illumina®

TruSight Oncology 500 v2

제품 지원 문서

ILLUMINA PROPRIETARY
문서 번호: 200058285 v01.1 KOR
2025년 9월

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

목차

개요

TruSight Oncology 500 v2 프로토콜은 암 관련 유전자의 시퀀싱을 목적으로 인리치먼트(enrichment) 기반의 접근 방식을 통해 포르말린 고정, 파라핀 포매(formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) 조직에서 추출한 DNA 및 RNA로 인리치먼트를 거친 라이브러리를 만드는 과정을 설명합니다. 이렇게 준비된 라이브러리는 Illumina 시퀀싱 시스템으로 시퀀싱합니다. TSO 500 v2를 사용하여 DNA 또는 RNA로 각각 라이브러리를 준비하거나, DNA 및 RNA 라이브러리를 조합하여 준비할 수 있습니다.

이 키트는 523개의 유전자에서 낮은 빈도로 존재하는 체세포 변이(low-frequency somatic variation)를 높은 민감도 및 특이도로 검출하도록 최적화되어 있습니다. DNA 바이오마커(biomarker)에는 다음이 포함됩니다.

- 단일 염기서열 변이(Single nucleotide variant, SNV)
- 삽입(Insertion)
- 결실(Deletion)
- 유전자 복제수 변이(Copy number variation, CNV)
- 다중 염기서열 변이(Multinucleotide variation, MNV)

또한 TSO 500 v2는 DNA 내 종양 변이 부담(tumor mutational burden, TMB) 및 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI)에 대한 면역요법 바이오마커도 검출합니다. 유전자 융합(fusion) 및 스플라이스(splice) 변이는 RNA에서 검출됩니다.

TSO 500 v2는 상동 재조합 결핍(homologous recombination deficiency, HRD)을 검출할 수 있습니다. HRD 옵션은 일부 국가에서는 지원되지 않습니다. 자세한 정보는 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다.

호환성

시퀀싱 호환성에 대한 자세한 정보는 Illumina 지원 센터의 TSO 500 v2 지원 페이지를 참조하시기 바랍니다.

권장되는 DNA/RNA 사용량

DNA는 최소 30 ng을, RNA는 최소 40 ng을 사용하도록 합니다. 권장량보다 적은 양을 사용하면 assay 성능이 저하될 수 있습니다. 프로토콜 시작 전 사용된 핵산(nucleic acid)을 정량(quantification)합니다. 충분한 핵산 물질을 얻기 위해 최소 2 mm^3의 FFPE 조직에서 핵산을 분리합니다. 이때 다음 가이드라인에 따라 사용 물질을 준비합니다.

- 회수율이 높고, 샘플 소모량은 최소화하며, 샘플의 무결성을 보장해 주는 핵산 분리 방법을 사용하도록 합니다. QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit는 높은 수율로 핵산을 분리합니다.
- 충분한 핵산 물질을 얻는 방법은 Illumina 지원 센터의 TSO 500 v2 지원 페이지를 참조하시기 바랍니다.
- AccuClear(DNA) 또는 QuantiFluor(RNA)와 같이 DNA/RNA 결합 염료를 사용하는 형광 정량(fluorometric quantification) 방법을 사용하도록 합니다.

샘플 품질 평가

TSO 500 v2 assay 사용 전 최적의 성능을 위해 DNA와 RNA 샘플의 품질을 평가합니다.

- DNA 샘플의 품질은 TruSight FFPE QC Kit로 평가할 수 있습니다.
- ΔCq 값이 5 이하인 DNA 샘플을 사용하도록 합니다. ΔCq 값이 5를 초과하는 샘플은 assay 성능을 저하할 수 있습니다.
- RNA 샘플의 품질은 Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer(Standard Sensitivity RNA Analysis Kit) 또는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer(Agilent RNA 6000 Nano Kit)를 사용하여 평가할 수 있습니다.
- DV_{200} 값이 20% 이상인 RNA 샘플을 사용합니다. DV_{200} 값이 20% 미만인 샘플은 assay 성능을 저하할 수 있습니다.

레퍼런스 샘플(선택 사항)

- Horizon Discovery HD753(DNA), Agilent Universal Human Reference RNA와 같이 변이의 구성이 알려져 있는 참조 물질(reference material)을 사용합니다.
- 템플릿이 없는 대조군(No Template Control, NTC)을 추가하려면, RNase/DNase가 없는(RNase/DNase-free) 물을 사용합니다. NTC는 시퀀싱하지 않습니다.
- 레퍼런스 샘플 또는 NTC 처리 시 처리 가능한 테스트 샘플의 수는 줄어듭니다.

권장되는 DNA 절단 방법

TSO 500 v2 assay는 90~250 bp 길이로 절편화된 gDNA를 사용해 라이브러리를 준비하도록 최적화되어 있습니다. 또한 이 assay는 24페이지의 *gDNA 절편화(DNA 워크플로우)* 섹션에 기술되어 있는 파라미터와 Covaris E220*evolution*, LE220-plus, M220, ME220, ML230 또는 R230 focused-ultrasonicator를 함께 사용하도록 최적화되어 있습니다. 절편 크기의 분포는 샘플 품질과 절편화에 사용된 초음파 분쇄기에 따라 상이할 수 있습니다. 일부 Covaris 모델은 비슷한 성능을 확보하기 위해 더 많은 양의 샘플을 사용해야 할 수 있습니다.

라이브러리 준비의 자동화(선택 사항)

TSO 500 v2 Kit는 타사의 리퀴드 핸들링 로봇(liquid handling robot)과 함께 사용이 가능하도록 자동화에 적합한 옵션도 제공하고 있습니다. 적합한 TSO 500 v2 Kit를 3페이지의 *제품의 구성품* 섹션에서 확인 후 주문하시기 바랍니다.

라이브러리 준비의 자동화 방법은 리퀴드 핸들링 로봇 업체를 통해 확인하실 수 있습니다. TSO 500 v2 라이브러리 준비 절차를 자동화하는 방법은 선호하는 리퀴드 핸들링 로봇 업체에 문의하시기 바랍니다.

소모품 및 비품

TSO 500 v2 프로토콜을 진행하기 위해서는 다음과 같은 소모품과 비품을 Illumina를 통해 또는 별도로 준비해야 합니다.

이 프로토콜은 아래 명시된 품목을 사용하여 최적화 및 검증 절차를 거쳤습니다. 다른 소모품과 비품을 사용할 경우 비슷한 수준의 성능을 보장할 수 없습니다.

필수 소모품과 비품은 프로토콜 시작 전 미리 준비해 둡니다.

제품의 구성품

TSO 500 v2 프로토콜을 완수하려면 라이브러리 프렙 시약(library prep reagent), 인리치먼트 시약(enrichment reagent) 그리고 인덱스 어댑터(index adapter)가 필요합니다. 완전한 TSO 500 v2 카탈로그 번호 목록은 illumina.com을 참조하시기 바랍니다.

키트

항목	키트 옵션	카탈로그 번호
라이브러리 프렙 시약 및 인리치먼트 시약	TruSight Oncology 500 v2 Kit (24 DNA Samples + 24 RNA Samples)	20130527
	TruSight Oncology 500 v2 Kit (48 DNA Only Samples)	20130528
	TruSight Oncology 500 v2 Automation Kit (32 DNA Samples + 32 RNA Samples)	20130529
	TruSight Oncology 500 v2 Automation Kit (64 DNA Only Samples)	20130530
	TruSight Oncology 500 v2 Automation Kit (96 DNA Samples + 96 RNA Samples)	20130532

항목	키트 옵션	카탈로그 번호
인덱스 어댑터	Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654
	Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091656
	Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091658
	Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091660
	Illumina DNA/RNA UD Indexes v3, Set A, Auto (96 Indexes, 96 Samples)	20141196
	Illumina DNA/RNA UD Indexes v3, Set B, Auto (96 Indexes, 96 Samples)	20141197
	Illumina DNA/RNA UD Indexes v3, Set C, Auto (96 Indexes, 96 Samples)	20141198
	Illumina DNA/RNA UD Indexes v3, Set D, Auto (96 Indexes, 96 Samples)	20141199

라이브러리 프렙 키트의 구성품

TSO 500 v2 RNA Library Prep -20C: -25~-15°C에 보관

24 Manual	32 Auto	96 Auto	시약	설명
1	1	2	EPH3	Elution Primer Frag Mix
1	1	2	FSM	First Strand Synthesis Mix
1	1	2	RVT	Reverse Transcriptase
1	1	2	SSM	Second Strand Mix

TSO 500 v2 Library Prep 4C: 보관 온도는 아래 표 참조

24 Manual	48 Manual	32 Auto	64 Auto	96 Auto	시약	설명	보관 온도
1	1	2	1	4	IPB	Illumina Purification Beads	실온
1	1	2	1	4	RSB	Resuspension Buffer	2~8°C
1	1	1	1	1	TEB	TE Buffer	2~8°C

TSO 500 v2 Library Prep -20C: -25~-15°C에 보관

24 Manual	48 Manual	32 Auto	64 Auto	96 Auto	시약	설명
2	2	1	1	2	ERP6	End Repair Mix 6
2	2	1	1	2	ATL4	A-Tailing Mix
1	1	1	1	2	UMI3	UMI Index Anchors 3
2	2	1	1	2	LIGX	Ligation Mix
1	1	1	1	2	STL	Stop Ligation Buffer
2	2	1	1	2	EPM4	Enhanced PCR Mix 4

인리치먼트 키트의 구성품

TSO 500 v2 Enrichment 4C: 보관 온도는 아래 표 참조

24 Manual	48 Manual	32 Auto	64 Auto	96 Auto	시약	설명	보관 온도
1	1	1	1	2	EHB2	Enrich Hyb Buffer 2	2~8°C
2	2	1	1	2	SMB4	Streptavidin Magnetic Beads 4	2~8°C
1	1	1	1	2	IPB	Illumina Purification Beads	실온
1	1	1	1	2	RSB	Resuspension Buffer	2~8°C
1	1	1	1	2	LNB3	Library Normalization Beads 3	2~8°C
2	2	1	1	2	LNW1	Library Normalization Wash 1	2~8°C
1	1	1	1	2	HP3	(2 N NaOH)	2~8°C

TSO 500 v2 Enrichment -20C (DNA): -25~-15°C에 보관

48 Manual	64 Auto	시약	설명
2	1	NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers
2	2	OPD2	Oncology DNA Probe Pool 2
2	2	OPD3	Oncology DNA Probe Pool 3
3	1	PPC3	PCR Primer Cocktail 3
2	1	EPM4	Enhanced PCR Mix 4
2	1	EE1	Enrichment Elution Buffer 1
1	2	EEW	Enhanced Enrichment Wash
1	1	LNS1	Library Normalization Storage Buffer 1
1	1	LNA1	Library Normalization Additives 1

TSO 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA): -25~-15°C에 보관

24 Manual	32 Auto	96 Auto	시약	설명
2	1	2	NHB2	Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers
1	1	2	OPD2	Oncology DNA Probe Pool 2
1	1	2	OPD3	Oncology DNA Probe Pool 3
1	1	2	OPR1	Oncology RNA Probe Pool 1
3	1	2	PPC3	PCR Primer Cocktail 3
2	1	2	EPM4	Enhanced PCR Mix 4
2	1	2	EE1	Enrichment Elution Buffer 1
1	2	4	EEW	Enhanced Enrichment Wash
1	1	2	LNS1	Library Normalization Storage Buffer 1
1	1	2	LNA1	Library Normalization Additives 1

인덱스 어댑터 키트

-25~-15°C에 보관합니다.

