

TruSeq™ 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx

체외 진단용

카탈로그 # 20005718: 1~4회 사용, 최대 96개의 라이브러리

사용 목적

illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx는 말초 전혈 및 포르말린 고정 파라핀 임베딩된(FFPE) 조직에서 추출한 DNA 샘플 라이브러리 준비에 사용하는 시약 및 소모품의 세트입니다. 관심 대상인 특정 게놈 표적 영역을 표적화하는 라이브러리 프랩을 위해 사용자 공급 분석물 특이적인 시약이 필요합니다. 생성된 샘플 라이브러리는 illumina의 고처리량 DNA 시퀀스 분석기에 사용됩니다.

절차의 원칙

The illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx는 말초 전혈 표본 및 포르말린 고정 파라핀 임베딩된(FFPE) 조직의 DNA 시퀀싱용 라이브러리를 수동으로 준비하는 데 사용됩니다. TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx에 제공된 시약을 사용하여, 라이브러리 프랩 단계를 통해서 게놈 DNA를 처리하며, 분석물 특정 oligonucleotide를 사용하여 각 샘플의 표적 게놈 영역을 특이적으로 증폭하고 동시에 인덱스와 플로우 셀 수집 시퀀스를 증폭된 산물에 추가합니다. 전혈 표본의 DNA는 생식 세포 워크플로우를 따르며 FFPE 조직의 DNA는 somatic 워크플로우를 따릅니다. 그렇게 확보한 샘플 라이브러리는 illumina 고처리량 DNA 시퀀스 분석기에서의 시퀀싱 및 생식세포 또는 somatic 워크플로우에 상응하는 기기 소프트웨어 모듈 분석에 준비됩니다.

사용자가 디자인하는 분석물 특이적인 oligonucleotide를 제외하고 모든 시약이 제공됩니다.

라이브러리 프랩은 혼성화, extension-ligation, PCR 증폭 및 라이브러리 노멀라이제이션 등 4개의 주요 단계로 구성됩니다.

라이브러리 프랩

- **혼성화**— 샘플 게놈 DNA의 관심 영역에 특이적인 업스트림 및 다운스트림 oligonucleotide의 풀을 혼성화합니다. 이 과정의 마지막에서, 크기 선택이 가능한 필터로 3단계 세척 절차를 통해 게놈 DNA로부터 결합되지 않은 oligonucleotide를 제거합니다.
- **Extension-Ligation**— 혼성화된 업스트림 및 다운스트림 oligonucleotide를 연결합니다. DNA 중합효소가 업스트림 oligonucleotide로부터 표적 영역까지 연장되고, DNA ligase를 사용하여 다운스트림 oligonucleotide의 5' 말단에 ligation이 이어집니다. 결과적으로, 증폭에 필요한 시퀀스 측면에서 관심 영역에 특이적인 oligonucleotide를 함유하는 산물이 형성됩니다.
- **PCR 증폭**— illumina 시퀀서에서 클러스터를 생성하는 데 필요한 샘플 multiplexing 및 플로우 셀 수집 시퀀스를 위해 인덱스 시퀀스를 추가하는 프라이머를 사용하여 extension-ligation 산물을 증폭합니다. 이 과정의 마지막에서, PCR 정리 절차로 PCR 산물(라이브러리로 칭함)을 정제합니다.
- **라이브러리 노멀라이제이션**— 최종 풀링된 라이브러리에서 더욱 동일한 라이브러리 대표성을 보장할 수 있도록 각 라이브러리의 수량을 노멀라이즈합니다. 이 과정의 마지막에서, 합성을 통한 시퀀싱(SBS: Sequencing By Synthesis) chemistry를 사용하는 시퀀싱을 위해, 풀링된 라이브러리가 illumina 시퀀서에 장착됩니다.

절차의 제한 사항

- 1 체외 진단용.
- 2 길이가 25bp 이상인 삽입 및 결실(Indel)(insertion, deletion 및 그 결합) 함유물은 검사 소프트웨어에 의해서 배열되지 않습니다. 결과적으로, 길이가 25bp 이상인 삽입 및 결실(indel)은 검사 소프트웨어에 의해서 감지되지 않습니다.
- 3 시스템은 생식세포 및 Somatic variant 모듈과 함께 사용될 때 단일 nucleotide 변이(SNV)의 감지에 대해 최대 25bp의 deletion 및 24bp의 insertion까지 밸리데이션되었습니다. somatic 호출의 경우, 0.05의 변이 빈도에서 25bp의 deletion 및 18bp의 insertion이 테스트되었습니다.

- 4 극단의 변이 함유물이 있는 앰프리콘 리드는 검사 소프트웨어로 배열되지 않을 수 있으며 결과적으로 영역이 야생형으로 보고될 수 있습니다. 그러한 극단의 함유물에는 다음이 포함됩니다.
 - 3개 이상의 삽입 및 결실(indel)이 포함된 리드
 - SNV 함유물이 총 앰프리콘 표적 길이(프로브 영역 제외)의 4% 이상인 최소 30bp 길이의 리드
 - SNV 함유물이 총 앰프리콘 길이(프로브 영역 포함)의 10% 이상인 30bp 미만 길이의 리드
- 5 대형 변이(다중 뉴클레오타이드 변이, 대형 insertion, deletion 및 그 결합 포함)는 출력 VCF에서 별도의 더 작은 변이로 보고될 수 있습니다.
- 6 두 개의 타일링된 앰프리콘에 걸칠 때 deletion 길이가 타일링된 앰프리콘 간 중첩 이상인 경우 deletion 변이가 필터링되거나 누락될 수 있습니다.
- 7 insertion 및 deletion이 프라이머에 바로 인접하여 발생하고 중첩되는 앰프리콘이 없으면 시스템이 감지할 수 없습니다. 중첩 앰프리콘이 있는 영역의 경우, 검사는 중첩 영역이 감지할 deletion의 크기보다 작을 때 deletion을 감지하지 못합니다. 예를 들어, 두 개의 인접한 앰프리콘 간 중첩 영역이 두(2) 개의 염기일 때 검사는 그 염기 모두를 포함하여 어떤 deletion도 감지할 수 없습니다. 해당 염기 중 하나의 단일 염기 deletion은 감지할 수 있습니다.
- 8 어느 혼성화 기반 라이브러리 플랫폼 워크플로우와 마찬가지로, oligonucleotide 결합 영역의 기저 다형성, 돌연변이, insertion 또는 deletion은 조사 중인 대립형질에 영향을 주고 그에 따라 시퀀싱 도중 호출이 이루어집니다. 예를 들어,
 - 프라이머 영역에 변이가 있는 단계의 변이는 증폭되지 않고 결과적으로 위음성이 나타날 수 있습니다.
 - 프라이머 영역의 변이는 reference 대립형질의 증폭을 방해하여 부정확한 동형 변이 호출로 이어질 수 있습니다.
 - 프라이머 영역의 삽입 및 결실(indel) 변이는 프라이머와 인접한 리드의 말단에서 위양성 호출을 유발할 수 있습니다.
- 9 삽입 및 결실(Indel)은 하나의 리드 말단 가까이에서 발생하는 경우 가닥 편향으로 인해 필터링될 수 있으며 배열 중 부드럽게 클리핑됩니다.
- 10 작은 MNV는 밸리데이션되지 않았습니다.
- 11 복제수 변이 또는 융합이나 전위 등 구조적 변이는 밸리데이션되지 않았습니다.
- 12 생식세포 특이적 제한 사항
 - 생식세포 변이 모듈은 생식세포 변이 호출의 정성적 결과를 전달하도록 디자인되었습니다(예: 동종접합, 이형접합, 야생형).
 - 생식세포 변이 모듈을 사용할 때 정확한 변이 콜링에 필요한 앰프리콘당 최소 커버리지는 150x입니다. 샘플의 수와 총 표적 염기 수가 커버리지에 영향을 줍니다. GC 함량 및 기타 게놈 함량이 커버리지에 영향을 줄 수 있습니다.
 - 복제수 변화는 변이가 동종접합으로 또는 이형접합으로 식별되는지에 영향을 줄 수 있습니다.
 - 특정 반복 맥락의 변이는 VCF 파일에 필터링됩니다. 변이 위치에 인접한 reference 게놈에서 변이 시퀀스의 전체 또는 일부가 반복적으로 존재하는 경우, 변이를 필터링하는 데 RMxN 반복 필터를 사용할 수 있습니다. 생식세포 변이 호출 시, 변이를 필터링하는 데 reference에서 9회 이상의 반복이 필요하며 길이가 5bp까지만 반복만 고려됩니다(R5x9).
- 13 somatic 특이적 제한 사항
 - Somatic variant 모듈은 Somatic variant 호출의 정성적 결과를 전달하도록 디자인되었습니다(즉, 0.05의 감지 한도에서 변이 빈도가 0.026 이상인 Somatic variant 존재).
 - Somatic variant 모듈을 사용할 때 정확한 변이 콜링에 필요한 앰프리콘당 최소 커버리지는 oligonucleotide 풀당 450x입니다. 샘플의 수와 총 표적 염기 수가 커버리지에 영향을 줍니다. GC 함량 및 기타 게놈 함량이 커버리지에 영향을 줄 수 있습니다.
 - 특정 반복 맥락의 변이는 VCF 파일에 필터링됩니다. 변이 위치에 인접한 reference 게놈에서 변이 시퀀스의 전체 또는 일부가 반복적으로 존재하는 경우, 변이를 필터링하는 데 RMxN 반복 필터를 사용할 수 있습니다. Somatic variant 호출 시, 변이를 필터링하는 데 reference에서 6회 이상의 반복이 필요하며 길이가 3bp까지만 반복만 고려됩니다(R3x6).
 - Somatic variant 모듈은 생식세포 및 Somatic variant를 구분할 수 없습니다. 해당 모듈은 다양한 범위의 변이 빈도에서 변이를 감지하도록 디자인되었지만 변이 빈도를 사용하여 Somatic variant와 생식세포 변이를 구분할 수 없습니다.
 - 표본의 정상 조직은 변이 감지에 영향을 줍니다. 보고된 감지 한계는 종양 및 정상 조직 모두에서 추출된 총 DNA에 관한 변이 빈도에 기반합니다.

제품 구성요소

Illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 Kit Dx는 다음으로 구성됩니다.

- TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx(카탈로그 번호 20005718)

시약

제공 시약

Illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx는 단회 사용으로 최대 96개의 라이브러리를 처리하도록 구성되었습니다(생식세포 워크플로우의 경우 96개의 샘플 및 somatic 워크플로우의 경우 40개의 샘플[샘플당 2개의 라이브러리 필요]). 또한, 키트는 생식세포 워크플로우 사용당 24개의 라이브러리와 somatic 워크플로우 사용당 20개의 라이브러리로, 4개의 라이브러리 프랩 사용을 지원합니다.

이 키트에 포함된 완전한 시약 목록은 다음 표를 참조하십시오.

TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx, 상자 1

표 1 Box 1A Amp 전 시약

구성요소	수량	총전량	활성 성분	보관
혼성화 완충용액	1개의 튜브	4.32ml	염과 포름아마이드가 포함된 완충 수용액	-25°C~-15°C
Extension-Ligation 믹스	1개의 튜브	4.8ml	DNA 중합효소, DNA ligase 및 dNTP의 특허받은 혼합물이 포함된 완충 수용액	-25°C~-15°C
인덱스 프라이머 A (A501) -H(A508)	프라이머당 1개의 튜브	192µl	인덱스 시퀀스 및 시퀀싱 어댑터가 있는 PCR 프라이머	-25°C~-15°C
인덱스 프라이머 1 (A701) -12(A712)	프라이머당 1개의 튜브	128µl	인덱스 시퀀스 및 시퀀싱 어댑터가 있는 PCR 프라이머	-25°C~-15°C
PCR 중합효소	1개의 튜브	56µl	특허받은 DNA 중합효소	-25°C~-15°C
PCR 마스터 믹스	1개의 튜브	2.8ml	염과 dNTP가 포함된 완충 수용액	-25°C~-15°C

표 2 상자 1B Amp 후 시약

구성요소	수량	총전량	활성 성분	보관
라이브러리 노멀라이제이션 희석제	1개의 튜브	4.6ml	염과 2-메르캅토에탄올, 포름아마이드가 포함된 완충 수용액	-25°C~-15°C
라이브러리 희석 완충용액	1개의 튜브	4.5ml	완충 수용액	-25°C~-15°C
PhiX 내부 대조군	1개의 튜브	10µl	PhiX 게놈 DNA가 포함된 완충 수용액	-25°C~-15°C

TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx, 상자 2

표 3 Amp 전 시약

구성요소	수량	총전량	함유물	보관
필터 플레이트	4개의 플레이트	해당 없음	조절 폴리에테르설폰 막 폴리프로필렌 마이크로티터 플레이트	15°C~30°C

표 4 Amp 후 시약

구성요소	수량	총전량	활성 성분	보관
추출 완충용액	1개의 튜브	4.8ml	완충 수용액	15°C~30°C
라이브러리 보관 완충용액	1개의 튜브	3.5ml	완충 수용액	15°C~30°C



참고
상자 2에는 단일 상자의 Amp 전 및 Amp 후 시약이 들어 있습니다.

TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx, 상자 3

표 5 상자 3A Amp 전 시약

구성요소	수량	충전량	활성 성분	보관
강한 세척 완충용액	1개의 병	24ml	염과 2-메르캅토에탄올, 포름아마이드가 포함된 완충 수용액	2°C~8°C
범용 세척 완충용액	1개의 튜브	4.8ml	염이 포함된 완충 수용액	2°C~8°C

표 6 상자 3B Amp 후 시약

구성요소	수량	충전량	활성 성분	보관
PCR 정리 비드	1개의 튜브	5ml	고체상 상자성 비드 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된 완충 수용액	2°C~8°C
라이브러리 노멀라이제이션 세척용액	2개의 튜브	4.8ml	염과 2-메르캅토에탄올, 포름아마이드가 포함된 완충 수용액	2°C~8°C
라이브러리 비드	1개의 튜브	1.2ml	고체상 상자성 비드가 포함된 완충 수용액	2°C~8°C

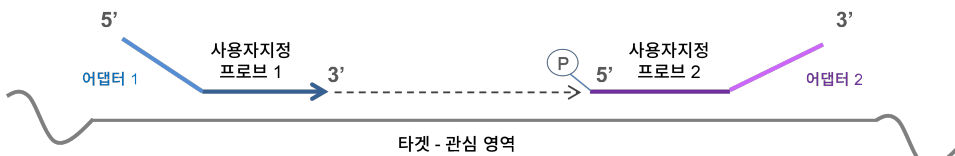
필요하지만 제공되지 않는 시약

사용자지정 oligonucleotide 풀

분석물 특정 oligonucleotide는 사용자가 개발하는 목적이며 라이브러리 플랫폼 키트에 포함되지 않습니다. 그림 1은 사용자 지정 올리고 디자인 원칙을 설명합니다. 올리고 디자인은 다음의 조건을 만족해야 합니다.

- 생식세포 워크플로우의 경우, 하나의 사용자지정 프로브 1(업스트림 좌위 특이적인 oligonucleotide[ULSO]) 및 하나의 사용자지정 프로브 2(다운스트림 좌위 특이적인 oligonucleotide[DLSO])의 사용자지정 oligonucleotide 한 쌍을 각 앰프리콘마다 디자인해야 합니다.
- somatic 워크플로우의 경우, 각 앰프리콘마다 사용자지정 oligonucleotide 두 쌍을 디자인해야 합니다. 각 쌍은 하나의 사용자지정 프로브 1(업스트림 좌위 특이적인 oligonucleotide[ULSO]) 및 하나의 사용자지정 프로브 2(다운스트림 좌위 특이적인 oligonucleotide[DLSO])로 구성됩니다. 한 쌍은 플러스 가닥을, 다른 한 쌍은 마이너스 가닥을 표적화해야 합니다.
- 사용자지정 oligonucleotide는 관심 영역 주위를 감싸야 합니다. 관심 영역은 150~250bp 사이일 수 있으며 2x150 Cycle 시퀀스 실행으로 절편의 완전한 시퀀싱이 가능합니다.
- 두 oligonucleotide는 모두 동일한 DNA 가닥에 혼성화해야 합니다.
- 사용자지정 oligonucleotide는 PCR에 의한 인덱스의 추가 및 시퀀싱 어댑터를 지원할 수 있도록 Illumina 특이적인 어댑터를 포함해야 합니다.
 - 어댑터 1(5'-CAACGATCGTCGAAATTCGC-3')은 사용자지정 프로브 1(ULSO)의 5' 말단에 위치해야 합니다.
 - 어댑터 2(5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3')는 사용자지정 프로브 2(DLSO)의 3' 말단에 위치해야 합니다.
- 사용자지정 프로브 2(DLSO)는 5' 말단에서 인산화되어 사용자지정 프로브 1(ULSO) extension 후 ligation 단계를 지원합니다.

그림 1 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx용 올리고 디자인



- 다음의 oligonucleotide 디자인 매개변수를 권장합니다.
 - 22~30의 뉴클레오타이드 길이 범위(유전자 특이 영역).

- 생식세포 워크플로우의 어댑터를 포함하는 190~290 염기쌍 또는 somatic 워크플로우의 어댑터를 포함하는 160~250 염기쌍 앰프리콘의 총 크기.
- 권장 프라이머 GC 함량은 25%~70% 범위입니다.
- 권장 Tm 범위는 55°C~70°C입니다.
- 사용자지정 풀에서 oligonucleotide 농도는 올리고당 15nM여야 합니다.
- 합성 후 추가적인 oligonucleotide 정제는 필요하지 않습니다. 탈염을 권장합니다.
- oligonucleotide는 TE 완충용액에 희석할 수 있습니다.
- 샘플당 앰프리콘 수는 16~384 범위일 수 있습니다.
- 관심 영역의 극단에서 insertion 및 deletion을 감지할 수 있도록, 프라이머 말단과 관심 영역 간에 여분의 염기를 두고 oligonucleotide를 디자인합니다(2페이지 절차 제한 사항 항목 7 참조).
- 전체 관심 영역을 포괄하기 위해 타일링이 필요한 경우, 인접 프로브 세트에 결합하는 부위 사이의 표적 영역 내 중첩 영역은 감지하는 deletion의 크기보다 1bp가 커야 합니다. 예를 들어, 3bp의 deletion을 감지하려면, 인접 프로브 세트 간 중첩 영역이 >4bp여야 합니다. 인접 프로브 세트는 Alternate 가닥에 맞게 디자인하여 간섭을 피해야 합니다.

변이 호출에 필요한 앰프리콘당 최소 커버리지는 [절차 제한 사항](#)을 참조하십시오. 실행당 샘플 수는 시퀀싱 기기에서 필요한 최소 커버리지에 따라 계산해야 하며 사용자지정 oligonucleotide 풀의 총 길이와 커버리지 균일성에 따라 달라집니다.

사용자지정 oligonucleotide 풀마다 메니페스트 파일을 생성해야 합니다. 메니페스트는 표적 게놈 영역에 관한 정보가 담긴 텍스트 파일이며 시퀀서가 분석을 실행하는 데 필요합니다. Illumina 웹사이트를 방문하여 메니페이스 파일 템플릿을 다운로드하십시오.

Amp 전 시약

- 10N NaOH(정제로부터 준비 또는 표준 용액 사용)
- TE 완충용액
- RNase/DNase 없는 순수

Amp 후 시약

- 10N NaOH(정제로부터 준비 또는 표준 용액 사용)
- 에탄올, 분자 생물용 200프로프
- TE 완충용액
- RNase/DNase 없는 순수

보관 및 취급

- 1 실온은 15°C~30°C로 정의됩니다.
- 2 다음 시약은 냉동 상태로 배송되며 -25°C~-15°C에서 보관 시 지정된 유효 기간까지 안정적입니다.
 - 혼성화 완충용액
 - Extension-Ligation 믹스
 - 인덱스 프라이머 A(A501) – H(A508)
 - 인덱스 프라이머 1(A701) – 12(A712)
 - PCR 중합효소
 - PCR 마스터 믹스
 - 라이브러리 노멀라이제이션 희석제
 - 라이브러리 희석 완충용액
 - PhiX 내부 대조군
 시약은 최대 6회의 냉동/해동 cycle 동안 지정된 유효 기간까지 안정적입니다.
- 3 다음 시약은 냉장 상태로 배송되며 2°C~8°C에서 보관 시 지정된 유효 기간까지 안정적입니다.
 - 강한 세척 완충용액
 - 범용 세척 완충용액
 - PCR 정리 비드

- 라이브러리 비드
 - 라이브러리 노멀라이제이션 세척용액
- 4 다음 시약은 주변 온도로 배송되며 실온 보관 시 지정된 유효 기간까지 안정적입니다.
 - 추출 완충용액
 - 필터 플레이트
 - 라이브러리 보관 완충용액
 - 5 제공된 시약의 물리적 성상이 변화하는 경우 이는 물질의 악화를 나타낼 수 있습니다. 물리적 성상의 변화가 발생하면 (예: 시약 색상의 분명한 변화 또는 미생물 오염으로 탁해짐), 시약을 사용하지 마십시오.
 - 6 혼성화 완충용액, 강한 세척 완충용액 및 라이브러리 노멀라이제이션 희석 시약에서 가시적인 침전물이나 결정이 생성될 수 있습니다. 사용 전에 강하게 교반한 다음 육안으로 침전물이 없는지 확인하십시오.
 - 7 PCR 정리 비드 및 라이브러리 비드를 취급할 때 다음의 모범 사례를 준수하십시오.
 - 비드는 냉동해서는 안 됩니다.
 - 비드를 실온으로 맞춥니다.
 - 사용하기 직전에 충분히 부유하고 색상이 균일해질 때까지 비드를 교반합니다.
 - 위아래로 10회 파이펫팅하여 비드를 추가한 후 샘플을 완전히 혼합합니다. 셰이커를 사용하여 샘플을 완전히 혼합합니다.
 - 표시된 전체 기간 동안 실온에서 비드/샘플 혼합물을 배양합니다.
 - 자성 스탠드 사용 시 지침을 따릅니다. 용액이 투명해질 때까지 기다린 다음 흡입합니다. 자성 스탠드에 플레이트를 두고 분리된 비드를 건드리지 않도록 주의하면서 상청액을 느리게 흡입합니다.
 - 8 PCR 증폭 플레이트는 열 순환기에서 하룻밤 동안 유지하거나 아래 제시된 조건 중 하나로 보관할 수 있습니다. 보관 전에, 플레이트 웰을 밀봉합니다.
 - 2°C~8°C에서 최대 2일
 - -25°C~-15°C에서 최대 일주일
 - 9 사용하지 않는 동안, 라이브러리 비드를 냉동하거나 라이브러리 노멀라이제이션 희석 시약과 혼합하지 마십시오.
 - 10 완성된 라이브러리 노멀라이제이션 플레이트(LNP)는 2°C~8°C에서 최대 3시간 또는 -25°C~-15°C에서 최대 일주일 동안 보관할 수 있습니다.
 - 11 보관 플레이트(SGP)는 -25°C~-15°C에서 최대 48시간 동안 보관할 수 있습니다.
 - 12 희석된 앰프리콘 라이브러리(DAL)는 -25°C~-15°C에서 최대 84일까지 보관할 수 있습니다.
 - 13 변성 후 곧바로, 희석된 앰프리콘 풀을 시약 카트리지에 장착하십시오.

장비 및 물질

제공되는 장비 및 물질, 별도 판매

- 1 Illumina 고처리량 DNA 시퀀스 분석기 및 관련 시퀀싱 소모품
- 2 TruSeq 인덱스 플레이트 고정 키트, 카탈로그 번호 FC-130-1005
- 3 TruSeq 인덱스 플레이트 고정 및 칼라 키트, 카탈로그 번호 FC-130-1007
- 4 Index 어댑터 교체 캡, 카탈로그 번호 DX-502-1003
- 5 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx Dx-FFPE QC, 카탈로그 번호 20006259(somatic 워크플로우용)

필요하지만 제공되지 않는 장비 및 물질

Amp 전 장비 및 물질

- 1 **가열 블록**—96웰 플레이트에 맞는 1개의 가열 블록이 필요합니다. 가열 블록은 다음의 기준을 충족해야 합니다.
 - 가열된 덮개
 - 온도 범위: +5°C~99°C의 주변 온도
 - 온도 조절: 37°C에서 ±0.1°C; 60°C에서 ±0.4°C
- 2 **샘플 배양기**—1개의 배양기(혼성화 오븐)가 필요합니다. 배양기는 다음의 기준을 충족해야 합니다.
 - 온도 범위: 10°C~100°C
 - 온도 조절: ±0.2°C

- 3 **탁상 원심분리기**—1개의 탁상 원심분리기(Amp 후 실험실 공간에 별도의 원심분리기가 필요합니다). 원심분리기는 다음의 기준을 충족해야 합니다.
 - 20°C 유지 가능
 - 필터 유닛 포함 96웰 플레이트에 적합함
 - 5ml 튜브 수용
 - 280~2400 × g 속도 달성
- 4 **열 밀봉기**—40°C 배양 시 증발을 방지할 수 있도록 하룻밤을 넘는 혼성화에 권장됩니다.
- 5 **정밀 파이펫**—정밀 파이펫 한 세트가 필요합니다. (Amp 후 실험실 공간에 별도의 세트가 필요합니다.) 정밀 파이펫의 사용으로 정확한 시약 및 샘플 전달을 보장합니다. 정기적으로 교정이 되고 기재 용량의 5% 이내로 정확한 경우 단채널 또는 다채널 파이펫을 사용할 수 있습니다.
- 6 **소모품**—다음의 소모품이 필요합니다.
 - 96웰 스커트 PCR 플레이트, 0.2ml, 폴리프로필렌 또는 동급
 - 96웰 보관 플레이트, 0.8ml(MIDI 플레이트)
 - PVC, DNase, RNase- 없는 용액 용기(트러프)
 - 접착 알루미늄 포장지 밀봉재(95°C 포함 내온도 범위) 또는 열 밀봉기 호환 밀봉재
 - PCR 열 순환기 호환 밀봉재
 - 에어로졸 오염 방지 파이펫 팁

