illumina®

NovaSeq 6000

Denature and Dilute Libraries Guide

개요	3
소모품 및 장비	4
Protocol A: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Standard Loading)	5
Protocol B: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Xp Loading)	9
Protocol C: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)	12
Protocol D: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)	15
Protocol E: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)	18
Protocol F: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)	23
개정 이력	30
기술 지원	31

문서 번호: 1000000106351 v03 KOR

2020년 11월

ILLUMINA PROPRIETARY

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 올바르고 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.

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

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

개요

본 가이드는 Illumina® NovaSeq 6000™ 시스템으로 시퀀싱을 수행하기 위해 준비한 라이브러리를 변성(denaturation)하고 희석(dilution)하는 방법을 설명합니다.

작업 시 본 가이드와 NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)를 함께 참조하시기 바랍니다.

라이브러리 가이드라인

하기 지침은 지원되는 모든 라이브러리 준비 방법에 적용되며, Insert(단편) 크기는 지원되는 NovaSeq 6000 애플케이션에 일반적으로 사용되는 크기라는 가정 하에 작성되었습니다.

- 최상의 결과를 위해 라이브러리의 풀링(pooling)과 변성이 완료되면 곧바로 시퀀싱을 수행합니다.
- 각 애플리케이션에 적합한 로딩 농도로 라이브러리를 희석합니다. 로딩 농도가 너무 낮거나 높으면 필터를 통과하는 클러스터의 비율(%PF)에 부정적인 영향을 줍니다. 라이브러리 농도가 낮으면 시퀀싱 중복 리드 수가 증가할 수 있습니다. 라이브러리 농도가 지나치게 높으면 %PF가 낮아질 수 있습니다.
- 최적의 %PF를 얻기 위해서는 정확한 라이브러리의 정량과 올바른 품질 관리가 중요합니다. Library Prep Kit 관련 문서에서 권장 사항을 확인하시기 바랍니다.
- Xp 프로토콜을 사용하는 경우 시퀀싱 런을 설정하기에 앞서 클러스터 카트리지의 8번 위치에 빈 라이브러리 튜브를 로딩합니다. 빈 라이브러리 튜브는 플로우 셀로 분배 전 Conditioning Mix를 준비할 때 사용합니다. Conditioning Mix는 시퀀싱의 클러스터링(clustering) 효율을 향상시켜 줍니다.

프로토콜의 종류

라이브러리 준비에 사용한 절차에 알맞은 변성 및 희석 프로토콜을 따릅니다.

- **Standard Loading(Protocol A)** — 라이브러리가 라이브러리 준비 관련 문서에서 권장하는 표준 라이브러리 정량 절차와 품질 관리 절차에 따라 표준화(normalization)됩니다. 해당 라이브러리에는 5페이지의 *Protocol A: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Standard Loading)*이 적용됩니다.
- **Xp Loading(Protocol B)** — 라이브러리가 라이브러리 준비 관련 문서에서 권장하는 표준 라이브러리 정량 절차와 품질 관리 절차에 따라 표준화됩니다. 해당 라이브러리에는 9페이지의 *Protocol B: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Xp Loading)*이 적용됩니다.
- **TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리(Standard Loading - Protocol C)** — Standard Loading을 사용하는 TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리에는 12페이지의 *Protocol C: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)*이 적용됩니다.
- **TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리(Xp Loading - Protocol D)** — Xp Loading을 사용하는 TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리에는 15페이지의 *Protocol D: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*이 적용됩니다.
- **TruSight Oncology 500 HT 라이브러리(Standard loading - Protocol E)** — Standard loading을 사용하는 TruSight Oncology 500 HT 라이브러리에는 18페이지의 *Protocol E: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)*이 적용됩니다.
- **TruSight Oncology 500 HT 라이브러리(Xp Loading - Protocol F)** — Xp Loading을 사용하는 TruSight Oncology 500 HT 라이브러리에는 23페이지의 *Protocol F: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*이 적용됩니다.

모범 사례

- 최상의 결과를 위해 라이브러리의 변성과 희석을 시작하기 전에 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지를 해동합니다. 카트리지 해동 방법은 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*를 참조하시기 바랍니다.

소모품 및 장비

소모품

라이브러리의 변성과 희석에는 다음과 같은 소모품이 필요합니다.

소모품	공급 업체	용도
[Protocol A & B] 1 N NaOH	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 변성을 위해 0.2 N으로 희석하여 사용.
[Protocol A & B] 10 mM Tris-HCl, pH 8.5	일반 실험기자재 공급 업체	변성 전 라이브러리 및 PhiX Control(선택 사항)의 희석에 사용.
[Protocol A & B] 400 mM Tris-HCl, pH 8.0	일반 실험기자재 공급 업체	변성 후 라이브러리 및 PhiX Control(선택 사항)의 중성화에 사용.
[Protocol C, D, E & F] 1 M Tris-HCl, pH 8.0	일반 실험기자재 공급 업체	변성 후 라이브러리 및 PhiX Control(선택 사항)의 중성화에 사용.
[Protocol C, D, E & F] RNase/DNase가 없는(RNase/DNase-free) 물	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 변성에 사용하는 NaOH을 희석할 때 사용. 메인터넌스 워시를 위한 Tween 20 및 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite, NaOCl)의 희석에 사용.
일회용 장갑(powder-free)	일반 실험기자재 공급 업체	범용.
1.5 ml 미세원심분리 튜브	VWR(카탈로그 번호: 20170-038) 또는 동일 사양 제품	NaOH 및 라이브러리 희석 시 양을 합칠 때 사용.
20 µl 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 희석 및 로딩을 위한 피펫팅에 사용.
200 µl 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 희석 및 로딩을 위한 피펫팅에 사용.
[Protocol A & B] 실험용수	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 변성에 사용하는 NaOH을 희석할 때 사용. 메인터넌스 워시를 위한 Tween 20 및 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite, NaOCl)의 희석에 사용.
[NovaSeq XP Workflow] 다음 키트 중 1개. • NovaSeq XP 2-Lane Kit • NovaSeq XP 4-Lane Kit	Illumina: • 카탈로그 번호: 20021664 • 카탈로그 번호: 20021665	플로우 셀에 라이브러리를 수동으로 로딩할 때 사용. • SP, S1 및 S2 Flow Cell용 2-Lane Kit • S4 Flow Cell용 4-Lane Kit
[NovaSeq XP Workflow] 다음 키트 중 1개. • NovaSeq XP 2-Lane Kit v1.5 • NovaSeq XP 4-Lane Kit v1.5	Illumina: • 카탈로그 번호: 20043130 • 카탈로그 번호: 20043131	플로우 셀에 라이브러리를 수동으로 로딩할 때 사용. • SP, S1 및 S2 Flow Cell용 2-Lane Kit • S4 Flow Cell용 4-Lane Kit
[NovaSeq Xp Workflow] 0.5 ml 튜브 및 1.7 ml 튜브	일반 실험기자재 공급 업체	ExAmp 믹싱에 사용.
[NovaSeq XP Workflow] [선택 사항] 다음 Manifold Pack 중 1개. • NovaSeq XP 2-Lane Manifold Pack • NovaSeq XP 4-Lane Manifold Pack	Illumina: • 카탈로그 번호: 20021666 • 카탈로그 번호: 20021667	라이브러리를 플로우 셀에 수동으로 로딩할 때 사용하는 여분의 NovaSeq Xp용 Manifold.
[선택 사항] PhiX Control v3	Illumina(카탈로그 번호: FC-110-3001)	PhiX Control의 spike-in에 사용.

아래 표에 명시된 라이브러리와 PhiX의 변성과 희석에 사용되는 소모품은 TruSight Oncology 500 ctDNA Library Prep Kit와 TruSight Oncology 500 HT Library Prep Kit에 포함되어 있습니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

소모품	용도
RSB	라이브러리 희석 및 PhiX Control(선택 사항) 희석과 변성에 사용.
HP3	PhiX Control(선택 사항) 변성에 사용하는 2 N NaOH.

장비

비드 기반의 방법으로 표준화된 라이브러리는 다음 장비를 통해 변성됩니다.

장비	공급 업체
[Protocol C, D, E & F] 1.5 ml 미세원심분리 튜브용 가열 블록(heat block)	일반 실험기자재 공급 업체

Protocol A: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Standard Loading)

라이브러리 준비 관련 문서에서 권장하는 표준 라이브러리 정량 절차 및 품질 관리 절차에 따라 표준화한 라이브러리를 Protocol A를 참조하여 변성 및 희석합니다.

