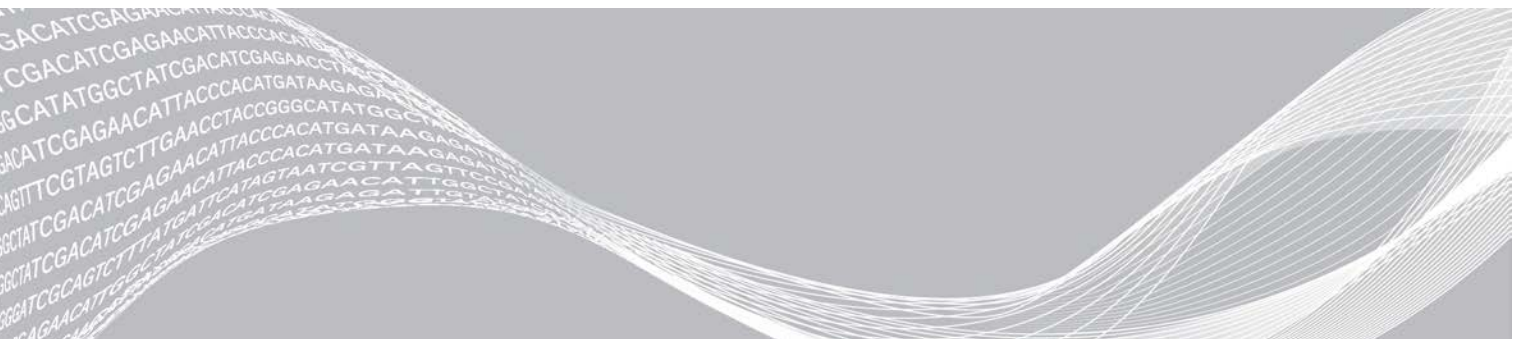


TruSight Oncology 500

Reference 가이드



본 문서와 그 내용은 Illumina, Inc. 및 계열사("Illumina")의 소유이며, 계약을 체결한 고객만이 본 문서에 기술된 제품의 사용과 관련하여 이용할 수 있습니다. 본 문서와 그 내용은 Illumina의 사전 서면 동의 없이 다른 목적으로 사용되거나 배포되지 않으며 어떠한 방식으로든 전달, 공개 또는 복제되지 않습니다. Illumina는 특허권, 상표권, 저작권 또는 관습 법상의 권리에 따른 사용권이나 본 문서에 의해 부여된 이와 유사한 제3자의 권리를 양도하지 않습니다.

본 문서의 지침은 본 문서에 기술된 제품의 적절하고 안전한 사용을 보장하기 위해 자격을 갖추고 적절한 교육을 받은 사람이 엄격하고 명시적으로 준수해야 합니다. 해당 제품을 사용하기 전에 본 문서의 모든 내용을 완전히 읽고 이해해야 합니다.

본 문서에 포함된 지침을 완전히 읽고 명시적으로 따르지 않을 경우 제품 손상, 사용자를 포함한 신체적 상해 및 기타 자산의 손실이 발생할 수 있으며 본 제품에 대한 모든 보증이 무효화됩니다.

Illumina는 본 문서에 기술된 제품(부품 또는 소프트웨어 포함)의 부적절한 사용으로 인해 발생하는 모든 문제에 대해 어떠한 책임도 지지 않습니다.

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 개별 소유자의 재산입니다. 특정 상표 정보는 www.illumina.com/company/legal.html을 참조하십시오.

개정 내역

문서	날짜	변경사항 설명
문서 번호 1000000067621 v01	2019년 3월	RNA에서 파생된 샘플 라이브러리에 대한 프로토콜에 단계가 추가되었습니다. RNA에 대한 키트 내용물, 소모품 및 장비가 추가되었습니다.
문서 번호 1000000067621 v00	2018년 12월	최초 릴리즈.

목차

1장 개요	1
도입	1
RNA/DNA Input 권장사항	1
DNA 절단 권장사항	2
추가 리소스	2
2장 프로토콜	3
도입	3
도움말 및 기법	4
라이브러리 프랩 DNA 전용 워크플로우	6
인리치먼트 DNA 전용 워크플로우	7
라이브러리 프랩 DNA 및 RNA 워크플로우	8
인리치먼트 DNA 및 RNA 워크플로우	9
RNA 변성 및 강화	10
첫 번째 나선 cDNA 합성	11
두 번째 나선 cDNA 합성	12
cDNA 세척	12
gDNA 절편	14
엔드 복구 및 A-테일링 수행	15
어댑터 결합	17
Ligation 세척	18
PCR 인덱스	19
첫 번째 혼성화 설정	21
타겟 캡처 1	22
두 번째 혼성화 설정	24
타겟 캡처 2	25
인리치된 라이브러리 증폭	28
증폭 및 인리치된 라이브러리 세척	29
라이브러리 정량화(옵션)	30
라이브러리 노멀라이즈	31
로드 농도로 라이브러리 풀링 및 희석	33
부록 A 지원 정보	34
도입	34
두문자어	34
키트 내용물	34
소모품 및 장비	37
기술 지원	40

1장 개요

도입	1
RNA/DNA Input 권장사항	1
DNA 절단 권장사항	2
추가 리소스	2

도입

TruSight™ Oncology 500 프로토콜은 포르말린-고정 파라핀-포매(FFPE) 샘플에서 추출된 DNA 및 RNA를 Illumina® 시퀀싱 시스템에서 시퀀싱할 수 있는 암 관련 유전자에 대해 인리치된 라이브러리로 전환하기 위한 인리치먼트 기반 접근방식을 설명합니다. TruSight Oncology 500 키트를 사용하면 DNA 또는 RNA, 혹은 DNA와 RNA 조합으로 48개의 라이브러리를 준비할 수 있습니다.

이 키트는 523개 유전자 전반에서 저빈도(low-frequency) Somatic variant에 대해 높은 민감도 및 특이도를 제공하도록 최적화되었습니다. DNA 바이오마커에는 SNV(단일 뉴클레오티드 변이), 삽입, 삭제 및 MNV(다중 뉴클레오티드 변이)가 포함됩니다. 또한 TruSight Oncology 500은 DNA에서 TMB(종양 돌연변이 부담) 및 MSI(미부수체 불안정성, microsatellite instability)에 대한 면역요법 바이오마커를 감지합니다. 융합 및 스플라이스 변이는 RNA에서 감지됩니다.

TruSight Oncology 500 로컬 앱 소프트웨어를 사용하여 DNA 전용 시퀀싱 데이터를 분석합니다. 소프트웨어 변이 콜링 알고리즘은 타겟 유전자의 전체 코딩 영역, TMB 점수 및 MSI 상태에서 돌연변이에 대한 보고서를 제공합니다. *TruSight Oncology 500 로컬 앱 사용자 가이드(문서 번호 1000000067616)*를 참조하십시오.

TruSight 170 로컬 앱을 사용하여 RNA 시퀀싱 데이터를 분석합니다. *TruSight Tumor 170 로컬 앱 사용자 가이드(문서 번호 1000000036413)*를 참조하십시오. 앱은 RNA 라이브러리에 대한 융합 및 스플라이스 변이 콜 파일을 보고합니다.

RNA/DNA Input 권장사항

TruSight Oncology 500 키트 에세이는 40ng의 DNA/RNA Input이 필요합니다. 프로토콜을 시작하기 전에 핵산 Input을 정량화합니다. 충분한 핵산 물질을 얻으려면 FFPE 조직의 최소 2mm³에서 핵산을 분리합니다.

- ▶ 높은 회수율을 생성하고 샘플 소비를 최소화하며 샘플 온전성을 보존하는 핵산 분리 방법을 사용합니다. QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE 키트는 이 에세이에 대해 테스트한 다른 추출 방법보다 높은 핵산 수율을 제공합니다.
- ▶ QuantiFluor®(RNA) 또는 AccuClear™(DNA)와 같은 RNA/DNA 결합 염료를 사용하는 형광 정량화 방법을 사용합니다.

최적의 성능을 내기 위해 TruSight Oncology 500 키트 에세이를 사용하기 전에 DNA 및 RNA 샘플 품질을 평가합니다.

- ▶ DNA 샘플은 Illumina FFPE QC 키트를 사용하여 평가할 수 있습니다.
- ▶ 델타 Cq 값이 ≤ 5인 DNA 샘플을 사용합니다. 델타 Cq 값이 > 5인 샘플은 에세이 성능을 저하시킬 수 있습니다.
- ▶ RNA 샘플은 Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer™(Standard Sensitivity RNA 분석 키트) 또는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer(Agilent RNA 6000 나노 키트)를 사용하여 평가할 수 있습니다.
- ▶ DV200 값이 ≥ 20%인 RNA 샘플을 사용합니다. DV200 값이 < 20%인 샘플을 사용하면 에세이 성능이 저하될 수 있습니다.

Reference 샘플(옵션)

- ▶ 라이브러리 프랩을 실행할 때 HorizonDx HD753(DNA) 및 Agilent Universal Human Reference RNA와 같이 변이 구성이 알려진 Reference 물질을 사용하십시오. Agilent Universal Human Reference RNA는 온전한 RNA 샘플입니다. 10페이지의 RNA 변성 및 강화에 있는 온전한 RNA 과정을 수행한 후에 샘플을 처리하십시오.
- ▶ RNase/DNase 없는 순수를 No Template Control로 사용하십시오. No Template Control을 시퀀싱하지 마십시오.
- ▶ Reference 샘플 또는 No Template Control을 처리하는 경우 처리할 수 있는 총 테스트 샘플 수가 감소합니다.

DNA 절단 권장사항

TruSight Oncology 500 키트 에세이는 90 ~ 250bp로 분할되는 gDNA에서 라이브러리를 프랩하도록 최적화됩니다. 이 에세이는 14페이지의 gDNA 절편에 나와 있는 매개변수와 함께 Covaris E220 evolution™ 또는 LE220 Focused 초음파분쇄기를 사용하여 최적화됩니다. 절편 크기 분포는 절편화에 사용된 샘플 품질의 차이와 초음파처리 기기 장치에 따라 다를 수 있습니다.

E220 evolution 또는 LE220 이외의 Covaris 모델의 경우 TruSight Oncology 500 키트 지원 페이지를 참조하십시오.

다음 가이드라인을 사용하여 절단합니다.

- ▶ 절단 튜브에 발생하는 과도한 버블 또는 공극으로 인해 불완전한 절단이 발생할 수 있습니다.
 - ▶ 버블이 생기지 않도록 gDNA를 Covaris 튜브에 천천히 로드합니다.
 - ▶ Covaris 튜브를 원심분리하여 튜브의 하단에 샘플을 수집한 후에 절단합니다.
- ▶ LE220 Covaris 기기를 사용하는 경우 최적의 성능을 내기 위해 사용하지 않은 Covaris 8 microTUBE Strip 웰을 순수 52µl로 채웁니다.
- ▶ **[옵션]** Agilent DNA 1000 키트를 Agilent Bioanalyzer 2100과 함께 사용하여 절단된 샘플의 절편 크기 분포를 평가합니다.

추가 리소스

분석 소프트웨어를 포함하여 호환되는 Illumina 제품에 대한 설명서, 소프트웨어 다운로드, 교육 리소스 및 정보는 Illumina 웹사이트에서 TruSight Oncology 500 키트 지원 페이지를 참조하십시오. 항상 최신 버전의 지원 페이지를 확인하십시오.

