

illumina®

TruSight Oncology 500

레퍼런스 가이드

ILLUMINA PROPRIETARY

문서 번호: 1000000067621 v09 KOR

2021년 10월

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

이 문서와 이 문서에 기술된 내용은 Illumina, Inc. 및 그 계열사(통칭 "Illumina")의 소유이며, 이 문서에 명시된 제품의 사용과 관련하여 오직 고객의 계약상의 제품 사용만을 위해 제공되므로 그 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다. 이 문서와 이 문서에 기술된 내용은 Illumina의 사전 서면 동의 없이 어떤 방식으로든 다른 목적으로 사용하거나 배포할 수 없으며, 전달, 공개 또는 복제할 수 없습니다. Illumina는 이 문서를 통해 특허, 상표, 저작권 또는 관습법상의 권리 혹은 타사의 유사한 권리에 따라 어떠한 라이선스도 양도하지 않습니다.

이 문서에 명시된 제품의 올바르게 안전한 사용을 보장하기 위해 이 문서의 지침은 반드시 적절한 교육을 받고 자격을 갖춘 관계자가 엄격하고 정확하게 준수해야 합니다. 제품 사용 전 이 문서의 모든 내용을 완전히 읽고 숙지해야 합니다.

이 문서에 포함된 모든 지침을 완전히 읽지 않거나 정확하게 따르지 않으면 제품 손상, 사용자나 타인의 부상, 기타 재산 피해가 발생할 수 있으며, 이 경우 제품에 적용되는 모든 보증은 무효화됩니다.

Illumina는 이 문서에 명시된 제품(해당 제품의 부품 또는 소프트웨어 포함)의 부적절한 사용에서 비롯된 문제에 대해 어떠한 책임도 지지 않습니다.

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다. 특정 상표 정보는 www.illumina.com/company/legal.html을 참조하십시오.

목차

소개	1
권장 DNA/RNA 사용량	1
샘플 품질 평가	2
[선택 사항] 참조 샘플	2
DNA 절단 권장 방법	2
[선택 사항] 라이브러리 준비의 자동화	3
추가 리소스	3
프로토콜	4
팁과 기술	4
DNA 라이브러리 준비 워크플로우	7
DNA 인리치먼트 워크플로우	8
DNA & RNA 라이브러리 준비 워크플로우	9
DNA & RNA 인리치먼트 워크플로우	10
RNA 라이브러리 준비 워크플로우	11
RNA 인리치먼트 워크플로우	12
RNA 변성 및 결합	13
첫 번째 가닥 cDNA 합성	14
두 번째 가닥 cDNA 합성	15
cDNA 클린업	16
gDNA 절편화	18
말단 복구 및 A-테일링 수행	20

어댑터 연결.....	21
라이게이션(Ligation) 클린업	23
인덱스 PCR.....	24
1차 혼성화 준비	26
1차 표적 캡처.....	28
2차 혼성화 준비	30
2차 표적 캡처.....	32
인리치된 라이브러리 증폭	35
증폭 및 인리치된 라이브러리 클린업	36
[선택 사항] 라이브러리 정량화	38
라이브러리 표준화.....	39
라이브러리 풀링 및 로딩 농도로의 희석.....	42
부가 정보.....	43
키트 구성.....	43
Library Prep.....	44
Enrichment.....	46
소모품 및 장비	48
두문자어.....	51
리소스 및 참고 자료.....	52
기술 지원.....	57

소개

TruSight™ Oncology 500 프로토콜은 암 관련 유전자의 시퀀싱을 목적으로 Illumina® 시퀀싱 시스템과 인리치먼트(enrichment) 기반의 접근 방식을 통해 FFPE(formalin-fixed paraffin embedded, 포르말린 고정 파라핀 내장) 조직에서 추출한 DNA 및 RNA를 인리치된 라이브러리로 만드는 과정을 설명합니다. TruSight Oncology 500을 사용하여 DNA 또는 RNA로 각각 48개의 라이브러리를 준비하거나 DNA 및 RNA 라이브러리를 조합하여 준비할 수 있습니다.

해당 키트는 523개의 유전자에서 낮은 빈도로 존재하는 체세포 변이(somatic variation)를 높은 민감도와 특이도로 검출할 수 있도록 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 TruSight Oncology 500은 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.

권장 DNA/RNA 사용량

- TruSight Oncology 500 assay는 90~250 bp로 절편화된 gDNA를 사용해 라이브러리를 준비할 수 있도록 최적화되어 있습니다.
- TruSight Oncology 500 Kit로 assay 수행 시 최소 40 ng의 DNA/RNA를 사용하도록 합니다. 40 ng 미만을 사용할 경우 라이브러리 수율과 품질이 저하될 수 있습니다. 프로토콜 시작 전 사용된 핵산(nucleic acid)을 정량화(quantification)합니다. 충분한 핵산 물질을 얻기 위해 최소 2 mm³의 FFPE 조직에서 핵산을 분리합니다.
 - 이때 회수율이 높고, 샘플 소모량은 최소화하며, 샘플의 무결성을 보장해 주는 핵산 분리 방법을 사용하도록 합니다. QIAGEN사의 AllPrep DNA/RNA FFPE Kit는 높은 수율로 핵산을 분리합니다.
 - AccuClear™ (DNA) 또는 QuantiFluor® (RNA)와 같이 DNA/RNA 결합 염료를 사용하는 형광 정량(fluorometric quantification) 방법을 사용하도록 합니다.

샘플 품질 평가

TruSight Oncology 500 assay 사용 전 최적의 성능을 위해 DNA와 RNA 샘플의 품질을 평가합니다.

- DNA 샘플의 품질은 Illumina FFPE QC Kit로 평가할 수 있습니다.
- 델타 Cq 값이 5 이하인 DNA 샘플을 사용하도록 합니다. 델타 Cq 값이 5를 초과하는 샘플은 assay 성능을 저하할 수 있습니다.
- RNA 샘플의 품질은 Advanced Analytical Technologies사의 Fragment Analyzer™(Standard Sensitivity RNA Analysis Kit) 또는 Agilent Technologies사의 2100 Bioanalyzer(Agilent RNA 6000 Nano Kit)를 사용하여 평가할 수 있습니다.
- DV₂₀₀ 값이 20% 이상인 RNA 샘플을 사용합니다. DV₂₀₀ 값이 20% 미만인 샘플은 assay 성능을 저하할 수 있습니다.

[선택 사항] 참조 샘플

- Horizon Discovery사의 HD753(DNA) 및 Agilent사의 Universal Human Reference RNA와 같이 변이의 구성이 알려져 있는 참조 물질(reference material)을 사용합니다. Agilent사의 Universal Human Reference RNA는 원형(intact) RNA 샘플입니다. [13페이지의 RNA 변성 및 결합](#) 섹션에 기술되어 있는 원형 RNA 관련 절차를 완료한 후 샘플을 처리합니다.
- RNase/DNase가 없는 물을 No Template Control(NTC, 비템플릿 대조군)로 사용합니다.
- 참조 샘플 또는 NTC 처리 시 처리 가능한 테스트 샘플의 수는 줄어듭니다.

DNA 절단 권장 방법

해당 assay는 [18페이지의 gDNA 절편화](#) 섹션에 기술되어 있는 파라미터와 Covaris E220evolution™, LE220 또는 ME220 Focused-ultrasonicator를 함께 사용하도록 최적화되어 있습니다. 절편 크기의 분포는 샘플의 품질과 절편화에 사용된 초음파 분쇄기(sonicator)에 따라 다를 수 있습니다.

다음 가이드라인에 따라 절단(shearing)을 진행합니다.

- 절단에 사용하는 튜브 안에 과도한 거품이나 공기틈이 있으면 절단이 불완전할 수 있습니다.
 - 거품의 생성을 방지하기 위해 gDNA는 Covaris 튜브에 천천히 주입하도록 합니다.
 - 튜브 바닥에 샘플이 모일 수 있도록 절단 전 Covaris 튜브를 원심분리해 줍니다.
- Covaris LE220 ultrasonicator 사용 시 최적의 성능을 위해 사용하지 않은 Covaris 8 microTUBE Strip의 웰(well)에는 52 µl의 물을 넣습니다.

- [선택 사항] Agilent Bioanalyzer 2100과 Agilent DNA 1000 Kit를 사용하여 절단된 샘플의 절편 크기 분포를 평가합니다.

[선택 사항] 라이브러리 준비의 자동화

TruSight Oncology 500 Kit는 타사의 리퀴드 핸들링 로봇(liquid handling robot)과 함께 사용이 가능하도록 충분한 양의 시약을 포함하는 자동화에 적합한 옵션도 제공하고 있습니다. TruSight Oncology 500 Kit 주문 전 적합한 제품을 [43페이지의 부가 정보](#) 섹션에서 확인하시기 바랍니다. 라이브러리 준비의 자동화 방법은 리퀴드 핸들링 로봇 업체를 통해 알아보실 수 있습니다. 자세한 TruSight Oncology 500 라이브러리 준비 자동화 방법은 해당 리퀴드 핸들링 로봇 업체에 문의하시기 바랍니다.

추가 리소스

Illumina 웹사이트의 [TruSight Oncology 500 Support 페이지](#)에서 소프트웨어, 교육 자료, 제품 호환성 정보 및 다음과 같은 문서를 확인하실 수 있습니다. 항상 Support 페이지에서 최신 버전의 문서를 확인하시기 바랍니다.

리소스	설명
Custom Protocol Selector	사용자의 라이브러리 준비 방식, 런 파라미터(run parameter)와 분석 방법에 맞춤형 엔드 투 엔드 지침 생성 및 정밀도 개선 옵션 제공.
TruSight Oncology 500 Checklist (문서 번호: 1000000067619)	전문 사용자를 위한 단계별 체크리스트 제공.
TruSight Oncology 500 Consumables & Equipment List (문서 번호: 1000000067617)	대화식 별도 구매 소모품 및 장비 체크리스트 제공.
Illumina Adapter Sequences (문서 번호: 1000000002694)	Illumina Library Prep Kit의 어댑터 시퀀스 제공.

프로토콜

이 섹션에서는 TruSight Oncology 500 Kit로 DNA 및 RNA를 사용해 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리를 생성하는 단계별 지침을 제공합니다. 해당되는 단계의 후반부에 안전한 정지점(safe stopping point)이 명시되어 있습니다.

- 먼저 키트 구성을 살펴보고 필요한 소모품과 장비가 모두 준비되어 있는지 확인합니다.
- 이 프로토콜은 교차 오염을 줄이기 위해 Pre-Amp 작업과 Post-Amp 작업용 마그네틱 스탠드(magnetic stand)를 1개씩 따로 준비해 사용하도록 하고 있습니다.
- 명시된 파라미터를 사용하여 기술된 순서대로 프로토콜을 따르도록 합니다. 안전한 정지점이 따로 명시되어 있지 않다면 다음 단계를 바로 진행하도록 합니다.

이 섹션에서는 TruSight Oncology 500 Kit 프로토콜을 설명합니다.

- 제품의 호환성과 실험 파라미터를 확인하기 위해 샘플 준비 단계부터 분석 단계까지 시퀀싱 워크플로우를 모두 검토하시기 바랍니다.
- 시퀀싱 런(run)별 라이브러리 개수와 가능한 DNA/RNA 조합에 대한 가이드라인은 *NextSeq 500 and 550 Sequencing Systems Denature and Dilute Libraries Guide*(문서 번호: 15048776)를 참조하시기 바랍니다.
- 라이브러리 준비를 시작하기 전 샘플의 농도와 품질을 기록합니다. 해당 정보는 데이터 분석 단계에서 사용할 수 있도록 저장해 두도록 합니다.
- TruSight Oncology 500 Kit의 안정성을 평가한 결과 최대 8회 사용까지 성능이 유지되는 것으로 확인되었습니다.
- 자력 선별(magnetic separation) 단계에서 비드(bead)가 피펫 팁 안으로 흡인될 경우 마그네틱 스탠드에 고정되어 있는 플레이트의 동일한 웰에 다시 분주해 줍니다. 액체가 투명해질 때까지 약 2분 기다립니다.
- 비드 워시 수행 시 주의 사항
 - 플레이트에 적합한 마그네틱 스탠드를 사용합니다.
 - 웰의 측면에 있는 비드가 적셔지도록 액체는 비드 펠릿(pellet)에 직접 분주합니다.
 - 플레이트를 제거하라는 지침이 있을 때까지 플레이트는 마그네틱 스탠드에 그대로 둡니다.
 - 마그네틱 스탠드에 고정되어 있는 플레이트는 흔들지 않도록 합니다. 비드 펠릿을 건드리지 않도록 주의합니다.

