

이 문서와 이 문서에 수록된 내용은 Illumina, Inc. 및 그 회사("Illumina")의 재산으로, 여기에 설명된 제품의 사용과 관련하여 전적으로 계약상 보증된 고객만을 위해 사용할 수 있으며 그 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다. 이 문서와 이 문서에 수록된 내용은 다른 목적으로 사용되거나 배포될 수 없으며, Illumina의 사전 서면 승인 없이는 어떠한 방식으로도 달리 전달, 공개하거나 복제할 수 없습니다. Illumina에서는 이 문서를 통해 특허, 상표, 저작권 또는 관습법적 권한 또는 타사의 유사 권한에 따라 어떠한 라이선스도 양도하지 않습니다.

이 문서의 지침은 여기에 설명된 제품의 올바르게 안전한 사용을 위해 적절한 교육을 받은 자격을 갖춘 사람을 통해서 엄격하고 정확하게 준수되어야 합니다. 해당 제품을 사용하기 전에 이 문서의 모든 내용을 철저히 읽고 숙지해야 합니다.

여기에 포함된 모든 지침을 완전히 읽거나 명확하게 따르지 않을 경우 제품 손상, 사용자나 다른 사람의 신체 부상, 재산 상의 손해가 발생할 수 있습니다.

Illumina는 여기에 설명된 제품(그 부품이나 소프트웨어 포함)을 잘못 사용하여 발생하는 일에 대해 어떠한 책임도 지지 않습니다.

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, HiSeq, NextSeq, TruSight 및 하단 흐름 디자인은 미국 및/또는 다른 국가에서 Illumina, Inc. 및/또는 그 회사의 등록 또는 출원 상표입니다. 그 밖의 모든 이름, 로고 및 기타 상표는 해당 소유자의 재산입니다.

개정 내역

문서	날짜	변경 내용 설명
문서 번호 1000000024091 v01	2017년 4월	<ul style="list-style-type: none"> · RNA/DNA 인풋 권장사항 섹션에서 RNA 샘플 평가에 사용되는 키트를 수정했습니다. · 라이브러리 정규화 소개에서 수동 정규화는 현재 TruSight Tumor 170 에서 지원되지 않음을 명시했습니다. · 고급 분석 기술 표준 민감도 RNA 분석 키트와 Agilent RNA 6000 나노 키트를 소모품 목록에 추가했습니다.
문서 번호 1000000024091 v00	2017년 3월	최초 릴리스.

목차

1장 개요	1
소개	1
RNA/DNA 인풋 권장사항	1
DNA 전단 권장사항	2
추가 리소스	2
2장 프로토콜	3
소개	3
경고 및 주의사항	4
팁과 기술	4
라이브러리 준비 작업흐름	6
Enrichment 작업흐름	7
RNA 변성 및 아닐	8
첫 번째 가닥 cDNA 합성	9
두 번째 가닥 cDNA 합성	10
cDNA 세척	10
분절 gDNA	12
End Repair 및 A-Tailing 수행	14
어댑터 연결	15
결찰 세척	16
인덱스 PCR	17
1차 혼성화 수행	19
1차 캡처 수행	20
2차 혼성화 수행	22
2차 캡처 수행	23
강화 라이브러리 증폭	25
증폭된 강화 라이브러리 세척	26
라이브러리 정량화	27
라이브러리 정규화	28
시퀀싱 준비	30
부록 A 지원 정보	34
소개	34
약어	34
키트 내용물	35
소모품 및 장비	37
기술 지원	40

개요

소개	1
RNA/DNA 인풋 권장사항	1
DNA 전단 권장사항	2
추가 리소스	2

소개

TruSight® Tumor 170 프로토콜은 FFPE(포르말린 고정 파라핀 내장) 조직에서 추출된 DNA 및 RNA를 Illumina® 시퀀싱 시스템에서 시퀀싱할 수 있는 압 관련 유전자가 농축된 라이브러리로 변환하기 위한 enrichment 기반 접근 방식을 설명합니다. TruSight Tumor 170 키트를 이용하면 48개(DNA에서 24개, RNA에서 24개)의 라이브러리를 준비할 수 있습니다. 이 키트는 170개의 유전자 전반에서 빈도가 낮은 체세포 변형에 대한 높은 민감도와 특이성을 제공하도록 최적화되었습니다. 이러한 이형에는 단일 뉴클레오티드 이형(SNV), 삽입, 삭제, 다중 뉴클레오티드 이형(MNV), 증폭, 융합 및 이어맞추기 이형이 포함됩니다.

제품 설명

TruSight Tumor 170 RUO 키트는 샘플 핵산을 시퀀싱 가능한 라이브러리로 전환하기 위한 라이브러리 준비 시약으로 구성됩니다. TruSight Tumor 170 키트는 관련 TruSight Tumor 170 소프트웨어도 포함합니다. 에세이는 인풋 샘플 유형으로 FFPE 조직에서 추출된 DNA 및/또는 RNA로 시작됩니다. 이형 호출(Variant Calling) 알고리즘은 TruSight Tumor 170 앱에서 제공됩니다. TruSight Tumor 170 앱은 목표 유전자의 전체 코딩 영역에서 돌연변이(단일 뉴클레오티드 이형, 다중 뉴클레오티드 이형, 결실(indel), 복제수 편차, 이어맞추기 이형, 유전자 융합)를 보고합니다.

RNA/DNA 인풋 권장사항

TruSight Tumor 170 에세이는 정의된 RNA/DNA 인풋 범위에 최적화되었습니다. DNA의 최적 범위는 40ng ~ 120ng 또는 3.3ng/μl ~ 10ng/μl입니다. RNA의 최적 범위는 40ng ~ 85ng 또는 4.7ng/μl ~ 10ng/μl입니다. 프로토콜을 시작하기 전에 인풋 RNA/DNA를 정량화하십시오. Illumina는 충분한 핵산 물질을 획득하기 위해 최소 2mm³의 FFPE 조직에서 핵산을 분리할 것을 권장합니다.

- ▶ 높은 회수율을 제공하고 샘플 소모량을 최소화하며 샘플 무결성을 보존하는 핵산 분리 방법을 사용하십시오. QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE 키트는 이 에세이에 대해 테스트된 다른 추출 방법에 비해 많은 양의 핵산을 제공합니다.
- ▶ QuantiFluor®(RNA) 또는 AccuClear™(DNA) 등의 RNA/DNA 결합 색소를 사용하는 형광 정량화 방법을 사용하십시오.
- ▶ 시재료를 RNase/DNase 없는 순수에 희석합니다.

최적의 성능을 위해 TruSight Tumor 170 에세이를 사용하기 전에 DNA 및 RNA 샘플 품질을 평가합니다.

- ▶ DNA 샘플은 Illumina FFPE QC 키트를 사용하여 평가할 수 있습니다.
- ▶ 5 이하의 델타 Cq 값을 도출하는 DNA 샘플을 사용하십시오. 델타 Cq 값이 5를 초과하는 샘플을 사용하면 에세이 성능이 저하될 수 있습니다.
- ▶ RNA 샘플은 Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer™(표준 민감도 RNA 분석 키트) 또는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer(Agilent RNA 6000 나노 키트)를 사용하여 평가할 수 있습니다.
- ▶ 20% 이상의 DV₂₀₀ 값을 도출하는 RNA 샘플을 사용하십시오. DV₂₀₀ 값이 20%를 초과하는 샘플을 사용하면 에세이 성능이 저하될 수 있습니다.

레퍼런스 샘플[선택사항]

- ▶ HorizonDxHD753(DNA) 및 Agilent 범용 레퍼런스 RNA 등의 라이브러리 준비를 실행할 때 특성화된 레퍼런스 물질을 사용하십시오. Agilent 범용 레퍼런스 RNA는 8페이지의 RNA 변성 및 아닐에 있는 원형 RNA 절차에 따라 처리되어야 하는 원형 RNA 샘플입니다.
- ▶ 세포주 유래 이종 이식물의 적절한 FFPE 물질은 레퍼런스 샘플로 사용될 수 있습니다.
- ▶ RNase/DNase 없는 순수를 NTC(음성 대조군)로 사용하십시오. NTC(음성 대조군)는 시퀀싱하지 마십시오.



참고

레퍼런스 샘플이나 NTC(음성 대조군)를 실행하면 처리할 수 있는 알 수 없는 샘플의 총 개수가 줄어듭니다.

DNA 전단 권장사항

TruSight Tumor 170 에세이는 90~250bp(최대 125bp)로 분절된 gDNA에서 라이브러리를 준비하도록 최적화되었습니다. 이 에세이는 12페이지의 분절 gDNA에 제공된 매개변수로 Covaris E220evolution™ 또는 LE220 집중식 초음파분쇄기를 사용하여 최적화되었습니다. 분절 크기 분포는 이 테스트에 사용된 초음파 분쇄 기기와 샘플 품질의 차이로 인해 달라질 수 있습니다. TruSight Tumor 170(Covaris E220evolution 또는 LE220)에 최적화된 분절 방법을 사용하고 있지 않다면 TruSight Tumor 170 지원 페이지를 참조하십시오.

- ▶ 전단 튜브에 과도한 기포나 공기 틈새가 있는 경우 전단이 불완전해질 수 있습니다.
 - ▶ 기포 생성을 방지하려면 gDNA를 Covaris 튜브에 천천히 장착하십시오.
 - ▶ 전단 전에 튜브 하단에서 샘플을 수집할 수 있도록 Covaris 튜브를 원심분리합니다.
- ▶ LE220 Covaris 기기를 사용 중이라면 최적의 성능을 위해 사용하지 않은 Covaris 8마이크로튜브 스트립 웰을 52µl의 물로 채웁니다.
- ▶ [선택사항] 전단 샘플의 분절 크기 분포는 Agilent Bioanalyzer 2100과 함께 Agilent DNA 1000 키트를 사용해 평가할 수 있습니다.

추가 리소스

분석 소프트웨어를 포함한, 호환되는 Illumina 제품에 대한 설명서, 소프트웨어 다운로드, 교육 리소스 및 정보를 이용하려면 Illumina 웹사이트의 TruSight Tumor 170 키트 지원 페이지를 방문하십시오.

다음 설명서는 Illumina 웹사이트에서 다운로드할 수 있습니다.

리소스	설명
custom 프로토콜 선택기	support.illumina.com/custom-protocol-selector.html 시퀀싱 실행에 사용되는 라이브러리 준비 방법, 실행 매개변수 및 분석 방법에 맞게 사용자 지정된 통합 설명서를 생성하기 위한 마법사입니다.
<i>TruSight Tumor 170 검사 목록</i> (문서 번호 1000000024092 v00)	숙련된 사용자를 위한 단계별 검사 목록을 제공합니다.
<i>TruSight Tumor 170 소모품 및 장비 목록</i> (문서 번호 1000000031408 v00)	사용자 제공 소모품 및 장비의 대화식 검사 목록을 제공합니다.

