

NextSeq 500 and 550 System

Denature and Dilute Libraries Guide

개요	3
소모품 및 장비	3
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
Protocol E: TruSight Tumor 170 Library Denaturation and Dilution	10
Protocol F: TruSight Oncology 500 Library Denaturation and Dilution	12
Protocol A~D의 PhiX Control 변성 및 희석	15
Protocol E의 PhiX Control 변성 및 희석	17
Protocol F의 PhiX Control 변성 및 희석	18
다음 단계	19
문제 해결을 위한 런 수행에 필요한 PhiX 준비	19
개정 이력	21
기술 지원	23



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.

© 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® NextSeq™ 500 및 550 시스템으로 시퀀싱을 수행하기 위해 준비한 라이브러리(library)를 변성(denaturation)하고 희석(dilution)하는 방법을 설명합니다.

본 가이드는 다음과 같은 목적으로 PhiX 라이브러리를 준비하는 지침을 포함하고 있습니다.

- ▶ **Control** — 준비한 라이브러리와 혼합해 시퀀싱의 Control(대조물질)로 사용할 PhiX 라이브러리 준비. PhiX Control 프로토콜은 [15페이지](#) 참조.
- ▶ **문제 해결** — 문제 해결을 위해 PhiX 단독 시퀀싱 런(run)에 사용할 PhiX 라이브러리 준비. 자세한 내용은 [19페이지의 문제 해결을 위한 런 수행에 필요한 PhiX 준비](#) 섹션 참조.

로딩 볼륨 및 농도

다음 절차에 따라 High-Output Kit에는 1.8 pM, Mid-Output Kit에는 1.5 pM의 권장 농도를 적용하여 라이브러리를 최종 로딩 볼륨인 1.3 ml로 변성하고 희석합니다. 실제 로딩 농도는 라이브러리 준비 방법과 정량(quantification) 방법에 따라 결정됩니다.

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 라이브러리 준비 절차에 따라 라이브러리 표준화. 이 경우 라이브러리에는 **Protocol B** 적용. 자세한 내용은 [6페이지의 Protocol B: Bead-Based Normalization](#) 섹션 참조.
 - ▶ TruSight™ Tumor 170 라이브러리에는 [10페이지의 Protocol E: TruSight Tumor 170 Library Denaturation and Dilution](#) 적용.
 - ▶ 호환 가능한 TruSight Oncology 500 라이브러리에는 [12페이지의 Protocol F: TruSight Oncology 500 Library Denaturation and Dilution](#) 적용.
- ▶ **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

- ▶ 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 NextSeq 500 시스템 가이드 또는 NextSeq 550 시스템 가이드를 참조하시기 바랍니다.

소모품 및 장비

소모품

라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control의 준비에는 다음과 같은 소모품이 필요합니다.

소모품	공급 업체
HT1(Hybridization Buffer)	NextSeq 500/550 Kit의 구성품
[Protocol C] Low TE	Illumina(AmpliSeq Library PLUS Kit에 포함)

별도 구매 소모품	공급 업체
분자생물학 실험용 1 N NaOH	일반 실험기자재 공급 업체
[Protocol A~D] 200 mM Tris-HCl, pH 7.0	일반 실험기자재 공급 업체

PhiX Control의 준비에는 다음과 같은 소모품이 추가로 필요합니다.

소모품	키트 이름
PhiX, 10 nM RSB(Resuspension Buffer)	Illumina(카탈로그 번호: FC-110-3002)
[Protocol E & F] HP3(2 N NaOH)	Illumina(Library Prep Kit 구성품에 포함)

장비

비드 기반의 방법을 통해 표준화된 라이브러리를 변성할 때는 다음 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.



참고

일반적으로 HT1 희석 후 최종적으로 만들어진 용액에 들어 있는 NaOH의 농도가 1 mM를 초과하지 않는 것이 중요합니다. 단, 200 mM Tris-HCl를 추가함으로써 NaOH이 최종 용액에서 완전히 가수 분해되도록 할 수 있습니다. 이 경우 HT1 희석 후 NaOH의 최종 농도가 1 mM를 초과한다 해도 템플릿 혼성화(template hybridization)에는 영향을 주지 않습니다.