다음 설명서는 Illumina 웹사이트에서 다운로드할 수 있습니다.

리소스	설명
사용자지정 프로토콜 선택기	support.illumina.com/custom-protocol-selector.html 시퀀싱 런에 사용된 라이브러리 프랩 방법, 런 매개변수 및 분석 방법에 맞게 맞춤화된 포괄적인 사용자지정 설명서를 생성하는 마법사입니다.
TruSight Oncology 500 체크리스트(문서 번호 1000000067619)	숙련된 사용자를 위한 단계별 체크리스트를 제공합니다.
TruSight Oncology 500 소모품 및 장비 목록(문서 번호 1000000067617)	사용자가 준비해야 하는 소모품 및 장비에 대한 대화형 체크리스트를 제공합니다.

2장 프로토콜

도입	3
도움말 및 기법	4
라이브러리 프렙 DNA 전용 워크플로우	6
인리치먼트 DNA 전용 워크플로우	7
라이브러리 프렙 DNA 및 RNA 워크플로우	8
인리치먼트 DNA 및 RNA 워크플로우	9
RNA 변성 및 강화	10
첫 번째 나선 cDNA 합성	11
두 번째 나선 cDNA 합성	12
cDNA 세척	12
gDNA 절편	14
엔드 복구 및 A-테일링 수행	15
어댑터 결합	17
Ligation 세척	18
PCR 인덱스	19
첫 번째 혼성화 설정	21
타겟 캡처 1	22
두 번째 혼성화 설정	24
타겟 캡처 2	25
인리치된 라이브러리 증폭	28
증폭 및 인리치된 라이브러리 세척	29
라이브러리 정량화(옵션)	30
라이브러리 노멀라이즈	31
로드 농도로 라이브러리 풀링 및 희석	33

도입

이 섹션에서는 TruSight Oncology 500 키트 프로토콜에 대해 설명합니다.

- ▶ 샘플에서 분석까지 전체 시퀀싱 워크플로우를 검토하여 제품 및 실험 매개변수의 호환성을 보장합니다.
- ▶ 진행하기 전에 키트 내용물을 확인하여 필요한 소모품 및 장비가 있는지 확인합니다. 자세한 내용은 34 페이지의 **키트 내용물**을 참조하십시오.
- ▶ 지정된 매개변수를 사용하여 설명된 순서대로 프로토콜을 따릅니다.
- ▶ 라이브러리 프렙을 시작하기 전에 샘플 농도 및 샘플 품질 정보를 기록합니다. 나중에 데이터 분석 중에 사용할 수 있도록 이 정보를 저장합니다.

RNA 라이브러리와 DNA 라이브러리를 동시에 프렙할 수 있습니다. Illumina는 다음 일정에 따라 TruSight Oncology 500 키트 에세이 워크플로우를 수행할 것을 권장합니다.

- ▶ 제1일: RNA 샘플에서 cDNA 합성, gDNA 샘플의 DNA 절단, 라이브러리 프렙 및 오버나잇(첫 번째) 혼성화 시작. 6페이지의 **라이브러리 프렙 DNA 전용 워크플로우** 및 8페이지의 **라이브러리 프렙 DNA 및 RNA 워크플로우**를 참조하십시오.
- ▶ 제2일: 인리치먼트, (옵션) 인리치된 라이브러리 QC 검사(라이브러리 정량화), 인리치된 라이브러리의 비드 기반 노멀라이제이션 및 시퀀싱 플랫폼에 라이브러리 로드. 7페이지의 **인리치먼트 DNA 전용 워크플로우** 및 9페이지의 **인리치먼트 DNA 및 RNA 워크플로우**를 참조하십시오.

프로토콜 전반에 표시된 안전한 중단점을 통해 이전 일정에 대안을 수행할 수 있습니다.

도움말 및 기법

프로토콜을 시작하기 전에 도움말 및 기법을 검토하십시오. 여러 중요한 기법이 여기에만 나열되어 있고 프로토콜에서는 반복되지 않습니다.

안전한 중단점이 프로토콜에 지정되지 않은 경우 즉시 다음 단계를 진행하십시오.

교차 오염 방지

- ▶ Pre-Amp 영역에서 Post-Amp 영역으로 이동할 때 단방향 워크플로우를 사용하십시오.
- ▶ 증폭 제품 또는 프로브 캐리오버를 방지하려면 Post-Amp 영역에서 작업을 시작한 후에 Pre-Amp 영역으로 돌아가지 않도록 하십시오.
- ▶ 절차 전후에 작업 표면을 깨끗하게 세척하십시오.
- ▶ 샘플을 추가하거나 옮길 때 **각 웰** 사이에 팁부를 변경하십시오.
- ▶ 인덱싱 프라이머를 추가할 때 **각 웰** 사이에 팁부를 변경하십시오.
- ▶ 작업 영역에서 사용하지 않은 인덱싱 프라이머 튜브를 제거하십시오.
- ▶ 장갑이 인덱싱 프라이머, 샘플 또는 프로브에 접촉한 경우 장갑을 교체하십시오.

플레이트 포장

- ▶ 프로토콜에서 다음 단계를 수행하기 전에 항상 해당 플레이트 포장지를 사용하여 플레이트를 포장하십시오.
 - ▶ 흔들기 단계
 - ▶ 와류 단계
 - ▶ 원심분리 단계
 - ▶ 열 사이클링 단계
- ▶ 접착 포장지를 적용하여 플레이트를 덮고 고무 롤러로 포장하십시오.
- ▶ 플레이트를 덮을 때마다 새 포장지를 적용하십시오.
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지는 -40°C ~ 110°C에서 효과적이며 스커트형 또는 반 스커트형 PCR 플레이트에 적합합니다. 흔들기, 원심분리, PCR 증폭 및 장기 보관에는 Microseal 'B'를 사용하십시오.

플레이트 전송

- ▶ 플레이트 간에 용량을 옮길 때 플레이트의 각 웰에서 지정된 용량을 다른 플레이트의 해당 웰로 옮기십시오.

원심분리

- ▶ 플레이트를 원심분리하라는 지침이 있는 경우 280 × g에서 1분 동안 원심분리하십시오.

시약 처리

- ▶ 증발을 제한하고 오염을 방지하기 위해 사용 직후에 모든 시약 튜브의 캡을 단단히 닫으십시오.
- ▶ 절차에 더 이상 필요하지 않은 경우 시약을 권장 보관 조건에 맞게 되돌려 놓으십시오.
- ▶ TruSight Oncology 500 키트는 안전성이 평가되었으며 최대 8회의 키트 사용으로 성능이 입증되었습니다.

어댑터 세트

- ▶ TruSight Oncology 500 키트에는 UMI1 어댑터와 SUA1 어댑터가 포함됩니다. UMI1 어댑터는 DNA 샘플과 함께 사용하고 SUA1 어댑터는 RNA 샘플과 함께 사용합니다. DNA 라이브러리에는 SUA1 어댑터를 사용하지 마십시오. RNA 라이브러리에는 UMI1 어댑터를 사용하지 마십시오.

비드 처리

- ▶ 파이펫을 사용하여 비드를 혼합할 때:
 - ▶ 혼합하는 용량에 적합한 파이펫과 팁 크기를 사용하십시오(예를 들어 20 μ l ~ 200 μ l의 용량에는 P200 사용).
 - ▶ 용량 설정을 샘플 용량의 약 50 ~ 75%로 조정하십시오.
 - ▶ 플런저를 해제하지 않은 상태에서 파이펫을 느리고 부드럽게 사용하십시오.
 - ▶ 과도하게 파이펫팅을 사용하여 튀거나 버블이 발생하지 않도록 하십시오.
 - ▶ 파이펫의 팁부를 펠릿 위에 놓고 펠릿에 직접 분사하여 웰 또는 튜브에서 비드를 방출하십시오.
 - ▶ 비드 펠릿이 완전히 용해되었는지 확인하십시오. (예를 들어 SMB 펠릿의 경우 용액이 어두운 갈색이어야 하며 균질해야 합니다.)
- ▶ 사용하기 전에 비드를 실온에 두십시오.
- ▶ 균질성을 보장하기 위해 사용하기 전에 1분 동안 비드를 혼합하십시오.
- ▶ 자기 분리 단계 동안 비드가 파이펫 팁부로 흡입되는 경우 자기 스탠드에 있는 플레이트의 동일한 웰에 다시 분사하십시오. 액체가 투명해질 때까지 기다리십시오(약 2분).
- ▶ 비드를 세척할 때:
 - ▶ 플레이트에 해당하는 자기 스탠드를 사용하십시오.
 - ▶ 웰의 측면에 있는 비드가 젖도록 액체를 비드 펠릿에 직접 분사하십시오.
 - ▶ 제거하라는 지침이 있을 때까지 플레이트를 자기 스탠드에 두십시오.
 - ▶ 자기 스탠드에 있는 동안 플레이트를 흔들지 마십시오. 비드 펠릿을 건드리지 마십시오.

라이브러리 프렙 DNA 전용 워크플로우

하기의 도면은 TruSight Oncology 500 키트를 사용하는 권장 DNA 전용 라이브러리 프렙 워크플로우를 보여줍니다. 안전한 중단점이 단계 사이에 표시되어 있습니다.

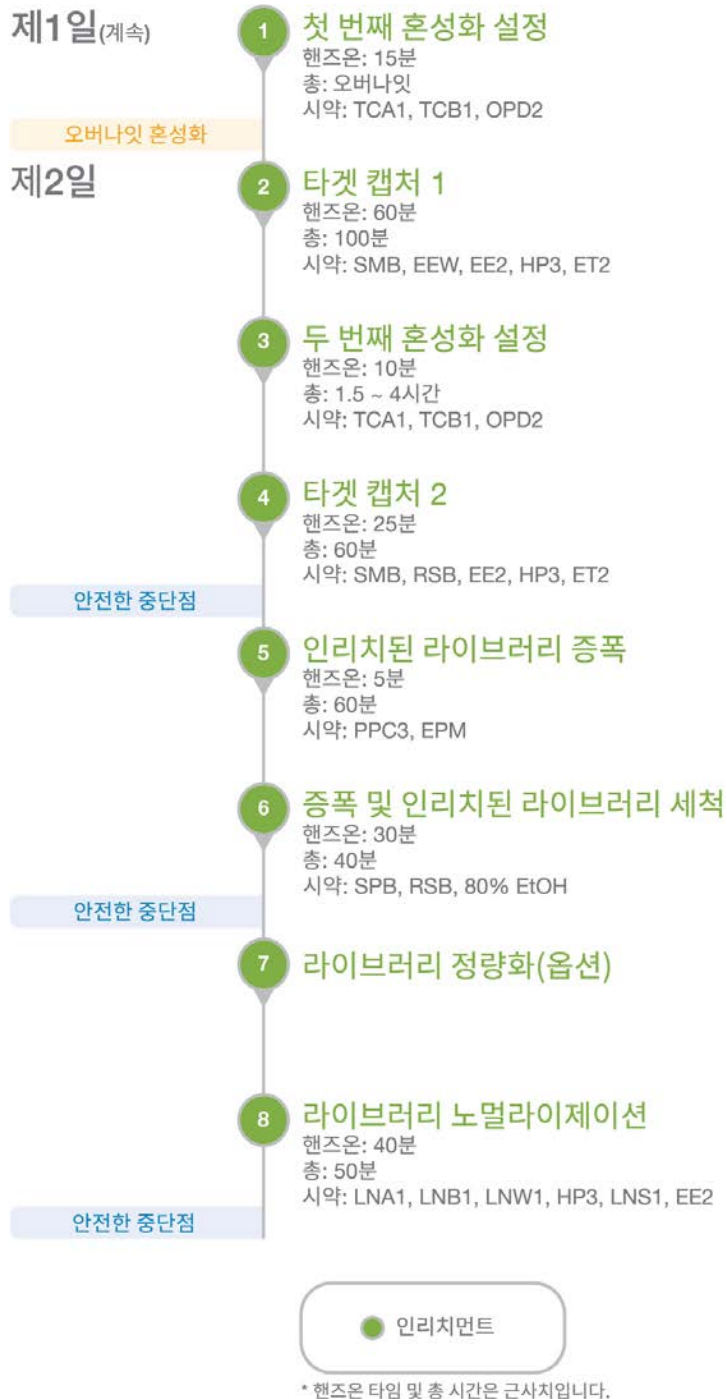
그림 1 TruSight Oncology 500 키트 DNA 전용 워크플로우(파트 1)



인리치먼트 DNA 전용 워크플로우

하기의 도면은 TruSight Oncology 500 키트를 사용하는 권장 인리치먼트 DNA 전용 워크플로우를 보여줍니다. 안전한 중단점이 단계 사이에 표시되어 있습니다.

