

MiSeq™ i100 시리즈를 이용한 라이브러리 QC

대용량 시스템으로 시퀀싱 전 라이브러리의 품질 평가 및 풀링 최적화



빠르고 유연하게 하루 안에 도출되는 시퀀싱 결과로 라이브러리 품질 관리 간소화



자동 온보드 계산으로 간편해진 라이브러리 리밸런싱 지원



인덱스 표현의 밀접한 상관관계를 바탕으로 대용량 시스템으로 생성한 결과의 신뢰도 향상

소개

대용량 시퀀싱의 효율성을 크게 높이려면 첫 라이브러리의 품질을 확인하는 것이 중요합니다. 낮은 품질의 라이브러리는 대규모 시퀀싱 프로젝트의 성공을 저해하고 추가적인 비용과 시간이 발생하는 반복 실험으로 이어질 수 있습니다. 형광광도법(Fluorometry) 또는 qPCR을 통한 라이브러리의 정량/정성 분석과 같은 기존의 라이브러리 품질 관리(quality control, QC) 방법은 기능 분석이 아니며, 올바른 인덱스가 부착된 라이브러리의 준비 여부는 평가하지 않습니다. MiSeq i100 시리즈는 실제 규모의 런(run)을 NovaSeq™ 6000 시스템 또는 NovaSeq X 시리즈로 수행하기에 앞서 라이브러리 품질에 대한 빠른 기능 분석에 활용할 수 있어, 연구자는 시간과 비용을 절약하는 동시에 더 좋은 결과를 기대해 볼 수 있습니다.

MiSeq i100 시리즈는 간단하고 간소화된 워크플로우를 통해 상세한 품질 매트릭스(quality metrics)를 신속하게 생성합니다. 품질 매트릭스는 부적절한 라이브러리 프랩이나 런 계획 단계에서 인덱스 할당 오류로 인해 발생하는 샘플 드롭아웃(dropout)을 감지하는 데 사용할 수 있으며, 풀(pool)의 리밸런싱(rebalancing, 양적 균형 재조정)을 위한 자동 계산을 실행하여 모든 샘플에 걸쳐 균형 있는 인덱스 표현을 제공합니다. 이 Application Note는 NovaSeq X 시리즈 또는 NovaSeq 6000 시스템으로 시퀀싱 전 MiSeq i100 시리즈를 통해 우수한 라이브러리 표현을 제공하는 빠르고 간편하며 비용 대비 효과적인 라이브러리 QC 워크플로우를 소개합니다(그림 1).

MiSeq i100 시리즈를 이용한 라이브러리 리밸런싱

MiSeq i100 시리즈는 특정 풀에서 더 균일한 인덱스 표현을 얻기 위해 라이브러리 드롭아웃 스크리닝과 라이브러리 리밸런싱을 진행하는 라이브러리 QC 도구로 활용할 수 있습니다. 또한 MiSeq i100 시리즈는 DRAGEN™ Library QC 앱(v1.0.13)을 온보드 소프트웨어로 지원합니다. 이 앱은 자동으로 시퀀싱 리드(read)를 디멀티플렉싱(demultiplexing)하고 계산을 실행하며 대용량 시스템으로 시퀀싱 전 라이브러리 리밸런싱 실행 시 참고할 수 있는 보고서를 생성합니다(그림 2). 자동 리밸런싱 계산 기능과 인덱스를 먼저 시퀀싱하는 Index-First 시퀀싱 기능을 결합한 MiSeq i100 시리즈는 빠르면 약 3.2시간 내에 디멀티플렉싱된 라이브러리 정보를 제공할 수 있습니다.

그림 1: 라이브러리 QC 워크플로우



시퀀싱이 완료된 후 DRAGEN Library QC 앱을 통해 온보드로 또는 클라우드에서 리밸런싱 계산을 자동 실행하는 MiSeq i100 시리즈는 빠르면 약 3.2시간 이내에 라이브러리 QC 및 리밸런싱에 필요한 디멀티플렉싱된 라이브러리 정보를 생성하는 간편한 워크플로우를 지원합니다.