별도 구매 소모품 및 비품

소모품

소모품	공급 업체
96-well storage plates, 0.8 ml(MIDI plates)	Fisher Scientific(파트 번호: AB-0859)
0.2 ml 96-well PCR Plate(폴리프로필렌(polypropylene, PP))	일반 실험기자재 공급 업체
Absolute ethanol, molecular biology grade	Sigma-Aldrich(파트 번호: E7023)
20 µl 에어로졸 생성 방지 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체
200 µl 에어로졸 생성 방지 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체
1 ml 에어로졸 생성 방지 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
15 ml 코니칼 튜브	일반 실험기자재 공급 업체
50 ml 코니칼 튜브	일반 실험기자재 공급 업체
1.7 ml 뉴클레아제가 없는 미세원심분리 튜브 (nuclease-free microcentrifuge tube)	일반 실험기자재 공급 업체
Microseal 'B' adhesive seal(플레이트 밀봉 씰)	Bio-Rad(파트 번호: MSB-1001)
Nuclease-free reagent reservoirs (PVC, disposable trough)	VWR(파트 번호: 89094-658)
뉴클레아제가 없는 물	일반 실험기자재 공급 업체
[LE220-plus, E220evo] 8 microTUBE Strip(12 또는 120)	Covaris(파트 번호: 520053(12) 또는 파트 번호: 520109(120))
[LE220-plus, R230] 96 microTUBE Plate(1 또는 10)	Covaris(파트 번호: 520078(1) 또는 파트 번호: 520069(10))
[M220] microTUBE-50 AFA Fiber Screw-Cap(25 또는 250)	Covaris(파트 번호: 520166(25)) 또는 파트 번호: 520167(250))
[ML230, ME220] 8 microTUBE-50 AFA Fiber H Strip V2	Covaris(파트 번호: 520240)
[선택 사항] 96-well microplate, black, flat, clear bottom	Corning(파트 번호: 3904)
[선택 사항] AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA quantification Kit with 1 DNA Standard	Biotium(카탈로그 번호: 31029)
[선택 사항] Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent(카탈로그 번호: 5067–1511)
[선택 사항] AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	QIAGEN(카탈로그 번호: 80234)
[선택 사항] DNA Reference Standard	Horizon Diagnostics(카탈로그 번호: HD753)
[선택 사항] QuantiFluor RNA System	Promega(카탈로그 번호: E3310)
[선택 사항] Standard Sensitivity RNA Analysis Kit	Agilent(카탈로그 번호: DNF-471-0500)
[선택 사항] TruSight FFPE QC Kit	Illumina(카탈로그 번호: 20139070)
[선택 사항] Universal Human Reference RNA	Agilent(카탈로그 번호: 740000)

비품(Pre-Amp)

비품	공급 업체
BioShake XP plate shaker	Q Instruments(파트 번호: 1808-0505)
1.5 ml 미세원심분리 튜브 가열 블록(heat block)	일반 실험기자재 공급 업체
가열 베이스(Heating base)를 포함하는 Hybex incubator 2개(택1) • Hybex Microsample Incubator, heating base, 115V • Hybex Microsample Incubator, heating base, 230V	 • SciGene(카탈로그 번호: 1057-30-O) • SciGene(카탈로그 번호: 1057-30-2)
Magnetic stand-96	Thermo Fisher(카탈로그 번호: AM10027)
미세원심분리기(1.5 ml 튜브용)	일반 실험기자재 공급 업체
MIDI Heat Block Insert	Illumina(카탈로그 번호: BD-60-601)
20 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
200 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
1 ml 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
플레이트 밀봉기(Plate sealer)	일반 실험기자재 공급 업체
온도 조절이 가능하거나 끌 수 있는 가열 뚜껑(heated lid)이 장착되어 있는 열 순환기(thermal cycler)	일반 실험기자재 공급 업체
초음파 분쇄기 1개(택1) • Covaris E220*evolution* Focused-ultrasonicator • Covaris LE220plus Focused-ultrasonicator • Covaris R230 Focused-ultrasonicator • Covaris ML230 Focused-ultrasonicator • Covaris ME220 Focused-ultrasonicator • Covaris M220 Focused-ultrasonicator	 • Covaris(파트 번호: 500429) • Covaris(파트 번호: 500569) • Covaris(파트 번호: 500620) • Covaris(파트 번호: 500656) • Covaris(파트 번호: 500506) • Covaris(파트 번호: 500295)
초음파 분쇄기별 필수 하드웨어 • [E220evo] Rack E220e 8 microTUBE Strip • [LE220-plus] Rack 12 place 8 microTUBE Strip • [R230] PSU Rack R230 TPX Plate & 130 Plate • [ML230] Rack 8 microTUBE Strip V2 • [ME220] Rack 8 microTUBE Strip V2 • [ME220] Waveguide 8 Place • [M220] Holder XTU • [M220] Holder XTU Insert microTUBE 50 µl	 • Covaris(파트 번호: 500430) • Covaris(파트 번호: 500191) • Covaris(파트 번호: 500750) • Covaris(파트 번호: 500661) • Covaris(파트 번호: 500518) • Covaris(파트 번호: 500526) • Covaris(파트 번호: 500414) • Covaris(파트 번호: 500488)
볼텍스 믹서	일반 실험기자재 공급 업체

비품	공급 업체
[선택 사항] 8 microTUBE Strip Prep Station for LE220 and E220*evolution*	Covaris(파트 번호: 500327)
[선택 사항] microTUBE Prep Station Snap & Screw Cap	Covaris(파트 번호: 500330)
[샘플 품질 분석기] • 2100 Bioanalyzer Desktop System 또는 • Fragment Analyzer Automated CE System 또는 • 4150/4200 TapeStation	 • Agilent(파트 번호: G2940CA) • Agilent(파트 번호: M5310AA 또는 M5311AA) • Agilent(파트 번호: G2992AA 또는 G2991BA)

비품(Post-Amp)

비품	공급 업체
BioShake XP plate shaker	Q Instruments(파트 번호: 1808-0505)
가열 베이스를 포함하는 Hybex Incubator 1대(택1) • Hybex Microsample Incubator, heating base, 115V • Hybex Microsample Incubator, heating base, 230V	 • SciGene(카탈로그 번호: 1057-30-O) • SciGene(카탈로그 번호: 1057-30-2)
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher(카탈로그 번호: AM10027)
미세원심분리기(1.5 ml 튜브용)	일반 실험기자재 공급 업체
MIDI Heat Block Insert	Illumina(카탈로그 번호: BD-60-601)
20 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
200 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
1 ml 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
플레이트 밀봉기	일반 실험기자재 공급 업체
열 순환기	일반 실험기자재 공급 업체
볼텍스 믹서	일반 실험기자재 공급 업체
[샘플 품질 분석기] • 2100 Bioanalyzer Desktop System 또는 • Fragment Analyzer Automated CE System 또는 • 4150/4200 TapeStation	 • Agilent(파트 번호: G2940CA) • Agilent(파트 번호: M5310AA 또는 M5311AA) • Agilent(파트 번호: G2992AA 또는 G2991BA)

Assay 프로토콜

이 섹션은 TruSight Oncology 500 v2 프로토콜을 설명합니다.

- 제품의 호환성과 실험 파라미터를 확인하기 위해 샘플 준비 단계부터 분석 단계까지 시퀀싱 워크플로우 계획을 모두 검토합니다.
- 먼저 키트 구성을 살펴보고 필요한 구성품, 비품 및 소모품이 모두 준비되어 있는지 확인합니다. 이 프로토콜에는 라이브러리 프렙 키트(library prep kit)와 인덱스 프라이머(index primer)가 필요합니다. 인덱스 어댑터는 별도로 주문해야 합니다. 자세한 정보는 3페이지의 *제품의 구성품* 섹션을 참조하시기 바랍니다.
- 명시된 볼륨(volume)과 배양(incubation) 파라미터를 참고하여 기술된 순서대로 프로토콜을 따르도록 합니다.
- 라이브러리 준비를 시작하기 전에 샘플의 정보를 기록해 두고 각 샘플에 고유한 듀얼 인덱스(unique dual index, UDI)를 할당합니다.
- 인덱스 어댑터의 시퀀스 및 기록 방법은 *Illumina Adapter Sequences*를 참조하시기 바랍니다.
- TruSight Oncology 500 v2 Kit의 안정성을 평가한 결과, 최대 6회 사용까지 키트의 성능이 유지되는 것이 확인되었습니다.

다음 섹션은 TruSight Oncology 500 v2 Kit 사용 시 권장되는 몇 가지 워크플로우를 다이어그램으로 보여줍니다. 단계 사이에 안전한 중단 지점이 표시되어 있습니다. DNA & RNA 워크플로우로는 DNA 샘플과 RNA 샘플을 동시에 준비할 수 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 아래에 명시된 샘플 수를 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다.

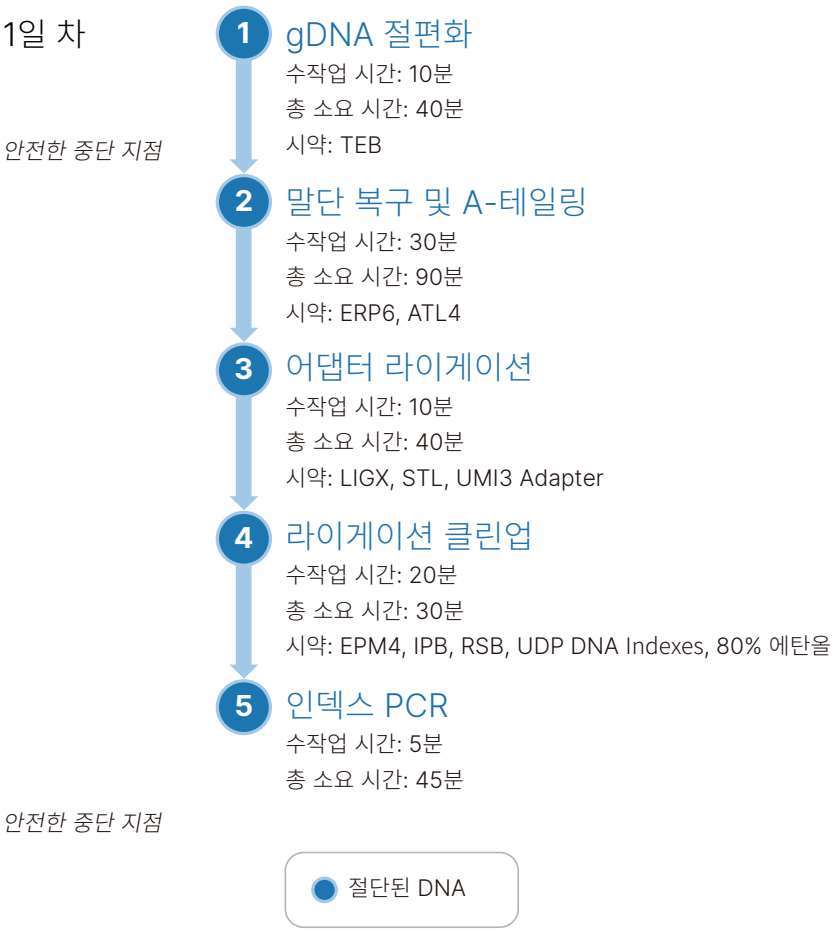
- DNA 워크플로우는 8개의 DNA 샘플을 사용하는 것을 기준으로 합니다.
- DNA & RNA 워크플로우는 8개의 DNA 샘플과 8개의 RNA 샘플을 사용하는 것을 기준으로 합니다.