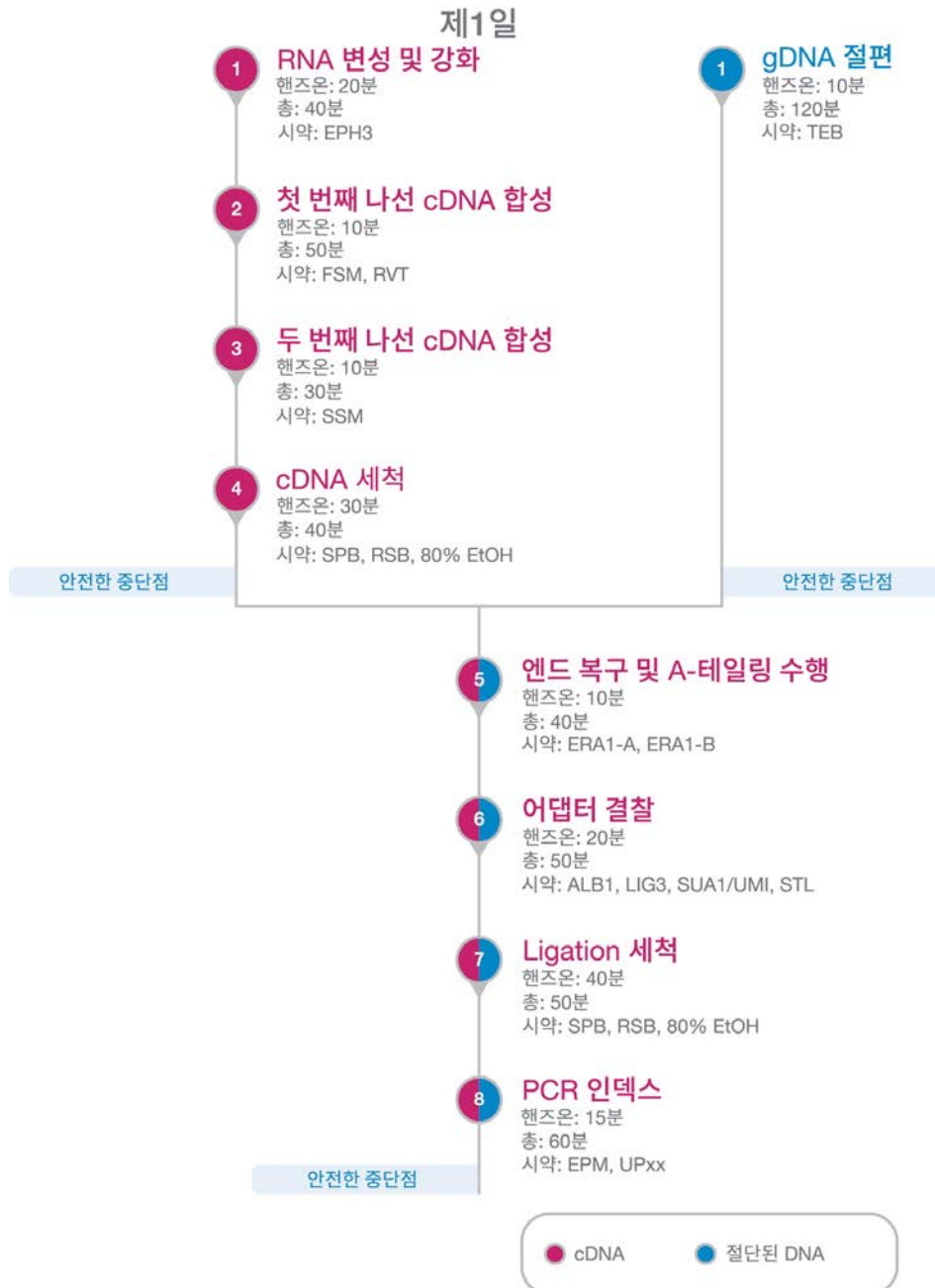
그림 2 TruSight Oncology 500 키트 DNA 전용 워크플로우(파트 2)



라이브러리 프랩 DNA 및 RNA 워크플로우

하기의 도면은 TruSight Oncology 500 키트를 사용하는 권장된 라이브러리 프랩 DNA 및 RNA 워크플로우를 나타냅니다. RNA 라이브러리와 DNA 라이브러리를 동시에 준비할 수 있습니다. 안전한 중단점이 단계 사이에 표시되어 있습니다.

그림 3 TruSight Oncology 500 키트 DNA 및 RNA 워크플로우(파트 1)



* 핸즈온 및 총 시간은 근사치입니다.
 제시된 핸즈온 타임은 8개의 DNA 샘플과 8개의 RNA 샘플을 기준으로 산출되며 Covaris 초음파분쇄기의 가스 배출 시간도 포함됩니다.

인리치먼트 DNA 및 RNA 워크플로우

다음 다이어그램은 TruSight Oncology 500 키트를 사용하는 권장 인리치먼트 DNA 및 RNA 워크플로우를 보여줍니다. 안전한 중단점이 단계 사이에 표시되어 있습니다.

그림 4 TruSight Oncology 500 키트 DNA 및 RNA 워크플로우(파트 2)



RNA 변성 및 강화

이 과정 중에 cDNA 합성을 준비하기 위해 정제된 RNA가 변성되고 무작위 6합체로 프라이밍됩니다. 정제된 DNA만 사용하여 작업하는 경우 14페이지의 *gDNA 절편*을 바로 진행하십시오.

소모품

- ▶ 뉴클레아제가 없는 순수
- ▶ EPH3(용출, 프라임, 절편 하이 믹스 3)[빨간색 캡]
- ▶ FSM(첫 번째 나선 합성 믹스)[빨간색 캡]
- ▶ RVT(역전사 효소)[빨간색 캡]
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지



주의

다음 절차를 수행하려면 RNase 및 Dnase가 없는 환경이 필요합니다. RNase 억제 클리너를 사용하여 작업 영역의 오염을 완전히 제거하십시오. RNA 전용 장비를 사용해야 합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
EPH3	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
FSM	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
RVT	-25°C ~ -15°C	얼음 위에 보관합니다. 짧게 원심분리합니다.

- 2 얼음에서 RNA 샘플을 해동합니다.
- 3 샘플을 정성화 및 정량화합니다. 1페이지의 *RNA/DNA Input 권장사항*을 참조하십시오.
- 4 정제된 각 RNA 샘플을 RNase/Dnase 없는 순수에서 4.7ng/μl ~ 10ng/μl의 농도로 희석합니다.
 - ▶ 정제된 각 RNA 샘플에 최소 40ng 및 최대 85ng를 사용합니다.
- 5 다음 프로그램을 열 사이클러에 저장합니다.
 - ▶ FFPE 또는 분할된 RNA의 경우 LQ-RNA 프로그램을 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정
 - ▶ 반응 용량을 17μl로 설정
 - ▶ 5분 동안 65°C
 - ▶ 4°C에서 유지
 - ▶ 세포주 또는 온전한 RNA의 경우 HQ-RNA 프로그램을 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정
 - ▶ 반응 용량을 17μl로 설정
 - ▶ 8분 동안 94°C
 - ▶ 4°C에서 유지
- 6 새로운 96웰 PCR 플레이트 CF(cDNA 절편)에 라벨을 지정합니다.

절차

- 1 다음 시약을 마이크로 원심분리 튜브에 혼합하여 FSM+RVT 마스터 믹스를 만듭니다.

마스터 믹스 구성요소	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
FSM	27µl	72µl	144µl	216µl
RVT	3µl	8µl	16µl	24µl

- ▶ 최소 3개의 샘플을 준비합니다.
 - ▶ 사용 후 남은 마스터 믹스를 폐기합니다.
- 2 파이펫을 사용하여 혼합합니다.
 - 3 11페이지의 첫 번째 나선 cDNA 합성 과정을 진행하기 전까지 FSM+RVT 마스터 믹스를 얼음 위에 놓습니다.
 - 4 정제된 각 RNA 샘플의 8.5µl(4.7ng/µl ~ 10ng/µl)를 CF 플레이트의 해당 웰에 추가합니다.
 - 5 EPH3 8.5µl를 각 웰에 추가합니다.
 - 6 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 1분 동안 흔듭니다.
 - 7 사전 프로그래밍된 열 사이클러에 놓고 LQ-RNA 또는 HQ-RNA 프로그램을 실행합니다.

첫 번째 나선 cDNA 합성

이 과정에서는 역전사 효소를 사용하여 무작위 6합체로 프라이밍된 RNA 절편을 첫 번째 나선 cDNA로 역전사합니다.

소모품

- ▶ FSM+RVT 마스터 믹스(10페이지의 RNA 변성 및 강화에서 준비됨)
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

준비

- 1 다음 프로그램을 가열된 뚜껑이 있는 열 사이클러에 1stSS로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정
 - ▶ 반응 용량을 25µl로 설정
 - ▶ 10분 동안 25°C
 - ▶ 15분 동안 42°C
 - ▶ 15분 동안 70°C
 - ▶ 4°C에서 유지

절차

- 1 열 사이클러에서 CF 플레이트를 제거합니다.
- 2 사용하기 전에 파이펫을 사용하여 FSM+RVT 마스터 믹스를 혼합합니다.
- 3 FSM+RVT 마스터 믹스 8µl를 각 웰에 추가합니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 1분 동안 흔듭니다.

- 5 열 사이클러에 놓고 1stSS 프로그램을 실행합니다.
- 6 또한 DNA 라이브러리를 프렙하는 경우 1stSS 프로그램이 실행되는 동안 gDNA 분할을 시작할 수 있습니다. 시작하려면 14페이지의 *gDNA 절편*을 참조하십시오.

두 번째 나선 cDNA 합성

이 과정에서는 RNA 템플릿을 제거하고 이중 나선 cDNA를 합성합니다.

소모품

- ▶ SSM(두 번째 나선 믹스)[빨간색 캡]
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
SSM	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 10회 뒤집어서 혼합합니다. 짧게 원심분리합니다.

