illumina®

Nextera® XT DNA 샘플 준비 키트

작은 게놈, 엠프리콘, 플라스미드를 위한 가장 빠르고 간편한 샘플 준비 작업흐름.

핵심 사항

- **빠른 샘플 준비**
  단 15분의 조작 시간으로 90분의 짧은 시간 안에 샘플 준비 완료
- **결과까지 최저 소요 시간**
  MiSeq® 시스템을 사용하여 8시간 안에 DNA에서 데이터까지 작업 진행
- **작은 게놈, PCR 엠프리콘, 플라스미드에 최적화**
  다수의 애플리케이션에 사용 가능한 하나의 샘플 준비 키트
- **혁신적 샘플 정규화**
  더 이상 샘플 풀링 및 시퀀싱 전에 필요하지 않은 라이브러리 정량화

소개

Nextera XT DNA 샘플 준비 키트를 사용하면 연구자는 단 15분의 조작 시간으로 90분 안에 작은 게놈(박테리아, 고세균, 바이러스), PCR 엠프리콘, 플라스미드에 대한 시퀀싱 준비 라이브러리를 준비할 수 있습니다. MiSeq 시스템과 Nextera XT DNA 샘플 준비 키트를 사용하면 DNA에서 데이터까지 8시간 안에 처리할 수 있습니다(그림 1). 적은 양(1ng)의 입력 DNA를 사용하므로 이 방법은 제한된 수량으로 제공되는 귀중한 샘플을 처리하기에 적합합니다. 모든 Illumina 시퀀서와 호환되는 Nextera 샘플 준비는 수많은 기존 애플리케이션[1-9]의 전체 시퀀싱 작업흐름 시간을 단축하며 처리량이 높도록 자동화하기 쉽습니다.

가장 빠르고 간편한 샘플 준비 작업흐름

단일 "tagmentation" 효소 반응을 사용하여 샘플 DNA는 동시에 분절되고 어댑터로 태깅됩니다. 최적화되고 주기가 제한된 PCR 프로토콜은 태깅된 DNA를 증폭하고 시퀀싱 인덱스를 추가합니다(그림 1). 전체 Nextera XT 프로토콜은 시작부터 완료까지 사용 가능한 다른 샘플 준비 방법보다 80% 이상 빠르고 조작 시간이 가장 적게 소요됩니다.

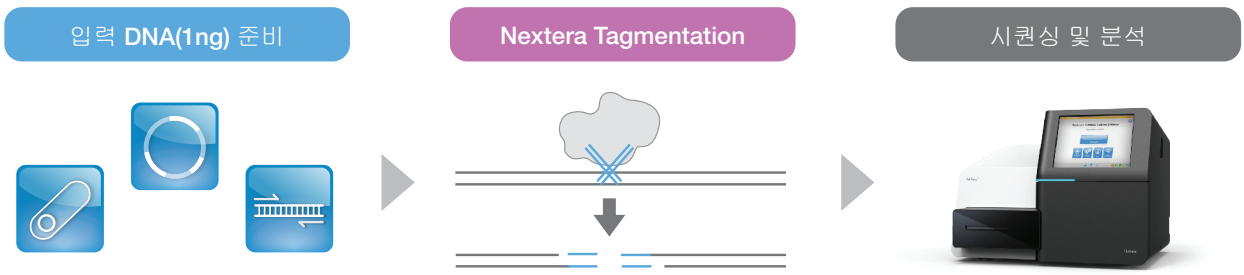
혁신적 샘플 정규화

차세대 시퀀싱을 위한 샘플 준비 키트는 다양한 농도의 라이브러리를 제공합니다. 샘플을 동일하게 풀링하고 목표 클러스터 밀도를 달성하기 위해 시간이 많이 소요되는 정량화 방법이 종종 사용되며 그 뒤를 이어 바코드 표시된 샘플의 희석 및 풀링이 진행됩니다. Nextera XT DNA 샘플 준비 키트를 사용하면 단순한 비드 기반 샘플 정규화 단계를 사용하므로 샘플 풀링과 시퀀싱 전에 라이브러리 정량화가 필요하지 않습니다(그림 2). 준비된 라이브러리는 용량별 풀링을 사용하는 동일한 농도로 만들어집니다. 즉, 시퀀싱할 각 라이브러리에서 5 µl씩만 풀링합니다.