Xp Loading의 경우 9페이지의 *Protocol B: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

TSO500 ctDNA 라이브러리를 사용하는 경우 12페이지의 *Protocol C: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)* 또는 15페이지의 *Protocol D: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

TSO500 HT 라이브러리를 사용하는 경우 18페이지의 *Protocol E: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)* 또는 23페이지의 *Protocol F: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

표준화된 라이브러리 풀 생성

다음 지침에 따라 라이브러리를 적절한 농도로 표준화한 후 풀링합니다. 동일한 플로우 셀에서 시퀀싱될 라이브러리는 반드시 하나의 표준화된 풀(pool)로 통합해야 합니다.

1 애플리케이션 및 플로우 셀별 일반적인 리드 수와 권장하는 plexity(다양성)에 대한 정보는 아래 표를 참조하시기 바랍니다.

표 1 권장 라이브러리 풀 Plexity

애플리케이션	플로우 셀	필터 통과 페어드 엔드(paired-end) 리드 수/플로우 셀(단위: billion)	라이브러리 개수/레인
인간 유전체	SP	1.3~1.6	~2
	S1	2.6~3.2	~4
	S2	6.6~8.2	~10
	S4	16~20	~24
엑솜	SP	1.3~1.6	~20
	S1	2.6~3.2	~40
	S2	6.6~8.2	~100
	S4	16~20	~250

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

애플리케이션	플로우 셀	필터 통과 페어드 엔드 리드 수/플로우 셀(단위: billion)	라이브러리 개수/레인
전사체	SP	1.3~1.6	~16
	S1	2.6~3.2	~32
	S2	6.6~8.2	~82
	S4	16~20	~200

풀링 전 라이브러리 표준화

1 원하는 최종 로딩 농도에 따라 풀링된 라이브러리의 농도를 설정합니다. 자세한 내용은 6페이지의 *권장 로딩 농도*를 참조하시기 바랍니다.

최종 로딩 농도(pM)	풀링된 라이브러리 농도(nM)
100	0.50
150	0.75
200	1
250	1.25
300	1.50
350	1.75
400	2
450	2.25
500	2.50

2 10 mM Tris-HCl(pH 8.5)를 사용하여 라이브러리를 원하는 풀링된 라이브러리 농도로 표준화합니다.
Illumina 웹사이트에서 제공하는 Pooling Calculator를 이용하시면 라이브러리의 적정 농도 희석과 관련해 도움을 받으실 수 있습니다.

권장 로딩 농도

최적의 DNA 로딩 농도는 라이브러리의 종류와 insert의 크기에 따라 달라집니다. 아래 표에는 insert의 크기가 450 bp 이하인 Illumina 라이브러리별로 권장되는 DNA 로딩 농도가 기술되어 있습니다. Insert의 크기가 더 작은 라이브러리에는 권장 로딩 농도 범위의 하한값을 적용합니다. Insert의 크기가 450 bp를 넘는 라이브러리에는 더 높은 로딩 농도를 적용해야 할 수 있습니다.

참고

Illumina의 라이브러리 준비 방법이 아닌 다른 방법에 따라 라이브러리를 생성했을 경우, 최고의 %PF를 얻기 위한 최적의 분주(seeding) 농도를 확보하려면 먼저 해당 라이브러리를 적정(titration) 해야할 수 있습니다. 이렇게 산출한 최적의 로딩 농도는 향후 동일한 종류의 라이브러리를 사용할 때 적용 가능합니다.

표 2 Standard Workflow(소프트웨어 버전 1.1 이상)에 권장하는 로딩 농도

라이브러리 종류	최종 로딩 농도(pM)	풀링된 로딩 농도(nM)
PhiX[1]	250	1.25
Illumina DNA PCR-free Library Pool	400~600[2]	2~3[2]
TruSeq DNA PCR-free Library Pool	175~350	0.875~1.75
DNA PCR-amplified Library Pool	300~600	1.5~3.0
Single Cell[3]	250~500	1.25~2.5

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

[1] PhiX 단독 런에 해당.

[2] 450 bp의 Insert 크기 중앙값, 660 g/mol의 DNA 분자량, ssQubit 농도값을 기준으로 계산된 수치.

[3] Xp Workflow에 한해 검증.

이미 HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 또는 HiSeq™ 3000에 최적화된 최종 로딩 농도가 있다면 그의 1.5배의 농도를 NovaSeq 6000에 적용하도록 합니다. 예를 들어, HiSeq X의 최종 로딩 농도가 200 pM인 경우 NovaSeq 6000에는 300 pM를 적용합니다.

표준화된 라이브러리 풀링 및 PhiX Control(선택 사항) 추가

1 아래에 명시된 용량의 라이브러리를 만들기 위해 각각의 표준화된 라이브러리로부터 적정량을 취하여 새 미세원심분리 튜브 1개에 넣어 줍니다.

모드	최종 용량(µl)
SP/S1	100
S2	150
S4	310

예를 들어, 6-plex 라이브러리 풀과 S2 모드를 사용할 경우 동일한 농도로 표준화된 라이브러리를 각각 25 µl씩 취하고, 4-plex 라이브러리 풀과 S1 모드를 사용할 경우 표준화된 변성되지 않은 라이브러리를 각각 25 µl씩 취한 후 합해 줍니다.

2 **[선택 사항]** ***풀링되지 않은*** 라이브러리가 있다면 -25~-15°C에 보관합니다.

3 **[선택 사항]** 다음과 같이 변성되지 않은 1% PhiX를 spike-in합니다.

a 10 mM Tris-HCl(pH 8.5)로 10 nM PhiX를 2.5 nM의 농도로 희석합니다.

b 적정량의 변성되지 않은 2.5 nM PhiX를 변성되지 않은 라이브러리 풀이 담긴 튜브에 넣습니다.

모드	변성되지 않은 2.5 nM PhiX(µl)	변성되지 않은 라이브러리 풀(µl)
SP/S1	0.6	100
S2	0.9	150
S4	1.9	310

균형이 잘 맞춰진 라이브러리에 권장되는 PhiX spike-in 양은 1%입니다. 다양성이 낮은 라이브러리에는 더 많은 양을 spike-in해야 할 수 있습니다. PhiX Control을 다양성이 낮은 라이브러리에 사용하려면 Illumina 기술지원팀에 먼저 문의해 주시기 바랍니다.

새로 희석된 NaOH 준비

시퀀싱 수행에 앞서 라이브러리를 변성하기 위해 0.2 NaOH을 ***새로*** 희석합니다. 피펫팅 과정에서 발생하는 미세한 오차가 NaOH의 최종 농도에 영향을 주는 것을 방지하기 위해 용액을 넉넉하게 준비합니다.

주의

새로 희석한 0.2 N NaOH는 변성 과정에 반드시 필요합니다. 변성이 불충분하면 수율이 감소할 수 있습니다.

1 미세원심분리 튜브에 아래에 명시된 용량의 시약을 넣고 1 N NaOH을 0.2 N로 희석합니다.

표 3 SP/S1/S2 모드

시약	플로우 셀 1개 용량(µl)	플로우 셀 2개 용량(µl)
실험용수	40	80
Stock 1 N NaOH	10	20

상기 명시된 용량으로는 플로우 셀 1개을 사용할 경우 50 µ의 0.2 N NaOH을, 플로우 셀 2개를 사용할 경우 100 µl의 0.2 N NaOH을 만들 수 있습니다.

표 4 S4 모드

시약	플로우 셀 1개 용량(µl)	플로우 셀 2개 용량(µl)
실험용수	80	160
Stock 1 N NaOH	20	40

상기 명시된 용량으로는 플로우 셀 1개을 사용할 경우 100 µ의 0.2 N NaOH을, 플로우 셀 2개를 사용할 경우 200 µl의 0.2 N NaOH을 만들 수 있습니다.

2 여러 번 앞뒤로 뒤집어 혼합하거나 충분히 볼텍싱합니다. 튜브의 뚜껑을 닫아 보관하고, 보관 시 ***12시간*** 이내에 사용합니다.

라이브러리 풀과 PhiX Control(선택 사항) 변성

1 다음과 같이 변성되지 않은 라이브러리 풀과 PhiX(선택 사항)가 담긴 튜브에 0.2 N NaOH을 넣습니다.