여기에는 Covaris ultrasonicator의 가스 제거(degassing) 시간이 포함됩니다.

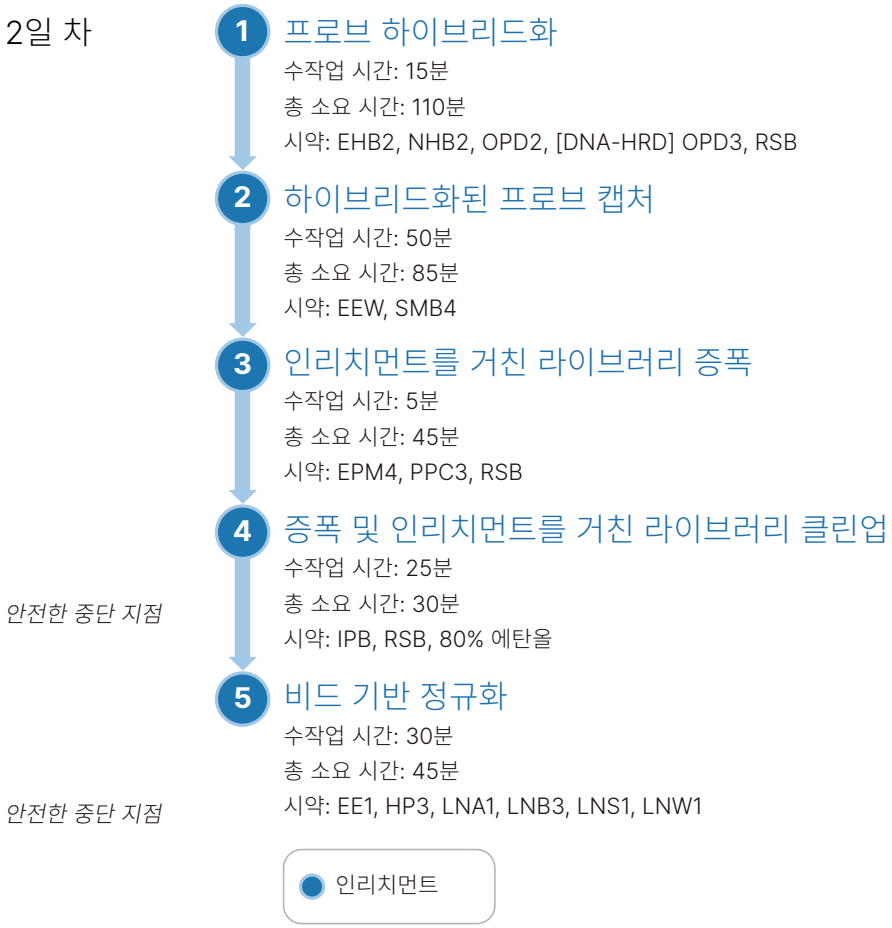
Illumina는 다음과 같은 일정 중 하나를 선택해 TruSight Oncology 500 v2 assay 워크플로우를 진행하는 것을 권장합니다.

DNA 워크플로우

DNA 라이브러리 준비 워크플로우

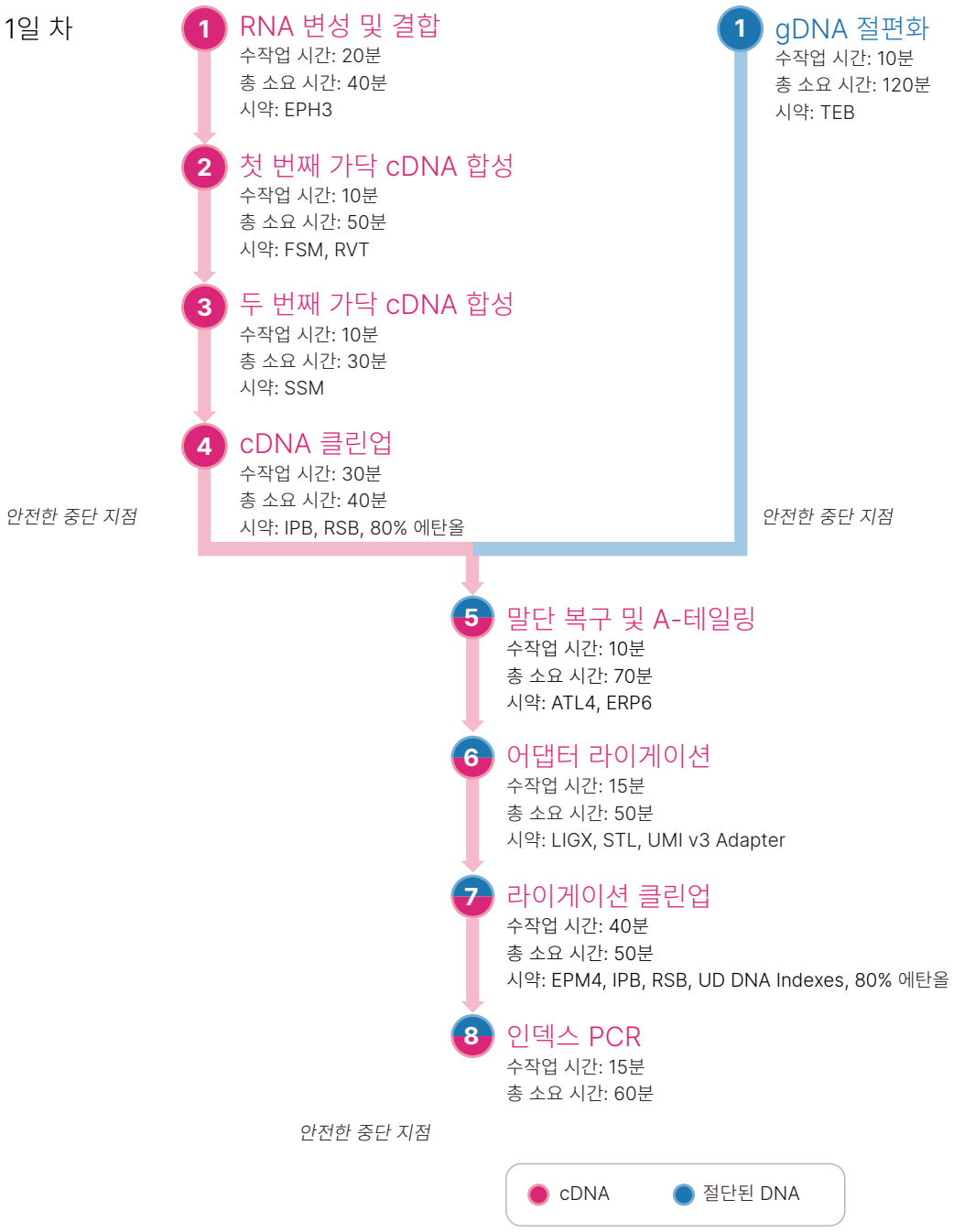


DNA 인리치먼트 워크플로우

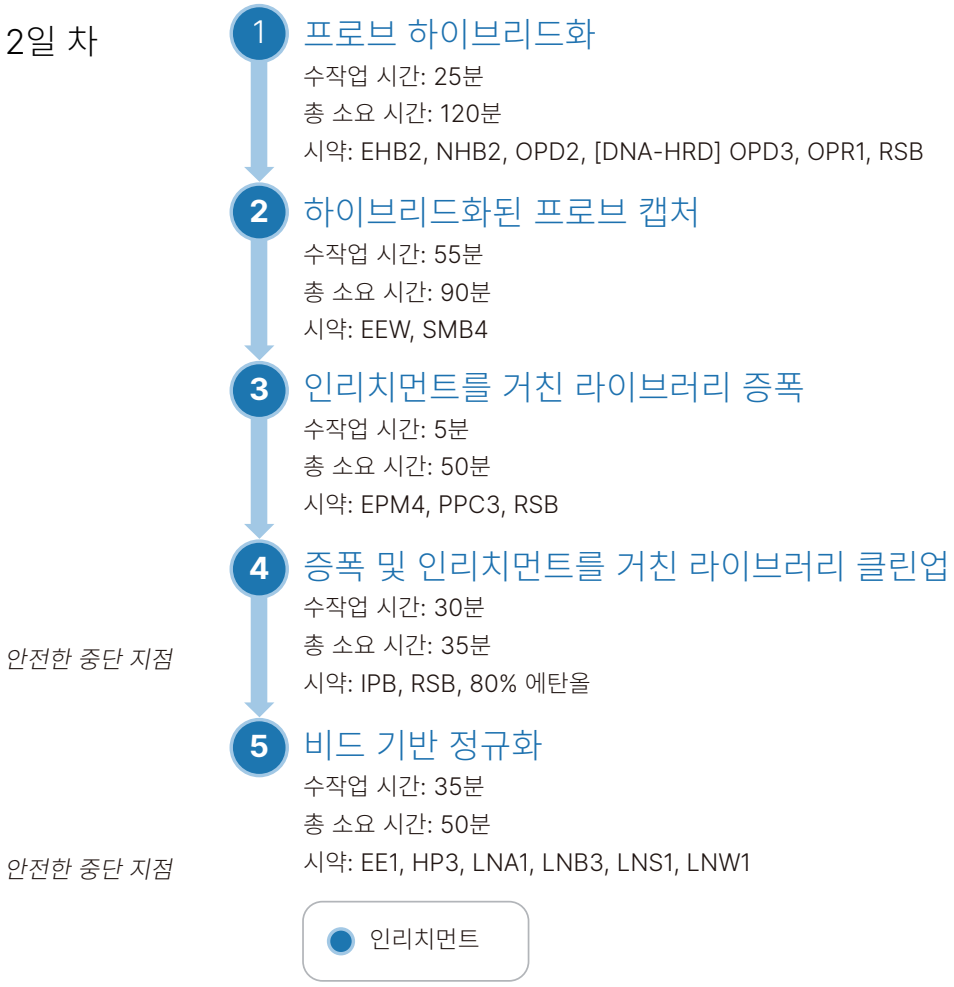


DNA & RNA 워크플로우

DNA & RNA 라이브러리 준비 워크플로우



DNA & RNA 인리치먼트 워크플로우



팁과 기술

프로토콜 시작 전 이 섹션에 기술되어 있는 팁과 기술을 읽어보시기 바랍니다. 프로토콜에 안전한 중단 지점이 따로 명시되어 있지 않다면 다음 단계를 바로 진행하도록 합니다.

