User Manual

Instructions for Use

ONCOseeker™ SOLID

사용 전, 제품 설명서에 있는 모든 내용을 숙지하시기 바랍니다.

본 제품은 허가된 국가에서 IVD 목적으로 사용될 수 있습니다.

목 차

1. 제품 정보 4
1.1. 제품설명 4
1.2. 제품 구성 및 보관 4
1.3. 추가로 필요한 기기 및 시약 (제공되지 않음) 5
2. 검사 방법 6
2.1. 시약 준비 6
2.2. 검사 예상 시간 (12 개 sample 기준) 6
2.3. Sample Preparation (검체 준비) 7
2.4. Library preparation 9
Step 1. End repair 9
Step 2. Adapter Ligation 10
(Optional) Repair of deaminated bases 10
Step 3. Post-ligation clean-up 11
Step 4. PCR amplification 12
Step 5. Post-PCR clean-up 13
2.5. Hybridization and capture 14
Step 6. Combine blockers Mix, Cot DNA, library, and dry 14
Step 7. Hybridization reaction 15
Step 8. Prepare wash buffers 16
Step 9. Wash streptavidin beads 17
Step 10. Bead capture 18
Step 11. Wash 18
Step 12. Post-capture PCR 20
Step 13. Purify post-capture PCR fragments 21
2.6. 라이브러리 유효성 확인 22
2.7. MiSeq Sequencing Run 22
Denature and Dilution Libraries 22
Sequencing 23
3. 부록 24
A. Index 정보 24
B. Sample Sheet 24
C. Troubleshooting 25
D. 사용시 주의사항 26
문서 및 지원 27

1. 제품 정보

중요: 제품을 사용하기 전에 부록의 **"D. 사용시 주의사항"**을 숙지하시기 바랍니다.

1.1. 제품설명

ONCOseeker™ SOLID panel은 hybridization capture 방식을 기반으로 차세대 시퀀싱(NGS; Next-generation Sequencing)을 통해 고형암과 관련된 변이를 탐색하는 제품입니다.
최신 연구 동향을 반영하고 임상 진단에 도움이 되는 폐암, 유방암, 대장암, 흑색종, 난소암, 위암 등의 고형암 관련 필수 유전자를 선별하였습니다.
시험 결과는 임상 참고용입니다. 임상의는 환자의 상태, 약물 적응증, 치료 및 기타 시험 결과를 기반으로 결과를 종합적으로 판단하여야 합니다.

1.2. 제품 구성 및 보관

중요: 제품의 모든 구성품을 확인하고 배송 중 파손이 확인된 경우 기술지원팀에 문의하세요.
제품은 적정 보관조건에 세워서 보관 바랍니다.

Kit	Type	Kit Components	Cap color	Quantity	Volume (µL)	Storage
Library Preparation kit (48 rxns)	Tube	Buffer E1	Green	1	230 µL	-20℃
		Enzyme E2	Green	1	48 µL	
		Enzyme E3	Green	1	48 µL	
		Enzyme E4	Green	1	15 µL	
		Buffer L1	Yellow	1	864 µL	
		Enzyme L2	Yellow	1	288 µL	
		Reagent L3	Yellow	1	240 µL	
		UDG	Yellow	1	48 µL	
		PCR Master Mix	Blue	1	1200 µL	
Index primer set (48 rxns)	Plate	Index 01 ~ 12 (each 1rxn)	-	1	5 µL (total 4rxns)	-20℃
Target Enrichment kit (4 rxns)	Tube	Target Probe	Violet	1	16 µL	-20℃
		Blockers Mix	Red	1	8 µL	
		Cot DNA	Red	1	20 µL	
		2X Hyb Buffer	White	1	68 µL	
		Hyb Buffer Enhancer	Amber	1	22 µL	
		2X Bead Wash Buffer	White	1	640 µL	
		10X Wash Buffer 1	Clear	1	112 µL	
		10X Wash Buffer 2	Clear	1	64 µL	
		10X Wash Buffer 3	Clear	1	64 µL	
		10X Stringent Wash Buffer	Clear	1	128 µL	
		2X HotStart Mix	Green	1	100 µL	
		P5 primer	Green	1	10 µL	
		P7 primer	Green	1	10 µL	

<index 위치 정보>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	01	09	01	09	01	09				
B	02	10	02	10	02	10	02	10				
C	03	11	03	11	03	11	03	11				
D	04	12	04	12	04	12	04	12				
E	05		05		05		05					
F	06		06		06		06					
G	07		07		07		07					
H	08		08		08		08					

1.3. 추가로 필요한 기기 및 시약 (제공되지 않음)

Kit 구성품 외에 다음과 같은 장비, 시약 및 소모품이 필요합니다.

1) 장비 및 소모품

	Equipment	Supplier / Catalog No.
1	MiSeq or MiSeq Dx	Illumina
2	Covaris - Covaris micro Tube	Covaris (E-series or S-series) Covaris, Cat # 520045
3	96-well Thermal cycler	General laboratory supplier
4	Digital electrophoresis system (하단의 장비 중 선택 가능)	
	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer	Agilent Technologies, Cat # G2939AA
	- Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Cat # 5067-4626
	Agilent 4150 TapeStation	Agilent Technologies, Cat # G2992AA
	(or Agilent 4200 TapeStation)	(Cat # G2991BA)
	- Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape & Reagent	Agilent Technologies, Cat # 5067-5584/5067-5585
	- Agilent D1000 ScreenTape & Reagent	Agilent Technologies, Cat # 5067-5582/5067-5583
	- Agilent Genomic DNA ScreenTape & Reagent	Agilent Technologies, Cat # 5067-5365/5067-5366
	- Agilent Cell-free DNA ScreenTape & Reagent	Agilent Technologies, Cat # 5067-5630/5067-5631
5	Magnetic separation stand (하단의 제품 중 선택 가능)	
	16-tube DynaMag™-2 Magnet (for 1.5 mL tube)	Life Technologies, Cat # 12321D
	6-tube magnetic separation rack (for 1.5 mL tube)	New England Biolabs, Cat # S1506S
	DiaMag02 magnetic rack (for 1.5 mL tube)	Diagenode, Cat # B04000001
	Magnet stand-96 (DynaMag-96 side) (for 0.2 mL tube)	Life Technologies, Cat # 12331D
6	Fluorometer 하단의 장비 중 선택 가능)	
	Qubit® 3.0/4.0 Fluorometer	Life Technologies, Cat # Q33216/ Q33226
	- Qubit® Assay Tubes	Life Technologies, Cat # Q32856
	- Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies, Cat # Q32851
	- Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies, Cat # Q32850
	Quantus Fluorometer	Promega, Cat # E6150
	- QuantiFluor® Single-Tube Fluorometer Accessories	Promega, Cat # E4942
	- QuantiFluor® ONE ds DNA System	Promega, Cat # E4871
7	Microcentrifuge	General laboratory supplier
8	Vacuum concentrator	General laboratory supplier
9	Vortex Mixer	General laboratory supplier
10	Water bath or Heat block	General laboratory supplier
11	Plate centrifuge	General laboratory supplier