플로우 셀	0.2 N NaOH	변성되지 않은 라이브러리 풀(µl)	생성 용량
SP/S1	25	100	**125 µl, PhiX 추가 시 125.6 µl**
S2	37	150	**187 µl, PhiX 추가 시 187.9 µl**
S4	77	310	**387 µl, PhiX 추가 시 388.9 µl**

2 뚜껑을 닫은 후 짧게 볼텍싱합니다.

3 280 × g에서 최대 1분간 원심분리합니다.

4 변성을 위해 실온에서 8분간 배양(incubation)합니다.

5 중성화를 위해 다음과 같이 400 mM Tris-HCl(pH 8.0)를 넣습니다.

모드	400 mM Tris-HCl, pH 8.0(µl)	생성 용량
SP/S1	25	**150 µl, PhiX 사용 시 150.6 µl**
S2	38	**225 µl, PhiX 사용 시 225.9 µl**
S4	78	**465 µl, PhiX 사용 시 466.9 µl**

6 뚜껑을 닫은 후 짧게 볼텍싱합니다.

7 280 × g에서 최대 1분간 원심분리합니다.

8 변성된 라이브러리 또는 변성된 라이브러리와 PhiX를 전량 NovaSeq 6000 Reagent Kit와 함께 제공되는 라이브러리 튜브로 옮깁니다.

9 지체없이 라이브러리 튜브를 클러스터 카트리지에 로딩한 후 런을 설정합니다.
라이브러리 튜브가 들어 있는 시약 카트리지는 반드시 ***30분*** 이내에 기기에 로딩해야 합니다.

10 **[선택 사항]** 바로 다음 단계를 진행할 수 없다면 라이브러리 튜브의 뚜껑을 닫고 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3주까지 보관 가능합니다. 해동 후 다시 냉동하지 않습니다.

주의

라이브러리 튜브는 꼭 필요한 경우에만 보관하도록 합니다. -25~-15°C에서 장기간 보관하면 중복 리드 수가 증가하여 수율이 감소할 수 있습니다.

참고

라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Standard Workflow 섹션에 기술되어 있는 *SBS 및 클러스터 카트리지 준비* 단계로 넘어갑니다.

Protocol B: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Xp Loading)

라이브러리 준비 관련 문서에서 권장하는 표준 라이브러리 정량 절차 및 품질 관리 절차에 따라 표준화한 라이브러리를 Protocol B를 참조하여 변성 및 희석합니다. 어드레서블 레인 로딩에 관한 자세한 내용은 NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)의 NovaSeq Xp Workflow 장을 확인하시기 바랍니다.

Standard Loading을 사용하는 경우 5페이지의 *Protocol A: 시퀀싱 전 라이브러리의 풀링 및 변성(Standard Loading)*을 참조하여 진행합니다.

TSO500 ctDNA 라이브러리를 사용하는 경우 12페이지의 *Protocol C: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)* 또는 15페이지의 *Protocol D: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

TSO500 HT 라이브러리를 사용하는 경우 18페이지의 *Protocol E: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)* 또는 23페이지의 *Protocol F: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

표준화된 라이브러리 풀 생성

다음 지침에 따라 라이브러리를 적절한 농도로 표준화한 후 풀링합니다. 동일한 레인에서 시퀀싱될 라이브러리는 반드시 하나의 풀로 합쳐줘야 합니다. 레인당 표준화된 풀의 총량은 아래 표에 기술되어 있습니다. 두 개 이상의 레인에서 동일한 풀을 시퀀싱하는 경우 표 5의 값에 레인의 개수를 곱합니다.

표 5 풀링된 라이브러리의 총량

모드	풀의 총량/레인(µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Standard Workflow에서는 모든 레인의 데이터를 취합하지만, Xp Workflow에서는 각 레인으로부터 데이터를 따로 획득합니다. 따라서 Xp Workflow는 Standard Workflow보다 라이브러리 풀에 포함되어 있는 라이브러리의 개수가 더 적습니다.

애플리케이션 및 플로우 셀별 일반적인 리드 수와 권장하는 plexity에 대한 정보는 아래 표를 참조하시기 바랍니다.

표 6 권장 라이브러리 풀 Plexity

애플리케이션	플로우 셀	필터 통과 페어드 엔드 리드 수/레인(단위: billion)	라이브러리 개수/레인
인간 유전체	SP	.65~.8	1
	S1	1.3~1.6	~2
	S2	3.3~4.1	~5
	S4	4.0~5.0	~6
엑솜	SP	.65~.8	~10
	S1	1.3~1.6	~20
	S2	3.3~4.1	~50
	S4	4.0~5.0	~62

애플리케이션	플로우 셀	필터 통과 페어드 엔드 리드 수/레인(단위: billion)	라이브러리 개수/레인
전사체	SP	.65~.8	~8
	S1	1.3~1.6	~16
	S2	3.3~4.1	~41
	S4	4.0~5.0	~50

풀링 전 라이브러리 표준화

1 원하는 최종 로딩 농도에 따라 풀링된 라이브러리의 농도를 설정합니다. 자세한 내용은 10페이지의 *권장 로딩 농도*를 참조하시기 바랍니다.

최종 로딩 농도(pM)	풀링된 라이브러리 농도(nM)
100	0.5
150	0.75
200	1.0
250	1.25
300	1.5
350	1.75
400	2.0
450	2.25
500	2.5

2 10 mM Tris-HCl(pH 8.5)를 사용하여 라이브러리를 원하는 풀링된 라이브러리 농도로 표준화합니다. Pooling Calculator(support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html)를 이용하시면 라이브러리의 적정 농도 희석과 관련해 도움을 받으실 수 있습니다.

권장 로딩 농도

최적의 DNA 로딩 농도는 라이브러리의 종류와 insert의 크기에 따라 달라집니다. 아래 표에는 insert의 크기가 450 bp 이하인 Illumina 라이브러리별로 권장되는 DNA 로딩 농도가 기술되어 있습니다. Insert의 크기가 더 작은 라이브러리에는 권장 로딩 농도 범위의 하한값을 적용합니다. Insert의 크기가 450 bp를 넘는 라이브러리에는 더 높은 로딩 농도를 적용해야 할 수 있습니다.

표 7 권장 로딩 농도

라이브러리 종류	최종 로딩 농도(pM)	풀링된 로딩 농도(nM)
PhiX[1]	100	0.5
Illumina DNA PCR-free Library Pool	300~400[2]	1.5~2.0[2]
TruSeq DNA PCR-free Library Pool	115~235	0.575~1.175
DNA PCR-amplified Library Pool	200~400	1.0~2.0
Single Cell	175~275	.875~1.375

[1] PhiX 단독 런에 해당.

[2] 450 bp의 Insert 크기 중앙값, 660 g/mol의 DNA 분자량, ssQubit 농도값을 기준으로 계산된 수치.

이미 HiSeq™ X, HiSeq™ 4000 또는 HiSeq™ 3000에 최적화한 로딩 농도가 있다면 그와 비슷한 수준의 농도를 NovaSeq Xp Workflow에 적용합니다. NovaSeq Standard Workflow에 최적화한 로딩 농도가 있다면 그보다 1/3 정도 낮은 수준의 농도를 NovaSeq Xp Workflow에 적용합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

참고

최적의 분주 농도를 확보하려면 먼저 해당 라이브러리를 적정해야 할 수 있습니다. 이렇게 산출한 최적의 로딩 농도는 동일한 종류의 라이브러리를 사용할 때 적용 가능합니다.

표준화된 라이브러리 풀링 및 PhiX Control(선택 사항) 추가

1 레인별로 최종적으로 요구되는 용량의 라이브러리를 만들기 위해 각각의 표준화된 라이브러리로부터 적정량을 취하여 새 미세원심분리 튜브 1개에 넣습니다.

모드	풀의 총량/레인(μl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

예를 들어, 6-plex 라이브러리 풀과 S4 모드를 사용할 경우 동일한 농도로 표준화된 라이브러리를 각각 5 μl씩 취한 후 합해 줍니다.

2 **[선택 사항]** ***풀링되지 않은*** 라이브러리가 있다면 -25~-15°C에 보관합니다.

3 **[선택 사항]** 다음과 같이 변성되지 않은 1% PhiX를 spike-in합니다.

a 10 mM Tris-HCl(pH 8.5)로 10 nM PhiX를 0.25 nM의 농도로 희석합니다.

b 적정량의 PhiX를 변성되지 않은 라이브러리 풀이 담긴 튜브에 넣습니다.