교차 오염 방지

- 다음과 같은 상황에서는 ***웰을 옮길 때마다*** 팁을 교체해 줍니다.
  - 샘플을 분주하거나 옮길 때
  - 샘플에 시약을 넣을 때
  - 인덱싱 프라이머를 추가할 때
  - 피펫으로 샘플을 혼합할 때
- Pre-Amp 작업 구역에서 Post-Amp 작업 구역으로 이동 시 단방향 워크플로우를 적용합니다.
- 증폭 산물(Amplification product) 또는 프로브 잔류 오염(probe carryover)을 방지하기 위해 Post-Amp 구역에서 작업을 시작하면 다시 Pre-Amp 구역으로 돌아오지 않습니다.
- 끼고 있던 장갑이 인덱싱 프라이머, 샘플 또는 프로브와 접촉한 경우 장갑을 교체합니다.
- 절차 시작 전과 완료 후에는 RNase/DNase를 억제하는 세제로 작업대의 표면과 장비를 꼼꼼히 닦아줍니다.
- 플레이트의 씰은 재사용하지 않습니다.

플레이트의 밀봉 및 밀봉 제거

- 아래에 명시된 단계 전에는 항상 플레이트를 밀봉하고, 특히 가장자리와 웰이 완전히 밀봉된 것을 확인합니다.
  - 진탕(Shaking) 단계
  - 볼텍싱(Vortexing) 단계
  - 원심분리(Centrifugation) 단계
  - 열 순환(Thermal cycling) 단계
  - 배양(Incubating) 단계
- 접착 커버로 플레이트를 덮은 후 밀봉 웨지나 롤러로 밀어 플레이트를 밀봉합니다.
- 밀봉 씰을 제거할 때는 시약의 교차 오염을 방지하기 위해 플레이트를 평평한 표면에 올려놓고 진행합니다.
- 플레이트를 장기 보관해야 할 때는 Microseal 'B' Adhesive Seal을 사용해 밀봉합니다. Microseal 'B' Adhesive Seal은 -40~110°C에서 효과적이며 스커트형(skirted) 또는 반스커트형(semi-skirted) PCR Plate에 적합합니다.
- 밀봉된 플레이트 내부에 물방울이 맺힌 것이 보이면, 샘플 손실을 방지하기 위해 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

플레이트 간 이동

- 플레이트 간 볼륨 이동 시 각 샘플의 웰 포지션을 기록해 둡니다. 명시된 볼륨을 한 플레이트의 각 웰에서 다른 플레이트의 상응하는 웰로 옮겨 줍니다.
- 열 순환 단계 전 PCR Plate로 볼륨 이동 시 샘플과 웰 바닥 사이에 공기 간극(air gap)이 생기지 않도록 주의합니다.

볼텍싱 및 원심분리

- 짧게 볼텍싱하라는 지침이 있을 경우 최대 속도로 3초간 볼텍싱을 3번 진행합니다.
- 짧게 원심분리하라는 지침이 있을 경우 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

시약의 취급

- 시약을 미리 해동해 두면 전체 워크플로우 시간을 줄일 수 있습니다.
- 시약의 증발을 억제하고 오염을 방지하기 위해 모든 시약 튜브는 사용 직후 캡을 단단히 닫아 줍니다.
- 절차에 시약이 더 이상 필요하지 않으면, 시약을 권장 온도에 다시 보관하도록 합니다.
- 워크플로우의 각 단계마다 시약별 혼합 지침을 따릅니다. 시약을 5분 넘게 방치한 경우, 사용 전 다시 혼합합니다.
- 80% 에탄올은 만든 당일에 사용해야 합니다.

비드의 취급

- 비드(Bead)는 똑바로 세워 보관하고 냉동하지 않습니다.
- 비드 현탁액(suspension)은 천천히 피펫팅합니다.
- 비드는 실온에 도달하도록 방치했다가 사용합니다.
- 비드 워시 수행 시 주의 사항
  - 플레이트에 적합한 마그네틱 스탠드(magnetic stand)를 사용합니다.
  - 웰에 들어 있는 비드가 워시 버퍼(wash buffer)에 완전히 잠길 때까지 액체를 분주합니다.
  - 웰의 벽면을 따라 비드의 반대쪽으로 액체를 부드럽게 피펫팅합니다. 이때 피펫이 비드 펠릿(pellet)에 닿지 않도록 주의합니다.
  - 플레이트를 제거하라는 지침이 있을 때까지 플레이트는 마그네틱 스탠드에 그대로 둡니다.
  - 마그네틱 스탠드에 고정되어 있는 플레이트는 흔들지 않습니다.
  - 비드 펠릿을 건드리지 않도록 주의합니다.
- 비드에서 용출 시 주의 사항
  - 피펫으로 비드에서 상층액(supernatant)을 천천히 흡인해 제거합니다.
  - 피펫 팁에 흡인된 비드가 없는 것을 확인합니다.
  - 팁으로 비드를 건드렸거나 팁 안으로 비드가 흡인된 경우, 마그네틱 스탠드에 고정되어 있는 플레이트에 액체를 분주하고 액체가 투명해질 때까지 2분 동안 기다립니다.
- 피펫으로 비드 혼합 시 주의 사항
  - 혼합하는 볼륨에 적합한 크기의 피펫과 팁을 사용합니다(예: 20~200 µl 혼합 시 200 µl 피펫 사용).
  - 볼륨은 샘플 볼륨의 약 50~75% 정도로 설정합니다.
  - 피펫으로 강하고 빠르게 혼합하되 액체가 튀거나 거품이 발생하지 않도록 주의합니다.
  - 피펫 팁을 펠릿 위에 위치시킨 후 웰이나 튜브에서 비드가 방출되도록 펠릿 안에 바로 분주해 줍니다.
  - 비드 펠릿이 완전히 용해되었는지 확인합니다. 예를 들어, SMB4 펠릿을 사용한 경우 용액은 짙은 갈색을 띠고 농도가 균일해야 합니다.
  - 비드 펠릿이 완전히 용해되지 않은 경우, 농도가 균일해지도록 피펫으로 용액을 혼합해 줍니다.

프로토콜 사전 준비

다음의 단계는 Pre-Amp 구역에서 진행됩니다.

같은 날 DNA 프로토콜 및 RNA 프로토콜을 수행하는 경우, DNA 절편화 단계에서 가스 제거에 더 많은 시간이 소요될 수 있습니다. DNA와 RNA를 준비하기 전에 가스 제거를 시작하도록 합니다.

RNA 준비

1. 보관 중이던 RNA 샘플을 꺼내 얼음 위에 올려 두고 해동합니다.
2. 박스에서 시약을 꺼내 다음 절차에 따라 준비합니다.

실온 보관

시약	박스 라벨	지침
IPB	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep 4C, 20129773	2~8°C에서 보관한 경우 실온에 도달하도록 방치한 후 사용

2~8°C 보관

시약	박스 라벨	지침
RSB	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep 4C, 20129773	실온에 도달하도록 방치

-25~-15°C 보관

시약	박스 라벨	지침
EPH3	TruSight Oncology 500 v2 RNA Library Prep, 20129771	실온에서 해동
FSM	TruSight Oncology 500 v2 RNA Library Prep, 20129771	실온에서 해동
RVT	TruSight Oncology 500 v2 RNA Library Prep, 20129771	얼음 위에 보관
SSM	TruSight Oncology 500 v2 RNA Library Prep, 20129771	실온에서 해동

RNA 변성 및 결합(RNA 워크플로우)

이 단계에서는 cDNA 합성을 준비하기 위해 정제된 RNA를 변성(denaturation)하고 랜덤 헥사머(random hexamer)로 프라이밍합니다.

DNA 샘플만을 사용하는 경우, 이 단계는 건너뛰고 바로 26페이지의 *프로토콜 사전 준비* 단계로 이동합니다.

소모품

- EPH3(Elution Prime Fragment 3 HC Mix)
- FSM(First Strand Synthesis Mix)
- RVT(Reverse Transcriptase)
- 96-well PCR Plate
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브
- Microseal 'B' Adhesive Seal
- 뉴클레아제가 없는 물

준비

1. 다음의 지침에 따라 RNA 샘플을 준비합니다.
   a. 최소 10회 피펫팅하여 잘 혼합해 줍니다.
   b. 각각의 정제된 RNA 샘플을 40 ng씩 뉴클레아제가 없는 물로 희석하여 최종적으로 8.5 µl(4.7 ng/µl)를 만듭니다.
   자세한 내용은 1페이지의 *권장되는 DNA/RNA 사용량* 섹션을 참조하시기 바랍니다.
   c. 피펫팅하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
2. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - EPH3 — 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   - FSM
     a. 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
     b. 피펫팅하여 혼합합니다.
     c. 침전물 유무를 확인합니다. 침전물이 보이면 용액이 투명해질 때까지 위아래로 피펫팅하여 혼합합니다.
   - RVT — 짧게 원심분리 후 피펫팅하여 혼합합니다.

3. FSM+RVT Master Mix를 준비하기 위해 별도의 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합합니다. 최소 3개의 샘플에 충분한 양의 Master Mix를 준비합니다.

Master Mix 구성 성분	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
FSM(µl)	22.5	60	120	180
RVT(µl)	7.5	20	40	60

   상기 명시된 볼륨으로는 피펫팅을 고려해 필요량보다 25% 더 많은 샘플당 10 µl의 FSM+RVT Master Mix를 만들 수 있으며, 키트의 다회 사용이 가능합니다.
4. FSM+RVT Master Mix를 최소 10회 피펫팅하여 잘 혼합합니다.
5. FSM+RVT Master Mix는 사용 전까지 얼음 위에 둡니다.
6. RNA의 경우 다음과 같은 DA-RNA 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
   - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정
   - Reaction Volume을 17 µl로 설정
   - 65°C에서 5분
   - 4°C에서 1분
   - 4°C에서 온도 유지
7. 새 96-well PCR Plate에 “CF”라는 라벨을 부착합니다.

절차

1. 8.5 µl의 정제 및 희석된 RNA 샘플을 각각 “CF” 플레이트의 웰에 하나씩 나누어 넣습니다.
2. 각 웰에 8.5 µl의 EPH3를 넣은 후 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
5. 플레이트를 미리 프로그래밍된 열 순환기에 놓고 DA-RNA 프로그램을 실행합니다.

   라이브러리는 다음 단계로 넘어가기 전 최대 5분간 4°C로 유지될 수 있습니다.

첫 번째 가닥 cDNA 합성(RNA 워크플로우)

이 단계에서는 RVT를 사용해 랜덤 헥사머로 프라이밍된 RNA 절편을 첫 번째 가닥 cDNA로 역전사(reverse transcription)합니다.

소모품

- FSM+RVT Master Mix
- Microseal 'B' Adhesive Seal

준비

1. 다음과 같은 1stSS 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
    - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정
    - Reaction Volume을 25 µl로 설정
    - 25°C에서 10분
    - 42°C에서 15분
    - 70°C에서 15분
    - 4°C에서 1분
    - 4°C에서 온도 유지

절차

1. 열 순환기에서 "CF" 플레이트를 꺼냅니다.
2. FSM+RVT Master Mix를 10회 피펫팅합니다.
3. "CF" 플레이트의 각 웰에 8 µl의 FSM+RVT Master Mix를 넣은 후 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
4. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
5. 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
6. 플레이트를 미리 프로그래밍된 열 순환기에 놓고 1stSS 프로그램을 실행합니다.

    라이브러리는 다음 단계로 넘어가기 전 최대 5분간 4°C로 유지될 수 있습니다.

두 번째 가닥 cDNA 합성(RNA 워크플로우)

이 단계에서는 RNA 템플릿을 제거하고 이중 가닥(double-stranded) cDNA를 합성합니다.