팁과 기술

프로토콜 시작 전 아래의 팁과 기술을 읽어보시기 바랍니다.

교차 오염 방지

- Pre-Amp에서 Post-Amp 작업 구역으로 이동 시 단방향 워크플로우를 적용합니다.
- 증폭 산물 또는 프로브의 이월(carryover)을 방지하기 위해 Post-Amp 구역에서 작업을 시작하면 다시 Pre-Amp 구역으로 돌아오지 않도록 합니다.
- 절차 시작 전과 완료 후에는 RNase/DNase를 억제하는 세제로 작업대의 표면과 장비를 꼼꼼히 닦아줍니다.
- 샘플을 웰에 추가해 넣거나 옮길 때마다 팁을 교체해 줍니다.
- 한 번에 1개의 인덱스 프라이머(index primer)만 개봉하고 취급하도록 합니다. 인덱스 튜브는 사용 후 즉시 캡을 다시 닫아 줍니다. 키트에는 여분의 캡이 들어 있습니다.
- 인덱싱 프라이머를 웰에 추가할 때마다 팁을 교체해 줍니다.
- 사용하지 않은 인덱싱 프라이머는 작업 구역에서 치워 둡니다.
- 끼고 있던 장갑이 인덱싱 프라이머, 샘플 또는 프로브와 접촉한 경우 장갑을 교체합니다.

플레이트의 밀봉

- 아래에 명시된 프로토콜 단계 전에는 항상 플레이트를 적절한 접착 씬(adhesive seal)로 밀봉하도록 합니다.
 - 진탕(shaking) 단계
 - 볼텍싱(vortexing) 단계
 - 원심분리(centrifugation) 단계
 - 열 순환(thermal cycling) 단계
- 접착 씬로 플레이트를 덮은 후 고무 롤러로 밀어 밀봉합니다.
- 플레이트마다 새로운 씬을 사용하도록 합니다.
- Microseal 'B' Adhesive Seal은 -40~110°C에서 효과적이며 스킵형(skirted) 또는 반스킵형(semi-skirted) PCR 플레이트에 적합합니다. 진탕, 원심분리, PCR 증폭, 장기 보관 시에는 Microseal 'B' Adhesive Seal을 사용합니다.
- 밀봉된 플레이트 내부에 물방울이 맺히기 시작하면 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

플레이트 간 이동

- 플레이트 간 볼륨 이동 시 명시된 볼륨을 한 플레이트의 각 웰에서 다른 플레이트의 상응하는 웰로 옮겨 줍니다.

원심분리

- 플레이트를 원심분리하라는 지침이 있을 경우 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

시약의 취급

- 시약의 증발을 억제하고 오염을 방지하기 위해 모든 시약 튜브는 사용 직후 캡을 단단히 닫아 줍니다.

비드의 취급

- 피펫으로 비드 혼합 시 주의 사항
 - 혼합하는 볼륨에 적절한 크기의 피펫과 팁을 사용합니다(예: 20~200 μ l 혼합 시 200 μ l 피펫 사용).
 - 볼륨은 샘플 볼륨의 50~75% 정도로 설정합니다.
 - 피펫은 천천히 부드럽게 다루도록 합니다.
 - 과격한 피펫팅은 피하고 튜브 현상이나 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, SMB 펠릿을 사용한 경우 용액은 짙은 갈색을 띠고 농도가 균일해야 합니다.
- 비드는 사용 전 미리 실온에 꺼내 둡니다.

DNA 라이브러리 준비 워크플로우

다음은 TruSight Oncology 500 Kit를 사용하는 권장 DNA 라이브러리 준비 워크플로우를 나타낸 다이어그램입니다. 단계 사이에 안전한 정지점이 표시되어 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 8개의 DNA 샘플을 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다. 여기에는 Covaris ultrasonicator의 가스 제거(degassing) 시간이 포함됩니다.

RNA 라이브러리와 DNA 라이브러리를 동시에 준비할 수도 있습니다. Illumina는 다음과 같은 일정으로 TruSight Oncology 500 Kit 워크플로우를 통해 assay를 수행하는 것을 권장합니다.

그림 1 TruSight Oncology 500 Kit DNA 라이브러리 준비 워크플로우(파트 1)



DNA 인리치먼트 워크플로우

다음은 TruSight Oncology 500 Kit를 사용하는 권장 DNA 인리치먼트 워크플로우를 나타낸 다이어그램입니다. 단계 사이에 안전한 정지점이 표시되어 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 8개의 DNA 샘플을 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다.

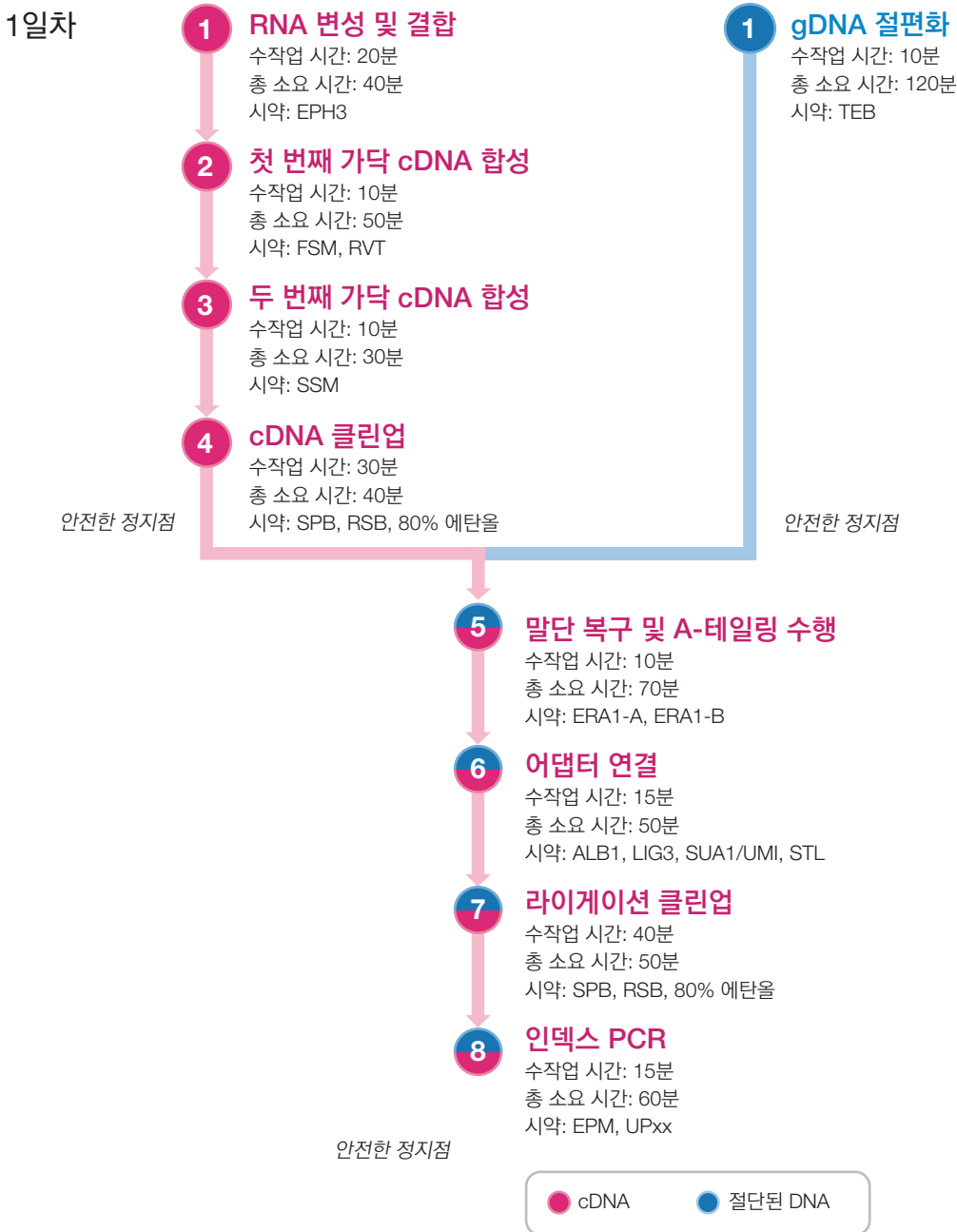
그림 2 TruSight Oncology 500 Kit DNA 인리치먼트 워크플로우(파트 2)



DNA & RNA 라이브러리 준비 워크플로우

다음은 TruSight Oncology 500 Kit를 사용하는 권장 DNA 및 RNA 라이브러리 준비 워크플로우를 나타낸 다이어그램입니다. RNA 라이브러리와 DNA 라이브러리를 동시에 준비할 수 있습니다. 단계 사이에 안전한 정지점이 표시되어 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 8개의 DNA 샘플과 8개의 RNA 샘플을 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다. 여기에는 Covaris ultrasonicator의 가스 제거(degassing) 시간이 포함됩니다.

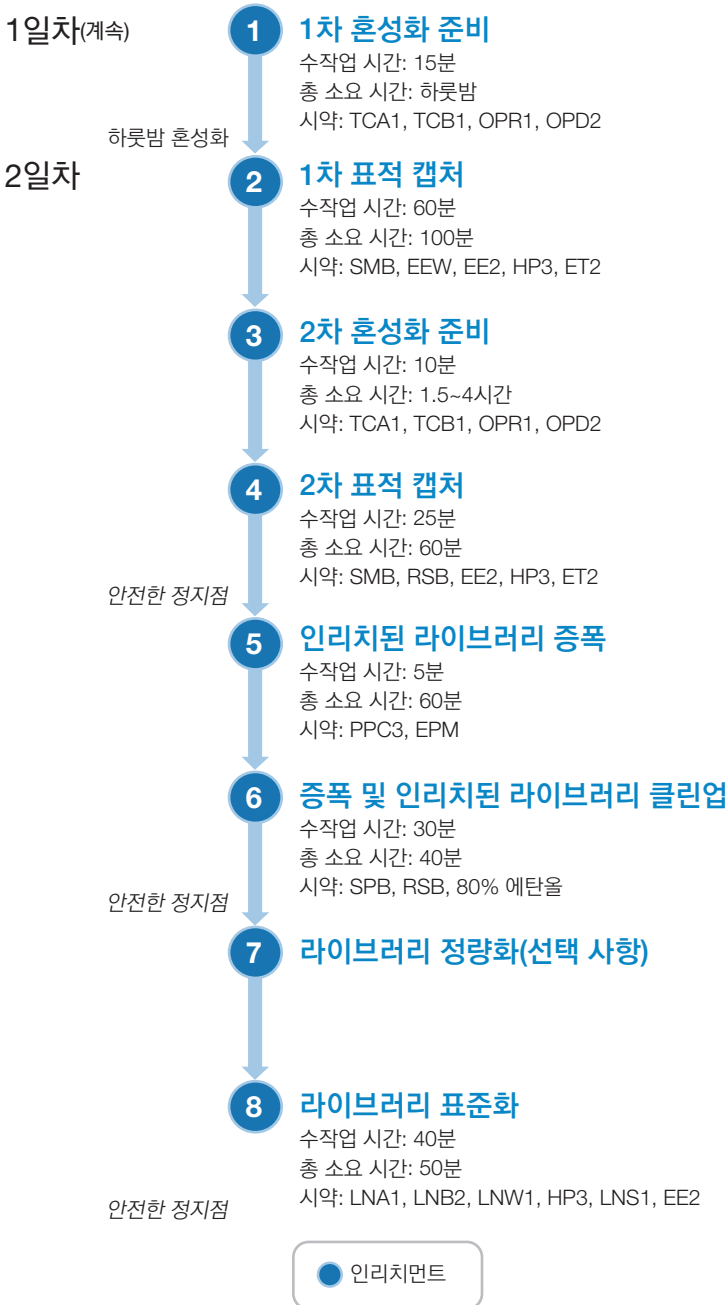
그림 3 TruSight Oncology 500 Kit DNA & RNA 라이브러리 준비 워크플로우(파트 1)



DNA & RNA 인리치먼트 워크플로우

다음은 TruSight Oncology 500 Kit를 사용하는 권장 DNA 및 RNA 인리치먼트 워크플로우를 나타낸 다이어그램입니다. 단계 사이에 안전한 정지점이 표시되어 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 8개의 DNA 샘플과 8개의 RNA 샘플을 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다.

