

# MiSeq™ i100 시리즈로 최적의 성능 확보

성공적인 런을 위한 라이브러리  
로딩 최적화 단계

- MiSeq i100 시리즈의 플로우 셀 사용 시 최적의 라이브러리 로딩 농도 결정
- 라이브러리 삽입 크기 결과의 개선으로 최적의 시퀀싱 성능 달성
- PhiX로 라이브러리 복잡성을 보완하여 다양성이 낮은 라이브러리 사용 가능



## 소개


MiSeq i100 시리즈는 Illumina 시퀀서 중 가장 간편하고 빠른 벤치탑 시퀀싱을 제공합니다. MiSeq i100 시리즈는 획기적으로 발전된 시스템 디자인, XLEAP-SBS™ chemistry, 통합된 데이터 분석 기능을 기반으로 향상된 사용성, 우수한 데이터 정확도, 매우 빠른 처리 속도를 제공하여 기존 MiSeq 시스템보다 최대 4배 빠른 속도로 결과를 도출합니다. 엔드투엔드 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) 솔루션의 한 구성 요소인 MiSeq i100 시리즈는 미생물학, 감염병, 종양학 등 핵심 분야에서 전사체학(transcriptomics) 연구, 미생물 유전체학(microbial genomics) 연구, 표적 유전자 시퀀싱(targeted gene sequencing) 연구 등 다양한 애플리케이션에 활용 시 하루 안에 시퀀싱 결과를 제공할 수 있습니다.

다른 시퀀싱 시스템에서의 프로젝트를 MiSeq i100 시리즈로 옮기려는 경우, 라이브러리 로딩을 최적화하여 데이터 수율(yield) 및 품질을 크게 향상시킬 수 있습니다. 이 Technical Note는 MiSeq i100 시리즈로 최적의 결과를 얻을 수 있도록 라이브러리 로딩 농도, 라이브러리 품질 및 뉴클레오티드 다양성(nucleotide diversity) 고려 사항을 비롯한 다양한 권장 사항을 안내해 드립니다.

## 최적의 라이브러리 로딩

로딩 농도란 시퀀싱을 위해 기기에 로딩된 라이브러리의 최종 농도를 의미합니다. 라이브러리를 준비한 후에는 사용하는 라이브러리의 종류, 시퀀싱 시스템 및 시약 키트에 적합한 로딩 농도로 라이브러리를 희석해야 합니다.

너무 높거나 낮은 농도로 라이브러리를 로딩하면 시퀀싱 품질 및 수율이 저하될 수 있으며 극한 조건에서는 런 실패를 초래할 수 있습니다. 언더로딩(Underloading)은 나노웰(nanowell) 이용률(% Occupied)을 낮추고 중복 리드(duplicate read) 수를 증가시킬 수 있어, 표적 커버리지(target coverage)를 달성하기 위해서는 더 많은 리드가 필요할 수 있습니다. 반면 오버로딩(overloading)은 낮은 %의 필터 통과 클러스터(% PF)를 야기할 수 있습니다. MiSeq i100 시리즈에 최적화된 로딩 농도를 결정하기 위해 Sequencing Analysis Viewer에서 % Occupied 및 % PF 매트릭스를 플로팅하여 각 런에 대한 언더로딩, 최적의 로딩 또는 오버로딩 결과를 확인합니다. 다음의 실험 방법 예시를 참고해 로딩 농도를 적정(titration)하고 1차 및 2차 매트릭스를 평가하시기 바랍니다.

 자세한 정보는 [Plotting % Occupied by % PF to optimize loading for the NovaSeq X Series, MiSeq i100 Series, NovaSeq 6000, and iSeq 100](#)을 참조하시기 바랍니다.

## 최적의 로딩 농도 확인 방법

최적의 로딩 농도를 파악할 때는 다양한 농도를 테스트하는 것이 매우 중요합니다. 이때 % PF 및 % Occupied와 같은 1차 매트릭스와 Duplicates, Insert size, Coverage와 같은 2차 매트릭스를 함께 활용하여 다양한 로딩 농도에서 성능을 측정함으로써 해당 애플리케이션에 "적용 가능한 수율"을 확인합니다.

