、Manual ランモードを使用します。18 ページの「[NCS によるランの作成](#)」および 21 ページの「[ランモード](#)」を参照してください。

NCS によるランの作成

NCS (Manual ランモード) でランを作成する場合、フローセルをロードする直前に、ランおよび解析パラメーターを入力します。

1. 22 ページの「[NCS でのランおよび解析パラメーターの入力 \(Manual ランモード\)](#)」で、必要なランおよび解析パラメーターを確認します。
2. ランおよび解析パラメーターを決めておくことで、シーケンスランを開始する際に遅延がなくなります。

試薬カートリッジの準備

1. -25°C ~ -15°C の保管庫から試薬カートリッジを取り出します。
2. 室温のウォーターバスで融解します (~ 60 分間)。カートリッジを水に沈めないでください。
3. 作業台の上で優しく叩いてカートリッジの下部から水を除去して乾燥させます。
【代替方法】 2°C ~ 8°C で一晩かけて試薬を融解します。試薬の融解には少なくとも 18 時間必要です。試薬はこの温度で、1 週間安定です。
4. カートリッジを 5 回転倒混和し、試薬を混合します。
5. 位置 29、30、31、および 32 を点検して、試薬が融解していることを確認します。
6. 作業台の上でカートリッジを優しく叩き気泡を減らします。

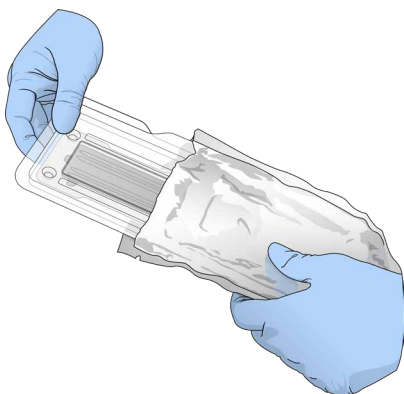
- !** | この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。有害物質を含む試薬を扱う際は、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。

フローセルの準備

- 2°C～8°Cの保管庫からフローセルの新しいパッケージを取り出します。
- フローセルのパッケージを未開封のまま室温で30分静置します。

i | ホイルパッケージが開封されていなければ、フローセルは室温で最大12時間放置できます。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。
- フローセルをホイルパッケージから取り出します。

図 12 ホイルパッケージからの取り出し



- 透明なプラスチック製クラムシェルパッケージを開封し、フローセルを取り出します。

図 13 クラムシェルパッケージからの取り出し



- i** | フローセルのこすり傷や外観上の軽微な不良は異常ではなく、データ品質および収量が損なわれることはないと考えられます。イルミナでは、このようなフローセルを通常どおりに使用することを推奨しています。

- リントフリーのアルコールワイブを使用してフローセルのガラス表面をきれいにします。ラボ用リントフリー紙で、ガラスの表面に残った水滴を拭き取ります。

シーケンスのためのライブラリー調製

ライブラリーの分量およびローディング濃度は、使用する NCS のバージョンによって異なります。

コントロールソフトウェアのバージョン	ライブラリーの分量	ライブラリー濃度
NCS v1.3 以降	1.3 mL	1.8 pM
NCS v1.2 以前	3 mL	3 pM

ライブラリーの変性と希釈

ライブラリーを以下のローディング量とローディング濃度に希釈して変性します。

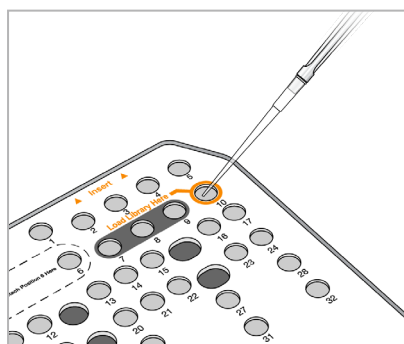
キットタイプ	ローディング量	ローディング濃度
High Output	1.3 mL	1.8 pM
Mid Output	1.3 mL	1.5 pM

実際には、ローディング濃度はライブラリー調製方法と定量方法によって異なる場合があります。手順については、『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Denature and Dilute Libraries Guide』（文書番号：15048776）を参照してください。

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、位置番号 10 のリザーバー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. 調製済みの 1.8 pM ライブラリー 1.3 mL を、[**Load Library Here**] というラベルが付いている位置番号 10 のリザーバーにロードします。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 14 ライブラリーのロード



シーケンスランのセットアップ

1. [Home] 画面で [**Experiment**] を選択します。
2. [Select Assay] 画面で [**Sequence**] を選択します。
Sequence コマンドによってイメージングコンパートメントドアが開き、前回のランの消耗品がリリースされ、一連のランのセットアップ画面が表示されます。通常は少し時間がかかります。

ランモード

シーケンスランをセットアップする際に以下のランモードの1つを選択し、ラン情報の入力場所およびデータ解析方法を指定します。

ランモード	ラン情報	データ解析 *
Local Run Manager	Local Run Manager に入力します。	ソフトウェアは指定された出力フォルダーにデータを保存し、Local Run Manager が自動解析します。
Manual	NCS に入力します。	ソフトウェアは指定された出力フォルダーにデータを保存し、後で装置外で解析します。

* 解析を目的とした BaseSpace Sequence Hub はいずれのランモードとも組み合わせて使用することができます。ランモードが Local Run Manager であり、BaseSpace Sequence Hub が設定されている場合、両方のアプリケーションによってデータが解析されます。

Local Run Manager が既定のランモードです。これを使用するとワークフローが最も効率的になります。Local Run Manager にランを作成し、保存します。次に情報はコントロールソフトウェアに送信され、そこでランを選択してランセットアップを続行します。シーケンス後、Local Run Manager は自動的にデータ解析を実施します。サンプルシートと解析アプリケーションを別々に用意する必要はありません。

i | Local Run Manager はコントロールソフトウェアの機能ではありません。シーケンスサンプルの記録、ランパラメーターの指定、データ解析のための統合ソフトウェアです。

BaseSpace Sequence Hub (オプション)

シーケンスランをセットアップする際に、以下の BaseSpace Sequence Hub オプションの1つを選択できます。

オプション	内容説明および必要事項
Run Monitoring and Storage	リモートモニタリングと解析のために、InterOp ファイル、ログファイル、ランデータを BaseSpace Sequence Hub に送信します。BaseSpace Sequence Hub アカウント、インターネット接続、サンプルシートが必要です。
Run Monitoring Only	ランをリモートでモニタリングできるように、InterOp ファイルおよびログファイルを BaseSpace Sequence Hub に送信します。このオプションが初期設定です。BaseSpace Sequence Hub アカウントとインターネット接続が必要になります。

ランモードおよび BaseSpace Sequence Hub の選択

1. [Run Setup] 画面で、以下のランモードの1つを選択します。
 - Local Run Manager
 - Manual
2. (オプション) [Use BaseSpace Sequence Hub Setting] を選択し、以下の1つを選択します。
 - Run Monitoring and Storage
 - Run Monitoring Only

BaseSpace Sequence Hub のユーザー名とパスワードを入力します。

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択します。プロンプトが表示されるのは、ユーザーが複数のワークグループに属している場合だけです。

3. [Next] を選択します。

NCS でのランおよび解析パラメーターの入力 (Manual ランモード)

1. 任意のラン名を入力します。
2. (オプション) 任意のライブラリー 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。
- **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 と同じサイクル数です。
- **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。

コントロールソフトウェアは、以下の基準に従って入力を確認します。

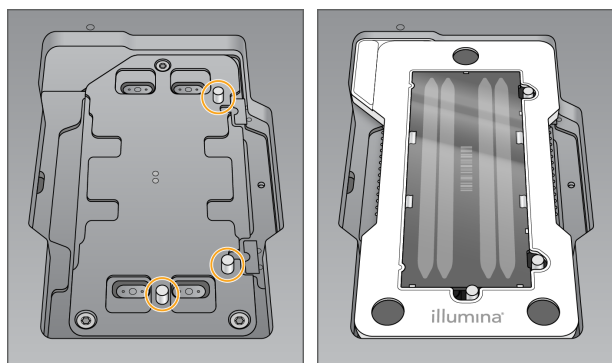
- 総サイクルが許可された最大サイクル数を超えていない
 - Read 1 のサイクル数が、テンプレート形成に使用される 5 サイクルより大きい
 - インデックスのリードサイクルが、Read 1 および Read 2 のサイクル数を超えていない
6. (オプション) カスタムプライマーを使用する場合、使用するプライマーのチェックボックスを選択します。詳細については、『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Custom Primers Guide』(文書番号: 15057456) を参照してください。
 - **Read 1** : リード 1 用カスタムプライマー
 - **Read 2** : リード 2 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

7. 現在のランに対する出力フォルダの場所を設定します。[**Browse**] を選択してネットワーク上のロケーションを指定します。
出力フォルダの要件の詳細については、57 ページの「出力フォルダの場所の設定」を参照してください。
8. [**Browse**] を選択してサンプルシートを指定します。
BaseSpace Sequencing Hub の [Run Monitoring and Storage] で Manual (ラン) モードに設定しているシステムでは、サンプルシートが必要です。
9. [**Purge consumables for this run**] を選択します。
この設定では、現在のランの実行後、自動的に未使用の試薬がパージされます。
10. [**Next**] を選択します。
11. (オプション) [Edit] アイコンを選択して、ランパラメーターを変更します。
12. [**Next**] を選択します。

フローセルのロード

1. 前回のランの使用済みフローセルを取り外します。
2. アライメントピンに対してフローセルを位置合わせし、フローセルをステージに置きます。

図 15 フローセルのロード



3. [**Load**] を選択します。
自動的にドアが閉じ、フローセル ID が画面に表示され、センサーがチェックされます。
4. [**Next**] を選択します。

廃液タンクを空にする

1. 廃液タンクを取り出し、適切な基準に従って中身を廃棄します。

図 16 廃液タンクを取り出し

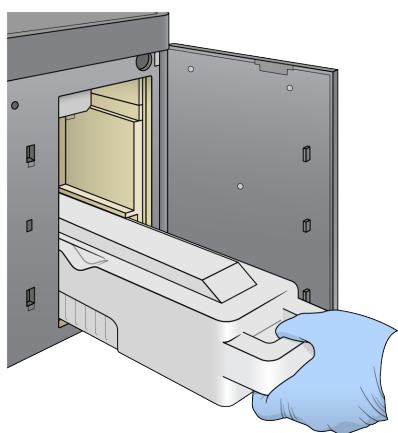


i | 廃液タンクを取り出す際は、片方の手を底面に添えて支えてください。

! | 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。有害物質を含む試薬を扱う際は、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。

2. 空の廃液タンクをバッファーコンパートメントの一番奥までスライドさせます。カチッという音が聞こえたら、容器が所定の位置にセットされた状態です。

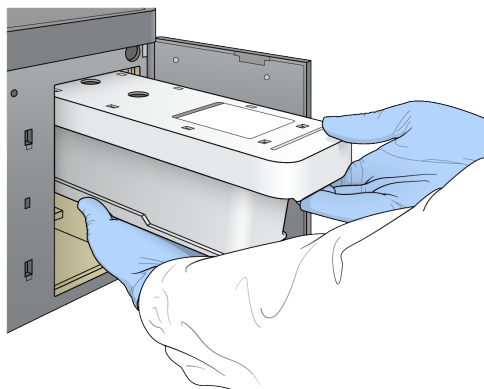
図 17 空の廃液タンクのロード



バッファークートリッジのロード

1. 上部コンパートメントから使用済みのバッファークートリッジを取り出します。
2. 新しいバッファークートリッジをバッファークンパートメントの一番奥までスライドさせます。カチッという音が聞こえたら、カートリッジが所定の位置にセットされた状態です。バッファークートリッジ ID が画面に表示され、センサーがチェックされます。

図 18 バッファークートリッジのロード



3. バッファークンパートメントドアを閉じ、[Next] を選択します。

試薬カートリッジのロード

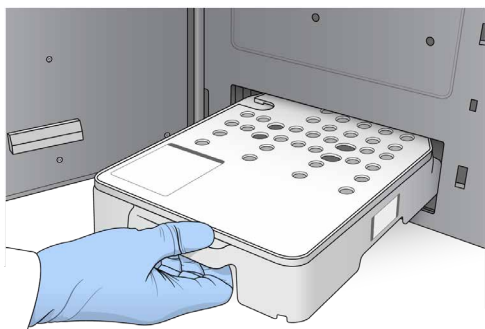
1. 試薬コンパートメントから使用済みの試薬カートリッジを取り出します。残余の中身を適切な基準に従って廃棄します。