그림 2: DRAGEN Library QC 앱의 라이브러리 리밸런싱 계산 보고서 예시

illumina DRAGEN Reports

Demultiplex Report

Run name: DRAGEN_LibraryQC_requeue Created on: 2025-02-17 03:09

Demultiplex Stats Top Unknown Barcodes Index Hopping Counts Library Rebalancing

Library Rebalancing Stats

[Download CSV](#)

Sample ID	Index 1	Index 2	Reads	% Reads	Rebalancing Factor	Rebalanced Input Volume
Sample1	TACTCATA	CCTGTGGC	7,896,538	0.2544%	1	5
Sample2	CGTCTGCG	TTCACAAT	7,005,661	0.2257%	1.1272	5.6358
Sample3	TCGATATC	ACACGAGT	7,756,899	0.2499%	1.018	5.09
Sample4	CTAGCGCT	GTGTAGAC	7,507,949	0.2419%	1.0518	5.2588

DRAGEN Library QC 앱은 FastQC와 Full Pipeline, 두 가지 모드(MiSeq i100 시리즈 제품 지원 문서 내 요약 내용 참조)를 지원함. FastQC Mode에서는 BCL Convert/Demultiplex만이 실행되며 1차 매트릭스와 함께 리밸런싱 계산이 제공됨

방법

라이브러리 준비

라이브러리는 300 ng의 NA12878 gDNA(Coriell Institute for Medical Research, 카탈로그 번호: NA12878)를 가지고 Illumina DNA PCR-Free Prep(Illumina, 카탈로그 번호: 20041795), Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation(96 indexes, 96 samples; Illumina, 카탈로그 번호: 20091654) 및 Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation(96 indexes, 96 samples; Illumina, 카탈로그 번호: 20091656)을 사용하여 Biomek NGenius Next Generation Library Prep System(Beckman Coulter, 카탈로그 번호: C62703)으로 준비했습니다. 이어서 100 ng의 gDNA를 가지고 TruSeq™ DNA Nano(Illumina, 카탈로그 번호: 20015965)와 IDT for Illumina DNA UD Indexes v2 (96 indexes, 96 samples; Illumina, 카탈로그 번호: 20040870)를 사용하여 수동으로 라이브러리를 준비했습니다.

시퀀싱 및 리밸런싱

준비한 라이브러리를 동일한 볼륨으로 풀링한 후 MiSeq i100 Plus 시스템에서 MiSeq i100 Series 5M Reagent Kit(300 Cycles; Illumina, 카탈로그 번호: 20126566)를 사용하여 24-plex로 2 × 151 bp 시퀀싱 런을 수행했습니다(표 1). 비교를 위해 동일한 라이브러리를 iSeq™ 100 시스템에서 iSeq 100 i1 Reagent v2(300 Cycles) Kit(Illumina, 카탈로그 번호: 20031371)를 사용하여 시퀀싱했습니다.

시퀀싱 데이터는 MiSeq i100 Plus 시스템에서 온보드로 라이브러리 리밸런싱 계산을 자동 실행하는 DRAGEN Library QC 앱(v1.0.13)을 통해 분석했습니다. 라이브러리 풀의 리밸런싱 후 NovaSeq X Plus 시스템과 NovaSeq 6000 시스템으로 2 × 151 bp 시퀀싱 런을 수행하여 인덱스 변동 계수(coefficient of variation, CV)를 확인했습니다.

표 1: MiSeq i100 시리즈를 이용한 라이브러리 QC 결과

파라미터	Illumina DNA PCR-Free Prep	Illumina DNA PCR-Free Prep	TruSeq DNA Nano
자동화 여부	Beckman Coulter Biomek NGeniusS	Beckman Coulter Biomek NGeniusS	수동
gDNA	Coriell Human NA12878	Coriell Human NA12878	Coriell Human NA12878
DNA 사용량	300 ng	300 ng	100 ng
어댑터	Illumina Set A UDI 1~24개	Illumina Set B UDI 97~120개	IDT for Illumina TruSeq UDI 1~24개
로딩 농도	120 pM	120 pM	120 pM
이용률(% Occupied)	91.59%	89.27%	91.43%
필터 통과 클러스터 비율(% PF)	80.42%	77.20%	85.02%