프로토콜

소개	3
경고 및 주의사항	4
팁과 기술	4
라이브러리 준비 작업흐름	6
Enrichment 작업흐름	7
RNA 변성 및 아닐	8
첫 번째 가닥 cDNA 합성	9
두 번째 가닥 cDNA 합성	10
cDNA 세척	10
분절 gDNA	12
End Repair 및 A-Tailing 수행	14
어댑터 연결	15
결찰 세척	16
인덱스 PCR	17
1차 혼성화 수행	19
1차 캡처 수행	20
2차 혼성화 수행	22
2차 캡처 수행	23
강화 라이브러리 증폭	25
증폭된 강화 라이브러리 세척	26
라이브러리 정량화	27
라이브러리 정규화	28
시퀀싱 준비	30

소개

이 섹션에서는 TruSight Tumor 170 프로토콜을 설명합니다.

- ▶ 진행하기 전에 키트 내용물을 확인하고 필요한 소모품과 장비를 모두 갖췄는지 확인합니다. 자세한 내용은 [35페이지의 키트 내용물](#)을 참조하십시오.
- ▶ 이 프로토콜의 일부 시약은 관련 샘플 유형을 식별할 수 있도록 색상으로 구분된 캡이 씌워져 있습니다.
 - ▶ 파란색 캡은 유전체 DNA(gDNA) 샘플에만 사용되는 시약을 나타냅니다.
 - ▶ 빨간색 캡은 RNA 또는 보완적 DNA(cDNA) 샘플에만 사용되는 시약을 나타냅니다.
- ▶ 지정된 매개변수를 사용하여 설명된 순서대로 프로토콜을 따르십시오.
- ▶ 라이브러리 준비를 시작하기 전에 샘플 농도(DNA 또는 RNA)와 샘플 품질 정보를 기록합니다. 데이터 분석 중에 나중에 사용할 수 있도록 이 정보를 저장합니다.

RNA 및 DNA 라이브러리는 동시에 준비될 수 있습니다. Illumina는 다음 일정에 따라 TruSight Tumor 170 에세이 작업흐름을 수행할 것을 권장합니다.

- ▶ 1일 차: RNA 샘플로부터의 cDNA 합성, gDNA 샘플의 DNA 진단가공, 라이브러리 준비 후 하룻밤 동안(1차) 혼성화 시작. 자세한 내용은 [6페이지의 라이브러리 준비 작업흐름](#)을 참조하십시오.
- ▶ 2일 차: Enrichment, 강화된 라이브러리 QC 확인(라이브러리 정량화), 강화된 라이브러리의 비드 기반 정규화, 시퀀싱 플랫폼(NextSeq[®] 500, NextSeq 550 또는 HiSeq[®] 2500)에 라이브러리 장착. 자세한 내용은 [7페이지의 Enrichment 작업흐름](#)을 참조하십시오.

앞의 일정에 따라 TruSight Tumor 170 에세이 작업흐름을 수행할 수 없는 경우 대안적 일정을 수용할 수 있도록 프로토콜 전반에 몇 가지 안전한 중지 지점이 지정되어 있습니다.

경고 및 주의사항



경고

이 키트의 시약 중 일부에는 잠재적으로 위험한 화학물질이 함유되어 있습니다. 흡입, 섭취하거나 피부 또는 눈에 접촉할 경우 인체에 상해를 입을 수 있습니다. 노출 위험에 적합한 보안경, 장갑, 실험실 가운 등의 보호 장비를 착용하십시오. 사용한 시약은 화학 폐기물로 처리하고 해당되는 국가 및 지역 법률과 규정에 따라 폐기하십시오. 자세한 환경, 보건건강, 및 안전 정보는 support.illumina.com/sds.html에서 SDS를 참조하십시오.

팁과 기술

프로토콜에 안전한 중지 시점이 지정된 경우를 제외하고 다음 단계로 즉시 이동하십시오.

교차 오염 방지

- ▶ 증폭 전에서 증폭 후 구역으로 이동하는 경우 단일 방향의 작업흐름을 사용합니다.
- ▶ 제품 또는 프로브 잔류물이 증폭되는 것을 방지하려면 증폭 후 구역에서 작업을 시작한 이후에 증폭 전 구역으로 돌아오지 마십시오.
- ▶ 샘플을 추가 또는 전송할 때는 각 웰 사이의 팁을 변경합니다.
- ▶ 인덱싱 프라이머를 추가할 때는 각 웰 사이의 팁을 변경합니다.
- ▶ 인덱싱 프라이머, 샘플 또는 프로브에 접촉된 장갑은 교체합니다.
- ▶ 절차 전후에 작업대를 철저히 세척합니다.
- ▶ 작업 구역에서 사용하지 않은 인덱싱 프라이머 튜브를 제거합니다.

플레이트 밀봉

- ▶ 프로토콜의 다음 단계를 수행하기 전에 항상 적합한 플레이트 실로 플레이트를 밀봉합니다.
 - ▶ 흔들기 단계
 - ▶ 교반 단계
 - ▶ 원심분리 단계
 - ▶ 열주기 단계
- ▶ 접착 실을 발라 플레이트를 덮고 고무 롤러로 봉인하십시오.
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실은 $-40^{\circ}\text{C}\sim 110^{\circ}\text{C}$ 에서 효과가 있으며, 스커트형 또는 반스커트형 PCR 플레이트에 적합합니다. 흔들기, 원심분리, PCR 증폭, 장기 보관용 마이크로실 'B' 를 사용합니다.

플레이트 전송

- ▶ 플레이트 간 용량을 전송할 때는 각 플레이트 웰에서 지정된 용량을 다른 플레이트의 해당하는 웰로 전송합니다.

원심분리

- ▶ 플레이트를 원심분리하라는 지시가 있으면 $280 \times g$ 로 1분간 원심분리합니다.

시약 처리

- ▶ 증발을 제한하고 오염을 방지하기 위해 사용 직후 모든 시약 튜브의 뚜껑을 꼭 닫으십시오.
- ▶ 절차에 더 이상 필요하지 않게 되면 시약을 권장 보관조건에 부합하는 장소에 다시 넣으십시오.

비드 처리

- ▶ 비드 현탁액에 피펫 작업을 천천히 수행합니다.
- ▶ 피펫 작업 전에 철저하게 섞습니다.
- ▶ 자석 분리 단계에서 비드가 피펫 팁에 흡입되는 경우 자석 스탠드의 플레이트에 다시 공급하고 액체가 투명해질 때까지 기다리십시오(최대 2분).
- ▶ 비드 세척 시:
 - ▶ 플레이트에 적합한 자석 스탠드를 사용합니다.
 - ▶ 웰의 측면에 있는 비드가 젖도록 액체를 공급합니다.
 - ▶ 제거하라는 지시가 있을 때까지 플레이트를 자석 스탠드 위에 놓아 둡니다.
 - ▶ 자석 스탠드 위에 둔 동안에는 플레이트를 흔들지 마십시오. 비드 펠릿이 섞이지 않도록 하십시오.

라이브러리 준비 작업흐름

다음 다이어그램은 TruSight Tumor 170 키트를 사용한 권장 라이브러리 준비 작업흐름을 보여줍니다. RNA 및 DNA 라이브러리는 동시에 준비될 수 있습니다. 단계 사이에 안전한 중지 시점이 표시되어 있습니다.

그림 1 TruSight Tumor 170 작업흐름(1부)



* 조작 및 총 시간은 근사치입니다.
* 제시된 조작 시간은 8개의 DNA 샘플과 8개의 RNA 샘플을 바탕으로 하며 Covaris 초음파분쇄기의 가스 제거 시간은 포함하고 있지 않습니다.

Enrichment 작업흐름

다음 다이어그램은 TruSight Tumor 170 키트를 사용한 권장 Enrichment 작업흐름을 보여줍니다. 단계 사이에 안전한 중지 시점이 표시되어 있습니다.

그림 2 TruSight Tumor 170 작업흐름(2부)



● Enrichment ● 시퀀싱 준비

* 조작 및 총 시간은 근사치입니다.

RNA 변성 및 아날

이 프로세스 중에는 정제된 RNA가 변성되고 cDNA 합성을 위한 준비로 무작위 6합체로 프라이밍됩니다. 정제된 DNA로만 작업 중인 경우 12페이지의 분절 gDNA 을 바로 진행하십시오.

소모품

- ▶ EPH3(용출, 프라이밍, 분절 높은 믹스 3[빨간색 캡])
- ▶ FSM(첫 번째 가닥 합성 믹스[빨간색 캡])
- ▶ RVT(역전사 효소[빨간색 캡])
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실



주의

다음 절차에는 RNase- 및 DNase- 없는 환경이 필요합니다. RNase 억제 세척제로 작업 영역의 오염을 철저히 제거하십시오. RNA 전용 장비를 사용해야 합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
EPH3	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
FSM	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
RVT	-25°C~-15°C	얼음 위에 둡니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

2 얼음 위에서 RNA 샘플을 해동합니다.

3 샘플을 정성화 및 정량화합니다. 1페이지의 RNA/DNA 인풋 권장사항을 참조하십시오.

4 정제된 각 RNA 샘플을 4.7ng/μl ~ 10ng/μl 농도의 핵산 분해 효소가 없는 물에 희석합니다.

5 다음 프로그램을 유전자 증폭기에서 저장합니다.

- ▶ FFPE 또는 분절된 RNA의 경우 LQ-RNA 프로그램을 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
 - ▶ 반응 용량을 17μl로 설정합니다.
 - ▶ 65°C에서 5분간
 - ▶ 4°C에서 유지
- ▶ 세포주 또는 원형 RNA의 경우 HQ-RNA 프로그램을 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
 - ▶ 반응 용량을 17μl로 설정합니다.
 - ▶ 94°C에서 8분간
 - ▶ 4°C에서 유지

6 새 96웰 PCR 플레이트에 CF(cDNA 분절) 라벨을 붙입니다.

절차

- 1 다음 시약을 미량원심분리기 튜브에서 결합해 FSM+RVT 마스터 믹스를 만듭니다.

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

- ▶ 최소 3개의 샘플을 준비합니다.
 - ▶ 사용 후 남아 있는 모든 마스터 믹스를 폐기합니다.
- 2 피펫 작업을 수행하여 섞습니다.
 - 3 9페이지의 첫 번째 가닥 cDNA 합성 때까지 FSM+RVT 마스터 믹스를 얼음 위에 놓아둡니다.
 - 4 8.5µl의 정제된 각 RNA 샘플을 CF 플레이트의 해당 웰에 추가합니다.
 - 5 8.5µl의 EPH3을 각 웰에 추가합니다.
 - 6 마이크로실 'B' 를 적용하고 1분간 1200rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
 - 7 사전에 프로그래밍된 유전자 증폭기에 놓고 LQ-RNA 또는 HQ-RNA 프로그램을 실행합니다.
 - 8 유전자 증폭기의 온도가 4°C에 도달하면 즉시 다음 단계를 진행합니다.

첫 번째 가닥 cDNA 합성

이 프로세스는 역전사 효소를 이용하여 무작위 6합체로 프라이밍된 RNA 분절을 첫 번째 가닥 cDNA로 역전시킵니다.