2) 시약 및 소모품

	Other Materials	Supplier / Cat. No.
1	>80% Ethanol	General laboratory supplier
2	Microtubes, 1.5 mL	General laboratory supplier
3	PCR tube, 0.2 mL flat cap	General laboratory supplier
4	8-strip tube	General laboratory supplier
5	DNA LoBind Tubes, 1.5 mL	Eppendorf, Cat # 0030108051
6	Nuclease-Free water	General laboratory supplier
7	Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies, Cat # 12090015 (or general laboratory supplier)
8	Agencourt® AMPure® XP – PCR Purification beads	Beckman Coulter, Cat # A63880
9	Dynabeads® M-270 Streptavidin	Life Technologies, Cat # 65305
10	1.0N NaOH (molecular biology grade)	General laboratory supplier
11	MiSeq Reagent Kit	Illumina

2. 검사 방법

2.1. 시약 준비

1) 모든 시약은 사용 전 튜브의 마개나 벽면에 잔여물이 남아있지 않도록 짧게 spin down하고 얼음 위에서 차갑게 유지하면서 사용한다.

2) 얼어 있는 시약의 경우 해동한 뒤 vortex하고 짧게 spin down하여 얼음 위에서 차갑게 유지하면서 사용한다.

3) Agencourt AMPure XP beads는 사용 전 상온에 꺼내어 beads의 온도가 상온과 같아지도록 하고, 사용 전 균일하게 섞이도록 vortex 한다.

2.2. 검사 예상 시간 (12개 sample 기준)

Part	Step		Time (hrs)
Sample preparation	DNA shearing	gDNA	1
		FFPE	2
	Q.C	gDNA	0.5
		FFPE	
		cfDNA	
Library preparation	Library preparation		3
	Q.C (Qubit & TapeStation)		0.5
Hybridization & capture	Hybridization (Over-night)		4 (~16)
	Capture		2.5
	Post-capture PCR		1
	Q.C (Qubit & TapeStation)		1
Sequencing	MiSeq or Miseq DX system		-

☞ DNA shearing 과정은 사용하는 장비에 따라 소요시간이 달라질 수 있다.

2.3. Sample Preparation (검체 준비)

1) 권장하는 DNA 품질

권장하는 DNA 품질		
gDNA **FFPE DNA**	Input DNA양 (Qubit® Fluorometer 정량 값 기준) DNA quality (OD A260/280 ratio) DIN (DNA Integrity Number)	≥ 200 ng 1.8~2.0 ≥ 7 (gDNA) ≥ 3 (FFPE)
cfDNA	Input DNA양 (Qubit® Fluorometer 정량 값 기준) DNA integrity DIN (DNA Integrity Number)	> 15 ng > 50% cfDNA > 1.0

2) Sample의 정량 및 정성을 위한 권장사항

- 정확한 정량은 고품질의 library를 만드는데 중요하다.
  Qubit® 4.0 Fluorometer 같은 fluorescent dye 방식의 측정법으로 수행할 것을 권장한다.
- DNA sample과 library의 정확한 size를 확인하기 위해서는 size 분포와 품질을 빠르게 확인할 수 있는 TapeStation(Agilent)을 사용할 것을 권장한다.

3) DNA shearing

Library를 제작하기 위해서는 DNA를 적당한 사이즈로 절단하여야 한다.
Covaris장비(E-series 또는 S-series)를 사용하여 적정한 사이즈로 절단할 것을 권장한다.
절단된 size가 적정하지 않을 경우 증폭 과정에서 최종 library의 size와 생산량에 영향을 줄 수 있으므로, 필요한 경우 적정한 DNA size를 얻기 위해 shearing 조건을 최적화하여야 한다.

cfDNA의 경우 단편화 된 크기로 추출되기 때문에 shearing 과정은 진행하지 않는다.

- **사용자 준비물** (Covaris 장비를 사용할 경우)
  - Covaris E-series 또는 S-series/covaris microtube
  - Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)

- **Sample Guidelines**

	Genomic DNA	FFPE DNA	cfDNA
Input DNA	purified DNA 200ng/53 µL		N/A
Buffer	Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)		N/A
DNA Quality	OD 260/280 ratio 1.8~2.0		N/A

  - 저품질의 DNA일 경우 shearing 조건 및 시간 설정을 위한 test를 진행하여야 한다.
  - Shearing 된 sample은 covaris용 microTUBE 또는 miniTUBE에 보관하지 않도록 하며, 다음 실험 과정을 위해 sample을 PCR tube 또는 1.5 mL tube로 옮겨야 한다.

- **설정**
  - Covaris system에서 DNA가 200 bp의 size로 절단되도록 parameter값을 설정한다.
  - Parameter 조건 설정 방법에 대해서는 장비의 사용자 매뉴얼을 참조한다.
  - microTUBE와 miniTUBE에 맞는 tube holder 또는 rack을 사용한다.

Sample의 상태와 장비에 따라 shearing 과정에서 대략 50%정도 DNA 손실이 발생할 수 있다. 따라서 shearing 후 남아있는 DNA 양을 확인 후 input DNA 양을 조절하여 진행하는 것을 권장한다.

4) Sheared DNA Q.C

DNA sample이 shearing 되었는지 확인하는 방법으로는 전기영동에서 절단된 사이즈 분포와 band의 패턴으로 확인할 수 있다. Agilent TapeStation 또는 유사한 성능의 장비를 사용하여 절단된 DNA의 사이즈를 확인하는 것을 권장한다.

- **필요 장비**
  - Agilent 4150 또는 4200 TapeStation
  - High Sensitivity D1000 ScreenTape & Reagent
  - TapeStation용 96well plate 또는 8-strip tube
  - TapeStation plate용 Adhesive Plate Seal (4200)
- **준비 및 분석**
  - Agilent High Sensitivity D1000 Reagent를 사용하기 30분 전 상온에 미리 꺼내 둔다.
  - 사용 전 reagent를 잘 섞어준다.
  - 정확한 검사방법은 장비와 reagent의 사용자 매뉴얼을 참조한다.
- **Sample Q.C Guidelines**

	Genomic DNA	FFPE DNA	cfDNA
Size distribution	Fragments averaging 200 bp in length (approximately 150 to 250 bp)		Fragments greater than 160 bp in length

2.4. Library preparation

Step 1. End repair

준비물 (Kit 포함)
- ● Buffer E1 - ● Enzyme E2 - ● Enzyme E3 - ● Enzyme E4
사용자 준비물
- Thermal Cycler - PCR tube - Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)
- **Fragmented DNA 약 50 µL (gDNA, FFPE DNA)** **또는 cfDNA 약 50 µL**

1) 준비된 sample DNA 50 µL(Fragmented DNA 또는 cfDNA)를 새로운 0.2 mL PCR tube에 옮긴다. 최종 volume이 50 µL 이하일 경우, Low EDTA TE buffer로 volume을 50 µL로 맞춘다.