그림 4 TruSight Oncology 500 Kit DNA & RNA 인리치먼트 워크플로우(파트 2)



RNA 라이브러리 준비 워크플로우

다음은 TruSight Oncology 500 Kit를 사용하는 권장 RNA 라이브러리 준비 워크플로우를 나타낸 다이어그램입니다. 단계 사이에 안전한 정지점이 표시되어 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 8개의 RNA 샘플을 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다.

그림 5 TruSight Oncology 500 Kit RNA 라이브러리 준비 워크플로우(파트 1)

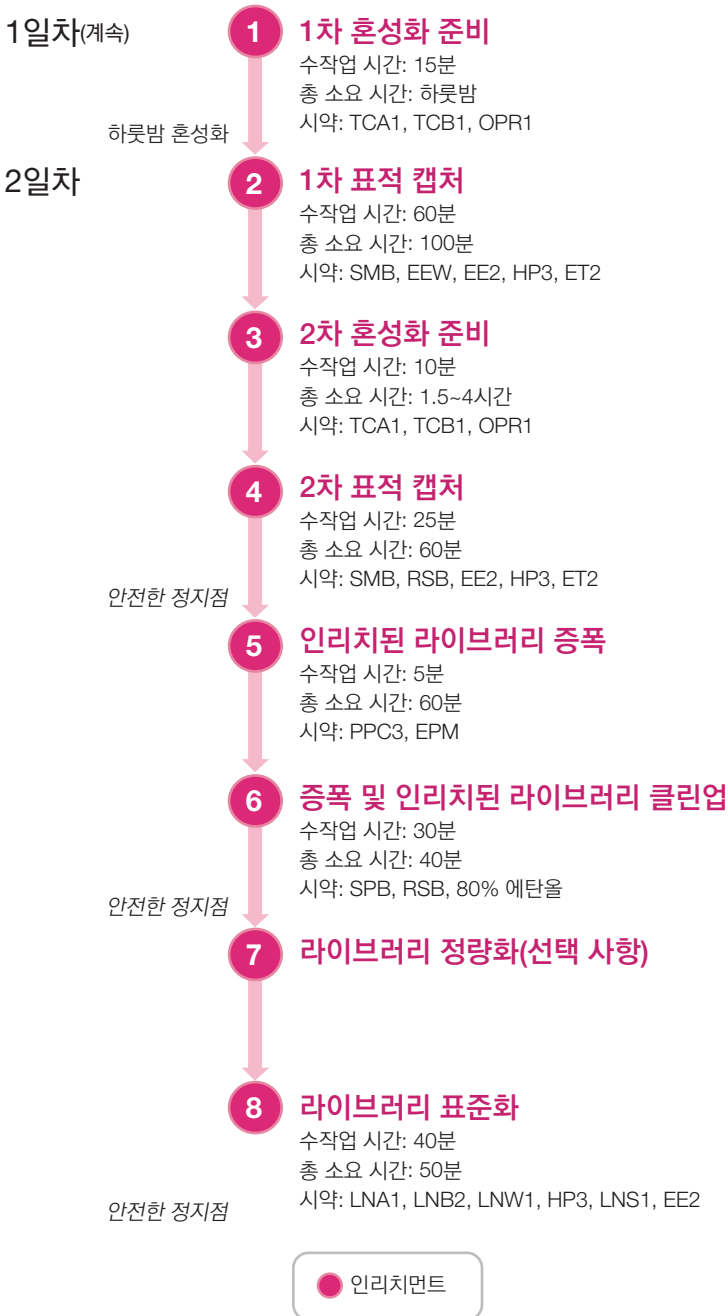
1일차



RNA 인리치먼트 워크플로우

다음은 TruSight Oncology 500 Kit를 사용하는 권장 RNA 인리치먼트 워크플로우를 나타낸 다이어그램입니다. 단계 사이에 안전한 정지점이 표시되어 있습니다. 수작업 시간 및 총 소요 시간은 8개의 RNA 샘플을 기준으로 계산한 대략적인 수치입니다.

그림 6 TruSight Oncology 500 Kit RNA 인리치먼트 워크플로우(파트 2)



RNA 변성 및 결합

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

정제된 DNA만을 사용하는 경우 [18페이지의 gDNA 절편화](#) 단계로 이동합니다.

소모품

- EPH3(Elute, Prime, Fragment High Mix 3, 빨간색 캡)
- FSM(First Strand Synthesis Mix, 빨간색 캡)
- RVT(Reverse Transcriptase, 빨간색 캡)
- 뉴클레아제가 없는(nuclease-free) 물
- 96-well PCR Plate
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

준비

! 다음 절차는 RNase 및 DNase가 없는 환경에서 수행해야 합니다. RNase를 억제하는 세제로 작업 구역에서 오염 물질을 완전히 제거하시기 바랍니다. RNA 전용 장비를 사용하도록 합니다.

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
EPH3	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
FSM	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
RVT	-25~-15°C	얼음 위에 보관. 짧게 원심분리.

2. 얼음 위에 RNA 샘플을 올려 두고 해동합니다.
3. 샘플을 정성화 및 정량화합니다. 자세한 내용은 [1페이지의 권장 DNA/RNA 사용량](#) 섹션을 참조하시기 바랍니다.
4. 최소 40 ng의 RNA 샘플을 RNase/DNase가 없는(RNase/DNase-free) 물에 희석하여 최종적으로 8.5 µl를 만듭니다.
5. FFPE 또는 절편화된 RNA의 경우 다음과 같은 LQ-RNA 프로그램을 열 순환기(thermal cycler)에 저장합니다.
 - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정.
 - Reaction Volume을 17 µl로 설정.
 - 65°C에서 5분.

- 4°C에서 온도 유지.
6. 세포주(cell line) 또는 원형 RNA의 경우 다음과 같은 HQ-RNA 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
 - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정.
 - Reaction Volume을 17 µl로 설정.
 - 94°C에서 8분.
 - 4°C에서 온도 유지.
 7. 새 96-well PCR Plate에 CF(의미: cDNA Fragments)라는 라벨을 부착합니다.

절차

1. FSM+RVT Master Mix를 준비하기 위해 미세원심분리 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합합니다.

Master Mix 구성 성분	샘플 3개(µl)	샘플 8개(µl)	샘플 16개(µl)	샘플 24개(µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

과량의 시약이 포함되어 있습니다.

2. 피펫팅하여 혼합합니다.
3. 14페이지의 첫 번째 가닥 cDNA 합성 단계를 시작하기 전까지 FSM+RVT Master Mix를 얼음 위에 둡니다.
4. 8.5 µl의 정제된 RNA 샘플을 각각 "CF" PCR Plate의 상응하는 웰에 넣습니다.
5. 각 웰에 8.5 µl의 EPH3를 넣습니다.
6. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1200 rpm에서 1분간 진탕합니다.
7. 플레이트를 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
8. 플레이트를 미리 프로그래밍된 열 순환기에 놓고 LQ-RNA 또는 HQ-RNA 프로그램을 실행합니다.

첫 번째 가닥 cDNA 합성

이 과정에서는 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 뚜껑이 가열된 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 온도 유지.

절차

1. 열 순환기에서 "CF" PCR Plate를 꺼냅니다.
2. 피펫팅하여 FSM+RVT Master Mix를 혼합합니다.
3. 각 웰에 8 µl의 FSM+RVT Master Mix를 넣습니다.
4. 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
5. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1200 rpm에서 1분간 진탕합니다.
6. 플레이트를 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
7. 플레이트를 미리 프로그래밍된 열 순환기에 놓고 1stSS 프로그램을 실행합니다.
8. 동시에 DNA 라이브러리도 준비하는 경우 1stSS 프로그램이 실행되는 동안 gDNA 절편화 작업을 시작할 수 있습니다. 자세한 내용은 [18페이지의 gDNA 절편화](#) 섹션을 참조하시기 바랍니다.

두 번째 가닥 cDNA 합성

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

소모품

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

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
SSM	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 10회 앞뒤로 뒤집어 혼합. 짧게 원심분리.

2. 다음과 같은 2ndSS 프로그램을 뚜껑이 가열된 열 순환기에 저장합니다.
뚜껑 온도를 30°C로 설정할 수 없다면 Preheated Lid Heat 옵션을 비활성화합니다.
 - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 30°C로 설정.

- Reaction Volume을 50 µl로 설정.
- 16°C에서 25분.
- 4°C에서 온도 유지.

절차

1. 열 순환기에서 "CF" PCR Plate를 꺼냅니다.
2. 각 웰에 25 µl의 SSM을 넣습니다.
3. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1200 rpm에서 1분간 진탕합니다.
4. 플레이트를 미리 프로그래밍된 열 순환기에 놓고 2ndSS 프로그램을 실행합니다.

cDNA 클린업

이 과정에서는 SPB를 사용하여 원치 않는 반응물에서 cDNA를 정제합니다.

소모품

- SPB(Sample Purification Beads)
- 96-well MIDI Plate(2개). 18페이지의 [gDNA 절편화](#) 단계 전 작업을 멈출 경우 1개의 MIDI Plate만 필요.
- [보관 시 필요] 96-well PCR Plate
- 새로 준비한 80% 에탄올(EtOH)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

시약 정보

- 용액의 점도를 고려해 SPB를 천천히 흡인하고 분주합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
RSB	2~8°C 또는 -25~-15°C	실온에 도달하도록 방치. -25~-15°C에서 보관한 경우 실온에서 해동한 후 사용 전 볼텍싱.
SPB	2~8°C	최소 30분간 실온에 도달하도록 방치.

2. 새 96-well MIDI Plate에 BIND1이라는 라벨을 부착합니다.
3. 다음 중 하나의 플레이트 옵션을 선택합니다.
 - cDNA 클린업 후 곧바로 라이브러리를 준비하려면 96-well MIDI Plate에 PCF(의미: Purified cDNA Fragments)라는 라벨을 부착합니다.
 - cDNA를 클린업 후 플레이트를 보관하려면 새 96-well PCR Plate에 PCF라는 라벨을 부착합니다.
4. 80% 에탄올을 새로 준비합니다.

절차

결합

1. 열 순환기에서 "CF" PCR Plate를 꺼냅니다.
2. 비드를 재현탁하기 위해 SPB를 1분간 볼텍싱합니다.
3. "BIND1" MIDI Plate의 각 웰에 90 μ l의 SPB를 넣습니다.
4. "CF" PCR Plate의 각 웰에서 50 μ l의 샘플을 각각 "BIND1" MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
5. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
6. 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.