소모품

- ▶ FSM+RVT 마스터 믹스(8페이지의 RNA 변성 및 아닐에서 준비됨)
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

준비

- 1 다음 프로그램을 가열 뚜껑이 있는 유전자 증폭기에서 1stSS로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
 - ▶ 반응 용량을 25µl로 설정합니다.
 - ▶ 25°C에서 10분간
 - ▶ 42°C에서 15분간
 - ▶ 70°C에서 15분간
 - ▶ 4°C에서 유지

절차

- 1 유전자 증폭기에서 CF 플레이트를 제거합니다.
- 2 사용 전에 피펫 작업을 수행하여 FSM+RVT 마스터 믹스를 혼합합니다.
- 3 각 웰에 8µl의 FSM+RVT 마스터 믹스를 추가합니다.
- 4 마이크로실 'B' 를 적용하고 1분간 1200rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 5 유전자 증폭기에 넣고 1stSS 프로그램을 실행합니다.
- 6 유전자 증폭기의 온도가 4°C에 도달하면 즉시 다음 단계를 진행합니다.



팁

DNA 라이브러리도 준비 중인 경우 1stSS 프로그램을 실행하는 동안에 gDNA 분절을 시작할 수 있습니다. 시작하려면 12페이지의 분절 gDNA 을 참조하십시오.

두 번째 가닥 cDNA 합성

이 프로세스는 RNA 템플레이트를 제거하고 ds cDNA를 합성합니다.

소모품

- ▶ SSM(두 번째 가닥 믹스[빨간색 캡])
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
SSM	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 10번 뒤집어 용액을 혼합합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

2 다음 프로그램을 가열 뚜껑이 있는 유전자 증폭기에서 2ndSS로 저장합니다. 뚜껑 온도를 30°C로 설정할 수 없으면 예열된 뚜껑 가열 옵션을 끕니다.

- ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 30°C로 설정합니다.
- ▶ 반응 용량을 50µl로 설정합니다.
- ▶ 16°C에서 25분간
- ▶ 4°C에서 유지

절차

- 1 유전자 증폭기에서 CF 플레이트를 제거합니다.
- 2 25µl의 SSM을 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 'B' 를 적용하고 1분간 1200rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 4 유전자 증폭기에 넣고 2ndSS 프로그램을 실행합니다.
- 5 유전자 증폭기의 온도가 4°C에 도달하면 다음 단계를 진행합니다.

cDNA 세척

이 프로세스는 SPB를 사용하여 원치 않는 반응 구성요소로부터 cDNA를 정제합니다.

소모품

- ▶ 새로 준비한 80% 에탄올(EtOH)
- ▶ SPB(샘플 정제 비드)
- ▶ RSB(재현탁 완충액)
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실
- ▶ 96웰 MIDI 플레이트(1~2)
- ▶ [선택사항] 96웰 PCR플레이트



주의

최적의 에세이 성능을 위해 적합한 유형의 플레이트가 필요합니다. 이 단계 후에 프로토콜을 계속 진행하려면 MIDI 플레이트를 사용하십시오. 이 단계 후에 샘플을 보관하려면 PCR 플레이트를 사용하십시오. 자세한 내용은 **11페이지**의 **준비**를 참조하십시오.

시약 정보

- ▶ 사용 전에 각 SPB를 교반합니다.
- ▶ 비드가 고르게 분포되도록 자주 SPB를 교반합니다.
- ▶ 용액의 점도로 인해 SPB를 천천히 흡입하고 공급합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
SPB	2°C~8°C	실온에 둡니다. SPB 사용 전에 1분간 교반합니다.
RSB	2°C~8°C 또는 -25°C~-15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C~-15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 사용 전 교반합니다.

- 2 새 96웰 MIDI 플레이트에 BIND1 라벨을 붙입니다.
- 3 새 96웰 MIDI 플레이트에 PCF(정제된 cDNA 분절) 라벨을 붙입니다.
 - ▶ [선택사항] 이 단계 후에 플레이트를 보관하려면 새 96웰 PCR 플레이트를 사용하십시오.
- 4 새로운 80% EtOH를 준비합니다.

절차

결합

- 1 유전자 증폭기에서 CF 플레이트를 제거합니다.
- 2 BIND1 플레이트의 각 웰에 90µl의 SPB를 추가합니다.
- 3 CF 플레이트에서 각 샘플 50µl를 BIND1 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.
- 4 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 흔들립니다.
- 5 실온에서 5분 동안 배양합니다.

세척

- 1 5분 동안 자석 스탠드에 BIND1 플레이트를 올려놓습니다.
- 2 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 3 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자석 스탠에 올려둔 상태에서 새로운 80% EtOH 200µl를 추가합니다.
 - b 30초간 기다린 후 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 4 3단계(a~b)를 반복하여 두 번째 세척을 수행합니다.



참고

최적의 에세이 성능을 위해 2번의 세척이 필요합니다.

- 5 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거합니다.

용출

- 1 자석 스탠드에서 BIND1 플레이트를 제거합니다.
- 2 22µl의 RSB를 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 2분간 1500rpm으로 흔들니다.
- 4 실온에서 2분 동안 배양합니다.
- 5 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 6 BIND1 플레이트의 각 웰에서 PCF 플레이트의 해당 웰로 20µl의 용출액을 전송합니다.
- 7 PCF 플레이트의 각 웰에 30µl의 RSB를 추가한 다음 피펫 작업을 수행하여 섞습니다(최소 10회).
- 8 14페이지의 *End Repair 및 A-Tailing 수행*을 진행하거나 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 보관합니다.



팁

DNA 라이브러리도 준비 중인 경우 정제된 cDNA 분절과 전단 DNA 샘플을 동일한 플레이트에 보관할 수 있습니다. 웰에 라벨을 붙이십시오. 자세한 내용은 12페이지의 *분절 gDNA* 의 준비 섹션을 참조하십시오.

안전한 중지 시점

중지할 경우에는 PCR 플레이트에 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 280 x g에서 짧게 원심분리를 실시합니다. 하룻밤 동안 2°C~8°C에서 보관하거나 최대 7일간 -25°C~-15°C에서 보관합니다.

분절 gDNA

이 프로세스는 Covaris 집중식 초음파분쇄기를 사용하여 gDNA를 90~250bp의 분절 크기로 최적으로 분절합니다. Covaris 전단은 돌출부가 3’ 또는 5’ 인 dsDNA 분절을 생성합니다.

정제된 RNA로만 작업 중이라면 이 단계를 건너뛰고 바로 14페이지의 *End Repair 및 A-Tailing 수행*으로 진행합니다.

소모품

- ▶ TEB(TE 완충제)
- ▶ Covaris 8마이크로튜브 스트립
- ▶ 96웰 MIDI 플레이트
- ▶ [선택사항] 96웰 PCR 플레이트



주의

최적의 에세이 성능을 위해 적합한 유형의 플레이트가 필요합니다. 이 단계 후에 프로토콜을 계속 진행하려면 MIDI 플레이트를 사용하십시오. 이 단계 후에 샘플을 보관하려면 PCR 플레이트를 사용하십시오. 자세한 내용은 13페이지의 *준비*를 참조하십시오.



팁

RNA 샘플에서 cDNA 라이브러리를 준비 중인 경우 정제된 cDNA 분절과 전단 DNA 샘플을 PCF 플레이트에 보관할 수 있습니다. 웰에 라벨을 붙이십시오. 자세한 내용은 13페이지의 *준비*를 참조하십시오.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
TEB	2°C~8°C	실온에 둡니다. 뒤집어서 혼합합니다.

2 제조업체의 지침에 따라 Covaris 기기를 켜고 설정합니다. 이 기기에서 기체를 제거하는 데에는 최대 1시간이 소요됩니다.

3 다음 플레이트 옵션 중 하나를 선택하십시오.

- ▶ gDNA만 처리하려면 새로운 96웰 MIDI 플레이트를 사용하십시오.
- ▶ cDNA 샘플을 동시에 처리하려면 **10페이지의 cDNA 세척**에 나온 PCF 플레이트를 계속 사용하십시오.
- ▶ [선택사항] 이 단계 후에 전단 gDNA를 보관하려면 96웰 PCR 플레이트를 사용하십시오.

4 플레이트에 LP(라이브리리 준비) 라벨을 붙입니다(또는 라벨을 다시 부착).

5 실온에서 gDNA 샘플을 해동합니다. 뒤집어서 혼합합니다.

6 샘플을 정성화 또는 정량화하려면 1페이지의 **1페이지의 RNA/DNA 인풋 권장사항**을 참조하십시오.

7 정제된 각 DNA 샘플을 3.3 ng/μl~10ng/μl 농도의 TEB에 희석합니다.

절차

1 희석되고 정제된 각 gDNA 샘플 12μl를 Covaris 8마이크로튜브 스트립에 추가합니다.

2 40μl의 TEB를 각 샘플에 추가합니다.



팁

LE220 Covaris 기기를 사용 중이라면 최적의 성능을 위해 사용하지 않은 Covaris 8마이크로튜브 스트립 웰을 52μl의 물로 채웁니다.

3 피펫 작업을 수행하여 섞습니다.

4 알루미늄 포장지로 마이크로튜브 스트립을 밀봉합니다.

5 짧게 원심분리를 실시합니다.

6 Covaris E220evolution 또는 LE220 모델을 사용하는 경우 다음 설정을 사용하여 gDNA를 분절합니다. 다른 Covaris 모델을 사용 중이라면 TruSight Tumor 170 지원 페이지를 참조하십시오.

설정	E220evolution	LE220
최대 입사 전력	175W	450W
충격 계수	10%	30%
버스트당 주기	200	200
치료 시간	280초	250초
온도	7°C	7°C
증폭기	예	해당 없음

7 각 전단 gDNA 샘플 50μl를 LP 플레이트(cDNA를 동시에 처리하는 경우 PCF 플레이트)의 해당 웰로 전송합니다.

8 [선택사항] PCF 플레이트가 midi 플레이트이며 이 단계 후에 보관할 계획이라면 cDNA 50μl 및 전단 gDNA 샘플 50μl를 새로운 96웰 PCR 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.

- ▶ 플레이트에 LP 라벨을 붙입니다.



팁

전단 gDNA 샘플을 LP 플레이트(피펫 20µl + 20µl + 10µl)로 전송할 때 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용할 수 있습니다.

안전한 중지 시점

중지할 경우에는 PCR 플레이트에 마이크로실 'B' 를 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리를 실시합니다. 하룻밤 동안 2°C~8°C에서 보관하거나 최대 7일간 -25°C~-15°C에서 보관합니다.

End Repair 및 A-Tailing 수행

이 프로세스는 분절로 인한 돌출부를 End Repair A-Tailing 마스터 믹스(ERA1)를 사용해 무딘 말단으로 변환합니다. 이 믹스의 3' -5' 핵산 말단 분해효소 활동은 3' 돌출부를 제거하며 5' -3' 중합효소 활동은 5' 돌출부를 채웁니다. 3' 말단은 이 반응 중에 A-Tailing되어 어댑터 결합 반응 동안 서로 결합되는 것을 방지합니다.