! | この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。有害物質を含む試薬を扱う際は、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。

i | 試薬コンパートメントから使用済みの試薬カートリッジを取り出します。残余の中身を適切な基準に従って廃棄します。26 ページの「位置番号 6 からの使用済みリザーバーの取り外し」を参照してください。

2. 試薬カートリッジを試薬コンパートメントの一番奥までスライドさせた後、試薬コンパートメントドアを閉じます。

図 19 試薬カートリッジのロード

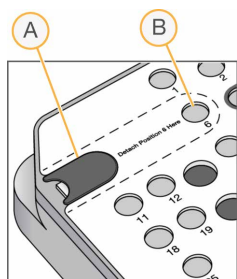


3. **[Load]** を選択します。
ソフトウェアによりカートリッジが自動的にセットされ（～ 30 秒）、試薬カートリッジ ID が画面に表示され、センサーがチェックされます。
4. **[Next]** を選択します。

位置番号 6 からの使用済みリザーバーの取り外し

1. 使用済みの試薬カートリッジを装置から取り出した後、位置番号 6 の横にあるスロットの保護用ゴムカバーを取り外します。

図 20 位置番号 6 の取り外し可能なリザーバー



- A. 保護用のゴムカバー
- B. 位置番号 6



2. 透明なプラスチックタブを押し下げ、左方向に押しつけてリザーバーを取り外します。
3. 適切な基準に従ってリザーバーを廃棄します。

自動チェックのレビュー


ソフトウェアにより、システムの自動チェックが行われます。チェック中に、以下のインジケーターが画面に表示されます。

- **灰色のチェックマーク**：チェックはまだ行われていません。
- **進行中アイコン**：チェック中です。

- **緑色のチェックマーク**：チェックにパスしました。
- **赤色の印**：チェックにパスしませんでした。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。
45 ページの「[自動チェック時のエラーの解決](#)」を参照してください。

進行中の自動チェックを止めるには、右下にある  アイコンを選択してください。チェックを再開するには、 アイコンを選択してください。チェックは、未完了または失敗した時点から再開されます。

カテゴリ内の個別のチェック結果を表示するには  アイコンを選択してカテゴリを展開してください。

 | NCS v4.0 以降を使って初回のシーケンスランを実施する場合、システムの自動チェックにおいて、フローセルのレジストレーションは通常 15 分以上かかります。

ランの開始

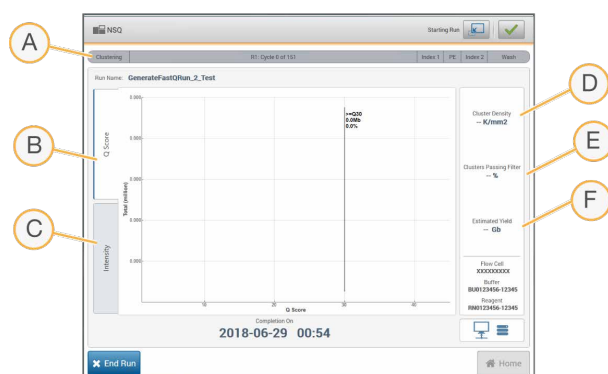
自動チェックが完了したら、[**Start**] を選択します。シーケンスランが開始します。

チェックの成功後にランが自動的に開始されるようシステムを設定するには、16 ページの「[ランセットアップオプションの設定](#)」を参照してください。

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たら、ランの進捗状況、シグナル強度、クオリティスコアをモニタリングします。

図 21 シーケンスランの進捗状況とメトリクス



- ランの進捗状況**：各リードの現在のステップおよび完了したサイクル数。進捗バーのサイズは各ステップのラン比率に比例していません。右上に表示される残り時間を使って、実際の時間を判断してください。
- Q-score**：クオリティスコア（Q スコア）の分布。[62 ページの「クオリティスコアリング」](#)を参照してください。
- Intensity**：各タイトルの 90 パーセントのクラスターシグナル強度値。プロットの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 です。これらの色は Sequencing Analysis Viewer (SAV) Software で示される塩基の色と一致します。
- Cluster Density (K/mm²)**：そのランにおいて、検出されたクラスター数。
- Clusters Passing Filter (%)**：フィルターを通過したクラスターの割合。[61 ページの「フィルターを通過するクラスター」](#)を参照してください。
- Estimated Yield (Gb)**：そのランにおいて、予想される塩基数。

i | [Home] を選択した後は、ランメトリクスの表示に戻ることはできません。ただし、ランメトリクスは BaseSpace Sequencing Hub からアクセスでき、また、Sequencing Analysis Viewer (SAV) を用いたスタンドアロンコンピューターからも確認することができます。













ランメトリクスのサイクル

ランのさまざまな時点で、ランメトリクスが表示されます。

- クラスタ形成ステップの間、メトリクスは表示されません。
- 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。
- 25 サイクル目以降に、Cluster Density、Clusters Passing Filter、Estimated Yield、Q-score などのランメトリクスが表示されます。

データ転送

選択した解析設定に応じて、ラン実行中にアイコンが画面上に表示され、データ転送状況が示されます。

ステータス	Local Run Manager	出力フォルダー	Illumina BaseSpace Sequence Hub
接続中			
接続中かつデータの転送中			
切断			
無効			

ランの実行中にデータ転送が途切れた場合、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。接続が復旧すると、データ転送は自動的に再開します。接続がランの終了までに復旧しなかった場合は、次のランが始まる前に装置のコンピューターからデータを手動で消去します。

Universal Copy Service

NextSeq System Software Suite には Universal Copy Service が含まれます。RTA v2 は、ファイルをソースの場所から目的の場所にコピーするようにサービスにリクエストし、サービスはコピーのリクエストを受け取った順に処理します。例外が生じた場合、ファイルはコピーキュー内のファイル数に応じてコピーのためにリキューされます。

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メトリクスを表示します。メトリクスは、RTA によって生成されたデータに基づいて作成されたプロット、グラフ、およびテーブルの形で表示されます。これらのデータは InterOp ファイルに書き込まれます。メトリクスはランの進捗とともに更新されます。ランの実行中に任意のタイミングで **[Refresh]** を選択して、更新したメトリクスを表示することができます。詳細については、『Sequencing Analysis Viewer Software User Guide』（文書番号：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ているソフトウェアに含まれています。同じネットワークに接続された別のコンピューターにも Sequencing Analysis Viewer をインストールして、ランメトリクスを遠隔でモニタリングすることもできます。

自動ポストラランウォッシュ

シーケンスランが完了すると、自動ポストラランウォッシュが開始されます。ポストラランウォッシュには、バッファカートリッジ内の洗浄溶液および試薬カートリッジ内の NaOCl が使用されます。

自動ポストラランウォッシュの所要時間は約 90 分です。洗浄が終了すると、[Home] 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することができます。

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。カートリッジは次のランまでそのままにしておきます。

スキャン (NextSeq 550 のみ)

i | 本セクションの情報は NextSeq 550 のみに適用されます。

NextSeq 550 でスキャンを行うには、以下の構成が必要が必要です。

- ハイブリダイズされ染色された BeadChip
- 再使用可能な BeadChip アダプター
- 測定用の BeadChip のデコードマップ (DMAP) ファイル
- 測定用の BeadChip のマニフェストファイル
- 測定用の BeadChip のクラスターファイル

出力ファイルはスキャン中に生成された後、指定の出力フォルダーへの転送待機となります。

BlueFuse Multi ソフトウェアを用いて解析する場合、スキャンデータはジェノタイプコール (GTC) ファイル形式で用意されている必要があります。初期設定では、NextSeq 550 は GTC ファイル形式での標準化データおよび関連するジェノタイプコールを生成します。オプションで、シグナル強度データ (IDAT) ファイルを追加で生成するように装置に設定することができます。詳細については、[57 ページの「BeadChip スキャン構成」](#)を参照してください。

Decode File Client

DMAP フォルダーには、BeadChip 上のビーズ位置を特定し、各ビーズに関連したシグナルを定量する情報が含まれます。DMAP フォルダーは各 BeadChip バーコードに固有のものであります。

Decode File Client ユーティリティを使うと、標準 HTTP プロトコルを用いて、DMAP フォルダーをイルミナサーバーから直接ダウンロードすることができます。

Decode File Client にアクセスするには、[イルミナウェブサイトの Decode File Client サポートページ](#)を参照してください。Decode File Client は、DMAP フォルダーのネットワークロケーションにアクセスできるコンピューターにインストールしてください。

詳細については、[31 ページの「DMAP フォルダーのダウンロード」](#)を参照してください。

マニフェストファイルおよびクラスターファイル

ソフトウェアでは、BeadChip ごとにマニフェストファイルとクラスターファイルにアクセスする必要があります。マニフェストファイルとクラスターファイルはそれぞれ BeadChip タイプに固有です。ファイル名に NS550 を含むクラスターファイルを使用していることを確認してください。これらのファイルは NextSeq システムと互換性があります。

- **マニフェストファイル**：マニフェストファイルには、BeadChip の SNP またはプローブコンテンツが記載されます。マニフェストファイルには、BPM ファイル形式が使用されます。
- **クラスターファイル**：クラスターファイルには、イルミナジェノタイプピングアレイのためのクラスターの位置が記載されており、データを解析してジェノタイプコールを行う場合に使用されます。クラスターファイルには、EGT ファイル形式が使用されます。

ファイルの場所は [BeadChip Scan Configuration] 画面で指定します。NCS の [Home] 画面で、[**Manage Instrument**]、[**System Configuration**]、[**BeadChip Scan Configuration**] の順に選択します。

NextSeq 550 装置の設置時に、イルミナの担当者がこれらのファイルをダウンロードして、コントロールソフトウェアのパスを指定します。消失した場合や新規バージョンが利用可能な場合を除き、これらのファイルを変更する必要はありません。詳細については、[51 ページの「マニフェストファイルおよびクラスターファイルの交換」](#)を参照してください。

DMAP フォルダのダウンロード

Decode File Client を用いて、アカウントまたは BeadChip（初期設定表示）ごとに、DMAP フォルダにアクセスすることができます。

アカウントによる DMAP フォルダへのアクセス

- [Decode File Client] のメインタブから、ダウンロードオプションを1つ選択します。
 - AutoPilot
 - All BeadChips not yet downloaded
 - All BeadChips
 - BeadChips by purchase order
 - BeadChips by barcode
- 必須情報を入力します。
- ダウンロードする DMAP フォルダを探します。
- ダウンロード先に十分な空きスペースがあることを確認します。
- ダウンロードを開始します。[Download Status and Log] タブにダウンロードステータスが表示されます。
- 指定した DMAP フォルダの場所に DMAP フォルダを保存します。

BeadChip による DMAP フォルダへのアクセス

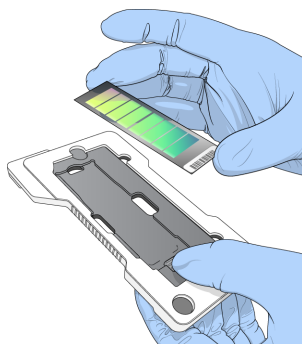
- 以下のオプションのうち 2 項目を用いて BeadChip を特定します。
 - BeadChip バルコード
 - BeadChip ボックス ID
 - 発注番号
 - 販売注文番号
- ダウンロードする DMAP フォルダを探します。
- ダウンロード先に十分な空きスペースがあることを確認します。

- ダウンロードを開始します。[Download Status and Log] タブにダウンロードステータスが表示されます。
- 指定した DMAP フォルダーの場所に DMAP フォルダーを保存します。

アダプターへの BeadChip のロード

- アダプターのリテンションクリップを押し下げます。クリップはわずかに後方に傾き開きます。
- BeadChip の端を持ち、BeadChip のバーコードをリテンションクリップの近くに配置して、アダプターの埋め込みシェルフの上に BeadChip を置きます。

図 22 アダプターへの BeadChip のロード



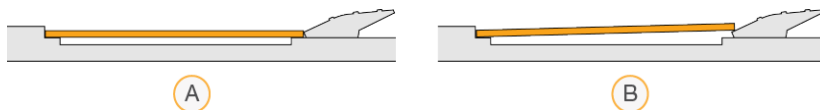
- BeadChip の両側の開口部から、BeadChip がアダプターの埋め込みシェルフに固定されていることを確認します。

図 23 BeadChip の設置と固定



- リテンションクリップをゆっくりと戻し、BeadChip を固定します。
- BeadChip を側面から目視して、BeadChip がアダプター上で水平に設置されていることを確認します。必要に応じて、BeadChip を設置し直します。