- 2 다음 프로그램을 가열된 뚜껑이 있는 열 사이클러에 2ndSS로 저장합니다. 뚜껑 온도를 30°C로 설정할 수 없는 경우 예열된 뚜껑 열 옵션을 턴오프 합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 30°C로 설정
 - ▶ 반응 용량을 50µl로 설정
 - ▶ 25분 동안 16°C
 - ▶ 4°C에서 유지

절차

- 1 열 사이클러에서 CF 플레이트를 제거합니다.
- 2 SSM 25µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 1분 동안 흔들립니다.
- 4 열 사이클러에 놓고 2ndSS 프로그램을 실행합니다.

cDNA 세척

이 과정에서는 원치 않는 반응 구성요소로부터 cDNA를 정제하기 위해 SPB를 사용합니다.

소모품

- ▶ 새로 준비된 80% 에탄올(EtOH)
- ▶ SPB(샘플 정제 비드)
- ▶ RSB(재현탁 완충용액)
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지
- ▶ 96웰 중형 플레이트(1-2)
- ▶ **[옵션]** 96웰 PCR 플레이트



주의

최적의 에세이 성능을 위해 적합한 플레이트 유형이 필요합니다. 이 단계 이후에 프로토콜을 지속하려면 중형 플레이트를 사용하십시오. 이 단계 이후에 샘플을 저장하려면 PCR 플레이트를 사용하십시오. 자세한 내용은 13페이지의 준비를 참조하십시오.

시약 정보

- ▶ 매번 사용하기 전에 SPB를 와류시킵니다.
- ▶ 비드가 균등하게 분산되도록 SPB를 자주 와류시킵니다.
- ▶ 용액의 점도로 인해 SPB를 천천히 흡입하고 분사합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
SPB	2°C ~ 8°C	최소 30분 동안 실온에 둡니다. SPB를 사용하기 전에 1분 동안 와류시킵니다.
RSB	2°C ~ 8°C 또는 -25°C ~ -15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C ~ -15°C에 보관된 경우 사용하기 전에 실온에서 해동하고 와류시킵니다.

- 2 새로운 96웰 중형 플레이트 BIND1에 라벨을 지정합니다.
- 3 다음 플레이트 옵션 중 1개를 선택합니다.
 - ▶ cDNA를 세척한 후 즉시 라이브러리 프랩을 계속하려면 새로운 96웰 플레이트 PCF(정제된 cDNA 절편)에 라벨을 지정합니다.
 - ▶ 이 단계 이후에 플레이트를 저장하려면 96웰 PCR 플레이트를 사용합니다.
- 4 새로운 80% EtOH를 준비합니다.

절차

결합

- 1 열 사이클러에서 CF 플레이트를 제거합니다.
- 2 SPB 90μl를 BIND1 중형 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 3 각 샘플의 50μl를 CF 플레이트에서 BIND1 중형 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 5 실온에서 5분 동안 배양합니다.

세척

- 1 BIND1 중형 플레이트를 자기 스탠드에 5분 동안 놓아둡니다.
- 2 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.
- 3 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자기 스탠드에서 새로운 80% EtOH 200μl를 추가합니다.
 - b 30초 동안 기다린 후 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.

- 4 3단계(a-b)를 반복하여 두 번째로 세척합니다.
- 5 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용하여 각 웰에서 잔류 상청액을 제거합니다.

용출

- 1 자기 스탠드에서 BIND1 중형 플레이트를 제거합니다.
- 2 RSB 22 μ l를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 1500rpm의 속도로 2분 동안 흔들립니다.
- 4 실온에서 2분 동안 배양합니다.
- 5 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 6 용출액 20 μ l를 BIND1 중형 플레이트의 각 웰에서 PCF 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 7 RSB 30 μ l를 PCF 플레이트의 각 웰에 추가한 다음 파이펫을 사용하여 혼합합니다(최소 10회).
- 8 15페이지의 **엔드 복구 및 A-테일링 수행**을 진행하거나 Microseal 'B'를 적용하고 보관합니다. 또한 DNA 라이브리리를 프랩하는 경우 정제된 cDNA 절편 및 절단된 DNA 샘플을 동일한 플레이트에 보관할 수 있습니다. 웰에 라벨을 지정합니다. 자세한 내용은 14페이지의 **gDNA 절편**에서 준비 섹션을 참조하십시오.

안전한 중단점

중단하는 경우 Microseal 'B'를 PCF PCR 플레이트에 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리합니다. 최대 7일 동안 -25°C ~ -15°C에서 보관합니다.

gDNA 절편

이 과정에서는 Covaris LE220 Focused 초음파분쇄기 또는 Covaris E220 *evolution*을 사용하여 gDNA를 90 ~ 250bp 절편 크기로 분할합니다. Covaris 절단은 3' 및 5' 돌출부가 있는 dsDNA 절편을 생성합니다.

소모품

- ▶ TEB(TE 완충용액)
- ▶ 알루미늄 포장지에 싸인 Covaris 8 microTUBE Strip
- ▶ 96웰 중형 플레이트
- ▶ **[옵션]** 96웰 PCR 플레이트



주의

최적의 에세이 성능을 위해 적합한 플레이트 유형이 필요합니다. 이 단계 이후에 프로토콜을 지속하려면 중형 플레이트를 사용하십시오. 이 단계 이후에 샘플을 저장하려면 PCR 플레이트를 사용하십시오. 자세한 내용은 14페이지의 **준비**를 참조하십시오.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
TEB	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 뒤집어서 혼합합니다.

- 2 제조업체의 가이드라인에 따라 Covaris 기기를 켜고 설정합니다. 이 기기는 가스를 배출하는 데 약 1시간이 소요됩니다.

- 3 다음 플레이트 옵션 중 1개를 선택합니다.
 - ▶ gDNA를 절단한 후 즉시 라이브러리 프랩을 계속하려면 새로운 96웰 중형 플레이트를 사용합니다.
 - ▶ 이 단계 후에 절단된 gDNA를 보관하려면 96웰 PCR 플레이트를 사용합니다.
 - ▶ gDNA 샘플과 cDNA 샘플을 동시에 처리하려면 12페이지의 *cDNA 세척* 에서 PCF 플레이트를 계속하여 사용합니다.
- 4 플레이트 LP(라이브러리 프랩)에 라벨을 지정합니다.
- 5 실온에서 gDNA 샘플을 해동합니다. 뒤집어서 혼합합니다.
- 6 1페이지의 *DNA Input 권장사항*을 참조하여 샘플을 정성화 또는 정량화합니다.
- 7 최종 용량이 12µl가 되도록 정제된 각 DNA 샘플의 최소 40ng을 TEB에서 3.3ng/µl의 농도로 희석합니다.

절차

- 1 희석시키고 정제된 각 gDNA 샘플의 12µl를 Covaris 8 microTUBE Strip에 추가합니다.
- 2 TEB 40µl를 각 샘플에 추가합니다.
- 3 파이펫을 사용하여 혼합합니다.
- 4 사용하지 않은 Covaris 8 microTUBE Strip 웰을 순수 52µl로 채웁니다.
- 5 microTUBE Strip을 알루미늄 포장지로 포장합니다.
- 6 짧게 원심분리합니다.
- 7 Covaris E220 *evolution* 또는 LE220 모델을 사용하는 경우 다음 설정을 사용하여 gDNA를 분할합니다. 다른 Covaris 모델을 사용하는 경우 TruSight Oncology 500 키트 지원 페이지를 참조하십시오.

설정	E220 <i>evolution</i>	LE220
최고 입사력	175W	450W
충격 계수	10%	30%
버스트당 Cycle 수	200	200
처리 시간	280초	250초
온도	7°C	7°C
강조인자	예	N/A

- 8 튜브 스트립을 짧게 원심분리하여 물방울을 수집합니다.
- 9 절단된 각 gDNA 샘플의 50µl를 LP 플레이트(또는 cDNA를 동시에 처리하는 경우 PCF 플레이트)의 각 웰로 옮깁니다.
 - ▶ 절단된 gDNA 샘플을 LP 플레이트로 옮길 때 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용할 수 있습니다(파이펫 20µl + 20µl + 10µl).

안전한 중단점

중단하는 경우 Microseal 'B'를 LP 또는 PCF 플레이트에 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리합니다. 최대 7일 동안 -25°C ~ -15°C에서 보관합니다.

엔드 복구 및 A-테일링 수행

이 과정에서는 엔드 복구 A-테일링 마스터 믹스(ERA1)를 사용하여 절편화 단계에서 발생한 5' 및 3' 돌출부를 블런트 엔드로 변환합니다.

이 믹스의 3' ~ 5' 핵산말단분해효소 활동은 3' 돌출부를 제거하고 5' ~ 3' 중합효소 활동은 5' 돌출부를 채웁니다. 3' 엔드는 어댑터 Ligation 반응 동안 서로 결합되지 않도록 하기 위해 이 반응 동안 A-테일링됩니다.

소모품

- ▶ ERA1-A(엔드 복구 A-테일링 효소 믹스 1)
- ▶ ERA1-B(엔드 복구 A-테일링 완충용액 1)
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지
- ▶ 1.7ml 마이크로 원심분리 튜브
- ▶ **[옵션]** 96웰 중형 플레이트



주의

gDNA 샘플 또는 cDNA 샘플을 보관하는 데 PCR 플레이트가 사용된 경우 16페이지의 준비 단계에 있는 플레이트 전송 지침을 따르십시오.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
ERA1-A	-25°C ~ -15°C	얼음 위에 보관합니다. 짧게 원심분리한 다음 파이펫을 사용하여 혼합합니다.
ERA1-B	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 짧게 원심분리한 다음 파이펫을 사용하여 혼합합니다. 침전물을 검사합니다. 침전물이 있는 경우 손으로 튜브를 따뜻하게 한 다음 결정이 녹을 때까지 파이펫을 사용하여 혼합합니다.

- 2 절단된 gDNA 및 모든 cDNA를 실온에 둡니다.
- 3 96웰 PCR 플레이트에 보관된 경우 파이펫을 사용하여 혼합합니다. 그런 다음 절단된 gDNA 샘플 50µl과 cDNA 50µl를 새로운 96웰 중형 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 4 중형 플레이트 LP2(라이브러리 프랩 2)에 라벨을 지정합니다.
- 5 다음과 같이 중형 열 블록 삽입물과 함께 2개의 Hybex 배양기를 예열합니다.
 - ▶ Hybex 배양기를 30°C로 예열합니다.
 - ▶ Hybex 배양기를 72°C로 예열합니다.
- 6 얼음통을 준비합니다.

절차

- 1 다음 시약을 마이크로 원심분리 튜브에 혼합하여 ERA1 마스터 믹스를 만듭니다.

마스터 믹스 구성요소	샘플 3개	샘플 8개	샘플 16개	샘플 24개
ERA1-B	26µl	69µl	138µl	207µl
ERA1-A	10µl	27µl	54µl	81µl

- ▶ 최소 3개의 샘플을 준비합니다.
 - ▶ 사용 후 남은 마스터 믹스를 폐기합니다.
- 2 파이펫을 사용하여 10회 혼합하고 ERA1 마스터 믹스를 얼음 위에 놓습니다.
 - 3 ERA1 마스터 믹스 10µl를 LP2 플레이트의 각 샘플에 추가합니다.
 - 4 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.