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)
 총 1 ml의 0.2 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



참고

희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용합니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 해동된 HT1은 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

RSB 준비



참고

RSB 대신 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 with 0.1% Tween 20를 사용해도 됩니다.

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 RSB가 담긴 튜브를 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 해동된 RSB는 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

라이브러리 변성

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

초기 라이브러리 농도	라이브러리	0.2 N NaOH
4 nM	5 µl	5 µl
2 nM	10 µl	10 µl
1 nM	20 µl	20 µl
0.5 nM	40 µl	40 µl

- 2 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.
- 4 아래 볼륨의 200 mM Tris-HCl, pH 7을 넣습니다.

초기 라이브러리 농도	200 mM Tris-HCl, pH 7
4 nM	5 µl
2 nM	10 µl
1 nM	20 µl
0.5 nM	40 µl

- 5 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 20 pM로 희석

- 1 아래 볼륨의 미리 냉각해 둔 HT1을 변성된 라이브러리가 담긴 튜브에 넣습니다.

초기 라이브러리 농도	미리 냉각한 HT1
4 nM	985 µl
2 nM	970 µl
1 nM	940 µl
0.5 nM	880 µl

변성된 20 pM 라이브러리가 만들어집니다.

- 2 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

- 3 마지막 희석 단계를 진행할 준비가 완료될 때까지 20 pM 라이브러리는 얼음에 올려 둡니다.

라이브러리 로딩 농도로 희석

High-Output Kit

- 1 다음과 같이 변성된 20 pM 라이브러리 용액을 1.8 pM로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 라이브러리 용액(117 μ l)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(1183 μ l)총 볼륨이 1.3 ml가 될 때 농도는 1.8 pM가 됩니다.
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 펄스 원심분리합니다.
- 3 PhiX Control을 추가하려면 15페이지의 *Protocol A~D의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 19페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

Mid-Output Kit

- 1 다음과 같이 변성된 20 pM 라이브러리 용액을 1.5 pM로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 라이브러리 용액(97 μ l)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(1203 μ l)총 볼륨이 1.3 ml가 될 때 농도는 1.5 pM가 됩니다.
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 펄스 원심분리합니다.
- 3 PhiX Control을 추가하려면 15페이지의 *Protocol A~D의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 19페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

Protocol B: Bead-Based Normalization

비드 기반의 표준화를 지원하고 라이브러리별로 표준화 프로토콜을 구분하지 않는 방법을 사용하는 경우, Protocol B를 참조하여 앞서 라이브러리 준비 관련 문서에 기술된 비드 기반의 절차에 따라 표준화한 후 풀링했던 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

비드 기반의 표준화 절차는 상이할 수 있습니다. 라이브러리 종류와 숙련도에 따라 2~5 μ l의 라이브러리를 사용할 때 최적의 결과를 얻을 수 있습니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 해동된 HT1은 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.

라이브러리 풀	미리 냉각한 HT1
2 µl	998 µl
3 µl	997 µl
4 µl	996 µl
5 µl	995 µl

총 1 ml가 만들어집니다.

- 1 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 2 750 µl의 희석된 라이브러리를 새로운 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 3 750 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 추가합니다.
- 4 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 15페이지의 *Protocol A~D의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 19페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization

표준 AmpliSeq for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 라이브러리는 Protocol C를 참조하여 변성하고 희석합니다. 최종 로딩 농도 및 볼륨은 라이브러리 준비 방법과 정량 방법에 따라 결정됩니다. 시퀀싱 런당 지원되는 라이브러리의 수는 [Illumina 웹사이트의 Support 페이지](#)에서 사용 중인 AmpliSeq for Illumina 패널에 대해 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)
 총 1 ml의 0.2 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



참고

희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용합니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 해동된 HT1은 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 Plate에 각 라이브러리를 넣고 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 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 1.1~1.9 pM로 희석하여 최종 볼륨이 1.3 ml인 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 라이브러리의 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)
 총 1 ml의 0.2 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



참고

희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용합니다.