모드	변성되지 않은 0.25 nM PhiX(μl)	변성되지 않은 라이브러리 풀(μl)
SP/S1	0.7	18
S2	0.8	22
S4	1.1	30

균형이 잘 맞춰진 라이브러리에 권장되는 PhiX spike-in 양은 1%입니다. 다양성이 낮은 라이브러리에는 더 많은 양을 spike-in해야 할 수 있습니다. PhiX Control을 다양성이 낮은 라이브러리에 사용하려면 Illumina 기술지원팀에 먼저 문의해 주시기 바랍니다.

새로 희석된 NaOH 준비

시퀀싱 수행에 앞서 라이브러리를 변성하기 위해 0.2 NaOH을 ***새로*** 희석합니다. 피펫팅 과정에서 발생하는 미세한 오차가 NaOH의 최종 농도에 영향을 주는 것을 최소화하기 위해 플로우 셀당 최소 30 μl의 희석된 NaOH을 준비합니다. 듀얼 플로우 셀 런의 경우 60 μl의 희석된 NaOH을 준비합니다.

주의

새로 희석한 0.2 N NaOH는 변성 과정에 반드시 필요합니다. 변성이 불충분하면 수율이 감소할 수 있습니다.

1 플로우 셀을 1개 사용하는 경우, 아래 명시된 용량에 따라 1 N NaOH을 0.2 N로 미세원심분리 튜브에 희석합니다.

- 실험용수(24 μl)
- Stock 1 N NaOH(6 μl)

상기 명시된 용량으로는 30 μl의 0.2 N NaOH을 만들 수 있습니다. 플로우 셀을 2개 사용하는 경우 2배의 용량을 적용합니다.

2 여러 번 앞뒤로 뒤집어 혼합하거나 충분히 볼텍싱합니다. 튜브의 뚜껑을 닫아 보관하고, 보관 시 ***12시간*** 이내에 사용합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

라이브러리 풀과 PhiX Control(선택 사항) 변성

1 다음과 같이 변성되지 않은 라이브러리 풀과 PhiX(선택 사항)가 담긴 튜브에 0.2 N NaOH을 넣습니다.

모드	0.2 N NaOH(µl)	변성되지 않은 라이브러리 풀(µl)	생성 용량
SP/S1	4.0	18.0	22.0 µl, PhiX 추가 시 22.7 µl
S2	5.0	22.0	27.0 µl, PhiX 추가 시 27.8 µl
S4	7.0	30.0	37.0 µl, PhiX 추가 시 38.1 µl

2 뚜껑을 닫은 후 짧게 볼텍싱합니다.

3 최대 280 × g에서 최대 1분간 원심분리합니다.

4 변성을 위해 실온에서 8분간 배양합니다.

5 중성화를 위해 다음과 같이 400 mM Tris-HCl(pH 8.0)를 넣습니다.

모드	400 mM Tris-HCl, pH 8.0(µl)	생성 용량
SP/S1	5.0	27.0 µl, PhiX 추가 시 27.7 µl
S2	6.0	33.0 µl, PhiX 추가 시 33.8 µl
S4	8.0	45.0 µl, PhiX 추가 시 46.1 µl

6 뚜껑을 닫은 후 짧게 볼텍싱합니다.

7 최대 280 × g에서 최대 1분간 원심분리합니다.

8 ExAmp Master Mix를 넣을 준비가 될 때까지 변성된 라이브러리는 얼음 위에 둡니다.

9 **[선택 사항]** 바로 다음 단계를 진행할 수 없다면 튜브의 뚜껑을 닫고 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3주까지 보관 가능합니다. 해동 후 다시 냉동하지 않습니다.

주의

변성되지 않은 라이브러리 튜브는 꼭 필요한 경우에만 보관하도록 합니다. 장기간 보관하면 중복 리드 수가 증가하여 수율이 감소할 수 있습니다.

참고

라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Xp Workflow 섹션에 기술되어 있는 *플로우 셀 및 도크 준비* 단계로 넘어갑니다.

Protocol C: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)

TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리용 NovaSeq Standard Workflow는 NovaSeq 6000 시스템에 로딩되는 라이브러리의 변성과 희석에 사용됩니다. 어드레서블 레인 로딩에 관한 자세한 내용은 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 NovaSeq Xp Workflow 장을 확인하시기 바랍니다. TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리용 워크플로우를 통해 준비한 라이브러리의 농도는 샘플 풀링에 바로 적용 가능한 시작 농도로 표준화됩니다.

S2 또는 S4 모드로 TSO500 ctDNA 라이브러리를 시퀀싱하는 경우에는 Protocol C를 참조합니다. 1개의 S2 Flow Cell로는 최대 8개의 라이브러리를, 1개의 S4 Flow Cell로는 최대 16개의 라이브러리를 시퀀싱할 수 있습니다.

Xp Loading을 사용하는 경우 15페이지의 *Protocol D: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

PhiX Control 준비[선택 사항]

준비

1. 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.
2. 10 nM PhiX가 들어 있는 튜브(10 µl/튜브) 1개를 해동합니다.
3. 미세원심분리 튜브 1개에 dHP3(의미: diluted HP3)이라는 라벨을 부착합니다.
4. 미세원심분리 튜브 1개에 dTris(의미: diluted Tris-HCl)라는 라벨을 부착합니다.
5. 미세원심분리 튜브 1개에 dPhiX(의미: diluted PhiX)라는 라벨을 부착합니다.

새로 희석된 NaOH 준비

1. HP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
2. 다음을 dHP3 튜브에 넣고 혼합합니다.
   - RNase/DNase가 없는 물(32.5 µl)
   - HP3(7.5 µl)
3. dHP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

새로 희석된 Tris-HCl 준비

1. 다음을 dTris 튜브에 넣고 혼합합니다.
   - RNase/DNase가 없는 물(25.0 µl)
   - 1 M Tris-HCl, pH 8.0(15.0 µl)
2. dTris를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

PhiX 희석

1. RSB를 볼텍싱하여 혼합합니다.
2. PhiX Control을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
3. 다음을 dPhiX 튜브에 넣고 혼합합니다.
   - RSB(2.0 µl)
   - PhiX Control(6.0 µl)
4. dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
5. **[선택 사항]** dPhiX는 -25~-15°C에서 최대 3개월까지 보관 가능합니다.

PhiX 변성

1. 8 µl의 dHP3을 dPhiX 튜브에 넣습니다.
2. dHP3 튜브는 폐기합니다.
3. dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
4. 실온에서 5분간 배양합니다.
5. 지체없이 8 µl의 dTris를 dPhiX 튜브에 넣어 반응을 중성화합니다.
6. dTris 튜브는 폐기합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

7 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
PhiX의 최종 농도는 2.5 nM입니다.

8 **[선택 사항]** 변성된 2.5 nM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 2주까지 보관 가능합니다.

표준화된 라이브러리 풀링

준비

플로우 셀별로 풀당 지원되는 샘플의 개수는 Illumina 웹사이트의 TruSight Oncology 500 ctDNA Support 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

1 NL(의미: Normalized Library)이라는 라벨을 부착한 플레이트를 보관 중이었다면 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

2 가열 블록을 96°C로 예열합니다.

3 얼음통을 준비합니다.

절차

1 30 µl로 용량을 설정한 피펫을 사용해 NL 플레이트 안의 라이브러리를 가볍게 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
   - 라이브러리마다 새 팁을 사용합니다.

   최상의 라이브러리 시퀀싱 성능을 위해 라이브러리 혼합 지침을 반드시 준수합니다.

2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL(의미: Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.

3 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리로부터 각각 동일한 양을 취해 PDL 튜브로 옮겨 다음과 같은 용량의 풀을 만듭니다.

모드	권장 풀 용량(µl)
S2	100
S4	200

예를 들어, 8-plex 라이브러리 풀과 S2 모드를 사용할 경우 동일한 농도로 표준화된 라이브러리를 각각 12.5 µl씩 취해 합해 줍니다.

4 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

5 PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

표준화된 라이브러리 변성

1 PDL 튜브를 가열 블록을 사용해 96°C에서 2분간 배양합니다.

2 지체없이 얼음으로 옮겨 5분간 올려 둡니다.