워시

1. "BIND1" MIDI Plate를 마그네틱 스탠드에 5분간 둡니다.
2. 각 웰에서 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
3. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
 - a. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 둔 상태에서 각 웰에 새로 준비한 80% 에탄올을 200 μ l씩 넣어 줍니다.
 - b. 30초간 기다립니다.
 - c. 각 웰에서 상층액을 모두 분리한 후 폐기합니다.
4. **2차** 비드 워시를 수행합니다.
5. 미세한 피펫 팁과 20 μ l 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거해 줍니다.

용출

1. 마그네틱 스탠드에서 "BIND1" MIDI Plate를 내립니다.
2. 각 웰에 22 μ l의 RSB를 넣습니다.
3. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
4. 실온에서 2분간 배양합니다.
5. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.

6. "BIND1" MIDI Plate의 각 웰에서 20 µl의 용출액을 각각 PCF Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
7. PCF Plate의 각 웰에 30 µl의 RSB를 넣은 후 최소 10회 피펫팅하여 혼합해 줍니다.
8. 샘플 유형에 따라 다음 중 하나의 옵션을 선택합니다.
 - DNA 및 RNA 샘플 — 18페이지의 *gDNA 절편화* 단계로 이동하거나 안전한 정지점에 멈추어 지침을 따릅니다. 정제된 cDNA 절편 및 절단된 DNA 샘플은 동일한 플레이트에 보관 가능합니다. 웰에 라벨을 부착해 둡니다. 자세한 내용은 18페이지의 *gDNA 절편화* 단계의 준비 섹션을 참조하시기 바랍니다.
 - RNA 샘플 — RNA 샘플로만 작업 중이고 안전한 정지점에서 멈추지 않을 경우 20페이지의 *말단 복구 및 A-테일링 수행* 단계로 이동합니다.

안전한 정지점

여기에서 작업을 멈출 경우 "PCF" PCR Plate를 Microseal 'B'로 밀봉한 후 280 x g로 짧게 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 7일까지 보관 가능합니다.

gDNA 절편화

이 과정에서는 Covaris E220evolution, LE220 또는 ME220 Focused-ultrasonicator를 사용하여 gDNA를 90~250 bp의 크기로 절단합니다. Covaris로 gDNA를 절단하면 3' 및 5' 돌출부(overhang)를 가진 dsDNA 절편이 생성됩니다.

소모품

- TEB(TE Buffer)
- Covaris 8 microTUBE Strip(포일 씰 포함)
- 96-well MIDI Plate
- [선택 사항] 96-well PCR Plate

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
TEB	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 앞뒤로 뒤집어 혼합.

2. 제조사의 가이드라인에 따라 Covaris의 전원을 켜 후 설정합니다. 기기의 가스 제거 작업은 약 1시간이 소요됩니다.
3. 다음 중 하나의 플레이트 옵션을 선택합니다.
 - gDNA 절단 후 즉시 라이브러리를 준비하려면 새 96-well MIDI Plate에 LP(의미: Library Preparation)라는 라벨을 부착합니다.

- 이 단계 후 절단된 gDNA를 보관하려면 96-well PCR Plate를 사용합니다.
 - gDNA와 cDNA 샘플을 동시에 처리하려면 16페이지의 **cDNA 클린업** 섹션에 명시되어 있는 PCF Plate를 계속 사용합니다.
4. 실온에서 gDNA 샘플을 해동합니다.
 5. 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.
 6. 샘플의 정성화 및 정량화 방법은 1페이지의 **권장 DNA/RNA 사용량** 섹션을 참조하시기 바랍니다.
 7. 각 정제된 DNA 샘플을 최소 40 ng씩 TEB에 희석하여 최종적으로 12 µl를 만듭니다.

절차

1. 정제 후 희석된 각 gDNA 샘플을 12 µl씩 Covaris 8 microTUBE Strip에 넣습니다.
2. 각 샘플에 40 µl의 TEB를 넣습니다.
3. 피펫팅하여 혼합합니다.
4. 사용하지 않은 모든 Covaris 8 microTUBE Strip의 웰에 52 µl의 물을 넣습니다.
5. Covaris 8 microTUBE Strip을 포일 씰로 밀봉합니다.
6. 짧게 원심분리합니다.
7. Covaris E220evolution, LE220 또는 ME220 모델을 사용 중인 경우 다음과 같이 기기를 설정하여 gDNA를 절편화합니다.

설정 항목	E220evolution	LE220	ME220
Peak Incident Power	175 watts	450 watts	50 watts
Duty Factor	10%	30%	30%
Cycles per Burst	200	200	1000
Treatment Time	280 seconds	250 seconds	10 seconds
Temperature	7°C	7°C	12°C
Intensifier	yes	N/A	N/A
Other	Intensifier	N/A	Wave guide
Pulse repeats	N/A	N/A	20
Average power	N/A	N/A	15 watts

8. 액적(droplet) 수집을 위해 튜브 스트립을 짧게 원심분리합니다.
9. 각 절단된 gDNA 샘플을 50 µl씩 "LP" Plate(cDNA를 동시에 처리하는 경우 "PCF" Plate)의 상응하는 웰로 옮겨줍니다.
 - 절단된 gDNA 샘플을 "LP" Plate로 옮길 때는 미세한 피펫 팁과 20 µl 피펫을 사용합니다(20 µl 1회 + 추가로 20 µl 1회 + 이후 나머지 10 µl 피펫팅).

안전한 정지점

여기에서 작업을 멈출 경우 "LP" Plate 또는 "PCF" Plate를 Microseal 'B'로 밀봉한 후 280 x g로 짧게 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 7일까지 보관 가능합니다.

말단 복구 및 A-테일링 수행

이 과정에서는 절편화 단계에서 생성된 5' 및 3' 돌출부를 End Repair Mix를 사용하여 둔단(blunt end)으로 만들어 줍니다.

믹스의 3'-5' 핵산 말단 가수분해효소 활성(3' to 5' exonuclease activity)을 통해 3' 돌출부가 제거되며, 3'-5' 중합효소 활성(5' to 3' polymerase activity)을 통해 5' 돌출부가 채워집니다. 이 반응 과정에서는 3' 말단에 A-테일을 추가하여 어댑터 연결 반응 과정에서 3' 말단끼리 서로 연결되는 것을 방지합니다.

소모품

- ERA1-A(End Repair A-tailing Enzyme Mix 1)
- ERA1-B(End Repair A-tailing Buffer 1)
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)
- [선택 사항] 보관 시 96-well MIDI Plate
- Microseal 'B' Adhesive Seal

! PCR Plate에 gDNA나 cDNA 샘플을 보관한 경우 [20페이지의 준비](#) 섹션에서 단계에 명시되어 있는 플레이트 변경 지침을 따르도록 합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
ERA1-A	-25~-15°C	얼음 위에 보관. 짧게 원심분리 후 피펫팅하여 혼합.
ERA1-B	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 짧게 원심분리 후 피펫팅하여 혼합. 침전물이 보이면 양 손으로 튜브를 감싸 온도를 높인 후 결정이 용해될 때까지 피펫팅하여 혼합.

2. 절단된 gDNA와 모든 cDNA는 실온에 도달할 때까지 방치합니다.
3. 96-well PCR Plate에 보관했다면 피펫팅하여 혼합한 후 50 µl의 절단된 gDNA 샘플과 50 µl의 cDNA를 모두 새 96-well MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
4. "PCF" 또는 "LP" PCR Plate를 -25~-15°C에 보관했다면 다음을 수행합니다.

- a. 플레이트를 실온에서 해동합니다.
 - b. 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
 - c. 피펫팅하여 혼합합니다.
 - d. 절단된 gDNA 및/또는 cDNA 전량을 96-well MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
5. MIDI Plate에 LP2(의미: Library Preparation 2)라는 라벨을 부착합니다.
 6. 다음과 같이 MIDI Heat Block Insert로 Hybex Incubator 2대를 예열합니다.
 - 첫 번째 인큐베이터를 30°C로 예열합니다.
 - 두 번째 인큐베이터를 72°C로 예열합니다.
 7. 얼음통을 준비합니다.

절차

1. ERA1 Master Mix를 준비하기 위해 미세원심분리 튜브를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합합니다.

Master Mix 구성 성분	샘플 3개(µl)	샘플 8개(µl)	샘플 16개(µl)	샘플 24개(µl)
ERA1-B	26	69	138	207
ERA1-A	10	27	54	81

과량의 시약이 포함되어 있습니다.

2. 10회 피펫팅하여 혼합한 후 ERA1 Master Mix를 얼음 위에 올려 둡니다.
3. "LP2" MIDI Plate의 각 샘플에 10 µl의 ERA1 Master Mix를 넣어 줍니다.
4. 남은 Master Mix는 모두 폐기합니다.
5. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
6. 30°C에서 30분 동안 배양합니다.
7. 곧바로 플레이트를 72°C로 설정된 인큐베이터로 옮기고 20분 동안 배양합니다.
8. 플레이트를 얼음에 5분간 올려 둡니다.

어댑터 연결

이 과정에서는 어댑터를 cDNA 및/또는 gDNA 절편의 말단에 연결합니다. SUA1 어댑터는 cDNA 절편에만 연결됩니다. 고유한 분자 인덱스(unique molecular index)를 가진 UMI1 어댑터는 gDNA 절편에만 연결됩니다.

소모품

- ALB1(Adapter Ligation Buffer 1)

- LIG3(DNA Ligase 3)
- STL(Stop Ligation Buffer)
- SUA1(Short Universal Adapters 1)
- UMI1(UMI Adapters v1)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

시약 정보

- ALB1은 점도가 매우 높습니다. 거품이 생기지 않도록 천천히 피펫팅합니다.
- **DNA 라이브러리에 UMI1**을 사용하고 **RNA 라이브러리에 SUA1**을 사용해야 합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

품목	보관 온도	지침
ALB1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 10초 이상 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
LIG3	-25~-15°C	얼음 위에 보관. 짧게 원심분리 후 피펫팅하여 혼합.
STL	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
SUA1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 10초 이상 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
UMI1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 10초 이상 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.

절차

1. 각 웰에 60 µl의 ALB1을 넣습니다.
2. 각 웰에 5 µl의 LIG3를 넣습니다.
3. 각 웰에 적절한 어댑터를 넣습니다.
 - DNA 라이브러리에 10 µl의 UMI1을 넣습니다.
 - RNA 라이브러리에 10 µl의 SUA1을 넣습니다.
4. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
5. 실온에서 30분간 배양합니다.
6. 각 웰에 5 µl의 STL을 넣습니다.
7. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.

라이게이션(Ligation) 클린업

이 과정에서는 SPB로 gDNA 및 cDNA 절편을 정제하고, 연결되지 않은 어댑터와 같은 원치 않는 산물을 제거합니다.

소모품

- RSB(Resuspension Buffer)
- SPB(Sample Purification Beads)
- 새로 준비한 80% 에탄올(EtOH)
- Microseal 'B' Adhesive Seal
- 96-well PCR Plate

시약 정보

- 현탁액의 점도를 고려해 SPB를 천천히 흡인하고 분주하도록 합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
RSB	2~8°C -25~-15°C	실온에 도달하도록 방치. -25~-15°C에서 보관한 경우 실온에 도달할 때까지 해동한 후 사용 전 볼텍싱.
SPB	2~8°C	최소 30분간 실온에 도달하도록 방치. 사용 전 1분간 볼텍싱.

2. 새 96-well PCR Plate에 LS(의미: Library Samples)라는 라벨을 부착합니다.
3. 80% 에탄올을 새로 준비합니다.

절차

결합

1. SPB를 1분간 볼텍싱하여 비드를 재현탁합니다.
2. "LP2" MIDI Plate의 각 웰에 112 µl의 SPB를 넣습니다.
3. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
4. 실온에서 5분간 배양합니다.

워시

1. "LP2" MIDI Plate를 마그네틱 스탠드에 10분간 둡니다.
2. 각 웰에서 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.
3. 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
 - a. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 둔 상태에서 각 웰에 새로 준비한 80% 에탄올을 200 μ l씩 넣어 줍니다.
 - b. 30초간 기다립니다.
 - c. 각 웰에서 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.
4. 2차 비드 워시를 수행합니다.
5. 미세한 피펫 팁과 20 μ l 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거해 줍니다.