Amp 후 장비 및 물질

- 1 **열 순환기**—하나의 열 순환기가 필요합니다. 열 순환기는 가열 덮개가 있어야 하며 다음 성능 기준을 충족해야 합니다.
 - 온도 조절 범위: 4°C~99°C
 - 조절 정확도 35°C~99°C에서 ±0.25°C
- 2 **마이크로플레이트 셰이커**—Amp 후 실험실 공간에 1개의 마이크로플레이트 셰이커가 필요합니다. 플레이트 셰이커는 다음 성능 기준을 충족해야 합니다.
 - 최대 혼합 속도: 3000rpm
 - 혼합 속도 범위: 200~3000rpm
- 3 **탁상 원심분리기**—1개의 탁상 원심분리기가 필요합니다(Amp 전 실험실 공간에 별도의 원심분리기가 필요합니다). 원심분리기는 다음의 기준을 충족해야 합니다.
 - 20°C 유지 가능
 - 96웰 MIDI 플레이트에 적합함
 - 5ml 튜브 수용
 - 280~2400 × g 속도 달성
- 4 **가열 블록**—1.5ml~2ml 튜브에 맞는 1개의 가열 블록이 필요합니다. 가열 블록은 다음의 기준을 충족해야 합니다.
 - 온도 범위: +5°C~99°C의 주변 온도
 - 온도 조절: 37°C에서 ±0.1°C; 60°C에서 ±0.4°C
- 5 **자성 스탠드**—96웰 플레이트에 맞는 1개의 자성 스탠드가 필요합니다. 자석이 스탠드 바닥이 아니라 측면에 있을 때 더 나은 성능을 보입니다.
- 6 **정밀 파이펫**—정밀 파이펫 한 세트가 필요합니다. (Amp 전 실험실 공간에 별도의 세트가 필요합니다.) 정확한 시약 및 샘플 전달을 보장할 수 있도록 정밀 파이펫을 사용해야 합니다. 정기적으로 교정이 되고 기재 용량의 5% 이내로 정확한 경우 단채널 또는 다채널 파이펫을 사용할 수 있습니다.
- 7 **겔 전기영동 비품**—겔에서 PCR 산물을 시각화하기 위해 적절한 염색 방법과 더불어 겔 전기영동 비품 및 기구가 필요합니다.
- 8 **소모품**—다음의 소모품이 필요합니다.
 - 96웰 스커트 PCR 플레이트, 0.2ml, 폴리프로필렌 또는 동급
 - 96웰 보관 플레이트, 0.8ml(MIDI 플레이트)



참고

96웰 플레이트가 자성 스탠드와 맞게 호환되는지 확인하십시오.

- 2~4% TBE 아가로스 겔
- 100bp DNA 분자량 표시기

- DNA 장착 염료
- 원뿔형 튜브, 15ml
- Eppendorf 마이크로원심분리 튜브(나사식 마개 권장)
- PCR 여덟 개 튜브 스트립
- PVC, DNase, RNase- 없는 용액 용기(트리프)
- 접착 알루미늄 포장지 밀봉재
- Microseal® 'B'(Bio-Rad) 또는 동급
- 에어로졸 오염 방지 파이펫 팁

표본 수집, 수송 및 보관

생식세포 워크플로우

혈액 및 혈액에서 추출한 DNA를 처리할 때 다음 조건을 충족해야 합니다.



주의

HIV, HBV 및 기타 감염성이 알려진 혈액 매개 병원균을 취급하는 방법으로 모든 혈액 표본을 취급합니다.

- 1 K₂EDTA 튜브에 수집된 전혈 표본을 사용할 수 있습니다.
- 2 전혈 표본을 실온에서 최대 7일, 2°C~8°C에서 최대 30일 또는 -25°C~-15°C에서 냉동 상태로 최대 30일까지 보관할 수 있습니다.
- 3 전혈을 실온에서 최대 7일, 2°C~8°C에서 또는 냉동된 상태로 -25°C~-15°C에서 최대 30일 동안 수송할 수 있습니다. 전혈 수송 시 병인체의 수송에 관한 국가, 연방, 주 및 지역 규정을 준수해야 합니다.
- 4 냉동 게놈 DNA 샘플은 6회의 냉동/해동 cycle에서 안정적입니다.



참고

전혈 표본에서 빌리루빈, 콜레스테롤, 헤모글로빈, 트리글리세라이드 또는 EDTA가 상승했을 때 키트 성능에 대한 부정적인 효과가 관찰되지 않았습니다.

DNA 추출(생식세포 워크플로우)

유효성이 확인된 DNA 추출 방법을 사용할 수 있습니다.

Somatic 워크플로우

종양 조직 및 조직에서 추출한 DNA를 처리할 때 다음 조건을 충족해야 합니다.

- 1 종양 조직은 포르말린 고정 파라핀 임베딩(FFPE)되어야 합니다.
- 2 추출된 게놈 DNA는 2°C~8°C에서 최대 28일 또는 -25°C~-15°C에서 최대 161일 동안 냉동 상태로 보관해야 합니다.
- 3 냉동 게놈 DNA 샘플은 2회의 냉동/해동 cycle에서 안정적입니다.



참고

탈파라핀 용액, 파라핀 왁스, 크실렌, 에탄올, 단백질분해효소 K, 세척 용액, 헤모글로빈 또는 괴사 조직이 존재할 때 FFPE 조직에서 키트 성능에 대한 부정적인 효과가 관찰되지 않았습니다.

DNA 추출(somatic 워크플로우)

Illumina는 단백질분해효소 K의 양을 배가하고, 단백질분해효소 K를 하룻밤 교반한 후 30µl 이상의 용량을 최종 용출하는 방법을 사용하는 열 기반 DNA 추출 키트를 권장합니다. 비드 기반 추출 방법 및 원 세포 추출의 용해만을 사용하는 방법은 이 시약에 권장되지 않습니다.

경고 및 주의사항



주의

연방 법률은 본 장치를 의사 또는 진료하는 주 법률에 의해 허가받은 기타 의료 종사자에 의해서 또는 그 주문에 따라 판매하고 장치를 사용 또는 사용을 주문하도록 제한합니다.



경고

이 시약 세트에는 잠재적으로 위험한 화학물질이 들어 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. 자세한 환경, 보건 및 안전 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

- 1 사람면역결핍 바이러스(HIV), 사람 B형 간염 바이러스(HBV) 및 기타 감염성이 알려진 혈액 매개 병원균(일반 예방조치)을 취급하는 방법으로 모든 혈액 표본을 취급합니다.
- 2 서술된 절차를 따르지 않을 경우 결과의 오류 또는 샘플 품질의 현저한 감소로 이어질 수 있습니다.
- 3 정기 실험실 예방조치를 사용하십시오. 입으로 파이펫팅하지 마십시오. 지정된 작업 공간에서 먹거나 마시거나 흡연하지 마십시오. 표본 및 키트 시약 취급 시 일회용 장갑이나 실험실 코트를 착용하십시오. 표본 및 키트 시약 취급 시 깨끗하게 손을 씻으십시오.
- 4 키트 상자 라벨의 유효 기간이 지난 키트 구성요소를 사용하지 마십시오. 다른 키트 로트의 키트 구성요소와 교체하지 마십시오. 참고로 키트 로트는 키트 상자 라벨로 식별됩니다.
- 5 지정된 증폭 전 및 증폭 후 공간에서 지정된 온도로 키트 구성요소를 보관하십시오.
- 6 시약의 반복적인 냉동-해동 cycle을 피하십시오. 키트 사용 횟수에 대한 [절차 노트](#)를 참조하십시오.
- 7 샘플 또는 시약 악화를 방지할 수 있도록, 프로토콜 시작 전에 모든 차아염소산나트륨 증기가 완전히 사라지는 것을 확인하십시오.
- 8 PCR 산물이 시약, 기기 및 게놈 DNA 샘플로부터 오염되는 것을 방지하기 위해 적절한 실험실 기준 및 실험실 위생 관리가 필요합니다. PCR 오염으로 인해 부정확하고 신뢰할 수 없는 결과가 발생할 수 있습니다.
- 9 오염 방지를 위해, 증폭 전 및 증폭 후 공간에 전용 장비(예: 파이펫, 파이펫 팁, 교반기, 원심분리기)가 있는지 확인하십시오.
- 10 교차 오염을 방지하십시오. 샘플 및 시약 분주 간에 새로운 파이펫 팁을 사용하십시오. 지시된 대로 파이펫으로 샘플을 혼합하고 플레이트를 원심분리하십시오. 플레이트를 교반하지 마십시오. 에어로졸 오염 방지 팁을 사용하여 앰프리콘 캐리오버 및 샘플 간 교차 오염의 위험을 줄이십시오.
- 11 인덱스 샘플 페어링은 인쇄된 플레이트 레이아웃에 정확하게 일치해야 합니다. Local Run Manager는 샘플 이름이 모듈에 입력될 때 관련된 인덱스 프라이머를 자동으로 채웁니다. 사용자는 시퀀싱 실행을 시작하기 전에 샘플과 관련된 인덱스 프라이머를 확인하는 것이 좋습니다. 샘플 시트 및 플레이트 레이아웃 간 불일치는 양성 샘플 식별의 손실 및 부정확한 결과 보고로 이어집니다.
- 12 세척 단계에서는 항상 새 80% 에탄올을 준비하십시오. 에탄올은 공기에서 물을 흡수하여 결과에 영향을 줄 수 있습니다.
- 13 세척 단계 동안 웰 바닥에서 모든 에탄올이 제거되는 것을 확인하십시오. 잔류 에탄올은 결과에 영향을 줄 수 있습니다.
- 14 완전한 증발을 보장할 수 있도록 자성 스탠드 단계 이후 지정된 건조 시간을 준수하십시오. 잔류 에탄올은 후속 반응의 성능에 영향을 줄 수 있습니다.
- 15 보관을 위해 사용자지정 oligonucleotide 풀과 혼성화 완충용액을 혼합하지 마십시오. 결합 시, 냉동 상태로 보관하더라도 사용자지정 올리고 풀이 불안정해집니다.
- 16 능동 냉각식 열 순환기(예: Peltier, 열전 냉각식)의 사용은 혼성화 단계에 권장되지 않습니다. 적절한 혼성화를 위해서는 수동 냉각 단계가 매우 중요합니다.
- 17 항상 사용 직전에 PCR 마스터 믹스에 PCR 중합효소를 추가하십시오. 결합된 작업용 용액을 절대로 보관하지 마십시오.
- 18 라이브러리 노멀라이제이션 단계 동안, 라이브러리 비드 펠릿을 완전히 재부유하는 것은 매우 중요합니다. 이는 후속 플로우 셀의 일관된 클러스터 밀도를 달성하는 데 필수적입니다.
- 19 라이브러리 노멀라이제이션 단계에서 지정된 배양 횟수를 준수하십시오. 부적절한 배양은 라이브러리 대표성 및 클러스터 밀도에 영향을 줄 수 있습니다.
- 20 플레이트 수송 횟수 및 후속 오염의 가능성 때문에, 특히 주의를 기울여 웰 내용물이 완전하게 웰 안에 유지되도록 보장해야 합니다. 내용물이 튀게 해서는 안 됩니다.

약어

표 7 Illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx 약어

약어	정의
AMP	AMplification Plate, 증폭용 플레이트(라이브러리)
CLP	CLean-up Plate, 정리 플레이트
COP	사용자지정 Oligonucleotide 풀
DAL	Diluted Amplicon Library, 희석 앰프리콘 라이브러리
FPU	Filter Plate Unit, 필터 플레이트 장치
HYB	HYBridization Plate, 혼성화 플레이트
LNP	Library Normalization Plate, 라이브러리 노멀라이제이션 플레이트
NTC	Negative Template Control, 음성 템플릿 대조군
PAL	Pooled Amplicon Library, 풀 앰프리콘 라이브러리
POS	POsitive Control, 양성 대조군
SGP	StoraGe Plate, 보관 플레이트

절차 노트

- 1 96개 미만의 라이브러리를 처리해야 할 때는 키트를 최대 4회까지 사용할 수 있습니다. **사용 지침**에 설명된 파이펫팅 기술을 따를 경우, 4회 사용에서 생식세포 워크플로우는 사용당 24개의 라이브러리를 지원하고 somatic 워크플로우는 사용당 20개의 라이브러리를 지원합니다.
- 2 Illumina의 요건은 매 사용 시 1개의 양성 대조군 DNA 샘플과 1개의 음성 대조군(NTC, 즉 템플릿이 없는 대조군)을 포함하는 것이며, 사용은 병렬적으로 처리되는 샘플의 세트에 정의됩니다. 양성 대조군 DNA 샘플은 관심 영역에 알려진 변이가 있는 잘 특성화된 샘플이어야 합니다.
- 3 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx 프로토콜을 시작하기 전에 DNA를 추출하여 정량화합니다.
- 4 생식세포 워크플로우의 경우, 분광법을 사용하여 DNA를 정량화합니다. DNA 샘플의 A260/A280이 >1.5인지 확인합니다. DNA 샘플을 5ng/μl로 노멀라이즈합니다. 샘플마다 10μl의 게놈 DNA(총 50ng)가 필요합니다.
- 5 생식세포 워크플로우의 50ng DNA input 권장사항은 DNA 수량 변이를 지원합니다. 라이브러리 수율과 시퀀싱 성능은 이 input 수준에 의해서 도출됩니다.
- 6 somatic 워크플로우의 경우, Illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 Dx - FFPE QC를 사용하여 DNA를 정성화합니다. 라이브러리 수율과 시퀀싱 성능은 FFPE QC 방법으로 측정되는 샘플의 품질에 따라 달라집니다.

