

MiniSeq System

Denature and Dilute Libraries Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

문서 번호: 1000000002697 v09 KOR

2021년 4월

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

이 문서와 이 문서에 기술된 내용은 Illumina, Inc. 및 그 계열사(통칭 "Illumina")의 소유이며, 이 문서에 명시된 제품의 사용과 관련하여 오직 고객의 계약상의 제품 사용만을 위해 제공되므로 그 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다. 이 문서와 이 문서에 기술된 내용은 Illumina의 사전 서면 동의 없이 어떤 방식으로든 다른 목적으로 사용하거나 배포할 수 없으며, 전달, 공개 또는 복제할 수 없습니다. Illumina는 이 문서를 통해 특허, 상표, 저작권 또는 관습법상의 권리 혹은 타사의 유사한 권리에 따라 어떠한 라이선스도 양도하지 않습니다.

이 문서에 명시된 제품의 올바르게 안전한 사용을 보장하기 위해 이 문서의 지침은 반드시 적절한 교육을 받고 자격을 갖춘 관계자가 엄격하고 정확하게 준수해야 합니다. 제품 사용 전 이 문서의 모든 내용을 완전히 읽고 숙지해야 합니다.

이 문서에 포함된 모든 지침을 완전히 읽지 않거나 정확하게 따르지 않으면 제품 손상, 사용자나 타인의 부상, 기타 재산 피해가 발생할 수 있으며, 이 경우 제품에 적용되는 모든 보증은 무효화됩니다.

Illumina는 이 문서에 명시된 제품(해당 제품의 부품 또는 소프트웨어 포함)의 부적절한 사용에서 비롯된 문제에 대해 어떠한 책임도 지지 않습니다.

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

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

개정 이력

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 1000000002697 v09	2021년 4월	로딩 농도에 관한 명확한 정보와 Standard Kit 및 Rapid Kit에 관한 정보를 포함하도록 업데이트.
문서 번호: 1000000002697 v08	2020년 9월	Rapid Kit를 포함하도록 로딩 농도 정보 업데이트.
문서 번호: 1000000002697 v07	2019년 2월	Protocol C의 권장 최종 로딩 농도 표를 하나의 권장 농도 범위로 대체.
문서 번호: 1000000002697 v06	2018년 11월	Protocol D의 AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 수정.
문서 번호: 1000000002697 V05	2018년 11월	Protocol C의 AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 수정. AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Research Assay Panel 풀링 비율 추가.
문서 번호: 1000000002697 v04	2018년 10월	AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비한 라이브러리의 변성 및 희석을 위한 Protocol D 추가.
문서 번호: 1000000002697 v03	2018년 7월	AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel 풀링 비율 추가.
문서 번호: 1000000002697 v02	2018년 5월	Protocol C에서 PhiX 사용 관련 주의 문구 삭제.

문서	날짜	개정 내용
문서 번호: 1000000002697 v01	2018년 4월	AmpliSeq for Illumina Panel 제품군의 변성과 희석을 위한 Protocol C 추가.
문서 번호: 1000000002697 v00	2016년 1월	최초 발행.

목차

개정 이력	iii
개요	1
로딩 볼륨 및 농도	1
프로토콜의 종류	1
모범 사례	1
소모품 및 장비	2
소모품	2
장비	2
Protocol A: Standard Normalization	3
시약 준비	3
표준화된 라이브러리 풀 생성	3
라이브러리 1 nM로 희석	4
라이브러리 변성	4
라이브러리 로딩 농도로 희석	5
Protocol B: Bead-Based Normalization	5
HT1 준비	5
인큐베이터 준비	6
라이브러리 로딩 농도로 희석	6
희석된 라이브러리 변성	6
Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization	6
시약 준비	7
라이브러리 희석	7
라이브러리 풀링	7
라이브러리 변성	8
변성된 라이브러리 20 pM로 희석	8
라이브러리 최종 로딩 농도로 희석	8
Protocol D: AmpliSeq Library Equalizer for Illumina Normalization	9
시약 준비	9
라이브러리 풀링	9
라이브러리 변성	10
변성된 라이브러리 희석	10
라이브러리 최종 로딩 농도로 희석	10