### 1단계: 적정 실험 설계

MiSeq Reagent Kit v3를 사용하는 기존 MiSeq 시스템에서의 프로젝트를 MiSeq i100 시리즈로 옮기려면, MiSeq Reagent Kit v3 로딩 농도의 약 6.5배를 중심으로 적정을 진행합니다. 권장되는 중심 농도는 MiSeq i100 시리즈와 어떤 라이브러리 프랩 키트를 사용하는지에 따라 결정됩니다(표 1). 그 외의 모든 경우에는 중심 농도로 100 pM을 사용하는 것이 권장됩니다.

표 1: MiSeq i100 시리즈를 사용한 적정 계획 시 권장되는 중심 농도<sup>a</sup>

라이브러리 프랩 키트	중심 농도
Illumina DNA Prep	80 pM
Illumina DNA Prep with Enrichment	60 pM
Illumina RNA Prep with Enrichment	80 pM
Illumina DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq™ DNA PCR-Free	120 pM
TruSeq DNA Nano	120 pM
Illumina Viral Surveillance Panel v2	80 pM
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B	80 pM
Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel	80 pM
Urinary Pathogen ID/AMR Panel	80 pM
TruSight™ RNA Pan-Cancer	80 pM
16S rRNA Amplicon <sup>b</sup>	60 pM
Pillar® oncoReveal™ Myeloid Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Essential MPN Panel	80 pM
Pillar oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel	80 pM
Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA2 plus CNV Panel	80 pM
PhiX Control v3	120 pM

- a. 이중 가닥 DNA(Double-stranded DNA) 라이브러리의 정량에는 형광 측정 assay인 Qubit dsDNA Quantitation High Sensitivity Assay(Thermo Fisher, 카탈로그 번호: Q32851)를 이용하였으며, 절편의 평균 크기 추정에는 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit(Agilent, 카탈로그 번호: 5067-4626)를 이용함. 단일 가닥 DNA(Single-stranded DNA) 라이브러리의 정량에는 Qubit ssDNA Assay Kit(Thermo Fisher, 카탈로그 번호: Q10212)를 이용함
- b. 16S rRNA 앰플리콘(amplicon) 라이브러리는 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation(파트 번호: 15044223 Rev.B) 문서에 기술된 워크플로우를 이용하여 준비함

이 예시에서는 Illumina DNA Prep을 사용하여 준비한 *Bacillus pacificus*, *Cereibacter sphaeroides* 및 *Escherichia coli*의 유전체 샘플로 구성된 라이브러리 풀(pool)을 40 pM, 80 pM 및 120 pM의 농도로 로딩하여 테스트했습니다.

**2단계: 나노웰 이용률 및 필터 통과 클러스터 확인**

각 로딩 농도에 대해 레인별로 % PF 및 % Occupied 매트릭스를 플로팅하여 어떤 농도값이 언더로딩, 오버로딩, 또는 균형 있는 로딩 결과를 가져왔는지 확인합니다. 이 예시에서 테스트한 3가지 농도값(40 pM, 80 pM, 120 pM)은 모두 % PF vs % Occupied 플롯에서 최적의 로딩 모양(양의 기울기를 가진 점 구름)을 보여, MiSeq i100 시리즈가 넓은 라이브러리 로딩 농도 범위 내에서 안정적인 결과를 도출할 수 있음이 입증되었습니다(그림 1).

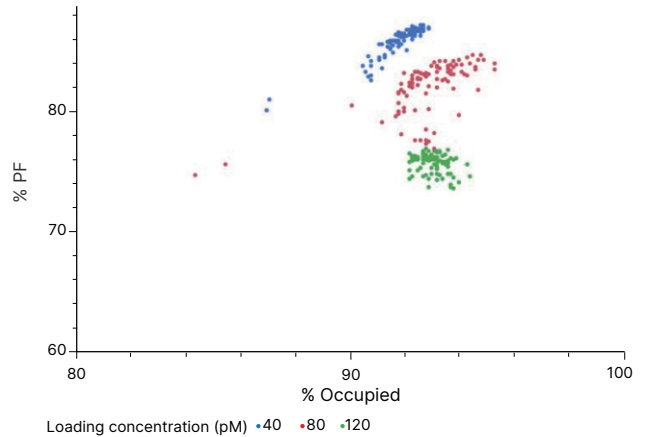


그림 1: 넓은 라이브러리 로딩 농도 범위에 걸쳐 확인된 최적의 나노웰 이용률 — 40 pM, 80 pM 및 120 pM의 농도로 로딩된 라이브러리를 시퀀싱했을 때 최적의 로딩 모양을 보여, MiSeq i100 시리즈가 넓은 라이브러리 로딩 농도 범위에 걸쳐 안정적인 결과를 도출할 수 있음이 입증됨