샘플 처리량

Illumina TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx의 경우, 시퀀싱 실행의 라이브러리 처리량은 MiSeqDx에서 1~96개의 라이브러리, 그리고 NextSeq 550Dx에서 8~96개의 라이브러릴 수 있습니다. somatic 워크플로우는 샘플마다 2개의 라이브러리가 필요합니다.

각 라이브러리가 고유한 인덱스 조합을 사용하도록 보장하려면 PCR 증폭 동안 사용된 인덱스 프라이머를 원하는 최종 샘플 처리량에 따라 선택해야 합니다.

인덱스 프라이머 시퀀스

표 8 인덱스 프라이머 A(A501) –H(A508)용 시퀀스

인덱스 프라이머	시퀀스
인덱스 프라이머 A(A501)	TGAACCTT
인덱스 프라이머 B(A502)	TGCTAAGT
인덱스 프라이머 C(A503)	TGTTCTCT
인덱스 프라이머 D(A504)	TAAGACAC
인덱스 프라이머 E(A505)	CTAATCGA
인덱스 프라이머 F(A506)	CTAGAACA
인덱스 프라이머 G(A507)	TAAGTTCC
인덱스 프라이머 H(A508)	TAGACCTA



참고

NextSeq™ 550Dx에서, 인덱스 프라이머 A501-A508은 역방향 보체로 리드됩니다. 2채널 시퀀싱 chemistry에 대한 인덱스 다양성 조건을 고려할 때 역방향 보체 시퀀스를 사용해야 합니다.

표 9 인덱스 프라이머 1(A701) –12(A712)용 시퀀스

인덱스 프라이머	시퀀스
인덱스 프라이머 1(A701)	ATCACGAC
인덱스 프라이머 2(A702)	ACAGTGGT
인덱스 프라이머 3(A703)	CAGATCCA
인덱스 프라이머 4(A704)	ACAAACGG
인덱스 프라이머 5(A705)	ACCCAGCA
인덱스 프라이머 6(A706)	AACCCCTC
인덱스 프라이머 7(A707)	CCCAACCT
인덱스 프라이머 8(A708)	CACCACAC
인덱스 프라이머 9(A709)	GAAACCCA
인덱스 프라이머 10(A710)	TGTGACCA
인덱스 프라이머 11(A711)	AGGGTCAA
인덱스 프라이머 12(A712)	AGGAGTGG

사용 지침

샘플 레이아웃

라이브러리 프랩을 수행하기 전에, 시퀀싱 기기의 소프트웨어인 LocalRun Manager로 시퀀싱 실행을 생성합니다. 실행에 샘플을 채우고 메니페스트 파일을 선택합니다. 그렇게 얻은 샘플 레이아웃을 인쇄하거나 파일로 내보낸 다음 샘플로부터 라이브러리를 준비할 때 reference로 사용합니다. 자세한 지침은 원하는 워크플로우와 시퀀싱 기기에 상응하는 모듈별 reference 가이드를 참조하십시오. 샘플은 reference 가이드 지침에 따라 수동으로 입력하거나 가져오기할 수 있습니다.

생식세포 대 Somatic 워크플로우 지침

TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx는 말초 전혈 표본 및 포르말린 고정 파라핀 임베딩된(FFPE) 조직의 DNA 시퀀싱을 위한 라이브러리를 수동으로 준비하는 데 사용됩니다. TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx에 제공된 시약을 사용하여, 라이브러리 프랩 단계를 통해서 게놈 DNA를 처리하며, 분석물 특정 oligonucleotide를 사용하여 각 샘플의 표적 게놈 영역을 특이적으로 증폭하고 동시에 인덱스와 플로우 셀 수집 시퀀스를 증폭된 산물에 추가합니다. 전혈의 DNA는 생식세포 워크플로우를 따르며 FFPE 조직의 DNA는 somatic 워크플로우를 따릅니다.

그렇게 확보한 샘플 라이브러리는 Illumina 고처리량 DNA 시퀀싱 분석기에서의 시퀀싱 및 각 워크플로우에 상응하는 기기 소프트웨어 모듈 분석(생식세포 또는 somatic)에 준비됩니다.



참고

사용 지침 전체에서 생식세포 워크플로우 실행과 somatic 워크플로우 실행 지침의 차이가 있는 경우 이 단계에서 콜링됩니다. 이 차이는 표 10에 요약되었습니다.

표 10 생식세포 대 Somatic 변이 분석 워크플로우 간 차이

단계	매개변수	생식세포 워크플로우	Somatic 워크플로우
분석 전	샘플 유형	전혈 DNA	FFPE 조직 DNA
분석 전	DNA input	50ng	ΔCq에 따름
분석 전	샘플 QC 방법	A260	TSCA Dx - FFPE QC
oligonucleotide 풀의 혼성화	혼성화 접근법	단일 가닥	이중 가닥
oligonucleotide 풀의 혼성화	oligonucleotide 풀의 수	1	2
PCR 증폭	인덱스 프라이머의 볼륨	4µl	9µl
PCR 증폭	PCR 반응 인덱싱의 용량[HM4]	50µl	60µl
PCR 증폭	PCR cycle	28	32
라이브러리 프랩 확인	라이브러리 수율	옵션 겔 평가(CLP 산물)	겔 평가됨(AMP 산물)
PCR 정리	PCR 정리 용량	45µl	55µl

oligonucleotide 풀의 혼성화(Pre-Amp)

준비

- 1 분석물 특이적 oligonucleotide 풀, 혼성화 완충용액, 게놈 DNA 샘플 및 양성 대조군 샘플을 실온으로 맞춥니다.
- 2 사용자지정 올리고 풀 및 혼성화 완충용액을 강하게 교반하고 모든 침전물이 완전히 용해되었는지 확인한 다음, 짧은 시간 동안 oligonucleotide 풀 튜브를 원심분리하여 액체를 수집합니다. 혼성화 완충용액에 침전물이 보이지 않는지 확인합니다.
- 3 96웰 가열 블록을 95°C로 설정합니다.
- 4 배양기를 37°C로 예열합니다.
- 5 LocalRun Manager에서 인쇄된 플레이트 레이아웃에 따라 샘플 플레이트를 생성합니다.

절차

- 1 새 96웰 PCR 플레이트를 준비합니다(이후 **HYB** 플레이트로 칭함).
- 2 측정하고자 하는 변이 유형에 따라 다음 워크플로우 중 하나(생식세포 또는 somatic)를 선택합니다.
 - **생식세포 워크플로우:**
 - 10 μ l의 샘플 또는 대조군을 5ng/ μ l(총 50ng)로 **HYB** 플레이트의 적절한 웰에 플레이트의 레이아웃에 따라 추가합니다.
 - **Somatic 워크플로우:**
 - TruSeq 사용자지정 앰프리콘 Dx - FFPE QC에 따라 희석된 10 μ l의 샘플 또는 대조군을 추가합니다. 플레이트 레이아웃에 따라 2개의 oligonucleotide 풀로 혼성화할 수 있도록 샘플 또는 대조군을 2개의 웰에 있는 플레이트에 추가합니다.
- 3 측정하고자 하는 변이 유형에 따라 다음 워크플로우 중 하나(생식세포 또는 somatic)를 선택합니다.
 - **생식세포 워크플로우:**
 - 1X 10 μ l의 TE 완충용액을 템플릿이 없는 대조군(NTC) 웰에 추가합니다. 정확하게 웰을 선택할 수 있도록 생성된 플레이트 레이아웃을 따릅니다.
 - **Somatic 워크플로우:**
 - 1X 10 μ l의 TE 완충용액을 템플릿이 없는 대조군(NTC) 웰(2)에 추가합니다. 정확하게 웰을 선택할 수 있도록 생성된 플레이트 레이아웃을 따릅니다.
- 4 측정하고자 하는 변이 유형에 따라 다음 워크플로우 중 하나(생식세포 또는 somatic)를 선택합니다.
 - **생식세포 워크플로우:**
 - 플레이트 레이아웃에 따라 게놈 DNA 및 NTC가 포함된 모든 웰에 5 μ l의 사용자지정 oligonucleotide 풀을 추가합니다.
 - **Somatic 워크플로우:**
 - 플레이트 레이아웃에 따라 게놈 DNA 및 NTC가 포함된 모든 웰에 5 μ l의 사용자지정 oligonucleotide 풀 A를 추가합니다.
 - 플레이트 레이아웃에 따라 게놈 DNA 및 NTC가 포함된 모든 웰에 5 μ l의 사용자지정 oligonucleotide 풀 B를 추가합니다.

각 풀을 받는 웰은 서로 겹치지 않습니다.
- 5 **HYB** 플레이트의 각 샘플 및 NTC에 40 μ l의 혼성화 완충용액을 추가합니다. 파이펫을 이용하여 부드럽게 위아래로 3~5회 혼합합니다.
- 6 **HYB** 플레이트를 밀봉하고 20°C에서 1분간 1000 × g로 원심분리합니다.



주의

혼성화 반응 동안 증발 가능성을 제한할 수 있도록, 하룻밤 이상 혼성화 시에는 **HYB** 플레이트에 가열 밀봉기를 사용할 것을 적극 권장합니다. 가열 밀봉기를 이용할 수 없는 경우, 접착 알루미늄 포장지 밀봉재로 **HYB** 플레이트를 밀봉하고 밀봉 롤러나 웹지로 완전하게 감싼 다음 온도가 40°C가 되었을 때 다음 단계로 진행합니다.

- 7 95°C로 예열된 96웰 가열 블록에 **HYB** 플레이트를 놓고, 덮개를 닫은 후 1분간 배양합니다.
 - 8 가열 블록 설정을 40°C로 줄이고 가열 블록이 40°C가 될 때까지(약 80분) 계속해서 배양합니다.
- 적절한 혼성화를 위해서는 점진적인 냉각이 매우 중요합니다. 따라서 이 과정에서는 능동 냉각식 PCR 열 순환기(예: Peltier, 열전 냉각식)를 권장하지 않습니다.



안전 중단점

가열 블록이 40°C가 된 후, **HYB** 플레이트는 최대 18시간 동안 40°C를 유지하며 안정됩니다. 가열 블록을 제거하기 전에 밀봉 롤러나 웹지를 사용하여 포장지 밀봉재를 덧입습니다.

비결합 oligonucleotide의 제거

준비

- 1 Extension-Ligation 믹스, 강한 세척 완충용액 및 범용 세척 완충용액을 실온에 맞춘 다음 짧은 시간 동안 교반합니다.
- 2 필터 플레이트 어셈블리 유닛(이후 **FPU**로 칭함)을 위에서 아래, 즉 덮개, 필터 플레이트, 어댑터 컬러, MIDI 플레이트 순서로 조립합니다.

- 3 필터 플레이트 막을 다음과 같이 사전 세척합니다.
 - a 50 μ l의 강한 세척 완충용액을 각 샘플과 NTC 웰에 추가합니다.
 - b 필터 플레이트에 덮개를 씌우고 20°C에서 2400 × g로 5분간 원심분리합니다.

**참고**

필터 플레이트의 모든 웰에서 완전히 배수가 되었는지 확실하게 확인합니다. 세척 완충용액이 완전하게 배수되지 않았다면, 20°C에서 2400 × g로 모든 액체가 사라질 때까지 다시 원심분리합니다(추가로 5~10분간).

**주의**

세척 단계 동안 원심분리 온도의 관리가 매우 중요합니다. 온도가 25°C 이상이면, 온도가 높을수록 프라이머 결합의 강도가 높아질 수 있습니다. 드물게는 샘플의 프라이머 결합 영역에 SNV가 있을 경우 높은 강도가 대립형질 탈락률로 이어질 수 있습니다.

절차

- 1 가열 블록에서 HYB 플레이트를 제거하고 20°C에서 1000 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 2 필터 플레이트의 상응하는 웰에 각 샘플의 전체 용량(약 55 μ l)을 옮깁니다.
- 3 필터 플레이트에 덮개를 씌우고 20°C에서 2400 × g로 5분간 원심분리합니다.
- 4 필터 플레이트를 다음과 같이 세척합니다.
 - a 50 μ l의 강한 세척 완충용액을 각 샘플과 NTC 웰에 추가합니다.
 - b 필터 플레이트에 덮개를 씌우고 20°C에서 2400 × g로 5분간 원심분리합니다.