유연한 다중화

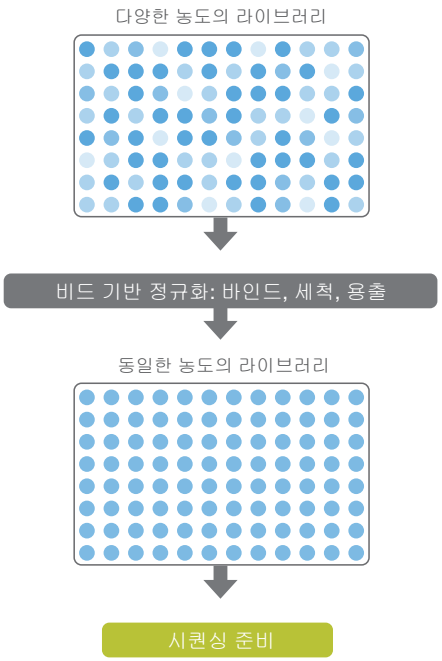
Nextera XT 샘플 준비 키트는 단일 실험에서 최대 384개의 샘플을 처리하고 고유한 바코드를 표시하는 혁신적인 인덱싱 솔루션을 제공합니다. 각 DNA 분절에 2개의 인덱스를 추가한 후 고유하게 인덱싱된 최대 384개의 샘플을 풀링하고 시퀀싱할 수 있습니다. 시퀀싱 후 인덱스 2개의 고유한 조합을 사용하여 데이터를 역다중화하고 리드를 적절한 샘플에 할당합니다.

그림 1: Nextera XT 샘플 준비 작업흐름



Nextera XT와 MiSeq 시스템을 통한 빠른 시퀀싱의 조합으로 단 8시간 안에 완전한 DNA를 데이터 작업흐름에 제공합니다.

그림 2: 혁신적 샘플 정규화



Nextera XT 샘플 준비 키트에서는 샘플 풀링 및 시퀀싱 전에 라이브러리를 정량화할 필요가 없습니다. 동일한 농도의 라이브러리는 비드 기반 샘플 정규화를 사용하여 생성되며, 시퀀싱할 라이브러리를 각각 5µl씩 피펫으로 추출하는 간단한 방식을 사용합니다.

Nextera XT 인덱스 키트는 이러한 이중 바코드 접근 방법을 통해 오직 40개의 고유한 인덱스 올리고만으로 최대 384개의 샘플을 처리하는 확장 가능한 접근 방법을 제공합니다. 다중 샘플 연구는 판 기반 처리를 위한 간편한 반응 설정을 제공하는 무료 제공 소프트웨어 도구인 Illumina Experiment Manager를 통해 편리하게 관리할 수 있습니다.

