

MiSeq System

Denature and Dilute Libraries Guide

개요	3
소모품 및 장비	4
Protocol A: Standard Normalization	4
Protocol B: Bead-Based Normalization	6
Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization	7
Protocol D: AmpliSeq Library Equalizer for Illumina Normalization	9
PhiX Control 변성 및 희석	10
부가 정보	11
다음 단계	12
개정 이력	13
기술 지원	14



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.

© 2019 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® MiSeq® 시스템으로 시퀀싱을 수행하기 위해 준비한 라이브러리(library)를 변성(denaturation)하고 희석(dilution)하는 방법을 설명합니다.

본 가이드는 시퀀싱 Control로 사용할 PhiX 라이브러리를 준비하는 지침을 포함하고 있습니다.

로딩 볼륨 및 농도

다음 절차에 따라 라이브러리를 최종 볼륨인 600 µl로 변성하고 희석합니다. 권장 로딩 농도는 시퀀싱 런에 사용되는 MiSeq Reagent Kit의 버전에 따라 차이가 있습니다. 실제 로딩 농도는 라이브러리 준비 방법과 정량(quantification) 방법에 따라 결정됩니다.

Chemistry	권장 최종 로딩 농도
MiSeq Reagent Kit v3	6~20 pM의 로딩 농도 지원. 희석 및 변성 전 최소 4 nM 라이브러리 필요.
MiSeq Reagent Kit v2	6~10 pM의 로딩 농도 지원.

프로토콜의 종류

라이브러리 준비에 사용한 절차에 알맞은 변성 및 희석 프로토콜을 따릅니다.

- ▶ **Standard Normalization** – 라이브러리 준비 관련 문서에서 권장하는 표준 라이브러리 정량 절차와 품질 관리 절차에 따라 라이브러리 표준화(normalization). 이 경우 라이브러리에는 **Protocol A** 적용. 자세한 내용은 4페이지의 *Protocol A: Standard Normalization* 섹션 참조.
- ▶ **Bead-Based Normalization** – 비드 기반의 표준화를 지원하는 방법을 사용하는 경우, 라이브러리 준비 관련 문서에 기술된 비드 기반 절차에 따라 라이브러리 표준화. 이 경우 라이브러리에는 **Protocol B** 적용. 자세한 내용은 6페이지의 *Protocol B: Bead-Based Normalization* 섹션 참조.
- ▶ **AmpliSeq™ for Illumina Normalization** – 표준 AmpliSeq for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 모든 라이브러리에는 **Protocol C** 적용. 자세한 내용은 7페이지의 *Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization* 섹션 참조.
- ▶ **AmpliSeq Library Equalizer™ for Illumina Normalization** – AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 모든 라이브러리에는 **Protocol D** 적용. 자세한 내용은 9페이지의 *Protocol D: AmpliSeq Library Equalizer for Illumina Normalization* 섹션 참조.

모범 사례

- ▶ **항상** 클러스터 생성을 위해 라이브러리를 변성할 때는 새로 희석한 NaOH을 준비하도록 합니다. 이 단계는 변성 과정에 반드시 필요합니다.
- ▶ 피펫팅 과정에서 발생하는 미세한 오차가 NaOH의 최종 농도에 영향을 주는 것을 방지하기 위해 최소 1 ml의 새로 희석한 NaOH을 준비합니다.
- ▶ 최상의 결과를 위해 라이브러리를 변성하고 희석하기 전에 시약 카트리지의 해동을 시작하도록 합니다. 자세한 지침은 *MiSeq 시스템 가이드(파트 번호: 15027617)*를 참조하시기 바랍니다.

다양성이 낮은 라이브러리

다양성이 낮은 라이브러리(low diversity library)란 상당수 리드(read)의 시퀀스(sequence)가 동일한 라이브러리를 의미합니다. 이렇게 다양성이 부족하면 리드가 더 이상 랜덤하지 않기 때문에 염기 조성(base composition)이 변하게 됩니다.

예를 들어, 25%를 초과하는 한 종류의 전사물(transcript), low-plexity 앰플리콘 풀(amplicon pool), 어댑터 이합체(adapter dimer) 또는 바이설파이트 시퀀싱(bisulphite sequencing)을 사용한 일부 유전자 발현 연구에서는 낮은 다양성이 관찰될 수 있습니다. 고농도 PhiX spike-in은 전반적으로 다양성이 부족한 시퀀스의 균형을 맞추는 데 도움이 됩니다.