소모품

- ▶ ERA1-A(End Repair A-tailing 효소 믹스 1)
- ▶ ERA1-B(End Repair A-tailing 완충제 1)
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실
- ▶ 1.7ml 미량원심분리기 튜브
- ▶ [선택사항] 96웰 MIDI 플레이트



주의

gDNA 및/또는 cDNA 샘플 보관에 PCR 플레이트가 사용된 경우 14페이지의 준비/중 4단계에 있는 플레이트 전송 지침을 따르십시오.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
ERA1-A	-25°C~-15°C	얼음 위에 둡니다. 짧게 원심분리 후 피펫 작업을 수행하여 섞습니다.
ERA1-B	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 짧게 원심분리 후 피펫 작업을 수행하여 섞습니다. 결정이 있으면 손으로 튜브를 데운 다음 피펫 작업을 수행하여 결정이 용해될 때까지 섞습니다.

- 2 cDNA 및 전단 gDNA를 실온에 둡니다.
- 3 cDNA와 gDNA가 별도의 midi 플레이트에 보관되어 있으면 모든 샘플을 동일한 midi 플레이트로 옮깁니다.
- 4 [선택사항] cDNA 및/또는 전단 gDNA가 96웰 PCR 플레이트에 보관되어 있으면 50µl의 cDNA 및/또는 전단 gDNA 샘플을 새로운 단일 96웰 midi 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.
- 5 midi 플레이트에 LP2(라이브러리 준비 2) 라벨을 붙입니다(또는 라벨을 다시 부착).
- 6 다음과 같이 midi 히트 블록 인서트로 Hybex 인큐베이터 2개를 예약합니다.
 - ▶ Hybex 인큐베이터 하나를 30°C로 예약합니다.
 - ▶ Hybex 인큐베이터 하나를 72°C로 예약합니다.

절차

1 다음 시약을 미량원심분리기 튜브에서 결합해 ERA1 마스터 믹스를 만듭니다.

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

- ▶ 최소 3개의 샘플을 준비합니다.
 - ▶ 사용 후 남아 있는 모든 마스터 믹스를 폐기합니다.
- 2 피펫 작업을 수행해(최소 10회) 섞은 후 ERA1 마스터 믹스를 얼음 위에 놓아둡니다.
 - 3 LP2 플레이트의 각 샘플에 10µl의 ERA1 마스터 믹스를 추가합니다.
 - 4 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
 - 5 30°C의 Hybex 인큐베이터에서 30분간 배양합니다.
 - 6 즉시 72°C의 다른 Hybex 인큐베이터로 전송하여 20분간 배양합니다.
 - 7 플레이트를 얼음 위에 5분간 놓아둡니다.

어댑터 연결

이 프로세스는 어댑터를 cDNA 및/또는 gDNA 분절의 말단에 연결합니다.

소모품

- ▶ ALB1(어댑터 결합 완충제 1)
- ▶ SUA1(짧은 범용 어댑터 1)
- ▶ STL(중지 결합 완충제)
- ▶ LIG3(DNA 연결효소 3)
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ ALB1은 점도가 매우 높습니다. 기포가 생기지 않도록 천천히 피펫 작업을 수행합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
ALB1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
SUA1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
STL	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
LIG3	-25°C~-15°C	얼음 위에 둡니다. 짧게 원심분리 후 피펫 작업을 수행하여 섞습니다.

절차

- 1 60µl의 ALB1을 각 웰에 추가합니다.
- 2 5µl의 LIG3을 각 웰에 추가합니다.
- 3 SUA1을 최소 10초간 교반합니다.
- 4 10µl의 SUA1을 각 웰에 추가합니다.
- 5 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔들니다.
- 6 실온에서 30분 동안 배양합니다.
- 7 5µl의 STL을 추가합니다.
- 8 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔들니다.

결찰 세척

이 프로세스는 SPB를 사용하여 cDNA 또는 gDNA 분절을 정제하고 원치 않는 산물을 제거합니다.

소모품

- ▶ 새로 준비한 80% 에탄올(EtOH)
- ▶ SPB(샘플 정제 비드)
- ▶ RSB(재현탁 완충액)
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ 사용 전에 각 SPB를 교반합니다.
- ▶ 비드가 고르게 분포되도록 자주 SPB를 교반합니다.
- ▶ 현탁액의 점도로 인해 SPB를 천천히 흡입하고 공급합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
SPB	2°C~8°C	실온에 둡니다. SPB 사용 전에 1분간 교반합니다.
RSB	2°C~8°C 또는 -25°C~-15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C~-15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 사용 전 교반합니다.

- 2 새 96웰 PCR 플레이트에 LS(라이브러리 샘플) 라벨을 붙입니다.
- 3 새로운 80% EtOH를 준비합니다.

절차

결합

- 1 LP2 플레이트의 각 웰에 112µl의 SPB를 추가합니다.

- 2 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 흔들니다.
- 3 실온에서 5분 동안 배양합니다.

세척

- 1 10분 동안 자석 스탠드에 LP2 플레이트를 올려놓습니다.
- 2 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 3 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자석 스탠드에 올려둔 상태에서 새로운 80% EtOH 200 μ l를 추가합니다.
 - b 30초간 기다린 후 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 4 3단계(a~b)를 반복하여 두 번째 세척을 수행합니다.



참고

최적의 에세이 성능을 위해 2번의 세척이 필요합니다.

- 5 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거합니다.

용출

- 1 자석 스탠드에서 제거합니다.
- 2 27.5 μ l의 RSB를 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1500rpm으로 흔들니다.
- 4 실온에서 2분 동안 배양합니다.
- 5 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 6 LP2 플레이트에서 각 용출 25 μ l를 LS 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.

인덱스 PCR

이 단계에서는 샘플 다중화를 위해 인덱스 시퀀스를 추가하는 프라이머를 사용하여 cDNA 및/또는 gDNA 분절이 증폭됩니다. 결과로 얻어지는 산물에는 클러스터 생성에 필요한 시퀀스와 어댑터가 측면에 배치된 DNA 분절이 포함됩니다.

소모품

- ▶ EPM(향상된 PCR 믹스)
- ▶ UPXX(고유한 인덱스 프라이머 믹스), 35페이지의 [키트 내용물 참조](#)
- ▶ CPXX(조합 인덱스 프라이머 믹스), 35페이지의 [키트 내용물 참조](#)
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
EPM	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
UPXX	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
CPXX	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

2 RNA 라이브러리당 1개의 UPXX 인덱스 프라이머 믹스 및 DNA 라이브러리당 1개의 CPXX 인덱스 프라이머 믹스를 할당합니다(XX = 인덱스 프라이머 믹스 번호).

- ▶ UPXX 인덱스 프라이머 믹스는 DNA 라이브러리와 함께 사용할 수도 있습니다.
- ▶ CPXX 인덱스 프라이머 믹스를 RNA 라이브러리와 함께 사용하지 마십시오.
- ▶ 로우플렉스 시퀀싱 실행은 충분한 다양성을 제공할 수 있도록 다음 UPXX 인덱스 프라이머 세트 중 1개를 포함하는 라이브러리 3개를 사용해야 합니다.
로우플렉스 실행을 위해 다음 인덱스 프라이머 세트 중 1개를 선택합니다.
 - ▶ [UP01,UP02,UP03]
 - ▶ [UP04,UP05,UP06]
 - ▶ [UP07,UP08,UP09]
 - ▶ [UP10,UP11,UP12]

자세한 내용은 35페이지의 **키트 내용물**을 참조하십시오.



주의

단일 플로우 셀에서 여러 라이브러리를 시퀀싱할 경우 각 라이브러리 샘플에 다른 인덱싱 프라이머 믹스를 할당하십시오.



주의

인덱싱 프라이머를 처리할 때는 교차 오염을 방지하십시오. 인덱싱 프라이머 믹스 튜브가 열린 후에는 원래의 튜브 캡을 폐기하고 새 튜브 캡을 사용합니다.



주의

UPXX 인덱스 프라이머 믹스를 RNA 라이브러리에만 할당해야 합니다. CPXX 인덱스 프라이머 믹스를 RNA 라이브러리에 할당하면 성능이 저하될 수 있습니다.

3 증폭 후 구역에서, 다음 프로그램을 가열 뚜껑이 포함된 유전자 증폭기에서 I-PCR로 저장합니다.

- ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
- ▶ 반응 용량을 50µl로 설정합니다.
- ▶ 98°C에서 30초간
- ▶ 15주기:
 - ▶ 98°C에서 10초간
 - ▶ 60°C에서 30초간
 - ▶ 72°C에서 30초간
- ▶ 72°C에서 5분간
- ▶ 10°C에서 유지

절차

- 1 5µl의 인덱싱 프라이머 믹스(UPXX 또는 CPXX)를 LS 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
(인덱싱 프라이머 믹스에 대한 자세한 내용은 17페이지의 **준비**를 참조하십시오.)
- 2 20µl의 EPM을 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 1분간 1500rpm으로 플레이트를 흔듭니다.



주의

증폭 후 구역에서 다음 단계를 수행하여 증폭 산물이 잔류하는 것을 방지합니다.

- 4 280 x g로 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 5 사전에 프로그래밍된 유전자 증폭기에 넣고 I-PCR 프로그램을 실행합니다.
- 6 I-PCR 프로그램이 완료된 후 플레이트에 ALS(증폭된 라이브러리 샘플) 라벨을 다시 붙입니다.

7 짧게 원심분리를 실시합니다.

안전한 중지 시점

중지할 경우에는 PCR 플레이트에 마이크로실 'B' 를 적용하고 280 x g에서 짧게 원심분리를 실시합니다. 하룻밤 동안 2°C~8°C에서 보관하거나 최대 30일간 -25°C~-15°C에서 보관합니다.

1차 혼성화 수행

이 프로세스 중에 TruSight Tumor 170에 의해 표적화된 170개의 유전자에 특정한 올리고 풀이 17페이지의 인덱스 PCR 중에 생성된 RNA 및/또는 DNA 라이브러리로 혼성화됩니다. 목표 영역의 Enrichment를 보장하기 위해 두 개의 혼성화 단계가 필요합니다. 이 단계에서 1차 혼성화는 하룻밤 동안 수행됩니다(8~24시간).

소모품

- ▶ TCA1(목표 캡처 첨가제 1)
- ▶ TCB1(목표 캡처 완충제 1)
- ▶ OPR1(종양학 프로브 RNA 1[빨간색 캡])
- ▶ OPD1(종양학 프로브 DNA 1[파란색 캡])
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ RNA 라이브러리에만 OPR1을 사용합니다(빨간색 캡).
- ▶ DNA 라이브러리에만 OPD1을 사용합니다(파란색 캡).

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
TCB1	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 1분간 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다. 결정이 있으면 손으로 튜브를 데운 다음 결정이 용해될 때까지 교반합니다.
TCA1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
OPR1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
OPD1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

2 ALS 플레이트가 -25°C ~ -15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 원심분리합니다.

3 새 96웰 PCR 플레이트에 HYB1(혼성화 1) 라벨을 붙입니다.

4 다음 프로그램을 가열 뚜껑이 있는 유전자 증폭기에서 HYB1로 저장합니다.

- ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
- ▶ 반응 용량을 50µl로 설정합니다.
- ▶ 95°C에서 10분간
- ▶ 85°C에서 2.5분간
- ▶ 75°C에서 2.5분간
- ▶ 65°C에서 2.5분간
- ▶ 57°C에서 유지

절차

- 1 각 RNA 및/또는 DNA 라이브러리의 20µl를 HYB1 플레이트에 추가합니다.
- 2 15µl의 TCB1을 각 웰에 추가합니다.
- 3 10µl의 TCA1을 각 웰에 추가합니다.
- 4 적합한 프로브를 추가합니다.
 - ▶ RNA 라이브러리의 경우 5µl의 OPR1(빨간색 캡)을 추가합니다.
 - ▶ DNA 라이브러리의 경우 5µl의 OPD1(파란색 캡)을 추가합니다.
- 5 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 6 사전에 프로그래밍된 유전자 증폭기에 넣고 HYB1 프로그램을 실행합니다. 57°C에서 하룻밤 동안(최소 8시간, 최대 24시간) 혼성화합니다.

1차 캡처 수행

이 단계는 관심 있는 목표 영역으로 혼성화된 프로브를 캡처하기 위해 SMB(스트렙타비딘 자성 비드)를 사용합니다. EEW2를 사용한 3회의 가열 세척은 비드에서 비특정 결합을 제거합니다. 그런 다음 강화 라이브러리가 비드로부터 용출되어 2차 혼성화를 위해 준비됩니다.

소모품

- ▶ SMB(스트렙타비딘 자성 비드)
- ▶ ET2(용출 목표 완충제 2)
- ▶ EE2(Enrichment 용출 2)
- ▶ HP3(2 N NaOH)
- ▶ EEW2(향상된 Enrichment 세척 2)
- ▶ 96웰 MIDI 플레이트
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ 이 절차를 위해 SPB가 **아닌** SMB를 사용해야 합니다.
- ▶ SMB를 자주 교반하여 비드가 부유 상태를 유지하도록 합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
EE2	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
EEW2	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 1분간 교반합니다.
SMB	2°C~8°C	실온에 둡니다. 1분간 교반합니다. 비드 펠릿이 있으면 펠릿을 방출하기 위해 상하 방향으로 피펫 작업을 수행한 다음 재부유되도록 교반합니다.
ET2	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
HP3	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

- 2 MIDI 히트 블록 인서트로 Hybex 인큐베이터를 57°C로 예열합니다.
- 3 새 96웰 MIDI 플레이트에 CAP1 라벨을 붙입니다.
- 4 새 96웰 PCR 플레이트에 ELU1(용출 1) 라벨을 붙입니다.

절차

결합

- 1 유전자 증폭기에서 HYB1 플레이트를 제거합니다.
- 2 CAP1 플레이트의 각 웰에 150µl의 SMB를 추가합니다.
- 3 HYB1 플레이트에서 각 라이브러리 50µl를 CAP1 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.
- 4 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 5 57°C의 Hybex 인큐베이터에서 25분간 배양합니다.
- 6 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 7 자석 스탠드에 둔 상태에서 피펫을 사용하여 상층액을 분리하여 폐기합니다.

세척

- 1 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자석 스탠드에서 CAP1 플레이트를 제거합니다.
 - b 200µl의 EEW2를 각 웰에 추가합니다.
 - c 피펫 작업을 수행하여 5번 섞습니다. 각 라이브러리에 깨끗한 팁을 사용합니다.
 - d 마이크로실 'B' 를 적용하고 4분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
여전히 비드 펠릿이 있으면 마이크로실을 제거하고 피펫 작업으로 섞어서 모든 비드가 재부유하도록 합니다. 새 마이크로실 'B' 를 적용합니다.
 - e 57°C의 Hybex 인큐베이터에서 5분간 배양합니다.
 - f 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
 - g 자석 스탠드에 둔 상태에서 피펫을 사용하여 각 웰에서 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 2 1단계(a~g)를 반복하여 두 번째 세척을 수행합니다.
- 3 1단계(a~g)를 반복하여 세 번째 세척을 수행합니다.



참고

최적의 에세이 성능을 위해 3번의 세척이 필요합니다.

- 4 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거합니다.

용출

- 1 다음 시약을 미량원심분리기 튜브에서 결합해 EE2+HP3 용출 믹스를 만듭니다.

용출 믹스 구성요소	샘플 3개당	샘플 8개당	샘플 16개당	샘플 24개당
EE2	95µl	228µl	456µl	684µl
HP3	5µl	12µl	24µl	36µl

- ▶ 최소 3개의 샘플을 준비합니다.

- ▶ 사용 후 남아 있는 모든 용출 믹스를 폐기합니다.
- 2 짧게 교반하여 섞습니다.
- 3 자석 스탠드에서 CAP1 플레이트를 제거합니다.
- 4 각 샘플 웰릿에 17 μ l의 EE2+HP3 용출 믹스를 추가합니다.
- 5 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 6 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 7 CAP1 플레이트의 각 웰에서 ELU1 플레이트로 15 μ l의 용출액을 조심스럽게 전송합니다.



주의

지정된 양에 못 미치는 용량의 용출액을 전송하면 에세이 성능에 영향을 미칠 수 있습니다.

- 8 ELU1 플레이트의 각 용출액에 5 μ l의 ET2를 추가합니다.
- 9 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.

2차 혼성화 수행

이 단계는 강화 RNA 및/또는 DNA 라이브러리의 목표 영역을 캡처 프로브와 재차 결합시킵니다. 2차 혼성화는 캡처된 영역의 높은 특이성을 보장합니다. 최적의 라이브러리 Enrichment를 보장하려면 최소 1.5시간에서 최대 4시간 동안 2차 혼성화 단계를 수행해야 합니다.

소모품

- ▶ TCA1(목표 캡처 첨가제 1)
- ▶ TCB1(목표 캡처 완충제 1)
- ▶ OPR1(종양학 프로브 RNA 1[빨간색 캡])
- ▶ OPD1(종양학 프로브 DNA 1[파란색 캡])
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ RNA 라이브러리에만 OPR1을 사용합니다(빨간색 캡).
- ▶ DNA 라이브러리에만 OPD1을 사용합니다(파란색 캡).

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
TCB1	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 1분간 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다. 결정이 있으면 손으로 튜브를 데운 다음 결정이 용해될 때까지 교반합니다.
TCA1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
OPR1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
OPD1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

- 2 다음 프로그램을 가열 뚜껑이 있는 유전자 증폭기에서 HYB2로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
 - ▶ 반응 용량을 50µl로 설정합니다.
 - ▶ 95°C에서 10분간
 - ▶ 85°C에서 2.5분간
 - ▶ 75°C에서 2.5분간
 - ▶ 65°C에서 2.5분간
 - ▶ 57°C에서 유지

절차

- 1 ELU1 플레이트의 각 웰에 15µl의 TCB1을 추가합니다.
- 2 10µl의 TCA1을 각 웰에 추가합니다.
- 3 적합한 프로브를 추가합니다.
 - ▶ RNA 라이브러리의 경우 5µl의 OPR1(빨간색 캡)을 추가합니다.
 - ▶ DNA 라이브러리의 경우 5µl의 OPD1(파란색 캡)을 추가합니다.
- 4 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 5 사전에 프로그래밍된 유전자 증폭기에 넣고 HYB2 프로그램을 실행합니다. 57°C에서 최소 1.5시간, 최대 4시간 동안 혼성화합니다.

2차 캡처 수행

이 단계는 관심 있는 목표 영역으로 혼성화된 프로브를 캡처하기 위해 SMB(스트렙타비딘 자성 비드)를 사용합니다. RSB는 포착된 라이브러리를 세척하고 비드에서 비특정 결합을 제거하는 데 사용됩니다. 그런 다음 강화 라이브러리가 비드로부터 용출되어 시퀀싱을 위해 준비됩니다.

소모품

- ▶ SMB(스트렙타비딘 자성 비드)
- ▶ ET2(용출 목표 완충제 2)
- ▶ Ee2(Enrichment 용출 2)
- ▶ HP3(2 N NaOH)
- ▶ RSB(재현탁 완충액)
- ▶ 96웰 MIDI 플레이트
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ 이 절차를 위해 SPB가 **아닌** SMB를 사용해야 합니다.
- ▶ SMB를 자주 교반하여 비드가 부유 상태를 유지하도록 합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
EE2	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
SMB	2°C~8°C	실온에 둡니다. 1분간 교반합니다. 비드 펠릿이 있으면 펠릿을 방출하기 위해 상하 방향으로 피펫 작업을 수행한 다음 재부유되도록 교반합니다.
ET2	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
HP3	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
RSB	2°C~8°C 또는 -25°C~-15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C~-15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 사용 전 교반합니다.

2 MIDI 히트 블록 인서트로 Hybex 인큐베이터를 57°C로 예열합니다.

3 새 96웰 midi 플레이트에 CAP2 라벨을 붙입니다.

4 새 96웰 PCR 플레이트에 ELU2(용출 2) 라벨을 붙입니다.

절차

결합

- 1 유전자 증폭기에서 ELU1 플레이트를 제거합니다.
- 2 CAP2 플레이트의 각 웰에 150µl의 SMB를 추가합니다.
- 3 ELU1 플레이트에서 각 라이브러리 50µl를 CAP2 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.
- 4 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 5 57°C의 Hybex 인큐베이터에서 25분간 배양합니다.
- 6 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 7 자석 스탠드에 둔 상태에서 피펫을 사용하여 각 웰에서 상층액을 조심스럽게 분리하여 폐기합니다.

세척

- 1 자석 스탠드에서 CAP2 플레이트를 제거합니다.
- 2 200µl의 RSB를 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 'B' 를 적용하고 4분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다. 여전히 비드 펠릿이 있으면 마이크로실을 제거하고 피펫 작업으로 섞어서 모든 비드가 재부유하도록 합니다. 새 마이크로실 'B' 를 적용합니다.
- 4 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 5 자석 스탠드에 둔 상태에서 피펫을 사용하여 상층액을 조심스럽게 분리하여 폐기합니다.
- 6 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거합니다.

용출

- 1 다음 시약을 미량원심분리기 튜브에서 결합해 신선한 EE2+HP3 용출 믹스를 만듭니다.

용출 믹스 구성요소	샘플 3개당	샘플 8개당	샘플 16개당	샘플 24개당
EE2	95µl	228µl	456µl	684µl
HP3	5µl	12µl	24µl	36µl

- ▶ 최소 3개의 샘플을 준비합니다.
- ▶ 사용 후 남아 있는 모든 용출 믹스를 폐기합니다.

- 2 교반하여 섞습니다.
- 3 자석 스탠드에서 CAP2 플레이트를 제거합니다.
- 4 각 샘플 웰릿에 22µl의 EE2+HP3 용출 믹스를 추가합니다.
- 5 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.
- 6 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 7 CAP2 플레이트의 각 웰에서 ELU2 플레이트로 20µl의 용출액을 전송합니다.