용출

1. 마그네틱 스탠드에서 플레이트를 내립니다.
2. 각 웰에 27.5 μ l의 RSB를 넣습니다.
3. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
4. 실온에서 2분간 배양합니다.
5. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
6. "LP2" MIDI Plate의 각 웰에서 25 μ l의 용출액을 각각 "LS" PCR Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.

인덱스 PCR

이 단계에서는 샘플의 멀티플렉싱(multiplexing)을 위해 인덱스 시퀀스를 추가하는 프라이머를 사용하여 라이브러리 절편을 증폭합니다. 증폭 산물은 인덱스 시퀀스와 클러스터 생성에 필요한 어댑터로 플랭킹(flanking)되어 있는 완성된 절편 라이브러리를 포함합니다.

소모품

- EPM(Enhanced PCR Mix)
- UPxx(Unique Index Primer)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

! 해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

준비

- 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
EPM	-25~-15°C	얼음 위에서 해동. 불텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
UPxx	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 불텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.

- 라이브러리당 1개의 UPxx 인덱스 프라이머를 할당합니다(xx: 인덱스 프라이머 번호).
1개의 플로우 셀(flow cell)로 복수의 라이브러리를 시퀀싱할 경우 샘플 라이브러리마다 다른 인덱스 프라이머를 할당합니다. 샘플 레이아웃 방향(layout orientation)과 각각에 할당된 인덱스를 기록해 둡니다.

i | 시퀀싱 런별 라이브러리 개수와 가능한 DNA/RNA 조합에 대한 가이드라인은 *NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide*(문서 번호: 15048776)를 참조하시기 바랍니다.

- DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 함께 시퀀싱할 경우 두 가지 유형의 라이브러리에 서로 다른 인덱스 프라이머가 들어 있는지 확인합니다. 예를 들어, DNA 라이브러리에 UP01 인덱스 프라이머가 들어 있다면 RNA 라이브러리에는 다른 UPxx를 선택하도록 합니다.
- 시퀀싱 런의 플렉스가 낮은(low-plex) 경우 인덱스 다양성 요건을 충족하기 위해 다음 중 하나의 조합을 포함하는 라이브러리를 3개 이상 사용합니다.

- [UP01, UP02, UP03]
- [UP04, UP05, UP06]
- [UP07, UP08, UP09]
- [UP10, UP11, UP12]

예를 들어, 첫 번째 라이브러리에는 UP01, 두 번째 라이브러리에는 UP02, 세 번째 라이브러리에는 UP03을 할당합니다.

- 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 15회의 사이클 수행.
 - 98°C에서 10초.
 - 60°C에서 30초.
 - 72°C에서 30초.
- 72°C에서 5분.
- 10°C에서 온도 유지.

절차

1. "LS" PCR Plate의 각 웰에 5 µl의 인덱싱 프라이머(UPxx)를 넣습니다.
2. 새 튜브 캡으로 인덱싱 프라이머가 남아 있는 튜브의 입구를 막습니다.
3. 각 웰에 20 µl의 EPM을 넣습니다.
4. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1200 rpm에서 1분간 진탕합니다.
5. 280 × g로 짧게 원심분리합니다.
6. 증폭 산물의 이월을 방지하기 위해 Post-Amp 구역으로 이동합니다.
7. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 놓고 I-PCR 프로그램을 실행합니다.
8. 플레이트에 ALS(의미: Amplified Library Samples)라는 라벨을 새로 부착합니다.
9. 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

여기에서 작업을 멈출 경우 "ALS" Plate를 Microseal 'B'로 밀봉한 후 280 x g로 짧게 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 30일까지 보관 가능합니다.

1차 혼성화 준비

이 과정에서는 55개의 유전자에 특이적인 올리고 풀(oligo pool)이 RNA 라이브러리에 혼성화(hybridization)되며, 523개의 유전자에 특이적인 올리고 풀은 [24페이지의 인덱싱 PCR](#) 단계에서 준비한 DNA 라이브러리에 혼성화됩니다. 표적 영역의 인리치먼트를 위해서는 두 번의 혼성화 단계를 거쳐야 합니다. 1차 혼성화 단계에서는 하룻밤(8~24시간) 동안 올리고를 DNA 및/또는 RNA 라이브러리에 혼성화합니다.

소모품

- OPD2(Oncology Probes DNA 2, 노란색 캡)
- OPR1(Oncology Probes RNA 1, 빨간색 캡)
- TCA1(Target Capture Additives 1)
- TCB1(Target Capture Buffer 1)
- 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. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- OPD2는 DNA 라이브러리에만 사용합니다.
- OPR1은 RNA 라이브러리에만 사용합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
[DNA] OPD2	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
[RNA] OPR1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
TCA1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
TCB1	2~8°C	실온에 도달할 때까지 해동. 짧게 원심분리 후 피펫팅하여 혼합. 침전물 유무 확인. 침전물이 보이면 양 손으로 튜브를 감싸 온도를 높인 후 결정이 용해될 때까지 피펫팅하여 혼합.

2. "ALS" PCR Plate를 -25~-15°C에 보관했다면 다음 절차에 따라 준비합니다.
 - a. 플레이트를 실온에서 해동합니다.
 - b. 250 × g로 1분간 원심분리합니다.
 - c. 피펫팅하여 혼합합니다.
3. 새 96-well PCR Plate에 HYB1(의미: Hybridization 1)이라는 라벨을 부착합니다.
4. 다음과 같은 HYB1 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.
 - Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정.
 - Reaction Volume을 50 µl로 설정.
 - 95°C에서 10분.
 - 85°C에서 2.5분.
 - 75°C에서 2.5분.
 - 65°C에서 2.5분.
 - 57°C에서 온도 유지.

절차

1. "ALS" PCR Plate에서 각 라이브러리를 20 µl씩 "HYB1" PCR Plate로 옮깁니다.
2. 각 웰에 15 µl의 TCB1을 넣습니다.

3. 각 웰에 10 µl의 TCA1을 넣습니다.
4. 적절한 프로브를 넣습니다.
 - DNA 라이브러리에는 5 µl의 OPD2(노란색 캡)을 넣습니다.
 - RNA 라이브러리에는 5 µl의 OPR1(빨간색 캡)을 넣습니다.
5. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1200 rpm에서 2분간 진탕합니다.
6. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 넣고 HYB1 프로그램을 실행합니다. 57°C에서 8~24시간 동안 혼성화합니다.

1차 표적 캡처

이 단계에서는 SMB를 사용하여 관심 표적 라이브러리 DNA 영역에 혼성화된 프로브를 캡처합니다. EEW를 사용해 열을 가한 비드 워시를 3회 수행하여 비특이적 DNA 결합(nonspecific DNA binding)을 제거합니다. 이후 비드에서 인리치된 라이브러리를 용출하면 2차 혼성화 준비가 완료됩니다.

소모품

- EE2(Enrichment Elution 2)
- EEW(Enhanced Enrichment Wash)
- ET2(Elute Target Buffer 2)
- HP3(2 N NaOH)
- SMB(Streptavidin Magnetic Beads)
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)
- 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. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- 이번 절차에는 SPB 대신 SMB를 사용해야 합니다.

준비

- 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
EE2	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
EEW	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 1분간 볼텍싱하여 재현탁.
ET2	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
HP3	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
SMB	2~8°C	30분간 실온에 도달하도록 방치. 비드 펠릿이 있는 경우 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어준 후 볼텍싱하여 재현탁.

- MIDI Heat Block Insert를 사용해 Hybex Incubator 1대를 57°C로 예열합니다.
- 새 96-well MIDI Plate에 CAP1(의미: Capture 1)이라는 라벨을 부착합니다.
- 새 96-well PCR Plate에 ELU1(의미: Elution 1)이라는 라벨을 부착합니다.

절차

결합

- 열 순환기에서 "HYB1" PCR Plate를 꺼냅니다.
- 비드를 재현탁하기 위해 SMB를 1분간 볼텍싱합니다.
- "CAP1" MIDI Plate의 각 웰에 150 µl의 SMB를 넣습니다.
- "HYB1" PCR Plate의 각 웰에서 50 µl의 라이브러리를 각각 "CAP1" MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
- Microseal 'B'로 "CAP1" MIDI Plate를 밀봉하고 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
- Hybex Incubator를 사용해 57°C에서 25분간 배양합니다.
- 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
- 플레이트를 마그네틱 스탠드에 올려둔 상태에서 피펫으로 각 웰의 상층액을 제거한 후 폐기합니다.

워시

- 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
 - 마그네틱 스탠드에서 "CAP1" MIDI Plate를 내립니다.

- b. 각 웰에 200 μ l의 EEW를 넣습니다.
 - c. 10회 피펫팅하여 혼합합니다.
 - d. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 4분간 진탕합니다.
비드 펠릿이 아직 남아 있다면 싯을 제거한 후 피펫팅하여 혼합합니다. 모든 비드가 재현탁되었는지 확인한 후 플레이트를 새 Microseal 'B'로 밀봉합니다.
 - e. Hybex Incubator를 사용해 57°C에서 5분간 배양합니다.
 - f. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
 - g. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 올려둔 상태에서 각 웰의 상층액을 제거한 후 폐기합니다.
2. **2차** 비드 워시를 수행합니다.
 3. **3차** 비드 워시를 수행합니다.
 4. 20 μ l 피펫을 사용하여 각 웰의 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.

용출

1. EE2+HP3 Elution Mix를 준비하기 위해 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합합니다.
 - 최소 3개의 라이브러리를 준비합니다.
 - 사용 후 남은 Elution Mix는 모두 폐기합니다.

Elution Mix 구성 성분	라이브러리 3개 (μ l)	라이브러리 8개 (μ l)	라이브러리 16개 (μ l)	라이브러리 24개 (μ l)
EE2	95	171	342	513
HP3	5	9	18	27

2. 짧게 볼텍싱하여 혼합합니다.
3. 마그네틱 스탠드에서 "CAP1" MIDI Plate를 내립니다.
4. 각 샘플 펠릿에 17 μ l의 EE2+HP3 Elution Mix를 천천히 넣습니다.
5. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
6. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
7. "CAP1" MIDI Plate의 각 웰에서 15 μ l의 용출액을 "ELU1" PCR Plate로 조심스럽게 옮깁니다.
8. "ELU1" PCR Plate의 각 용출액에 5 μ l의 ET2를 넣습니다.
9. Microseal 'B'로 "ELU1" PCR Plate를 밀봉하고 1200 rpm에서 2분간 진탕합니다.

2차 혼성화 준비

이 단계에서는 인리치된 DNA/RNA 라이브러리의 표적 영역과 캡처 프로브의 2차 결합을 진행합니다. 2차 혼성화는 캡처된 영역의 특이도를 높입니다. 최적의 라이브러리 인리치먼트를 위해 2차 혼성화 단계는 1.5~4시간 동안 진행하도록 합니다.

소모품

- OPD2(Oncology Probes DNA 2, 노란색 캡)
- OPR1(Oncology Probes RNA 1, 빨간색 캡)
- TCA1(Target Capture Additives 1)
- TCB1(Target Capture Buffer 1)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

! 해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- OPD2는 DNA 라이브러리에만 사용합니다.
- OPR1은 RNA 라이브러리에만 사용합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
[DNA] OPD2	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
[RNA] OPR1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
TCA1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
TCB1	2~8°C	실온에 도달할 때까지 해동. 짧게 원심분리 후 피펫팅하여 혼합. 침전물이 보이면 양 손으로 튜브를 감싸 온도를 높인 후 결정이 용해될 때까지 피펫팅하여 혼합.

2. 다음과 같은 HYB2 프로그램을 열 순환기에 저장합니다.

- Preheat Lid 옵션 선택 후 온도를 100°C로 설정.
- Reaction Volume을 50 µl로 설정.
- 95°C에서 10분.
- 85°C에서 2.5분.