2) 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 미리 세팅한 뒤, 세팅한 프로그램을 시작하여 첫 단계인 4℃_Hold 단계를 진행시켜 lid온도를 미리 heating 시킨다.

(End repair program: Lid온도는 70℃로 설정한다.)

Temperature	Temperature time
4℃	Hold
20℃	30 min
65℃	30 min
4℃	Hold

3) 아래 표를 참고하여 1.5mL tube에 End repair Master Mix를 준비한다.

Reagent		Volume per sample (µL)	
Master Mix	Low EDTA TE	3	10
	● Buffer E1	4.7	
	● Enzyme E2	1	
	● Enzyme E3	1	
	● Enzyme E4	0.3	
Fragmented DNA or cfDNA			**50**
Total volume			**60**

3.1) Master Mix는 vortex를 이용하여 5초간 섞은 뒤, spin down 한다.

3.2) 미리 준비한 50 µL DNA (Fragmented DNA or cfDNA)를 넣은 0.2 mL PCR tube에 Master Mix 10 µL를 넣는다.

3.3) Vortex를 이용하여 5초간 섞은 뒤, spin down 한다.

4) Thermal cycler에 tube를 넣고, 2) 단계의 프로그램을 실행하여 20℃ 30min → 65℃ 30min 동안 순차적으로 반응시킨다.

5) Thermal cycler 프로그램이 진행되는 동안 Adapter Ligation 단계의 Master mix를 미리 준비한다.

Thermal cycler 프로그램이 끝난 End repair sample은 4℃에서 1시간까지 보관 가능하지만, yield가 감소하는 것을 막기 위해 1시간 이내에 adapter ligation step을 진행하는 것을 추천한다.

Step 2. Adapter Ligation

준비물 (Kit 포함)
- Buffer L1 - Enzyme L2 - Reagent L3
사용자 준비물
- Thermal Cycler - PCR tube (optional 1.5 mL tube) - Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)
- **Step 1 의 End repair sample 60 µL**

1) 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 미리 세팅한다.
(Adapter ligation program: lid 온도는 OFF로 설정한다.)

온도	시간
20℃	15 min

2) 아래 표를 참고하여, DNA input <50 ng 일 때 Reagent L3를 Low EDTA TE buffer를 사용하여 희석 후 사용한다.

DNA input	Reagent L3 (Adapter)
≥ 50 ng	No dilution
10 ng	10-fold (1:10)
1 ng	20-fold (1:20)

3) 아래 표를 참고하여 Adapter Ligation Master Mix를 준비한다.
(Buffer L1과 Enzyme L2는 미리 혼합하여 ice 위에 보관하고, **Reagent L3는 사용 전에 혼합한다**.)

Reagent		Volume per sample (µL)	
Master Mix	Buffer L1	18	29
	Enzyme L2	6	
	Reagent L3	5	
End-repair sample			60
Total volume			89

4) End Prep Repair sample에 Adapter Ligation Master Mix 29 µL를 넣는다.
5) Vortex를 이용하여 5초간 섞은 뒤, spin down 한다.
6) 미리 세팅한 Thermal cycler에 tube를 넣고 20℃에서 15분간 반응시킨다.

(Optional) Repair of deaminated bases

준비물 (Kit 포함)
- UDG
사용자 준비물
- Thermal Cycler
- **Step 2 의 Adapter ligation sample 89 µL**

1) 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 미리 세팅한다.
(Deamination program: lid 온도는 47℃로 설정한다.)

Temperature	Time
37℃	15 min

2) Adapter ligation sample에 UDG 1 µL를 넣는다.
3) Vortex를 이용하여 5초간 섞은 뒤, spin down 한다.
4) 미리 세팅한 Thermal cycler에 tube를 넣고 37℃에서 15분간 반응시킨다

Step 3. Post-ligation clean-up

실험 전 준비사항
- AMPure XP beads 는 사용하기 30 분 전 상온에 꺼내 둔다.
사용자 준비물
- Agencourt® AMPure® XP beads - Magnetic stand - PCR tube - Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA) - 80% ethanol, freshly prepared
- **Step 2 의 Adapter ligation sample 89 µL (~90 µL_optional vol.)**

1) AMPure XP beads는 사용 30분 전 상온에 꺼내 두어 beads의 온도가 상온과 같아지도록 하고, vortex를 이용하여 균일하게 섞어준다.
2) 89 µL의 adapter ligated DNA에 AMPure XP beads 72 µL (ratio: 0.8X)를 넣고 pipetting을 10회 하여 잘 섞어준다. (tube 옆면에 beads mix가 남아 있지 않는지 확인한다.)
3) 상온에서 5분 동안 반응시킨다.
4) Beads와 섞인 sample을 magnetic stand에 고정한 뒤, beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 2~5분)
5) Pipette을 이용하여 깨끗해진 상층액을 모두 제거한다. 이 때, beads pellet은 건드리지 않도록 주의한다.
6) Magnetic stand에 고정한 상태로 미리 준비한 80% ethanol 200 µL를 넣은 후, 상온에서 30초 동안 반응시킨 뒤 pipette을 이용하여 ethanol을 제거한다. 이 때, beads pellet은 건드리지 않도록 주의한다.
7) 6) 단계를 한 번 더 진행하여 총 2회의 ethanol wash를 진행한다.
8) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤, 살짝 spin down 한다.
9) Magnetic stand에 tube를 다시 고정한 뒤 pipette을 이용하여 남아있는 ethanol을 모두 제거한다. 이때, beads pellet이 over-dry 되지 않도록 주의한다.
10) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤 Low EDTA TE buffer 21 µL를 넣고 pipetting 하여 섞어준다.
11) 상온에서 2분 동안 반응시킨다.
12) Magnetic stand에 고정시킨 뒤 용액이 투명해지고 beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 2분)
13) 상층액 20 µL를 새로운 0.2 mL tube로 옮긴다.
이때, beads가 포함되어 있지 않는지 확인하고, beads가 있을 경우 magnetic stand에서 반응시킨 뒤 다시 상층액을 옮긴다.

Safe Stop: 다음 step을 바로 진행하지 않을 경우 sample을 -20℃ 냉동고에 보관이 가능하다.