- 5 30분 동안 30°C에서 배양합니다.
- 6 즉시 다른 배양기로 옮기고 72°C에서 20분 동안 배양합니다.
- 7 플레이트를 5분 동안 얼음 위에 놓아둡니다.

어댑터 결찰

이 과정에서는 어댑터를 cDNA 및/또는 gDNA 절편의 말단부에 결찰합니다. SUA1 어댑터는 cDNA 절편에만 결찰됩니다. 고유한 분자 인덱스를 포함하는 UMI1 어댑터는 gDNA 절편에만 결찰됩니다.

소모품

- ▶ ALB1(어댑터 Ligation 완충용액 1)
- ▶ SUA1(짧은 범용 어댑터 1)
- ▶ UMI1(UMI 어댑터 v1)
- ▶ STL(중단 Ligation 완충용액)
- ▶ LIG3(DNA 연결효소 3)
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ ALB1은 점성이 높습니다. 버블이 형성되지 않도록 파이펫을 천천히 사용합니다.
- ▶ **DNA 라이브러리에 UMI1만 사용하고 RNA 라이브러리에 SUA1만 사용합니다.**

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
ALB1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. ≥ 10초 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
SUA1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. ≥ 10초 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
UMI1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. ≥ 10초 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
STL	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
LIG3	-25°C ~ -15°C	얼음 위에 보관합니다. 짧게 원심분리한 다음 파이펫을 사용하여 혼합합니다.

절차

- 1 ALB1 60µl를 각 웰에 추가합니다.
- 2 LIG3 5µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 해당 어댑터를 각 웰에 추가합니다.
 - ▶ DNA 라이브러리에만 UMI1 10µl를 추가합니다.
 - ▶ RNA 라이브러리에만 SUA1 10µl를 추가합니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.

- 5 실온에서 30분 동안 배양합니다.
- 6 STL 5 μ l를 추가합니다.
- 7 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.

Ligation 세척

이 과정에서는 SPB를 사용하여 gDNA 및 cDNA 절편을 정제하고 원하지 않는 제품을 제거합니다.

소모품

- ▶ 새로 준비된 80% 에탄올(EtOH)
- ▶ SPB(샘플 정제 비드)
- ▶ RSB(재현탁 완충용액)
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ 매번 사용하기 전에 1분 동안 SPB를 와류시킵니다.
- ▶ 비드가 균등하게 분산되도록 SPB를 자주 와류시킵니다.
- ▶ 현탁액의 점도로 인해 SPB를 천천히 흡입하고 분사합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
SPB	2°C ~ 8°C	최소 30분 동안 실온에 둡니다. SPB를 사용하기 전에 1분 동안 와류시킵니다.
RSB	2°C ~ 8°C -25°C ~ -15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C ~ -15°C에 보관된 경우 사용하기 전에 실온에서 해동하고 와류시킵니다.

- 2 새로운 96웰 PCR 플레이트 LS(라이브러리 샘플)에 라벨을 지정합니다.
- 3 새로운 80% EtOH를 준비합니다.

절차

결합

- 1 SPB 112 μ l를 LP2 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 2 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 3 실온에서 5분 동안 배양합니다.

세척

- 1 LP2 플레이트를 자기 스탠드에 10분 동안 놓아둡니다.
- 2 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.

- 3 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자기 스탠드에서 새로운 80% EtOH 200µl를 추가합니다.
 - b 30초 동안 기다린 후 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.
- 4 3단계(a-b)를 반복하여 두 번째로 세척합니다.
- 5 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용하여 각 웰에서 잔류 상청액을 제거합니다.

용출

- 1 자기 스탠드에서 제거합니다.
- 2 RSB 27.5µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔들립니다.
- 4 실온에서 2분 동안 배양합니다.
- 5 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 6 각 용출액의 25µl를 LP2 중형 플레이트에서 LS PCR 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.

PCR 인덱스

이 단계에서 라이브러리 절편은 샘플 multiplexing을 위해 인덱스 시퀀스를 추가하는 프라이머를 사용하여 증폭됩니다. 그 결과 제품에는 클러스터 생성에 필요한 인덱스 시퀀스 및 어댑터의 측면에 있는 DNA 절편의 전체 라이브러리가 포함됩니다.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

소모품

- ▶ EPM(향상된 PCR 믹스)
- ▶ UPxx(고유한 인덱스 프라이머)
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
EPM	-25°C ~ -15°C	얼음에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
UPxx	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.

- 2 라이브러리당 1개의 UPxx 인덱스 프라이머를 할당합니다(xx = 인덱스 프라이머 번호). 단일 플로우 셀에서 여러 라이브러리를 시퀀싱할 때 각 샘플 라이브러리에 다른 인덱싱 프라이머를 할당합니다.



참고

최적의 적용범위를 위해 시퀀싱 런당 최대 8개의 DNA 라이브러리 또는 8개의 DNA 및 8개의 RNA 라이브러리를 시퀀싱합니다.

- 3 DNA 라이브러리와 RNA 라이브러리를 함께 시퀀싱하는 경우 2개의 라이브러리 유형에 다른 인덱스 프라이머가 포함되어 있어야 합니다. 예를 들어 DNA 라이브러리에 인덱스 프라이머 UP01이 포함된 경우 RNA 라이브러리에 다른 UPxx를 선택합니다.
- 4 저플렉스 시퀀싱 런의 경우 다음 조합의 UPxx 인덱스 프라이머 세트 중 1개를 포함하는 라이브러리를 최소 3개 이상 사용하여 충분한 인덱스 다양성을 제공합니다.
 - ▶ [UP01,UP02,UP03]
 - ▶ [UP04,UP05,UP06]
 - ▶ [UP07,UP08,UP09]
 - ▶ [UP10,UP11,UP12]

예를 들어 첫 번째 라이브러리에 UP01, 두 번째 라이브러리에 UP02, 세 번째 라이브러리에 UP03이 할당됩니다.

- 5 Post-Amp 영역에서 다음 프로그램을 가열된 뚜껑이 있는 열 사이클러에 I-PCR로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정
 - ▶ 반응 용량을 50µl로 설정
 - ▶ 30초 동안 98°C
 - ▶ 15 Cycles:
 - ▶ 10초 동안 98°C
 - ▶ 30초 동안 60°C
 - ▶ 30초 동안 72°C
 - ▶ 5분 동안 72°C
 - ▶ 10°C에서 유지

절차

- 1 인덱싱 프라이머(UPxx) 5µl를 LS 플레이트의 각 웰에 추가합니다. 새로운 튜브 캡을 적용합니다.
- 2 EPM 20µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 1분 동안 흔들립니다.



주의

증폭 제품 캐리오버를 방지하려면 Post-Amp 영역에서 다음 단계를 수행하십시오.

- 4 280 × g에서 짧게 원심분리합니다.
- 5 사전 프로그래밍된 열 사이클러에 놓고 I-PCR 프로그램을 실행합니다.
- 6 플레이트 ALS(증폭된 라이브러리 샘플)에 다시 라벨을 지정합니다.
- 7 짧게 원심분리합니다.

안전한 중단점

중단하는 경우 Microseal 'B'를 ALS 플레이트에 적용하고 최대 30일 동안 -25°C ~ -15°C에서 보관합니다.

첫 번째 혼성화 설정

이 과정에서 55개 유전자에 특정한 올리고 풀은 RNA 라이브러리로 혼성화되고 523개 유전자에 특정한 올리고 풀은 19페이지의 PCR 인덱스에서 준비한 DNA 라이브러리로 혼성화됩니다. 타겟 영역의 인리치먼트에는 2번의 혼성화 단계가 필요합니다. 첫 번째 혼성화 단계에서 올리고가 오버나잇(8 ~ 24시간) 동안 DNA 및/또는 RNA로 혼성화됩니다.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

소모품

- ▶ TCA1(타겟 캡처 첨가제 1)
- ▶ TCB1(타겟 캡처 완충용액 1)
- ▶ OPR1(Oncology 프로브 RNA 1)[빨간색 캡]
- ▶ OPD2(Oncology 프로브 DNA 2)[노란색 캡]
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ RNA 라이브러리에만 OPR1(빨간색 캡)을 사용합니다.
- ▶ DNA 라이브러리에만 OPD2(노란색 캡)를 사용합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
TCB1	2°C ~ 8°C	실온에서 해동합니다. 짧게 원심분리한 다음 파이펫을 사용하여 혼합합니다. 침전물을 검사합니다. 침전물이 있는 경우 손으로 튜브를 따뜻하게 한 다음 결정이 녹을 때까지 파이펫을 사용하여 혼합합니다.
TCA1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
OPR1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
OPD2	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.

- 2 ALS 플레이트가 -25°C ~ -15°C에 보관된 경우 실온에서 해동하고 파이펫을 사용하여 혼합한 다음 원심 분리합니다.
- 3 새로운 96웰 PCR 플레이트 HYB1(혼성화 1)에 라벨을 지정합니다.
- 4 다음 프로그램을 가열된 뚜껑이 있는 열 사이클러에 HYB1로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정

- ▶ 반응 용량을 50µl로 설정
- ▶ 10분 동안 95°C
- ▶ 2.5분 동안 85°C
- ▶ 2.5분 동안 75°C
- ▶ 2.5분 동안 65°C
- ▶ 57°C에서 유지

절차

- 1 각 라이브러리의 20µl를 HYB1 플레이트로 옮깁니다.
- 2 TCB1 15µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 TCA1 10µl를 각 웰에 추가합니다.
- 4 해당 프로브를 추가합니다.
 - ▶ DNA 라이브러리의 경우 OPD2(노란색 캡) 5µl를 추가합니다.
 - ▶ RNA 라이브러리의 경우 OPR1(빨간색 캡) 5µl를 추가합니다.
- 5 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 6 사전 프로그래밍된 열 사이클러에 놓고 HYB1 프로그램을 실행합니다. 57°C에서 8 ~ 24시간(오버나잇) 동안 혼성화합니다.

타겟 캡처 1

이 단계에서는 SMB(스트렙타비딘 자기 비드)를 사용하여 타겟 관심 라이브러리 DNA 영역에 혼성화된 프로브를 캡처합니다. EEW를 사용하여 열 세척을 3회 수행하면 비드에서 비특정 DNA 결합이 제거됩니다. 그 다음 인리치된 라이브러리가 비드에서 용출되고 두 번째 혼성화를 위해 준비됩니다.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

소모품

- ▶ SMB(스트렙타비딘 자기 비드)
- ▶ ET2(용출 타겟 완충용액 2)
- ▶ EE2(인리치먼트 용출 2)
- ▶ HP3(2N NaOH)
- ▶ EEW(향상된 인리치먼트 세척)
- ▶ 96웰 중형 플레이트
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ 이 절차에는 **SMB**만 사용하고 **SPB**는 사용하지 않습니다.
- ▶ 비드가 현탁되도록 SMB를 자주 와류시킵니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
EE2	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
EEW	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 1분 동안 와류시커 재현탁합니다.
SMB	2°C ~ 8°C	30분 동안 실온에 둡니다. 1분 동안 와류시킵니다. 비드 펠릿이 존재하는 경우 파이펫을 사용하여 위 아래로 흔들어 펠릿을 방출한 다음 와류시커 재현탁합니다.
ET2	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
HP3	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.