3 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

4 PDL 튜브를 얼음에 올려 둡니다.

안전한 정지점

안전한 정지점에서 작업을 멈출 경우 변성된 라이브러리를 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 30일까지 보관 가능합니다. 냉동된 라이브러리 풀의 경우, 다음 단계로 넘어가기 전 먼저 튜브를 해동한 후 14페이지의 *표준화된 라이브러리 변성* 과정을 반복합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

라이브러리 희석 및 PhiX Control(선택 사항) 추가

RSB 준비

1 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.

변성된 2.5 nM PhiX 준비

1 변성된 2.5 nM PhiX를 -25~-15°C에서 보관했을 경우 꺼내어 실온에서 해동합니다.

2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 희석

1 새 1.5 ml 미세원심분리 튜브에 DIL1(의미: Dilution 1)이라는 라벨을 부착합니다.

2 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

3 PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

4 다음과 같이 적정량의 PDL 및 RSB를 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	PDL(µl)	RSB(µl)	생성 용량(µl)
S2	65	160	225
S4	134	331	465

5 **[선택 사항]** 다음과 같이 적정량의 변성된 2.5 nM PhiX를 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	2.5 nM PhiX(µl)	생성 용량(µl)
S2	0.9	225.9
S4	1.9	466.9

6 DIL1 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

7 DIL1 튜브를 짧게 원심분리합니다.

8 DIL1을 전량 NovaSeq 6000 Reagent Kit와 함께 제공되는 라이브러리 튜브로 옮깁니다.

9 지체없이 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Standard Workflow 섹션에 기술되어 있는 *SBS 및 클러스터 카트리지 준비* 단계로 넘어갑니다.
라이브러리 튜브가 들어 있는 시약 카트리지는 반드시 ***30분*** 이내에 기기에 로딩해야 합니다.

Protocol D: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)

TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리용 NovaSeq Xp Workflow는 NovaSeq 6000 시스템에 어드레서블 로딩될 라이브러리를 변성하고 희석하는 데에 사용됩니다. TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리용 워크플로우를 통해 준비한 라이브러리의 농도는 샘플 풀링에 바로 적용 가능한 시작 농도로 표준화됩니다. 어드레서블 레인 로딩에 관한 자세한 내용은 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 NovaSeq Xp Workflow 장을 확인하시기 바랍니다.

어드레서블 레인 로딩을 위해 S4 모드로 TSO500 ctDNA 라이브러리를 시퀀싱하는 경우에는 Protocol D를 참조합니다. 레인당 최대 6개의 라이브러리를 시퀀싱할 수 있습니다.

Standard Loading을 사용하는 경우 12페이지의 *Protocol C: TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)*을 참조하여 진행합니다.

PhiX Control 준비[선택 사항]

준비

1. 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.
2. 10 nM PhiX가 들어 있는 튜브(10 µl/튜브) 1개를 해동합니다.
3. 미세원심분리 튜브 1개에 dHP3(의미: diluted HP3)이라는 라벨을 부착합니다.
4. 미세원심분리 튜브 1개에 dTris(의미: diluted Tris-HCl)라는 라벨을 부착합니다.
5. 미세원심분리 튜브 1개에 dPhiX(의미: diluted PhiX)라는 라벨을 부착합니다.

새로 희석된 Tris-HCl 준비

1. HP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
2. 다음을 dHP3 튜브에 넣고 혼합합니다.
   - RNase/DNase가 없는 물(32.5 µl)
   - HP3(7.5 µl)
3. dHP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

새로 희석된 Tris-HCl 준비

1. 다음을 dTris 튜브에 넣고 혼합합니다.
   - RNase/DNase가 없는 물(25.0 µl)
   - 1 M Tris-HCl, pH 8.0(15.0 µl)
2. dTris를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

PhiX 희석

1. RSB를 볼텍싱하여 혼합합니다.
2. PhiX Control을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
3. 다음을 dPhiX 튜브에 넣고 혼합합니다.
   - RSB(2.0 µl)
   - PhiX Control(6.0 µl)
4. dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
5. **[선택 사항]** dPhiX는 -25~-15°C에서 최대 3개월까지 보관 가능합니다.

PhiX 변성

1. 8 µl의 dHP3을 dPhiX 튜브에 넣습니다.
2. dHP3 튜브는 폐기합니다.
3. dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
4. 실온에서 5분간 배양합니다.
5. 지체없이 8 µl의 dTris를 dPhiX 튜브에 넣어 반응을 중성화합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

6 dTris 튜브는 폐기합니다.
7 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
8 희석 및 변성된 PhiX 용액에 216 µl의 RSB를 넣습니다.
9 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
PhiX의 최종 농도는 0.25 nM입니다.
10 **[선택 사항]** 변성된 0.25 nM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 2주까지 보관 가능합니다.

표준화된 라이브러리 풀링

준비

플로우 셀별로 풀당 지원되는 샘플의 개수는 Illumina 웹사이트의 TruSight Oncology 500 ctDNA Support 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

1 NL(의미: Normalized Library)이라는 라벨을 부착한 플레이트를 보관 중이었다면 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
2 가열 블록을 96°C로 예열합니다.
3 얼음통을 준비합니다.

절차

1 30 µl로 용량을 설정한 피펫을 사용해 NL 플레이트 안의 라이브러리를 가볍게 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
  - 라이브러리마다 새 팁을 사용합니다.
  최상의 라이브러리 시퀀싱 성능을 위해 라이브러리 혼합 지침을 반드시 준수합니다.
2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL_L1(의미: Pooled DNA Libraries_Lane 1)이라는 라벨을 부착합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다(표 8 참조).

표 8 PDL 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

3 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리를 각각 5 µl씩 PDL 튜브로 옮깁니다. 사용하는 레인이 더 있다면 레인마다 이 과정을 반복합니다.
4 각각의 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
5 각각의 PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

표준화된 라이브러리 변성

1 각각의 PDL 튜브를 가열 블록을 사용해 96°C에서 2분간 배양합니다.
2 지체없이 얼음으로 옮겨 5분간 올려 둡니다.
3 각각의 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
4 PDL 튜브를 얼음에 올려 둡니다.

안전한 정지점

안전한 정지점에서 작업을 멈출 경우 변성된 라이브러리를 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 30일까지 보관 가능합니다. 냉동된 라이브러리 풀의 경우, 다음 단계로 넘어가기 전에 먼저 튜브를 해동한 후 17페이지의 *표준화된 라이브러리 변성* 과정을 반복합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

라이브러리 희석 및 PhiX Control(선택 사항) 추가

RSB 준비

1 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.

변성된 0.25 nM PhiX 준비

1 변성된 0.25 nM PhiX를 -25~-15°C에서 보관 중이었다면 꺼내어 실온에서 해동합니다.
2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 희석

1 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 DIL1_L1(의미: Dilution 1_Lane 1)이라는 라벨을 부착합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다(표 9 참조).

표 9 DIL1 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

2 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
3 PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.
4 다음과 같이 적정량의 PDL 및 RSB를 각각의 DIL1 튜브로 옮깁니다.

모드	PDL(µl)	RSB(µl)	생성 용량(µl)
S4	6.8	38.2	45

5 **[선택 사항]** 다음과 같이 적정량의 변성된 0.25 nM PhiX를 각각의 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	0.25 nM PhiX(µl)	생성 용량(µl)
S4	1.1	46.1

6 DIL1 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
7 DIL1 튜브를 짧게 원심분리합니다.
8 라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Xp Workflow 섹션에 기술되어 있는 *플로우 셀 및 도크 준비* 단계로 넘어갑니다.

Protocol E: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)

TruSight Oncology 500 HT 라이브러리용 NovaSeq Standard Workflow는 NovaSeq 6000 시스템에 로딩되는 라이브러리의 변성과 희석에 사용됩니다. Standard Loading에 관한 자세한 내용은 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 NovaSeq Standard Workflow 장을 확인하시기 바랍니다. TruSight Oncology 500 HT 워크플로우를 통해 준비한 라이브러리의 농도는 샘플 풀링에 바로 적용 가능한 시작 농도로 표준화됩니다.

Standard Loading을 사용해 S1, S2 또는 S4 모드로 TSO500 HT 라이브러리를 시퀀싱하는 경우에는 Protocol E를 참조합니다. SP Flow Cell당 최대 16개, S1 Flow Cell당 최대 32개, S2 Flow Cell당 최대 72개, S4 Flow Cell당 최대 192개의 샘플을 시퀀싱할 수 있습니다.