Step 4. PCR amplification

준비물 (Kit 포함)
- ● PCR Master Mix - **(plate)** Index 01~12
사용자 준비물
- Thermal Cycler - PCR tube - Plate centrifuge
- **Step 3 의 ligated clean-up sample 20 µL**

<index 위치 정보>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	01	09	01	09	01	09				
B	02	10	02	10	02	10	02	10				
C	03	11	03	11	03	11	03	11				
D	04	12	04	12	04	12	04	12				
E	05		05		05		05					
F	06		06		06		06					
G	07		07		07		07					
H	08		08		08		08					

1) 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 미리 세팅한다. (PCR program: lid 온도는 105℃로 설정한다.)

☞ PCR cycle 수는 input DNA 양에 따라 효율이 다를 수 있으므로 아래 표를 참고하여 PCR cycle수를 결정한다. Sample indexing을 위해서는 적어도 3cycle을 진행해야 한다.

온도	시간	Cycles 수
98℃	2 min	1
98℃	20 sec	3-10 *
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	1 min	1
4℃	Hold	

*** Input DNA 양에 따른 PCR cycle 수**

DNA Input	최소 cycle 수
1 µg	3
100 ng	3
10 ng	6-7
1 ng	9-10

2) Index가 들어있는 plate는 사용 전 plate centrifuge로 spin down 시켜준다.

3) 아래 표를 참고하여 ligated DNA에 Index를 넣고 ● PCR Master Mix 25 µL를 각 sample tube에 순서대로 넣는다.

Reagent	Volume per sample (µL)
Ligated DNA (**purified DNA from Step 3**)	20
(plate) Index 01~12 (each)	5
● PCR Master Mix	25
Total volume	**50**

4) Vortex를 이용하여 5초간 섞은 뒤, spin down 한다.

5) 미리 세팅한 Thermal cycler에 tube를 넣고 프로그램을 진행시킨다.

Step 5. Post-PCR clean-up

실험 전 준비사항
- AMPure XP beads 는 사용하기 30 분 전 상온에 꺼내 둔다.
사용자 준비물
- Agencourt® AMPure® XP beads - Magnetic stand - PCR tube - Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA) - 80% ethanol, freshly prepared
- **Step 4 의 amplified DNA sample 50 µL**

1) AMPure XP beads는 사용 30분 전 상온에 꺼내 두어 beads의 온도가 상온과 같아지도록 하고, vortex를 이용하여 균일하게 섞는다.
2) Step 4의 amplified DNA tube에 AMPure XP beads 75 µL (ratio: 1.5X)를 넣고 pipetting을 10회 하여 잘 섞어준다.
3) 상온에서 5분 동안 반응시킨다.
4) Beads와 섞인 sample을 magnetic stand에 고정한 뒤, beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 2~5분)
5) Pipette을 이용하여 깨끗해진 상층액을 모두 제거한다.
   이 때, beads pellet은 건드리지 않도록 주의한다.
6) Magnetic stand에 고정한 상태로 미리 준비한 80% ethanol 200 µL를 넣은 후, 상온에서 30초 동안 반응시킨 뒤 pipette을 이용하여 ethanol을 제거한다. 이 때, beads pellet은 건드리지 않도록 주의한다.
7) 6) 단계를 한 번 더 반복하여 총 2회의 ethanol wash를 진행한다.
8) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤, 살짝 spin down 한다.
9) Magnetic stand에 tube를 다시 고정한 뒤 pipette을 이용하여 남아있는 ethanol을 모두 제거한다. 이때, beads pellet이 over-dry 되지 않도록 주의한다.
10) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤 Low EDTA TE buffer 21 µL를 넣고 pipetting 하여 섞어준다.
11) 상온에서 2분 동안 반응시킨다.
12) Magnetic stand에 고정시킨 뒤 용액이 투명해지고 beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 2분)
13) 상층액 20 µL를 새로운 0.2 mL tube로 옮긴다.
    이때, beads가 포함되어 있지 않는지 확인하고, beads가 있을 경우 magnetic stand에서 반응시킨 뒤 다시 상층액을 옮긴다.
14) Qubit® 4.0 Fluorometer로 농도를 측정하고, TapeStation 또는 Bioanalyzer를 사용하여 사이즈를 확인한다.
15) Qubit® 4.0 Fluorometer로 측정한 정량 값으로 pooling할 sample을 각각 동량으로 혼합하여 총 500~1500ng의 library 혼합물을 만든다.

Safe Stop: 다음 step을 바로 진행하지 않을 경우 sample을 -20℃ 냉동고에 보관한다.

2.5. Hybridization and capture

Step 6. Combine blockers Mix, Cot DNA, library, and dry

준비물 (Kit 포함)
- ● Blockers Mix - ● Cot DNA
사용자 준비물
- Thermal Cycler - 1.5 mL LoBind tube
- **Step 5 의 barcoded library pool (500~1500ng)**

1) 아래의 표를 참고하여 DNA LoBind 1.5 mL tube에 Step5의 barcoded library pool과 ● Cot DNA, ● Blockers Mix를 혼합한다.

Reagent	Volume per reaction
Barcoded library pool (step 5)	500~1500 ng
● Blockers Mix	2 µL
● Cot DNA	5 µL

2) Mixture를 Vacuum concentrator를 이용하여 농축(dry down)한다.
☞ Vacuum concentrator의 온도는 70℃ 이하로 유지한다.

Safe Stop: 다음 step을 바로 진행하지 않을 경우 sample을 상온에서 하루 동안 보관할 수 있다.
좀 더 오래 보관할 경우 -20℃에 보관한다.

Step 7. Hybridization reaction

준비물 (Kit 포함)
- ● Target Probe - ○ 2X Hyb Buffer - ● Hyb Buffer Enhancer
사용자 준비물
- Thermal Cycler - Heat block 또는 water bath - PCR tube - Nuclease-Free Water
- **Step 6 의 Dried DNA library**

1) 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 미리 세팅한다. (HYB program: lid 온도는 100℃로 설정한다.)

온도	시간
95℃	30 sec
65℃	4~16 h
65℃	Hold

2) 아래 표를 참고하여 Hybridization Master Mix를 준비한다.

Reagent	Volume per reaction (µL)
○ 2X Hyb Buffer	8.5
● Hyb Buffer Enhancer	2.7
● Target Probe	4
Nuclease-Free Water	1.8
Total volume	**17**

☞ 2X Hyb buffer에 결정화가 있는지 확인하고, 결정이 있는 경우 65℃에서 buffer를 완전히 용해시킨 뒤 사용한다.

3) Step 6에서 농축한 library pool에 Hybridization Master Mix 17 µL를 넣고 pipetting 하여 섞어 준 뒤, 상온에서 5~10분동안 반응시킨다.

4) Vortex를 이용하여 섞은 뒤, spin down 하여 새로운 0.2 mL PCR tube로 옮긴다.