PhiX Control 변성 및 희석	11
PhiX 4 nM로 희석	11
PhiX 변성	11
변성된 PhiX 로딩 농도로 희석	11
라이브러리와 PhiX Control의 혼합	12
다음 단계	12
문제 해결을 위한 런 수행에 필요한 PhiX 준비	12
PhiX 4 nM로 희석	13
PhiX 변성	13
변성된 PhiX 라이브러리 로딩 농도로 희석	13

개요

본 가이드는 Illumina® MiniSeq™ 시스템으로 시퀀싱을 수행하기 위해 준비한 라이브러리(library)를 변성(denaturation)하고 희석(dilution)하는 방법을 설명합니다.

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

- **Control** — 준비한 라이브러리와 혼합해 시퀀싱의 Control(대조물질)로 사용할 PhiX 라이브러리 준비. 자세한 내용은 [11페이지의 PhiX Control 변성 및 희석](#) 섹션 참조.
- **문제 해결** — 문제 해결을 위해 PhiX 단독 시퀀싱 런에 사용할 PhiX 라이브러리 준비. 자세한 내용은 [12페이지의 문제 해결을 위한 런 수행에 필요한 PhiX 준비](#) 섹션 참조.

로딩 볼륨 및 농도

다음 절차에 따라 Standard Kit에는 1.4 pM, Rapid Kit에는 1.6 pM의 권장 농도를 적용하여 라이브러리를 최종 로딩 볼륨인 500 µl로 변성하고 희석합니다. 실제 로딩 농도는 라이브러리 준비 방법과 정량(quantification) 방법에 따라 결정됩니다.

프로토콜의 종류

라이브러리 준비에 사용한 절차에 알맞은 변성 및 희석 프로토콜을 따릅니다.

- **Standard Normalization** — 라이브러리 준비 관련 문서에서 권장하는 표준 라이브러리 정량 절차와 품질 관리 절차에 따라 라이브러리 표준화(normalization). 이 경우 라이브러리에는 **Protocol A** 적용. 자세한 내용은 [3페이지의 Protocol A: Standard Normalization](#) 섹션 참조.
- **Bead-Based Normalization** — 비드 기반의 표준화를 지원하는 방법을 사용하는 경우, 라이브러리 준비 관련 문서에 기술된 비드 기반 라이브러리 준비 절차에 따라 라이브러리 표준화. 이 경우 라이브러리에는 **Protocol B** 적용. 자세한 내용은 [5페이지의 Protocol B: Bead-Based Normalization](#) 섹션 참조.
- **AmpliSeq™ for Illumina Normalization** — 표준 AmpliSeq for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 모든 라이브러리에는 **Protocol C** 적용. 자세한 내용은 [6페이지의 Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization](#) 섹션 참조.
- **AmpliSeq Library Equalizer™ for Illumina Normalization** — AmpliSeq Library Equalizer for Illumina 워크플로우를 사용하여 준비된 모든 라이브러리에는 **Protocol D** 적용. 자세한 내용은 [9페이지의 Protocol D: AmpliSeq Library Equalizer for Illumina Normalization](#) 섹션 참조.

모범 사례

- **항상** 클러스터 생성을 위해 라이브러리를 변성할 때는 새로 희석한 NaOH(pH > 12.5)을 준비하도록 합니다. 이 단계는 변성 과정에 반드시 필요합니다.

- 피펫팅 과정에서 발생하는 미세한 오차가 NaOH의 최종 농도에 영향을 주는 것을 방지하기 위해 최소 1 ml의 새로 희석한 NaOH을 준비합니다.
- 최상의 결과를 위해 라이브러리를 변성하고 희석하기 전에 시약 카트리지의 해동을 시작하도록 합니다. 자세한 지침은 *MiniSeq 시스템 가이드*(문서 번호: 1000000002695)를 참조하시기 바랍니다.