**3단계: 중복 리드 확인**

중복 리드의 비율(% Duplicates)을 분석해 목표 농도 범위를 좁힙니다. 로딩 농도가 증가하면 중복 리드의 수는 감소하는 경향이 있습니다. 이 예시에서 테스트한 3가지 농도값은 모두 15% 미만의 중복 리드를 보였으며 80 pM 및 120 pM의 농도에서 가장 적게 나타났습니다(그림 2).

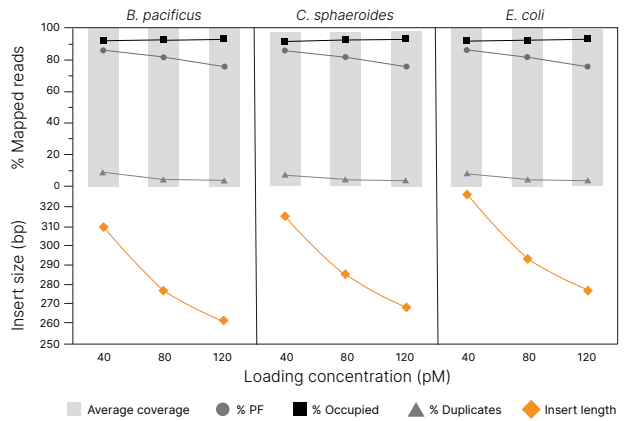


그림 2: MiSeq i100 시리즈를 사용한 시퀀싱 런 최적화 — 중복 리드 비율, 평균 커버리지, 라이브러리 삽입 크기를 분석한 적정 실험 예시

**4단계: 라이브러리 삽입 크기 분석**

라이브러리 삽입 크기를 검토합니다. 실제 라이브러리 및 애플리케이션에 알맞은 최적의 범위는 워크플로우 요구 사항에 따라 다를 수 있습니다. 이 예시에서는 3가지 세균 균주 모두 라이브러리 삽입 크기가 테스트한 농도 범위에 걸쳐 차이를 보였으며, 특히 40 pM과 80 pM 사이의 농도에서 가장 큰 차이가 관찰되었습니다(그림 2).

**5단계: 기타 애플리케이션 의존적 매트릭스(Coverage, Mapping 등) 검토**

실제 애플리케이션에 최적화된 성능을 확보하기 위해 추가적으로 2차 분석 매트릭스를 검토합니다. 이 예시에서 % Mapped reads를 보면, 테스트한 3가지 로딩 농도값 모두가 안정적인 결과를 도출한 것을 확인할 수 있습니다(그림 2). 2차 매트릭스는 기기 내 또는 클라우드에서 이용 가능한 DRAGEN™ Small Whole Genome Sequencing 앱으로 생성했습니다.

**라이브러리 품질**

삽입 길이가 짧은 라이브러리와 라이브러리 준비 과정에서 유입되는 오염물(예: 어댑터 다이머(adapter dimer), 프라이머 다이머(primer dimer), 불완전하게 제작된 라이브러리)은 MiSeq i100 시리즈의 클러스터링 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있습니다. 이렇게 삽입 길이가 짧은 라이브러리나 오염물은 클린업(cleanup) 단계나 크기 선별(size selection) 단계에서 제거하는 것이 매우 중요합니다. 필요시 기존의 라이브러리 준비 프로토콜에 선택적으로 비드 정제(bead purification) 단계를 추가해 더 효과적으로 삽입 길이가 짧은 라이브러리와

오염물을 제거해 볼 수도 있습니다. 라이브러리가 준비되면, 연구자는 시퀀싱을 시작하기에 앞서 모든 라이브러리의 품질과 순도(purity)를 확인해야 합니다. Agilent사의 Bioanalyzer나 Fragment Analyzer 시스템 또는 TapeStation을 사용해 라이브러리 무결성(integrity), 평균 라이브러리 삽입 크기 및 오염물을 확인합니다.