- 75°C에서 2.5분.
- 65°C에서 2.5분.
- 57°C에서 온도 유지.

절차

1. "ELU1" PCR Plate의 각 웰에 15 µl의 TCB1을 넣습니다.
2. 각 웰에 10 µl의 TCA1을 넣습니다.
3. 각 웰에 적절한 프로브를 넣습니다.
 - DNA 라이브러리에는 5 µl의 OPD2(노란색 캡)을 넣습니다.
 - RNA 라이브러리에는 5 µl의 OPR1(빨간색 캡)을 넣습니다.
4. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1200 rpm에서 2분간 진탕합니다.
5. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 놓고 HYB2 프로그램을 실행합니다. 57°C에서 1.5~4시간 동안 혼성화합니다.

2차 표적 캡처

이 단계에서는 SMB를 사용하여 관심 표적 영역에 혼성화된 프로브를 캡처합니다. RSB를 사용하여 캡처된 라이브러리를 행구고 비드에서 비특이적 결합을 제거합니다. 이후 비드에서 인리치된 라이브러리를 용출하면 시퀀싱 준비가 완료됩니다.

소모품

- EE2(Enrichment Elution 2)
- ET2(Elute Target Buffer 2)
- HP3(2 N NaOH)
- RSB(Resuspension Buffer)
- SMB(Streptavidin Magnetic Beads)
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)
- [선택 사항] 15 ml 코니칼 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. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- 이 번 절차에는 SPB 대신 SMB를 사용해야 합니다.

준비

- 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
EE2	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 불텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
ET2	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 불텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
HP3	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 불텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
RSB	2~8°C 또는 -25~-15°C	실온에 도달하도록 방치. 사용 전 불텍싱. -25~-15°C에서 보관한 경우 실온에서 해동한 후 사용 전 불텍싱.
SMB	2~8°C	30분간 실온에 도달하도록 방치. 비드 펠릿이 있는 경우 위아래로 피펫팅하여 펠릿을 풀어준 후 불텍싱하여 재현탁.

- MIDI Heat Block Insert를 사용해 Hybex Incubator 1대를 57°C로 예열합니다.
- 새 96-well MIDI Plate에 CAP2(의미: Capture 2)라는 라벨을 부착합니다.
- 새 96-well PCR Plate에 ELU2(의미: Elution 2)라는 라벨을 부착합니다.

절차

결합

- 열 순환기에서 "ELU1" PCR Plate를 꺼냅니다.
- 비드를 재현탁하기 위해 SMB를 1분간 불텍싱합니다.
- "CAP2" MIDI Plate의 각 웰에 150 µl의 SMB를 넣습니다.

4. "ELU1" PCR Plate의 각 웰에서 50 µl의 라이브러리를 각각 "CAP2" MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
5. Microseal 'B'로 "CAP2" MIDI Plate를 밀봉하고 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
6. Hybex Incubator를 사용해 57°C에서 25분간 배양합니다.
7. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
8. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 올려둔 상태에서 피펫으로 천천히 각 웰의 상층액을 제거한 후 폐기합니다.

워시

1. 다음 절차에 따라 워시를 수행합니다.
 - a. 마그네틱 스탠드에서 "CAP2" MIDI Plate를 내립니다.
 - b. 각 웰에 200 µl의 RSB를 넣습니다.
 - c. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 4분간 진탕합니다.
 - d. 비드 펠릿이 아직 남아 있다면 싯을 제거한 후 피펫하여 혼합합니다. 모든 비드가 확실히 재현탁되었는지 확인한 후 새 Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉합니다.
 - e. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
 - f. 플레이트를 마그네틱 스탠드에 올려둔 상태에서 피펫으로 조심스럽게 상층액을 제거한 후 폐기합니다.
2. 미세한 피펫 팁과 20 µl 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거해 줍니다.

용출

1. EE2+HP3 Elution Mix를 준비하기 위해 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)를 사용해 아래에 명시된 볼륨을 혼합합니다.

Elution Mix 구성 성분	라이브러리 3개 (µl)	라이브러리 8개 (µl)	라이브러리 16개 (µl)	라이브러리 24개 (µl)
EE2	95	209	418	627
HP3	5	11	22	33

- 최소 3개의 라이브러리를 준비합니다.
 - 사용 후 남은 Elution Mix는 모두 폐기합니다.
2. 볼텍싱하여 혼합합니다.
 3. 마그네틱 스탠드에서 "CAP2" MIDI Plate를 내립니다.
 4. 각 샘플 펠릿에 22 µl의 EE2+HP3 Elution Mix를 조심스럽게 넣습니다.
 5. Microseal 'B'로 "CAP2" MIDI Plate를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
 6. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
 7. "CAP2" MIDI Plate의 각 웰에서 20 µl의 용출액을 "ELU2" PCR Plate로 옮깁니다.

8. "ELU2" PCR Plate의 각 용출액에 5 µl의 ET2를 넣습니다.
9. Microseal 'B'로 "ELU2" PCR Plate를 밀봉한 후 1200 rpm에서 2분간 진탕합니다.
10. 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

여기에서 작업을 멈출 경우 "ELU2" Plate를 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 7일까지 보관 가능합니다.

인리치된 라이브러리 증폭

이 단계에서는 프라이머를 사용하여 인리치된 라이브러리를 증폭합니다.

소모품

- EPM(Enhanced PCR Mix)
- PPC3(PCR Primer Cocktail 3)
- Microseal 'B' Adhesive Seal

! 해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
EPM	-25~-15°C	얼음 위에서 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
PPC3	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.

2. "ELU2" PCR Plate를 -25~-15°C에 보관했다면 다음 절차에 따라 준비합니다.
 - a. 플레이트를 실온에서 해동합니다.
 - b. 250 × g로 1분간 원심분리합니다.
 - c. 피펫팅하여 혼합합니다.
3. 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 18회의 사이클 수행.
 - 98°C에서 10초.
 - 60°C에서 30초.
 - 72°C에서 30초.
- 72°C에서 5분.
- 10°C에서 온도 유지.

절차

1. "ELU2" PCR Plate의 각 웰에 5 µl의 PPC3를 넣습니다.
2. 각 웰에 20 µl의 EPM을 넣습니다.
3. Microseal 'B'로 "ELU2" PCR Plate를 밀봉한 후 1200 rpm에서 2분간 진탕합니다.
4. 280 × g로 짧게 원심분리합니다.
5. 사전에 프로그래밍한 열 순환기에 놓고 EL-PCR 프로그램을 실행합니다.

증폭 및 인리치된 라이브러리 클린업

이 단계에서는 SPB를 사용하여 인리치된 라이브러리를 원치 않는 반응 성분에서 정제합니다.

소모품

- RSB(Resuspension Buffer)
- SPB(Sample Purification Beads)
- 새로 준비한 80% 에탄올(EtOH)
- 96-well MIDI Plate
- 96-well PCR Plate
- Microseal 'B' Adhesive Seal

시약 정보

- 용액의 점도를 고려해 SPB를 천천히 흡인하고 분주하도록 합니다.

준비

- 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

품목	보관 온도	지침
RSB	2~8°C 또는 -25~-15°C	실온에 도달하도록 방치. 사용 전 불텍싱. -25~-15°C에서 보관한 경우 실온에서 해동한 후 사용 전 불텍싱.
SPB	2~8°C	30분간 실온에 도달하도록 방치. 사용 전 1분간 불텍싱.

- 새 96-well MIDI Plate에 BIND2라는 라벨을 부착합니다.
- 새 96-well PCR Plate에 PL(의미: Purified Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 80% 에탄올을 새로 준비합니다.

절차

결합

- 열 순환기에서 "ELU2" PCR Plate를 꺼냅니다.
- SPB를 1분간 불텍싱하여 비드를 재현탁합니다.
- "BIND2" MIDI Plate의 각 웰에 110 µl의 SPB를 넣습니다.
- "ELU2" PCR Plate의 각 웰에서 50 µl의 라이브러리를 각각 "BIND2" MIDI Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
- Microseal 'B'로 "BIND2" MIDI Plate를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
- 실온에서 5분간 배양합니다.

워시

- "BIND2" MIDI Plate를 마그네틱 스탠드에 5분간 둡니다.
- 각 웰에서 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.
- 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
 - 플레이트를 마그네틱 스탠드에 둔 상태에서 각 웰에 새로 준비한 80% 에탄올을 200 µl씩 넣어 줍니다.
 - 30초간 기다립니다.
 - 각 웰에서 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.
- 2차** 비드 워시를 수행합니다.
- 미세한 피펫 팁과 20 µl 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거해 줍니다.

용출

- 마그네틱 스탠드에서 "BIND2" MIDI Plate를 내립니다.

2. 각 웰에 32 μ l의 RSB를 넣습니다.
3. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
4. 실온에서 2분간 배양합니다.
5. 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
6. "BIND2" MIDI Plate의 각 웰에서 30 μ l의 용출액을 각각 "PL" PCR Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.

안전한 정지점

여기에서 작업을 멈출 경우 "PL" Plate를 Microseal 'B'로 밀봉한 후 280 x g로 짧게 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 30일까지 보관 가능합니다.

[선택 사항] 라이브러리 정량화

플로우 셀 위에 클러스터링(clustering)이 가능한 충분한 양의 라이브러리가 있는지 확인하기 위해 정확하게 정량화합니다. 라이브러리를 표준화(normalization)하기 전에 형광 정량 시스템을 사용하여 인리치된 라이브러리의 양을 평가합니다. 효과적인 비드 기반 라이브러리 표준화를 위해서는 각 라이브러리의 양이 3 ng/ μ l 이상이어야 합니다. 본 프로토콜의 경우 AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit가 라이브러리의 정량화에 효과적인 것으로 입증되었습니다.

AccuClear 관련 권장 가이드라인

1. 6 μ l의 DNA Standard를 44 μ l의 RSB와 혼합하여 DNA Standard를 3 ng/ μ l로 희석합니다.
2. RSB를 Blank로 사용합니다.
3. 희석된 AccuClear DNA Standard와 Blank를 3회 반복 실험(triplicate)합니다.
4. 라이브러리를 단일 반복 실험(single replicate)합니다.
5. DNA Standard와 Blank의 상대 형광 단위(relative fluorescence unit, RFU) 평균값을 측정합니다.
6. 다음과 같이 Standard의 표준화된 RFU를 계산합니다.

$$\text{Average Standard RFU} - \text{Average Blank RFU} = \text{Normalized Standard RFU}$$

7. 다음과 같이 각 라이브러리의 표준화된 RFU를 계산합니다.

$$\text{Library RFU} - \text{Average Blank RFU} = \text{Normalized RFU for each library}$$

RFU 평가

계산 후 각 라이브러리의 표준화된 RFU 수치를 다음에 따라 평가합니다.

형광 측정	권장 사항
≤ Blank의 평균 RFU	정제된 DNA 샘플의 양과 질이 요구 조건에 부합하는 경우 라이브러리 준비 및 인리치먼트 단계 반복.
> Blank의 평균 RFU (및) < Standard의 표준화된 RFU	39페이지의 라이브러리 표준화 단계 진행. 사용하는 라이브러리의 RFU가 Standard의 표준화된 RFU에 미치지 못하는 경우, 샘플에 존재할 수 있는 변이의 정확한 검출에 필요한 수준의 시퀀싱 결과를 얻지 못할 수 있음.
≥ Standard의 표준화된 RFU	39페이지의 라이브러리 표준화 단계 진행.

라이브러리 표준화

이 과정에서는 라이브러리 풀에서 라이브러리가 균일하게 표현될 수 있도록 비드 기반 표준화(bead-based normalization) 과정을 통해 각 라이브러리의 양을 표준화합니다.