소모품

- SSM(Second Strand Mix)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

준비

1. 다음과 같이 SSM을 준비합니다.
   a. 10회 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.
   b. 짧게 원심분리합니다.
2. 다음과 같은 2ndSS 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
   뚜껑 온도를 30°C로 설정할 수 없는 경우에는 Preheated Lid Heat 옵션을 비활성화합니다.
   - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 30°C로 설정
   - Reaction Volume을 50 µl로 설정
   - 16°C에서 10분
   - 4°C에서 온도 유지

절차

1. 열 순환기에서 "CF" 플레이트를 꺼냅니다.
2. 각 웰에 25 µl의 SSM을 넣은 후 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 플레이트를 미리 프로그래밍된 열 순환기에 놓고 2ndSS 프로그램을 실행합니다.

   라이브러리는 다음 단계로 넘어가기 전 최대 5분간 4°C로 유지될 수 있습니다.

cDNA 클린업(RNA 워크플로우)

이 단계에서는 Illumina Purification Beads(IPB)를 사용하여 원치 않는 반응물에서 cDNA를 정제합니다. 비드를 새로 준비한 80% 에탄올로 2회 세척하고, Resuspension Buffer(RSB)로 cDNA를 용출합니다.

소모품

- IPB(Illumina Purification Beads)
- RSB(Resuspension Buffer)
- 96-well Plate
  - 곧바로 라이브러리를 준비하려는 경우 — MIDI Plate 2개
  - cDNA 단계 후 플레이트를 보관하려는 경우 — MIDI Plate 1개 + PCR Plate 1개
- 무수에탄올(EtOH)
- 뉴클레아제가 없는 물
- 50 ml 코니칼 튜브
- Microseal 'B' Adhesive Seal

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - IPB — 사용 전 1분간 볼텍싱하여 비드가 흩어지게 합니다.
   - RSB — 볼텍싱하여 혼합합니다.
2. **[RNA 워크플로우 직후 라이브러리를 준비하려는 경우]** 새 96-well MIDI Plate에 "LP"라는 라벨을 부착합니다.
   [RNA 워크플로우 직후 cDNA를 보관하려는 경우] 새 PCR Plate에 "PCF"라는 라벨을 부착합니다.
3. 새 96-well MIDI Plate에 "BIND1"이라는 라벨을 부착합니다.
4. 코니칼 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합하여 80% 에탄올을 준비합니다.

80% 에탄올	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
에탄올(µl)	1200	3200	6400	9600
뉴클레아제가 없는 물(µl)	300	800	1600	2400

   상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 500 µl의 80% 에탄올을 만들 수 있습니다.
5. 80% 에탄올을 볼텍싱하여 혼합합니다.

절차

결합

1. 열 순환기에서 “CF” 플레이트를 꺼냅니다.
2. IPB를 1분간 볼텍싱합니다.
3. “BIND1” 플레이트의 각 웰에 90 µl의 IPB를 넣습니다.
4. “CF” 플레이트의 각 웰에서 샘플의 전량을 “BIND1” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.
5. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
6. 실온에서 5분간 배양합니다.

워시

1. “BIND1” 플레이트를 마그네틱 스탠드에 5분간 둡니다.
2. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
3. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
   a. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 둔 상태에서 각 웰에 80% 에탄올을 200 µl씩 넣어 줍니다.
   b. 30초간 기다립니다.
   c. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
4. 위의 3단계를 반복하여 **2차** 비드 워시를 수행합니다.
5. 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 20 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰에 남아 있는 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

용출

1. 마그네틱 스탠드에서 “BIND1” 플레이트를 내립니다.
2. 각 웰에 52 µl의 RSB를 넣습니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
4. 실온에서 2분간 배양합니다.
5. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
6. **[RNA 워크플로우 직후 라이브러리를 준비하려는 경우]** “BIND1” 플레이트의 각 웰에서 50 µl의 상층액을 “LP” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다. cDNA 샘플과 gDNA 샘플을 동시에 처리하는 경우, gDNA를 절단하는 동안 “LP” 플레이트는 얼음에 올려 둡니다. 24페이지의 *gDNA 절편화(DNA 워크플로우)* 과정을 완료한 후 절단된 gDNA 샘플을 “LP” 플레이트로 옮깁니다.
   [RNA 워크플로우 직후 정제된 cDNA를 보관하려는 경우] “BIND1” 플레이트의 각 웰에서 50 µl의 상층액을 “PCF” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.

> 상층액은 갈색빛을 띨 수 있으며, 이는 라이브러리의 품질에 영향을 주지 않습니다.

안전한 중단 지점

여기에서 작업을 멈출 경우(PCF만 해당), “PCF” 플레이트를 Microseal ‘B’로 밀봉한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 7일까지 보관 가능합니다.

프로토콜 사전 준비

DNA 준비

1. 보관 중이던 gDNA 샘플을 꺼내 실온에서 해동합니다.
2. 박스에서 시약을 꺼내 다음 절차에 따라 준비합니다.

   2~8°C 보관

시약	박스 라벨	지침
TEB	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep 4C, 20129773	실온에 도달하도록 방치

gDNA 절편화(DNA 워크플로우)

이 단계에서는 권장되는 초음파 분쇄기를 사용하여 gDNA를 90~250 bp의 크기로 절단합니다(3페이지의 *소모품 및 비품* 섹션 참조). Covaris로 gDNA를 절단하면 3' 및 5' 돌출부(overhang)를 가진 dsDNA 절편이 생성됩니다.

소모품

- TEB(TE Buffer)
- 특정 초음파 분쇄기 전용 Covaris microTUBE(7페이지의 *별도 구매 소모품 및 비품* 참조)
- 96-well Plate
  - 곧바로 라이브러리를 준비하려는 경우 — MIDI Plate
  - 절단 후 보관하려는 경우 — PCR Plate

준비

1. 제조사의 가이드라인에 따라 Covaris의 전원을 켠 후 설정합니다.
   모델에 따라 기기의 가스 제거에는 1시간 정도가 소요될 수 있습니다.
2. TEB를 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.
3. 다음의 지침에 따라 gDNA 샘플을 준비합니다.
   a. gDNA 샘플을 10회 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   b. 각각의 정제된 gDNA 샘플을 30 ng씩 TEB로 희석하여 최종적으로 12 µl(2.5 ng/µl)를 만듭니다.
   자세한 내용은 1페이지의 *권장되는 DNA/RNA 사용량* 섹션을 참조하시기 바랍니다.
   c. 피펫팅하거나 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
4. 곧바로 26페이지의 *프로토콜 사전 준비* 단계를 진행하려면, 새 96-well MIDI Plate에 “LP MIDI”라는 라벨을 부착합니다.
   이 단계 완료 후 절단된 gDNA를 보관하려면, 새 96-well PCR Plate에 “LP PCR”이라는 라벨을 부착합니다.

절차

1. 정제 후 희석된 각각의 gDNA 샘플을 12 µl씩 Covaris microTUBE의 웰에 나누어 넣습니다.
2. 각 샘플에 40 µl의 TEB를 넣습니다.
3. 피펫팅하여 혼합합니다.
   gDNA 절단에 사용하는 튜브에서 거품이나 공기 간극이 과도하게 발생하면 gDNA가 불완전하게 절단될 수 있습니다.
4. 사용하지 않은 모든 Covaris microTUBE의 웰에 52 µl의 TEB를 넣습니다.
5. Covaris microTUBE를 함께 제공되는 캡 또는 포일 씰로 밀봉합니다.
6. 짧게 원심분리합니다.
7. 권장되는 초음파 분쇄기를 사용하는 경우 다음과 같이 기기를 설정하여 gDNA를 절편화합니다. 제공되는 파라미터는 소프트웨어 버전에 따라 상이할 수 있습니다.

설정 항목	E220evo	LE220-plus	R230	ML230	ME220	M220
Water bath temperature	7°C	7°C	10°C	12°C	12°C	20°C
Peak Incident Power (PIP)	175 watts	450 watts	450 watts	350 watts	50 watts	50 watts
% Duty Factor	10%	30%	25%	25%	30%	20%
Cycles per Burst	200	200	600	1000	1000	1000
Pulsing (10 sec bursts)	X	X	O	O	O	O
Pulse delay time (seconds)	N/A	N/A	10	40	10	10
Shearing Time (seconds)	280	250	200[1]	320[2]	200[1]	200[1]
Sample Processing	1	1–8	1–8	1–8	1	1
Batch Size	1–8	1–96	1–96	1–8	1–8	1
Dithering	N/A	N/A	1.5 mm Y @ 10 mm/s	3 mm Y @ 20 mm/s	N/A	N/A
Other	Intensifier	N/A	N/A	N/A	Wave Guide	N/A
DNA input equivalent (for median exon coverage)	30 ng	30 ng	30 ng	40 ng	40 ng	50 ng

1. 200초의 절단 시간에는 버스트(burst) 10초 및 반복 20회가 포함됨
2. 320초의 절단 시간에는 버스트 10초 및 반복 32회가 포함됨

8. Covaris microTUBE를 짧게 원심분리합니다.
9. 각각의 절단된 gDNA 샘플을 50 µl씩 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.
   - 곧바로 라이브러리를 준비하려는 경우 — “LP” MIDI Plate 사용
   - 절단된 gDNA를 보관하려는 경우 — “LP” PCR Plate 사용

   정확도를 높이기 위해 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 16.7 µl로 설정한 후 피펫으로 각각의 절단된 gDNA 샘플을 3번에 걸쳐 옮깁니다.
10. gDNA 샘플과 cDNA 샘플을 동시에 처리하는 경우, 22페이지의 *cDNA 클린업(RNA 워크플로우)* 단계를 완료한 후 이 플레이트를 사용해 cDNA를 옮기도록 합니다.

안전한 중단 지점

여기에서 작업을 멈출 경우, “LP” PCR Plate를 Microseal ‘B’로 밀봉한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 7일까지 보관 가능합니다.

프로토콜 사전 준비

다음의 단계는 Pre-Amp 구역에서 진행됩니다.

1. 박스에서 시약을 꺼내 다음 절차에 따라 준비합니다.

   실온 보관

시약	박스 라벨	지침
IPB	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep 4C, 20129773	2~8°C에서 보관한 경우 실온에 도달하도록 방치한 후 사용

   2~8°C 보관

시약	박스 라벨	지침
RSB	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep 4C, 20129773	실온에 도달하도록 방치

   -25~-15°C 보관

시약	박스 라벨	지침
ATL4	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep -20C, 20129774	실온에 도달할 때까지 해동
EPM4	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep -20C, 20129774	얼음 위에서 해동
ERP6	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep -20C, 20129774	얼음 위에서 해동
LIGX	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep -20C, 20129774	얼음 위에서 해동
STL	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep -20C, 20129774	실온에 도달할 때까지 해동
UMI3	TruSight Oncology 500 v2 Library Prep -20C, 20129774	실온에 도달할 때까지 해동

말단 복구 및 A-테일링

이 단계에서는 앞서 절편화 단계에서 생성된 5' 및 3' 돌출부를 End Repair Mix 6(ERP6)를 사용하여 둔단(blunt end)으로 만듭니다. ERP6의 핵산 말단 가수분해효소 활성(exonuclease activity)을 통해 3' 돌출부가 제거되며, 5'–3' 중합효소 활성(5' to 3' polymerase activity)을 통해 5' 돌출부가 채워집니다.