### 추가적인 비드 정제를 통한 짧은 라이브러리의 제거

이 예시에서는 Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit를 이용하여 준비한 폐수 샘플의 라이브러리를 [Optimal variant calling with Illumina DNA PCR-Free Prep on the NovaSeq™ X Series Technical Note](#)에 기술된 프로토콜과 비슷한 절차에 따라 비드 대 샘플 비율을 0.8x로 적용하여 추가적인 비드 정제를 진행했습니다. 다만 한 가지 차이가 있다면, 기존 프로토콜의 2단계에 명시된 52.5 µl의 Illumina Purification Beads를 넣는 대신, 이 예시에서는 40 µl 넣었습니다. 추가적인 비드 정제를 통해 길이가 250 bp 미만인 절편이 대부분 효과적으로 제거되었으며, 라이브러리 수율은 약 35% 감소했습니다(그림 3).

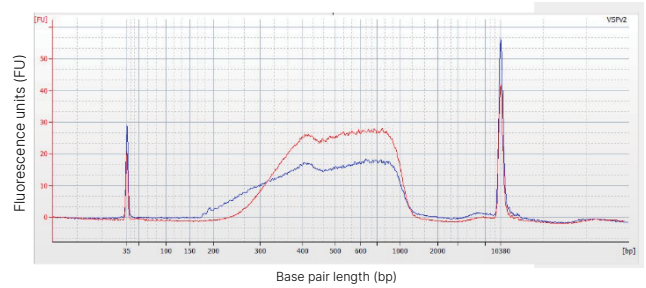


그림 3: 추가적인 비드 정제 시 증가된 라이브러리 삽입 크기 — 추가적인 비드 정제를 적용한 프로토콜(빨간색 선)은 변경하지 않은 프로토콜(파란색 선)과 비교했을 때 길이가 250 bp 미만인 절편 대부분을 효과적으로 제거하였음

### 시퀀싱 성능 향상

Viral Surveillance Panel v2 라이브러리는 추가적인 비드 정제를 적용한 조건과 적용하지 않는 조건에서 MiSeq i100 시리즈로 시퀀싱한 후 DRAGEN Microbial Enrichment Plus 앱으로 분석했습니다. 추가적인 비드 정제를 적용하여 준비한 라이브러리를 시퀀싱하였을 때는 변경하지 않은 프로토콜을 그대로 사용했을 때보다 Mean read length나 % post-quality reads와 같은 메트릭스가 향상되었고 Microorganism detection count도 증가했습니다(그림 4).

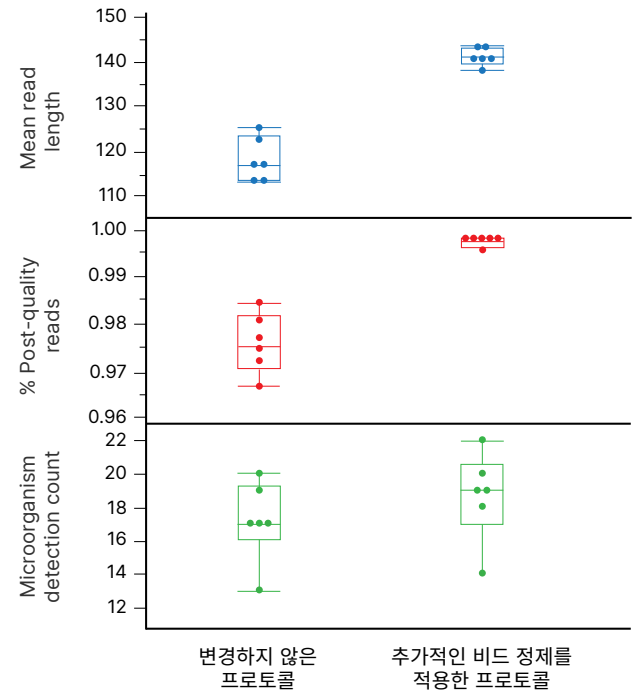


그림 4: 라이브러리 삽입 크기 증가 시 향상된 성능 — 변경한 프로토콜(라이브러리 삽입 크기 증가)에 따라 준비한 라이브러리를 MiSeq i100 시리즈로 시퀀싱했을 때 평균 리드 길이, 고품질 리드 비율(%) 및 미생물 검출 횟수가 모두 증가하며 향상된 성능을 보여줌