참고

다양성이 낮은 라이브러리 사용 시 PhiX Control 라이브러리는 변성된 라이브러리와 같은 농도로 희석하도록 합니다.

소모품 및 장비

소모품

MiSeq 시스템으로 시퀀싱을 수행하기 위해 DNA 라이브러리를 준비할 때는 다음과 같은 소모품이 필요합니다.

소모품	공급 업체
해동 후 미리 냉각한 HT1(Hybridization Buffer)	Illumina(Miseq Reagent Kit에 포함)
[선택 사항] Illumina PhiX Control	Illumina(카탈로그 번호: FC-110-3001)
분자생물학 실험용 1.0 N NaOH	일반 실험기자재 공급 업체
10 mM Tris-HCl, pH 8.5 with 0.1% Tween 20	일반 실험기자재 공급 업체
Tris-HCl, pH 7.0	일반 실험기자재 공급 업체
[Protocol C] Low TE	Illumina(AmpliSeq Library PLUS Kit에 포함)

장비

비드 기반의 방법으로 표준화된 라이브러리를 변성할 때는 다음과 같은 장비가 필요합니다.

장비	공급 업체
Hybex Microsample Incubator	SciGene(카탈로그 번호: 1057-30-O(115 V)) 또는 동일 사양 제품 SciGene(카탈로그 번호: 1057-30-2(230 V)) 또는 동일 사양 제품
Heat block for 1.5 ml microcentrifuge tubes	SciGene(카탈로그 번호: 1057-34-0) 또는 동일 사양 제품

Protocol A: Standard Normalization

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

사용 중인 MiSeq Reagent Kit의 버전과 라이브러리에 가장 적합한 절차를 따르시기 바랍니다. 로딩 농도는 라이브러리 종류와 정량 방법에 따라 달라질 수도 있습니다.

Nextera™ DNA Flex Library Prep Kit 사용 시 *Nextera DNA Flex Library Prep Reference Guide*(문서 번호: 100000025416)에 기술된 희석 및 변성 지침을 참조하시기 바랍니다.

TruSight® Cardio Sequencing Kit 사용 시 *TruSight Cardio Sequencing Kit Reference Guide*(문서 번호: 15063774)에 기술된 희석 및 변성 지침을 참조하시기 바랍니다.

Chemistry	호환 가능한 변성 및 희석 절차
MiSeq Reagent Kit v3	4 nM 라이브러리 – 로딩 농도 6~20 pM의 라이브러리 생성.
MiSeq Reagent Kit v2	4 nM 라이브러리 – 로딩 농도 6~20 pM의 라이브러리 생성. 2 nM 라이브러리 – 로딩 농도 6~10 pM의 라이브러리 생성.

본 가이드 HT1 희석 후 최종적으로 만들어진 용액에 들어 있는 NaOH의 농도가 0.001(1 mM)을 초과하지 않는 변성 절차를 기술하고 있습니다. 라이브러리에 고농도의 NaOH이 들어 있을 경우, 플로우 셀(flow cell)에 대한 라이브러리의 혼성화(hybridization)가 저해되고 클러스터의 밀도(cluster density)가 감소됩니다.

시약 준비

새로 희석된 NaOH 준비

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 실험용수(800 µl)
 - ▶ Stock 1.0 N NaOH(200 µl)
 1 ml의 0.2 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



참고

희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용하시기 바랍니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

4 nM 라이브러리 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 4 nM 라이브러리(5 µl)
 - ▶ 0.2 N NaOH(5 µl)
- 2 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.
- 4 변성된 라이브러리가 담긴 튜브에 990 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다. 1 ml의 20 pM 변성된 라이브러리가 만들어집니다.

변성된 20 pM 라이브러리 희석

- 1 아래 명시된 볼륨을 넣어 라이브러리를 원하는 농도로 희석합니다.

농도	6 pM	8 pM	10 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM 라이브러리	180 µl	240 µl	300 µl	360 µl	450 µl	600 µl
미리 냉각한 HT1	420 µl	360 µl	300 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 PhiX Control을 추가하려면 10페이지의 *PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 12페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

2 nM 라이브러리 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.