**참고**

필터 플레이트의 모든 웰에서 완전히 배수가 되었는지 확실하게 확인합니다. 세척 완충용액이 완전하게 배수되지 않았다면, 20°C에서 2400 × g로 모든 액체가 사라질 때까지 다시 원심분리합니다(추가로 5~10분간).

- 5 이전 단계에서 설명된 세척을 반복합니다.
- 6 모든 통과액(포름아마이드)를 폐기한 다음 FPU를 재조립합니다.
- 7 45 μ l의 범용 세척 완충용액을 FPU의 각 샘플과 NTC 웰에 추가합니다.
- 8 필터 플레이트에 덮개를 씌우고 20°C에서 2400 × g로 5분간 원심분리합니다.

**참고**

필터 플레이트의 모든 웰에서 완전히 배수가 되었는지 확실하게 확인합니다. 세척 완충용액이 완전하게 배수되지 않았다면, 20°C에서 2400 × g로 모든 액체가 사라질 때까지 다시 원심분리합니다(추가로 5~10분간).

결합 oligonucleotide의 extension-ligation**절차**

- 1 각 샘플 및 필터 플레이트의 NTC 웰에 45 μ l의 Extension-Ligation 믹스를 추가합니다.
- 2 접착 알루미늄 포장지로 필터 플레이트를 밀봉한 다음 덮개를 씌웁니다.
- 3 예열된 37°C 배양기에 FPU를 45분 동안 회전 없이 배양합니다.
- 4 FPU 배양 동안 다음 섹션에 설명된 대로 AMP(증폭 플레이트)를 준비합니다.

PCR 증폭**준비**

- 1 새 0.05 N NaOH를 준비합니다.
- 2 LocalRun Manager에서 인쇄된 플레이트 레이아웃에 따라 사용할 인덱스 프라이머를 결정합니다.
- 3 PCR 마스터 믹스 및 적절한 인덱스 프라이머를 실온으로 맞춥니다. 각각의 해동된 튜브를 교반하여 혼합한 다음 짧은 시간 동안 튜브를 원심분리하여 액체를 수거합니다.
- 4 새 96웰 PCR 플레이트를 준비합니다(이후 AMP 플레이트로 칭함).
- 5 워크플로우에 따라 AMP 플레이트에 인덱스 프라이머를 추가합니다.

— 생식세포 워크플로우:

- 4 μ l의 선택된 인덱스 프라이머[A(A501)~H(A508)]를 AMP 플레이트 열의 적절한 웰에 추가합니다.
- 원래의 흰색 캡을 폐기하고 새로운 흰색 캡을 적용합니다.

- 4 μ l의 선택된 인덱스 프라이머[1(A701)~12(A712)]를 AMP 플레이트의 적절한 행에 추가합니다. **인덱스 교차 오염을 방지할 수 있도록 열마다 팁을 교체해야 합니다.**
 - 원래의 주황색 캡을 폐기하고 새로운 주황색 캡을 적용합니다.
 - **Somatic 워크플로우:**
 - 9 μ l의 선택된 인덱스 프라이머[A(A501)~H(A508)]를 AMP 플레이트 열의 적절한 웰에 추가합니다.
 - 원래의 흰색 캡을 폐기하고 새로운 흰색 캡을 적용합니다.
 - 9 μ l의 선택된 인덱스 프라이머[1(A701)~12(A712)]를 AMP 플레이트의 적절한 행에 추가합니다. **인덱스 교차 오염을 방지할 수 있도록 열마다 팁을 교체해야 합니다.**
 - 원래의 주황색 캡을 폐기하고 새로운 주황색 캡을 적용합니다.
- 6 다음과 같이 PCR 마스터 믹스/PCR 중합효소 PCR 작업용 용액을 준비합니다.
- a 96개의 라이브러리에서는 56 μ l의 PCR 중합효소를 2.8ml의 PCR 마스터 믹스에 추가합니다. PCR 마스터 믹스 대 PCR 중합효소의 비율에는 이미 무용 용량이 포함되어 있습니다.
 - b 준비된 PCR 작업용 용액을 20회 뒤집어서 혼합합니다.
 - c PCR 작업용 용액은 실온에서 10분간 안정적입니다.

절차

- 1 배양기에서 FPU를 제거합니다.
- 2 알루미늄 포장지 밀봉재를 제거합니다. 필터 플레이트에 덮개를 씌우고 20°C에서 2400 x g로 2분간 원심분리합니다.
- 3 각 샘플 및 필터 플레이트의 NTC 웰에 25 μ l의 0.05N NaOH를 추가합니다. NaOH를 위아래로 5~6회 파이펫팅합니다.
- 4 필터 플레이트를 덮고 실온에서 5분간 배양하여 라이브러리를 용출합니다.
- 5 필터 플레이트를 배양하는 동안, 인덱스 프라이머가 담긴 AMP 플레이트의 각 웰에 22 μ l의 PCR 작업용 용액을 옮깁니다.
- 6 필터에서 용출된 샘플을 다음과 같이 AMP 플레이트로 옮깁니다.
 - a 필터 막에 구멍이 나지 않도록 주의를 기울이며 20 μ l로 설정된 P20 파이펫을 사용하여 샘플을 부드럽게 위아래로 5~6회 파이펫팅합니다.
 - b 필터 플레이트에서 20 μ l를 AMP 플레이트의 해당 웰로 옮깁니다.
 - c 부드럽게 위아래로 5~6회 파이펫팅하여 DNA와 PCR 작업용 용액을 완전하게 결합시킵니다.
 - d 유사한 방식으로, 남은 반응 웰을 필터 플레이트에서 AMP 플레이트로 옮깁니다. **인덱스 및 샘플 교차 오염을 방지할 수 있도록 옮길 때마다 팁을 교체해야 합니다.**
- 7 롤러나 웹지로 AMP 플레이트를 밀봉하고 고정합니다.
- 8 20°C에서 1000 x g로 1분간 원심분리합니다.
- 9 AMP 플레이트를 증폭 후 영역으로 옮깁니다.
- 10 가열된 덮개를 장착한 상태로 다음의 열 순환기 프로그램을 사용하여 워크플로우에 따라 PCR을 수행합니다.
 - **생식세포 워크플로우:**
 - 95°C에서 3분
 - 이후 다음의 28 cycle:
 - 95°C에서 30초
 - 66°C에서 30초
 - 72°C에서 60초
 - 72°C에서 5분
 - 10°C에서 유지
 - **Somatic 워크플로우:**
 - 95°C에서 3분
 - 이후 다음의 32 cycle:
 - 95°C에서 30초
 - 66°C에서 30초
 - 72°C에서 60초
 - 72°C에서 5분
 - 10°C에서 유지



안전 중단점

곧바로 PCR 정리를 진행하지 않는 경우, AMP 플레이트를 열 순환기에서 하룻밤 동안, 2°C~8°C에서 최대 48시간 동안 또는 -25°C~-15°C에서 최대 1주일 동안 보관할 수 있습니다.

라이브러리 프렙 확인

절차

다음 단계를 수행하여 라이브러리 프렙을 확인하십시오.

생식세포 워크플로우:

생식세포 워크플로우에는 라이브러리 프렙 확인이 없습니다.

Somatic 워크플로우:

- 1 필요 시, 5µl의 증폭 산물을 15µl의 물 및 DNA 장착 염료와 결합합니다.
- 2 50~100bp 래더로 2~4% TBE 아가로스 겔을 실행하고 라이브러리 산물의 상태와 밝기를 확인합니다(산물 크기는 패널에 따라 다름).
 - 하나의 올리고 풀 또는 두 개의 올리고 풀에서 증폭을 보여주는 샘플은 유효한 것으로 간주되며 나머지 워크플로우에서 처리될 수 있습니다.
 - 하나의 올리고 풀 또는 두 개의 올리고 풀에서 증폭이 거의 또는 전혀 나타나지 않는 샘플은 유효하지 않은 것으로 간주되며 나머지 워크플로우에서 처리되어서는 안 됩니다.
 - 유효하지 않은 겔 결과가 관찰되면, 해당 샘플 또는 샘플들의 라이브러리 프렙을 [oligonucleotide 풀 혼성화 시작 시 \(Amp 전\)](#)에 반복해야 합니다.
 - 반복 실행에도 겔에서 밴드가 관찰되지 않으면, 샘플 품질 또는 올리고 패널 디자인을 점검하십시오.
 - 빈 NTC 샘플이 올리고 풀 A 및/또는 B의 증폭을 보여주는 경우, 이는 오염을 나타냅니다.

PCR 정리

준비

- 1 PCR 정리 비드를 실온으로 맞춥니다.
- 2 무수에탄올로 새 80% 에탄올을 준비합니다.

절차

- 1 AMP 플레이트를 20°C에서 1000 × g로 1분간 원심분리합니다.
- 2 새 MIDI 플레이트를 준비합니다(이후 CLP 플레이트로 칭함).
- 3 PCR 정리 비드를 10회 뒤집습니다. 강하게 교반한 다음 10회 더 뒤집습니다. 용액을 육안으로 검사하여 비드가 재부유되는지 확인합니다.



참고

PCR 정리 비드는 점성이 강하며 파이펫팅 시 추가적인 주의가 필요합니다. 과도한 시약 손실을 방지하려면, 비드 용량을 서서히 흡입하고 서서히 공급한 다음, 팁을 꺼내기 전에 파이펫 팁에서 모든 비드가 공급되었는지 육안으로 검사하십시오. 적절한 용량을 흡입한 다음, 파이펫 혼합이나 파이펫 팁의 습식 전처리 없이 공급하십시오.

- 4 PCR 정리 비드를 워크플로우에 따라 CLP 플레이트에 다음 단계대로 추가합니다.
 - **생식세포 워크플로우:**
 - 45µl의 PCR 정리 비드를 CLP 플레이트의 각 웰에 서서히 추가합니다.
 - AMP 플레이트의 전체 PCR 산물을 CLP 플레이트에 옮깁니다(약 50µl).
 - **Somatic 워크플로우:**
 - 55µl의 PCR 정리 비드를 CLP 플레이트의 각 웰에 서서히 추가합니다.
 - AMP 플레이트의 전체 PCR 산물을 CLP 플레이트에 옮깁니다(약 60µl).
- 5 CLP 플레이트를 밀봉하고 마이크로플레이트 셰이커에서 1800rpm의 속도로 2분 동안 흔듭니다.
- 6 흔들지 말고 10분간 실온에서 배양합니다.
- 7 2분 이상 또는 상청액이 투명해질 때까지 자성 스탠드에 플레이트를 둡니다.
- 8 CLP 플레이트를 자성 스탠드에 두고 조심스럽게 상청액을 제거하여 폐기합니다.

- 9 CLP 플레이트를 자성 스탠드에 두고 다음과 같이 비드를 세척합니다.
 - a 200 μ l의 새로 준비한 80% 에탄올을 각 샘플 웰에 추가합니다.
 - b 30초 이상 또는 상청액이 투명해질 때까지 자성 스탠드에 플레이트를 배양합니다.
 - c 상청액을 조심스럽게 제거하고 폐기합니다.
- 10 이전 단계에서 설명된 세척을 반복합니다.
- 11 20 μ l로 설정된 P20 다채널 파이펫을 사용하여 과잉의 에탄올을 제거합니다.
- 12 자성 스탠드에서 CLP 플레이트를 제거하고 5분간 비드를 자연 건조합니다.
- 13 30 μ l의 용출 완충용액을 조심스럽게 비드에 추가하고 짧은 시간 동안 교반합니다.



참고

용출 완충용액은 점성이 있으며 용량을 서서히 흡인 및 공급해야 합니다.

- 14 Microseal 'B'와 롤러 또는 웻지로 CLP 플레이트를 밀봉한 다음 마이크로플레이트 셰이커에서 1800rpm으로 5분간 처리합니다. 혼든 다음 샘플이 재부유되는지 확인합니다.
일부 웰에서 여전히 비드 펠릿이 보인다면, 30 μ l로 설정된 P200 파이펫을 사용하여 각각의 개별 피드 펠릿을 재부유합니다. 육안으로 팁을 검사하여 팁을 꺼내기 전에 비드가 웰에 다시 공급되었는지 확인합니다. CLP 플레이트를 재밀봉하고 마이크로플레이트 셰이커에서 1800rpm으로 추가로 5분간 처리합니다.
- 15 2분간 실온에서 배양합니다.
- 16 2분 이상 또는 상청액이 투명해질 때까지 자성 스탠드에 CLP 플레이트를 둡니다.
- 17 새 MIDI 플레이트를 준비합니다(이후 LNP 플레이트로 칭함).
- 18 20 μ l의 CLP 플레이트 상청액을 LNP 플레이트로 옮깁니다.
- 19 조심스럽게 20 μ l의 CLP 플레이트 상청액을 LNP 플레이트로 옮깁니다.
- 20 접착 플레이트 밀봉재로 LNP 플레이트를 밀봉한 다음 20°C에서 1000 x g로 1분간 원심분리하여 모든 상청액이 웰 바닥에 있는지 확인합니다.
- 21 [옵션] CLP 플레이트에 남은 상청액 중 10 μ l를 새로운 플레이트에 옮기고 실행 이름 및 날짜를 라벨로 표시합니다. 시퀀싱 실행 및 데이터 분석 완료 시까지 이 플레이트를 -25°C~-15°C에서 보관합니다.
정리된 PCR 산물은 샘플 실패 시 문제 해결 과정에서 사용할 수 있습니다.