소모품

- EE2(Enrichment Elution 2)
- HP3(2 N NaOH)
- LNA1(Library Normalization Additives 1)
- LNB1(Library Normalization Beads 1)
- LNS1(Library Normalization Storage 1)
- LNW1(Library Normalization Wash 1)
- 1.7 ml 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube) 2개
- 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. 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 Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

시약 정보

- 현탁액의 점도를 고려해 LNB1을 천천히 흡인하고 분주하도록 합니다.

준비

1. 다음과 같은 소모품을 준비합니다.

시약	보관 온도	지침
EE2	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
LNA1	-25~-15°C	실온에 도달할 때까지 해동. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
HP3	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
LNB1	2~8°C	최소 30분간 실온에 도달하도록 방치. 위아래로 LNB1 펠릿을 피펫팅하여 재현탁.
LNS1	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 볼텍싱하여 재현탁. 짧게 원심분리.
LNW1	2~8°C	실온에 도달하도록 방치. 볼텍싱하여 재현탁.

2. "PL" Plate를 -25~-15°C에 보관했다면 실온에서 해동한 후 피펫팅하여 혼합하고 원심분리합니다.
3. 새 96-well MIDI Plate에 BBN(의미: Bead-Based Normalization)이라는 라벨을 부착합니다.
4. 새 96-well PCR Plate에 NL(의미: Normalized Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.

절차

1. LNB1 튜브를 1분간 최대 속도로 펄스 볼텍싱(pulse vortexing)합니다.
모든 비드가 재현탁되도록 LNB1 튜브를 앞뒤로 뒤집어 줍니다. 비드 펠릿이 남아있다면 볼텍싱 단계를 반복합니다.
2. 800 µl로 설정된 1000 µl 피펫을 사용하여 "LNB1"을 10회 위아래로 피펫팅하여 혼합합니다.

! 튜브 바닥에 있는 비드 펠릿을 완전히 재현탁하는 것이 매우 중요합니다. 균일한 클러스터 밀도를 얻기 위해서는 재현탁이 필수입니다.

- 다음 시약을 새 미세원심분리 튜브에 넣고 혼합하여 LNA1+LNB1 Master Mix를 준비합니다.

Master Mix 구성 성분	라이브러리 3개 (µl)	라이브러리 8개 (µl)	라이브러리 16개 (µl)	라이브러리 24개 (µl)
LNA1	132	352	704	1056
LNB1	24	64	128	192

과량의 시약이 포함되어 있습니다.

- 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 다음 시약을 새 미세원심분리 튜브에 넣고 혼합하여 EE2+HP3 Elution Mix를 준비합니다.

Elution Mix 구성 성분	라이브러리 3개 (µl)	라이브러리 8개 (µl)	라이브러리 16개 (µl)	라이브러리 24개 (µl)
EE2	114	304	608	912
HP3	6	16	32	48

- 볼텍싱하여 혼합합니다.

결합

- LNA1+LNB1 Master Mix를 볼텍싱합니다.
- "BBN" MIDI Plate의 각 웰에 45 µl의 LNA1+LNB1 Master Mix를 넣습니다.
- "PL" PCR Plate의 각 웰에서 20 µl의 라이브러리를 각각 "BBN" MIDI Plate의 상응하는 웰에 넣습니다.
- Microseal 'B'로 "BBN" MIDI Plate를 밀봉한 후 1800 rpm에서 30분간 진탕합니다.
- "BBN" MIDI Plate를 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
- 각 웰에서 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.

워시

- 다음 절차에 따라 비드 워시를 수행합니다.
 - 마그네틱 스탠드에서 "BBN" MIDI Plate를 내립니다.
 - 각 웰에 45 µl의 LNW1을 넣습니다.
 - Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 5분간 진탕합니다.
 - 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
 - 각 웰에서 상층액을 모두 제거한 후 폐기합니다.
- 2차** 워시를 수행합니다.
- 미세한 피펫 팁과 20 µl 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거해 줍니다.

용출

- 마그네틱 스탠드에서 "BBN" MIDI Plate를 내립니다.

2. EE2+HP3 Elution Mix를 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
3. 조심스럽게 각 웰에 32 μ l의 EE2+HP3 Elution Mix를 넣습니다.
4. Microseal 'B'로 플레이트를 밀봉한 후 1800 rpm에서 2분간 진탕합니다.
5. "BBN" MIDI Plate를 마그네틱 스탠드에 2분간 둡니다.
6. "BBN" MIDI Plate의 각 웰에서 30 μ l의 용출액을 각각 "NL" PCR Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
7. "NL" PCR Plate의 각 라이브러리에 30 μ l의 "LNS1"을 넣습니다.
8. 위아래로 피펫팅하여 혼합합니다.

안전한 정지점

여기에서 작업을 멈출 경우 "NL" Plate를 Microseal 'B'로 밀봉한 후 280 x g로 짧게 원심분리합니다. 플레이트는 -25~-15°C에서 최대 30일까지 보관 가능합니다.

라이브러리 풀링 및 로딩 농도로의 희석

라이브러리의 풀링(pooling), 변성(denaturation) 및 로딩 농도로의 희석(dilution)이 필요한 경우 사용 중인 시퀀싱 시스템의 Denature and Dilute Libraries Guide를 참조하시기 바랍니다.

부가 정보

소개

본 가이드의 프로토콜은 사용자가 이 섹션에 기술된 내용을 이미 검토했고 프로토콜의 구성을 확인했으며 필요한 모든 소모품 및 장비를 확보했다는 가정 하에 작성되었습니다.

키트 구성

프로토콜을 진행하기에 앞서 반드시 본 섹션에서 시약을 확인해 두시기 바랍니다.

Library Prep Kit	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA Kit (48 Sample Library Prep Kit Only)	20028213
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle (24 Sample Library Prep Kit Only)	20028215
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 Sample Library Prep Kit Only)	20045504
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 Sample Library Prep Kit Only)	20045508
Library Prep Kit & NextSeq 500/550 시스템 시약	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA NextSeq Kit (48 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit)	20028214
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle NextSeq Kit (24 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit)	20028216
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit)	20045505
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (32 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit)	20045990
Library Prep Kit & PierianDx Clinical Genomics Workspace 연결	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA Kit, plus PierianDx (48 Sample Library Prep Kit with PierianDx)	20032624
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle Kit, plus PierianDx (24 Sample Library Prep Kit with PierianDx)	20032626

Library Prep Kit & PierianDx Clinical Genomics Workspace 연결	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 Sample Library Prep Kit with PierianDx)	20045506
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 Sample Library Prep Kit with PierianDx)	20045509
Library Prep Kit, NextSeq 500/550 시스템 시약 & PierianDx Clinical Genomics Workspace 연결	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA NextSeq Kit, plus PierianDx (48 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit and PierianDx)	20032625
TruSight Oncology 500 DNA/RNA NextSeq Kit, plus PierianDx (24 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit and PierianDx)	20032627
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit (64 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit and PierianDx)	20045507
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit (32 Sample Library Prep Kit with NextSeq Kit and PierianDx)	20045991

Library Prep

Box 1 - Library Prep – RNA (Pre-Amp), -25~-15°C에 보관

DNA/RNA Bundle을 구매한 경우 1개의 상자가 배송됩니다. DNA Kit를 구매한 경우 이 상자는 배송되지 않습니다.

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
1	2	EPH3	Elute, Prime, Fragment High Mix 3
1	3	FSM	First Strand Synthesis Mix
1	2	RVT	Reverse Transcriptase
1	2	SSM	Second Strand Mix

Box 2 - Library Prep (Pre-Amp), -25~-15°C에 보관

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
2	3	UMI1	UMI Adapters v1

Box 3 - Library Prep (Pre-Amp), -25~-15°C에 보관

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
2	3	ALB1	Adapter Ligation Buffer 1
2	3	EPM	Enhanced PCR Mix
2	6	ERA1-A	End Repair A-tailing Enzyme Mix 1
2	5	ERA1-B	End Repair A-tailing Buffer 1
2	3	LIG3	DNA Ligase 3
2	2	STL	Stop Ligation Buffer
2	2	SUA1	Short Universal Adapters 1

Box 4 - Library Prep (Pre-Amp), 보관 온도는 하기 표 참조

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명	보관 온도
1	1	RSB	Resuspension Buffer	2~8°C 또는 -25~-15°C
2	4	SPB	Sample Purification Beads	2~8°C
1	1	TEB	TE Buffer	2~8°C

Box 5 - Library Prep – Unique PCR Index Primers (Pre-Amp), -25~-15°C에 보관

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
1	2	UP01	Unique Index Primer 01
1	2	UP02	Unique Index Primer 02
1	2	UP03	Unique Index Primer 03
1	2	UP04	Unique Index Primer 04
1	2	UP05	Unique Index Primer 05

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
1	2	UP06	Unique Index Primer 06
1	2	UP07	Unique Index Primer 07
1	2	UP08	Unique Index Primer 08
1	2	UP09	Unique Index Primer 09
1	2	UP10	Unique Index Primer 10
1	2	UP11	Unique Index Primer 11
1	2	UP12	Unique Index Primer 12
1	2	UP13	Unique Index Primer 13
1	2	UP14	Unique Index Primer 14
1	2	UP15	Unique Index Primer 15
1	2	UP16	Unique Index Primer 16

Enrichment

Box 6 – Enrichment (Post-Amp), 보관 온도는 하기 표 참조

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명	보관 온도
2	3	ET2	Elute Target Buffer 2	2~8°C
2	2	HP3	2 N NaOH	2~8°C
1	1	LNB1	Library Normalization Beads 1	2~8°C
2	2	LNS1	Library Normalization Storage 1	2~8°C
2	2	LNW1	Library Normalization Wash 1	2~8°C
1	2	RSB	Resuspension Buffer	2~8°C 또는 -25~-15°C

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명	보관 온도
2	4	SMB	Streptavidin Magnetic Beads	2~8°C
2	3	SPB	Sample Purification Beads	2~8°C
2	3	TCB1	Target Capture Buffer 1	2~8°C

Box 7 - Enrichment (Post-Amp), -25~-15°C에 보관

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
3	4	EE2	Enrichment Elution 2
1	1	EEW	Enhanced Enrichment Wash
2	3	EPM	Enhanced PCR Mix
1	1	LNA1	Library Normalization Additives 1
2	3	PPC3	PCR Primer Cocktail 3
2	3	TCA1	Target Capture Additives 1

Box 8 - Enrichment (Post-Amp), -25~-15°C에 보관

DNA/RNA Bundle을 구매한 경우 1개의 상자가 배송됩니다. DNA Kit를 구매한 경우 이 상자가 2개 배송됩니다.

Manual Kit (24개 샘플용) 제공 수량	Manual Kit (48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
1	2	3	OPD2	Oncology DNA Probes Pool 2

Box 9 - TruSight Oncology 500 Kit Content Set (RNA Only), -25~-15°C에 보관

DNA/RNA Bundle을 구매한 경우 1개의 상자가 배송됩니다. DNA Kit를 구매한 경우 이 상자는 배송되지 않습니다.

Manual Kit (24/48개 샘플용) 제공 수량	Automated Kit (32/64개 샘플용) 제공 수량	시약	설명
1	1	OPR1	Oncology RNA Probes Master Pool

소모품 및 장비

필수 소모품과 장비는 프로토콜 시작 전 미리 준비해 둡니다.