3' 말단에 1개의 'A' 뉴클레오티드를 추가하여 어댑터 라이게이션 반응(adapter ligation reaction) 중 절편들이 서로 연결되는 것을 방지합니다.

소모품

- ATL4(A-Tailing Mix)
- ERP6(End Repair Mix 6)
- 앞서 cDNA 및/또는 gDNA를 PCR Plate에 보관했던 경우 96-well MIDI Plate
- Microseal 'B' Adhesive Seal

준비

1. 다음과 같이 MIDI Heat Block Insert로 인큐베이터 2대를 예열합니다.
   a. 첫 번째 인큐베이터를 30°C로 예열합니다.
   b. 두 번째 인큐베이터를 70°C로 예열합니다.
2. 얼음통을 준비합니다.
3. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - ERP6 — 피펫팅하거나 중간 속도로 짧게 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   - ATL4 — 중간 속도로 짧게 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
4. 다음 옵션 중 하나를 선택해 플레이트를 준비합니다.
   - 옵션 1: 샘플이 MIDI Plate에 들어 있는 경우 다음 절차에 따라 준비합니다.
     a. MIDI Plate의 라벨을 "LP2"로 교체합니다.
     b. 일부 샘플이 다른 MIDI Plate에 들어 있는 경우, 플레이트 레이아웃에 따라 모든 샘플을 1개의 MIDI Plate의 웰로 하나씩 옮깁니다.
   - 옵션 2: 플레이트를 냉동 보관했던 경우 다음 절차에 따라 준비합니다.
     a. "PCF" PCR Plate 및/또는 "LP" PCR Plate를 실온에 도달할 때까지 해동합니다.
     b. 플레이트를 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
     c. 각 웰을 10회 피펫팅하여 혼합합니다.
     d. 새 96-well MIDI Plate에 "LP2"라는 라벨을 부착합니다.
     e. "PCF" PCR Plate 및/또는 "LP" PCR Plate의 각 웰에 들어 있던 샘플의 전량인 50 µl를 각각 "LP2" MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
     f. "PCF" PCR Plate 또는 "LP" PCR Plate를 폐기합니다.

절차

1. “LP2” 플레이트의 각 웰에 10 µl의 ERP6를 넣습니다.
2. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
3. 30°C에서 30분간 배양합니다.

   “LP2” 플레이트는 가열 또는 냉각 후 결로 현상이 발생할 수 있습니다. 원심분리 단계는 필요하지 않습니다.
4. 곧바로 70°C로 설정된 다른 인큐베이터로 플레이트를 옮겨 10분간 배양합니다.
5. 30°C로 설정되어 있던 인큐베이터를 37°C로 재설정합니다.
6. “LP2” 플레이트를 얼음에 5분간 올려 둡니다.
7. 35 µl의 ATL4를 각 웰에 넣습니다.
8. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
9. 37°C에서 20분간 배양합니다.
10. 곧바로 70°C로 설정된 다른 인큐베이터로 플레이트를 옮겨 5분간 배양합니다.
11. “LP2” 플레이트를 얼음에 5분간 올려 둡니다.

어댑터 연결

이 단계에서는 어댑터를 cDNA 절편 및/또는 gDNA 절편의 말단에 연결합니다.

소모품

- LIGX(Ligation Mix)
- STL(Stop Ligation Buffer)
- UMI3(Unique Molecular Identifier Index Anchors 3)
- Microseal ‘B’ Adhesive Seal

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - LIGX
     a. 짧게 원심분리합니다.
     b. 피펫팅하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   - UMI3 — 최소 10초간 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
   - STL
     a. 실온에서 해동합니다.
     b. 최소 10초간 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.

절차

1. "LP2" 플레이트의 각 웰에 10 µl의 UMI3를 넣습니다.
2. 각 웰에 5 µl의 LIGX를 넣습니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 실온에서 30분간 배양합니다.
5. STL을 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
6. 각 웰에 5 µl의 STL을 넣습니다.
7. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.

라이게이션 클린업

이 단계에서는 IPB로 cDNA 절편 및/또는 gDNA 절편을 정제하고, 연결되지 않은 어댑터와 같은 원치 않는 산물을 제거합니다. 비드를 새로 준비한 80% 에탄올로 2회 세척하고, 산물을 RSB로 용출합니다.

소모품

- EPM4(Enhanced PCR Mix 4)
- IPB(Illumina Purification Beads)
- RSB(Resuspension Buffer)
- UD Index Plate
- 무수에탄올(EtOH)
- 96-well PCR Plate
- 50 ml 코니칼 튜브
- Microseal 'B' Adhesive Seal
- 뉴클레아제가 없는 물

⚠ **해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 시약에 함유된 유해 물질을 취급할 때는 적절한 환기가 이루어져야 합니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다.** 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheets, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- IPB
  - IPB는 실온에 도달하도록 방치한 후 사용합니다.
  - 용액의 점도를 고려해 IPB를 천천히 흡인하고 분주합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - IPB — 사용 전 1분간 볼텍싱하여 비드가 흩어지게 합니다.
   - RSB — 볼텍싱하여 혼합합니다.
   - UD Index Plate — 짧게 원심분리합니다.
   - EPM4
     a. 피펫팅하여 혼합하거나 중간 속도로 볼텍싱합니다.
     b. 짧게 원심분리합니다.
2. 코니칼 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합하여 80% 에탄올을 준비합니다.

80% 에탄올	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
에탄올(µl)	1200	3200	6400	9600
뉴클레아제가 없는 물(µl)	300	800	1600	2400

   상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 500 µl의 80% 에탄올을 만들 수 있습니다.
3. 80% 에탄올을 볼텍싱하여 혼합합니다.
4. 라이브러리당 1개의 UDPXXXX 인덱스 프라이머를 할당합니다(XXXX = 인덱스 프라이머 번호).
   여러 개의 라이브러리를 시퀀싱할 경우 샘플 라이브러리마다 다른 인덱싱 프라이머를 할당합니다.
   샘플 레이아웃 방향(layout orientation)과 각 샘플 라이브러리에 할당된 인덱스를 기록해 둡니다.
   UD Index Plate에는 일회용 웰이 들어 있습니다. 처리하는 샘플의 수와 동일한 수의 웰만을 사용하도록 합니다.
   자세한 내용은 *Index Adapters Pooling Guide(문서 번호: 1000000041074)*를 참조하시기 바랍니다.
5. 새 96-well PCR Plate에 “LS”라는 라벨을 부착합니다.

절차

결합

1. IPB를 1분간 볼텍싱합니다.
2. “LP2” 플레이트의 각 웰에 92 µl의 IPB를 넣습니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 실온에서 5분간 배양합니다.

워시

1. “LP2” 플레이트를 마그네틱 스탠드에 10분간 둡니다.
2. 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 제거 및 폐기합니다.
3. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
   a. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 둔 상태에서 각 웰에 80% 에탄올을 200 µl씩 넣어 줍니다.
   b. 30초간 기다립니다.
   c. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
4. 위의 3단계를 반복하여 2차 비드 워시를 수행합니다.
5. 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 20 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

용출

1. 마그네틱 스탠드에서 “LP2” 플레이트를 내립니다.
2. 각 웰에 20 µl의 RSB를 넣습니다.

   올바른 인덱스 할당을 위해 사용 전 UD Index Plate의 방향을 확인합니다.

3. 새 피펫 팁을 사용해 처리하는 샘플의 수와 동일한 수의 UD Index Plate 웰을 덮고 있는 포일 씰에 하나씩 구멍을 뚫어 줍니다. UD Index를 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
4. 10 µl의 할당된 UD Index를 각각 “LP2” 플레이트의 상응하는 웰에 넣습니다. 오염을 방지하기 위해 UD Index Plate의 웰 중 열려 있거나 이미 사용한 웰은 다시 밀봉합니다.
5. 각 웰에 20 µl의 EPM4를 넣습니다.
6. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
   모든 비드가 재현탁(resuspension)된 것을 확인합니다. 비드 펠릿이 관찰되면, 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어줍니다.
7. “LP2” 플레이트의 각 웰에서 용액의 전량(IPB 비드 포함)을 “LS” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.

인덱스 PCR

이 단계에서는 샘플의 멀티플렉싱(multiplexing)을 위해 인덱스 시퀀스(index sequence)를 추가하는 프라이머를 사용하여 IPB 비드가 있는 상태에서 라이브러리 절편을 증폭합니다. 증폭 산물은 인덱스 시퀀스와 클러스터 생성(cluster generation)에 필요한 어댑터로 플랭킹(flanking)되어 있는 완성된 DNA 절편 라이브러리를 포함합니다.

소모품

- 96-well PCR Plate
- Microseal 'B' Adhesive Seal

준비

1. 새 96-well PCR Plate에 "ALS"라는 라벨을 부착합니다.
2. Post-Amp 구역에서 다음과 같은 I-PCR 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
    - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정
    - Reaction Volume을 50 µl로 설정
    - 98°C에서 30초
    - 다음 조건에서 15사이클 수행
        - 98°C에서 10초
        - 60°C에서 30초
        - 72°C에서 30초
    - 72°C에서 5분
    - 10°C에서 온도 유지

절차

1. "LS" 플레이트를 Post-Amp 구역으로 옮깁니다.
2. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 놓고 I-PCR 프로그램을 실행합니다.
3. 프로그램이 10°C에서 온도를 유지하는 단계까지 진행되면, 열 순환기에서 플레이트를 꺼냅니다.
4. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
5. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 "LS" 플레이트의 각 웰에 있는 상층액을 모두(약 50 µl) "ALS" 플레이트의 상응하는 웰로 옮겨 줍니다.
   경미한 비드 잔류 오염이 발생할 수 있으나 이는 후속 단계에 영향을 주지 않습니다.

안전한 중단 지점

여기에서 작업을 멈출 경우, "ALS" 플레이트를 Microseal 'B'로 밀봉한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다. 2~8°C에서 밤사이(overnight) 보관하거나, -25~-15°C에서 최대 30일까지 보관 가능합니다.

프로토콜 사전 준비

다음의 단계는 Post-Amp 구역에서 진행됩니다.

1. 보관 중이던 "ALS" 플레이트를 꺼내 실온에 도달할 때까지 해동합니다.
2. 박스에서 시약을 꺼내 다음 절차에 따라 준비합니다.

실온 보관

시약	박스 라벨	지침
IPB	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	2~8°C에서 보관한 경우 실온에 도달하도록 방치한 후 사용

2~8°C 보관

시약	박스 라벨	지침
EHB2	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	실온에 도달하도록 방치
RSB	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	실온에 도달하도록 방치
SMB4	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	실온에 도달하도록 방치

-25~-15°C 보관

시약	박스 라벨	지침
EEW	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 최소 90분 해동
EPM4	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	얼음 위에서 해동
NHB2	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동
PPC3	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동

3. 워크플로우에 따라 해당하는 경우 보관 중이던 인리치먼트 프로브 패널을 꺼냅니다.

   -25~-15°C 보관

시약	박스 라벨	지침
[DNA] OPD2	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동
[DNA-HRD] OPD3	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동
[RNA] OPR1	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동

프로브 하이브리드화

이 단계에서는 이중 가닥 인리치먼트 프로브 올리고뉴틀레오티드(oligonucleotide)를 cDNA 라이브러리 및/또는 gDNA 라이브러리의 표적 영역에 결합합니다.