안전 중단점

이 시점에서 중단할 경우 LNP 플레이트를 밀봉하고 20°C에서 1분간 1000 x g로 원심분리합니다. 플레이트는 2°C~8°C에서 최대 3시간 또는 -25°C~-15°C에서 최대 일주일 동안 안정적입니다.

라이브러리 노멀라이제이션

준비

- 1 새 0.1N NaOH를 준비합니다.
- 2 라이브러리 노멀라이제이션 희석용액, 라이브러리 비드, 라이브러리 노멀라이제이션 세척용액을 실온으로 맞춥니다.
- 3 라이브러리 보관용 완충용액을 실온 보관 상태에서 분리하여 별도로 보관합니다.
- 4 라이브러리 노멀라이제이션 희석용액을 강하게 교반하고 모든 침전물이 용해되었는지 확인합니다.
- 5 라이브러리 비드를 간간이 뒤집으면서 비드가 재부유되고 튜브를 뒤집었을 때 바닥에 펠릿이 나타나지 않을 때까지 1분간 강하게 교반합니다.

절차

- 1 라이브러리 노멀라이제이션 희석제 및 라이브러리 비드를 새 15ml의 원뿔형 튜브에 다음과 같이 혼합합니다(<24개의 샘플 처리 시 새 1.5ml 튜브 사용).
 - a 96개의 샘플에서는 4.4ml의 라이브러리 노멀라이제이션 희석제를 추가합니다.
 - b 라이브러리 비드 재부유: 라이브러리 비드를 간간이 뒤집으면서 1분간 강하게 교반합니다. 1000 μ l에 P1000 세트를 사용하여 서서히 위아래로 10회 이상 파이펫팅하는 방식으로, 튜브를 뒤집었을 때 튜브 바닥에 펠릿이 나타나지 않을 때까지 라이브러리 비드를 완전히 재부유합니다.

**주의**

튜브 바닥에서 라이브러리 비드 펠릿을 완전히 재부유하는 것이 매우 중요합니다. P1000을 사용하여 비드가 균질하게 재부유되고 튜브 바닥에 비드 덩어리가 없도록 보장합니다. 비드의 재부유는 플로우 셀의 일관된 클러스터 밀도를 달성하는 데 필수적입니다.

**주의**

라이브러리 비드는 점성이 강하며 파이펫팅 시 추가적인 주의가 필요합니다. 과도한 시약 손실을 방지하려면, 비드 용량을 서서히 흡입하고 서서히 공급한 다음, 팁을 꺼내기 전에 파이펫 팁에서 모든 비드가 공급되었는지 육안으로 검사하십시오.

- c 96개의 라이브러리에서는 800 μ l의 라이브러리 비드를 라이브러리 노멀라이제이션 희석제가 담긴 튜브에 파이펫팅합니다. 라이브러리의 수가 더 적은 경우 비율은 라이브러리당 7.2 μ l의 라이브러리 비드 대 37.8 μ l의 라이브러리 노멀라이제이션 희석제입니다. 파이펫팅 오류를 고려하여 무용 용량을 포함하십시오.
- d 튜브를 15~20회 뒤집으며 혼합하십시오.
- 2 45 μ l의 결합 라이브러리 노멀라이제이션 희석제/라이브러리 비드 작업용 용액을 라이브러리가 담긴 LNP 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- 3 Microseal 'B'와 롤러 또는 웻지로 LNP 플레이트를 밀봉한 다음 마이크로플레이트 셰이커에서 1800rpm으로 30분간 처리합니다.

**참고**

당일 시퀀싱을 진행한다면 이때가 시약 카트리지 해동을 시작하기에 좋은 시점입니다. 해당하는 기기의 포장 삽입지에 있는 시약 카트리지 해동 지침을 따르십시오.

- 4 2분 이상 또는 상청액이 투명해질 때까지 자성 스탠드에 플레이트를 둡니다.
- 5 LNP 플레이트가 자성 스탠드에 있는 동안, 밀봉을 제거한 다음 조심스럽게 상청액을 제거하여 폐기합니다.
- 6 자성 스탠드에서 LNP 플레이트를 제거하고 라이브러리 노멀라이제이션 세척용액으로 비드를 세척합니다.
 - a 45 μ l의 라이브러리 노멀라이제이션 세척용액을 LNP 플레이트의 비드에 추가합니다.
 - b Microseal 'B'와 롤러 또는 웻지로 LNP 플레이트를 밀봉한 다음 마이크로플레이트 셰이커에서 1800rpm으로 5분간 처리합니다.
 - c 2분간 또는 상청액이 투명해질 때까지 자성 스탠드에 LNP 플레이트를 둡니다.
 - d 모든 상청액을 제거하여 폐기합니다.
- 7 이전 단계에서 설명된 라이브러리 노멀라이제이션 세척 절차를 반복합니다.
- 8 접착 플레이트 밀봉재로 LNP 플레이트를 밀봉합니다.
- 9 LNP 플레이트를 20°C에서 1000 × g로 30초간 원심분리하여 잔류 세척 완충용액을 수거합니다.
- 10 자성 스탠드에 LNP 플레이트를 2분간 둡니다.
- 11 20 μ l로 설정된 P20 다채널 파이펫을 사용하여 과잉의 라이브러리 노멀라이제이션 세척용액을 조심스럽게 제거합니다. 비드를 건드리면 안 됩니다.
- 12 자성 스탠드에서 LNP 플레이트를 제거하고 각 웰에 30 μ l의 0.1N NaOH를 추가합니다.
- 13 Microseal 'B'와 롤러 또는 웻지로 LNP 플레이트를 밀봉한 다음 마이크로플레이트 셰이커에서 1800rpm으로 5분간 처리합니다.
- 14 5분의 용출 동안 새 96웰 PCR 플레이트를 준비합니다(이후 SGP 플레이트로 칭함).
- 15 SGP 플레이트에 사용할 각 웰에 30 μ l의 라이브러리 보관용 완충용액을 추가합니다.
- 16 5분의 용출 후 LNP 플레이트의 모든 비드가 재부유되었는지 확인합니다. 비드가 완전히 재부유되지 않으면 파이펫으로 웰을 위아래로 부드럽게 젓거나 작업대의 플레이트를 가볍게 두드려 비드를 재부유한 다음, 다시 5분간 흔듭니다.
- 17 자성 스탠드에 LNP 플레이트를 2분 이상 둡니다.
- 18 LNP 플레이트에서 SGP 플레이트로 상청액(약 30 μ l)을 서서히 옮깁니다. 파이펫을 이용하여 부드럽게 위아래로 5회 혼합합니다. 옮길 때마다 새로운 팁을 사용하십시오.
- 19 SGP 플레이트를 밀봉하고 20°C에서 1분간 1000 × g로 원심분리합니다. 곧바로 **라이브러리 풀링**을 진행합니다. LNP 플레이트를 폐기합니다.

라이브러리 시퀀싱 준비

준비

- 1.5ml 원심분리 튜브에 적합한 가열 블록을 96°C로 설정합니다.
- 얼음통에 얼음 수조를 준비합니다.
- 25°C~-15°C로 보관된 라이브러리 희석 완충용액과 PhiX 내부 대조군을 꺼내어 해동합니다.
- 해동 후, 라이브러리 희석 완충용액 및 PhiX 내부 대조군을 얼음 수조에서 냉각합니다.
- 라이브러리 희석 완충용액을 교반하고 짧은 시간 동안 원심분리한 다음 모든 침전물이 완전히 용해되었는지 확인합니다.

PhiX 내부 대조군 변성 및 희석

PhiX 내부 대조군은 10nM로 공급되고 단일 가닥 DNA로 변성 후 20pM로 희석하여 사용해야 합니다. 다음 지침은 변성된 20pM PhiX 내부 대조군의 1ml를 제공하며 이는 몇몇 DAL에 충분합니다(>20).

- 0.1N NaOH를 준비합니다.
- 튜브를 몇 차례 뒤집어서 혼합합니다.



주의

새로 희석한 NaOH의 사용은 시퀀서의 클러스터 생성을 위해 샘플을 완전히 변성하는 데 필수적입니다.



팁

PhiX가 라이브러리 노멀라이제이션과 같은 날에 준비된다면 0.1N NaOH의 동일한 저장물을 사용할 수 있습니다.

- 다음 용량을 결합하여 PhiX 내부 대조군 라이브러리를 2nM로 희석합니다.
 - 2µl의 10nM PhiX 내부 대조군 라이브러리
 - 8µl의 1X TE 완충용액
- 다음 용량을 결합하여 1nM PhiX 내부 대조군 라이브러리를 준비합니다.
 - 10µl의 2nM PhiX 내부 대조군 라이브러리
 - 10µl의 0.1N NaOH
- 짧은 시간 동안 교반하여 1nM PhiX 내부 대조군 라이브러리 용액을 혼합합니다.
- 짧은 시간 동안 1nM PhiX 내부 대조군 라이브러리 용액을 원심분리하여 함유물을 수집합니다.
- 5분 동안 실온 배양하여 PhiX 내부 대조군 라이브러리 용액을 DNA 단일 가닥으로 변성합니다.
- 변성된 PhiX 내부 대조군 라이브러리가 포함된 튜브에 예냉된 라이브러리 희석 완충용액 980µl를 추가합니다. 최종 농도는 20pM 변성 PhiX 내부 대조군 라이브러리입니다.



팁

변성된 20pM PhiX 내부 대조군 라이브러리는 일회 사용 분취량으로 -25°C~-15°C에서 3주까지 보관할 수 있습니다.

라이브러리 풀링

- 라이브러리 희석 완충용액을 교반하고 모든 침전물이 완전히 용해되었는지 확인합니다.
- 짧은 시간 동안 원심분리하여 함유물을 수집합니다.
- 새 나사식 마개 튜브를 준비합니다(이후 PAL[Pooled Amplicon Library, 풀링된 앰프리콘 라이브러리] 튜브라고 칭함).
- 시퀀싱에 풀링할 샘플을 결정합니다. 시퀀싱을 위해 최대 96개의 라이브러리를 풀링할 수 있습니다.
- SGP 플레이트에서 밀봉을 제거합니다. SGP 플레이트에서 시퀀싱할 각 라이브러리의 10µl를 PCR 8튜브 스트립으로, 매번 팁을 교체해 가면서 옮깁니다.
- 접착 플레이트 밀봉재로 SGP 플레이트를 재밀봉하고 -25°C~-15°C에서 최대 48시간 동안 보관합니다.



팁

최초 시퀀싱 커버리지가 불충분할 때 SGP 플레이트를 샘플이 더 적은 풀에 사용할 수 있습니다.

- PCR 8튜브 스트립의 함유물을 결합하여 PAL 튜브로 옮깁니다. PAL 튜브를 완전하게 혼합합니다.
- 3개의 새 나사식 마개 튜브(이후 DAL[Diluted Amplicon Library, 희석된 앰프리콘 라이브러리] 튜브라고 칭함)를 준비합니다.
- 585µl의 라이브러리 희석 완충용액을 DAL 튜브에 추가합니다.

- 10 라이브러리 희석 완충용액이 든 각각의 DAL 튜브에 5µl의 변성된 PhiX(20pM)를 옮깁니다. 위아래로 3~5회 파이펫팅하여 팁을 씻어 내고 옮기기가 완료되었는지 확인합니다.
- 11 10µl의 PAL을 각 DAL 튜브에 옮깁니다. 위아래로 3~5회 파이펫팅하여 팁을 씻어 내고 옮기기가 완료되었는지 확인합니다.
- 12 짧은 시간 동안 DAL 튜브를 교반한 다음 짧은 시간 동안 DAL 튜브를 원심분리하여 액체를 수거합니다.



팁
키트 사용에 따라, 각각의 시퀀싱 기기에 Illumina 시퀀싱 소모품 키트의 추가 라이브러리 희석 완충용액이 필요할 수 있습니다.



안전 중단점
곧바로 시퀀싱으로 진행하지 않는 경우, DAL 튜브는 -25°C~-15°C에서 최대 84일까지 보관할 수 있습니다.

MiSeqDx를 사용하여 시퀀싱 준비

- 1 시퀀싱을 위해 하나의 DAL 튜브로 진행합니다.
- 2 DAL 튜브가 냉동 보관되었다면, 완전히 해동합니다.
- 3 튜브를 최대 속도로 교반하여 DAL 튜브를 혼합합니다.
- 4 짧은 시간 동안 DAL 튜브를 원심분리합니다.
- 5 DAL 튜브를 가열 블록에서 96°C로 2분간 배양합니다.
- 6 배양 후, DAL 튜브를 1~2회 뒤집은 다음, 곧바로 얼음 수조에 넣습니다.
- 7 DAL 튜브를 얼음 수조에 5분간 보관합니다.