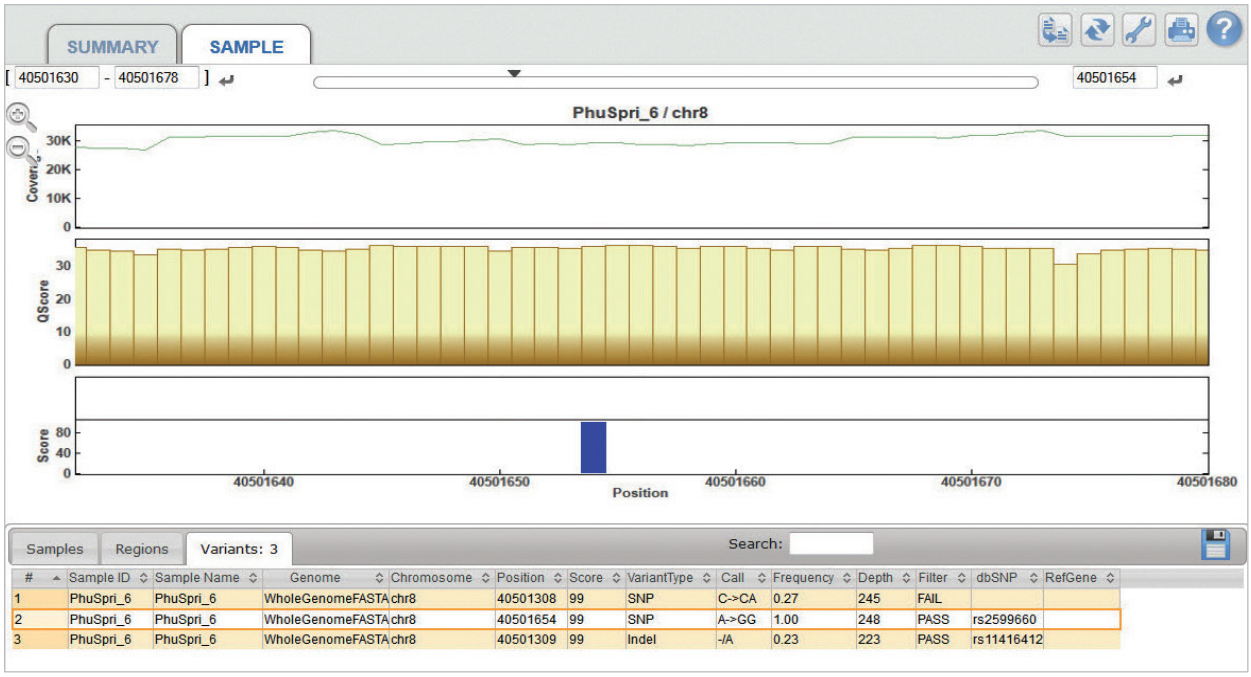
분석을 위한 단순한 사용자 인터페이스

MiSeq Reporter는 작은 게놈 드 노보(즉, 재시퀀싱), PCR 엠프리콘, 플라스미드 시퀀싱 등의 다양한 애플리케이션을 위한 자동화된 기기 내 분석을 제공합니다. 시퀀싱 결과와 분석은 보고 해석하기 쉽습니다. 예를 들어, MiSeq Reporter 소프트웨어의 PCR 엠프리콘 작업흐름을 사용하여 시퀀스 데이터는 직관적인 탭(즉, 샘플, 영역, 이형)으로 자동으로 범주화됩니다(그림 3). 이러한 각 탭 내에서 이형 점수, Quality Score(Q-점수), 시퀀싱 범위 수준은 단일 염기까지 확인되므로 관심 이형을 쉽게 분석할 수 있습니다.

높은 범위, 정확한 호출

Nextera XT 및 MiSeq 시스템을 사용하는 엠프리콘 시퀀싱의 성능을 보여주기 위해 2가지의 다른 인간 DNA 샘플에서 다양한 크기의 PCR 엠프리콘 9개를 준비했습니다. 각 샘플의 엠프리콘이 풀링되었고 각 풀의 DNA 1ng이 Nextera XT 키트를 사용하여 준비되었습니다. 2개의 샘플 풀로부터 라이브러리가 결합되고 MiSeq 시스템에서 페어드 엔드 2 × 150개 리드로 시퀀싱되었으며 PCR 엠프리콘 작업흐름을 사용하여 MiSeq Reporter로 분석했습니다.

그림 3: MiSeq Reporter의 PCR 엠프리콘 작업흐름



#	Sample ID	Sample Name	Genome	Chromosome	Position	Score	VariantType	Call	Frequency	Depth	Filter	dbSNP	RefGene
1	PhuSpri_6	PhuSpri_6	WholeGenomeFASTA	chr8	40501308	99	SNP	C->CA	0.27	245	FAIL		
2	PhuSpri_6	PhuSpri_6	WholeGenomeFASTA	chr8	40501654	99	SNP	A->GG	1.00	248	PASS	rs2599660	
3	PhuSpri_6	PhuSpri_6	WholeGenomeFASTA	chr8	40501309	99	Indel	-/A	0.23	223	PASS	rs11416412	

MiSeq Reporter는 여기에 표시된 PCR 엠프리콘을 포함하여 다양한 애플리케이션에 대한 자동화된 기기 내 분석을 제공합니다. 샘플, 영역, 이형에 쉽게 액세스할 수 있고 이형 점수, Quality Score(Q-점수), 범위 플롯이 단일 뉴클레오티드 해상도로 표시됩니다.

표 1: 엠프리콘 범위 및 호출된 이형

엠프리콘 길이 (bp)	중간 범위 (수천 개의 리드)	호출된 이형 (SNV/Indel)
953	15.1	4SNV
1083	27.4	4SNV
1099	22.1	1SNV
1800	22.4	7SNV
1809	17.8	1SNV
2166	17.6	7SNV
3064	12.5	4SNV
3064	13.3	1SNV
3072	14.8K	1SNV + 1indel

엠프리콘당 대략적인 평균 시퀀싱 범위 값과 샘플 2개 중 하나의 엠프리콘 내에서 식별된 호출된 이형 수(이형 점수 > 99)가 표 1에 표시되어 있습니다. MiSeq 시스템의 아웃풋은 12,000배가 넘는 깊이로 이러한 엠프리콘의 시퀀싱을 지원하므로 신뢰할 수 있는 이형 호출을 가능하게 합니다. 이 예에서 호출된 31개의 총 이형 중 94%가 dbSNP 데이터베이스 내에서 확인되었습니다. 이러한 결과는 범위가 엠프리콘 크기 범위 전체에서 높고 동등하며 이형 호출이 정확함을 나타냅니다.