소모품 및 장비

소모품

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

소모품	공급 업체
HT1	MiniSeq Kit의 구성품
[Protocol C] Low TE	Illumina(AmpliSeq Library PLUS Kit에 포함)

별도 구매 소모품	공급 업체
분자생물학 실험용 1 N NaOH	일반 실험기자재 공급 업체
200 mM Tris-HCl, pH 7.0	일반 실험기자재 공급 업체

PhiX Control의 준비에는 다음과 같은 소모품이 추가로 필요합니다.

소모품	키트 이름
PhiX, 10 nM RSB(Resuspension Buffer)	Illumina(카탈로그 번호: FC-110-3002)

장비

비드 기반의 방법을 통해 표준화된 라이브러리를 변성할 때는 다음 장비가 필요합니다.

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

Protocol A: Standard Normalization

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

시약 준비

새로 희석된 NaOH 준비

1. 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.
 - 실험용수(900 μ l)
 - Stock 1.0 N NaOH(100 μ l)총 1 ml의 0.1 N NaOH이 만들어집니다.
2. 튜브를 여러 번 앞뒤로 뒤집어 잘 섞어 줍니다.

i | 희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용합니다.

HT1 준비

1. $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 에서 보관 중이던 HT1(Hybridization Buffer)가 담긴 튜브를 꺼내어 실온에서 해동합니다.
2. 해동된 튜브는 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 $2\sim8^{\circ}\text{C}$ 에서 보관합니다.
3. 사용 전 짧게 볼텍싱합니다.

RSB 준비

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

1. $-25\sim-15^{\circ}\text{C}$ 에서 보관 중이던 RSB가 담긴 튜브를 꺼내어 실온에서 해동합니다.
2. 해동된 튜브는 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 $2\sim8^{\circ}\text{C}$ 에서 보관합니다.

표준화된 라이브러리 풀 생성

아직 라이브러리의 표준화 및 풀링(pooling)을 진행하지 않았다면, 다음 지침에 따라 라이브러리를 10 nM로 표준화하고 풀링합니다. MiniSeq 플로우 셀에 로딩할 라이브러리는 하나의 풀(pool)로 합쳐줘야 합니다.

이미 라이브러리의 표준화 및 풀링을 완료했다면 '라이브러리 1 nM로 희석' 단계로 넘어갑니다.

10 nM로 표준화된 라이브러리 세트 생성

1. 10 µl의 라이브러리를 각각 새로운 MIDI Plate 또는 PCR Plate의 상응하는 웰로 옮깁니다.
2. 라이브러리 준비 가이드에서 권장하는 정량 방법을 적용해 결정한 농도를 기준으로, 다음 공식에 따라 각 라이브러리를 RSB와 혼합하여 10 nM로 희석합니다.

$$x \mu l = \frac{(10 \mu l)(y \text{ nM})}{10 \text{ nM}} - 10 \mu l$$

이 공식에서 y는 개별 라이브러리의 농도를, x는 RSB의 볼륨을 의미합니다.

i | 개별 라이브러리의 농도가 10 nM 미만일 경우 최저 1 nM의 농도로 표준화해 줍니다.

3. 가볍게 피펫팅하여 혼합합니다.
최종 볼륨은 각 라이브러리의 농도에 따라 10 µl~400 µl 사이가 됩니다.

10 nM 라이브러리 풀 생성

1. 10 µl의 10 nM 라이브러리를 각각 새로운 미세원심분리 튜브에 넣습니다.
10 nM 라이브러리 풀의 최종 볼륨은 풀링된 라이브러리의 수에 따라 다릅니다.
2. [선택 사항] 남은 10 nM 라이브러리는 -25~-15°C에 보관합니다.

라이브러리 1 nM로 희석

1. 라이브러리 농도에 따라 적절한 볼륨의 라이브러리를 새로운 미세원심분리 튜브로 옮긴 후 RSB를 넣습니다.