5) 미리 세팅한 Thermal cycler에 tube를 넣은 뒤 프로그램을 실행시킨다.

6) 65℃에서 4시간~16시간 동안 hybridization 시킨다.

Step 8. Prepare wash buffers

준비물 (Kit 포함)
- ○ 2X Bead Wash Buffer - ◎ 10X Wash Buffer 1 - ◎ 10X Wash Buffer 2 - ◎ 10X Wash Buffer 3 - ◎ 10X Stringent Wash Buffer - ○ 2X Hyb Buffer - ● Hyb Buffer Enhancer
사용자 준비물
- Thermal Cycler - Heat block 또는 water bath - PCR tube - 1.5 mL LoBind tube - Nuclease-Free Water
- **Step 6 의 Dried DNA library**

1) 아래 표의 wash buffer를 상온에서 해동하고 표를 참고하여 한 개의 capture 반응에 대한 buffer를 **1X working solution**으로 희석한다.

Reagent	Nuclease-Free Water (µL)	Buffer (µL)	Total (µL)	Storage
○ 2X Beads Wash Buffer	160	160	320	Room temperature
◎ 10X Wash Buffer 1	252	28	280	**110 µL: 65℃ heat block** **170 µL:** Room temperature
◎ 10X Wash Buffer 2	144	16	160	Room temperature
◎ 10X Wash Buffer 3	144	16	160	Room temperature
◎ 10X Stringent Wash Buffer	288	32	320	각 160 µL씩 분주(**2tubes**): **65℃ heat block**

☞ 10X Wash Buffer 1이 완전히 녹지 않고 불투명 하다면, 65℃에서 buffer를 완전히 용해시킨 뒤 사용한다.
☞ 희석한 1X working solution은 상온(15~25℃)에서 4주까지 안정하다.

2) 110 µL의 Wash Buffer 1과 320 µL의 Stringent Wash Buffer는 아래의 표를 참고하여 Step 11의 Heated washes 단계 최소 15분 전에 65℃ Heat block 또는 Water bath에 보관하며, 그 외의 1X working solution은 상온에 보관한다.

☞ 65℃ 반응이 필요한 1X working solution은 정확한 온도의 buffer가 필요하므로, 적어도 Step 10의 Bead capture 단계를 시작할 때 heating 하기를 권장한다.

Buffer	Total (µL)	Storage
Wash Buffer 1	110	**65℃ Heat block**
	170	Room temperature
Stringent Wash Buffer	160 each (2 tubes)	**65℃ Heat block**

3) 아래 표를 참고하여 Bead Resuspension Mix를 준비한다.

Reagent	Volume per reaction (µL)
○ 2X Hyb Buffer	8.5
● Hyb Buffer Enhancer	2.7
Nuclease-Free Water	5.8
Total volume	**17**

☞ 2X Hyb buffer에 결정화가 있는지 확인하고, 결정이 있는 경우 65℃에서 buffer를 완전히 용해시킨 뒤 사용한다.

Step 9. Wash streptavidin beads

실험 전 준비사항
- Dynabeads® M-270 Streptavidin 은 사용하기 30 분 전 상온에 꺼내 둔다.
사용자 준비물
- Dynabeads® M-270 Streptavidin - Magnetic stand - 1.5 mL LoBind tube
- **Step 8 의 1X Bead Wash Buffer** (working solution)

1) Dynabeads® M-270 Streptavidin beads는 사용하기 30분 전에 상온 꺼내 두어 beads의 온도가 상온과 같아지도록 하고, Vortex를 이용하여 균일하게 섞는다.
2) 한 개의 capture 반응 당 Streptavidin beads 50 µL를 1.5 mL LoBind tube에 옮긴다.

   2 capture일 경우 100 µL를 옮긴다.
3) Beads를 넣은 tube에 1X Bead Wash Buffer를 capture 반응 당 100 µL를 넣고 pipetting을 10회 하여 섞어준다.
4) Magnetic stand에 tube를 고정한 뒤 beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 1분)
5) Magnetic stand에 tube가 고정된 상태로 깨끗해진 상층액을 모두 제거한 뒤, Magnetic stand에서 tube를 분리한다.
6) 아래와 같이 Wash를 진행한다.
   a) Beads가 들어있는 tube에 한 개의 capture 반응 당 1X Bead Wash Buffer 100 µL를 넣고 pipetting 10회 하여 섞어준다.
   b) Magnetic stand에 tube를 고정한 뒤, beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 1분)
   c) Magnetic stand에 tube가 고정된 상태로 깨끗해진 상층액을 모두 제거한다.
7) 6) 단계를 한 번 더 진행한다.
8) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤 Wash가 끝난 tube에 Step8에서 준비한 Bead Resuspension Mix를 capture 반응 당 17 µL 넣어준다.
9) Beads가 tube 내에서 건조되지 않도록 mix를 섞어주고, 짧게 spin down 한다.
10) 완전히 섞인 Beads를 새로운 0.2 mL tube에 capture 반응 당 17 µL씩 옮겨준다.

Step 10. Bead capture

사용자 준비물
- Thermal Cycler
- **Step 7 의 Hybridization sample 17 µL** - **Step 9 의 Washed Streptavidin Bead Resuspension Mix 17 µL**

1) Step 7의 HYB 프로그램(4~16h)이 끝나면 tube를 Thermal cycler에서 꺼낸다.
2) Tube를 꺼낸 후, 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 세팅하고 바로 WASH 프로그램을 시작한다. (WASH program: lid 온도는 70℃로 설정한다.)

온도	시간
65℃	Hold

3) Step 9의 Beads가 포함된 resuspension mix 17 µL를 Step 7의 HYB가 끝난 tube에 넣는다.
4) Vortex를 이용하여 완전히 섞은 후 간단히 spin down 한다.
5) Sample을 WASH 프로그램이 진행 중인 Thermal cycler에 넣고 65℃에서 45분 동안 반응시킨다. 이 때, Thermal cycler의 lid 온도가 70℃로 맞춰진 다음 tube를 넣고 진행시킨다.
6) 65℃에서 반응하는 시간 동안 beads를 현탁액 상태로 유지하기 위해 매 10-12분 마다 Thermal cycler에서 tube를 꺼내어 Vortex를 이용하여 bead를 섞어준다.
7) 45분 반응이 끝나면 Thermal cycler에서 sample tube를 꺼낸 뒤, 바로 Step 11의 Heated washes 과정으로 넘어간다.