소모품

- EHB2(Enrich Hyb Buffer 2)
- 인리치먼트 프로브 패널:
  - **[DNA]** OPD2(Oncology Probe DNA 2)
  - **[DNA-HRD]** OPD3(Oncology Probe DNA 3)
  - **[RNA]** OPR1(Oncology Probe RNA 1)
- NHB2(Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers)
- RSB(Resuspension Buffer)
- 96-well PCR Plate
- 1.7 ml 뉴클레아제가 없는 미세원심분리 튜브
- Microseal 'B' Adhesive Seal

⚠ **해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 시약에 함유된 유해 물질을 취급할 때는 적절한 환기가 이루어져야 합니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다.** 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheets, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- OPD2는 DNA 라이브러리에만 사용합니다.
- OPD2와 OPD3는 HRD가 있는 DNA 라이브러리에 사용합니다.
- OPR1은 RNA 라이브러리에만 사용합니다.
- EHB2를 넣은 후 시간이 지나면서 Master Mix가 혼탁해질 수 있습니다.

준비

1. 가열 블록을 54°C로 예열합니다.
2. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - NHB2
     a. 54°C의 가열 블록에서 5분간 배양합니다.
     b. 5초간 볼텍싱합니다.
     c. 용액에서 결정이나 혼탁이 관찰되면, 투명해질 때까지 볼텍싱을 반복하거나 위아래로 피펫팅하여 혼합합니다.
     온도가 실온까지 내려가면, 54°C에서 5분간 다시 예열합니다. 결정이 다시 생기는 것을 방지하기 위해 따뜻할 때 사용하도록 합니다.
   - **[DNA]** OPD2 — 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
   - **[DNA—HRD]** OPD3 — 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
   - **[RNA]** OPR1 — 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
   - RSB — 짧게 볼텍싱합니다.
   - EHB2
     a. 30초간 볼텍싱합니다.
     b. 용액에서 결정이나 혼탁이 관찰되면, 투명해질 때까지 볼텍싱을 반복하거나 위아래로 피펫팅하여 혼합합니다.
3. 새 96-well PCR Plate에 “HYB”라는 라벨을 부착합니다.
4. “ALS” 플레이트를 4°C 또는 -20°C에 보관했던 경우에는 실온에 도달할 때까지 방치합니다. 밀봉 씰에 물방울이 맺힌 것이 보이면, 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
5. “ALS” 플레이트에 들어 있는 라이브러리를 5회 피펫팅하여 혼합한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
6. 다음과 같은 HYB 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
   a. Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정
   b. Reaction Volume을 25 µl로 설정
   c. 98°C에서 5분
   d. 각각 1분간 19사이클 수행
   e. 96°C에서 60°C까지 사이클당 2°C씩 온도 감소
   f. 57°C에서 60분
   g. 57°C에서 최대 30분 온도 유지

절차

1. 해동된 "ALS" 플레이트를 마그네틱 스탠드에 1분간 둡니다.
2. 다음 절차에 따라 DNA 라이브러리를 준비합니다.
   a. 마그네틱 스탠드에 올려둔 "ALS" 플레이트의 각 웰에서 7.5 µl의 gDNA 라이브러리를 "HYB" 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.
   b. 각기 다른 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 명시된 순서대로 혼합하여 OPD2(DNA) HYB Master Mix 또는 OPD2+OPD3(DNA—HRD) HYB Master Mix를 준비합니다. HRD 프로토콜 옵션에는 OPD2+OPD3 HYB Master Mix만을 사용합니다.

      OPD2 HYB Master Mix(DNA)

시약 이름	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
NHB2(µl)	43.2	115.2	230.4	345.6
OPD2(µl)	5.1	13.6	27.2	40.8
RSB(µl)	3.6	9.6	19.2	28.8
EHB2(µl)	8.7	23.2	46.4	69.6

      OPD2+OPD3 HYB Master Mix(DNA—HRD만 해당)

시약 이름	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
NHB2(µl)	43.2	115.2	230.4	345.6
OPD2(µl)	5.1	13.6	27.2	40.8
OPD3(µl)	3.6	9.6	19.2	28.8
EHB2(µl)	8.7	23.2	46.4	69.6

      상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 20.2 µl의 Master Mix를 만들 수 있습니다. EHB2를 추가하면 용액이 혼탁해질 수도 있습니다. 균일한 현탁액 상태가 되도록 충분히 혼합하여 사용하도록 합니다.
   c. Master Mix를 볼텍싱합니다.
   d. gDNA 라이브러리가 들어 있는 "HYB" 플레이트의 각 웰에 17.5 µl씩 넣습니다.

3. 다음 절차에 따라 RNA 라이브러리를 준비합니다.
   a. 마그네틱 스탠드에 올려둔 “ALS” 플레이트의 각 웰에서 7.5 µl의 cDNA 라이브러리를 “HYB” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.
   b. 각기 다른 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 명시된 순서대로 혼합하여 OPR1 HYB Master Mix를 준비합니다.

      OPR1 HYB Master Mix(RNA)

시약 이름	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
NHB2(µl)	43.2	115.2	230.4	345.6
OPR1(µl)	5.1	13.6	27.2	40.8
RSB(µl)	3.6	9.6	19.2	28.8
EHB2(µl)	8.7	23.2	46.4	69.6

      상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 20.2 µl의 OPR1 HYB Master Mix를 만들 수 있습니다. EHB2를 추가하면 용액이 혼탁해질 수 있습니다. 균일한 현탁액 상태가 되도록 충분히 혼합하여 사용하도록 합니다.
   c. Master Mix를 볼텍싱합니다.
   d. cDNA 라이브러리가 들어 있는 “HYB” 플레이트의 각 웰에 17.5 µl씩 넣습니다.
4. 밀봉한 후 “HYB” 플레이트를 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
5. 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
6. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 놓고 HYB 프로그램을 실행합니다.
7. Hybex를 54°C로 예열합니다.
8. 실온에서 EEW와 SMB4를 해동합니다.

하이브리드화를 거친 프로브 캡처

이 단계에서는 Streptavidin Magnetic Beads 4(SMB4)를 사용하여 관심 표적 영역에 하이브리드화(hybridization)된 프로브를 캡처합니다. 가열 비드 워시를 수행하여 비특이적 DNA 결합(nonspecific DNA binding)을 제거합니다. 이후 비드에서 인리치먼트를 거친 라이브러리를 용출하면 증폭 단계로 넘어갈 준비가 완료됩니다.

소모품

- EEW(Enhanced Enrichment Wash)
- EPM4(Enhanced PCR Mix 4)
- PPC3(PCR Primer Cocktail 3)
- RSB(Resuspension Buffer)
- SMB4(Streptavidin Magnetic Beads 4)
- 96-well MIDI Plate 2개
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브
- Microseal 'B' Adhesive Seal

⚠ **해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 시약에 함유된 유해 물질을 취급할 때는 적절한 환기가 이루어져야 합니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다.** 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheets, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- EEW는 반드시 최소 90분간 실온에 방치했다가 사용해야 합니다.
- SMB4
  - 이 절차에는 IPB 대신 SMB4를 사용해야 합니다.
  - SMB4는 반드시 실온에 방치했다가 사용해야 합니다.
  - SMB4를 사용하기 전에 비드를 재현탁합니다.

준비

1. 얼음통을 준비합니다.
2. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - SMB4
     a. 1분간 충분하게 볼텍싱하여 비드를 재현탁합니다.
     b. 그래도 비드 펠릿이 남아 있다면, 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어준 후 볼텍싱을 반복합니다.
     c. 침전물이 관찰되면, 용해될 때까지 볼텍싱합니다.
   - EEW — 1분간 충분하게 볼텍싱하여 혼합합니다.
   - RSB — 짧게 볼텍싱합니다.
   - PPC3 — 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   - EPM4 — 피펫팅하거나 중간 속도로 짧게 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

3. 각기 다른 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합하여 EL-PCR Master Mix를 준비합니다.

   EL-PCR Master Mix

시약 이름	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
RSB	86.4	230.4	460.8	691.2
PPC3	17.4	46.4	92.8	139.2
EPM4	69.0	184.0	368.0	552.0

   상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 57.5 µl의 EL-PCR Master Mix를 만들 수 있습니다.
4. EL-PCR Master Mix를 볼텍싱하여 혼합합니다. 사용하기 전까지 얼음에 올려 둡니다.
5. 새 96-well MIDI Plate에 “Hyb Wash”라는 라벨을 부착합니다.
6. 새 96-well MIDI Plate에 “Transfer Wash”라는 라벨을 부착합니다.

절차

결합

1. 열 순환기에서 “HYB” 플레이트를 꺼냅니다.
2. SMB4를 1분간 볼텍싱합니다.
3. “Hyb Wash” 플레이트의 각 웰에 25 µl의 SMB4를 넣습니다.
4. “HYB” 플레이트의 각 웰에서 용액의 전량을 “Hyb Wash” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.
5. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 4분간 진탕합니다.
6. 54°C에서 15분간 배양합니다.
7. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
8. 피펫을 200 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

워시

1. EEW를 1분간 볼텍싱합니다.
2. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
   a. 마그네틱 스탠드에서 “Hyb Wash” 플레이트를 내립니다.
   b. 각 웰에 200 µl의 EEW를 넣은 후 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
   c. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 4분간 진탕합니다.
   d. 각 웰을 육안으로 확인합니다. 비드 펠릿이 관찰되면, 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어줍니다.
   e. 54°C에서 10분간 배양합니다.
   f. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
   g. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
3. 위의 2단계를 반복하여 **2차** 비드 워시를 수행합니다.
4. 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 20 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

트랜스퍼 워시

1. 마그네틱 스탠드에서 “Hyb Wash” 플레이트를 내립니다.
2. 각 웰에 200 µl의 EEW를 넣습니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 4분간 진탕합니다.
4. 각 웰을 육안으로 확인합니다. 비드 펠릿이 관찰되면, 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어줍니다.
5. 200 µl의 재현탁한 비드 용액을 “Transfer Wash” 플레이트로 옮깁니다.

   샘플을 새 MIDI Plate로 옮기는 작업은 후속 PCR에 영향을 줄 수 있는 잔여 시약으로 인한 잔류 오염을 최소화하는 데 매우 중요합니다.

6. 54°C에서 5분간 배양합니다.
7. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 두고 액체가 투명해질 때까지 2분간 기다립니다.
8. 피펫을 200 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
9. “Transfer Wash” 플레이트를 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
10. 마그네틱 스탠드에 10초간 둡니다.
11. 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 20 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

비드가 지나치게 마르는 것을 방지하기 위해 곧바로 다음 섹션을 진행합니다.

인리치먼트를 거친 라이브러리 증폭

이 단계에서는 프라이머를 사용하여 인리치먼트를 거친 라이브러리를 증폭합니다.

소모품

- Microseal 'B' Adhesive Seal
- 2 ml 미세원심분리 튜브
- PCR Plate

준비

1. 다음과 같은 EL-PCR 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
    - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정
    - Reaction Volume을 50 µl로 설정
    - 98°C에서 30초
    - 다음 조건에서 18사이클 수행
        - 98°C에서 10초
        - 60°C에서 30초
        - 72°C에서 30초
    - 72°C에서 5분
    - 10°C에서 온도 유지
2. 새 96-well PCR Plate에 "EL-PCR"이라는 라벨을 부착합니다.