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다.
- 2 해동된 HT1은 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 Comprehensive Panel v3	25:1

- 라이브러리 풀을 합친 후 튜브를 볼텍싱하여 혼합하고 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 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

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

변성된 라이브러리 희석

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

라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 아래 명시된 볼륨을 혼합하여 변성된 라이브러리 용액을 최종 로딩 농도로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 라이브러리(95 μl)
 - ▶ HT1(1205 μl)
- 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

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

Protocol E: TruSight Tumor 170 Library Denaturation and Dilution

Protocol E를 참조하여 TruSight Tumor 170 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

최적의 커버리지를 위해 다음의 절차를 따릅니다.

- ▶ 라이브러리마다 최대 커버리지를 확보하기 위해 NextSeq High-Output 플로우 셀을 사용하여 런당 16개의 라이브러리(DNA 8개, RNA 8개)를 시퀀싱합니다.
- ▶ DNA 라이브러리만을 사용하는 경우 최대 10개의 라이브러리를 시퀀싱할 수 있습니다.
- ▶ RNA 라이브러리만을 사용하는 경우 최대 16개의 라이브러리를 시퀀싱할 수 있습니다.
- ▶ 다른 개수의 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 시퀀싱해야 하는 경우 Illumina 기술지원팀에 문의해 주시기 바랍니다.

HT1 준비

- 25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다. 볼텍싱하여 재현탁합니다.
- 해동된 HT1은 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

Heat Block 준비

- 1 Heat Block(가열 블록)을 96°C로 예열합니다.

라이브러리 변성

- 1 각각의 풀링된 튜브를 Heat Block을 사용해 96°C에서 2분간 배양(incubation)합니다.
- 2 각 튜브를 2회씩 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 3 짧게 원심분리한 후 5분간 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 11페이지의 **라이브러리 변성** 절차를 반복하여 튜브를 다시 변성하고 혼합한 후 냉각해 줍니다.

라이브러리 희석

아래의 희석 방법 중 하나를 선택하여 변성된 라이브러리 용액을 만듭니다. 동일한 개수의 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 시퀀싱하는 경우 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 4:1의 비율로 풀링합니다. 다른 개수의 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 시퀀싱해야 하는 경우(예: DNA 7개 + RNA 3개) Illumina 기술지원팀에 문의해 주시기 바랍니다.

DNA 라이브러리 및 RNA 라이브러리 동시 시퀀싱

- 1 20 µl의 변성된 DNA 라이브러리를 새 스크류 캡 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)로 옮깁니다.
- 2 5 µl의 변성된 RNA 라이브러리를 튜브에 추가합니다.
- 3 475 µl의 HT1을 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 4 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

DNA 라이브러리 시퀀싱

- 1 10 µl의 변성된 DNA 라이브러리를 새 스크류 캡 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 2 190 µl의 HT1을 이 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

RNA 라이브러리 시퀀싱

- 1 10 µl의 변성된 RNA 라이브러리를 새 스크류 캡 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 2 190 µl의 HT1을 이 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 1 40 µl의 변성된 라이브러리 용액을 새 스냅 캡 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 2 1360 µl의 HT1을 튜브에 추가합니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 4 PhiX Control을 추가하려면 17페이지의 *Protocol E의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 19페이지의 *다음 단계* 섹션을 참조합니다.

Protocol F: TruSight Oncology 500 Library Denaturation and Dilution

호환 가능한 TruSight Oncology 500 워크플로우를 사용하여 준비된 라이브러리는 Protocol F를 참조하여 변성하고 희석합니다. 호환 가능한 워크플로우를 통해 준비한 라이브러리는 바로 샘플 풀링을 시작할 수 있는 농도로 표준화됩니다. TruSight Oncology 500 RNA 라이브러리만을 사용하는 경우 시퀀싱 품질을 확보하기 위해 PhiX Control이 필요합니다. TruSight Oncology 500 DNA 라이브러리만을 사용하거나 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 혼합하여 사용하는 경우 PhiX Control은 선택 사항입니다.

최적의 커버리지를 위해 다음의 절차를 따릅니다.