- ▶ 2 nM 라이브러리(5 µl)
 - ▶ 0.2 N NaOH(5 µl)
- 2 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
 - 3 실온에서 5분간 배양합니다.
 - 4 변성된 라이브러리가 담긴 튜브에 990 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
1 ml의 변성된 10 pM 라이브러리가 만들어집니다.

변성된 10 pM 라이브러리 희석

- 1 아래 명시된 볼륨을 넣어 라이브러리를 원하는 농도로 희석합니다.

농도	6 pM	8 pM	10 pM
10 pM 라이브러리	360 µl	480 µl	600 µl
미리 냉각한 HT1	240 µl	120 µl	0 µl

- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 PhiX Control을 추가하려면 10페이지의 *PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 12페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

Protocol B: Bead-Based Normalization

비드 기반의 표준화를 지원하는 방법을 사용하는 경우, Protocol B를 참조하여 앞서 라이브러리 준비 관련 문서에 기술된 비드 기반 절차에 따라 표준화한 후 풀링했던 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

비드 기반의 표준화 절차는 상이할 수 있습니다. 라이브러리 종류 및 숙련도에 따라 실제 라이브러리 볼륨은 달라질 수 있습니다. 로딩 농도는 라이브러리 종류와 정량 방법에 따라 달라질 수도 있습니다.

TruSight HLA Sequencing Kit 사용 시 *TruSight HLA v1 Sequencing Kit Reference Guide*(문서 번호: 15056536) 또는 *TruSight HLA v2 Sequencing Kit Reference Guide*(문서 번호: 1000000010159)에 기술된 희석 및 변성 지침을 참조하시기 바랍니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

인큐베이터 준비

- 1 인큐베이터를 98°C로 예열합니다.

라이브러리 로딩 농도로 희석

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래에 명시된 볼륨의 풀링된 라이브러리와 미리 냉각해 둔 HT1을 넣어 혼합합니다.
총 600 µl의 용액이 만들어집니다. 희석된 용액의 클러스터 밀도가 너무 높거나 낮은 경우 희석 비율을 조절하도록 합니다.
사용 중인 키트에 요구되는 로딩 볼륨이 일반적으로 앰플리콘에 권장되는 사항과 다른지 확인하려면 12페이지의 *Bead-Based Normalization 로딩 농도 미적용 키트* 섹션을 참조하시기 바랍니다.

표 1 일반적인 앰플리콘 권장 사항

라이브러리 풀	미리 냉각한 HT1	Chemistry
6 µl	594 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
7 µl	593 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
8 µl	592 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
9 µl	591 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
10 µl	590 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2

2 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

희석된 라이브러리 변성

- 1 튜브를 예열한 인큐베이터에 2분간 넣어 둡니다.
- 2 지체없이 얼음으로 옮겨 냉각합니다.
- 3 얼음에 5분간 올려 둡니다.
- 4 PhiX Control을 추가하려면 10페이지의 *PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 12페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization

표준 AmpliSeq for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 라이브러리를 Protocol C를 참조하여 변성하고 희석합니다. 최종 로딩 농도 및 볼륨은 라이브러리 준비 방법과 정량 방법에 따라 결정됩니다. 시퀀싱 런당 지원되는 라이브러리의 수에 대한 정보는 [Illumina 웹사이트의 Support 페이지](#)에서 사용 중인 AmpliSeq for Illumina Panel에 관해 제공하는 정보를 참조하시기 바랍니다.

시약 준비

새로 희석된 NaOH 준비

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 실험용수(800 µl)
 - ▶ Stock 1.0 N NaOH(200 µl)
 1 ml의 0.2 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



참고

희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용하시기 바랍니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

Low TE 준비

- 1 -25~-15°C에서 냉동 보관 중이던 Low TE를 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 해동된 Low TE는 실온에 보관합니다.

라이브러리 희석

- 1 새로운 96-well LoBind PCR Plate에서 각 라이브러리를 Low TE를 사용해 2 nM로 희석합니다.