절차

1. 마그네틱 스탠드에서 "Transfer Wash" 플레이트를 내립니다.
2. "Transfer Wash" 플레이트의 각 웰에 50 µl의 EL-PCR Master Mix를 넣습니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 각 웰을 육안으로 확인합니다. 비드 펠릿이 관찰되면, 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어줍니다.
5. "Transfer Wash" 플레이트의 각 웰에서 50 µl(비드 포함)를 "EL-PCR" Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
6. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 놓고 EL-PCR 프로그램을 실행합니다.

증폭 및 인리치먼트를 거친 라이브러리 클린업

이 단계에서는 인리치먼트를 거친 라이브러리를 IPB를 사용하여 정제합니다.

소모품

- IPB(Illumina Purification Beads)
- RSB(Resuspension Buffer)
- 무수에탄올(EtOH)
- 뉴클레아제가 없는 물
- 96-well PCR Plate
- 50 ml 코니칼 튜브
- Microseal 'B' Adhesive Seal

시약 정보

- IPB
  - IPB는 실온에 도달하도록 방치한 후 사용합니다.
  - 용액의 점도를 고려해 IPB를 천천히 흡인하고 분주합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - IPB — 사용 전 1분간 볼텍싱하여 비드가 흩어지게 합니다.
   - RSB — 볼텍싱하여 혼합합니다.
2. 코니칼 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합하여 80% 에탄올을 준비합니다.

80% 에탄올	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
에탄올(µl)	600	1600	3200	4800
뉴클레아제가 없는 물(µl)	150	400	800	1200

   상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 250 µl의 80% 에탄올을 만들 수 있습니다.
3. 80% 에탄올 — 볼텍싱하여 혼합합니다.
4. 새 96-well MIDI Plate에 "Clean Up"이라는 라벨을 부착합니다.
5. 새 96-well PCR Plate에 "PL"이라는 라벨을 부착합니다.

절차

결합

1. 열 순환기에서 “EL-PCR” 플레이트를 꺼냅니다.
2. IPB를 1분간 볼텍싱합니다.
3. “Clean Up” 플레이트의 각 웰에 60 µl의 IPB를 넣습니다.
4. “EL-PCR” 플레이트의 라이브러리를 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
5. “EL-PCR” 플레이트의 각 웰에서 용액의 전량(약 50 µl)을 “Clean Up” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.
6. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
7. 실온에서 5분간 배양합니다.

워시

1. “Clean Up” 플레이트를 마그네틱 스탠드에 5분간 둡니다.
2. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
3. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
   a. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 둔 상태에서 각 웰에 80% 에탄올을 200 µl씩 넣어 줍니다.
   b. 30초간 기다립니다.
   c. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
4. 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 20 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

용출

1. 마그네틱 스탠드에서 플레이트를 내립니다.
2. 각 웰에 32 µl의 RSB를 넣습니다.
3. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 실온에서 5분간 배양합니다.
5. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
6. “Clean Up” 플레이트의 각 웰에서 30 µl의 상층액을 “PL” 플레이트의 상응하는 웰로 옮깁니다.

   용출액은 갈색빛을 띨 수 있으며, 이는 라이브러리 품질에 영향을 주지 않습니다.

안전한 중단 지점

여기에서 작업을 멈출 경우, “PL” 플레이트를 Microseal ‘B’로 밀봉한 후 280 × g로 1분간 짧게 원심분리합니다. 2~8°C에서 밤사이(overnight) 보관하거나, -25~-15°C에서 최대 30일까지 보관 가능합니다.

프로토콜 사전 준비

1. 보관 중이던 “PL” 플레이트를 꺼내 실온에 도달할 때까지 해동합니다.
2. 박스에서 시약을 꺼내 다음 절차에 따라 준비합니다.

2~8°C 보관

시약	박스 라벨	지침
HP3	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	실온에 도달하도록 방치
LNB3	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	실온에 도달하도록 30분간 방치한 후 사용
LNW1	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment 4C, 20129777	실온에 도달하도록 방치

-25~-15°C 보관

시약	박스 라벨	지침
EE1	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동
LNA1	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동
LNS1	TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA), 20129778 또는 TruSight Oncology 500 v2 Enrichment -20C (DNA/RNA), 20129776	실온에서 해동

소모품

- EE1(Enrichment Elution Buffer 1)
- HP3(2 N NaOH)
- LNA1(Library Normalization Additives 1)
- LNB3(Library Normalization Beads 3)
- LNS1(Library Normalization Storage Buffer 1)
- LNW1(Library Normalization Wash 1)
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브
- 96-well MIDI Plate
- 96-well PCR Plate
- Microseal 'B' Adhesive Seal

해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 시약에 함유된 유해 물질을 취급할 때는 적절한 환기가 이루어져야 합니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다. 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheets, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

용액의 점도를 고려해 LNB3 비드를 천천히 흡인하고 분주합니다.

비드 기반 정규화

이 단계에서는 시퀀싱 풀(pool)에서 균일한 라이브러리 결과를 얻을 수 있도록 비드 기반 정규화(bead-based normalization) 과정을 통해 각 라이브러리의 양을 정규화합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.
   - LNA1 — 볼텍싱하여 혼합합니다.
   - LNB3
     a. 1분간 최대 속도로 펄스 볼텍싱(pulse vortexing)합니다.
     b. 1000 µl 피펫을 800 µl로 설정한 후 혼합합니다.
     c. 모든 비드가 재현탁될 때까지 위의 a~b단계를 반복합니다. 튜브를 뒤집었을 때 바닥에 비드가 남아 있지 않은 것을 육안으로 확인합니다.

     튜브 바닥에 남아 있는 비드 펠릿을 완전히 재현탁하는 것이 매우 중요합니다. 균일한 클러스터 밀도를 얻기 위해서는 재현탁이 필수입니다.
   - EE1 — 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   - HP3 — 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
   - LNW1 — 볼텍싱하여 혼합합니다.
   - LNS1 — 볼텍싱하여 혼합합니다.
2. 각기 다른 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합하여 LNA1 + LNB3 Master Mix를 준비합니다. 각각의 명시된 볼륨에 샘플 수를 곱합니다.

   LNA1+LNB3 Master Mix

시약 이름	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
LNA1(µl)	142.8	380.8	761.6	1,142.4
LNB3(µl)	25.8	68.8	137.6	206.4

   상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 56.2 µl의 LNA1 + LNB3 Master Mix를 만들 수 있습니다.
3. LNA1+LNB3 Master Mix를 볼텍싱하여 혼합합니다.
4. 각기 다른 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합하여 EE1 + HP3 Master Mix를 준비합니다.

   EE1+HP3 Master Mix

시약 이름	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
EE1(µl)	114	304	608	912
HP3(µl)	6.0	16.0	32.0	48.0

   상기 명시된 볼륨으로는 정확한 피펫팅을 고려해 넉넉하게 샘플당 40 µl의 EE1 + HP3 Master Mix를 만들 수 있습니다.

5. 다음과 같이 “PL” PCR Plate를 준비합니다.
   - “PL” 플레이트를 실온 이하에서 보관했다면 실온에 도달할 때까지 방치합니다.
   - 밀봉 씰에 물방울이 맺힌 것이 보이면, 짧게 원심분리합니다.
   - 피펫팅하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
6. 새 96-well MIDI Plate에 “BBN”이라는 라벨을 부착합니다.
7. 새 96-well PCR Plate에 “NL”이라는 라벨을 부착합니다.

절차

결합

1. LNA1 + LNB3 Master Mix를 짧게 볼텍싱합니다.
2. “BBN” 플레이트의 각 웰에 45 µl의 LNA1 + LNB3 Master Mix를 넣습니다.
3. “PL” 플레이트를 마그네틱 스탠드에 1분간 둡니다.
4. “PL” 플레이트의 각 웰에서 20 µl의 라이브러리를 "BBN" 플레이트의 상응하는 웰에 넣습니다.
5. “BBN” 플레이트를 밀봉한 후 1,800 rpm에서 10분간 진탕합니다.
6. “BBN” 플레이트를 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
7. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

워시

1. LNW1을 짧게 볼텍싱합니다.
2. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
   a. 마그네틱 스탠드에서 “BBN” 플레이트를 내립니다.
   b. 각 웰에 45 µl의 LNW1을 넣습니다.
   c. 밀봉한 후 1,800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
   d. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
   e. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
3. 위의 2단계를 반복하여 **2차** 비드 워시를 수행합니다.
4. 미세한 피펫 팁이 장착된 P20 피펫을 20 µl로 설정합니다. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 각 웰의 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.

용출

1. EE1 + HP3 Master Mix를 짧게 볼텍싱합니다.
2. 마그네틱 스탠드에서 “BBN” 플레이트를 내립니다.
3. 각 웰에 32 µl의 EE1+HP3 Master Mix를 넣습니다.
4. “BBN” 플레이트를 밀봉한 후 1,800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
5. “BBN” 플레이트를 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
6. 새로 준비한 “NL” 플레이트의 각 웰에 30 µl의 LNS1을 넣습니다.
7. 피펫으로 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 “BBN” 플레이트의 각 웰에서 30 µl의 상층액을 “NL” 플레이트의 상응하는 웰로 옮겨 줍니다.
8. 5회 피펫팅하여 혼합합니다.

안전한 중단 지점

여기에서 작업을 멈출 경우, “NL” 플레이트를 Microseal ‘B’로 밀봉한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다. 2~8°C에서 밤사이(overnight) 보관하거나, -25~-15°C에서 최대 30일까지 보관 가능합니다.

라이브러리 풀링 및 로딩 농도로 희석

라이브러리를 풀링(pooling), 변성 및 로딩 농도로 희석하는 방법은 사용 중인 시퀀싱 시스템의 변성 및 희석 지침을 따릅니다.

리소스 및 참고 자료

Illumina 지원 센터의 TruSight Oncology 500 v2 Kit 지원 페이지에서 소프트웨어, 교육 자료, 제품 호환성 정보 및 다음과 같은 문서를 확인하실 수 있습니다. 항상 지원 페이지에서 최신 버전의 문서를 확인하시기 바랍니다.

추가 리소스

리소스	설명
Illumina Adapter Sequences(문서 번호: 1000000002694)	Illumina 라이브러리 프렙 키트의 어댑터 시퀀스 제공
Index Adapters Pooling Guide(문서 번호: 1000000041074)	인덱싱 계획 시 권장 사항 및 풀링 전략 제공

개정 이력

문서 번호	날짜	개정 내용
200058285 v01.1	2025년 9월	HTML 버전의 제품 지원 문서에 개정 이력 추가
200058285 v01	2025년 8월	에탄올 혼합 시약 볼륨 업데이트
200058285 v00	2025년 7월	최초 발행

기술 지원

기술 지원은 Illumina 기술지원팀에 요청하시기 바랍니다.

웹사이트: www.illumina.com

이메일: techsupport@illumina.com

안전 보건 자료(Safety Data Sheets, SDS) — Illumina 웹사이트의 support.illumina.com/sds.html에서 확인하실 수 있습니다.

제품 관련 문서 — support.illumina.com에서 다운로드하실 수 있습니다.

문서 번호: 200058285 v01.1 KOR

Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN(4566)
+1.858.202.4566(북미 외 지역)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

illumina®