라이브러리 풀 농도	라이브러리 볼륨	RSB 볼륨
10 nM	10 µl	90 µl
4 nM	25 µl	75 µl
2 nM	50 µl	50 µl

2. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

라이브러리 변성

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

5. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

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

라이브러리 로딩 농도로 희석

1. 변성된 라이브러리가 담긴 튜브에 985 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다. 라이브러리의 총 볼륨이 1 ml가 될 때 농도는 5 pM가 됩니다.
2. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
3. 아래 명시된 볼륨을 넣어 라이브러리를 원하는 농도로 희석합니다.

	Standard Kit	Rapid Kit
최종 농도	1.4 pM	1.6 pM
변성된 5 pM 라이브러리 풀	140 µl	160 µl
미리 냉각한 HT1	360 µl	340 µl

4. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
5. PhiX Control을 추가하려면 5페이지의 라이브러리 로딩 농도로 희석 단계로 이동합니다. PhiX Control을 추가하지 않으려면 12페이지의 다음 단계 섹션을 참조합니다.

Protocol B: Bead-Based Normalization

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

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

HT1 준비

1. -25~-15°C에서 보관 중이던 HT1이 담긴 튜브를 꺼내어 실온에서 해동합니다.
2. 해동된 튜브는 변성된 라이브러리의 희석 준비가 완료될 때까지 2~8°C에서 보관합니다.
3. 사용 전 짧게 볼텍싱합니다.

인큐베이터 준비

1. 인큐베이터를 98°C로 예열합니다.

라이브러리 로딩 농도로 희석

1. 미세원심분리 튜브에 아래에 명시된 볼륨의 풀링된 라이브러리와 미리 냉각해 둔 HT1을 넣어 혼합합니다.

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

총 1 ml가 만들어집니다.

2. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
3. 250 µl의 희석된 라이브러리를 새로운 미세원심분리 튜브로 옮깁니다.
4. 250 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 추가합니다.
5. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.

희석된 라이브러리 변성

1. 튜브를 예열한 인큐베이터에 2분간 넣어 둡니다.
2. 지체없이 얼음으로 옮겨 냉각합니다.
3. 얼음에 5분간 올려 둡니다.
4. PhiX Control을 추가하려면 [11페이지의 PhiX Control 변성 및 희석](#) 단계로 이동합니다.
PhiX Control을 추가하지 않으려면 [12페이지의 다음 단계](#) 섹션을 참조합니다.

Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panel Normalization

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

시약 준비

새로 희석된 NaOH 준비

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

i | 희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용합니다.

HT1 준비

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

Low TE 준비

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

라이브러리 희석

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

라이브러리 풀링

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

패널	DNA 대 RNA 비율
AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel	8:1

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

- 라이브러리 풀을 합친 후 튜브를 볼텍싱하여 혼합하고 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.

시약	볼륨(μl)
풀링된 라이브러리	10
0.2 N NaOH	10

- 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.
- 실온에서 5분간 배양합니다.
- 풀링된 2 nM 라이브러리가 담긴 튜브에 10 μl의 200 mM Tris-HCl, pH 7.0을 넣습니다.
- 짧게 볼텍싱한 후 짧게 원심분리합니다.

변성된 라이브러리 20 pM로 희석

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

라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 변성된 20 pM 라이브러리 용액을 미리 냉각해 둔 HT1을 사용해 1.1~1.9 pM로 희석하여 최종 볼륨이 500 μl인 용액을 만듭니다.
- 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

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

Protocol D: AmpliSeq Library Equalizer for Illumina Normalization

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

시약 준비

새로 희석된 NaOH 준비

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

i | 희석액은 만든지 **12시간** 이내에 사용하시기 바랍니다.

HT1 준비

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

라이브러리 풀링

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

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

- 라이브러리 풀을 합친 후 튜브를 볼텍싱하여 혼합하고 짧게 원심분리합니다.