- 2 중형 열 블록 삽입물과 함께 Hybex 배양기를 57°C로 예열합니다.
- 3 새로운 96웰 중형 플레이트 CAP1(캡처 1)에 라벨을 지정합니다.
- 4 새로운 96웰 PCR 플레이트 ELU1(용출 1)에 라벨을 지정합니다.

절차

결합

- 1 열 사이클러에서 HYB1 플레이트를 제거합니다.
- 2 SMB 150µl를 CAP1 중형 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 3 각 라이브러리의 50µl를 HYB1 플레이트에서 CAP1 중형 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 5 Hybex 배양기를 57°C에서 25분 동안 배양합니다.
- 6 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 7 자기 스탠드에 있는 동안 파이펫을 사용하여 상청액을 제거하고 폐기합니다.

세척

- 1 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자기 스탠드에서 CAP1 중형 플레이트를 제거합니다.
 - b EEW 200µl를 각 웰에 추가합니다.
 - c 파이펫을 사용하여 10회 혼합합니다. 각 라이브러리에 깨끗한 팁부를 사용합니다.
 - d Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 4분 동안 흔듭니다. 비드 펠릿이 계속하여 존재하는 경우, Microseal을 제거하고 파이펫을 사용해 혼합하여 모든 비드가 재현탁 되도록 합니다. 새로운 Microseal 'B'를 적용합니다.

- e Hybex 배양기를 57°C에서 5분 동안 배양합니다.
- f 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- g 자기 스탠드에 있는 동안 파이펫을 사용하여 각 웰에서 상청액을 제거하고 폐기합니다.

- 2 1단계(a-g)를 반복하여 두 번째로 세척합니다.
- 3 1단계(a-g)를 반복하여 세 번째로 세척합니다.
- 4 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용하여 각 웰에서 모든 잔류 상청액을 제거합니다.

용출

- 1 다음 시약을 마이크로 원심분리 튜브에 혼합하여 EE2+HP3 용출 믹스를 만듭니다.

용출 믹스 구성요소	라이브러리 3개	라이브러리 8개	라이브러리 16개	라이브러리 24개
EE2	95µl	171µl	342µl	513µl
HP3	5µl	9µl	18µl	27µl

- ▶ 최소 3개의 라이브러리를 준비합니다.
- ▶ 사용 후 남은 믹스를 폐기합니다.

- 2 짧게 와류시켜 혼합합니다.
- 3 자기 스탠드에서 CAP1 플레이트를 제거합니다.
- 4 EE2+HP3 용출 믹스 17µl를 각 샘플 펠릿에 추가합니다.
- 5 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔들니다.
- 6 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 7 용출액 15µl를 CAP1 플레이트의 각 웰에서 ELU1 플레이트로 조심스럽게 옮깁니다.
- 8 ET2 5µl를 ELU1 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 9 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 2분 동안 흔들니다.

두 번째 혼성화 설정

이 단계에서는 인리치된 RNA 및/또는 DNA 라이브러리의 타겟 영역을 캡처 프로브와 두 번째로 결합합니다. 두 번째 혼성화는 캡처된 영역의 높은 특이성을 보장합니다. 최적의 라이브러리 인리치먼트를 보장하기 위해 최소 1.5시간부터 최대 4시간까지 두 번째 혼성화 단계를 수행합니다.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

소모품

- ▶ TCA1(타겟 캡처 첨가제 1)
- ▶ TCB1(타겟 캡처 완충용액 1)
- ▶ OPR1(Oncology 프로브 RNA 1)[빨간색 캡]
- ▶ OPD2(Oncology 프로브 DNA 2)[노란색 캡]

- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ RNA 라이브러리에만 OPR1(빨간색 캡)을 사용합니다.
- ▶ DNA 라이브러리에만 OPD2(노란색 캡)를 사용합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
TCB1	2°C ~ 8°C	실온에서 해동합니다. 짧게 원심분리한 다음 파이펫을 사용하여 혼합합니다. 침전물을 검사합니다. 침전물이 있는 경우 손으로 튜브를 따뜻하게 한 다음 결정이 녹을 때까지 파이펫을 사용하여 혼합합니다.
TCA1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
OPR1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
OPD2	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.

- 2 다음 프로그램을 가열된 뚜껑이 있는 열 사이클러에 HYB2로 저장합니다.

- ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정
- ▶ 반응 용량을 50µl로 설정
- ▶ 10분 동안 95°C
- ▶ 2.5분 동안 85°C
- ▶ 2.5분 동안 75°C
- ▶ 2.5분 동안 65°C
- ▶ 57°C에서 유지

절차

- 1 TCB1 15µl를 ELU1 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 2 TCA1 10µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 해당 프로브를 각 웰에 추가합니다.
 - ▶ DNA 라이브러리의 경우 OPD2(노란색 캡) 5µl를 추가합니다.
 - ▶ RNA 라이브러리의 경우 OPR1(빨간색 캡) 5µl를 추가합니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 5 사전 프로그래밍된 열 사이클러에 놓고 HYB2 프로그램을 실행합니다. 57°C에서 1.5 ~ 4시간 동안 혼성화합니다.

타겟 캡처 2

이 단계에서는 SMB(스트렙타비딘 자기 비드)를 사용하여 타겟한 관심 영역에 혼성화된 프로브를 캡처합니다. RSB를 사용하여 캡처된 라이브러리를 행구고 비드에서 비특정 결합을 제거합니다. 그 후 인리치된 라이브러리가 비드에서 용출되고 시퀀싱을 위해 준비됩니다.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하시기 바랍니다.

소모품

- ▶ SMB(스트렙타비딘 자기 비드)
- ▶ ET2(용출 타겟 완충용액 2)
- ▶ EE2(인리치먼트 용출 2)
- ▶ HP3(2N NaOH)
- ▶ RSB(재현탁 완충용액)
- ▶ 96웰 중형 플레이트
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ 이 절차에는 **SMB**만 사용하고 **SPB**는 사용하지 않습니다.
- ▶ 비드가 현탁되도록 SMB를 자주 와류시킵니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
EE2	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
SMB	2°C ~ 8°C	30분 동안 실온에 둡니다. 1분 동안 와류시킵니다. 비드 펠릿이 존재하는 경우 파이펫을 사용하여 위 아래로 흔들며 펠릿을 방출한 다음 와류시켜 재현탁합니다.
ET2	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
HP3	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시켜 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
RSB	2°C ~ 8°C 또는 -25°C ~ -15°C	실온에 둡니다.

- 2 중형 열 블록 삽입물과 함께 Hybex 배양기를 57°C로 예열합니다.
- 3 새로운 96웰 중형 플레이트 CAP2(캡처 2)에 라벨을 지정합니다.
- 4 새로운 96웰 PCR 플레이트 ELU2(용출 2)에 라벨을 지정합니다.

절차

결합

- 1 열 사이클러에서 ELU1 플레이트를 제거합니다.
- 2 SMB 150µl를 CAP2 중형 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 3 각 라이브러리의 50µl를 ELU1 플레이트에서 CAP2 중형 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 5 Hybex 배양기를 57°C에서 25분 동안 배양합니다.
- 6 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 7 자기 스탠드에 있는 동안 파이펫을 사용하여 각 웰에서 상청액을 조심스럽게 제거하고 폐기합니다.

세척

- 1 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자기 스탠드에서 CAP2 중형 플레이트를 제거합니다.
 - b RSB 200µl를 각 웰에 추가합니다.
 - c Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 4분 동안 흔듭니다.
 - ▶ 비드 플렛이 계속하여 존재하는 경우, Microseal을 제거하고 파이펫을 사용해 혼합하여 모든 비드가 재현탁되도록 합니다. 새로운 Microseal 'B'를 적용합니다.
 - d 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
 - e 자기 스탠드에 있는 동안 파이펫을 사용하여 상청액을 조심스럽게 제거하고 폐기합니다.
- 2 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용하여 각 웰에서 모든 잔류 상청액을 제거합니다.

용출

- 1 다음 시약을 마이크로 원심분리 튜브에 혼합하여 새로운 EE2+HP3 용출 믹스를 만듭니다.

용출 믹스 구성요소	라이브러리 3개	라이브러리 8개	라이브러리 16개	라이브러리 24개
EE2	95µl	209µl	418µl	627µl
HP3	5µl	11µl	22µl	33µl

- ▶ 최소 3개의 라이브러리를 준비합니다.
- ▶ 사용 후 남은 믹스를 폐기합니다.
- 2 와류시켜 혼합합니다.
- 3 자기 스탠드에서 CAP2 중형 플레이트를 제거합니다.
- 4 EE2+HP3 용출 믹스 22µl를 각 샘플 웰에 추가합니다.
- 5 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 6 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 7 용출액 20µl를 CAP2 중형 플레이트의 각 웰에서 ELU2 플레이트로 옮깁니다.
- 8 ET2 5µl를 ELU2 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 9 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 10 짧게 원심분리합니다.

안전한 중단점

중단하는 경우 ELU2 플레이트를 최대 7일 동안 -25°C ~ -15°C에서 보관합니다.

인리치된 라이브러리 증폭

이 단계에서는 프라이머를 사용하여 인리치된 라이브러리를 증폭합니다.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

소모품

- ▶ PPC3(PCR 프라이머 콕테일 3)
- ▶ EPM(향상된 PCR 믹스)
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
EPM	-25°C ~ -15°C	얼음에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.
PPC3	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심 분리합니다.

- 2 ELU2 플레이트가 -25°C ~ -15°C에 보관된 경우 실온에서 해동하고 파이펫을 사용하여 혼합한 다음 원심 분리합니다.
- 3 다음 프로그램을 가열된 뚜껑이 있는 열 사이클러에 EL-PCR로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정
 - ▶ 반응 용량을 50µl로 설정
 - ▶ 30초 동안 98°C
 - ▶ 18 Cycles:
 - ▶ 10초 동안 98°C
 - ▶ 30초 동안 60°C
 - ▶ 30초 동안 72°C
 - ▶ 5분 동안 72°C
 - ▶ 10°C에서 유지

절차

- 1 PPC3 5µl를 ELU2 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 2 EPM 20µl를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 플레이트를 1200rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.

- 4 280 × g에서 짧게 원심분리합니다.
- 5 열 사이클러에 놓고 EL-PCR 프로그램을 실행합니다.

증폭 및 인리치된 라이브러리 세척

이 단계에서는 SPB(샘플 정제 비드)를 사용하여 원하지 않는 반응 구성요소에서 인리치된 라이브러리를 정제합니다.

소모품

- ▶ 새로 준비된 80% 에탄올(EtOH)
- ▶ SPB(샘플 정제 비드)
- ▶ RSB(재현탁 완충용액)
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 96웰 중형 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지

시약 정보

- ▶ 매번 사용하기 전에 SPB를 와류시킵니다.
- ▶ 비드가 균등하게 분산되도록 SPB를 자주 와류시킵니다.
- ▶ 용액의 점도로 인해 SPB를 천천히 흡입하고 분사합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

항목	보관	지침
SPB	2°C ~ 8°C	30분 동안 실온에 둡니다. SPB를 사용하기 전에 1분 동안 와류시킵니다.
RSB	2°C ~ 8°C 또는 -25°C ~ -15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C ~ -15°C에 보관된 경우 사용하기 전에 실온에서 해동하고 와류시킵니다.

- 2 새로운 96웰 중형 플레이트 BIND2에 라벨을 지정합니다.
- 3 새로운 96웰 PCR 플레이트 PL(정제된 라이브러리)에 라벨을 지정합니다.
- 4 새로운 80% EtOH를 준비합니다.