### 뉴클레오티드 다양성

뉴클레오티드 다양성은 런의 모든 사이클에 존재하는 각 염기(A, C, G, 또는 T)의 상대적 비율을 의미합니다. 뉴클레오티드 균형은 시퀀싱 시스템의 컬러 매트릭스 수정(color matrix correction)과 강도 정규화(intensity normalization)에 중요합니다. Real-Time Analysis는 MiSeq i100 시리즈에 내장되어 있는 적응형 소프트웨어(adaptive software)로, 다양성이 낮은 라이브러리의 정확한 베이스콜링을 위해 세심하게 개발되었습니다. 가장 낮은 %의 PhiX spike-in(≥ 5%)으로 최대한 많은 고품질의 리드를 생성하여 다양성이 낮은 라이브러리를 시퀀싱할 때도 최적의 성능을 확보할 수 있습니다.

이 예시에서 5% 및 20% PhiX spike-in을 사용하여 다양성이 낮은 16S 앰플리콘 라이브러리를 MiSeq i100 시리즈로 시퀀싱했을 때 다양성이 높은 인간 Illumina DNA Prep 라이브러리를 시퀀싱했을 때와 비슷한 수준의 우수한 성능을 확인할 수 있었습니다(그림 5).

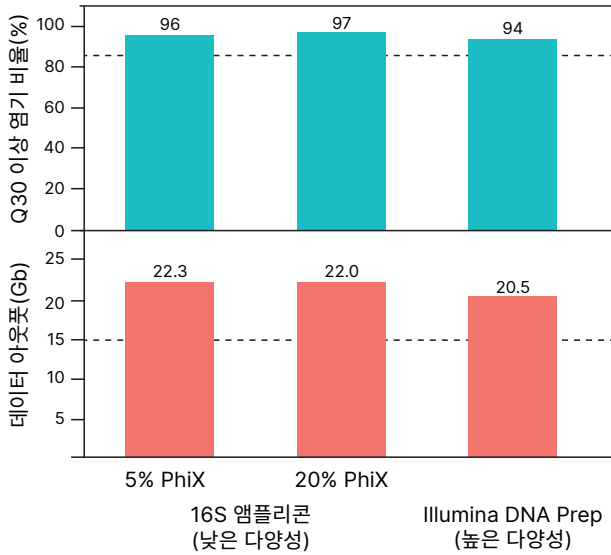


그림 5: 다양성이 낮은 라이브러리의 사용 지원 — Q30 이상 염기 비율(%) 및 데이터 아웃풋(Gb)을 통해 확인할 수 있듯이, MiSeq i100 시리즈에 내장되어 있는 소프트웨어가 다양성이 낮은 라이브러리의 시퀀싱 성능을 최적화함. 모든 시퀀싱 런은 MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit(600 Cycles)와 2 × 301 bp의 리드 길이를 사용해 수행하였으며, 그림의 파선은 성능 사양을 나타냄

## 요약

MiSeq i100 시리즈는 획기적으로 진보된 시퀀싱 chemistry와 통합된 데이터 분석 기능을 기반으로 향상된 사용성, 우수한 데이터 정확도, 매우 빠른 처리 속도를 제공합니다. 이 Technical Note에 소개된 모범 사례에 따라 라이브러리 품질 확인, 라이브러리 로딩 농도 최적화, 라이브러리 풀링(pooling)을 진행하면 MiSeq i100 시리즈로 최적의 성능을 확보할 수 있습니다.

## 상세 정보

[MiSeq i100 및 MiSeq i100 Plus 시퀀싱 시스템](#)



무료 전화(한국) 080-234-5300  
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. All rights reserved.  
 모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.  
 특정 상표 정보는 [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html)을 참조하십시오.  
 M-GL-03322 v1.0 KOR