Step 11. Wash

사용자 준비물
- Thermal Cycler - Heating block 또는 Water bath - 1.5ml LoBind tube - PCR tube - Magnetic Stand - Nuclease-Free Water
- **Step 8 의 1X working solutions** - **Step 10 의 Beads 가 포함된 sample 34 µL**

Heated washes

1) Step 10에서 반응이 끝난 tube에 65℃에서 데운 1X Wash Buffer 1을 100 µL 넣고, 천천히 10회 정도 pipetting 하여 섞은 뒤 spin down 한다. 이 때, 버블이 생기지 않도록 조심스럽게 pipetting 한다.
2) Mixture를 새로운 1.5 mL LoBind tube로 전부 옮긴 후 짧게 vortex 한다.
3) Magnetic stand에 sample tube를 고정한 뒤, 1분 동안 beads를 pellet 형태로 분리한 뒤 깨끗해진 상층액을 제거한다.
4) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤 65℃에 보관 중인 1X Stringent Wash Buffer를 150 µL 넣는다.
5) Pipetting을 10회 하여 잘 섞어주고, 버블이 생기지 않도록 조심한다.
6) Sample tube를 65℃에서 5분 동안 반응시킨다.
7) Magnetic stand에 sample tube를 고정한 뒤, 1분 동안 beads를 pellet 형태로 분리한 뒤 깨끗해진 상층액을 제거한다.
8) 4)~7) 단계를 한 번 더 수행한다.

Room temperature washes

1) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤 상온에서 보관 중인 1X Wash Buffer 1을 150 µL 넣는다.
2) Vortex를 이용하여 충분히 섞어준다.
3) 상온에서 2분 동안 반응시킨다. 이 때, tube 내에 beads가 균일하게 유지되도록 30초 동안 vortex 하고, 30초 동안 휴식을 번갈아 진행한다.
4) 반응이 끝나면 spin down 한다.
5) Magnetic stand에 tube를 고정한 뒤 1분 동안 beads를 pellet 형태로 분리한다.
6) 상층액을 제거한 뒤 1X Wash Buffer 2를 150 µL 넣는다.
7) Vortex를 이용하여 충분히 섞어준다.
8) 상온에서 2분 동안 반응시킨다. 이 때, tube 내에 beads가 균일하게 유지되도록 30초 동안 vortex 하고, 30초 동안 휴식을 번갈아 진행한다.
9) 반응이 끝나면 spin down 한다.
10) Magnetic stand에 tube를 고정한 뒤 1분 동안 beads를 pellet 형태로 분리한다.
11) 상층액을 제거한 뒤 1X Wash Buffer 3을 150 µL 넣는다.
12) Vortex를 이용하여 충분히 섞어준다.
13) 상온에서 2분 동안 반응시킨다. 이 때, tube 내에 beads가 균일하게 유지되도록 30초 동안 vortex 하고, 30초 동안 휴식을 번갈아 진행한다.
14) 반응이 끝나면 spin down 한다.
15) Magnetic stand에 tube를 고정한 뒤 1분 동안 beads를 pellet 형태로 분리한다.
16) 상층액을 제거한다.
17) Magnetic stand에 tube를 고정한 상태로 새로운 tip을 이용하여 tube 안에 남아있는 1X Wash Buffer 3을 모두 제거한 뒤, Magnetic stand에서 tube를 분리한다.
18) Sample tube에 Nuclease-Free Water 20 µL를 넣는다.
19) Pipetting을 10회 하여 tube의 벽면에 붙어있는 beads가 잘 혼합되도록 섞는다.

중요: Beads를 버리지 마십시오. Capture된 DNA가 들어있는 20 µL의 beads는 Post-capture PCR 단계에서 사용됩니다.

Step 12. Post-capture PCR

준비물 (Kit 포함)
- ● 2X HotStart Mix - ● P5 primer - ● P7 primer
사용자 준비물
- Thermal Cycler - PCR tube
- **Step 11 의 Beads with captured DNA 20 µL**

1) Step 11의 Beads with captured DNA sample 20 µL를 새로운 0.2 mL PCR tube로 옮긴다.

2) 아래 표를 참고하여 Amplification Reaction Mix 30 µL를 sample이 있는 0.2 mL PCR tube에 넣는다.

Reagent	Volume per capture (µL)
Beads with captured DNA (Step11)	**20**
● 2X HotStart Mix	25
● P5 primer	2.5
● P7 primer	2.5
Total volume	**50**

3) Vortex를 이용하여 잘 섞은 후 spin down 한다.

4) 아래 표와 같은 조건으로 Thermal cycler를 세팅하고 Post-capture PCR을 진행한다.
(Post-capture PCR: lid 온도는 105℃로 설정한다.)

Step		Temperature (℃)	Time (sec)	Number of cycles
Polymerase activation		98	45	1
Amplification	Denaturation	98	15	11
	Annealing	60	30	
	Extension	72	30	
Final extension		72	60	1
Hold		4	Hold	1

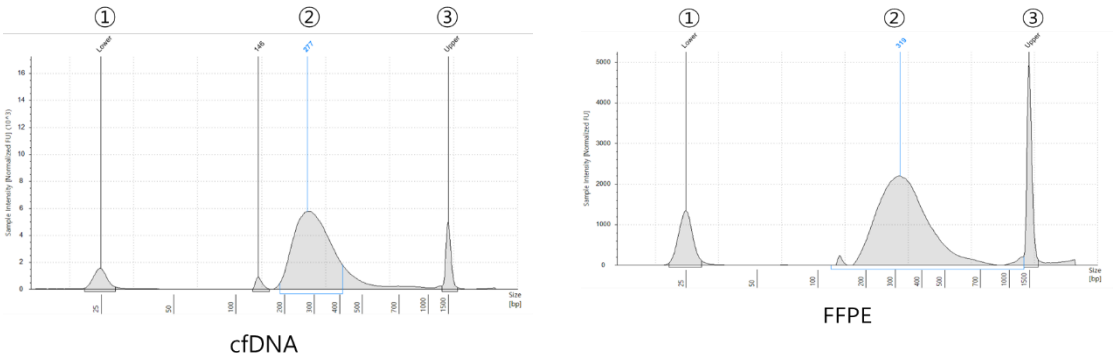
Safe Stop: PCR 반응물은 4℃에서 overnight하여 보관할 수 있다.