주의

지정된 양에 못 미치는 용량의 용출액을 전송하면 에세이 성능에 영향을 미칠 수 있습니다.

- 8 ELU2 플레이트의 각 용출액에 5µl의 ET2를 추가합니다.
- 9 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 플레이트를 흔듭니다.

안전한 중지 시점

중지할 경우에는 PCR 플레이트에 마이크로실 'B' 를 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리를 실시합니다. 하룻밤 동안 2°C~8°C에서 보관하거나 최대 7일간 -25°C~-15°C에서 보관합니다.

강화 라이브러리 증폭

이 단계에서는 프라이머를 사용해 강화된 라이브러리를 증폭시킵니다.

소모품

- ▶ PPC3(PCR 프라이머 카테일 3)
- ▶ EPM(향상된 PCR 믹스)
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
EPM	-25°C~-15°C	얼음 위에서 해동합니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
PPC3	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

- 2 ELU2 플레이트가 -25°C~-15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 원심분리합니다.
- 3 다음 프로그램을 가열 뚜껑이 있는 유전자 증폭기에서 EL-PCR로 저장합니다.
 - ▶ 예열된 뚜껑 옵션을 선택하고 100°C로 설정합니다.
 - ▶ 반응 용량을 50µl로 설정합니다.
 - ▶ 98°C에서 30초간

- ▶ 18주기:
 - ▶ 98°C에서 10초간
 - ▶ 60°C에서 30초간
 - ▶ 72°C에서 30초간
- ▶ 72°C에서 5분간
- ▶ 10°C에서 유지

절차

- 1 ELU2 플레이트의 각 웰에 5µl의 PPC3을 추가합니다.
- 2 20µl의 EPM을 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1500rpm으로 플레이트를 흔들니다.
- 4 280 x g로 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 5 유전자 증폭기에 넣고 EL-PCR 프로그램을 실행합니다.

증폭된 강화 라이브러리 세척

이 단계는 SPB(샘플 정제 비드)를 사용하여 원치 않는 반응 구성요소에서 강화 라이브러리를 정제합니다.

소모품

- ▶ 새로 준비한 80% 에탄올(EtOH)
- ▶ SPB(샘플 정제 비드)
- ▶ RSB(재현탁 완충액)
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 96웰 MIDI 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실

시약 정보

- ▶ 사용 전에 각 SPB를 교반합니다.
- ▶ 비드가 고르게 분포되도록 자주 SPB를 교반합니다.
- ▶ 용액의 점도로 인해 SPB를 천천히 흡입하고 공급합니다.

준비

- 1 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
SPB	2°C~8°C	실온에 둡니다. SPB 사용 전에 1분간 교반합니다.
RSB	2°C~8°C 또는 -25°C~-15°C	실온에 둡니다. RSB가 -25°C~-15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 사용 전 교반합니다.

- 2 새 96웰 MIDI 플레이트에 BIND2 라벨을 붙입니다.
- 3 새 96웰 PCR 플레이트에 PL(정제된 라이브러리) 라벨을 붙입니다.
- 4 새로운 80% EtOH를 준비합니다.

절차

결합

- 1 유전자 증폭기에서 ELU2 플레이트를 제거합니다.
- 2 BIND2 플레이트의 각 웰에 110 μ l의 SPB를 추가합니다.
- 3 ELU2 플레이트에서 각 라이브러리 50 μ l를 BIND2 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.
- 4 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 흔들립니다.
- 5 실온에서 5분 동안 배양합니다.

세척

- 1 5분 동안 자석 스탠드에 BIND2 플레이트를 올려놓습니다.
- 2 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 3 다음과 같이 세척합니다.
 - a 자석 스탠드에 올려둔 상태에서 새로운 80% EtOH 200 μ l를 추가합니다.
 - b 30초간 기다린 후 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.
- 4 3단계(a~b)를 반복하여 두 번째 세척을 수행합니다.



참고

최적의 에세이 성능을 위해 2번의 세척이 필요합니다.

- 5 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거합니다.

용출

- 1 자석 스탠드에서 BIND2 플레이트를 제거합니다.
- 2 32 μ l의 RSB를 각 웰에 추가합니다.
- 3 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 흔들립니다.
- 4 실온에서 2분 동안 배양합니다.
- 5 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 6 BIND2 플레이트에서 각 용출 30 μ l를 PL 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.

안전한 중지 시점

중지할 경우에는 PCR 플레이트에 마이크로실 'B' 를 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리를 실시합니다. 하룻밤 동안 2°C~8°C에서 보관하거나 최대 30일간 -25°C~-15°C에서 보관합니다.

라이브러리 정량화

플로우 셀의 클러스터링에 사용 가능한 라이브러리가 충분히 확보되도록 정확하게 정량화하십시오. 라이브러리 정규화 전에 형광 정량화 방법(사용자 공급)을 사용하여 강화 라이브러리의 수량을 평가합니다. 효과적인 비드 기반 라이브러리 정규화를 위해서는 3ng/ μ l 이상의 각 라이브러리가 필요합니다. AccuClear 초고감도 dsDNA 정량화 키트는 이 프로토콜로 라이브러리를 정량화하는 데 효과적이라는 것이 입증되었습니다.

권장 지침

- 1 형광 정량화 키트, 라이브러리, Blank 용액과 함께 제공된 DNA 표준은 모두 세 번 실행되어야 합니다.
- 2 각각에 대한 평균 RFU(상대 형광 단위)를 결정합니다.
- 3 다음 값을 계산합니다.
 - ▶ 평균 표준 RFU – 평균 Blank RFU = 정규화된 표준 RFU
 - ▶ 평균 라이브러리 RFU – 평균 Blank RFU = 각 라이브러리에 대해 정규화된 RFU

수량 평가

결과로 얻어지는 각 라이브러리에 대해 정규화된 RFU를 다음 조건에 대해 평가합니다.

형광 측정	권고사항
평균 Blank RFU 이하	정제된 DNA 또는 RNA 샘플이 수량 및 품질 사양을 충족하는 경우 라이브러리 준비 및 Enrichment를 반복합니다.
평균 Blank RFU를 초과하며 정규화된 표준 RFU 미만입니다.	라이브러리 정규화 로 진행합니다. 참고: RFU가 정규화된 표준 RFU에 못 미치는 라이브러리를 사용하면 샘플에 존재할 수도 있는 이형을 확실하게 호출하는 데 필요한 시퀀싱 결과를 충분하게 도출하지 못할 수도 있습니다.
정규화된 표준 RFU 이상	라이브러리 정규화 로 진행합니다.

라이브러리 정규화

이 프로세스는 비드 기반 정규화를 사용하여 각 라이브러리의 양을 정규화하여 풀링된 라이브러리에 동일한 라이브러리가 표시되도록 합니다.

수동 라이브러리 정규화는 현재 TruSight Tumor 170에서 지원되지 않습니다. 수동으로 라이브러리를 정규화하려면 Illumina 기술 지원팀에 문의하십시오.

소모품

- ▶ LNA1(라이브러리 정규화 첨가제 1)
- ▶ LNB1(라이브러리 정규화 비드 1)
- ▶ LNW1(라이브러리 정규화 세척액 1)
- ▶ LNS2(라이브러리 정규화 보관 2)
- ▶ HP3(2N NaOH)
- ▶ PCR 등급수
- ▶ 96웰 PCR 플레이트
- ▶ 96웰 MIDI 플레이트
- ▶ 마이크로실 'B' 접착 실
- ▶ 1.7ml 미량원심분리기 튜브 (2)

시약 정보

- ▶ 비드가 고르게 분포되도록 자주 LNB1을 교반합니다.

준비

1 다음 소모품을 준비합니다.

시약	보관조건	지침
LNA1	-25°C~-15°C	해동하여 실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
LNS2	15°C~30°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.
LNB1	2°C~8°C	실온에 둡니다. 비드가 고르게 분포되도록 1분간 교반합니다. LNB1 펠릿을 상하방향으로 피펫 작업을 수행하여 재부유되도록 합니다.
LNW1	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다.
HP3	2°C~8°C	실온에 둡니다. 재부유시키기 위해 교반합니다. 짧게 원심분리를 실시합니다.

2 PL 플레이트가 -25°C~-15°C에서 보관된 경우 플레이트를 실온에서 해동하고 원심분리합니다.

3 새 96웰 MIDI 플레이트에 BIND3 라벨을 붙입니다.

4 새 96웰 PCR 플레이트에 NL(정규화된 라이브러리) 라벨을 붙입니다.

절차

1 다음 시약을 새로운 미량원심분리기 튜브에서 결합해 LNA1+LNB1 마스터 믹스를 만듭니다.

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

2 교반하여 섞습니다.

3 다음 시약을 새로운 미량원심분리기 튜브에서 결합해 신선한 0.1N NaOH 용액을 만듭니다.

용액 구성요소	샘플 3개당	샘플 8개당	샘플 16개당	샘플 24개당
PCR 등급수	114µl	304µl	608µl	912µl
HP3	6µl	16µl	32µl	48µl

4 교반하여 섞습니다.

결합

- 45µl의 LNA1+LNB1 마스터 믹스를 BIND3 플레이트의 각 웰에 추가합니다.
- PL 플레이트에서 각 라이브러리 20µl를 BIND3 플레이트의 해당 웰에 추가합니다.
- 마이크로실 'B' 를 적용하고 10분간 1800rpm으로 흔들립니다.
- 2분 동안 자석 스탠드에 BIND3 플레이트를 올려놓습니다.
- 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.

세척

- 다음과 같이 세척합니다.
 - 자석 스탠드에서 BIND3 플레이트를 제거합니다.
 - 45µl의 LNW1을 각 웰에 추가합니다.
 - 마이크로실 'B' 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 흔들립니다.

- d 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- e 각 웰에서 모든 상층액을 분리하여 폐기합니다.

2 1단계(a~e)를 반복하여 두 번째 세척을 수행합니다.



참고

최적의 에세이 성능을 위해 2번의 세척이 필요합니다.

3 깨끗한 팁이 달린 P20 피펫을 사용하여 각 웰에 남아 있는 상층액을 제거합니다.

용출

- 1 32µl의 0.1N NaOH 용액을 각 웰에 추가합니다.
- 2 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 2분간 1800rpm으로 흔들니다.
- 3 BIND3을 2분간 자석 스탠드에 놓아둡니다.
- 4 BIND3 플레이트에서 각 용출 30µl를 NL 플레이트의 해당 웰로 전송합니다.
- 5 NL 플레이트의 각 웰에 30µl의 LNS2을 추가합니다.
- 6 상하 방향으로 피펫 작업을 수행해 혼합합니다.

안전한 중지 시점

중지할 경우에는 PCR 플레이트에 마이크로실 ‘B’ 를 적용하고 280 × g에서 짧게 원심분리를 실시합니다. 하룻밤 동안 2°C~8°C에서 보관하거나 최대 30일간 -25°C~-15°C에서 보관합니다.

시퀀싱 준비

NextSeq 시스템에서 TruSight Tumor 170을 시퀀싱할 때 최적의 클러스터 밀도를 얻으려면 다음 절차를 따르십시오.