플로우 셀별로 풀당 지원되는 샘플의 개수는 Illumina 웹사이트의 TruSight Oncology 500 ctDNA Support 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

Xp Loading을 사용하는 경우 23페이지의 *Protocol F: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)*을 참조하여 진행합니다.

PhiX Control 준비[선택 사항]

준비

1 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.

2 10 nM PhiX가 들어 있는 튜브(10 µl/튜브) 1개를 해동합니다.

3 미세원심분리 튜브 1개에 dHP3(의미: diluted HP3)이라는 라벨을 부착합니다.

4 미세원심분리 튜브 1개에 dTris(의미: diluted Tris-HCl)라는 라벨을 부착합니다.

5 미세원심분리 튜브 1개에 dPhiX(의미: diluted PhiX)라는 라벨을 부착합니다.

새로 희석된 NaOH 준비

1 HP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

2 다음을 dHP3 튜브에 넣고 혼합합니다.
- RNase/DNase가 없는 물(32.5 µl)
- HP3(7.5 µl)

3 dHP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

새로 희석된 Tris-HCl 준비

1 다음을 dTris 튜브에 넣고 혼합합니다.
- RNase/DNase가 없는 물(25.0 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 8.0(15.0 µl)

2 dTris를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

PhiX 희석

1 RSB를 볼텍싱하여 혼합합니다.

2 PhiX Control을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

3 다음을 dPhiX 튜브에 넣고 혼합합니다.
- RSB(2.0 µl)
- PhiX Control(6.0 µl)

4 dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

5 **[선택 사항]** dPhiX는 -25~-15°C에서 최대 3개월까지 보관 가능합니다.

PhiX 변성

1 8 µl의 dHP3을 dPhiX 튜브에 넣습니다.

2 dHP3 튜브는 폐기합니다.
3 dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
4 실온에서 5분간 배양합니다.
5 지체없이 8 µl의 dTris를 dPhiX 튜브에 넣어 반응을 중성화합니다.
6 dTris 튜브는 폐기합니다.
7 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
PhiX의 최종 농도는 2.5 nM입니다.
8 **[선택 사항]** 변성된 2.5 nM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 2주까지 보관 가능합니다.

표준화된 라이브러리 풀링

준비

플로우 셀별로 풀당 지원되는 샘플의 개수는 Illumina 웹사이트의 TruSight Oncology 500 ctDNA Support 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

1 NL(의미: Normalized Library)이라는 라벨을 부착한 플레이트를 보관 중이었다면 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
2 가열 블록을 96°C로 예열합니다.
3 얼음통을 준비합니다.

절차

1 30 µl로 용량을 설정한 멀티채널 피펫을 사용해 NL 플레이트 안의 라이브러리를 가볍게 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
- 라이브러리마다 새 팁을 사용합니다.

라이브러리를 풀링 전에 충분히 혼합하지 않으면 라이브러리 시퀀싱 성능이 감소됩니다.

2 다음 옵션 중 하나를 선택하여 표준화된 라이브러리를 풀링합니다.
- RNA 샘플과 DNA 샘플에서 유래한 라이브러리를 동시에 시퀀싱하려면 20페이지의 *RNA 및 DNA 풀링*을 확인하시기 바랍니다.
- DNA 샘플에서 유래한 라이브러리만 시퀀싱하려면 21페이지의 *DNA 단독 풀링*을 확인하시기 바랍니다.

RNA 및 DNA 풀링

1 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PRL(의미: Pooled RNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 40개가 넘는 RNA(cDNA) 라이브러리를 풀링하는 경우 추가로 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 TPRL(의미: Transferred Pooled RNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.

2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL(의미: Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 40개가 넘는 DNA 라이브러리를 풀링하는 경우 추가로 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 TPDL(의미: Transferred Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.

3 NL 플레이트 안의 표준화된 RNA 라이브러리로부터 각각 5 µl씩 취해 PRL 튜브로 옮깁니다.
4 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리를 각각 5 µl씩 PDL 튜브로 옮깁니다.
5 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
6 각각의 튜브를 짧게 원심분리합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

7 PRL 튜브에 40개가 넘는 RNA 라이브러리가 들어 있는 경우 PRL 튜브로부터 200 µl를 취하여 TPRL 튜브로 옮긴 후 PRL 튜브를 폐기합니다.

8 PDL 튜브에 40개가 넘는 DNA 라이브러리가 들어 있는 경우 PDL 튜브로부터 200 µl를 취하여 TPDL 튜브로 옮긴 후 PDL 튜브를 폐기합니다.

9 21페이지의 *표준화된 라이브러리 변성* 단계로 넘어갑니다.

DNA 단독 풀링

1 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL(의미: Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
  - 40개가 넘는 DNA 라이브러리를 풀링하는 경우 추가로 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 TPDL(의미: Transferred Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.

2 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리를 각각 5 µl씩 PDL 튜브로 옮깁니다.

3 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

4 PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

5 PDL 튜브에 40개가 넘는 DNA 라이브러리가 들어 있는 경우 PDL 튜브로부터 200 µl를 취하여 TPDL 튜브로 옮긴 후 PDL 튜브를 폐기합니다.

표준화된 라이브러리 변성

1 다음의 튜브를 각각 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
  - PRL(RNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPRL(RNA 라이브러리 수 > 40개)
  - PDL(DNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPDL(DNA 라이브러리 수 > 40개)

2 가열 블록을 사용해 96°C에서 2분간 배양합니다.

3 지체없이 얼음으로 옮겨 5분간 올려 둡니다.

4 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

5 튜브를 얼음에 올려 둡니다.

안전한 정지점

안전한 정지점에서 작업을 멈출 경우 변성된 라이브러리를 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 30일까지 보관 가능합니다. 냉동된 라이브러리 풀의 경우 다음 단계로 넘어가기 전에 먼저 튜브를 해동한 후 26페이지의 *표준화된 라이브러리 변성* 과정을 반복합니다.

라이브러리 희석 및 PhiX Control(선택 사항) 추가

RSB 준비

1 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.

변성된 2.5 nM PhiX 준비

1 변성된 2.5 nM PhiX를 -25~-15°C에서 보관 중이었다면 꺼내 실온에 도달할 때까지 해동합니다.

2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 희석

1 새 1.5 ml 미세원심분리 튜브에 DIL1(의미: Dilution 1)이라는 라벨을 부착합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

2 다음 옵션 중 하나를 선택하여 라이브러리를 희석합니다.
- RNA 샘플과 DNA 샘플에서 유래한 라이브러리를 동시에 시퀀싱하려면 22페이지의 *RNA 및 DNA 라이브러리 희석*을 확인하시기 바랍니다.
- DNA 샘플에서 유래한 라이브러리만 시퀀싱하려면 23페이지의 *DNA 라이브러리 단독 희석*을 확인하시기 바랍니다.

RNA 및 DNA 라이브러리 희석

1 다음의 튜브를 각각 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- PRL(RNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPRL(RNA 라이브러리 수 > 40개)
- PDL(DNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPDL(DNA 라이브러리 수 > 40개)

2 적정량의 변성된 PRL 또는 TPRL을 DIL1 튜브로 옮깁니다.

모드	PRL 또는 TPRL(µl)
SP/S1	10.4
S2	15.6
S4	32.2

3 적정량의 변성된 PDL 또는 TPDL을 DIL1 튜브로 옮깁니다.

모드	PDL 또는 TPDL(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	41.6	52
S2	62.4	78
S4	128.8	161

4 적정량의 RSB를 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	RSB(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	98	150
S2	147	225
S4	304	465

5 **[선택 사항]** 적정량의 변성된 2.5 nM PhiX를 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	2.5 nM PhiX(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	0.6	150.6
S2	0.9	225.9
S4	1.9	466.9

6 DIL1 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

7 DIL1 튜브를 짧게 원심분리합니다.

8 DIL1을 전량 NovaSeq 6000 Reagent Kit와 함께 제공되는 라이브러리 튜브로 옮깁니다.

9 지체없이 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Standard Workflow 섹션에 기술되어 있는 *SBS 및 클러스터 카트리지 준비* 단계로 넘어갑니다.
라이브러리 튜브가 들어 있는 시약 카트리지는 반드시 ***30분*** 이내에 기기에 로딩해야 합니다.