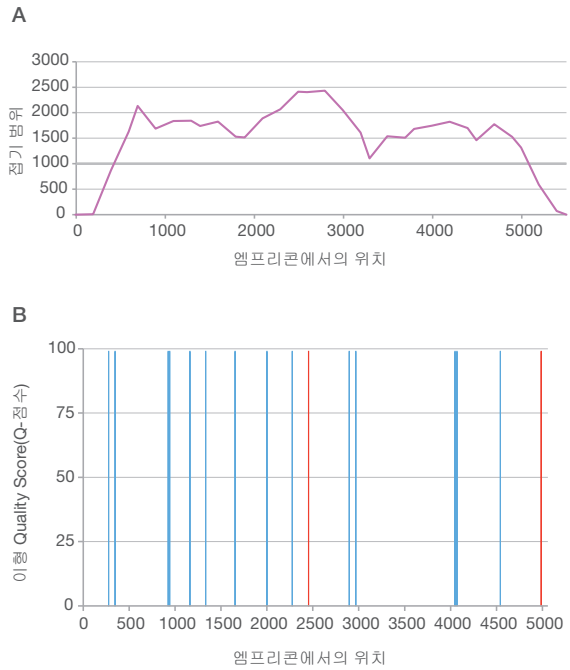
대형 엠프리콘 전체에서 동등한 범위

긴 범위의 PCR로 생성되는 대형 엠프리콘(> 1kb)은 Nextera XT 키트로 쉽게 준비되고 모든 Illumina 시퀀서에서 시퀀싱될 수 있습니다. 그림 4에서는 인간 게놈의 고도로 가변적인 비암호화 영역에서 5.1kb 엠프리콘에 대해 엠프리콘 길이에 따른 범위와 호출된 이형 위치를 표시합니다 5.1kb 엠프리콘은 크기가 300bp ~ 10kb인 인간 DNA의 24개 엠프리콘 풀의 일부였습니다. 엠프리콘 풀은 5가지 서로 다른 샘플에서 생성되었고 Nextera XT 라이브러리는 각 풀의 DNA 1ng을 사용하여 생성되었습니다. 라이브러리가 결합되었고, 단일 리드 시퀀싱은 MiSeq에서 1 × 150bp 주기를 사용하여 수행되고 PCR 엠프리콘 작업흐름을 사용하는 MiSeq Reporter를 통해 분석되었습니다.

작은 게놈의 드 노보 어셈블리

미생물 게놈의 준비와 관련하여 Nextera XT의 유용성을 보여주기 위해 대장균 레퍼런스 세포 주 MG1655의 게놈 DNA 1ng이 Nextera XT 키트를 사용하여 준비되고 MiSeq 시스템에서 페어드 엔드 2 × 150bp 리드를 사용하여 시퀀싱되었습니다. 데이터는 MiSeq Reporter의 어셈블리 작업흐름을 사용하여 분석했습니다. 이 샘플의 총 실행 후 분석 시간은 28분이었습니다. 어셈블리 메트릭이 표 2에 표시되어 있습니다. 고품질 어셈블리가 뛰어난 N50 점수와 범위로 생성되었습니다. 이 데이터 세트는 Illumina 클라우드 컴퓨팅 환경[10]인 BaseSpace®에서 분석할 수 있습니다.

그림 4: 대형 엠프리콘 범위



패널 A: 5.1kb 엠프리콘 전체에서 높은 시퀀싱 범위(>1,000배)
패널 B: 동일한 엠프리콘 내에서 필터 통과 이형 16개(파란색 SNV 14개 + 빨간색 indel 2개)가 이형 점수에 대한 그래프(이형 호출 정확성의 Phred-scale 측정, 최대값 = 99)로 표시됩니다. 16개 이형 중 13개가 dbSNP에 있습니다.