図 24 BeadChip の位置の確認



- 正しい位置：クリップを戻したときに BeadChip がアダプター上で水平になる
- 間違った位置：クリップを戻したときに BeadChip がアダプター上で水平にならない

スキヤンのセットアップ

- [Home] 画面で **[Experiment]** を選択した後、**[Scan]** を選択します。

Scan コマンドによりイメージングコンパートメントドアが開き、前回のランの消耗品が（ある場合）リリースされ、一連のスキヤンセットアップ画面が表示されます。通常は少し時間がかかります。

シーケンス消耗品の取り出し

スキヤンのセットアップ時に使用済みのシーケンス消耗品が残っている場合、次のステップに移る前に試薬カートリッジおよびバッファークートリッジを取り出すように指示されます。

1. 指示が表示された場合、前回のシーケンスランの使用済みのシーケンス消耗品を取り出します。
 - a. 試薬コンパートメントから試薬カートリッジを取り出します。残余の中身を適切な基準に従って廃棄します。
 - b. バッファークンパートメントから使用済みのバッファークートリッジを取り出します。

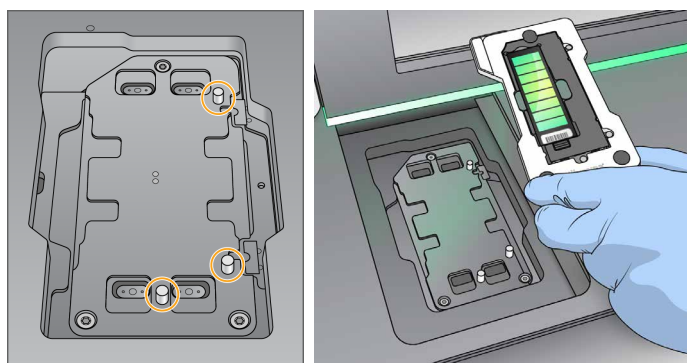
! この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。有害物質を含む試薬を扱う際は、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。

2. 試薬コンパートメントドアおよびバッファークンパートメントドアを閉じます。

BeadChip アダプターのロード

1. アライメントピンに合わせて、ステージに BeadChip アダプターを配置します。

図 25 BeadChip アダプターのロード



2. **[Load]** を選択します。
自動的にドアが閉じ、BeadChip ID が画面に表示され、センサーがチェックされます。通常は少し時間がかかります。BeadChip バーコードが読み込めない場合、ダイアログボックスが表示され、手動でバーコードを入力することができます。50 ページの「BeadChip バーコードをソフトウェアが読めない場合」を参照してください。
3. **[Next]** を選択します。

スキヤンのセットアップ

1. [Scan Setup] 画面で、以下の情報を確認してください。
 - **Barcode** : BeadChip がロードされるときに、ソフトウェアが BeadChip バーコードを読みとります。バーコードを手動で入力した場合、[Edit] ボタンが変更用に表示されます。
 - **Type** : BeadChip タイプは BeadChip バーコードに基づいて自動入力されます。
 - **DMAP Location** : DMAP フォルダーの場所は [BeadChip Scan Configuration] 画面に示されます。今回のスキヤンのみ場所を変更するには、[Browse] を選択し、正しい場所に移動します。
 - **Output Location** : 出力の場所は [BeadChip Scan Configuration] 画面に示されます。今回のスキヤンのみ場所を変更するには、[Browse] を選択し、希望する場所に移動します。
2. [Next] を選択します。


自動チェックのレビュー

ソフトウェアにより、システムの自動チェックが行われます。チェック中に、以下のインジケーターが画面に表示されます。

- **灰色のチェックマーク** : チェックはまだ行われていません。
- **進行中アイコン** : チェック中です。
- **緑色のチェックマーク** : チェックにパスしました。
- **赤色の印** : チェックにパスしませんでした。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。[45 ページの「自動チェック時のエラーの解決」](#)を参照してください。

進行中の自動チェックを止めるには、右下にある  アイコンを選択してください。チェックを再開するには、 アイコンを選択してください。チェックは、未完了または失敗した時点から再開されます。

カテゴリー内の個別のチェック結果を表示するには  アイコンを選択してカテゴリーを展開してください。

 | NCS v4.0 以降を使って初回のシーケンスランを実施する場合、システムの自動チェックにおいて、フローセルのレジストレーションは通常 15 分以上かかります。

スキヤンの開始

自動チェックが完了したら、[Start] を選択します。スキヤンが開始されます。

チェックの成功後にスキヤンが自動的に開始されるようシステムを設定するには、[16 ページの「ランセットアップオプションの設定」](#)を参照してください。

スキヤンの進捗状況のモニタリング

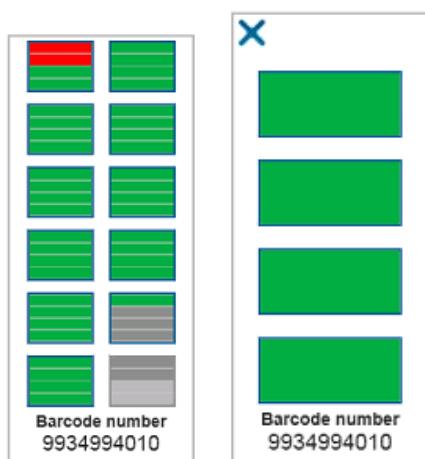
1. BeadChip イメージを用いて、スキヤンの進捗状況をモニタリングします。イメージの色はそれぞれスキヤンのステータスを示します。
 - **薄い灰色** : 未スキヤン
 - **濃い灰色** : スキヤン後、レジストレーション未実施

- **緑色**：スキャン後、レジストレーション成功
- **赤色**：スキャンおよびレジストレーション失敗

レジストレーションに失敗した場合、失敗したセクションを含むサンプルを再スキャンすることができます。[50 ページの「BeadChip スキャンの失敗」](#)を参照してください。

2. BeadChip のイメージを選択して、選択したサンプルの全体表示と詳細表示を切り替えます。
 - 全体表示では、BeadChip のサンプルと各サンプル内のセクションが表示されます。
 - 詳細表示では、選択したサンプル内の各セクションが表示されます。

図 26 BeadChip イメージ：全体表示および詳細表示



- i** | スキャンの強制終了は最終措置です。スキャンの完了前にスキャンを強制終了すると、スキャンデータは保存されません。

データ転送

スキャンが完了すると、データはスキャン出力フォルダーへの転送待機となります。データは、装置のコンピューターに一時的に書き込まれます。後続のスキャンが始まると、一時フォルダーは装置のコンピューターから自動的に削除されます。

データ転送に必要な時間はネットワーク接続によって異なります。後続のスキャン開始前に、データが出力フォルダーに書き込まれていることを確認してください。これは、GTC ファイルがバーコードフォルダー内にあるかどうかで確認できます。詳細については、[69 ページの「スキャン出力フォルダーの構造」](#)を参照してください。

接続が途切れた場合、データ転送は接続が復旧すると自動的に再開されます。

メンテナンス

メンテナンス手順には、手動での装置の洗浄や、エアフィルターの交換、システムソフトウェアの利用可能なアップデートが含まれます。

- 装置の洗浄**：各シーケンスランの後に、自動的にポストランウォッシュが行われ、装置のパフォーマンスが維持されます。ただし、手動洗浄は一定の条件下で定期的の実施する必要があります。[36 ページの「手動洗浄の実施」](#)を参照してください。
- ソフトウェアのアップデート**：システムソフトウェアの更新バージョンが利用可能な場合、以下の2つの方法のうち、いずれかを使って自動的にアップデートをインストールできます。
 - BaseSpace Sequence Hub に接続して行う方法
 - イルミナウェブサイトからインストーラーをダウンロードして手動で行う方法。[41 ページの「ソフトウェアのアップデート」](#)を参照してください。
- エアフィルターの交換**：エアフィルター付き装置では、背面パネルからフィルターにアクセスできます。エアフィルターを定期的に交換することで、装置の適切な空気の流れを維持できます。

Preventive Maintenance

イルミナでは、Preventive Maintenance (PM) サービスを毎年受けていただく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は、営業担当またはイルミナのテクニカルサポートに連絡して有償の PM サービスを手配してください。

手動洗浄の実施

手動洗浄は [Home] 画面から開始します。洗浄オプションには、Quick Wash と Manual Post-Run Wash があります。

洗浄タイプ	内容説明
Quick Wash 時間：20 分	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（バッファー洗浄カートリッジ）でシステムを洗浄します。 <ul style="list-style-type: none"> 試薬カートリッジとバッファーカートリッジを装着した状態で装置がアイドル状態にある場合は、14 日間ごとに実施する必要があります。 装置が乾燥状態（試薬カートリッジとバッファーカートリッジを取り外した状態）にある場合には、7 日間ごとに実施する必要があります。
Manual Post-Run Wash 時間：90 分	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（バッファー洗浄カートリッジ）、および 0.12% 次亜塩素酸ナトリウム（試薬洗浄カートリッジ）でシステムを洗浄します。 自動ポストランウォッシュが行われなかった場合に、実施する必要があります。

手動洗浄には、装置に付属の試薬洗浄カートリッジとバッファ洗浄カートリッジ、および使用済みのフローセルが必要です。使用済みフローセルは装置洗浄に最大 20 回使用することができます。

図 27 従来の試薬洗浄カートリッジおよびバッファ洗浄カートリッジ

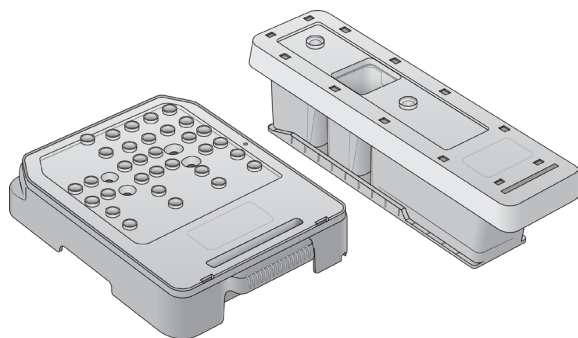
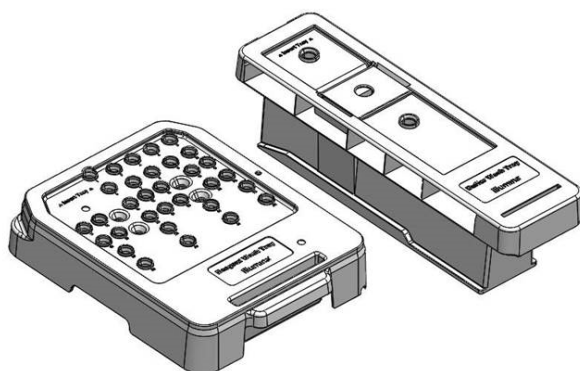


図 28 新しい試薬洗浄カートリッジおよびバッファ洗浄カートリッジ



Manual Post-Run Wash の準備

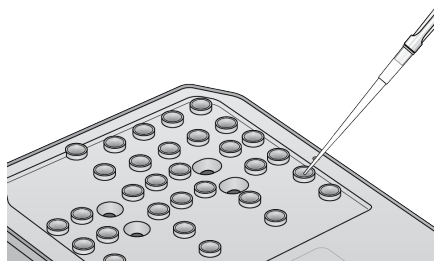
ユーザーが用意する消耗品	分量および内容説明
<ul style="list-style-type: none"> NaOCl 	1 mL、0.12% に希釈。 試薬洗浄カートリッジ（位置番号 28）にロードする。
<ul style="list-style-type: none"> 100% Tween 20 ラボラトリーグレード水 	0.05% の Tween 20 洗浄溶液 125 mL の調製に用いる。 バッファ洗浄カートリッジ（中央リザーバー）にロードする。

i | **24 時間**以内に調製した新しい NaOCl の希釈液を使用してください。1 mL を超える量を作る場合は、残った希釈液を 2°C～8°C で保管して、24 時間以内に使用してください。これを行えない場合は、残った NaOCl の希釈液は廃棄してください。

- 以下の分量をマイクロチューブに混合すると、0.12% の NaOCl が 1 mL できます。
 - 5% NaOCl (24 μ L)
 - ラボラトリーグレード水 (976 μ L)

2. チューブを転倒混和します。
3. 試薬洗浄カートリッジに 0.12% NaOCl を 1 mL 添加します。添加するリザーバーのポジションは、試薬カートリッジにおける位置番号 28 に相当します。

図 29 NaOCl のロード



4. 以下の分量を混合すると、0.05% の Tween 20 洗浄溶液ができます。

従来のバッファー洗浄カートリッジ

- 100% Tween 20 (62 μ L)
- ラボラトリーグレード水 (125 mL)
- バッファー洗浄カートリッジの中央リザーバーに 125 mL の洗浄溶液を添加します。