절차

결합

- 1 열 사이클러에서 ELU2 플레이트를 제거합니다.
- 2 SPB 110µl를 BIND2 중형 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 3 각 라이브러리의 50µl를 ELU2 플레이트에서 BIND2 중형 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 4 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 5 실온에서 5분 동안 배양합니다.

세척

- 1 BIND2 중형 플레이트를 자기 스탠드에 5분 동안 놓아둡니다.
- 2 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.
- 3 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자기 스탠드에서 새로운 80% EtOH 200 μ l를 추가합니다.
 - b 30초 동안 기다린 후 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.
- 4 3단계(a-b)를 반복하여 두 번째로 세척합니다.
- 5 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용하여 각 웰에서 잔류 상청액을 제거합니다.

용출

- 1 자기 스탠드에서 BIND2 중형 플레이트를 제거합니다.
- 2 RSB 32 μ l를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 4 실온에서 2분 동안 배양합니다.
- 5 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 6 각 용출액의 30 μ l를 BIND2 중형 플레이트에서 PL 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.

안전한 중단점

중단하는 경우 Microseal 'B'를 PL 플레이트에 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리합니다. 최대 30일 동안 -25°C ~ -15°C에서 보관합니다.

라이브러리 정량화(옵션)

플로우 셀에 클러스터링하는 데 사용할 수 있는 라이브러리가 충분한지 확인하기 위해 정확하게 정량화합니다. 라이브러리 노멀라이제이션 전에 사용자가 준비해야 하는 형광 정량화 방법을 사용하여 인리치된 라이브러리의 수량을 평가합니다. 효율적인 비드 기반 라이브러리 노멀라이제이션을 위해서는 각 라이브러리가 $\geq 3\text{ng}/\mu\text{l}$ 필요합니다.

권장 가이드라인

- 1 DNA 표준 6 μ l를 RSB 44 μ l와 혼합하여 DNA 표준을 3ng/ μ l로 희석합니다.
- 2 형광 정량화 키트, 라이브러리 및 바탕 용액과 함께 제공된 DNA 표준을 3회 실행합니다.
- 3 각각에 대한 RFU(평균 상대 형광 단위)를 결정합니다.
- 4 다음 값을 계산합니다(AccuClear).
 - ▶ 평균 표준 RFU - 평균 바탕액 RFU = 노멀라이즈된 표준 RFU
 - ▶ 평균 라이브러리 RFU - 평균 바탕액 RFU = 각 라이브러리에 대해 노멀라이즈된 RFU

수량 평가

다음 기준에 따라 각 라이브러리에 대해 노멀라이즈된 RFU를 평가합니다.

형광 측정	권장사항
≤ 평균 바탕액 RFU	정제된 DNA 샘플이 수량 및 품질 사양을 충족하는 경우 라이브러리 프랩 및 인리치먼트를 반복합니다.
> 평균 바탕액 RFU (및 < 노멀라이즈된 표준 RFU	<i>라이브러리 노멀라이즈</i> 을 진행합니다. 참고: RFU가 노멀라이즈된 표준 RFU 미만인 라이브러리를 사용하면 샘플에 존재할 수 있는 변이를 확실하게 호출할 수 있는 적절한 시퀀싱 결과가 산출되지 않습니다.
≥ 노멀라이즈된 표준 RFU	<i>라이브러리 노멀라이즈</i> 을 진행합니다.

라이브러리 노멀라이즈

이 과정에서는 풀링된 라이브러리에서 균일한 라이브러리 표시를 보장하기 위해 비드 기반 노멀라이제이션을 사용하여 각 라이브러리의 수량을 노멀라이즈합니다.

TruSight Oncology 500 키트는 수동 라이브러리 노멀라이제이션을 지원하지 않습니다. 라이브러리를 수동으로 노멀라이즈하려는 경우 Illumina 기술 지원에 문의하십시오.



경고

이 시약에는 잠재적으로 유해한 화학물질이 포함되어 있습니다. 흡입, 섭취, 피부 접촉 및 눈 접촉으로 인해 신체적 상해가 발생할 수 있습니다. 보호안경, 장갑, 실험 가운 등 노출된 위험에 적합한 보호 장비를 착용하십시오. 사용된 시약은 화학물질 폐기물로 취급하고 해당 지역, 국가, 현지 법률 및 규정에 따라 폐기하십시오. 환경, 건강, 안전에 대한 추가 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

소모품

- ▶ LNA1(라이브러리 노멀라이제이션 첨가제 1)
- ▶ LNB1(라이브러리 노멀라이제이션 비드 1)
- ▶ LNW1(라이브러리 노멀라이제이션 세척 1)
- ▶ LNS1(라이브러리 노멀라이제이션 보관 1)
- ▶ HP3(2N NaOH)
- ▶ EE2(인리치먼트 용출 2)
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 96웰 중형 플레이트
- ▶ Microseal 'B' 접착 포장지
- ▶ 1.7ml 마이크로 원심분리 튜브 (2)

시약 정보

- ▶ 매번 사용하기 전에 1분 동안 LNB1을 와류시킵니다.
- ▶ 비드가 균등하게 분산되도록 LNB1을 자주 와류시킵니다.
- ▶ 현탁액의 점도가 높으므로 LNB1을 천천히 흡입하고 분사합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

시약	보관	지침
LNA1	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
LNS1	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
LNB1	2°C ~ 8°C	최소 30분 동안 실온에 둡니다. 비드가 균등하게 분산되도록 1분 동안 와류시킵니다. LNB1 펠릿 파이펫을 사용하여 위 아래로 흔들어 확실하게 재현탁합니다.
LNW1	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시커 재현탁합니다.
HP3	2°C ~ 8°C	실온에 둡니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.
EE2	-25°C ~ -15°C	실온에서 해동합니다. 와류시커 재현탁합니다. 짧게 원심분리합니다.

- 2 PL 플레이트가 -25°C ~ -15°C에 보관된 경우 실온에서 해동하고 파이펫을 사용하여 혼합한 다음 원심분리합니다.
- 3 새로운 96웰 중형 플레이트 BBN에 라벨을 지정합니다.
- 4 새로운 96웰 PCR 플레이트 NL(노멀라이즈된 라이브러리)에 라벨을 지정합니다.

절차

1 다음 시약을 새로운 마이크로 원심분리 튜브에 혼합하여 LNA1+LNB1 마스터 믹스를 만듭니다.

마스터 믹스 구성요소	라이브러리 3개	라이브러리 8개	라이브러리 16개	라이브러리 24개
LNA1	132µl	352µl	704µl	1056µl
LNB1	24µl	64µl	128µl	192µl

- 2 와류시커 혼합합니다.
- 3 다음 시약을 새로운 마이크로 원심분리 튜브에 혼합하여 새로운 EE2+HP3 용출 믹스를 만듭니다.

용액 구성요소	라이브러리 3개	라이브러리 8개	라이브러리 16개	라이브러리 24개
EE2	114µl	304µl	608µl	912µl
HP3	6µl	16µl	32µl	48µl

4 와류시커 혼합합니다.

결합

- 1 LNA1+LNB1 마스터 믹스 45µl를 BBN 중형 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 2 각 라이브러리의 20µl를 PL 플레이트에서 BBN 중형 플레이트의 해당 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 30분 동안 흔들립니다.
- 4 BBN 중형 플레이트를 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 5 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.

세척

- 1 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자기 스탠드에서 BIND3 플레이트를 제거합니다.
 - b LNW1 45 μ l를 각 웰에 추가합니다.
 - c Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 5분 동안 흔들립니다.
 - d 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
 - e 각 웰에서 모든 상청액을 제거하고 폐기합니다.
- 2 1단계(a-e)를 반복하여 두 번째로 세척합니다.
- 3 팁부가 미세한 형상을 가진 P20 파이펫을 사용하여 각 웰에서 모든 잔류 상청액을 제거합니다.

용출

- 1 자기 스탠드에서 BBN 중형 플레이트를 제거합니다.
- 2 EE2+HP3 용출 믹스 32 μ l를 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'를 적용하고 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔들립니다.
- 4 BBN 중형 플레이트를 자기 스탠드에 2분 동안 놓아둡니다.
- 5 각 용출액의 30 μ l를 BBN 중형 플레이트에서 NL 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
- 6 LNS1 30 μ l를 NL 플레이트의 각 라이브러리에 추가합니다.
- 7 파이펫을 사용하여 위 아래로 흔들어 혼합합니다.

안전한 중단점

중단하는 경우 Microseal 'B'를 NL 플레이트에 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리합니다. 최대 30일 동안 -25°C ~ -15°C에서 보관합니다.

로드 농도로 라이브러리 풀링 및 희석

- 1 로드 농도로 라이브러리를 풀링, 변성 및 희석하려면 시퀀싱 시스템용 라이브러리 변성 및 희석 가이드를 참조하십시오.

지원 정보

도입	34
두문자어	34
키트 내용물	34
소모품 및 장비	37

도입

이 가이드에서 설명하는 프로토콜에서는 이 섹션의 내용을 검토했고 워크플로우 내용을 확인했으며 필요한 모든 소모품 및 장비를 확보한 것으로 가정합니다.

두문자어

두문자어	정의
1stSS	첫 번째 나선 합성
2ndSS	두 번째 나선 합성
ALS	증폭된 라이브러리 샘플
BBN	비드 기반 노멀라이제이션
CAP1	캡처 1
CAP2	캡처 2
cDNA	상보적 DNA
ELU1	용출 1
ELU2	용출 2
gDNA	게놈 DNA
HQ-RNA	고품질 RNA
HYB1	혼성화 1
HYB2	혼성화 2
LP	라이브러리 프렙
LP2	라이브러리 프렙 2
LQ-RNA	저품질 RNA
LS	라이브러리 샘플
NL	노멀라이즈된 라이브러리
PCF	정제된 cDNA 절편
PL	정제된 라이브러리

키트 내용물

프로토콜을 진행하기 전에 이 섹션에서 식별된 시약이 있어야 합니다.

소모품	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA NextSeq 키트(48 샘플 라이브러리 프렙 키트 및 NextSeq 키트)	20028214
TruSight Oncology 500 DNA 키트(48 샘플 라이브러리 프렙 키트 전용)	20028213

소모품	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 DNA/RNA 번들(24 샘플 라이브러리 프렙 키트 전용)	20028215
TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle NextSeq 키트(24 샘플 라이브러리 프렙 키트 및 NextSeq 키트)	20028216

라이브러리 프렙

상자 1 - 라이브러리 프렙 – RNA(Pre-Amp), PN 20007000

DNA/RNA 번들 고객은 이 상자를 1개 수령합니다. DNA 키트 고객은 이 상자를 수령하지 않습니다.