- ▶ DNA 라이브러리만을 사용하는 경우 최대 8개의 라이브러리를 시퀀싱할 수 있습니다.
- ▶ DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 동시에 시퀀싱하는 경우 각각의 라이브러리를 최대 8개씩 시퀀싱할 수 있습니다.
- ▶ RNA 라이브러리만을 시퀀싱하는 경우 최대 16개의 라이브러리를 시퀀싱할 수 있습니다.

다음 옵션 중 하나를 선택하여 라이브러리를 풀링, 변성 및 희석합니다.

- ▶ DNA 라이브러리만 시퀀싱하는 경우 12페이지의 *DNA 라이브러리 변성 및 희석* 섹션을 참조해 진행합니다.
- ▶ DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 동시에 시퀀싱하려면 13페이지의 *DNA 라이브러리 및 RNA 라이브러리 변성 및 희석* 섹션을 참조해 진행합니다.
- ▶ RNA 라이브러리만 시퀀싱하려면 14페이지의 *RNA 라이브러리 변성 및 희석* 섹션을 참조해 진행합니다.

DNA 라이브러리 변성 및 희석

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다. 볼텍싱하여 재현탁합니다.
- 2 해동된 HT1은 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

Heat Block 준비

- 1 Heat Block(가열 블록)을 96°C로 예열합니다.

라이브러리 풀링

- 1 DNA NL(의미: Normalized Library) 플레이트를 실온에 도달할 때까지 해동합니다. 피펫팅하여 혼합한 후 원심분리합니다.
- 2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 PDL(의미: Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 3 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리로부터 각각 10 µl씩 취해 PDL 튜브로 옮깁니다.
- 4 PDL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 5 PDL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 1 PDL 튜브를 Heat Block을 사용해 96°C에서 2분간 배양(incubation)합니다.
- 2 PDL 튜브를 2회 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 3 짧게 원심분리한 후 5분간 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 12페이지의 **라이브러리 변성** 절차를 반복하여 튜브를 다시 변성하고 혼합한 후 냉각해 줍니다.

라이브러리 희석

- 1 변성된 PDL 튜브에서 10 µl를 취해 새 스크류 캡 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 2 190 µl의 HT1을 이 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 1 40 µl의 변성 및 희석된 라이브러리 용액을 새 2 ml 스크류 캡 튜브로 옮깁니다.
- 2 1660 µl의 HT1을 튜브에 넣습니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 4 18페이지의 *Protocol F의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다.

DNA 라이브러리 및 RNA 라이브러리 변성 및 희석

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다. 볼텍싱하여 재현탁합니다.
- 2 해동된 HT1은 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

Heat Block 준비

- 1 Heat Block을 96°C로 예열합니다.

라이브러리 풀링

- 1 DNA NL 플레이트와 RNA NL 플레이트를 모두 실온에 도달할 때까지 해동합니다. 피펫팅하여 혼합한 후 원심분리합니다.
- 2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PDL(의미: Pooled DNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 3 NL 플레이트 안의 표준화된 DNA 라이브러리로부터 각각 10 µl씩 취해 PDL 튜브로 옮깁니다.
- 4 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PRL(의미: Pooled RNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 5 RNA NL 플레이트 안의 표준화된 RNA 라이브러리로부터 각각 10 µl씩 취해 PRL 튜브로 옮깁니다.
- 6 각각의 튜브를 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 1 각각의 풀링된 튜브를 Heat Block을 사용해 96°C에서 2분간 배양합니다.
- 2 각 튜브를 2회씩 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 3 짧게 원심분리한 후 5분간 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 13페이지의 **라이브러리 변성** 절차를 반복하여 튜브를 다시 변성하고 혼합한 후 냉각해 줍니다.

라이브러리 희석

- 1 20 µl의 변성된 DNA 라이브러리(PDL)를 새 스크류 캡 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 2 5 µl의 변성된 RNA 라이브러리(PRL)를 튜브에 넣습니다.
- 3 475 µl의 HT1을 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
동일한 개수의 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 시퀀싱하는 경우 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 4:1의 비율로 풀링합니다. 다른 개수의 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 시퀀싱해야 하는 경우 Illumina 기술지원팀에 문의해 주시기 바랍니다.
- 4 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 1 40 µl의 변성 및 희석된 라이브러리 용액을 새 2 ml 스크류 캡 튜브로 옮깁니다.
- 2 1660 µl의 HT1을 튜브에 넣습니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 4 18페이지의 *Protocol F의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다.