新しいバッファー洗浄カートリッジ

- 100% Tween 20 (75 μ L)
- ラボラトリーグレード水 (150 mL)
- バッファー洗浄カートリッジの中央リザーバーに 150 mL の洗浄溶液を添加します。

5. [Perform Wash] を選択した後、[Manual Post-Run Wash] を選択します。

Quick Wash の準備

ユーザーが用意する消耗品	分量および内容説明
<ul style="list-style-type: none"> • 100% Tween 20 • ラボラトリーグレード水 	0.05% の Tween 20 洗浄溶液 40 mL の調製に用いる。バッファー洗浄カートリッジ (中央リザーバー) にロードする。

1. 以下の分量を混合すると、0.05% の Tween 20 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. バッファー洗浄カートリッジの中央リザーバーに 40 mL の洗浄溶液を添加します。
3. [Perform Wash] を選択した後、[Quick Wash] を選択します。

使用済みのフローセルおよび洗浄カートリッジのロード

1. 使用済みのフローセルが装置にロードされていない場合は、ロードします。[**Load**] を選択した後で、[**Next**] を選択します。
2. 廃液タンクを取り出し、適切な基準に従って中身を廃棄します。

! | この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。有害物質を含む試薬を扱う際は、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全に関する詳細な情報については、jp.support.illumina.com/sds.html に掲載されている SDS を参照してください。
3. 空の廃液タンクをバッファークンパートメントの一番奥までスライドさせます。
4. 前回のランで使用したバッファークートリッジが残っている場合は取り出します。
5. 洗浄溶液を含むバッファークートリッジをロードします。
6. 前回のランで使用した試薬カートリッジが残っている場合は取り出します。
7. 試薬洗浄カートリッジをロードします。
8. [**Next**] を選択します。洗浄前チェックが自動的に始まります。

洗浄の開始

1. [**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。カートリッジは次のランまでそのままにしておきます。

エアフィルターの交換

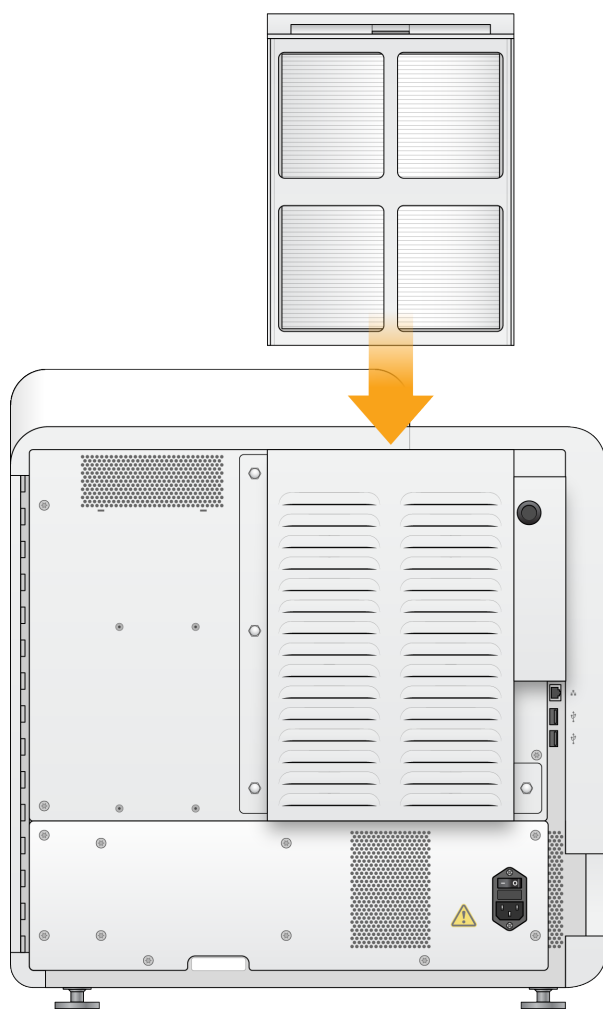
新しいシステムには、予備のエアフィルターが3つ付属しています。これらのフィルターは保管しておき、フィルターを交換するよう装置に促された場合に使用してください。

エアフィルター付き装置では、背面からフィルターにアクセスできます。エアフィルターによって、装置の空気の流れが維持できます。エアフィルターの交換の通知は90日ごとに表示されます。表示された場合は、[**Remind in 1 day**] を選択するか、以下の手順に従って [**Filter Changed**] を選択します。[**Filter Changed**] を選択すると、90日のカウントダウンがリセットされます。

1. 新しいエアフィルターをパッケージから取り出し、フィルターのフレームに取り付ける日付を記入します。
2. 装置の背面で、フィルタートレイの上側を押し下げ、トレイを外します。
3. フィルタートレイの上側を持ち、トレイを持ち上げて装置から完全に引き出します。

4. 古いエアフィルターを取り出して、廃棄します。
5. 新しいエアフィルターをトレイに挿入します。
 - i** | エアフィルターの前後が逆になっていると正しく機能しません。緑の上向き矢印が見えて、警告ラベルが見えない状態になるように、エアフィルターをトレイに挿入します。矢印はフィルタートレイのハンドル方向を示します。
6. フィルタートレイをスライドして装置に入れます。カチッと音がするまでフィルタートレイの上部を下に押し込みます。

図 30 エアフィルターの挿入




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 System Suite と呼ばれるソフトウェアバンドルにまとめられています。これには以下のソフトウェアが含まれます。

- NextSeq Control Software (NCS)
- NextSeq レシピ
- Local Run Manager ソフトウェア
- RTA
- NextSeq Service Software (NSS)
- Universal Copy Service
- Direct Memory Access (DMA) ドライバー


ソフトウェアのアップデートのインストールは、インターネット接続を使用して自動で行うことも、ネットワークまたは USB の場所から手動で行うこともできます。

- **自動アップデート**—インターネットにアクセス可能なネットワークに接続している装置では、アップデートが利用できる場合に [Home] 画面の [Manage Instrument] ボタン上にアラート  アイコンが表示されます。
- **手動アップデート**：イルミナウェブサイトの [NextSeq 550 サポートページ](#) から System Suite インストーラーをダウンロードします。手動アップデートを行う場合は、シーケンスラン用のサンプルおよび消耗品を準備する前に必ずアップデートを完了してください。

自動でのソフトウェアのアップデート

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表示されます。
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. リリースノートを確認します。
 - c. 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すると、コントロールソフトウェアが自動的に再起動します。

-  | 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、自動でシステムを再起動する必要があります。

手動によるソフトウェアのアップデート

1. イルミナのウェブサイトから System Suite インストーラーをダウンロードして、ネットワークロケーションに保存します。
もしくは、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します。
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の場所に移動し、**[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. リリースノートを確認します。
 - c. 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すると、コントロールソフトウェアが自動的に再起動します。

i | 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、自動でシステムを再起動する必要があります。

装置のシャットダウン

1. **[Manage Instrument]** を選択します。
研究 (RUO) モードで NextSeq 550Dx システムをシャットダウンするには、[71 ページの「NextSeq 550Dx の再起動およびシャットダウンオプション」](#) を参照してください。
2. **[Shutdown Options]** を選択します。
3. **[Shutdown]** を選択します。
Shutdown コマンドによりソフトウェアが安全にシャットダウンされ、装置の電源がオフになります。少なくとも 60 秒待ってから、装置の電源を再び入れます。

i | 初期設定では、装置は電源を入れると診断 (Dx) モードで起動します。

! | 装置を移設しないでください。装置を不適切に動かすと、光学アライメントが影響を受け、データの完全性が損なわれるおそれがあります。装置の移設が必要な場合は、イルミナの担当者にご連絡ください。

トラブルシューティング

技術的な質問については、イルミナウェブサイトの NextSeq 550 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、およびよくある質問が掲載されています。

サポート情報にアクセスするには、MyIllumina アカウントにログインしてください。

ランの品質やパフォーマンスの問題については、テクニカルサポートにお問い合わせください。

トラブルシューティングを容易にするために、BaseSpace Sequence Hub に保存されているランサマリーへのリンクをイルミナのテクニカルサポートと共有することをご検討ください。また、Illumina Proactive モニタリングサービスが有効な場合は、トラブルシューティングを支援することができます。サービスの詳細については、[15 ページの「装置性能データの送信オプションの設定」](#)を参照してください。

トラブルシューティングファイル

問題のトラブルシューティングを目的に、イルミナのテクニカルサポート担当者がラン固有またはスキャン固有のファイルのコピーをリクエストすることがあります。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。

シーケンスランのためのトラブルシューティングファイル

キーファイル	サブフォルダー	内容説明
ラン情報ファイル (RunInfo.xml)	<ランフォルダー名>	以下の情報が含まれます。 <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 インデックス付きのリードかどうか 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)	<ランフォルダー名>	ランパラメーターやラン試薬構成品に関する情報が含まれます。RFID、シリアルナンバー、部品番号、有効期限に関する情報が含まれます。
RTA 構成ファイル (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	ランの RTA 構成設定が含まれます。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 で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。

キーファイル	サブフォルダー	内容説明
ログファイル	Logs	ログファイルは、各サイクルで装置によって実行された各ステップを詳しく説明し、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。[InstrumentName]_CurrentHardware.csv という名前のファイルには、装置コンポーネントのシリアルナンバーのリストが含まれます。
エラーログファイル (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs	RTA エラーのログ。エラーログファイルは、エラーが発生するたびに更新されます。
グローバルログファイル (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs	すべての RTA イベントのログ。グローバルログファイルは、ラン全体を通じて更新されます。
レーンログファイル (*LaneLog*.txt)	RTA Logs	RTA 処理イベントのログ。レーンログファイルは、ラン全体を通じて更新されます。

RTA エラー

RTA エラーのトラブルシューティングを行うには、まず RTALogs フォルダーに保存されている 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。ファイルは、出力フォルダー内のラン固有のフォルダーにあります。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。

アレイスキャンのためのトラブルシューティングファイル

キーファイル	サブフォルダー	内容説明
スキャンパラメーター ファイル (ScanParameters.xml)	<ランフォルダー名>	スキャンパラメーターに関する情報が含まれます。情報にはスキャン日付、BeadChip バージョン、クラスターファイルの場所、およびマニフェストファイルの場所が含まれます。
ログファイル	Logs	ログファイルには、スキャン中に装置で行われた各ステップが記載されます。

キーファイル	サブフォルダー	内容説明
メトリクスファイル	[Barcode]	<p>メトリクスはサンプルメトリクスおよびセクションパラメーターとして提供されます。</p> <p>[barcode]_sample_metrics.csv : 各サンプルおよびチャンネル（赤色と緑色）について、Percent Off Image、Percent Outliers、P05、P50、P95、Avg FWHM Avg、FWHM Stddev、および Min Registration Score が一覧表示されます。</p> <p>[barcode]_section_metrics.csv : 各サンプル およびタイルについて、Laser Z-position、Through Focus Z-position、Red FWHM、Green FWHM、Red Avg Pixel Intensity、Green Avg Pixel Intensity、Red Registration Score、および Green Registration Score が一覧表示されます。</p>
再スキャンファイル	[Barcode]	<p>[barcode]_rescan.flowcell : 再スキャン用に調整されたタイルの位置が一覧表示され、増加したタイルごとのオーバーラップが含まれます。</p>

自動チェック時のエラーの解決

自動チェック中にエラーが発生した場合は、以下の推奨措置に従ってエラーを解決します。自動チェックはシーケンスとアレイスキャンでは異なります。

ただし、エラーを解決するためにコントロールソフトウェアの初期化が必要になる場合があります。コントロールソフトウェアの初期化中はフローセル、試薬カートリッジ、およびバッファーカートリッジのRFIDがロックされます。システムを再起動する前に、フローセル、試薬洗浄カートリッジ、およびバッファーカートリッジを装置から取り外す必要があります。また、ホイルシールに穴が開くと、消耗品であるRFIDはロックされます。

シーケンスランのチェック

プレラン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。ただし、エラーを解決するためにコントロールソフトウェアの初期化が必要になる場合があります。コントロールソフトウェアの初期化中はフローセル、試薬カートリッジ、およびバッファーカートリッジのRFIDがロックされます。システムを再起動する前に、フローセル、試薬洗浄カートリッジ、およびバッファーカートリッジを装置から取り外す必要があります。また、ホイルシールに穴が開くと、消耗品であるRFIDはロックされます。フローセルのRFIDがソフトウェアによって読み取られると、7時間のタイマーが起動します。7時間が経過すると、フローセルはロックされ、使用できないとみなされます。