결과

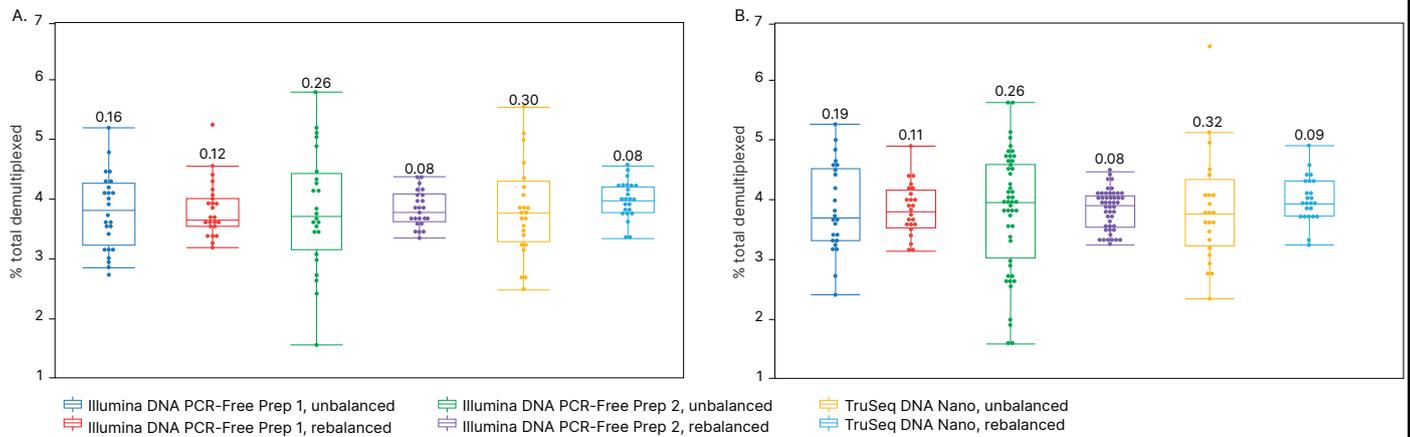
라이브러리 리밸런싱을 통한 인덱스 CV의 개선

Illumina DNA PCR-Free Prep과 TruSeq DNA Nano를 사용해 준비한 라이브러리를 MiSeq i100 시리즈로 시퀀싱했습니다. 라이브러리 리밸런싱 계수(rebalancing factor)는 온보드 DRAGEN Library QC 앱(v1.0.13)을 통해 획득했습니다. 리밸런싱이 적용된 라이브러리와 리밸런싱이 적용되지 않은 불균형 상태의 라이브러리를 NovaSeq X Plus 시스템과 NovaSeq 6000 시스템에서 시퀀싱했습니다. 시퀀싱 결과를 보면, NovaSeq X Plus 시스템(그림 3A)과 NovaSeq 6000 시스템(그림 3B) 모두에서 3가지 라이브러리 풀의 리밸런싱 후 인덱스 CV가 개선된 것을 확인할 수 있었습니다.