주의
시퀀싱 플로우 셀에서 효율적인 템플릿 장착을 보장할 수 있도록 DAL 튜브를 시약 카트리지에 장착하기 직전에 가열 변성을 수행합니다.

시약 카트리지 준비, 시약 카트리지에 샘플 라이브러리 장착 및 시퀀싱 실행 설정은 *MiSeqDx* 기기 포장 삽입지를 참조하십시오.

NextSeq 550Dx를 사용하여 시퀀싱 준비

- 1 시퀀싱을 위해 하나의 DAL 튜브로 진행합니다.
- 2 새 나사식 마개 튜브를 준비합니다(이후 FDT[최종 희석 튜브]라고 칭함).
- 3 DAL 튜브가 냉동 보관되었다면, 완전히 해동합니다.
- 4 튜브를 최대 속도로 교반하여 DAL 튜브를 혼합합니다.
- 5 짧은 시간 동안 DAL 튜브를 원심분리합니다.
- 6 DAL의 분취량을 FDT로 옮깁니다. 적절한 클러스터 밀도를 달성하는 데 필요한 DAL 용량은 사용하는 올리고 풀에 따라 다르며 일반적으로 130~160µl 범위입니다.
- 7 라이브러리 희석 완충용액으로 FDT를 1300µl의 총 용량에 맞춥니다.
- 8 튜브를 최대 속도로 교반하여 FDT 튜브를 혼합합니다.
- 9 짧은 시간 동안 FDT 튜브를 원심분리합니다.
- 10 FDT 튜브를 가열 블록에서 96°C로 2분간 배양합니다.
- 11 배양 후, FDT 튜브를 1~2회 뒤집은 다음, 곧바로 얼음 수조에 넣습니다.
- 12 FDT 튜브를 얼음 수조에 5분간 보관합니다.



주의
시퀀싱 플로우 셀에서 효율적인 템플릿 장착을 보장할 수 있도록 FDT 튜브를 시약 카트리지에 장착하기 직전에 가열 변성을 수행합니다.

시약 카트리지 준비, 시약 카트리지에 샘플 라이브러리 장착 및 시퀀싱 실행 설정은 *NextSeq 550Dx* 기기 포장 삽입지를 참조하십시오.

품질 관리 절차

실험실 관리 기준(Good Laboratory Practices)은 모든 라이브러리 프랩 사용 시 양성 대조군 DNA 샘플과 음성(템플릿 없음) 대조군 샘플을 포함하는 것을 의무로 규정합니다. 양성 대조군 DNA 샘플은 관심 영역에 알려진 변이가 있는 잘 특성화된 샘플이어야 합니다.

somatic 워크플로우의 경우, 위에서 설명한 대로 모든 라이브러리(대조군 라이브러리 포함)를 겔 전기영동으로 검사합니다.

성능 특성

생식세포 연구에서는 라이브러리 프랩에 MiSeqDx™ Universal Kit 1.0(DNA 추출 및 간섭 물질) 또는 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx(DNA input)가 사용되었습니다. 2개의 키트는 동일한 시약을 사용하며 유일한 워크플로우 차이는 중합효소 연쇄반응(PCR) cycle 수(각각 28, 32)입니다. PCR cycle의 증가로 MiSeqDx Universal Kit 1.0(250ng)에 비해 상대적으로 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트Dx(50ng)의 더 낮은 DNA input이 가능해졌으며, 이는 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx를 사용한 DNA input 연구에서 입증된 바와 같습니다. 각 연구에서 사용된 라이브러리 프랩 시약 및 시퀀싱 소모품이 명시되었으나, 모든 연구는 Universal Kit 1.0과의 동등성으로 인한 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx의 성능 특성을 반영합니다.

TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx가 사용된 Somatic 연구.

MiSeqDx Universal Kit 1.0으로 준비된 라이브러리는 성능 리드아웃으로 Illumina 버전 1 시퀀싱 소모품을 사용했지만 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx는 버전 3 시퀀싱 소모품을 리드아웃으로 사용했습니다. 시퀀싱은 MiSeqDx 기기에서 수행되었습니다. 대표 돌연변이 패널로 두 개의 유전자 또는 하나의 유전자 패널을 사용한 연구에서는 검사별 워크플로우 및 분석 모듈을 사용했습니다.

성능 특성에 사용된 계산의 정의

- 양의 백분율 일치(PPA)는 reference 방법에 따라 검사에서 올바르게 보고되고 변이로 분류된 유전 좌위의 비율로 계산됩니다.
 - (검사에서 올바르게 보고된 변이 좌위의 수) / (변이 유전 좌위의 총 수)
 - 검사에서 reference 방법과 일치하는 것으로 보고된 변이 유전 좌위는 진양성(TP)입니다. 검사에서 reference 호출 또는 다른 변이 호출로 보고된 변이 유전 좌위는 위음성(FN)입니다.
- 음의 백분율 일치(NPA)는 reference 방법에 따라 검사에서 올바르게 보고되고 야생형으로 분류된 유전 좌위의 비율로 계산됩니다.
 - (검사에서 올바르게 보고된 야생형 좌위 수) / (야생형 유전 좌위의 총 수)
 - 검사에서 reference 방법과 일치하는 것으로 보고된 야생형 유전 좌위는 진음성(TN)입니다. 검사에서 변이로 보고된 야생형 유전 좌위는 위양성(FP)입니다.
- 전체 백분율 일치(OPA)는 검사에서 reference 방법과 상대적인 것으로 올바르게 보고된 유전 좌위의 비율로 계산됩니다.
 - $((\text{검사에서 올바르게 보고된 변이 유전 좌위의 수}) + (\text{검사에서 올바르게 보고된 야생형 유전 좌위의 수})) / ((\text{변이 유전 좌위의 총 수}) + (\text{야생형 유전 좌위의 총 수}))$
- PPA, NPA 및 OPA의 계산에는 무호출(하나 이상의 품질 필터를 충족하지 않는 변이 또는 reference 유전 좌위)이 포함되지 않습니다. 두 연구에서 구체적으로 무호출이 "% 정상 호출" 매트릭에 포함되어 있으며, 무호출을 포함하는 이러한 내용이 해당 표에 명시되어 있습니다.
- 호출 비율은 필터를 통과한 유전 좌위의 총 수를 시퀀싱을 수행하거나 보고 가능한 위치의 총 수로 나누어 계산됩니다. 이 매트릭은 reference 방법으로 호출의 일치를 고려하지 않습니다.

샘플 캐리오버

생식세포와 somatic 워크플로우 모두 다수 샘플에 대조군을 추가하여 한 번에 전체를 처리하는 라이브러리 프랩 및 시퀀싱을 포함합니다. 샘플 캐리오버 연구는 라이브러리 프랩 사용 동안 웰 간 오염 또는 연속 시퀀싱 실행 사이의 실행 간 오염의 캐리오버로 인해서 위양성 결과가 테스트 결과에 영향을 미치는지를 평가하기 위해서 수행되었습니다. 생식세포 변이보다 더 낮은 대립형질 빈도로 감지가 가능한 somatic variant를 사용했습니다.

샘플은 세포주의 4개의 게놈 DNA 샘플로 구성되었으며 각각은 두 개의 유전자 패널에서 다른 패널 돌연변이를 포함했습니다. 샘플은 하나의 위치에 있는 돌연변이가 다른 하나에 reference(야생형) 시퀀스를 갖도록 준비되었습니다.

웰 간 캐리오버는 잠재적으로 수동 처리 단계(파이펫팅, 샘플 혼합 등)에 의해서 생성되는 실패 모드로 정의되었습니다. 하나의 샘플 웰에서 다른 웰로의 캐리오버를 평가하기 위해 2회의 테스트 실행이 수행되었습니다.

- 유전자 2의 돌연변이가 포함된 저 input 게놈 DNA의 샘플을 대체하는 유전자 1의 돌연변이가 포함된 고 input 게놈 DNA 샘플의 체커보드 레이아웃.

- 유전자 1의 돌연변이가 포함된 저 input 게놈 DNA의 샘플을 대체하는 유전자 2의 돌연변이가 포함된 고 input 게놈 DNA 샘플의 체커보드 레이아웃.

각 실행에서, 총 12개의 복제물이 위양성에 대해 평가되었습니다(즉, 유전자 2 돌연변이 샘플로 지정된 웰에서 유전자 1 돌연변이를 보고함 또는 그 반대의 경우도 동일).

실행 간 캐리오버는 이전 시퀀싱 실행의 잔류물에서 생성될 가능성이 있는 실패 모드로 정의됩니다. 시퀀싱 실행 간 캐리 오버가 있는지 판단하기 위해, 고 input 게놈 DNA에 빈 샘플을 더한 단일 고유 샘플의 11개 복제물을 포함하여 2개의 플레이 트를 준비했고 MiSeqDx 기기에서 연속해서 시퀀싱한 후 위양성 평가가 수행되었습니다. 첫 실행에는 유전자 2 돌연변이 샘플에 1개의 빈 샘플을 더하여 11개의 복제물이 포함되었습니다. 두 번째 실행에는 유전자 1 돌연변이 샘플에 1개의 빈 샘플을 더하여 11개의 복제물이 포함되었습니다. 유전자 2 돌연변이 샘플 라이브러리가 먼저 시퀀싱되었고 다음으로 유전자 1 돌연변이 샘플 라이브러리로 후속 시퀀싱이 실행되었으며 이후 유전자 2 돌연변이 샘플 라이브러리의 또 다른 반복 시퀀싱이 이어졌습니다. 유전자 1 돌연변이만의 실행에서 유전자 2 돌연변이가 관찰되거나 그 반대의 경우, 이러한 관찰은 캐리 오버를 나타낼 것입니다.

웰 간 캐리오버로 인한 0의 위양성(0/24, 0%)이 보고되었습니다. 모든 예상 돌연변이가 감지되었습니다. 실행 간 캐리오버로 인한 0의 위양성(0/24, 0%)이 보고되었습니다. 모든 예상 돌연변이가 감지되었습니다. 총 캐리오버(웰 간 및 실행 간 캐리 오버 통합)로 인한 0의 위양성(0/48, 0%)이 보고되었습니다.

생식세포 성능 특성

DNA input 연구에서는 23개의 염색체 패널을 대표적인 돌연변이 패널로 사용했습니다. 다른 연구에서는 단일 유전자 패널을 대표적인 돌연변이 패널로 사용했습니다.

DNA 추출

K₂EDTA 항응고 전혈을 사용하여 세 가지 다른 추출 방법(자석 비드 추출, 알코올 침전 및 실리카 필터 열 격리)이 평가되었습니다. 라이브러리 프렙은 MiSeqDx Universal Kit 1.0을 사용하여 완료되었습니다. 연구에서는 하나의 유전자 패널로부터 다양한 유전자형을 나타내는 14개의 고유한 혈액 샘플이 사용되었습니다. 2명의 다른 작업자가 추출 방법당 3건의 시퀀싱 실행을 수행하면서 3개의 DNA 추출 방법을 독립적으로 테스트했습니다. 각 추출은 다른 날짜에 각 작업자에 의해서 수행되었습니다. DNA 농도 및 추출된 gDNA 샘플의 A260/A280 비율은 분광법을 사용하여 측정했습니다. 이 연구의 각 추출 방법에 대한 총 샘플 크기는 168(14개 샘플 x 2명의 작업자/추출 방법 x 3회 실행/작업자 x 2 반복 시료/추출된 gDNA 샘플)이었습니다. 각 방법의 결과가 표 11에 제시되었습니다.

표 11 추출 방법별 정확도, 호출 비율 및 샘플 초회 통과 비율

추출 방법	테스트 샘플 수	호출 비율	정확도 ¹	샘플 초회 통과 비율 ²
알코올 침전	168	100%	100%	100%
실리카 필터 열 격리	168	100%	100%	100%
자석 비드 추출	168	100%	100%	100%

¹정확도 - 베이스 콜을 받는 염기 위치에 대해 계산된 Reference 테스트 방법의 백분율 일치(Sanger 양방향 시퀀싱).

²샘플 초회 통과 비율 - 처리되는 첫 시점에(즉, 재실행 또는 추가 실행의 필요 없이) 지정된 호출 비율을 충족하는 샘플의 수를 단일 MiSeqDx 시퀀싱 실험 동안 실행된 총 샘플 수의 백분율로 표시.

DNA input

23개의 다른 염색체에서 12,588개의 염기를 포괄하는 다양한 유전자를 조회하도록 디자인된 대표적인 검사와 13개의 DNA 샘플을 사용하여 일련의 희석 연구를 수행하고 라이브러리 프렙의 DNA input 범위(TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx)를 평가했습니다. MiSeqDx 시약 키트 v3가 시퀀싱 리드아웃으로 사용되었습니다.