システムチェック	推奨措置
Doors Closed	コンパートメントの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ます。ランの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。 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。
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。前回のランのデータが転送されなかった可能性があります。 装置のハードドライブからランデータを消去します。
Network Connection	ネットワーク接続が切断されています。ネットワークのステータスおよび物理的なネットワーク接続をチェックします。
Network Disk Space	ネットワークサーバーの容量がいっぱいです。
温度	推奨措置
Temperature	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。
イメージングシステム	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 Steps-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。
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	フローセルが正しく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。イメージングコンパートメントドアが開きます。 フローセルを取り出して再ロードし、正しく設置されたことを確認します。
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。
Buffer Mechanism	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。
Spent Reagents Empty	廃液タンクを空にして、空のタンクを再ロードします。

アレイスキャンのチェック

システムチェック	推奨措置
Doors Closed	コンパートメントの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ます。 ランの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アップデートを実施し、すべてのソフトウェアコンポーネントを復元します。
Verify Input Files	クラスターファイルとマニフェストファイルへのパスが正しく、ファイルが存在することを確認します。
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。前回のランのデータが転送されなかった可能性があります。 装置のハードドライブからランデータを消去します。
Network Connection	ネットワーク接続が切断されています。ネットワークのステータスおよび物理的なネットワーク接続をチェックします。
Network Disk Space	BaseSpace アカウントまたはネットワークサーバーの容量がいっぱいです。
イメージングシステム	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 Steps-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。
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。
Auto-Center	BeadChip アダプターを取り出します。BeadChip がアダプターに設置されていることを確認して、アダプターを再ロードします。

廃液タンクが満杯の場合

必ず廃液タンクが空の状態ですべてのランを開始してください。

廃液タンクを空にせずにランを開始すると、タンクが満杯になった時点でシステムセンサーによってランが一時停止されます。システムセンサーは、クラスタリング中、ペアエンドの再合成中、または自動的なポストランウォッシュ中にはランを一時停止できません。

ランが一時停止すると、ダイアログボックスが表示され、シッパーを持ち上げて満杯のタンクを空にするオプションが表示されます。

廃液タンクを空にする

1. [Raise Sippers] を選択します。
2. 廃液タンクを取り出して、中身を適切に廃棄します。
3. 空になったタンクをバッファコンパートメントに戻します。
4. [Continue] を選択します。自動的にランが再開します。

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メトリクスが 2,500 よりも低いシグナル強度を示した場合、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、1,000 より低いシグナル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。

i | [End Run] コマンドは最終措置です。終了したランは再開できず、ランの消耗品を再利用することはできません。また、ランのシーケンスデータは保存されません。

ランを終了する場合、ソフトウェアによりラン終了前に以下のステップが実行されます。

- フローセルを安全な状態にします。
- 後から実行するランのためにフローセルの RFID のロックを解除します。
- 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。
- 自動でのポストランウォッシュをスキップします。

リハイブリダイゼーションのランを開始すると、ソフトウェアによりランを実行するために以下のステップが実行されます。

- 固有のランの名前に基づきランフォルダーを作成します。
- 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。
- クラスター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 と残りのランを続行します。

リハイブリダイゼーションのためのランの終了ポイント

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**：シグナル強度はテンプレートのレジストレーション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 の後でランを終了しても安全ですが、サイクル 5 の後で終了することを推奨します。クラスター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、フローセルを後でリハイブリタイゼーションする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、どこでランを停止したかにかかわらず、新しい NextSeq 試薬カートリッジとバッファーク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。フローセルを保存しても、現在のランが回収できるとは限りません。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。

i | フローセルは、プラスチック製クラムシェルパッケージ内で乾燥剤なしで、2 ~ 8°C で最長 7 日間保存できます。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. [Home] 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。36 ページの「手動洗浄の実施」を参照してください。

i | 停止したランから試薬カートリッジとバッファークートリッジを取り出していない場合、手動洗浄にそれらを使用することができます。取り出している場合は、試薬洗浄カートリッジとバッファークートリッジを使用して手動洗浄を実施します。

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は、室温に戻します (15 ~ 30 分)。
3. 保存したフローセルをきれいにし、ロードします。
4. 廃液タンクを取り出し、中身を適切に廃棄した後、空のタンクを再ロードします。

5. [Run Setup] 画面で、以下のランモードの1つを選択します。
 - Local Run Manager
 - Manual
6. (オプション) [Use BaseSpace Sequence Hub Setting] を選択し、以下のどちらかのオプションを選択します。
 - Run Monitoring and Storage
 - Run Monitoring Only
 BaseSpace Sequence Hub のユーザー名とパスワードを入力します。
7. 新しいバッファークートリッジおよび試薬カートリッジをロードします。
8. [Next] を選択し、プレランチェックに進みランを開始します。

BeadChip およびスキャンエラー

BeadChip バーコードをソフトウェアが読めない場合

バーコードエラーのダイアログボックスが表示された場合は、以下のいずれかの方法を選択します。

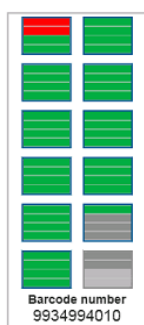
- [Rescan] を選択します。ソフトウェアによりバーコードの読み込みが再度試行されます。
- テキストフィールドを選択して、イメージに表示されるバーコードの数値を入力します。BeadChip によって異なりますが、バーコード番号は最大 12 桁です。[Save] を選択します。バーコードイメージは出力フォルダーに格納されます。
- [Cancel] を選択します。BeadChip アダプターを取り出すためにイメージングコンパートメントドアが開きます。

BeadChip スキャンの失敗

イメージはスキャン後、レジストレーションされます。レジストレーションでは、スキャンイメージ上の位置をビーズマップまたは DMAP フォルダー内に提供された情報と関連付けることによって、ビーズを特定します。

レジストレーションに失敗したセクションは、BeadChip イメージに赤色で表示されます。

図 31 スキャンに失敗したセクション



スキャンが完了してスキャンデータが出力フォルダーに書き込まれると、[Rescan] ボタンが有効になります。
[Rescan] を選択すると、ソフトウェアは以下のステップを実行します。

- タイルごとのオーバーラップの増加を利用して、失敗したセクションを含むサンプルを再スキャンします。
- 元出力フォルダーに出力ファイルを生成します。
- 失敗したセクションの以前の出力ファイルを上書きします。
- 再スキャンごとにスキャンカウンターが1つ増加しますが、これはバックグラウンドで行われます。ソフトウェアによって出力フォルダーの名称が変更されることはありません。

再スキャンまたは新しいスキャンの開始

1. [Rescan] を選択して、失敗したセクションを含むサンプルをスキャンします。
2. スキャンの失敗が続く場合は、スキャンを終了します。
3. BeadChip とアダプターを取り外して、BeadChip にほこりや異物がないかを確認します。異物を取り除くには、エアダスターまたはその他の圧縮除塵方法を用いてください。
4. BeadChip を再ロードして、新たなスキャンを開始します。
新たなスキャンが開始されると、ソフトウェアにより以下のステップが実行されます。
 - BeadChip 全体をスキャンします。
 - 新たな出力フォルダーに出力ファイルを生成します。
 - 最後の再スキャンのスキャンカウントに基づき、スキャンカウンターを1つ増やします。

マニフェストファイルおよびクラスターファイルの交換

1. 使用する BeadChip のイルミナ [サポートページ](#) にアクセスし、[Downloads] タブをクリックします。
2. 交換または更新するファイルをダウンロードし、使用するネットワークロケーションにファイルをコピーします。
- i** | 選択するマニフェストファイルとクラスターファイルが NextSeq 550 システムと互換性があることを確認してください。互換性のあるファイルのファイル名には **NS550** が含まれます。
3. 場所を変更した場合のみ、以下のように [BeadChip Scan Configuration] 画面で場所を更新してください。
 - a. NCS の [Home] 画面で [Manage Instrument] を選択します。
 - b. [System Configuration] を選択します。
 - c. [BeadChip Scan Configuration] を選択します。
4. [Browse] を選択して、置き換えまたは更新したファイルの場所に移動します。

カスタムレシピおよびレシピフォルダー

オリジナルレシピは修正しないでください。必ず、新たな名前で作成してください。オリジナルレシピを修正すると、ソフトウェアアップデーターは以降に更新するレシピを認識できなくなるため、新規バージョンがインストールされなくなります。

適切なレシピフォルダーにカスタムレシピを保存します。レシピフォルダーは以下のように構成されています。

Custom

- **High** : High Output Kit で使用するカスタマイズ済みレシピ
- **Mid** : Mid Output Kit で使用するカスタマイズ済みレシピ
- **High** : High Output Kit で使用するオリジナルレシピ
- **Mid** : Mid Output Kit で使用するオリジナルレシピ
- **Wash** : 手動洗浄レシピを含む

システムチェック

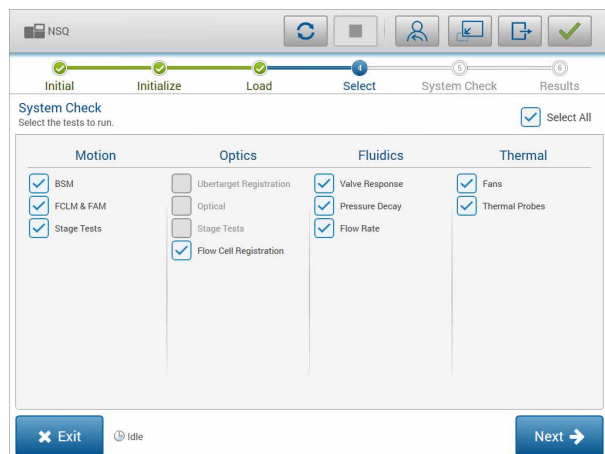
正常に動作しているときや装置のメンテナンスのためにシステムチェックを行う必要はありません。ただし、イルミナのテクニカルサポートでは、トラブルシューティングを目的としたシステムチェックの実行をお願いすることがあります。

i | 装置洗浄の期限が迫っている場合は、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、NextSeq Service Software (NSS) が開始します。サービスソフトウェアが起動し、ログインページが表示されます。Local Run Manager のいずれかのユーザー名とパスワードの認証情報（管理者またはユーザーレベル）を使用して、NSS にアクセスします。認証されると、ロード画面に NSS が表示されます。この画面は、高度なロードオプションを使用するように設定されています。

i | ロード画面が表示される前に、Local Run Manager の管理者ユーザーの認証情報を使用して、Service Software にログインする必要があります。

図 32 利用可能なシステムチェック



選択画面でアクティブになっていないチェックボックスは、イルミナの担当者のサポートを必要とするテストを示しています。

システムチェックの実施

- [Manage Instrument] 画面で、[**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よう求められたら、[**Yes**] を選択します。
- 以下のように消耗品をロードします。
 - 使用済みのフローセルが既に装置にない場合は、使用済みフローセルをロードします。
i | イルミナでは、システムチェックには High Output フローセルを使用することを推奨しています。
 - 廃液タンクを空にして、装置に戻します。
 - 中央リザーバーに 120 mL のラボラトリーグレード水を含むバッファー洗浄カートリッジをロードします。
 - 試薬洗浄カートリッジをロードします。試薬洗浄カートリッジが空で、清潔であることを確認してください。
- [**Load**] を選択します。ソフトウェアにより、フローセルと試薬洗浄カートリッジが所定の位置に移動します。[**Next**] を選択します。
- [**Next**] を選択します。システムチェックが開始します。
- (オプション) システムチェックが終了したら、チェック名の隣にある [**View**] を選択し、各チェックに関連する値を確認します。
- [**Next**] を選択します。システムチェックレポートが表示されます。
- [**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に移動してファイルを保存します。
- 終了したら、[**Exit**] を選択します。
- 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よう求められたら、[**Yes**] を選択します。コントロールソフトウェアが自動的に再起動します。

動作チェック

システムチェック	内容説明
BSM	Buffer Straw Mechanism (BSM) のゲインと距離を確認して、モジュールが適切に動作していることを確認します。
FCLM & FAM	Flow Cell Load Mechanism (FCLM) および Fluid Automation Module (FAM) のゲインと距離を確認し、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 6 つの Z ステージの移動限界およびパフォーマンスを、各カメラにつき 1 回確認します。

光学チェック

システムチェック	内容説明
Flow Cell Registration	正確なイメージング位置で、光学面のフローセルの傾きの測定、カメラ機能のテスト、イメージングモジュールのテスト、フローセルのレジストレーション確認を行います。