시스템 간 인덱스 표현의 상관관계

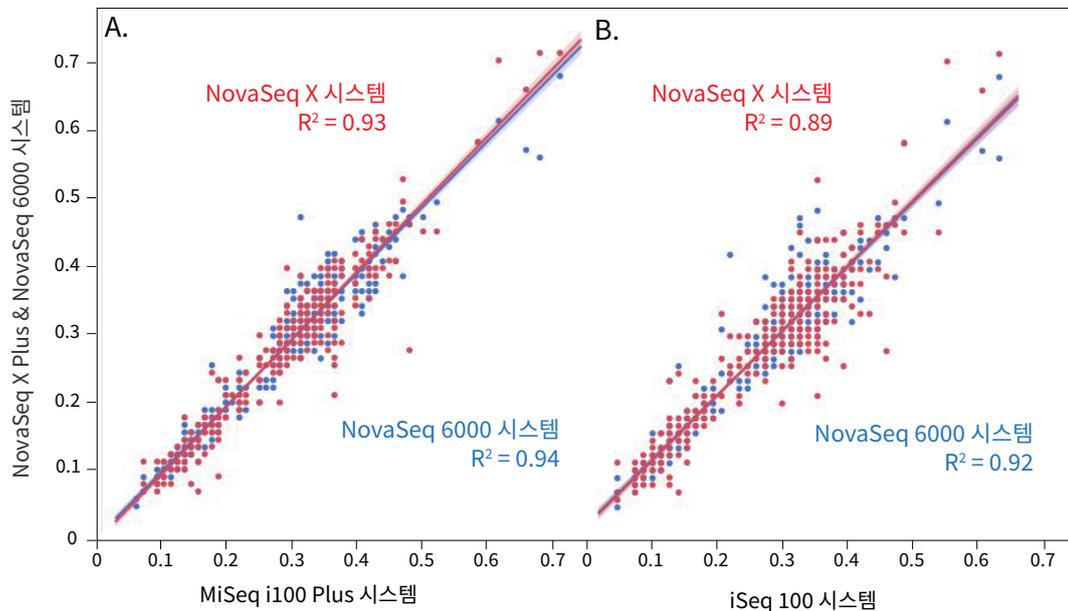
MiSeq i100 Plus 시스템, iSeq 100 시스템, NovaSeq X Plus 시스템 및 NovaSeq 6000 시스템 간 인덱스 표현의 베이스라인 상관관계를 평가했습니다. Hamilton STAR 자동 리퀴드 핸들러(automated liquid handler)를 사용해 Coriell Human NA11992 gDNA를 가지고 384-plex Illumina DNA PCR-Free Prep 라이브러리 풀을 준비했습니다. 풀링한 라이브러리는 MiSeq i100 Plus 시스템, iSeq 100 시스템, NovaSeq X 시스템, NovaSeq 6000 시스템에서 각각 시퀀싱했습니다. MiSeq i100 Plus 시스템으로 확보한 디멀티플렉싱된 라이브러리 정보는 NovaSeq X Plus 시스템과 NovaSeq 6000 시스템으로 확보한 디멀티플렉싱된 라이브러리 정보와 $R2 > 0.9$ (그림 4A)의 밀접한 상관관계를 보였으며, 이 수치는 iSeq 100 시스템으로 확보한 디멀티플렉싱된 라이브러리 정보(그림 4B)와 동등한 수준이었습니다.

그림 3: MiSeq i100 Plus 시스템을 이용한 라이브러리 리밸런싱



MiSeq i100 Plus 시스템으로 3가지 24-plex 인간 라이브러리 풀(즉, Illumina DNA PCR-Free Prep 1, Illumina DNA PCR-Free Prep 2, TruSeq DNA Nano)을 시퀀싱한 후 라이브러리 리밸런싱 계수를 온보드 DRAGEN Library QC 앱(v1.0.13)을 통해 획득함. NovaSeq X Plus 시스템과 NovaSeq 6000 시스템으로 리밸런싱이 적용된 라이브러리(rebalanced)와 리밸런싱이 적용되지 않은 불균형 상태의 라이브러리(unbalanced)를 시퀀싱함. (A) NovaSeq X Plus 시스템과 (B) NovaSeq 6000 시스템 모두에서 3가지 라이브러리 풀의 리밸런싱 후 인덱스 CV(각 박스 플롯 상단에 평균 값 표시)의 개선이 확인됨

그림 4: 인덱스 표현의 상관관계



인덱스 표현은 (A) MiSeq i100 시리즈가 NovaSeq X Plus 시스템 및 NovaSeq 6000 시스템과 밀접한 상관관계를 보였으며, 이는 (B) iSeq 100 시스템과 NovaSeq X Plus 시스템 및 NovaSeq 6000 시스템과의 상관관계와 비슷한 수준인 것으로 확인됨

요약

MiSeq i100 시리즈는 빠르면 3.2시간 안에 디멀티플렉싱된 라이브러리 정보를 제공할 수 있는 빠르고 간편하며 비용 대비 효과적인 라이브러리 QC 워크플로우를 지원합니다. 인덱스 표현의 밀접한 상관관계를 기반으로 특정 인덱스 페어에 대한 대용량 시퀀싱 시스템의 인덱스 표현을 예측해 볼 수 있습니다. 연구자는 이 라이브러리 QC 기능을 이용하여 NovaSeq X 시리즈 및 NovaSeq 6000 시스템으로 최적의 시퀀싱 성능을 확보할 수 있습니다.

상세 정보

[MiSeq i100 시리즈](#)

[NovaSeq X 시리즈](#)

[NovaSeq 6000 시스템](#)



무료 전화(한국) 080-234-5300
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. All rights reserved.
모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.
특정 상표 정보는 www.illumina.com/company/legal.html을 참조하십시오.
M-GL-02871 v1.0 KOR