250ng~12ng(250ng, 100ng, 50ng, 25ng 및 12ng) 범위로 5개의 DNA input 수준에서 각 샘플을 중복 테스트했습니다. 정확도의 측정을 위해 샘플 유전자형을 플래티넘 게놈 버전 2016-01과 비교했습니다. 각 input 레벨의 결과를 측정했습니다. 각 변이 유형에 대한 PPA(deletion, insertion 및 SNV)가 표 12에 제시되었습니다. NPA는 표 13에 제시되었습니다. 모든 input 수준에서 유사한 정확도가 나타났습니다. 권장 DNA input은 50ng이며 25ng 및 100ng은 정확도 요건을 충족하는 하한 및 상한을 제공했습니다.

표 12 변이 유형별 각 DNA Input의 PPA 결과

DNA Input (ng)	변이 유형	예상 변이	총 TP	총 FN	변이 무호출	PPA(%)
12	Deletion	552	534	3	15	99.4
25			541	0	11	100
50			542	0	10	100
100			542	0	10	100
250			542	0	10	100
12	Insertion	588	569	0	19	100
25			572	0	16	100
50			572	0	16	100
100			572	0	16	100
250			572	0	16	100
12	SNV	1752	1725	2	25	99.9
25			1739	3	10	99.8
50			1742	0	10	100
100			1740	0	12	100
250			1735	0	17	100

표 13 각 DNA Input의 NPA

DNA Input (ng)	예상 변이	TN	FP	Ref 무호출	NPA(%)
12	2892	307179	0	3935	100
25	2892	309767	0	1347	100
50	2892	309999	0	1115	100
100	2892	309754	0	1360	100
250	2892	308922	0	2192	100

간섭 물질

라이브리 프랩에 대한 간섭 물질의 영향을 평가하기 위해, 11,529개의 염기를 포괄하는 단일 유전자를 조희하도록 설계된 대표적인 검사가 잠재적인 간섭물의 존재 및 부재 상황에서 평가되었습니다. 라이브리 프랩은 UniversalKit 1.0을 사용하여 완료되었습니다. 연구에서는 8개의 고유 유전자형을 나타내는 8개의 전혈 샘플이 사용되었습니다. DNA를 추출하기 전에 혈액 표본에 스파이크하는 방식으로 네 개의 내재성 간섭 물질(빌리루빈, 콜레스테롤, 헤모글로빈, 트리글리세라이드)을 테스트했습니다. 혈액 채취(짧은 채취)로 인한 간섭을 평가하기 위해, EDTA를 2개 농도의 혈액 샘플에 스파이크했습니다. 각 물질의 농도 한도는 표 14에 표시되었습니다. 또한, 샘플 프랩으로 인한 간섭을 평가하기 위해 15% 세척 완충용액을 8개의 정제된 게놈 DNA에 추가했습니다. 하나의 유전자 패널을 사용했습니다. 간섭 물질의 존재 및 부재 상황에서 샘플 간 유전자형 호출 시의 100% 재현성에 추가로, 검사한 모든 샘플에 대해서 100% 호출 비율을 달성했습니다.

표 14 각 검사 물질에 대한 호출 비율

검사 물질	총 복제물 수	혈액 내 검사 농도 (상한)	혈액 내 검사 농도 (하한)	호출 비율
빌리루빈	16	684 μ mol/L	137 μ mol/L	100%
콜레스테롤	16	13mmol/L	2.6mmol/L	100%
헤모글로빈	16	2g/L	0.4g/L	100%
트리글리세라이드	16	37mmol/L	7.4mmol/L	100%
EDTA	16	7mg/mL	2.8mg/mL	100%

somatic 성능 특성

DNAinput 연구에서는 26개의 유전자 패널을 대표적인 돌연변이 패널로 사용했습니다. 다른 연구에서는 2개의 유전자 패널을 대표적인 돌연변이 패널로 사용했습니다.

DNA input

TruSeq 사용자지정 엠프리콘 Dx - FFPE QC를 사용하여 9개의 다른 조직으로 구성된 FFPE 표본에서 추출된 DNA 샘플의 세트를 평가했습니다. FFPE QC마다, 각 샘플에 대해 Cq 값이 측정되었고 대조군과 비교를 통해 -1.2~6.4 범위의 Δ Cq 값이 계산되었습니다. 샘플은 1:8, 1:4, 1:2로 희석되거나 키트 지침에 따라 neat로 처리되었습니다. 일부 샘플은 Δ Cq 값 증가를 위해 추가로 희석(1:64까지)되었습니다. 또한, 1:8 희석에서 Δ Cq 값이 호출된 두 개의 샘플이 권장 수준보다 높은 input의 테스트를 위해 희석 없이 처리되었습니다. 모든 희석은 라이브러리 프랩을 통해서 처리되고 시퀀싱되었습니다. somatic variant 모듈의 변이 호출이 조직 유형에 따라 특이적 유전자 표적에 대해 수행된 양방향 Sanger 시퀀싱과 비교되었습니다. 희석은 네 가지 Δ Cq 범위 중 하나에 그룹화되었고 정확도 및 무호출에 대해서 분석되었습니다(표 15). input의 상한은 키트 지침에 따라 2의 $<\Delta$ Cq인 input의 샘플을 반복적으로 희석하여 달성한 2의 Δ Cq입니다. input의 하한은 4의 Δ Cq입니다. 2~4의 Δ Cq 값은 동등한 정확도를 달성합니다. Δ Cq를 사용하여 FFPE 샘플을 평가하는 검사는 원하는 정확도 및 정밀도를 달성하는 데 필요한 절단을 측정해야 합니다.

표 15 Δ Cq 그룹별 정확도 및 무호출

Δ Cq 그룹	변이				야생형 위치				
	예상	TP	FN	무호출	PPA	TN	FP	무호출	NPA
Δ Cqs -1.2 및 -0.8	1	1	0	0	100	1387	1	0	99.9
Δ Cqs 1.5~4	19	18	0	1	100	14358	1	78	99.9
Δ Cqs ~4	19	18	0	1	100	14333	1	103	99.9
Δ Cqs ~5	22	20	2	0	90.9	15878	1	439	99.9

추출

상용으로 이용할 수 있는 3개의 추출 키트의 라이브러리 프랩 성능에 대한 영향을 평가하기 위해서 추출 방법 연구가 수행되었습니다. 키트에서 사용된 추출의 기반은 열이었고 탈파라핀용 시약과 FFPE 조직에 특이적인 포르말린 교차 결합을 부분적으로 뒤바꾸는 시약이 포함되었습니다. 방법은 단백질분해효소 K의 양을 배가하고 교반 없이 하룻밤을 배양하는 방식으로 수정되었습니다. 해당 키트의 최저 권장 용량 또는 최소 30 μ 에서 DNA가 용출되었습니다. 각 추출 키트마다 10개의 샘플을 중복 테스트했습니다. 각 키트로 테스트한 모든 복제물(20/20)이 검사 품질 관리 기준을 충족했습니다. 2개의 유전자 대표 검사가 사용되었습니다. 각 키트에서 PPA는 100%(16/16)였고 NPA는 100%(1104/1104)였습니다. reference 방법으로 Sanger 시퀀싱이 사용되었습니다.

간섭 물질

라이브리 프렘의 성능에 대한 잠재적인 간섭 물질의 영향을 평가하기 위해 간섭 물질 연구가 수행되었습니다. 내재성 물질(괴사 조직 및 헤모글로빈) 및 외인성 물질(파라핀 왁스, 크실렌, 에탄올, 단백질분해효소 K, 추출 용액)이 존재하는 상황에서 검사 성능이 평가되었습니다.

외인성 물질

검사한 외인성 물질은 DNA 추출 과정에서 일반적으로 사용되는 추출 용액이며 표 16에 검사한 수량과 함께 기재되어 있습니다. 간섭 물질당 열다섯(15)개의 결장직장 FFPE 표본을 검사하여 미처리 대조군과 비교했습니다. 표본은 유전자 1 패널 돌연변이를 포함하지 않는 야생형 샘플(5/15개의 표본)과 일반적인 돌연변이를 포함하는 표본(10/15개의 표본)을 대표했습니다. 표본은 실행당 10개 샘플에 대조군을 추가한 최대 multiplexing 수준에서 시퀀싱되었습니다.

표 16 검사 물질

간섭 물질	실제 양[$\mu\text{l}/25\mu\text{l}$ 용출]
탈파라핀 용액	1.69×10^{-04}
파라핀 왁스(크실렌 내)	2.50×10^{-05}
크실렌	2.50×10^{-05}
에탄올	1.69×10^{-04}
단백질분해효소 K ¹	3.30×10^{-06}
세척액 ²	6.25×10^{-01}
1X 세척액 ³	6.25×10^{-01}
세척 완충용액 AW1 ¹	6.25×10^{-02}
세척 완충용액 AW2 ¹	6.25×10^{-01}

¹⁻³시중에서 이용할 수 있는 3개의 열 기반 DNA 분리 키트입니다.

검사한 모든 외인성 물질에서, 전체 15개의 표본이 샘플 적합성 요건을 통과했으며(15/15, 100% 샘플 QC 통과율) 라이브리 프렘 및 시퀀싱 후 유효한 결과를 나타냈습니다(15/15, 100% 샘플 초회 통과율).

PPA는 샘플당 기준으로 계산됩니다. OPA 및 NPA는 DNA 수준의 돌연변이당 기준으로 계산됩니다. DNA 수준에서 샘플당 56개의 돌연변이가 있습니다. 9개의 모든 외인성 물질에 대한 15개의 모든 표본이 모든 돌연변이(10/10) 및 비돌연변이 위치(830/830)에서 미처리 대조군 상태와 일치로 나타났습니다. FFPE 조직으로부터 게놈 DNA(gDNA)를 추출하는 과정에서 발생할 것으로 예상되었고 최대 농도에서 평가된 잠재적 간섭 물질 모두 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx의 성능에 영향을 주지 않았습니다.

내재성 물질(헤모글로빈)

CLSI "고량" 헤모글로빈인 2mg/mL의 헤모글로빈이 존재하거나 부재한 상태로 열다섯(15) 개의 결장직장 FFPE 샘플을 각각 검사했습니다. 표본은 대표적인 패널 돌연변이를 포함하지 않는 야생형 샘플(5/15개의 표본)과 일반적이고 대표적인 패널 돌연변이를 포함하는 샘플(10/15개의 표본)을 대표했습니다. 표본은 실행당 10개 샘플에 대조군을 추가한 최대 multiplexing 수준에서 시퀀싱되었습니다. 전체 15개의 표본이 샘플 적합성 요건을 통과했으며(15/15, 100% 샘플 QC 통과율) 라이브리 프렘 및 시퀀싱 후 유효한 결과를 나타냈습니다(15/15, 100% 샘플 초회 통과율). 15개의 모든 표본이 모든 돌연변이(10/10) 및 비돌연변이 위치(830/830)에서 미처리 대조군 상태와 일치로 나타났습니다. 검사한 헤모글로빈 농도는 TruSeq 사용자지정 앰프리콘 키트 Dx의 성능에 영향을 주지 않습니다.

내재성 물질(괴사)

패널 돌연변이를 포함하지 않는 야생형 샘플로 구성된 열다섯(15)개의 결장직장 FFPE 샘플(10/15개의 표본)과 일반적이고 대표적인 패널 돌연변이를 포함하는 샘플(5/15개의 표본) 및 병리학적 소견에 따라 10~80% 괴사 상태로 판단되는 조직을

활용하여 내재성 괴사 표본을 평가했습니다. 표본은 실행당 10개 샘플에 대조군을 추가한 최대 multiplexing 수준에서 시퀀싱되었습니다. 라이브러리 프렙 및 시퀀싱 후 14/15개의 표본에서 유효한 결과가 도출되었습니다(93.3% 샘플 초회 통과 비율). Sanger 시퀀싱과 관련한 전체 백분율 일치는 99.9%(783/784)였습니다. PPA는 100%(4/4)였고 NPA는 99.87%(779/780)였습니다. 감지된 1개의 위양성은 Sanger 시퀀싱의 감지 한도 미만의 샘플 돌연변이 빈도 때문일 수 있었습니다. 전체적으로, TruSeq 사용자지정 엠프리콘 키트 Dx는 10~80% 괴사가 포함된 조직에서 성능 특성을 충족합니다.

특허 및 상표

이 문서와 이 문서에 수록된 내용은 Illumina, Inc. 및 그 자회사("Illumina")의 재산으로, 여기에 설명된 제품의 사용과 관련하여 전적으로 계약상 보증된 고객만을 위해 사용할 수 있으며 그 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다. 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 관습법상의 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 여기에 설명된 제품(그 부품 또는 소프트웨어 포함)을 잘못 사용하여 발생하는 일에 대해 어떠한 책임도 지지 않습니다.

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

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

AMPure, Beckman 및 Beckman Coulter는 Beckman Coulter, Inc.의 상표 또는 등록 상표입니다.

연락처



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 미국
+1.800.809.ILMN(4566)
+1.858.202.4566(북미 이외 지역)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
네덜란드



호주 후원사:
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
호주

제품 라벨

제품 포장 및 라벨에 표시되는 기호의 전체 Reference 정보는 support.illumina.com의 해당 키트 설명서 및 문헌 탭에 있는 기호 키를 참고하십시오.