- ▶ 실행당 16개의 라이브러리(DNA 8개와 RNA 8개)를 시퀀싱해 각 샘플에 대한 최대 범위를 달성합니다.
- ▶ DNA 라이브러리만 시퀀싱하는 경우 샘플을 10개 넘게 포함하지 마십시오.
- ▶ RNA 라이브러리만 시퀀싱하는 경우 샘플을 16개 넘게 포함하지 마십시오.
- ▶ [선택사항] 배열 및 오류율 계산을 위해 저농도의 PhiX 제어 주입을 양성 대조군으로 추가합니다. 자세한 내용은 Illumina 웹사이트에 있는 PhiX 제어 v3 지원 페이지를 참조하십시오.

HiSeq 2500 시스템에서 TruSight Tumor 170을 시퀀싱할 때 최적의 클러스터 밀도를 얻으려면 다음 절차를 따르십시오.

- ▶ 실행당 12개의 라이브러리(DNA 6개와 RNA 6개)를 시퀀싱해 각 샘플에 대한 최대 범위를 달성합니다.
- ▶ DNA 라이브러리만 시퀀싱하는 경우 샘플을 6개 넘게 포함하지 마십시오.
- ▶ RNA 라이브러리만 시퀀싱하는 경우 샘플을 12개 넘게 포함하지 마십시오.
- ▶ [선택사항] 배열 및 오류율 계산을 위해 저농도의 PhiX 제어 주입을 양성 대조군으로 추가합니다. 자세한 내용은 Illumina 웹사이트에 있는 PhiX 제어 v3 지원 페이지를 참조하십시오.
- ▶ 다른 조합의 DNA 및 RNA 라이브러리를 시퀀싱할 경우 Illumina 기술 지원팀에 문의해 주십시오.

소모품

- ▶ 정규화된 라이브러리(NL 플레이트)
- ▶ NextSeq 500/550 높은 아웃풋 키트 v2(300주기)
- ▶ HT1(혼성화 완충제)
- ▶ HiSeq 시스템과 함께 사용하기 위한 HiSeq 시약

- ▶ HiSeq Rapid SBS 키트 v2
- ▶ HiSeq Rapid 클러스터 키트 v2- 페어드 엔드 및 단일 리드
- ▶ 미량원심분리기 튜브(스냅 및 나사식 마개)
- ▶ PhiX 제어 v3

준비

1 사용 중인 Illumina 시퀀싱 플랫폼에 따라 다음 소모품 옵션 중 1개를 선택하십시오.

- ▶ [옵션 1] NextSeq 시스템 실행을 위해 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
NextSeq 높은 아웃풋 시약 카트리지(300주기)	-25°C~-15°C	해동될 때까지 실온의 수조에 넣어 녹입니다(최대 60분).
HT1(혼성화 완충제)	-25°C~-15°C	실온에서 해동합니다. 재부유시키기 위해 교반합니다.
NextSeq 완충제 카트리지	15°C~30°C	실온에 둡니다.
NextSeq 높은 아웃풋 플로우 셀	2°C~8°C	플로우 셀 포장을 엽니다. 실온에 30분간 놓아둡니다.

- ▶ [옵션 2] HiSeq 2500 시스템 실행을 위해 다음 소모품을 준비합니다.

품목	보관조건	지침
HiSeq Rapid SBS 키트 v2	-25°C~-15°C	실온에서 해동합니다.
HT1(혼성화 완충제)	-25°C~-15°C	실온에서 해동합니다. 재부유시키기 위해 교반합니다.
HiSeq Rapid 클러스터 키트 v2- 페어드 엔드 및 단일 리드	15°C~30°C	실온에 둡니다.
이식된 HiSeq Rapid PE 플로우 셀 v2	2°C~8°C	실온 상태가 되도록 30분간 둡니다.

- 2 NL 플레이트가 -25°C ~ -15°C에서 보관된 경우 실온에서 해동하고 원심분리합니다.
- 3 히트 블록을 96°C로 예열합니다.
- 4 나사식 마개 미량원심분리기 튜브에 PRL(풀링된 RNA 라이브러리) 라벨을 붙입니다.
- 5 나사식 마개 미량원심분리기 튜브에 PDL(풀링된 DNA 라이브러리) 라벨을 붙입니다.
- 6 나사식 마개 미량원심분리기 튜브에 DIL1(희석 1) 라벨을 붙입니다.
- 7 스냅 캡 미량원심분리기 튜브에 DIL2(희석 2) 라벨을 붙입니다.

절차

라이브러리 풀링

- 1 정규화된 각 RNA 라이브러리 10µl를 NL 플레이트에서 PRL 튜브로 전송합니다.
- 2 정규화된 각 DNA 라이브러리 10µl를 NL 플레이트에서 PDL 튜브로 전송합니다.
- 3 각 튜브를 교반하여 혼합합니다.
- 4 각 튜브를 짧게 원심분리합니다.
- 5 96°C의 히트 블록에서 2분간 배양합니다.
- 6 각 튜브를 2번 뒤집어 용액을 혼합합니다.

7 짧게 원심분리 후 5분간 얼음 위에 올려둡니다.



팁

PRL 및 PDL 튜브는 $-25^{\circ}\text{C}\sim-15^{\circ}\text{C}$ 에서 최대 30일 동안 보관할 수 있습니다. 얼린 상태로 보관된 PRL 및 PDL 튜브를 사용 중인 경우 32페이지의 1차 희석 준비를 진행하기 전에 5~7단계를 반복하여 튜브를 재변성, 혼합 및 냉각 하십시오.

1차 희석 준비

동일한 수의 DNA 및 RNA 라이브러리를 시퀀싱할 경우 DNA 대 RNA 비율을 4:1로 풀링합니다. 서로 다른 수의 라이브러리 (예: DNA 7개 + RNA 3개)를 시퀀싱할 경우에는 Illumina 기술 지원 부서에 문의하십시오.

시퀀싱 중인 라이브러리 유형에 따라 다음 풀링 절차 중 하나를 선택합니다.

▶ cDNA 및 DNA 라이브러리를 동시에 시퀀싱하려면 다음을 수행합니다.

- 1 20 μl 의 PDL을 비어 있는 DIL1 튜브로 전송합니다.
- 2 5 μl 의 PRL을 DIL1에 추가합니다.
- 3 475 μl 의 HT1 완충제를 DIL1에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 4 교반하여 섞습니다.
- 5 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 6 33페이지의 NextSeq용 라이브러리 희석 또는 33페이지의 HiSeq용 라이브러리 희석을 진행합니다.

▶ DNA 라이브러리만 시퀀싱하려면 다음을 수행합니다.

- 1 10 μl 의 PDL을 비어 있는 DIL1 튜브로 전송합니다.
- 2 190 μl 의 HT1 완충제를 DIL1에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 3 교반하여 섞습니다.
- 4 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 5 33페이지의 NextSeq용 라이브러리 희석 또는 33페이지의 HiSeq용 라이브러리 희석을 진행합니다.

▶ cDNA 라이브러리만 시퀀싱하려면 다음을 수행합니다.

- 1 10 μl 의 PRL을 비어 있는 DIL1 튜브로 전송합니다.
- 2 190 μl 의 HT1 완충제를 DIL1 튜브에 추가해 1:20 희석액을 만듭니다.
- 3 교반하여 섞습니다.
- 4 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 5 33페이지의 NextSeq용 라이브러리 희석 또는 33페이지의 HiSeq용 라이브러리 희석을 진행합니다.

2차 희석 준비

사용 중인 시퀀싱 시스템에 따라 적합한 희석 프로토콜을 따릅니다.

NextSeq용 라이브러리 희석

다음 절차에 따라 NextSeq 시스템에서 사용할 샘플 라이브러리를 준비합니다.

- 1 40 μ l의 DIL1을 비어 있는 DIL2 튜브로 전송합니다.
- 2 1360 μ l의 HT1 완충제를 DIL2에 추가합니다.
- 3 [선택사항] 2.5 μ l의 변성된 20pM PhiX를 추가합니다.
- 4 교반하여 섞습니다.
- 5 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 6 *NextSeq 500 시스템 안내서(문서 번호 15046563)* 또는 *NextSeq 550 시스템 안내서(문서 번호 15069765)*에 설명된 대로 1300 μ l의 DIL2를 해동된 NextSeq 시스템 시약 카트리지에 장착합니다.

HiSeq용 라이브러리 희석

다음 절차에 따라 HiSeq 시스템에서 사용할 샘플 라이브러리를 준비합니다.

- 1 130 μ l의 DIL1을 비어 있는 DIL2 튜브로 전송합니다.
- 2 1170 μ l의 HT1 완충제를 DIL2에 추가합니다.
- 3 [선택사항] 2.5 μ l의 변성된 20pM PhiX를 추가합니다.
- 4 교반하여 섞습니다.
- 5 짧게 원심분리를 실시합니다.
- 6 DIL2 튜브의 총 용량을 HiSeq 2500 시스템의 템플레이트 장착 스테이션에 장착합니다. 시약 준비를 포함한 지침은 *HiSeq 2500 시스템 안내서(문서 번호 15035786)*를 참조하십시오.

지원 정보

소개	34
약어	34
키트 내용물	35
소모품 및 장비	37

소개

이 안내서에 설명된 프로토콜은 사용자가 이 부록의 내용을 검토하고 키트 내용물을 확인했으며 필요한 모든 소모품과 장비를 확보했음을 가정하고 작성되었습니다.

약어

약어	정의
1stSS	첫 번째 가닥 합성
2ndSS	두 번째 가닥 합성
ALS	증폭된 라이브러리 샘플
cDNA	보완적 DNA
CF	cDNA 분절
DIL1	희석 1
DIL2	희석 2
ELU1	용출 1
ELU2	용출 2
gDNA	게놈 DNA
HQ-RNA	고품질 RNA
HYB1	혼성화 1
LQ-RNA	저품질 RNA
LS	라이브러리 샘플
LP	라이브러리 준비
LP2	라이브러리 준비 2
NL	정규화된 라이브러리
PCF	정제된 cDNA 분절
PDL	풀링된 DNA 라이브러리
PL	정제된 라이브러리
PNL	풀링 및 정규화된 라이브러리
PRL	풀링된 RNA 라이브러리

키트 내용물

프로토콜을 진행하기 전에 이 섹션에서 식별된 시약이 있는지 확인하십시오.

참고

- ▶ 상자 번호 1, 8, 9에 있는 시약에는 관련 라이브러리를 식별할 수 있도록 색상으로 구분된 캡이 씌워져 있습니다.
 - ▶ 파란색 캡은 DNA 라이브러리에만 사용되는 시약을 나타냅니다.
 - ▶ 빨간색 캡은 RNA 라이브러리에만 사용되는 시약을 나타냅니다.