참고

TSO500 HT 라이브러리 시퀀싱에는 10 index cycles를 사용합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

DNA 라이브러리 단독 희석

1 튜브를 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- PDL(DNA 라이브러리 수 ≤ 40개)
- TPDL(DNA 라이브러리 수 > 40개)

2 적정량의 PDL 또는 TPDL을 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	PDL 또는 TPDL(µl)
SP/S1	52
S2	78
S4	161

3 적정량의 RSB를 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	RSB(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	98	150
S2	147	225
S4	304	465

4 **[선택 사항]** 적정량의 변성된 2.5 nM PhiX를 DIL1 튜브에 넣습니다.

모드	2.5 nM PhiX(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	0.6	150.6
S2	0.9	225.9
S4	1.9	466.9

5 DIL1 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

6 DIL1 튜브를 짧게 원심분리합니다.

7 DIL1을 전량 NovaSeq 6000 Reagent Kit와 함께 제공되는 라이브러리 튜브로 옮깁니다.

8 지체없이 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Standard Workflow 섹션에 기술되어 있는 *SBS 및 클러스터 카트리지 준비* 단계로 넘어갑니다.
라이브러리 튜브가 들어 있는 시약 카트리지는 반드시 ***30분*** 이내에 기기에 로딩해야 합니다.

참고
TSO500 HT 라이브러리 시퀀싱에는 10 index cycles를 사용합니다.

Protocol F: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Xp Loading)

TruSight Oncology 500 HT 라이브러리용 NovaSeq Xp Workflow는 NovaSeq 6000 시스템에 로딩되는 라이브러리의 변성과 희석에 사용됩니다. 어드레서블 레인 로딩에 관한 자세한 내용은 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 NovaSeq Xp Workflow 장을 확인하시기 바랍니다. TruSight Oncology 500 HT 워크플로우를 통해 준비한 라이브러리의 농도는 샘플 풀링에 바로 적용 가능한 시작 농도로 표준화됩니다.

Xp Loading을 사용해 SP, S1, S2 또는 S4 모드로 TSO500 HT 라이브러리를 시퀀싱하는 경우에는 Protocol F를 참조합니다. SP Flow Cell에서는 레인당 최대 8개, S1 Flow Cell에서는 레인당 최대 16개, S2 Flow Cell은 레인당 최대 36개, S4 Flow Cell은 레인당 최대 48개의 샘플을 시퀀싱할 수 있습니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

플로우 셀별로 풀당 지원되는 샘플의 개수는 Illumina 웹사이트의 TruSight Oncology 500 ctDNA Support 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

Standard Loading을 사용하는 경우 18페이지의 *Protocol E: TruSight Oncology 500 HT 라이브러리 변성 및 희석 방법(Standard Loading)*을 참조하여 진행합니다.

PhiX Control 준비[선택 사항]

준비

1 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.

2 10 nM PhiX가 들어 있는 튜브(10 µl/튜브) 1개를 해동합니다.

3 미세원심분리 튜브 1개에 dHP3(의미: diluted HP3)이라는 라벨을 부착합니다.

4 미세원심분리 튜브 1개에 dTris(의미: diluted Tris-HCl)라는 라벨을 부착합니다.

5 미세원심분리 튜브 1개에 dPhiX(의미: diluted PhiX)라는 라벨을 부착합니다.

새로 희석된 NaOH 준비

1 HP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

2 다음을 dHP3 튜브에 넣고 혼합합니다.
- RNase/DNase가 없는 물(32.5 µl)
- HP3(7.5 µl)

3 dHP3을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

새로 희석된 Tris-HCl 준비

1 다음을 dTris 튜브에 넣고 혼합합니다.
- RNase/DNase가 없는 물(25.0 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 8.0(15.0 µl)

2 dTris를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

PhiX 희석

1 RSB를 볼텍싱하여 혼합합니다.

2 PhiX Control을 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

3 다음을 dPhiX 튜브에 넣고 혼합합니다.
- RSB(2.0 µl)
- PhiX Control(6.0 µl)

4 dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

5 **[선택 사항]** dPhiX는 -25~-15°C에서 최대 3개월까지 보관 가능합니다.

PhiX 변성

1 8 µl의 dHP3을 dPhiX 튜브에 넣습니다.

2 dHP3 튜브는 폐기합니다.

3 dPhiX 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

4 실온에서 5분간 배양합니다.

5 지체없이 8 µl의 dTris를 dPhiX 튜브에 넣어 반응을 중성화합니다.

6 dTris 튜브는 폐기합니다.

7 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

8 216 µl의 RSB를 dPhiX 튜브에 넣습니다.

9 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
PhiX의 최종 농도는 0.25 nM입니다.

10 **[선택 사항]** 변성된 0.25 nM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 2주까지 보관 가능합니다.

표준화된 라이브러리 풀링

준비

플로우 셀별로 풀당 지원되는 샘플의 개수는 Illumina 웹사이트의 TruSight Oncology 500 ctDNA Support 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

1 NL(의미: Normalized Library)이라는 라벨을 부착한 플레이트를 보관 중이었다면 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

2 가열 블록을 96°C로 예열합니다.

3 얼음통을 준비합니다.

절차

1 30 µl로 용량을 설정한 멀티채널 피펫을 사용해 NL 플레이트 안의 라이브러리를 가볍게 5회 피펫팅하여 혼합합니다.
- 라이브러리마다 새 팁을 사용합니다.

라이브러리를 풀링 전에 충분히 혼합하지 않으면 라이브러리 시퀀싱 성능이 감소됩니다.

2 다음 옵션 중 하나를 선택하여 표준화된 라이브러리를 풀링합니다.
- RNA 샘플과 DNA 샘플에서 유래한 라이브러리를 동시에 시퀀싱하려면 25페이지의 *RNA 및 DNA 풀링*을 확인하시기 바랍니다.
- DNA 샘플에서 유래한 라이브러리만 시퀀싱하려면 26페이지의 *DNA 단독 풀링*을 확인하시기 바랍니다.

참고
절차 진행 시 라벨 표기법 표를 참조하여 튜브에 라벨을 부착합니다. 용액을 옮길 튜브에 부착된 라벨이 상응하는 플로우 셀 레인에 맞는 라벨인지 확인합니다.

RNA 및 DNA 풀링

1 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PRL이라는 라벨을 부착하고 플로우 셀 레인 번호를 표기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다. 라벨 표기 방법은 표 10을 참조하시기 바랍니다.
- 40개가 넘는 RNA(cDNA) 라이브러리를 풀링하는 경우 추가로 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 TPRL이라는 라벨을 부착하고 플로우 셀 레인 번호를 표기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

표 10 RNA 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
SP/S1	PRL_L1	PRL_L2	해당 없음	해당 없음
S2	PRL_L1	PRL_L2	해당 없음	해당 없음
S4	PRL_L1	PRL_L2	PRL_L3	PRL_L4

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL이라는 라벨을 부착하고 플로우 셀 레인 번호를 표기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다. 라벨 표기 방법은 표 11을 참조하시기 바랍니다.

- 40개가 넘는 DNA 라이브러리를 풀링하는 경우 추가로 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 TPDL이라는 라벨을 부착하고 플로우 셀 레인 번호를 표기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

표 11 DNA 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
SP/S1	PDL_L1	PDL_L2	해당 없음	해당 없음
S2	PDL_L1	PDL_L2	해당 없음	해당 없음
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

3 NL 플레이트 안의 표준화된 RNA 라이브러리로부터 각각 5 µl씩 취해 PRL 튜브로 옮깁니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

4 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리를 각각 5 µl씩 PDL 튜브로 옮깁니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

5 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

6 각각의 튜브를 짧게 원심분리합니다.

7 PRL 튜브에 40개가 넘는 RNA 라이브러리가 들어 있는 경우 PRL 튜브로부터 200 µl를 취하여 TPRL 튜브로 옮긴 후 PRL 튜브를 폐기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

8 PDL 튜브에 40개가 넘는 DNA 라이브러리가 들어 있는 경우 PDL 튜브로부터 200 µl를 취하여 TPDL 튜브로 옮긴 후 PDL 튜브를 폐기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

9 26페이지의 *표준화된 라이브러리 변성* 단계로 넘어갑니다.

DNA 단독 풀링

1 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL이라는 라벨을 부착하고 플로우 셀 레인 번호를 표기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.
라벨 표기 방법은 표 12를 참조하시기 바랍니다.