라이브러리 풀링

- 1 플레이트에 들어 있는 동일한 볼륨의 2 nM 라이브러리를 각각 1.5 mL LoBind 튜브로 옮깁니다. DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 모두 풀링하는 경우, 반드시 라이브러리마다 별개의 튜브를 사용해야 합니다.
- 2 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 3 각각의 튜브를 짧게 원심분리합니다.
- 4 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 한 번의 시퀀싱 런에서 그룹화하는 경우, DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리 풀을 다음의 풀링 비율로 합쳐줍니다.

패널	DNA 대 RNA 비율
AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel	8:1
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel	5:1
AmpliSeq for Illumina Focus Panel	7:3
AmpliSeq for Illumina Comprehensive Panel v3	25:1

- 5 라이브러리 풀을 합친 후 튜브를 볼텍싱하여 혼합하고 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨의 라이브러리와 새로 희석된 0.2 N NaOH을 넣어 혼합합니다.

시약	볼륨(μl)
풀링된 라이브러리	10
0.2 N NaOH	10

- 2 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.
- 4 풀링된 2 nM 라이브러리가 담긴 튜브에 10 μl의 200 mM Tris-HCl, pH 7.0을 넣습니다.
- 5 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 20 pM로 희석

- 1 변성된 2 nM 라이브러리 풀이 담긴 튜브에 970 μl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다. 변성된 20 pM 라이브러리가 만들어집니다.
- 2 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 마지막 희석 단계를 진행할 준비가 완료될 때까지 20 pM 라이브러리는 얼음에 올려 둡니다

라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 1 변성된 20 pM 라이브러리 용액을 미리 냉각해 둔 HT1을 사용해 7~9 pM로 희석하여 최종 볼륨이 600 μl인 용액을 만듭니다.
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

여기서 작업을 멈출 경우 플레이트를 밀봉하여 -25~-15°C에서 보관합니다.

Protocol D: AmpliSeq Library Equalizer for Illumina Normalization

AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 라이브러리는 Protocol D를 참조하여 변성하고 희석합니다. AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 라이브러리는 바로 샘플 풀링을 시작할 수 있는 농도로 표준화됩니다. 시퀀싱 런당 지원되는 라이브러리 수는 [Illumina 웹사이트의 Support 페이지](#)에서 사용 중인 AmpliSeq for Illumina Panel에 관해 제공하는 정보를 참조하시기 바랍니다.

시약 준비

새로 희석된 NaOH 준비

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 실험용수(800 µl)
 - ▶ Stock 1.0 N NaOH(200 µl)
 1 ml의 0.2 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



참고

희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용하시기 바랍니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

라이브러리 풀링

- 1 플레이트에 들어 있는 동일한 볼륨의 라이브러리를 각각 1.5 mL LoBind 튜브로 옮깁니다.
DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 모두 풀링하는 경우, 반드시 라이브러리마다 별개의 튜브를 사용해야 합니다.
- 2 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 3 각각의 튜브를 짧게 원심분리합니다.
- 4 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 한 번의 시퀀싱 런에서 그룹화하는 경우, DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리 풀을 다음의 풀링 비율로 합쳐줍니다.

패널	DNA 대 RNA 비율
AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel	8:1
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel	5:1
AmpliSeq for Illumina Focus Panel	7:3
AmpliSeq for Illumina Comprehensive Panel v3	25:1

- 5 라이브러리 풀을 합친 후 튜브를 볼텍싱하여 혼합하고 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨의 라이브러리와 새로 희석된 0.2 N NaOH을 넣어 혼합합니다.

시약	볼륨(μl)
풀링된 라이브러리	10
0.2 N NaOH	10

- 2 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.
- 4 풀링된 라이브러리가 담긴 튜브에 10 μl의 200 mM Tris-HCl, pH 7.0을 넣습니다.
- 5 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 희석

- 1 변성된 라이브러리 풀이 담긴 튜브에 970 μl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
- 2 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 마지막 희석 단계를 진행할 준비가 완료될 때까지 라이브러리는 얼음에 올려 둡니다.

라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 1 아래 명시된 볼륨을 혼합하여 변성된 라이브러리 용액을 최종 로딩 농도로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 라이브러리(385 μl)
 - ▶ HT1(215 μl)
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

여기서 작업을 멈출 경우 플레이트를 밀봉하여 -25~-15°C에서 보관합니다.