RNA 라이브러리 변성 및 희석

HT1 준비

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1을 꺼내어 실온에서 해동합니다. 볼텍싱하여 재현탁합니다.
- 2 해동된 HT1은 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.

Heat Block 준비

- 1 Heat Block을 96°C로 예열합니다.

라이브러리 풀링

- 1 RNA NL 플레이트를 실온에 도달할 때까지 해동합니다. 피펫팅하여 혼합한 후 원심분리합니다.
- 2 1.5 ml 스크류 캡 미세원심분리 튜브에 PRL(의미: Pooled RNA Libraries)이라는 라벨을 부착합니다.
- 3 NL 플레이트 안의 표준화된 RNA 라이브러리로부터 각각 10 µl씩 취해 PRL 튜브로 옮깁니다.
- 4 PRL 튜브를 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 5 PRL 튜브를 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 1 PRL 튜브를 Heat Block을 사용해 96°C에서 2분간 배양합니다.
- 2 PRL 튜브를 2회 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 3 짧게 원심분리한 후 5분간 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 14페이지의 **라이브러리 변성** 절차를 반복하여 튜브를 다시 변성하고 혼합한 후 냉각해 줍니다.

라이브러리 희석

- 1 변성된 PRL 튜브에서 10 µl를 취해 새 스크류 캡 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
- 2 190 µl의 HT1을 이 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 1 40 µl의 변성 및 희석된 라이브러리 용액을 새 2 ml 스크류 캡 튜브로 옮깁니다.
- 2 1660 µl의 HT1을 튜브에 넣습니다.
- 3 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 4 18페이지의 *Protocol F의 PhiX Control 변성 및 희석* 단계로 이동합니다.

Protocol A~D의 PhiX Control 변성 및 희석

다음 절차에 따라 Protocol A~D의 시퀀싱 Control로 사용할 PhiX 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

PhiX 4 nM로 희석

- 1 10 nM PhiX stock(10 µl/튜브)이 담긴 튜브 1개를 해동합니다.
- 2 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 10 nM PhiX(10 µl)
 - ▶ RSB(15 µl)
 총 25 µl의 4 nM PhiX가 만들어집니다.
- 3 짧게 볼텍싱한 후 펄스 원심분리합니다.



참고

[선택 사항] 4 nM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3개월까지 보관 가능합니다.

PhiX 변성

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 4 nM PhiX(5 µl)
 - ▶ 새로 희석된 0.2 N NaOH(5 µl)
- 2 짧게 볼텍싱한 후 펄스 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.
- 4 5 µl의 200 mM Tris-HCl, pH 7.0을 넣습니다.
- 5 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

변성된 PhiX 로딩 농도로 희석

High-Output Kit

- 1 변성된 PhiX가 담긴 튜브에 985 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
총 1 ml의 20 pM 용액이 만들어집니다.
- 2 다음과 같이 변성된 20 pM PhiX를 1.8 pM로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 PhiX(117 µl)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(1183 µl)
 총 볼륨이 1.3 ml가 될 때 농도는 1.8 pM가 됩니다.
- 3 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.



참고

[선택 사항] 변성된 1.8 pM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 2주까지 보관 가능합니다. 2주가 지나면 클러스터의 수가 감소하는 경향이 있습니다.

Mid-Output Kit

- 1 변성된 PhiX가 담긴 튜브에 985 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
총 1 ml의 20 pM 용액이 만들어집니다.
- 2 다음과 같이 변성된 20 pM PhiX를 1.5 pM로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 PhiX(97 µl)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(1203 µl)
 총 볼륨이 1.3 ml가 될 때 농도는 1.5 pM가 됩니다.
- 3 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.



참고

[선택 사항] 변성된 1.5 pM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 2주까지 보관 가능합니다. 2주가 지나면 클러스터의 수가 감소하는 경향이 있습니다.

라이브러리와 PhiX Control의 혼합

대부분의 라이브러리는 1%의 저농도 PhiX Control spike-in을 시퀀싱의 Control로 사용합니다.