Step 13. Purify post-capture PCR fragments

실험 전 준비사항
- AMPure XP beads 는 사용하기 30 분 전 상온에 꺼내 둔다.
사용자 준비물
- Agencourt® AMPure® XP beads - Magnetic stand - 1.5 mL tube - Low EDTA TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA) - 80% ethanol, freshly prepared - Nuclease-Free Water
- **Step 12 의 PCR 반응물 50 µL**

1) AMPure XP beads는 사용 30분 전 상온에 꺼내 두어 beads의 온도가 상온과 같아지도록 하고, Vortex를 이용하여 균일하게 섞어준다.
2) Step 12의 PCR 반응물에 AMPure XP beads 75 µL (ratio: 1.5X)를 넣고 pipetting을 10회 하여 잘 섞어준다.
3) 상온에서 10분 동안 반응시킨다.
4) Beads와 섞인 sample을 magnetic stand에 고정한 뒤, beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 2~5분)
5) Pipette을 이용하여 깨끗해진 상층액을 모두 제거한다.
   이 때, beads pellet은 건드리지 않도록 주의한다.
6) Magnetic stand에 고정한 상태로 미리 준비한 80% ethanol 125 µL를 넣은 후, 상온에서 1분 동안 반응시킨 뒤 pipette을 이용하여 ethanol을 제거한다.
   이 때, beads pellet은 건드리지 않도록 주의한다.
7) 6) 단계를 한 번 더 진행하여 총 2회의 ethanol wash를 진행한다.
8) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤, 살짝 spin down 한다.
9) Magnetic stand에 tube를 다시 고정한 뒤 pipette을 이용하여 남아있는 ethanol을 모두 제거한다.
10) Magnetic stand에 tube를 고정시킨 상태로 상온에서 2분 동안 건조시킨다. (이때, 과도한 건조로 인해 beads에 균열이 생기지 않도록 하며, 균열이 생기면 바로 다음 단계를 수행한다.)
11) Magnetic stand에서 tube를 분리한 뒤 Low EDTA TE buffer 22 µL를 넣고 pipetting 하여 섞어준다.
12) 상온에서 5분 동안 반응시킨다.
13) Magnetic stand에 tube를 고정시킨 뒤 용액이 투명해지고 beads가 pellet 형태로 분리될 때까지 기다린다. (약 2분)
14) 상층액 20 µL를 새로운 1.5 mL tube로 옮긴다.
   이때, beads가 포함되어 있지 않는지 확인하고, beads가 있을 경우 magnetic stand에서 반응시킨 뒤 다시 상층액을 옮긴다.
15) Qubit® 4.0 Fluorometer로 농도를 측정하고, TapeStation 또는 Bioanalyzer를 사용하여 사이즈를 확인한다.
16) Qubit® 4.0 Fluorometer로 측정한 정량 값과 TapeStation 결과의 size를 사용하여 몰 농도로 변환시킨 뒤 Nuclease-Free Water를 사용하여 4nM로 희석한다.

2.6. 라이브러리 유효성 확인



[그림1.] Library electropherogram

cfDNA 20 ng / FFPE 200 ng input

① Lower Marker

② Library (230-350 bp): 라이브러리는 230-350 bp 범위에서 사이즈 확인

③ Upper Marker

2.7. MiSeq Sequencing Run

Denature and Dilution Libraries

MiSeq Reagent Kit, v2(300cycle) 또는 MiSeq Reagent Kit, v3(600cycle)를 사용할 경우 10~20pM의 library를 loading 할 것을 권장한다.

MiSeq Reagent cartridge에 loading 하기 전 새로 만든 0.2N NaOH를 사용하여 library를 denaturation 한다.

1. Prepare HT1 buffer and library
   1) HT1 buffer를 cartridge와 함께 해동한 뒤 library denaturation 전까지 냉장보관 한다.
   2) Library의 농도는 4nM 이상이여야 하고, 최종 volume이 10 µL가 되도록 Nuclease-Free Water를 사용하여 4nM로 희석한다.
2. Library Denaturation
   1) 이전 step에서 준비한 4nM library 5 µL에 0.2N NaOH 5 µL를 넣는다.
   2) Vortex를 하고 spin-down 시킨다.
   3) 상온에서 5분동안 반응시킨다.
   4) 미리 녹인 HT1 buffer 990 µL를 넣어 20pM의 denatured library mix 1 mL를 만든다.
   5) Vortex를 하고 spin-down 시킨다.
   6) 다음 step 전까지 ice에 보관한다.
3. Prepare library for Miseq Loading
   1) 다음 표를 참고하여 MiSeq에 loading할 농도로 희석시킨다.

최종 농도(pM)	10pM	12pM	13pM	14pM	16pM	20pM
20pM library	350 µL	420 µL	455 µL	490 µL	560 µL	600 µL
HT1	350 µL	280 µL	245 µL	210 µL	140 µL	0 µL

   2) 최종 농도로 희석된 library를 5번정도 invert 하고 spin-down 시킨다.
   3) MiSeq Reagent Cartridge에 loading 하기 전까지 ice에 보관한다.

Sequencing

1. MiSeq Flow Cell Loading
   - 최종 농도로 희석된 library를 MiSeq Reagent Cartridge에 600 µL loading 한다.
2. MiSeq Sample sheet setup and Run
   - Illumina Local Run Manager (LRM)를 사용하여 sample sheet를 생성한다.
   - Illumina MiSeq Control Software Instruction에 따라 MiSeq run을 시작한다.

보증 및 책임

㈜진씨커는 본 제품 설명서에 제시된 검사 방법과 다른 방법을 사용하여 발생된 문제에 대해서는 책임을 지지 않습니다. 제품에 대한 문제 발생 시 고객은 30일 이내에 발생된 문제점을 ㈜진씨커 고객센터에 전달해 주시기 바랍니다.

세부사항 전달

Tel. 02-3499-4247 / Fax. 02-3499-4248 / E-mail. info@genecker.com

3. 부록

A. Index 정보

Index primer	I7 index sequence	I5 index sequence	State
Index 01	**CTGATCGT**	**ATATGCGC**	A1, A3, A5, A7
Index 02	**ACTCTCGA**	**TGGTACAG**	B1, B3, B5, B7
Index 03	**TGAGCTAG**	**AACCGTTC**	C1, C3, C5, C7
Index 04	**GAGACGAT**	**TAACCGGT**	D1, D3, D5, D7
Index 05	**CTTGTCGA**	**GAACATCG**	E1, E3, E5, E7
Index 06	**TTCCAAGG**	**CCTTGTAG**	F1, F3, F5, F7
Index 07	**CGCATGAT**	**TCAGGCTT**	G1, G3, G5, G7
Index 08	**ACGGAACA**	**GTTCTCGT**	H1, H3, H5, H7
Index 09	**CGGCTAAT**	**AGAACGAG**	A2, A4, A6, A8
Index 10	**ATCGATCG**	**TGCTTCCA**	B2, B4, B6, B8
Index 11	**GCAAGATC**	**CTTCGACT**	C2, C4, C6, C8
Index 12	**GCTATCCT**	**CACCTGTT**	D2, D4, D6, D8

<Index 위치 정보>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	01	09	01	09	01	09				
B	02	10	02	10	02	10	02	10				
C	03	11	03	11	03	11	03	11				
D	04	12	04	12	04	12	04	12				
E	05		05		05		05					
F	06		06		06		06					
G	07		07		07		07					
H	08		08		08		08					

B. Sample Sheet

㈜진씨커에서 제공하는 Sample Sheet (.csv)를 사용하거나, Illumina Local Run Manager (LRM)를 이용하여 Sample Sheet를 생성한다.