PhiX Control 변성 및 희석

다음 절차에 따라 시퀀싱 Control로 사용할 PhiX 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

사용 중인 MiSeq Reagent Kit의 버전에 적합한 절차를 따르시기 바랍니다.

Chemistry	PhiX 최종 농도
MiSeq Reagent Kit v3	v3 시약을 사용할 때는 변성된 PhiX Control을 최적의 클러스터 밀도로 확보하는 20 pM로 희석.
MiSeq Reagent Kit v2	v2 시약을 사용할 때는 변성된 PhiX Control을 최적의 클러스터 밀도로 확보하는 12.5 pM로 희석.

PhiX 4 nM로 희석

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 10 nM PhiX 라이브러리(2 μl)
 - ▶ 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 with 0.1% Tween 20(3 μl)
- 2 희석액을 만든지 **12시간**이 지났다면, 0.2N NaOH을 새로 희석하여 준비합니다.

PhiX Control 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 4 nM PhiX 라이브러리(5 μl)

- ▶ 0.2 N NaOH(5 µl)
- 2 짧게 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 3 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 4 실온에서 5분간 배양합니다.

변성된 PhiX 20 pM로 희석

- 1 변성된 PhiX 라이브러리에 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
 - ▶ 변성된 PhiX 라이브러리(10 µl)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(990 µl)
 1 ml의 20 pM PhiX 라이브러리가 만들어집니다.
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.



참고

변성된 20 pM PhiX 라이브러리는 -25~-15°C에서 최대 3주까지 보관 가능합니다. 3주가 지나면 클러스터의 수가 감소하는 경향이 있습니다.

변성된 PhiX 12.5 pM로 희석

MiSeq Reagent Kit v3를 사용하는 경우에는 추가적인 희석이 필요하지 않습니다.

- 1 변성된 PhiX 라이브러리에 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
 - ▶ 변성된 20 pM PhiX 라이브러리(375 µl)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(225 µl)
 600 µl의 12.5 pM PhiX 라이브러리가 만들어집니다.
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.

라이브러리와 PhiX Control의 혼합

대부분의 라이브러리는 1%의 저농도 PhiX Control spike-in을 시퀀싱 Control로 사용합니다. 다양성이 낮은 라이브러리는 최소 5% 이상의 PhiX Control spike-in을 사용합니다.

- 1 아래 명시된 볼륨의 변성된 PhiX Control과 변성된 라이브러리를 혼합합니다.

	대부분의 라이브러리 (1% Spike-In)	다양성이 낮은 라이브러리 (≥ 5% Spike-In)
변성 및 희석된 PhiX	6 µl	30 µl
변성 및 희석된 라이브러리(Protocol A, B, C 또는 D 사용 시)	594 µl	570 µl

- 2 라이브러리를 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 얼음 위에 둡니다.



참고

실제 PhiX %는 라이브러리 풀의 품질과 양에 따라 달라집니다.

부가 정보

Bead-Based Normalization 로딩 농도 미적용 키트

표 2 Nextera XT DNA

라이브러리 풀	미리 냉각한 HT1	Chemistry
24 µl	576 µl	MiSeq Reagent Kit v3 및 v2



참고

Nextera XT DNA의 초기 볼륨은 24 µl가 권장됩니다.

표 3 TruSight Myeloid Sequencing Panel

라이브러리 풀	미리 냉각한 HT1	Chemistry
20 µl	580 µl	MiSeq Reagent Kit v3
6 µl	594 µl	MiSeq Reagent Kit v2

표 4 TruSeq® Custom Amplicon v1.5

라이브러리 풀	미리 냉각한 HT1	Chemistry
20 µl	580 µl	MiSeq Reagent Kit v3
6 µl	594 µl	MiSeq Reagent Kit v2

표 5 TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit

라이브러리 풀	미리 냉각한 HT1	Chemistry
7 µl	593 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
8 µl	592 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
9 µl	591 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2
10 µl	590 µl	MiSeq Reagent Kit v3 또는 v2

다음 단계

라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면, 라이브러리를 시약 카트리지에 로딩하고 시퀀싱 런을 설정할 수 있습니다. 자세한 정보는 *MiSeq 시스템 가이드(파트 번호: 15027617)*를 참조하시기 바랍니다.