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

라이브러리 및 농도(Mid-Output Kit, 1.5 pM PhiX 사용 시)	볼륨
변성 및 희석된 1.5 pM PhiX Control	13 µl
변성 및 희석된 라이브러리(Protocol A, B, C 또는 D 사용 시)	1287 µl

라이브러리 및 농도(Mid-Output Kit, 20 pM PhiX 사용 시)	볼륨
변성 및 희석된 20 pM PhiX Control	1 µl
변성 및 희석된 라이브러리(Protocol A, B, C 또는 D 사용 시)	1299 µl

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



참고

라이브러리와 PhiX를 혼합한 용액으로 0.5~2.0% PhiX까지 spike-in할 수 있습니다. 실제 %는 라이브러리 풀의 품질과 양에 따라 차이가 있습니다.

Protocol E의 PhiX Control 변성 및 희석

다음 절차에 따라 TruSight Tumor 170 라이브러리의 시퀀싱 Control로 사용할 PhiX 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

시약 준비

HP3 준비

- 1 2~8°C에서 보관 중이던 HP3를 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동합니다.

새로 희석된 NaOH 준비

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ RNase/DNase가 없는 물(950 μ l)
 - ▶ HP3(50 μ l)1 ml의 0.1 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



주의

희석액은 만든지 **1시간** 이내에 사용하기 바랍니다.

PhiX Control 준비

PhiX 2 nM로 희석

- 1 10 nM PhiX stock(10 μ l/튜브)이 담긴 튜브 1개를 해동합니다.
- 2 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 10 nM PhiX(2 μ l)
 - ▶ RSB(8 μ l)총 10 μ l의 2 nM PhiX가 만들어집니다.
- 3 위아래로 5회 피펫팅하여 혼합합니다.

PhiX 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 2 nM PhiX(10 μ l)
 - ▶ 새로 희석된 0.1 N NaOH(10 μ l)
- 2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.

변성된 PhiX 로딩 농도로 희석

- 1 변성된 PhiX가 담긴 튜브에 980 μ l의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.

총 1 ml의 20 pM 용액이 만들어집니다.

- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.



참고

[선택 사항] 변성된 20 pM PhiX는 일회용 50 µl 분액으로 나누어 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3주까지 보관 가능합니다.

라이브러리와 PhiX Control의 혼합

- 1 아래에 명시된 볼륨의 변성된 PhiX Control과 변성된 라이브러리를 혼합합니다.
 - ▶ 변성된 20 pM PhiX Control(2.5 µl)
 - ▶ 변성된 라이브러리(1300 µl)
- 2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 혼합액은 얼음 위에 둡니다.

Protocol F의 PhiX Control 변성 및 희석

다음 절차에 따라 Protocol F의 시퀀싱 Control로 사용할 PhiX 라이브러리를 변성하고 희석합니다.

시약 준비

HP3 준비

- 1 2~8°C에서 보관 중이던 HP3를 꺼내어 실온에 도달할 때까지 해동합니다.

새로 희석된 NaOH 준비

- 1 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ RNase/DNase가 없는 물(190 µl)
 - ▶ HP3(10 µl)총 200 µl의 0.1 N NaOH이 만들어집니다.
- 2 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.



주의

희석액은 만든지 **1시간** 이내에 사용하기 바랍니다.

PhiX Control 준비

PhiX 2 nM로 희석

- 1 10 nM PhiX stock(10 µl/튜브)이 담긴 튜브 1개를 해동합니다.
- 2 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 10 nM PhiX(2 µl)
 - ▶ RSB(8 µl)총 10 µl의 2 nM PhiX가 만들어집니다.
- 3 위아래로 5회 피펫팅하여 혼합합니다.

PhiX 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 2 nM PhiX(10 µl)
 - ▶ 새로 희석된 0.1 N NaOH(10 µl)
- 2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.

변성된 PhiX 로딩 농도로 희석

- 1 변성된 PhiX가 담긴 튜브에 980 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다. 총 1 ml의 20 pM 용액이 만들어집니다.
- 2 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.



참고

[선택 사항] 변성된 20 pM PhiX는 일회용 50 µl 분액으로 나누어 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3주까지 보관 가능합니다.