フルイディクスチェック

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さを確認し、ポンプシリンジの可動範囲をテストします。
Pressure Decay	密閉されたフルイディクス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確認します。バルブセンサーは、試薬ラインの空気を検出に使用されます。流量を測定し、閉塞または漏れの有無を確認します。

サーマルチェック

システムチェック	内容説明
Fans	1分あたりのパルス（PPM）でシステムファンのスピードをチェックし、ファンが機能していることを確認します。ファンが機能していないと、負の値が返されます。
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ていないと、負の値が返されます。

RAID エラーメッセージ

NextSeq のコンピューターにはハードドライブが 2 台備わっています。ハードドライブに障害が発生し始めると、システムは RAID エラーメッセージを表示して、イルミナのテクニカルサポートに問い合わせるよう促します。通常、ハードドライブの交換が必要になります。

ランセットアップ手順と通常操作を進めることはできます。メッセージの目的は、前もってサービスをスケジュールすることで、通常の装置操作の中断を回避することです。先に進むには、[**Acknowledge**] を選択し、[**Close**] を選択します。

ネットワークストレージのエラー

ネットワークストレージのエラーは、以下の原因のいずれかによって生じます。

- **出力フォルダーのストレージ容量が不十分**：ストレージデバイスの容量を増やすか、出力フォルダーを十分なストレージがある場所に移します。
- **ネットワークストレージに接続できない**：出力フォルダーへのパスを確認します。[57 ページの「出力フォルダーの場所の設定」](#)を参照してください。
- **システムがネットワークストレージに書き込みできない**：IT 管理者に権限を確認してください。装置のオペレーティングシステムの Windows アカウントは、出力フォルダーの読み書き権限が必要となります。

Local Run Manager の Windows アカウントも、出力フォルダーの読み書き権限が必要となります。『Local Run Manager v4 Software Guide』（文書番号：200036672）の「Specify Service Account Settings」（サービスアカウントの設定）を参照してください。

システムセッティングの設定

システムはインストール中に構成されます。ただし、変更が必要な場合や、システムを再構成しなければならない場合は、システム構成オプションを使用します。

- **[Network Configuration]**：IP アドレス設定、ドメイン名サーバー（DNS）アドレス、コンピューター名、ドメイン名のオプションを指定します。
- **[BaseSpace Sequence Hub]**：BaseSpace Sequence Hub を使用する場合、保管および解析のためのデータ転送先のオプションを指定します。
- **[Output Folder Location]**：出力フォルダーに対するパスのオプションを指定します。
- **[BeadChip Scan Configuration]**：以下を指定するためのオプションを指定します。
 - デフォルト DMAP フォルダーの場所
 - 出力フォルダーの場所
 - 保存したイメージのファイル形式
 - 出力ファイルタイプ

ネットワーク構成の設定

1. [Manage Instrument] 画面で、**[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、DHCP サーバーを使用する IP アドレスを入手します。

i | 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に、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、以下のように手動で別のサーバーに装置を接続することもできます。施設固有のアドレスについては、ネットワーク管理者にお問い合わせください。

- 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す。例えば「168.62.20.37」のような数字です。
 - 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ネーム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ネームサーバーに装置を接続することもできます。

- 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 アドレスに変換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 アドレスに変換できない場合は、代替 DNS を使用します。
5. **[Save]** を選択し **[Computer]** 画面に進みます。

i | 装置のコンピューター名は、製造時に装置のコンピューターに割り当てられます。コンピューター名を変更すると、接続に影響を及ぼす可能性があります。また、この操作はネットワーク管理者が行う必要があります。

6. 以下のように、装置のコンピューター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。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。
7. **[Save]** を選択します。

BaseSpace Sequence Hub の構成設定

1. **[Home]** 画面から **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[System Configuration]** を選択します。
3. **[BaseSpace Sequence Hub Configuration]** を選択します。
4. 以下のオプションの中から選択して、解析のためのデータ転送先を指定します。
 - **[Hosting Location]** リストから、データのアップロード先となるサーバーの場所を選択します。
 - Enterprise サブスクリプションがある場合、**[Private Domain]** チェックボックスを選択し、BaseSpace Sequence Hub のシングルサインオンに使用するドメイン名 (URL) を入力します。例：<https://yourlab.basespace.illumina.com>。
5. **[Save]** を選択します。

出力フォルダーの場所の設定

NextSeq では、すべてのランについて、出力フォルダーの設定が必要です。出力フォルダーへの完全な Universal Naming Convention (UNC) パスを使用してください。UNC パスにはバックスラッシュ 2 本、サーバー名、ディレクトリ名が含まれますが、マップしたネットワークドライブのドライブレターは使用できません。

- 出力フォルダーへのパスの階層が 1 つの場合、末尾にバックスラッシュが必要です。
 - UNC パスの例：\\servername\directory1\
- 出力フォルダーへのパスの階層が 2 つ以上の場合、末尾のバックスラッシュは不要です。
 - UNC パスの例：\\servername\directory1\directory2
- マップしたネットワークドライブへのパスは、エラーの原因となります。**使用しないでください。**
 - マップしたネットワークドライブへのパスの例：T:\sbsfiles

Local Run Manager ランモードでは、Local Run Manager ソフトウェアに出力フォルダーの場所を設定してください。詳細については、『Local Run Manager v4 Software Guide』（文書番号：200036672）を参照してください。

BeadChip スキャン構成

1. [Manage Instrument] 画面で、[**System Configuration**] を選択します。
2. [**BeadChip Scan Configuration**] を選択します。
3. デフォルト DMAP フォルダーの場所を指定するには、[**Browse**] を選択し、施設内ネットワークの優先フォルダーの場所に移動します。

i | 各スキャン前に、この場所に DMAP コンテンツをダウンロードおよびコピーしてください。DMAP コンテンツは各 BeadChip に必要で、各 BeadChip バーコードに固有のものです。
4. デフォルトの出力場所を指定するには、[**Browse**] を選択し、施設内ネットワークの優先する場所に移動します。
5. 保存したイメージのイメージファイル形式を選択します。初期設定のイメージタイプは **JPG** です。
6. スキャンデータの出力ファイル形式を選択します。初期設定の出力ファイルタイプは **GTC のみ** です。
7. [**Save**] を選択します。
8. [Scan Map] 画面から、各 BeadChip タイプのマニフェストファイルおよびクラスターファイルへのフルパスを指定します。各ファイルタイプの [**Browse**] を選択し、これらのファイルのあるフォルダーの場所に移動します。

Real-Time Analysis の概要

NextSeq 550 は RTA と呼ばれる Real-Time Analysis ソフトウェアの実装版を使用しています。RTA は装置のコンピューター上で実行され、イメージからシグナル強度を抽出し、ベースコーリングを行い、クオリティスコアをベースコールに割り当てます。RTA とコントロールソフトウェアがウェブ HTTP インターフェースを通じて通信し、メモリーファイルを共有します。RTA 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。

i | デマルチプレックスパフォーマンスは計算されません。そのため、Sequencing Analysis Viewer (SAV) の [Index] タブは表示されません。

RTA への入力

RTA は処理のために以下の入力が必要です。

- ローカルシステムメモリーに含まれるタイルイメージ。
- RunInfo.xml、ランの開始時に自動的に生成されます。このファイルは以下の情報を提供します。
 - ラン名
 - サイクル数
 - リードがインデックス化されているかどうか
 - フローセル上のタイルの数
- RTA.exe.config、このファイルは XML 形式のソフトウェア構成ファイルです。

RTA は RunInfo.xml の場所と、オプションの出力フォルダー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。

RTA v2 の出力ファイル

各チャンネルのイメージは、タイルとしてメモリーに渡されます。タイルは、カメラの視野として定義されるフローセルの小さなイメージングエリアです。これらのイメージから、クオリティスコア付きの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補助するものです。

ファイルタイプ	内容説明
ベースコールファイル (*.bcl)	解析される各タイルは、レーンおよびサイクルごとに1つのベースコールファイルに集約されます。集約され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含まれています。
フィルターファイル (*.filter)	フィルター情報はタイルごとに生成され、1レーンにつき1つのフィルターファイルへと集約されます。フィルターファイルは、クラスターがフィルターをパスしたかどうかを示します。
クラスターロケーションファイル (*.locs)	クラスターロケーションファイルには、1つのタイル上の全クラスターの X、Y 座標が記録されています。クラスターロケーションファイルは、テンプレート形成中、レーンごとに生成されます。

ファイルタイプ	内容説明
ベースコールインデックスファイル (*.bci)	ベースコールインデックスファイルは元のタイル情報を保存するために、レーンごとに生成されます。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。

出力ファイルは BaseSpace 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使用して FASTQ に変換し、サードパーティ解析ソリューションで使用します。NextSeq ファイルには bcl2fastq v2.0 以降が必要です。bcl2fastq の最新バージョンについては、イリミナウェブサイトの [NextSeq ダウンロードページ](#) を参照してください。

RTA v2 は、InterOp ファイルとして保存されるランクオリティのリアルタイムメトリクスを提供します。InterOp ファイルはタイル、サイクル、リードレベルメトリクスを含むバイナリー出力で、Sequencing Analysis Viewer (SAV) でのリアルタイムメトリクスの表示のために使用されます。SAV の最新バージョンについては、イリミナウェブサイトの [SAV ダウンロードページ](#) を参照してください。

エラー処理

RTA 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 ファイル形式でエラーファイルに記録されます。

処理の終了時に、以下のログファイルおよびエラーファイルは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 にはレーンごとの処理イベントが一覧表示されます。
- *Error*.tsv にはラン中に起こったエラーが一覧表示されます。
- *WarningLog*.tsv にはラン中に起こった警告が一覧表示されます。

Real-Time Analysis のワークフロー

テンプレート形成	クラスターロケーションをマップします。
レジストレーションとシグナル強度の抽出	フローセル上の各クラスターの場所を記録し、各クラスターのシグナル強度値を決定します。
フェージングの補正	フェージングとプレフェージングの影響を補正します。
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 座標と Y 座標を使用して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 サイクルからのイメージデータが必要です。テンプレートサイクルの最後のタイルのイメージを取得した後、テンプレートが形成されます。

i | 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 1 つ以上必要です。インデックスシーケンスの場合には、RTA v2 は最初の **2** サイクルに G 以外の塩基が 1 つ以上必要です。

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ロケーション (*.locs) ファイルに書き込まれます。

レジストレーションとシグナル強度の抽出

レジストレーションとシグナル強度の抽出はテンプレート形成後に開始されます。

- 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イメージをアライメントします。
- シグナル強度の抽出では、所定のイメージに対するテンプレートの各クラスターのシグナル強度値を測定します。

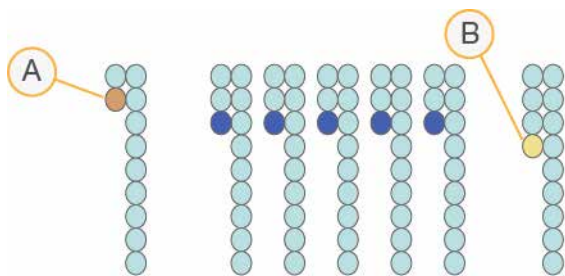
あるサイクルでいずれかのイメージのレジストレーションが失敗した場合、そのサイクルのそのタイルに対してベースコールは行われません。Sequencing Analysis Viewer (SAV) ソフトウェアを使用してサムネイルイメージを検査し、レジストレーションに失敗したイメージを特定します。

フェージングの補正

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

- 1 塩基分、反応が遅れる方へずれるとフェージングが起こります。
- 1 塩基分、反応が先へ進む方へずれるとプレフェージングが起こります。

図 33 フェージングとプレフェージング



- A. 塩基がフェージングしているリード
B. 塩基がプレフェージングしているリード

RTA によりフェージングとプレフェージングの影響が修正され、ラン実行中、すべてのサイクルでデータ品質が向上します。

ベースコーリング

ベースコーリングでは、特定のサイクルにおける特定のタイルのすべてのクラスターに対し、特定の塩基（A、C、G または T）を決定します。NextSeq 550 は 2 色チャンネルシーケンスを使用するため、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使用して 4 つの DNA 塩基のデータをエンコードできます。

ある画像から抽出された強度と別の画像との比較により、その結果、ヌクレオチドにそれぞれ対応した 4 つの集団に分けられます。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決定します。