수량	시약	설명	보관 온도
1	FSM	첫 번째 나선 합성 믹스	-25°C ~ -15°C
1	SSM	두 번째 나선 믹스	-25°C ~ -15°C
1	EPH3	용출, 프라임, 절편 하이 믹스 3	-25°C ~ -15°C
1	RVT	역전사 효소	-25°C ~ -15°C

상자 2 - 라이브러리 프렙(Pre-Amp), PN 20018492

수량	시약	설명	보관 온도
2	UMI1	UMI 어댑터 v1	-25°C ~ -15°C

상자 3 - 라이브러리 프렙(Pre-Amp), PN 20007002

수량	시약	설명	보관 온도
2	ERA1-A	엔드 복구 A-테일링 효소 믹스 1	-25°C ~ -15°C
2	ERA1-B	엔드 복구 A-테일링 완충용액 1	-25°C ~ -15°C
2	ALB1	어댑터 Ligation 완충용액 1	-25°C ~ -15°C
2	LIG3	DNA 연결효소 3	-25°C ~ -15°C
2	SUA1	짧은 범용 어댑터 1	-25°C ~ -15°C
2	STL	중단 Ligation 완충용액	-25°C ~ -15°C
2	EPM	향상된 PCR 믹스	-25°C ~ -15°C

상자 4 - 라이브러리 프렙(Pre-Amp), PN 20007003

수량	시약	설명	보관 온도
1	RSB	재현탁 완충용액	2°C ~ 8°C 또는 -25°C ~ -15°C
2	SPB	샘플 정제 비드	2°C ~ 8°C
1	TEB	TE 완충용액	2°C ~ 8°C

상자 5 - 라이브러리 프렙 - 고유한 PCR 인덱스 프라이머(Pre-Amp), PN 20006937

수량	시약	설명	보관 온도
1	UP01	고유한 인덱스 프라이머 01	-25°C ~ -15°C
1	UP02	고유한 인덱스 프라이머 02	-25°C ~ -15°C
1	UP03	고유한 인덱스 프라이머 03	-25°C ~ -15°C
1	UP04	고유한 인덱스 프라이머 04	-25°C ~ -15°C
1	UP05	고유한 인덱스 프라이머 05	-25°C ~ -15°C
1	UP06	고유한 인덱스 프라이머 06	-25°C ~ -15°C
1	UP07	고유한 인덱스 프라이머 07	-25°C ~ -15°C
1	UP08	고유한 인덱스 프라이머 08	-25°C ~ -15°C
1	UP09	고유한 인덱스 프라이머 09	-25°C ~ -15°C
1	UP10	고유한 인덱스 프라이머 10	-25°C ~ -15°C
1	UP11	고유한 인덱스 프라이머 11	-25°C ~ -15°C
1	UP12	고유한 인덱스 프라이머 12	-25°C ~ -15°C
1	UP13	고유한 인덱스 프라이머 13	-25°C ~ -15°C
1	UP14	고유한 인덱스 프라이머 14	-25°C ~ -15°C
1	UP15	고유한 인덱스 프라이머 15	-25°C ~ -15°C
1	UP16	고유한 인덱스 프라이머 16	-25°C ~ -15°C

인리치먼트

상자 6 - 인리치먼트(Post-Amp), PN 20026143

수량	시약	설명	보관 온도
2	TCB1	타겟 캡처 완충용액 1	2°C ~ 8°C
2	SMB	스트렙타비딘 자기 비드	2°C ~ 8°C
2	HP3	2N NaOH	2°C ~ 8°C
2	ET2	용출 타겟 완충용액 2	2°C ~ 8°C
1	LNB1	라이브러리 노멀라이제이션 비드 1	2°C ~ 8°C
2	LNW1	라이브러리 노멀라이제이션 세척 1	2°C ~ 8°C
1	RSB	재현탁 완충용액	2°C ~ 8°C 또는 -25°C ~ -15°C
2	SPB	샘플 정제 비드	2°C ~ 8°C
2	LNS1	라이브러리 노멀라이제이션 보관 1	2°C ~ 8°C

상자 7 - 인리치먼트(Post-Amp), PN 20026144

수량	시약	설명	보관 온도
2	TCA1	타겟 캡처 첨가제 1	-25°C ~ -15°C
1	EEW	향상된 인리치먼트 세척	-25°C ~ -15°C
3	EE2	인리치먼트 용출 2	-25°C ~ -15°C
2	EPM	향상된 PCR 믹스	-25°C ~ -15°C
2	PPC3	PCR 프라이머 콕테일 3	-25°C ~ -15°C
1	LNA1	라이브러리 노멀라이제이션 첨가제 1	-25°C ~ -15°C

상자 8 - 인리치먼트(Post-Amp), PN20026138

DNA/RNA 번들 고객은 이 상자를 1개 수령합니다. DNA 키트 고객은 이 상자를 2개 수령합니다.

수량	시약	설명	보관 온도
1	OPD2	Oncology DNA 프로브 마스터 풀 2	-25°C ~ -15°C

상자 9 - TruSight Oncology 500 키트 내용물 세트(RNA 전용), PN 20007012

DNA/RNA 번들 고객은 이 상자를 1개 수령합니다. DNA 키트 고객은 이 상자를 수령하지 않습니다.

수량	시약	설명	보관 온도
1	OPR1	Oncology RNA 프로브 마스터 풀	-25°C ~ -15°C

소모품 및 장비

프로토콜을 시작하기 전에 사용자가 준비해야 하는 모든 필요한 소모품 및 장비가 있으며 사용가능한 상태인지 확인합니다.

프로토콜은 나열된 항목을 사용하여 최적화 및 검증되었습니다. 대체 소모품 및 장비를 사용하는 경우 유사한 성능이 보장되지 않습니다.

소모품

소모품	공급자
[옵션] AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA 정량화 키트 (DNA 표준 1개 포함)	Biotium, 카탈로그 번호 31029
[옵션] AllPrep DNA/RNA FFPE 키트	QIAGEN, 카탈로그 번호 80234
[옵션] QuantiFluor RNA 시스템	Promega, 카탈로그 번호 E3310
[옵션] Agilent DNA 1000 키트	Agilent, 카탈로그 번호 5067-1504
[옵션] Agilent RNA 6000 나노 키트	Agilent, 카탈로그 번호 5067-1511
[옵션] Standard Sensitivity RNA 분석 키트	Advanced Analytical Technologies, 카탈로그 번호 DNF-471-0500
[옵션] FFPE QC 키트	Illumina, 카탈로그 번호 WG-321-1001
[옵션] DNA Reference 표준	Horizon Diagnostics, 카탈로그 번호 HD753
[옵션] Universal Human Reference RNA	Agilent, 카탈로그 번호 740000
8 microTUBE Strip	Covaris, 부품 번호 520053

소모품	공급자
Rack E220 <i>evolution</i> 8 microTUBE Strip 어댑터 (E220 <i>evolution</i> 과 함께 사용)	Covaris, 부품 번호 500430
Rack 12 place 8 microTUBE Strip 어댑터 (LE220과 함께 사용)	Covaris, 부품 번호 500191
뉴클레아제가 없는 1.7ml 마이크로 원심분리 튜브	일반 실험실 공급자
15ml 원뿔형 튜브	일반 실험실 공급자
50ml 원뿔형 튜브	일반 실험실 공급자
에어로졸 내성 파이펫 팁부 20µl	일반 실험실 공급자
에어로졸 내성 파이펫 팁부 200µl	일반 실험실 공급자
1ml 에어로졸 내성 파이펫 팁부	일반 실험실 공급자
96웰 보관 플레이트, 0.8ml(중형 플레이트)	Fisher Scientific, 부품 번호 AB-0859
96웰 PCR 플레이트, 0.2ml(폴리프로필렌)	일반 실험실 공급자
[옵션] 검은색의 평평하고 투명한 바닥을 가진 96웰 마이크로플레이트	Corning, 부품 번호 3904
뉴클레아제가 없는 시약 저장장치(PVC, 일회용 통)	VWR, 부품 번호 89094-658
Microseal 'B' 접착 포장지(플레이트 접착 포장지)	Bio-Rad, 부품 번호 MSB-1001
RNase/DNase 없는 순수	일반 실험실 공급자
뉴클레아제가 없는 순수	일반 실험실 공급자
에탄올(분자 생물용 200 프루프)	Sigma-Aldrich, 부품 번호 E7023

장비(Pre-Amp)

장비	공급자
열 사이클러	일반 실험실 공급자
열 블록(1.5ml 마이크로 원심분리 튜브)	일반 실험실 공급자
(2) 열 블록(Hybex 배양기, 열 기반)	SciGene, 카탈로그 번호 • 1057-30-O(115V) 또는 • 1057-30-2(230V)
(2) 중형 열 블록 삽입물(Hybex와 함께 사용)	Illumina, 카탈로그 번호 BD-60-601
Tabletop 원심분리(플레이트 원심분리)	일반 실험실 공급자
마이크로 원심분리(1.5ml 튜브)	일반 실험실 공급자
자기 스탠드 96	Thermo Fisher, 카탈로그 번호 AM10027
Vortexer	일반 실험실 공급자
플레이트 셰이커(BioShake XP)	Q Instruments, 부품 번호 1808-0505
Covaris Focused 초음파분쇄기	• Covaris, 부품 번호 500219(모델 LE220) 또는 • Covaris, 부품 번호 500429(모델 E220 <i>evolution</i>)
[옵션] 2100 Bioanalyzer 데스크톱 시스템	Agilent, 부품 번호 G2940CA
[옵션] Fragment Analyzer Automated CE 시스템	Advanced Analytical Technologies, 부품 번호 FSv2-CE2 또는 FSv2-CE10

장비(Post-Amp)

장비	공급자
열 블록(1.5ml 마이크로 원심분리 튜브)	일반 실험실 공급자
열 블록(Hybex 배양기, 96웰 플레이트)	SciGene, 카탈로그 번호 • 1057-30-O(115V) 또는 • 1057-30-2(230V)
중형 열 블록 삽입물(Hybex와 함께 사용)	Illumina, 카탈로그 번호 BD-60-601
Tabletop 원심분리(플레이트 원심분리)	일반 실험실 공급자
마이크로 원심분리(1.5ml 튜브)	일반 실험실 공급자
자기 스탠드 96	Thermo Fisher, 카탈로그 번호 AM10027
Vortexer	일반 실험실 공급자
플레이트 셰이커(BioShake XP)	Q Instruments, 부품 번호 1808-0505
열 사이클러	일반 실험실 공급자
[옵션] 2100 Bioanalyzer 데스크톱 시스템	Agilent, 부품 번호 G2940CA
[옵션] Fragment Analyzer Automated CE 시스템	Advanced Analytical Technologies, 부품 번호 FSv2-CE2 또는 FSv2-CE10

기술 지원

기술 지원이 필요한 경우 Illumina 기술 지원에 문의하십시오.

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

Illumina 고객 지원 전화 번호

지역	무료 전화	유료 전화
북미	+1.800.809.4566	
네덜란드	+31 8000222493	+31 207132960
노르웨이	+47 800 16836	+47 21939693
뉴질랜드	0800.451.650	
대한민국	+82 80 234 5300	
덴마크	+45 80820183	+45 89871156
독일	+49 8001014940	+49 8938035677
벨기에	+32 80077160	+32 34002973
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	
타이완	00806651752	
프랑스	+33 805102193	+33 170770446
핀란드	+358 800918363	+358 974790110
호주	+1.800.775.688	
홍콩	800960230	
기타 국가	+44.1799.534000	

SDS(Safety data sheets: 안전보건자료) - Illumina 웹사이트(support.illumina.com/sds.html)에서 제공합니다.

제품 설명서 - Illumina 웹사이트에서 PDF로 다운로드할 수 있습니다. support.illumina.com으로 이동하여 제품을 선택한 다음 **Documentation & Literature(설명서 및 홍보 자료)**를 선택합니다.



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 전용. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®