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

소모품

소모품	공급 업체
[선택 사항] AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit with 1 DNA Standard	Biotium(카탈로그 번호: 31029)
[선택 사항] AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	QIAGEN(카탈로그 번호: 80234)
[선택 사항] QuantiFluor RNA System	Promega(카탈로그 번호: E3310)
[선택 사항] Agilent DNA 1000 Kit	Agilent(카탈로그 번호: 5067-1504)
[선택 사항] Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent(카탈로그 번호: 5067-1511)
[선택 사항] Standard Sensitivity RNA Analysis Kit	Agilent(카탈로그 번호: DNF-471-0500)
[선택 사항] FFPE QC Kit	Illumina(카탈로그 번호: WG-321-1001)
[선택 사항] DNA Reference Standard	Horizon Diagnostics(카탈로그 번호: HD753)
[선택 사항] Universal Human Reference RNA	Agilent(카탈로그 번호: 740000)
LE220 & E220 <i>evolution</i> 용 8 microTUBE Strip(12)	Covaris(파트 번호: 520053)
8 microTUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2 (ME220과 사용 가능)	Covaris(파트 번호: 520240)
Rack E220 <i>evolution</i> 8 microTUBE Strip adapter (E220 <i>evolution</i> 과 사용 가능)	Covaris(파트 번호: 500430)
Rack 12 place 8 microTUBE Strip adapter (LE220과 사용 가능)	Covaris(파트 번호: 500191)
Rack 8 microTUBE Strip V2(ME220과 사용 가능)	Covaris(파트 번호: 500518)
뉴클레아제가 없는(nuclease-free) 1.7 ml 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)	일반 실험기자재 공급 업체
15 ml 코니칼 튜브	일반 실험기자재 공급 업체
50 ml 코니칼 튜브	일반 실험기자재 공급 업체
20 µl 에어로졸 생성 방지 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체

소모품	공급 업체
200 µl 에어로졸 생성 방지 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체
1 ml 에어로졸 생성 방지 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체
0.8 ml 96-well storage plate(MIDI plate)	Fisher Scientific(파트 번호: AB-0859)
0.2 ml 96-well PCR plate (폴리프로필렌(polypropylene, PP))	일반 실험기자재 공급 업체
[선택 사항, 라이브러리 정량화 절차] 96-well flat clear bottom black microplate	Corning(파트 번호: 3904)
Nuclease-free reagent reservoirs(PVC, disposable trough)	VWR(파트 번호: 89094-658)
Microseal 'B' adhesive seal(플레이트 밀봉 씬)	Bio-Rad(파트 번호: MSB-1001)
RNase/DNase가 없는(RNase/DNase-free) 물	일반 실험기자재 공급 업체
뉴클레아제가 없는 물	일반 실험기자재 공급 업체
Ethanol(200 proof for molecular biology)	Sigma-Aldrich(파트 번호: E7023)

장비(Pre-Amp)

장비	공급 업체
온도 조절이 가능하거나 끌 수 있는 가열 뚜껑(heated lid)이 장착되어 있는 열 순환기(thermal cycler)	일반 실험기자재 공급 업체
가열 블록(heat block, 1.5 ml 미세원심분리 튜브)	일반 실험기자재 공급 업체
Heat block(Hybex incubator, heating base) 2개	SciGene(카탈로그 번호) • 1057-30-O(115 V) 또는 • 1057-30-2(230 V)
MIDI heat block insert(Hybex incubator와 사용 가능) 2개	Illumina(카탈로그 번호: BD-60-601)
테이블형 원심분리기(플레이트 원심분리기)	일반 실험기자재 공급 업체
미세원심분리기(1.5 ml 튜브)	일반 실험기자재 공급 업체
Magnetic stand-96	Thermo Fisher(카탈로그 번호: AM10027)
볼텍스 믹서(vortexer)	일반 실험기자재 공급 업체
Plate shaker(BioShake XP)	Q Instruments(파트 번호: 1808-0505)

장비	공급 업체
Covaris Focused-ultrasonicator	<ul style="list-style-type: none"> ● Covaris(파트 번호: 500219(모델 LE220)) 또는 ● Covaris(파트 번호: 500429(모델 E220evolution)) 또는 ● Covaris(파트 번호: 500506(모델 ME220))
[선택 사항] LE220 & E220evolution용 8 microTUBE Strip Prep Station	Covaris(파트 번호: 500327)
[선택 사항] Rack Loading Station(ME220 micro TUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2와 사용 가능)	Covaris(파트 번호: 500523)
[선택 사항] 2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent(파트 번호: G2940CA)
[선택 사항] Fragment Analyzer Automated CE System	Agilent(파트 번호: M5310AA 또는 M5311AA)

장비(Post-Amp)

장비	공급 업체
가열 블록(heat block, 1.5 ml 미세원심분리 튜브)	일반 실험기자재 공급 업체
Heat block(Hybex incubator, 96-well plate)	SciGene(카탈로그 번호) <ul style="list-style-type: none"> ● 1057-30-O(115 V) 또는 ● 1057-30-2(230 V)
MIDI heat block insert(Hybex와 사용 가능)	illumina(카탈로그 번호: BD-60-601)
테이블형 원심분리기(플레이트 원심분리기)	일반 실험기자재 공급 업체
미세원심분리기(1.5 ml 튜브)	일반 실험기자재 공급 업체
Magnetic stand-96	Thermo Fisher(카탈로그 번호: AM10027)
볼텍스 믹서(vortexer)	일반 실험기자재 공급 업체
Plate shaker(BioShake XP)	Q Instruments(파트 번호: 1808-0505)
열 순환기(thermal cycler)	일반 실험기자재 공급 업체
[선택 사항] 2100 Bioanalyzer Desktop System	Agilent(파트 번호: G2940CA)
[선택 사항] Fragment Analyzer Automated CE System	Agilent(파트 번호: M5310AA 또는 M5311AA)

두문자어

두문자어	정의
1stSS	1st Strand Synthesis
2ndSS	2nd Strand Synthesis
ALS	Amplified Library Samples
BBN	Bead Based Normalization
CAP1	Capture 1
CAP2	Capture 2
cDNA	Complementary DNA
CF	cDNA Fragments
ELU1	Elution 1
ELU2	Elution 2
gDNA	Genomic DNA
HQ-RNA	High-quality RNA
HYB1	Hybridization 1
HYB2	Hybridization 2
LP	Library Preparation
LP2	Library Preparation 2
LQ-RNA	Low-quality RNA
LS	Library Samples
NL	Normalized Libraries
PCF	Purified cDNA Fragments
PL	Purified Libraries

리소스 및 참고 자료

Illumina 웹사이트의 [Support 페이지](#)에는 TruSight Oncology 500 Kit를 위한 다양한 리소스가 준비되어 있습니다. 교육 자료, 호환 가능 제품 목록, 기타 고려해야 할 사항 등을 추가로 확인하실 수 있습니다. 항상 Support 페이지에서 최신 버전의 문서를 확인하시기 바랍니다.

개정 이력

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 1000000067621 v09	2021년 10월	소모품 두문자어 및 부록 번호 수정.
문서 번호: 1000000067621 v08	2021년 6월	개요 섹션 삭제.
문서 번호: 1000000067621 v07	2021년 4월	절차 섹션에서 중복되는 단계 정보 삭제. RNA 변성 및 결합 섹션에서 열 순환기(thermal cycler) 사용 단계를 두 개의 개별 단계로 나누어 기술. cDNA 클린업 섹션의 소모품 목록에서 resuspend reagent 삭제. cDNA 클린업 섹션에서 두 번째 MIDI Plate의 준비는 선택 사항인 것으로 변경. gDNA 절편화 섹션에 새 플레이트에 LP라는 라벨을 부착하라는 참고 문구 추가. 주의 문구의 위치를 절차 섹션의 도입부로 이동. DNA와 RNA를 모두 사용하지 않는 이상 DNA와 RNA를 모두 해동하지 말 것을 명시하는 문구 추가. 1차 표적 캡처의 용출 섹션을 2차 표적 캡처의 용출 섹션처럼 간결하게 변경. 증폭 및 인리치된 라이브러리 클린업의 표에 누락되었던 행 추가. 라이브러리 정량화의 RFU 계산 단계를 두 개의 개별 단계로 나눔. 소모품 섹션에 microplate의 준비가 선택 사항임을 명시하는 문구 추가. 가열 뚜껑 및 온도 조절 기능이 있는 열 순환기를 사용할 것을 요구하는 내용 추가.

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 1000000067621 v06	2020년 9월	타사 리퀴드 핸들링 로봇(liquid handling robot)과의 사용을 위한 Library Prep Automation Kit 및 자동화 형식에 대한 정보 추가.
문서 번호: 1000000067621 V05	2020년 4월	확실한 재현택을 위한 LNB1 혼합 지침 업데이트. cDNA 클린업 섹션에 명시된 진탕 속도를 1500 rpm에서 1800 rpm으로 수정.
문서 번호: 1000000067621 v04	2019년 11월	시퀀싱 런별 라이브러리 개수와 가능한 DNA/RNA 조합에 대한 가이드라인은 <i>NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide</i> (문서 번호: 15048776)를 참조할 것을 표기.

문서	날짜	개정 내용
<p>문서 번호: 1000000067621 v03</p>	<p>2019년 10월</p>	<p>RNA 워크플로우 추가. Assay를 통해 검출되는 바이오마커 중 하나로 유전자 증폭 추가. 최대 RNA 사용량 지침 삭제. 이에 따라 권장 RNA 희석 농도도 프로토콜에서 삭제. 최소 40 ng의 DNA/RNA를 키트와 사용해야 하며, 사용량이 40 ng 미만인 경우 라이브러리 수율과 품질이 저하될 수 있음을 명시. DNA 사용량이 40 ng을 초과할 수 있으므로 gDNA 절편화 준비 시 필요한 TEB 내 샘플 농도 삭제. PierianDx가 포함된 키트를 키트 구성 목록에 추가. Covaris 소모품 및 장비 추가. Covaris ME220 장비 설정 추가. 새로운 교차 오염 방지 및 플레이트 밀봉 팁과 기술 추가. 시퀀싱 런별 라이브러리 개수와 가능한 DNA/RNA 조합에 대한 가이드라인은 TruSight Oncology 500 Support 페이지를 참조할 것을 표기. 확실한 재현탁을 위해 추가적인 LNB1 비드 펠릿 혼합 지침 제공. 결합 섹션에 비드 재현탁을 위한 1분간의 볼텍싱 단계 추가 후, 소개 및 준비 섹션에서 해당 지침 삭제. TruSight Oncology 500 라이브러리의 정량화에 효과적인 AccuClear Quantitation Kit에 대한 정보 추가. RSB를 Blank로 사용하는 법, 희석된 AccuClear DNA Standard와 Blank로 3회 반복 실험하는 법, 라이브러리로 단일 반복 실험하는 법 등 추가적인 라이브러리 정량화 가이드라인 제공.</p>

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 1000000067621 v02	2019년 6월	두문자어 목록 업데이트.
문서 번호: 1000000067621 v01	2019년 3월	RNA에서 유래한 샘플 라이브러리의 프로토콜에 단계 추가. RNA용 키트 구성, 소모품 및 장비 추가.
문서 번호: 1000000067621 v00	2018년 12월	최초 발행.

기술 지원

기술 지원은 Illumina 기술지원팀에 요청하시기 바랍니다.

웹사이트: www.illumina.com

이메일: techsupport@illumina.com

Illumina 기술지원팀 연락처

지역	무료 전화 번호	지역 전화 번호
네덜란드	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
노르웨이	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
뉴질랜드	+64 800 451 650	
대만, 중국	+886 8 06651752	
대한민국	+82 80 234 5300	
덴마크	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
독일	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
말레이시아	+60 1800 80 6789	
미국	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
베트남	+84 1206 5263	
벨기에	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
스웨덴	+46 2 00883979	+46 8 50619671
스위스	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
스페인	+34 800 300 143	+34 911 899 417
싱가포르	1 800 5792 745	
아일랜드	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
영국	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
오스트리아	+43 800 006249	+43 1 9286540
이탈리아	+39 800 985513	+39 236003759
인도	+91 8006500375	
인도네시아		0078036510048
일본	+81 0800 111 5011	
중국		+86 400 066 5835
캐나다	+1 800 809 4566	

지역	무료 전화 번호	지역 전화 번호
태국	+66 1800 011 304	
프랑스	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
핀란드	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
필리핀	+63 180016510798	
호주	+61 1800 775 688	
홍콩, 중국	+852 800 960 230	

안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS) – Illumina 웹사이트(support.illumina.com/sds.html)에서 확인하실 수 있습니다.

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



Illumina
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.

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®