図 34 クラスターシグナル強度の可視化

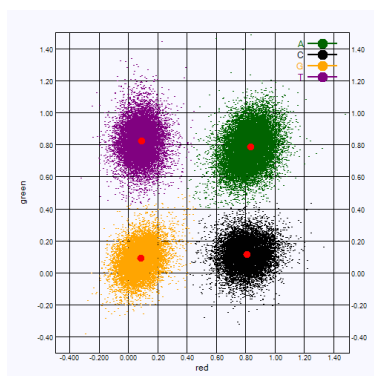


表 1 2 色チャンネルシーケンスのベースコール

塩基	赤チャンネル	緑チャンネル	結果
A	1 (on)	1 (on)	赤チャンネルと緑チャンネルでシグナル強度を示すクラスター。
C	1 (on)	0 (off)	赤チャンネルのみでシグナル強度を示すクラスター。
G	0 (off)	0 (off)	既知のクラスター位置でシグナル強度を示さないクラスター。
T	0 (off)	1 (on)	緑チャンネルのみでシグナル強度を示すクラスター。

フィルターを通過するクラスター

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

2 色チャンネル解析において、RTA は集団ベースの方式を使用してベースコールの Chastity（シグナル強度の純度）を決定します。最初の 25 サイクルのうち、Chastity が 0.63 未満のベースコールが 1 つ以下であった場合、そのクラスターはフィルターを通過します（PF：Pass Filter）。フィルターを通過しなかったクラスターについては、ベースコールは行われません。

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 つのサイクルのいずれかで G 以外の塩基が少なくとも 1 つ含まれている必要があります。インデックスリードが G の 2 つの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パフォーマンスを保証するために、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うことで、どのサイクルでも G 塩基のみになるインデックスの組み合わせを回避できます。

- 赤チャンネル：A または C
- 緑チャンネル：A または T

低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度の予測値です。高い Q スコアは、ベースコールのクオリティが高く、正しい可能性が高いことを示しています。

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

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

i | クオリティスコアリングは、Phred アルゴリズムの修正版に基づいています。

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

Q スコアを決定後、結果はベースコールファイルに保存されます。

シーケンス出力ファイル

ファイルタイプ	ファイルの説明、場所、名前
ベースコールファイル	<p>解析した各タイルはベースコールファイルに保存され、各サイクルの各レーンにつき1つのファイルに集約されます。この集約されたファイルには、そのレーンのすべてのクラスターのベースコールとエンコードされたクオリティスコアが含まれます。</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : ファイルは各レーンにつき1つのフォルダーに保存されます。</p> <p>[Cycle].bcl.bgzf : [Cycle] はサイクル数を示す4桁の数字で表されます。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>各レーンについて、バイナリーインデックスファイルは、オリジナルのタイル情報を各タイルの2つの値(タイル番号とそのタイルのクラスター数)で一覧表示します。</p> <p>ベースコールインデックスファイルが作成されるのは、ベースコールファイルがそのレーンに対して初めて作成されたときです。</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : ファイルは各レーンにつき1つのフォルダーに保存されます。</p> <p>s_[Lane].bci</p>
クラスターロケーションファイル	<p>各タイルについて、各クラスターのXY座標は各レーンにつき1つの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\L00[X] : ファイルは各レーンにつき1つのフォルダーに保存されます。</p> <p>s_[Lane].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パスしたかどうかを示します。フィルター情報は各レーンおよびリードにつき、1つのフィルターファイルに集約されます。サイクル26の時点で、25サイクルまでのデータを使用してフィルターファイルが作成されます。</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : ファイルは各レーンにつき1つのフォルダーに保存されます。</p> <p>s_[Lane].filter</p>
InterOp ファイル	<p>Sequencing Analysis Viewer (SAV) で使用されるバイナリーレポートファイル。</p> <p>InterOp ファイルはラン全体を通じて更新されます。</p> <p>InterOp フォルダー</p>
RTA 構成ファイル	<p>ランの開始時に作成される RTA 構成ファイルはランの設定を一覧表示します。</p> <p><Run folder Name>、RTAConfiguration.xml</p>
ラン情報ファイル	<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。RunInfo ファイルは、ランの開始時に生成されます。</p> <p><Run folder Name>、RunInfo.xml</p>

ファイルタイプ	ファイルの説明、場所、名前
サムネイルファイル	<p>タイル 1、6、および 12 用の各色チャンネル（赤色と緑色）のサムネイルイメージ。イメージング中の全サイクルですべてのカメラ、上面および底面から生成されます。</p> <p>Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]：ファイルは各レーンにつき 1 つのフォルダーに保存され、各サイクルにつき 1 つのサブフォルダーに保存されます。</p> <p>s_[lane]_[tile]_[channel].jpg：ファイル名では、[tile] は面、スワス、カメラ、およびタイルを示す 5 桁の数字で表されます。詳細については、66 ページの「タイルの番号付け」 および 67 ページの「サムネイルイメージ名」 を参照してください。</p>

フローセルタイル

タイルは、カメラの視野として定義されるフローセルの小さなイメージングエリアです。タイルの総数はフローセル上でイメージングされるレーン、スワス、面の数によって異なり、またカメラがどのように協働してイメージを収集するかによって異なります。

- High Output フローセルのタイルの総数は 864 個です。
- Mid Output フローセルのタイルの総数は 288 個です。

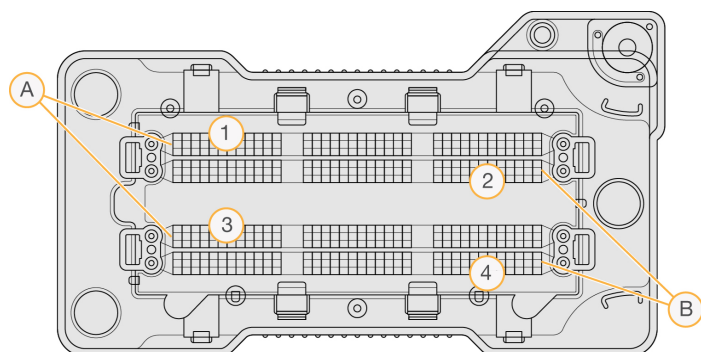
表 2 フローセルタイル

フローセルのコンポーネント	High Output	Mid Output	内容説明
レーン	4	4	レーンは専用の流入口と排出口を備えた物理的なチャンネルです。
面	2	2	フローセルは上面と底面の 2 つの面でイメージングされます。タイルの上面がイメージングされ、同じタイルの底面がイメージングされた後で、次のタイルに進みます。
レーンあたりのスワス	3	1	スワスはレーンのタイルの列です。
カメラのセグメント	3	3	装置は 6 台のカメラを使用して、各レーンあたり 3 セグメントでフローセルをイメージングします。
カメラセグメントのスワスあたりのタイル数	12	12	タイルとはカメラが 1 つのイメージとして捉えるフローセル上のエリアのことです。
イメージングされるタイルの総数	864	288	レーン × 面 × スワス × カメラセグメント × セグメントのスワスあたりのタイル数 = 総タイル数になります。

レーンの番号付け

レーン 1 および 3 はレーンペア A と呼ばれ、同時にイメージングされます。レーン 2 および 4 はレーンペア B と呼ばれ、レーンペア A のイメージングが完了するとイメージングされます。

図 35 レーンの番号付け

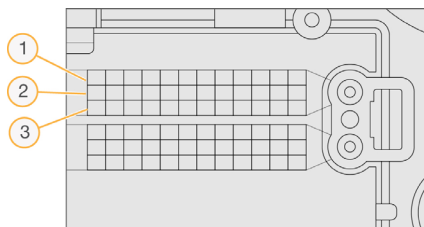


- A. レーンペア A : レーン 1 および 3
- B. レーンペア B : レーン 2 および 4

スワスの番号付け

各レーンは 3 つのスワス内にイメージングされます。スワスは High Output フローセル用に 1 ~ 3 の番号が付いています。

図 36 スワスの番号付け

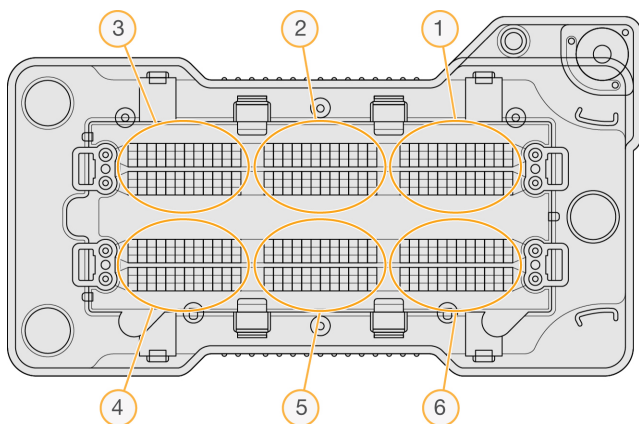


カメラの番号付け

NextSeq 550 はフローセルのイメージングに 6 台のカメラを使用します。

カメラには 1 ~ 6 の番号が付いています。カメラ 1 ~ 3 はレーン 1 をイメージングします。カメラ 4 ~ 6 はレーン 3 をイメージングします。レーン 1 およびレーン 3 をイメージングした後、イメージングモジュールが X 軸上を移動し、レーン 2 およびレーン 4 をイメージングします。

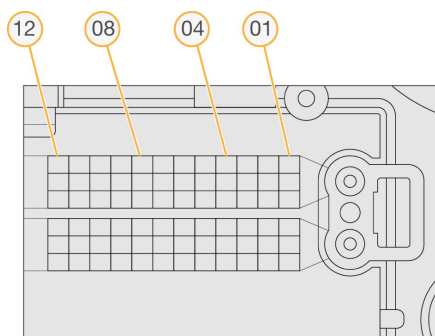
図 37 カメラおよびセグメントの番号付け（図は High Output フローセル）



タイルの番号付け

各カメラセグメントの各スワスには 12 のタイルがあります。タイルはスワス番号やカメラセグメントに関係なく、01～12 の番号が付けられ、2 桁で表されます。

図 38 タイルの番号付け



完全なタイル番号は 5 桁で、以下のように位置を表します。

- **面**：1 は上面、2 は底面
- **スワス**：1、2、3
- **カメラ**：1、2、3、4、5、6
- **タイル**：01、02、03、04、05、06、07、08、09、10、11、12

例：タイル番号 12508 は上面、スワス 2、カメラ 5、タイル 8 を表します。

完全な 5 桁のタイル番号はサムネイルイメージと実験的フェーシングファイルのファイル名に使用されます。詳細については、[63 ページの「シーケンス出力ファイル」](#)を参照してください。

サムネイルイメージ名

タイル 1、6、12 用の各色チャンネル（赤色と緑色）のサムネイルイメージは、イメージング中の全サイクルで、すべてのカメラ、上面および底面から生成されます。サムネイルファイルは JPG ファイル形式で生成されます。

各イメージは以下の命名規則に従い、タイル番号を含む名前が付けられます。名前は常に s_ で始まります。

- **レーン**：1、2、3、4
- **タイル**：5 桁のタイル番号で、面、スワス、カメラ、タイルを示します
- **チャンネル**：赤色または緑色

例：s_3_12512_green.jpg、これはレーン 3、上面、スワス 2、カメラ 5、タイル 12、および緑色チャンネルを示します。

シーケンス出力フォルダーの構造

出力フォルダー名は、コントロールソフトウェアによって自動で生成されます。

📁 Data

📁 Intensities

📁 BaseCalls

📁 **L001**：レーン 1 のベースコールファイル、サイクルごとに 1 ファイルに集約

📁 **L002**：レーン 2 のベースコールファイル、サイクルごとに 1 ファイルに集約

📁 **L003**：レーン 3 のベースコールファイル、サイクルごとに 1 ファイルに集約

📁 **L004**：レーン 4 のベースコールファイル、サイクルごとに 1 ファイルに集約

📁 **L001**：レーン 1 の集約された、*.locs ファイル

📁 **L002**：レーン 2 の集約された、*.locs ファイル

📁 **L003**：レーン 3 の集約された、*.locs ファイル

📁 **L004**：レーン 4 の集約された、*.locs ファイル

📁 Images

📁 Focus

📁 **L001**：レーン 1 のフォーカスイメージ

📁 **L002**：レーン 2 のフォーカスイメージ

📁 **L003**：レーン 3 のフォーカスイメージ

📁 **L004**：レーン 4 のフォーカスイメージ

- 📁 **InterOp** : Sequencing Analysis Viewer (SAV) によって使用されるバイナリーファイル
- 📁 **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固有のレシピファイル
- 📁 **RTALogs** : 解析ステップを記載したログファイル
- 📁 **Thumbnail_Images** : サイクルごとの各スワスのタイル 1、6、12 のサムネイルイメージ
- 📄 RTAComplete.xml
- 📄 RTAConfiguration.xml
- 📄 RunInfo.xml
- 📄 RunNotes.xml
- 📄 RunParameters.xml