표 12 DNA 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
SP/S1	PDL_L1	PDL_L2	해당 없음	해당 없음
S2	PDL_L1	PDL_L2	해당 없음	해당 없음
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- 40개가 넘는 DNA 라이브러리를 풀링하는 경우 추가로 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 TPRL(의미: Transferred Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착하고 플로우 셀 레인 번호를 표기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

2 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리를 각각 5 µl씩 PDL 튜브로 옮깁니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

3 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

4 각각의 튜브를 짧게 원심분리합니다.

5 PDL 튜브에 40개가 넘는 DNA 라이브러리가 들어 있는 경우 PDL 튜브로부터 200 µl를 취하여 TPDL 튜브로 옮긴 후 PDL 튜브를 폐기합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다.

표준화된 라이브러리 변성

1 다음의 튜브를 각각 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.

- PRL(RNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPRL(RNA 라이브러리 수 > 40개)
- PDL(DNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPDL(DNA 라이브러리 수 > 40개)

2 가열 블록을 사용해 96°C에서 2분간 배양합니다.

3 지체없이 얼음으로 옮겨 5분간 올려 둡니다.

4 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

5 튜브를 얼음에 올려 둡니다.

안전한 정지점

안전한 정지점에서 작업을 멈출 경우 변성된 라이브러리를 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 30일까지 보관 가능합니다. 냉동된 라이브러리 풀의 경우, 다음 단계로 넘어가기 전 먼저 튜브를 해동한 후 26페이지의 *표준화된 라이브러리 변성* 과정을 반복합니다.

라이브러리 희석 및 PhiX Control(선택 사항) 추가

RSB 준비

1 2~8°C 또는 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB(Resuspension Buffer)를 꺼내 실온에 도달할 때까지 방치합니다.

변성된 0.25 nM PhiX 준비

1 변성된 0.25 nM PhiX를 -25~-15°C에서 보관했을 경우 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동합니다.

2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 희석

1 다음 옵션 중 하나를 선택하여 라이브러리를 희석합니다.
- RNA 샘플과 DNA 샘플에서 유래한 라이브러리를 동시에 시퀀싱하려는 경우 27페이지의 *RNA 및 DNA 라이브러리 희석*을 참조하시기 바랍니다.
- DNA 샘플에서 유래한 라이브러리만 시퀀싱하려는 경우 28페이지의 *DNA 라이브러리 단독 희석*을 참조하시기 바랍니다.

RNA 및 DNA 라이브러리 희석

1 PRL 라이브러리와 PDL 라이브러리를 혼합하기 위해 새 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 라벨을 부착합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다. 라벨 표기 방법은 표 13을 참조하시기 바랍니다.

표 13 PRL 및 PDL 혼합 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
SP/S1	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	해당 없음	해당 없음
S2	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	해당 없음	해당 없음
S4	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	PRL+PDL_L3	PRL+PDL_L4

2 다음의 튜브를 각각 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- PRL(RNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPRL(RNA 라이브러리 수 > 40개)
- PDL(DNA 라이브러리 수 ≤ 40개) 또는 TPDL(DNA 라이브러리 수 > 40개)

3 PRL 튜브 또는 TPRL 튜브에서 5 µl를 취하여 상응하는 PRL+PDL 튜브로 옮깁니다.

4 PDL 튜브 또는 TPDL 튜브에서 20 µl를 취하여 상응하는 PRL+PDL 튜브로 옮깁니다.

5 PRL+PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

6 PRL+PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

7 혼합된 PRL+PDL 라이브러리를 희석하기 위해 새 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 라벨을 부착합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다. 라벨 표기 방법은 표 14를 참조하시기 바랍니다.

표 14 DIL 1 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
SP/S1	DIL1_L1	DIL1_L2	해당 없음	해당 없음
S2	DIL1_L1	DIL1_L2	해당 없음	해당 없음
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

8 적정량의 혼합된 PRL 및 PDL을 취하여 각각의 상응하는 DIL1 튜브로 옮깁니다.

플로우 셀	PRL+PDL(µl)
SP/S1	4
S2	5
S4	6.8

9 적정량의 RSB를 취하여 각각의 상응하는 DIL1 튜브에 넣습니다.

플로우 셀	RSB(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	23	27
S2	28	33
S4	38.2	45

10 **[선택 사항]** 적정량의 변성된 0.25 nM PhiX를 각각의 상응하는 DIL1 튜브에 넣습니다.

플로우 셀	0.25 nM PhiX(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	0.7	27.7
S2	0.8	33.8
S4	1.1	46.1

11 DIL1 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

12 DIL1 튜브를 짧게 원심분리합니다.

13 라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Xp Workflow 섹션에 기술되어 있는 *플로우 셀 및 도크 준비* 단계로 넘어갑니다.

참고

TSO500 HT 라이브러리 시퀀싱에는 10 index cycles를 사용합니다.

DNA 라이브러리 단독 희석

1 PDL 라이브러리를 희석하기 위해 새 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 라벨을 부착합니다. 사용하는 레인이 더 있다면 이 과정을 반복합니다. 라벨 표기 방법은 표 15를 참조하시기 바랍니다.

표 15 튜브 라벨 표기법

플로우 셀	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
SP/S1	DIL1_L1	DIL1_L2	해당 없음	해당 없음
S2	DIL1_L1	DIL1_L2	해당 없음	해당 없음
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

2 PDL 튜브 또는 TPDL 튜브를 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.

3 적정량의 PDL 또는 TPDL을 각각의 상응하는 DIL1 튜브로 옮깁니다.

플로우 셀	PDL 또는 TPDL(µl)
SP/S1	4
S2	5
S4	6.8

4 적정량의 RSB를 취하여 각각의 상응하는 DIL1 튜브에 넣습니다.

플로우 셀	RSB(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	23	27
S2	28	33
S4	38.2	45

5 **[선택 사항]** 적정량의 변성된 0.25 nM PhiX를 각각의 상응하는 DIL1 튜브에 넣습니다.

플로우 셀	0.25 nM PhiX(µl)	생성 용량(µl)
SP/S1	0.7	27.7
S2	0.8	33.8
S4	1.1	46.1

6 DIL1 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.

7 DIL1 튜브를 짧게 원심분리합니다.

8 라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면 *NovaSeq 6000 시스템 가이드(문서 번호: 1000000019358)*의 Xp Workflow 섹션에 기술되어 있는 *플로우 셀 및 도크 준비* 단계로 넘어갑니다.

참고

TSO500 HT 라이브러리 시퀀싱에는 10 index cycles를 사용합니다.

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

개정 이력

문서	일자	개정 내용
문서 번호: 1000000106351 v03	2020년 11월	TruSight Oncology 500 High Throughput 라이브러리 시퀀싱의 인덱스 사이클에 관한 정보 추가.
문서 번호: 1000000106351 v02	2020년 7월	NovaSeq 6000 Reagent Kit v1.5의 지원에 관한 정보 추가.
문서 번호: 1000000106351 v01	2020년 3월	TruSight Oncology 500 HT Standard Loading 및 Xp Loading 방법에 적용되는 Protocol E 및 Protocol F 추가.
문서 번호: 1000000106351 v00	2020년 1월	최초 발행.

기술 지원

기술 지원은 Illumina 기술지원팀에 요청하시기 바랍니다.

웹사이트:	www.illumina.com
이메일:	techsupport@illumina.com

Illumina 고객지원팀 연락처

지역	무료 전화 번호	지역 전화 번호
북미	+1.800.809.4566	
호주	+1.800.775.688	
오스트리아	+43 800006249	+43 19286540
벨기에	+32 80077160	+32 34002973
중국	400.066.5835	
덴마크	+45 80820183	+45 89871156
핀란드	+358 800918363	+358 974790110
프랑스	+33 805102193	+33 170770446
독일	+49 8001014940	+49 8938035677
홍콩, 중국	800960230	
아일랜드	+353 1800936608	+353 016950506
이탈리아	+39 800985513	+39 236003759
일본	0800.111.5011	
네덜란드	+31 8000222493	+31 207132960
뉴질랜드	0800.451.650	
노르웨이	+47 800 16836	+47 21939693
싱가포르	+1.800.579.2745	
대한민국	+82 80 234 5300	
스페인	+34 911899417	+34 800300143
스웨덴	+46 850619671	+46 200883979
스위스	+41 565800000	+41 800200442
대만, 중국	00806651752	
영국	+44 8000126019	+44 2073057197
기타 국가	+44.1799.534000	

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 이외 지역)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.