☞ 필요시 "Sample Sheet" 양식은 이메일 (**info@genecker.com**)로 요청하십시오.

C. Troubleshooting

문 제	예 상 원 인	해 결 방 법
Ethanol wash후 beads가 Low TE에 완전히 풀어지지 않는다.	Beads가 과하게 건조된 경우	Beads가 완전히 풀어질 때까지 pipetting 한다.
		과건조를 방지하기 위하여 Ethanol wash 후 바로 beads를 풀어준다.
Enzyme 시약의 부족	-20℃에서 enzyme을 pipetting 한 경우	Enzyme 시약을 사용하기 전 10분 동안 ice 위에 둔다.
Pipette tip에 시약이 남는 경우	점성이 있는 시약 (예: Buffer L1)은 pipette tip에 남을 수 있다.	Pipette을 위아래로 여러 번 움직여 시약을 전부 넣어준다.
Adapter dimer의 형성	잘못된 adapter의 희석	Input DNA에 맞게 adapter를 희석하여 사용한다.
	잘못된 beads 정제	PCR 이후 단계에서 정해진 용량의 beads를 사용하여 정제한다.
	Ligation master mix에 미리 Reagent L3를 넣은 경우	Reagent L3는 사용 직전 ligation master mix에 추가한다.
Library 유효성 확인을 위한 TapeStation 또는 Bioanalyzer electropherogram 결과에서 예상되는 library size보다 작은 size의 peak가 확인된 경우	Library leads의 과잉증폭으로 이중구조가 형성될 수 있다.	과잉증폭을 피하기 위하여 PCR cycles의 수를 조절한다.
	Clean up 단계에서 정량의 beads가 들어가지 않았거나 ethanol washing이 제대로 되지 않은 경우	Beads를 사용하기 전 충분히 섞어 가라앉은 beads를 충분히 풀어 사용하고, ethanol washing 후 잔여 ethanol을 완전히 제거한다.
	Clean up 단계에서 beads가 완전히 제거되지 않아 library에 beads가 남아있는 경우	Magnetic stand에 beads 반응 시 tube를 고정시키고 충분한 시간동안 기다리고 beads가 투명한 상층액과 함께 옮겨가지 않도록 주의한다.
분석 결과에서 duplication rate이 증가한 경우	Input DNA 양이 적거나 DIN 값이 낮을 경우	Input DNA양을 권장 양으로 맞추고, DIN 값이 높고 품질이 좋은 DNA를 사용한다.
	PCR cycle 수를 늘렸을 경우 duplication rate이 증가한다.	step 4. PCR amplification 과정에서 PCR cycle 수를 줄인다.

D. 사용시 주의사항

1. 본 제품은 전문가용으로 임상검체 및 진단 검사의 사용 자격을 갖추고 사용하여야 한다.
2. 본 제품은 일회용으로 재사용할 수 없다.
3. 본 제품 사용시 아래의 주의사항을 반드시 읽어 볼 것을 권장한다.
4. 본 제품은 차세대 염기서열 분석법(NGS)에 사용되는 시약으로 염기서열 분석기인 MiSeq 또는 MiSeq Dx 장비를 사용하여야 한다.
5. 매뉴얼은 최적화 및 개정될 수 있으므로 제품의 QR코드를 스캔하거나 진씨커 홈페이지 상의 매뉴얼을 확인하여야 한다.
6. 모든 시약은 ice 위에서 Master Mix를 만들도록 한다.
7. Library 제작 과정은 pipetting 오류에 민감하기 때문에 보정된 pipette 사용을 권장한다.
8. 교차오염을 방지하기 위하여 filter tip 사용을 권장한다.
9. DNA sample의 품질은 결과에 영향을 미치므로 고품질의 DNA 사용을 권장한다. 심하게 손상된 DNA는 library 제작과정의 실패 원인이 될 수 있다.
10. Library 제작에 사용되는 genomic DNA의 순도는 흡광도 260/280 비율을 기준으로 1.8~2.0 사이에 있어야 한다. (cfDNA의 경우 260/280 >1.0)
11. DNA의 농도는 Qubit® 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)와 같은 fluorescent dye 방식의 정량법으로 측정하여야 한다.
12. Library 제작에 사용하는 DNA는 TapeStation (Agilent Technologies)으로 측정한 DIN(DNA Integrity Number) 값이 7이상 (FFPE DNA의 경우 최소 3이상)인 sample을 사용할 것을 권장한다.
13. Sample 이외의 DNA 및 RNA 등에 의한 오염은 검체로부터 추출한 DNA 정량에 영향을 줄 수 있으므로 주위의 환경을 깨끗이 하여 교차오염이 일어나지 않도록 유의한다.
14. 검사 시약 및 장비의 오염, 권고사항과 다른 반응온도 또는 보관조건은 검사결과에 영향을 미칠 수 있다.
15. 본 제품의 사용과 관련하여 도움이 필요한 경우에는 ㈜진씨커 고객센터 (**info@genecker.com**)에 문의한다.

문서 및 지원

면책조항

법이 허용하는 범위 내에서 ㈜진씨커는 사용을 포함하여 이 문서와 관련된 또는 이 문서에서 발생하는 특수한, 부수적, 간접적, 처벌적, 복합적, 또는 간접적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

기호

기호에 관한 표는 배송, 소모품 또는 소모품 포장 등에 관한 사항

Symbol	설명	Symbol	설명
	제조사 Manufacturer		온도제한 (℃) Upper and lower limits of temperature
	제조 일자 Date of manufacture		주의 caution
	재 주문 번호 Catalog number		유효기간 Use by
	배치코드 Batch code		Test 수 Contains sufficient for <n> tests
	사용 지침 참조 Consult instructions for use		재사용 금지 Do not reuse
	체외진단의료기기 In vitro diagnostic use		

개정이력:

문서번호	제•개정	제•개정 일자	개정 내용
GC-IFU-N201V-KR	0	2024.10.10	신규 제정

고객 및 기술지원 :)

고객 및 기술지원을 받으려면 GeneCker에 문의하십시오

info@genecker.com

www.genecker.com

주식회사 진씨커
서울특별시 성동구 성수일로 10길 26, 1202~1204호(성수동 2가, 하우스디세종타워)
Tel: 02-3499-4247 / Fax: 02-3499-4248 / Web: www.genecker.com

㈜진씨커는 본 사용설명서에 나와있는 작업과 관련된 제품 생산에 책임이 있습니다.
사용설명서의 내용은 기능 및 성능 향상을 위해 예고없이 변경될 수 있습니다.