라이브러리와 PhiX Control의 혼합(DNA 라이브러리 단독 또는 DNA 라이브러리 & RNA 라이브러리)

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 변성된 20 pM PhiX Control(2.5 µl)
 - ▶ 변성된 TruSight Oncology 500 라이브러리(1700 µl)
- 2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 혼합액은 얼음 위에 둡니다.

라이브러리와 PhiX Control의 혼합(RNA 라이브러리 단독)

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 변성된 20 pM PhiX Control(16.7 µl)
 - ▶ 변성된 TruSight Oncology 500 라이브러리(1646 µl)
- 2 볼텍싱하여 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.
- 3 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 혼합액은 얼음 위에 둡니다.

다음 단계

라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면, 라이브러리를 시약 카트리지에 로딩하고 시퀀싱 런을 설정할 수 있습니다. 자세한 정보는 *NextSeq 500 시스템 가이드*(문서 번호: 15046563) 또는 *NextSeq 550 시스템 가이드*(문서 번호: 15069765)를 참조하시기 바랍니다.

문제 해결을 위한 런 수행에 필요한 PhiX 준비

다음 절차에 따라 PhiX 단독 시퀀싱 런에 사용할 PhiX 라이브러리를 변성하고 희석합니다. PhiX 단독 런은 기기 성능 확인 또는 문제 해결에 활용할 수 있습니다. PhiX 단독 런에는 권장 볼륨 및 로딩 농도를 충족하는 100% PhiX 라이브러리가 필요합니다.

다음을 진행하기 전에 18페이지의 **시약 준비** 섹션에 기술되어 있는 시약을 준비해 두시기 바랍니다.

PhiX 4 nM로 희석

- 1 10 nM PhiX stock(10 µl/튜브)이 담긴 튜브 1개를 해동합니다.
- 2 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 10 nM PhiX(10 µl)
 - ▶ RSB(15 µl)총 25 µl의 4 nM PhiX가 만들어집니다.
- 3 짧게 볼텍싱한 후 펄스 원심분리합니다.



참고

[선택 사항] 4 nM PhiX는 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3개월까지 보관 가능합니다.

PhiX 변성

- 1 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - ▶ 4 nM PhiX(5 µl)
 - ▶ 새로 희석된 0.2 N NaOH(5 µl)
- 2 짧게 볼텍싱한 후 펄스 원심분리합니다.
- 3 실온에서 5분간 배양(incubation)합니다.
- 4 5 µl의 200 mM Tris-HCl, pH 7.0을 넣습니다.
- 5 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

변성된 PhiX 로딩 농도로 희석

- 1 변성된 PhiX가 담긴 튜브에 985 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
총 1 ml의 20 pM 용액이 만들어집니다.
- 2 다음과 같이 변성된 20 pM PhiX를 1.8 pM로 희석합니다.
 - ▶ 변성된 PhiX(117 µl)
 - ▶ 미리 냉각한 HT1(1183 µl)총 볼륨이 1.3 ml가 될 때 농도는 1.8 pM가 됩니다.
- 3 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 4 라이브러리를 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 희석된 PhiX는 얼음 위에 둡니다.