표 2: 대장균의 드 노보 어셈블리

매개변수	값
적용되는 게놈의 비율	98%
콘틱(Contig) 수	314
최대 콘틱(Contig) 길이	221,108
염기 수	4,548,900
N50	111,546
염기당 평균 범위	184.9

요약

Nextera XT DNA 샘플 준비 키트는 속도와 편리함을 가장 중요하게 여기는 실험에 이상적입니다. 가장 빠르고 간편한 샘플 준비 작업흐름을 제공하는 Nextera XT DNA 샘플 준비 키트로 작은 게놈, PCR 엠프리콘, 플라스미드를 빠르게 시퀀싱할 수 있습니다. MiSeq 및 NextSeq™ 시스템과 결합된 Nextera XT DNA 샘플 준비 키트로 하루 안에 DNA에서 데이터까지 작업을 진행할 수 있습니다.

참조

1. Loman N, Misra RJ, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nat Biotechnol 22 Apr.
2. Gertz J, Varley KE, Davis NS, Baas BJ, Goryshin IY, et al. (2012) Transposase mediated construction of RNA-Seq libraries. Genome Res 22(1): 134–41.
3. Parkinson NJ, Maslau S, Ferneyhough B, Zhang G, Gregory L, et al. (2012) Preparation of high-quality next-generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA. Genome Res 22(1): 125–33.
4. Toprak E, Veres A, Michel J-B, Chait R, Hartl D, et al. (2012) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nat Genet 1(44): 101–106.
5. Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, Tan PL, Tai AK, et al. (2011) A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. Nat Genet 43(12): 1176–7.
6. Depledge DP, Palser AL, Watson SJ, Lai I Y-C, Gray E, et al. (2011) Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples. PLoS One 6(11): e27805.
7. Lieberman TD, Michel J-B, Aingaran M, Potter-Bynoe G, Roux D, et al. (2011) Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. Nat Genet 43(12): 1275–80.
8. Young TS, Walsh CT (2011) Identification of the thiazolyl peptide GE37468 gene cluster from Streptomyces ATCC 55365 and heterologous expression in Streptomyces lividans. Proc Natl Acad Sci USA 108(32): 13053–8.
9. Adey A, Morrison HG, Asan, Xun X, Kitzman JO, Turner EH, et al. (2010) Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. Genome Biol 2010;11(12):R119.
10. basespace.illumina.com

Nextera XT DNA 샘플 준비 키트 사양

사양	값
샘플 DNA 입력 유형	게놈 DNA, PCR 엠프리콘, 플라스미드
입력 DNA	1ng
일반적인 중간 삽입 크기	< 300bp
사용 가능한 인덱스	최대 384개
호환 시퀀서	MiSeq, NextSeq, HiSeq® 시스템
지원되는 리드 길이	모든 Illumina 시퀀싱 시스템의 모든 리드 길이 지원

주문 정보

제품	카탈로그 번호
Nextera XT DNA 샘플 준비 키트 (샘플 24개)	FC-131-1024
Nextera XT DNA 샘플 준비 키트 (샘플 96개)	FC-131-1096
Nextera XT 인덱스 키트 (인덱스 24개, 샘플 96개)	FC-131-1001
Nextera XT 인덱스 키트 (인덱스 96개, 샘플 384개)	FC-131-1002
TruSeq® 듀얼 인덱스 시퀀싱 프라이머 키트, 단일 리드(일회용 키트)*	FC-121-1003
TruSeq 듀얼 인덱스 시퀀싱 프라이머 키트, 페어드 엔드 리드(일회용 키트)*	PE-121-1003
Nextera XT 인덱스 키트 v2, 세트 A (인덱스 96개, 샘플 384개)	FC-131-2001
Nextera XT 인덱스 키트 v2, 세트 B (인덱스 96개, 샘플 384개)	FC-131-2002
Nextera XT 인덱스 키트 v2, 세트 C (인덱스 96개, 샘플 384개)	FC-131-2003
Nextera XT 인덱스 키트 v2, 세트 D (인덱스 96개, 샘플 384개)	FC-131-2004

*시퀀싱 프라이머 키트는 MiSeq 시스템을 제외한 모든 시퀀서에 필요합니다.

Illumina • 1.800.809.4566 수신자 부담 전화번호(미국) • +1.858.202.4566 일반 전화번호 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

연구 전용

© 2012–2014 Illumina, Inc. All rights reserved.
Illumina, BaseSpace, HiSeq, MiSeq, Nextera, NextSeq, TruSeq, 호박빛 주황색 및 Genetic Energy의 하단 흐름 디자인은 미국 및/또는 다른 나라에서 Illumina, Inc.의 상표입니다. 여기에 포함된 그 밖의 모든 이름, 로고 및 기타 상표는 해당 소유자의 재산입니다.
발행 번호 770-2012-011-KOR 07 4월 2015 기준 현재

illumina®