라이브러리 변성

- 미세원심분리 튜브에 아래 명시된 볼륨을 넣어 혼합합니다.

시약	볼륨(μl)
풀링된 라이브러리	10
0.2 N NaOH	10

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

변성된 라이브러리 희석

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

라이브러리 최종 로딩 농도로 희석

- 아래 명시된 볼륨을 혼합하여 변성된 라이브러리 용액을 최종 로딩 농도로 희석합니다.
 - 변성된 라이브러리(28 μl)
 - HT1(472 μl)
- 앞뒤로 뒤집어 혼합한 후 짧게 원심분리합니다.

안전한 정지점

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

PhiX Control 변성 및 희석

PhiX 4 nM로 희석

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

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

PhiX 변성

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

변성된 PhiX 로딩 농도로 희석

1. 변성된 PhiX 라이브러리가 담긴 튜브에 985 µl의 미리 생각해 둔 HT1을 넣습니다. 라이브러리의 총 볼륨이 1 ml가 될 때 농도는 20 pM가 됩니다.
2. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
3. 아래 명시된 볼륨을 넣어 라이브러리를 원하는 농도로 희석합니다.

	Standard Kit	Rapid Kit
최종 농도	1.4 pM	1.6 pM
변성된 20 pM PhiX	35 µl	40 µl
미리 생각한 HT1	465 µl	460 µl

4. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
5. 라이브러리를 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 얼음 위에 둡니다.

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

라이브러리와 PhiX Control의 혼합

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

1. 아래 명시된 볼륨의 변성된 PhiX Control과 변성된 라이브러리를 동일한 농도로 혼합합니다.

	대부분의 라이브러리 (1% Spike-In)	다양성이 낮은 라이브러리 (≥ 10% Spike-In)
변성 및 희석된 PhiX	5 µl	50 µl
변성 및 희석된 라이브러리(Protocol A, B, C 또는 D 사용 시)	495 µl	450 µl

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

i | 실제 PhiX의 %는 라이브러리 풀의 품질과 양에 따라 달라집니다.

다음 단계

라이브러리의 변성과 희석 그리고 PhiX Control(선택 사항)의 준비가 끝나면, 라이브러리를 해동된 시약 카트리지에 로딩하고 시퀀싱 런을 설정할 수 있습니다. 자세한 지침은 *MiniSeq 시스템 가이드(문서 번호: 1000000002695)*를 참조하시기 바랍니다.

기타 MiniSeq 시스템 관련 정보는 Illumina 웹사이트의 [MiniSeq Support 페이지](#)를 참조하시기 바랍니다. Illumina 웹사이트의 [Support 페이지](#)에서는 그 밖의 제품 관련 문서(Documentation), 소프트웨어 다운로드(Software Downloads), 자주 묻는 질문(FAQ), 온라인 교육(Training) 등의 메뉴를 이용하실 수 있습니다.

문제 해결을 위한 런 수행에 필요한 PhiX 준비

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

다음을 진행하기 전에 [3페이지의 시약 준비](#) 섹션에 기술되어 있는 시약을 준비해 두시기 바랍니다.

PhiX 4 nM로 희석

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

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

PhiX 변성

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

변성된 PhiX 라이브러리 로딩 농도로 희석

1. 변성된 PhiX 라이브러리가 담긴 튜브에 985 µl의 미리 냉각해 둔 HT1을 넣습니다.
라이브러리의 총 볼륨이 1 ml가 될 때 농도는 20 pM가 됩니다.
2. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
3. 아래 명시된 볼륨을 넣어 라이브러리를 원하는 농도로 희석합니다.

	Standard Kit	Rapid Kit
최종 농도	1.4 pM	1.6 pM
변성된 20 pM PhiX	35 µl	40 µl
미리 냉각한 HT1	465 µl	460 µl

4. 짧게 볼텍싱한 후 280 × g로 1분간 원심분리합니다.
5. 라이브러리를 시약 카트리지에 로딩할 준비가 완료될 때까지 얼음 위에 둡니다.



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

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®