スキャン出力ファイル

ファイルタイプ	説明、場所、名前
GTC ファイル	<p>ジェノタイプコールファイル。GTC ファイルは BeadChip でスキャンされた各サンプルに対して生成されます。ファイル名には、スキャンされたバーコードおよびサンプルが含まれます。</p> <p>[barcode]_[sample].gtc</p>
イメージファイル	<p>イメージファイルは BeadChip 上のスキャンされたエリアに従って名前が付けられます。名前にはバーコード、BeadChip のサンプルおよびセクション、スワス、およびイメージングチャンネル（赤色または緑色）が含まれます。</p> <p>[barcode]_[sample]_[section]_[swath]_[camera]_[tile]_[channel].jpg</p> <ul style="list-style-type: none"> • Barcode : ファイル名は BeadChip バーコードから始まります。 • Sample : BeadChip のエリアを示し、行 (R0X) は上から下へ、列 (C0X) は左から右に付番されます。 • Section : サンプル内の付番された行。 • Swath : BeadChips はオーバーラップするタイルの集合体としてイメージングされます。そのため、セクションのイメージングに使用されるスワスは 1 つのみです。 • Camera : イメージ収集に使用されるカメラ。 • Tile : カメラの視野として定義されるイメージングエリア。 • Channel : チャンネルは赤色または緑色のいずれかです。

スキャン出力フォルダーの構造

📁 [Date]_[Instrument Name]_[Scan#]_[Barcode]

📁 [Barcode]

📁 Config

📄 Effective.cfg : スキャン中に使用される config 設定を記録します。

📁 **Focus** : スキャンの焦点を合わせるために使用されるイメージファイルが含まれます。

📁 **Logs** : スキャン中に行われた各ステップを一覧表示するログファイルが含まれます。

📁 PreScanDiagnosticFiles

📁 [Date_Time] Barcode Scan

📄 ProcessedBarcode.jpg : BeadChip バーコードのイメージ。

📄 Scanning Diagnostics (ログファイル)

📄 PreScanChecks.csv : 自動チェックの結果を記録します。

📄 GTC ファイル : ジェノタイプコールファイル (サンプルごとに 1 ファイル)。

📄 IDAT ファイル : (オプション) シグナル強度データファイル (サンプルごとに 2 ファイル。チャンネルごとに各 1 ファイル)。

📄 イメージファイル : サンプル、セクション、スワス、カメラ、タイル、およびチャンネルそれぞれのスキャンイメージ。

📄 [Barcode]_sample_metrics.csv

📄 [Barcode]_section_metrics.csv

📄 ScanParameters.xml

NextSeq 550Dx 研究（RUO）モードの検討事項

本ガイドの手順は、一部の例外を含め、NCS v4.0以降のバージョンで研究（RUO）モードを使用する際のNextSeq 550Dxシステムに適用されます。NCS v3.0で研究（RUO）モードを使用する場合は、『NextSeq 550Dx Research Mode Instrument Reference Guide』（文書番号：1000000041922）を参照してください。

Local Run Manager ソフトウェアの一般的な使用手順に関する情報は、NextSeq 550Dx システムで使用するモードによって異なります。研究（RUO）モードで使用する場合は、『Local Run Manager v4 Software Guide』（文書番号：200036672）を参照してください。診断（Dx）モードで使用する場合は、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』（文書番号：1000000009513）の Local Run Manager ソフトウェアに関する記述を参照してください。Local Run Manager ソフトウェアは NCS v3.0 では利用できません。

研究（RUO）モードの NextSeq 550Dx と NextSeq 550 には以下の違いがあります。

- 消耗品の適合性
- 装置の起動
- 装置の再起動およびシャットダウン

NextSeq 550Dx の消耗品の適合性

NextSeq 550Dx でシーケンスランを実行するには、使い捨ての NextSeq 550/550 Kit、または NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit が必要です。

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit を研究（RUO）モードのランに使用する場合、すべての構成部品は同一のキットロットのものである必要があります。NextSeq 550/550 Kit は診断（Dx）モードのランに使用できません。

NextSeq 550Dx の装置モードインジケータ

以下の表は NCS または NOS 画面上の装置モードインジケータを一覧表示しています。研究（RUO）モードから診断（Dx）モードへの切り替え方法の詳細については、[71 ページの「NextSeq 550Dx の再起動およびシャットダウンオプション」](#)を参照してください。

モード	[Home] 画面	カラーバー	ステータスアイコンの方向
診断（Dx）モード	Welcome to NextSeqDx	青	水平
研究（RUO）モード	Welcome to NextSeq	オレンジ	垂直

NextSeq 550Dx の再起動およびシャットダウンオプション

研究（RUO）モードで使用中の NextSeq 550Dx の以下の機能には、[Shutdown Options] ボタンを選択してアクセスします。

- Reboot to Dx：装置は診断（Dx）モードで開きます。
- Reboot to RUO：装置は研究（RUO）モードで開きます。
- Shutdown：装置は診断（Dx）モードで開きます。
- Exit to Windows：権限に応じて、NCS を終了して Windows を表示することができます。

i | 研究（RUO）モードで NextSeq 550Dx を使用している場合、診断（Dx）モードに戻ると、ポストランウォッシュを行うよう指示されます。

診断（Dx）モードへの再起動

[Reboot to Dx] コマンドを使用して、装置を安全にシャットダウンし、診断（Dx）モードで再起動します。

1. [Manage Instrument] を選択します。
2. [Shutdown Options] を選択します。
3. [Reboot to Dx] を選択します。

研究（RUO）モードへの再起動

[Reboot to RUO] コマンドを使用して、装置を安全にシャットダウンし、研究（RUO）モードで再起動します。

1. [Manage Instrument] を選択します。
2. [Shutdown Options] を選択します。
3. [Reboot to RUO] を選択します。

装置のシャットダウン

1. [Manage Instrument] を選択します。
2. [Shutdown Options] を選択します。
3. [Shutdown] を選択します。

Shutdown コマンドによりソフトウェアが安全にシャットダウンされ、装置の電源がオフになります。少なくとも 60 秒待ってから、装置の電源を再び入れます。

i | 初期設定では、装置は電源を入れると診断（Dx）モードで起動します。

! | 装置を移設しないでください。装置を不適切に動かすと、光学アライメントが影響を受け、データの完全性が損なわれるおそれがあります。装置の移設が必要な場合は、イルミナの担当者にご連絡ください。

終了して Windows に移動

Exit to Windows コマンドを使用すると、装置のオペレーティングシステムや、装置のコンピューターのすべてのフォルダーにアクセスできます。このコマンドを使用すると、ソフトウェアを安全にシャットダウンして、Windows に移動することができます。

1. **[Manage Instrument]** を選択します。
2. **[Shutdown Options]** を選択します。
3. **[Exit to Windows]** を選択します。

追加リソース

以下の文書は、イルミナのウェブサイトからダウンロードできます。

リソース	内容説明
『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Site Prep Guide』 (文書番号：15045113)	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ています。
『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Safety and Compliance Guide』 (文書番号：15046564)	操作の安全検討事項、コンプライアンスステートメント、装置のラベルに関する情報を提供します。
『RFID Reader (Model # TR-001-44) Compliance Guide』 (文書番号：15041950)	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。
『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Denature and Dilute Libraries Guide』 (文書番号：15048776)	調製済みライブラリーをシーケンスランのために変性させて希釈する手順と、オプションの PhiX コントロールを調製する手順について説明しています。このステップは大部分の種類のライブラリーに適用されます。
『NextSeq 500 and NextSeq 550 Sequencing Systems Custom Primers Guide』 (文書番号：15057456)	イルミナシーケンスプライマーをカスタムシーケンスプライマーに置き換える場合の情報を提供します。
『NextSeq 550 System Guide』 (文書番号：15069765)	装置のコンポーネントの概要、装置の操作方法についての説明、メンテナンス、トラブルシューティングの手順について説明しています。
BaseSpace ヘルプ	BaseSpace Sequence Hub および利用可能な解析オプションの使用に関する情報を提供します。
『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』 (文書番号：1000000009513)	装置コンポーネントおよびソフトウェアの概要、シーケンスランを実行する方法、および NextSeq 550Dx に関する装置メンテナンスとトラブルシューティングの手順について説明しています。
『Local Run Manager v4 Software Guide』 (文書番号：200036672)	Local Run Manager v4 ソフトウェアの概要およびソフトウェア機能の使用に関する情報を提供します。

ドキュメント、ソフトウェアダウンロード、オンライントレーニング、およびよくある質問については、イルミナウェブサイトの [NextSeq 550 サポートページ](#) を参照してください。

正誤表

ページ番号	原文	修正内容
p.6	<p>NextSeq 550Dx システムのランに必要なシーケンス消耗品は、使い捨てのキットで別途提供されます。各キットには、フローセル、試薬カートリッジ、バッファークートリッジ、およびライブラリー希釈バッファークートリッジが1つずつ含まれます。詳細については、NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles)、NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)、または NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles) の Package Insert を参照してください。消耗品を正確に追跡し、適合性を把握するために、フローセル、試薬カートリッジ、およびバッファークートリッジには RFID (無線自動識別) が使用されています。</p> <p>! NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 Kit では、装置が v2.5 フローセルカートリッジを受け入れるために NOS 1.3 以降が必要です。試薬やサンプルが無駄にならないように、サンプルおよび消耗品を準備する前に、ソフトウェアアップデートを完了させてください。</p>	<p>NextSeq 500/550 システムのランに必要なシーケンス消耗品は、使い捨てのキットで別途提供されます。各キットには、フローセル、試薬カートリッジ、バッファークートリッジ、およびライブラリー希釈バッファークートリッジが1つずつ含まれます。詳細については、NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 cycles)、NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles)、NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles)、NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 cycles)、または NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles) の Package Insert を参照してください。消耗品を正確に追跡し、適合性を把握するために、フローセル、試薬カートリッジ、およびバッファークートリッジには RFID (無線自動識別) が使用されています。</p> <p>! NextSeq 500/550 High Output Kits v2.5 および Mid Output Kits v2.5 では、装置が v2.5 フローセルカートリッジを受け入れるために NCS v2.2.0 以降が必要です。試薬やサンプルが無駄にならないように、サンプルおよび消耗品を準備する前に、ソフトウェアアップデートを完了させてください。</p>
p.42	<p>初期設定では、装置は電源を入れると診断 (Dx) モードで起動します。</p>	<p>初期設定では、装置は電源を入れると研究 (RUO) モードで起動します。</p>

ページ番号	原文	修正内容
p.57	<p>BeadChip スキャン構成</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. [Manage Instrument] 画面で、[System Configuration] を選択します。 2. [BeadChip Scan Configuration] を選択します。 3. デフォルト DMAP フォルダの場所を指定するには、[Browse] を選択し、施設内ネットワークの優先フォルダの場所に移動します。 <p>i 各スキャン前に、この場所に DMAP コンテンツをダウンロードおよびコピーしてください。DMAP コンテンツは各 BeadChip に必要で、各 BeadChip バーコードに固有のものであります。</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. デフォルトの出力場所を指定するには、[Browse] を選択し、施設内ネットワークの優先する場所に移動します。 5. 保存したイメージのイメージファイル形式を選択します。初期設定のイメージタイプは JPG です。 6. スキャンデータの出力ファイル形式を選択します。初期設定の出力ファイルタイプは GTC のみ です。 7. [Save] を選択します。 8. [Scan Map] 画面から、各 BeadChip タイプのマニフェストファイルおよびクラスターファイルへのフルパスを指定します。各ファイルタイプの [Browse] を選択し、これらのファイルのあるフォルダの場所に移動します。 	<p>BeadChip スキャン構成</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. [Manage Instrument] 画面で、[System Configuration] を選択します。 2. [BeadChip Scan Configuration] を選択します。 3. デフォルト DMAP フォルダの場所を指定するには、[Browse] を選択し、施設内ネットワークの優先フォルダの場所に移動します。 <p>i 各スキャン前に、この場所に DMAP コンテンツをダウンロードおよびコピーしてください。DMAP コンテンツは各 BeadChip に必要で、各 BeadChip バーコードに固有のものであります。</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. 保存したイメージのイメージファイル形式を選択します。初期設定のイメージタイプは JPG です。 5. スキャンデータの出力ファイル形式を選択します。初期設定の出力ファイルタイプは GTC のみ です。 6. [Save] を選択します。 7. [Scan Map] 画面から、各 BeadChip タイプのマニフェストファイルおよびクラスターファイルへのフルパスを指定します。各ファイルタイプの [Browse] を選択し、これらのファイルのあるフォルダの場所に移動します。



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

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。
© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®