개정 이력

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 15039740 v10	2019년 2월	Protocol C의 권장 최종 로딩 농도 표를 하나의 권장 농도 범위로 대체.
문서 번호: 15039740 v09	2018년 11월	Protocol D의 AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 수정.
문서 번호: 15039740 v08	2018년 11월	Protocol C의 AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 수정. AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Research Assay Panel 풀링 비율 추가.
문서 번호: 15039740 v07	2018년 10월	AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 라이브러리의 변성 및 희석을 위한 Protocol D 추가.
문서 번호: 15039740 v06	2018년 7월	AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 추가.
문서 번호: 15039740 v05	2018년 5월	Protocol C에서 Phi 사용 관련 주의 문구 삭제.
문서 번호: 15039740 v04	2018년 4월	AmpliSeq for Illumina Panel의 변성 및 희석을 위한 Protocol C 추가.
문서 번호: 15039740 v03	2017년 12월	Protocol A에 Nextera DNA Flex Library Prep Kit 사용 시 Nextera DNA Flex Library Prep Reference Guide를 참조할 것을 권장하는 문구 추가.
문서 번호: 15039740 v02	2017년 2월	TruSeq Myeloid Sequencing Panel, TruSeq Custom Amplicon v1.5 및 TruSeq Custom Amplicon Low Input Sequencing Kit 사용 시 권장되는 로딩 농도 추가.
문서 번호: 15039740 v01	2016년 1월	비드 기반 방법을 사용하여 표준화된 라이브러리의 변성 및 희석 절차 추가. Protocol A와 Protocol B로 나누어 절차 정리.
파트 번호: 15039740 Rev. D	2013년 11월	다양성이 낮은 라이브러리의 경우, 변성된 샘플 라이브러리와 동일한 농도로 PhiX Control 라이브러리를 희석하도록 권장하는 문구 추가.
파트 번호: 15039740 Rev. C	2013년 8월	분자생물학 실험용 NaOH의 사용을 권장하는 문구 추가. MiSeq Reagent Kit v3와의 사용이 권장되는 라이브러리 변성 및 PhiX Control 프로토콜 추가. 샘플 라이브러리 로딩 관련 정보 삭제 후 <i>MiSeq 시스템 가이드(파트 번호: 15027617)</i> 로 이동.
파트 번호: 15039740 Rev. B	2013년 3월	다양성이 낮은 라이브러리에 권장되는 PhiX Control %를 $\geq 25\%$ 에서 $\geq 5\%$ 로 낮춤. 이러한 변경 사항은 MCS v2.2와 함께 출시된 RTA 1.17.28 또는 이후 버전 사용 시 적용 가능. 변성된 10 pM 라이브러리의 NaOH 농도를 1 mM로 수정. 준비된 라이브러리와 PhiX Control을 혼합하여 총 볼륨이 600 μ l인 용액을 만드는 지침 업데이트.
파트 번호: 15039740 Rev. A	2013년 1월	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 8000222493	+31 207132960
노르웨이	+47 800 16836	+47 21939693
뉴질랜드	0800.451.650	
대만	806651752	
덴마크	+45 80820183	+45 89871156
독일	+49 8001014940	+49 8938035677
벨기에	+32 80077160	+32 34002973
북미	+1.800.809.4566	
스웨덴	+46 850619671	+46 200883979
스위스	+41 565800000	+41 800200442
스페인	+34 911899417	+34 800300143
싱가포르	+1.800.579.2745	
아일랜드	+353 1800936608	+353 016950506
영국	+44 8000126019	+44 2073057197
오스트리아	+43 800006249	+43 19286540
이탈리아	+39 800985513	+39 236003759
일본	0800.111.5011	
중국	400.066.5835	
프랑스	+33 805102193	+33 170770446
핀란드	+358 800918363	+358 974790110
호주	+1.800.775.688	
홍콩	800960230	
기타 국가	+44.1799.534000	

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

제품 관련 문서 – Illumina 웹사이트에서 PDF 형식으로 다운로드하실 수 있습니다. support.illumina.com에서 제품을 선택한 후 **Documentation & Literature**를 선택하시기 바랍니다.



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.
© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]