소모품	카탈로그 번호
TruSight Tumor 170 NextSeq 키트(샘플 24개 라이브러리 준비 키트, (3)NextSeq 500/550 높은 아웃풋 v2 키트[300주기])	OP-101-1003
TruSight Tumor 170(라이브러리 준비 1개, 샘플 24개)	OP-101-1004

라이브러리 준비

상자 1 – 라이브러리 준비 – RNA(증폭 전)

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

상자 2 – 라이브러리 준비 – DNA(증폭 전)

수량	시약	설명	보관 온도
2	ERA1-A	End Repair A-tailing 효소 믹스 1	-25°C~-15°C
2	ERA1-B	End Repair A-tailing 완충제 1	-25°C~-15°C
2	ALB1	어댑터 결찰 완충제 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	중지 결찰 완충제	-25°C~-15°C
2	EPM	향상된 PCR 믹스	-25°C~-15°C

상자 3 – 라이브러리 준비(증폭 전)

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

상자 4 – 라이브러리 준비 – 고유 PCR 인덱스 프라이머 믹스(증폭 전)

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

상자 5 – 라이브러리 준비 – 조합 PCR 인덱스 프라이머 믹스(증폭 전)

수량	시약	설명	보관 온도
1	CP01	조합 인덱스 프라이머 믹스 01	-25°C~-15°C
1	CP02	조합 인덱스 프라이머 믹스 02	-25°C~-15°C
1	CP03	조합 인덱스 프라이머 믹스 03	-25°C~-15°C
1	CP04	조합 인덱스 프라이머 믹스 04	-25°C~-15°C
1	CP05	조합 인덱스 프라이머 믹스 05	-25°C~-15°C
1	CP06	조합 인덱스 프라이머 믹스 06	-25°C~-15°C
1	CP07	조합 인덱스 프라이머 믹스 07	-25°C~-15°C
1	CP08	조합 인덱스 프라이머 믹스 08	-25°C~-15°C
1	CP09	조합 인덱스 프라이머 믹스 09	-25°C~-15°C
1	CP010	조합 인덱스 프라이머 믹스 10	-25°C~-15°C
1	CP011	조합 인덱스 프라이머 믹스 11	-25°C~-15°C
1	CP012	조합 인덱스 프라이머 믹스 12	-25°C~-15°C
1	CP013	조합 인덱스 프라이머 믹스 13	-25°C~-15°C
1	CP014	조합 인덱스 프라이머 믹스 14	-25°C~-15°C
1	CP015	조합 인덱스 프라이머 믹스 15	-25°C~-15°C
1	CP016	조합 인덱스 프라이머 믹스 16	-25°C~-15°C

Enrichment

상자 6 – Enrichment(증폭 후)

수량	시약	설명	보관 온도
2	TCB1	목표 캡처 완충제 1	2°C~8°C
2	SMB	스트렙타비딘 자성 비드	2°C~8°C
2	HP3	2N NaOH	2°C~8°C
2	ET2	용출 목표 2	2°C~8°C
2	LNB1	라이브러리 정규화 비드 1	2°C~8°C
2	LNW1	라이브러리 정규화 세척액 1	2°C~8°C
1	RSB	재현탁 완충액	2°C~8°C 또는 -25°C~-15°C
2	SPB	샘플 정제 비드	2°C~8°C
2	LNS2	라이브러리 정규화 보관 2	15°C~30°C

▶ 수령 시 2°C~8°C 상자에서 LNS2 튜브를 꺼내 15°C~30°C에서 보관합니다.

상자 7 – Enrichment(증폭 후)

수량	시약	설명	보관 온도
2	TCA1	목표 캡처 첨가제 1	-25°C~-15°C
4	EEW2	향상된 Enrichment 세척액 2	-25°C~-15°C
2	EE2	Enrichment 용출 2	-25°C~-15°C
2	EPM	향상된 PCR 믹스	-25°C~-15°C
2	PPC3	PCR 프라이머 카테일 3	-25°C~-15°C
2	LNA1	라이브러리 정규화 첨가제 1	-25°C~-15°C

상자 8 – TruSight Tumor 170 내용물 세트(DNA만 해당)

수량	시약	설명	보관 온도
1	OPD1	종양학 DNA 프로브 마스터 풀	-25°C~-15°C

상자 9 – TruSight Tumor 170 내용물 세트(RNA만 해당)

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

소모품 및 장비

필요한 사용자 공급 소모품과 장비가 있는지 확인한 후에 프로토콜을 시작하십시오.

프로토콜이 나열된 항목을 사용하여 최적화되고 검증되었습니다. 대체 소모품 및 장비를 사용하는 경우에는 유사한 성능이 보장되지 않습니다.

소모품

소모품	공급업체
[선택사항] 1개의 DNA 표준이 포함된 AccuClear 초고감도 dsDNA 정량화 키트	Biotium, 카탈로그 번호 31029
[선택사항] AllPrep DNA/RNA FFPE 키트	QIAGEN, 카탈로그 번호 80234
[선택사항] QuantiFluor RNA 시스템	Promega, 카탈로그 번호 E3310
[선택사항] Agilent DNA 1000 키트	Agilent, 카탈로그 번호 5067-1504
[선택사항] Agilent RNA 6000 나노 키트	Agilent, 카탈로그 번호 5067-1511
[선택사항] 표준 민감도 RNA 분석 키트	Advanced Analytical Technologies, 카탈로그 번호 DNF-471-0500
[선택사항] FFPE QC 키트	Illumina, 카탈로그 번호 WG-321-1001
[선택사항] DNA 레퍼런스 표준	Horizon Diagnostics, 카탈로그 번호 HD753
[선택사항] 범용 인간 레퍼런스 RNA	Agilent, 카탈로그 번호 740000
8마이크로튜브 스트립	Covaris, 파트 번호 520053
랙 E220evolution 8마이크로튜브 스트립 어댑터(E220evolution와 함께 사용)	Covaris, 파트 번호 500430
랙 12 배치 8마이크로튜브 스트립 어댑터(LE220과 함께 사용)	Covaris, 파트 번호 500191
1.7ml 미량원심분리기 튜브, 핵산 분해 효소 없음	일반 실험용품 공급업체
2ml 미량원심분리기 튜브, 핵산 분해 효소 없음	일반 실험용품 공급업체
15ml 원뿔형 튜브	일반 실험용품 공급업체
50ml 원뿔형 튜브	일반 실험용품 공급업체
20µl 에어로졸 방지 피펫 팁	일반 실험용품 공급업체
200µl 에어로졸 방지 피펫 팁	일반 실험용품 공급업체
1ml 에어로졸 방지 피펫 팁	일반 실험용품 공급업체
96웰 보관 플레이트, 0.8ml(MIDI 플레이트)	Fisher Scientific, 파트 번호 AB-0859
96웰 PCR 플레이트, 0.2ml(폴리프로필렌)	일반 실험용품 공급업체
96웰 마이크로플레이트, 검은색, 평평함, 투명 하단	Coming, 파트 번호 3904
핵산 분해 효소 없는 시약 저장소(PVC, 일회용 트로프)	WWR, 파트 번호 89094-658
마이크로실 'B' 접착 실(접착 플레이트 실)	Bio-Rad, 파트 번호 MSB-1001
PCR 등급수	일반 실험용품 공급업체
에탄올(분자 생물 실험용, 200프루프)	Sigma-Aldrich, 파트 번호 E7023
HiSeq Rapid SBS 키트 v2(200주기)	Illumina, 카탈로그 번호 FC-402-4021
HiSeq Rapid 클러스터 키트 v2- 페어드 엔드 및 단일 리드	Illumina, 카탈로그 번호 GD-402-4002
NextSeq 500/550 높은 아웃풋 키트 v2(300주기)	Illumina, 카탈로그 번호 FC-404-2004

장비(증폭 전)

장비	공급업체
유전자 증폭기	일반 실험용품 공급업체
히트 블록(1.5ml 미량원심분리기 튜브)	일반 실험용품 공급업체

장비	공급업체
(2) 히트 블록(Hybex 인큐베이터, 가열 베이스)	SciGene, 카탈로그 번호 · 1057-30-O(115V) 또는 · 1057-30-2(230V)
(2) midi 히트 블록 인서트(Hybex와 함께 사용)	Illumina, 카탈로그 번호 BD-60-601
테이블형 원심분리기(플레이트 원심분리기)	일반 실험용품 공급업체
미량원심분리기(1.5ml 튜브)	일반 실험용품 공급업체
자석 스탠드-96	Thermo Fisher, 카탈로그 번호 AM10027
Vortexer	일반 실험용품 공급업체
플레이트 웨이커(BioShake XP)	Q Instruments, 파트 번호 1808-0505
Covaris 집중식 초음파분쇄기	· Covaris, 파트 번호 500219(모델 LE220) 또는 · Covaris, 파트 번호 500429(모델 E220evolution)
[선택사항] 2100 Bioanalyzer 데스크톱 시스템	Agilent, 파트 번호 G2940CA
[선택사항] Fragment Analyzer Automated CE 시스템	Advanced Analytical Technologies, 파트 번호 FSv2-CE2 또는 FSv2-CE10

장비(증폭 후)

장비	공급업체
히트 블록(1.5ml 미량원심분리기 튜브)	일반 실험용품 공급업체
히트 블록(Hybex 인큐베이터, 96웰 플레이트)	SciGene, 카탈로그 번호 · 1057-30-O(115V) 또는 · 1057-30-2(230V)
midi 히트 블록 인서트(Hybex와 함께 사용)	Illumina, 카탈로그 번호 BD-60-601
테이블형 원심분리기(플레이트 원심분리기)	일반 실험용품 공급업체
미량원심분리기(1.5ml 튜브)	일반 실험용품 공급업체
자석 스탠드-96	Thermo Fisher, 카탈로그 번호 AM10027
Vortexer	일반 실험용품 공급업체
플레이트 웨이커(BioShake XP)	Q Instruments, 파트 번호 1808-0505
유전자 증폭기	일반 실험용품 공급업체
NextSeq 시스템	Illumina, 카탈로그 번호 · SY-415-1001 또는 · SY-415-1002
[선택사항] 2100 Bioanalyzer 데스크톱 시스템	Agilent, 파트 번호 G2940CA
[선택사항] Fragment Analyzer Automated CE 시스템	Advanced Analytical Technologies, 파트 번호 FSv2-CE2 또는 FSv2-CE10
[선택사항] HiSeq 시스템	Illumina, 카탈로그 번호 SY-401-2501

기술 지원

기술 지원을 받으려면 Illumina 기술 지원 부서에 문의하십시오.

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

Illumina 고객 지원 센터 전화 번호

지역	무료 통화	지역
북미	+1.800.809.4566	
네덜란드	+31 8000222493	+31 207132960
노르웨이	+47 800 16836	+47 21939693
대만	00806651752	
뉴질랜드	0800.451.650	
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	400.635.9898	
프랑스	+33 805102193	+33 170770446
핀란드	+358 800918363	+358 974790110
호주	+1.800.775.688	
홍콩	800960230	
기타 국가	+44.1799.534000	

SDS(안전보건자료)—Illumina 웹사이트(support.illumina.com/sds.html)에서 확인할 수 있습니다.

제품 설명서—Illumina 웹사이트에서 PDF로 다운로드할 수 있습니다. support.illumina.com에서 제품을 선택한 다음, Documentation & Literature(설명서 및 문헌)를 선택하십시오.



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.

© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®