개정 이력

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 15048776 v16	2020년 7월	내부적인 목적으로 문서 업데이트. 내용은 변경되지 않음.
문서 번호: 15048776 v15	2020년 4월	TruSight Oncology 500 프로토콜이 모든 호환 가능한 TSO 500 제품에 적용됨을 명시.
문서 번호: 15048776 v14	2020년 3월	문서 제목에 NextSeq 버전(NextSeq 500 및 550) 명시.
문서 번호: 15048776 v13	2019년 11월	다음과 같은 TruSight Oncology 500 관련 정보 업데이트 <ul style="list-style-type: none"> • 시퀀싱 런별 라이브러리 개수와 선택 가능한 DNA/RNA 라이브러리 조합에 대한 가이드라인. • 세 가지 라이브러리 풀링, 변성 및 희석 옵션 중 하나를 선택하도록 명시.
문서 번호: 15048776 v12	2019년 10월	TruSight Oncology 500 라이브러리 변성 및 희석 섹션에 새로운 RNA 라이브러리 단독 프로토콜 추가. Protocol F의 라이브러리 변성 및 희석 방법에 공통적인 주제 통합. TruSight Oncology 500의 시퀀싱 런별 라이브러리 개수와 가능한 DNA/RNA 라이브러리 조합에 관한 가이드라인을 삭제 후 해당 정보를 TruSight Oncology 500 Support 페이지 로 이동.
문서 번호: 15048776 v11	2019년 4월	새로운 TruSight Oncology 500 DNA 라이브러리/RNA 라이브러리 변성 및 희석 프로토콜 추가. Protocol E 및 Protocol F에서 인큐베이터를 언급한 부분을 Heat Block으로 대체. Heat Block과 Thermal Cycler를 장비 목록에 추가. 호환 가능한 프로토콜을 보다 명확히 파악할 수 있도록 PhiX Control 변성 및 희석 절차 업데이트.
문서 번호: 15048776 v10	2019년 2월	Protocol C의 권장 최종 로딩 농도 표를 하나의 권장 농도 범위로 대체.
문서 번호: 15048776 v09	2018년 12월	새로운 TruSight Tumor 170 라이브러리 변성 및 희석 프로토콜 추가. TruSight Tumor 170 관련 새로운 PhiX 변성 및 희석 절차 추가. 새로운 TruSight Oncology 500 라이브러리 풀링, 변성 및 희석 프로토콜 추가. TruSight Oncology 500 관련 새로운 PhiX 변성 및 희석 절차 추가.
문서 번호: 15048776 v08	2018년 11월	Protocol D의 AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 수정.
문서 번호: 15048776 v07	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: 15048776 v06	2018년 10월	AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비한 라이브러리의 변성 및 희석을 위한 Protocol D 추가.
문서 번호: 15048776 v05	2018년 7월	AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 추가.
문서 번호: 15048776 v04	2018년 5월	Mid-Output Kit 로딩 농도 관련 참고 문구 추가. High-Output Kit 및 Mid-Output Kit에 관한 정보 추가. Protocol C에서 PhiX 사용 관련 주의 문구 삭제.

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 15048776 v03	2018년 4월	AmpliSeq for Illumina Panel 제품의 변성 및 희석을 위한 Protocol C 추가.
문서 번호: 15048776 v02	2016년 1월	비드 기반 방법을 사용하여 표준화한 라이브러리의 변성 및 희석 절차 추가. Protocol A와 Protocol B로 나누어 절차 정리. Control로 사용할 PhiX를 1.8 pM로 희석하는 지침 추가.
문서 번호: 15048776 v01	2015년 10월	PhiX 준비 지침에서 추가적인 볼텍싱 및 원심분리 단계 삭제. NCS v1.2 소프트웨어 사용 지침 삭제.
파트 번호: 15048776 Rev. E	2015년 5월	NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide로 문서 제목 변경. 본 가이드는 NextSeq 500 시스템과 NextSeq 550 시스템에 모두 적용.
파트 번호: 15048776 Rev. D	2014년 10월	라이브러리를 PhiX spike-in과 혼합하고 NCS v1.2를 사용할 때 생성되는 라이브러리의 볼륨을 2995 µl로 수정. 문제 해결 목적의 PhiX 단독 런 수행에 관한 정보 추가.
파트 번호: 15048776 Rev. C	2014년 9월	안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)의 URL을 support.illumina.com/sds.html 로 업데이트. NextSeq 제품 마크를 ™에서 ®로 업데이트.
파트 번호: 15048776 Rev. B	2014년 8월	로딩 농도가 1.8 pM인 라이브러리의 준비 지침을 추가하고, 로딩 볼륨을 줄임(기존 로딩 볼륨 1.3 ml). 해당 변경 사항의 적용에는 NCS v1.3 필요. 0.5 nM 라이브러리의 변성 및 희석 볼륨 수정. 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)의 URL을 support.illumina.com/sds.ilmn 으로 업데이트.
파트 번호: 15048776 Rev. A	2014년 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, 중국	806651752	
대한민국	+82 80 234 5300	
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, 중국	800960230	
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.

성능평가 목적으로만 사용할 수 있습니다.

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]