

NovaSeq 6000

시퀀싱 시스템 가이드



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.

© 2020 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
자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v14	2020년 9월	키트의 카탈로그 번호를 최신 v1.0 및 v1.5 Reagent Kit 제품의 카탈로그 번호로 업데이트.
자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v13	2020년 7월	NovaSeq 6000 Reagent Kit v1.5 및 특정 런 매트릭스 데이터 필드에서 레인별 메트릭 데이터를 제공하는 Software v1.7 관련 정보 추가.
자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v12	2020년 2월	변성(denaturation) 및 희석(dilution) 관련 정보를 새로운 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)로 이동.
자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v11	2019년 2월	Xp Workflow의 라이브러리 풀 Plexity 표 업데이트.
자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v10	2019년 1월	SP Flow Cell에 관한 정보 추가. Standard Workflow 및 Xp Workflow의 권장 라이브러리 풀 Plexity 표 업데이트.
자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v09	2018년 11월	NovaSeq 6000 Support 페이지 링크 수정. 누락된 경고 사항 추가.
자료 번호: 20020483 문서 번호: 1000000019358 v08	2018년 9월	NovaSeq 6000 S4 Kit(200 cycles)에 관한 정보 추가. 사용자 계정 관련 정보 추가. 싱글 셀 로딩 농도 추가. Staggered start(시차를 둔 런 시작) 지침 업데이트. BaseSpace 로그인 지침 업데이트. 프리런 검사 지침 업데이트. 종료 또는 재시작 시 확인 요구 사항에 대한 참고 문구 추가. 완료되지 않은 포스트런 워시에 대한 참고 문구 추가. 명확한 메인터넌스 워시 정보 제공. 명확한 소프트웨어 업데이트 정보 제공.

문서	날짜	개정 내용
<p>자료 번호: 20020483 문서 번호: 1000000019358 v07</p>	<p>2018년 4월</p>	<p>시퀀싱 전 부스트 단계에서 시약 혼합용 라이브러리 튜브의 사용법에 대한 명확한 설명 제공. 소모품 또는 소모품 포장지에 표시되어 있는 기호를 설명하는 표 추가. '런 설정 모드' 섹션에 Illumina Proactive 모니터링 서비스에 대한 정보 추가. NovaSeq LIMS API에 대한 정보 추가. NovaSeq Control Software v1.4.0에 대한 설명 업데이트. 일반적인 S2 Flow Cell의 필터 통과 리드 수에 관한 정보 업데이트. NovaSeq Xp Workflow의 권장 로딩 농도 업데이트. 플로우 셀 포장 개봉 지침 업데이트. 라이브러리를 플로우 셀에 로딩하는 명확한 절차 제공. 메인터넌스 워시 시작 시 기기의 가용 여부에 대한 참고 문구 추가. 시차를 둔 런의 시작에 사용되는 타이머에 대한 정보 추가. SRP 규칙의 추가 또는 삭제 지침 업데이트.</p>
<p>문서 번호: 1000000019358 v06</p>	<p>2018년 2월</p>	<p>'플로우 셀' 섹션에 S1 Flow Cell 사용 시 소프트웨어 v1.3.1이 필요함을 명시하는 참고 문구 추가. '라이브러리 로딩 방법' 표에 기재된 설명 및 Standard Workflow의 로딩 볼륨 업데이트. '시약 키트 구성품' 섹션에 주의 사항 추가. 0.5 ml 튜브 및 1.5 ml 튜브, 20 ul, 200 ul, 1000 ul 피펫용 팁을 '소모품' 표에 추가. '장비' 표에 메스 실린더 추가. 제4장 및 제5장에 '플로우 셀 준비' 섹션을 추가하고, 단계를 제4장에서 해당 섹션으로 이동. 제4장에 기술된 S1 Flow Cell의 총 볼륨 업데이트. '권장 라이브러리 풀 Plexity' 표를 제4장의 '표준화된 라이브러리 풀 생성' 섹션에 추가. 제4장 및 제5장에서 SBS 기법 및 클러스터 카트리지를 해동 단계를 업데이트. 플로우 셀 준비에서 해동 지침을 명확히 함. 'NovaSeq Xp의 권장 로딩 농도'에 제공되는 해동 정보 업데이트. 제5장의 '표준화된 라이브러리 풀 생성하기' 섹션의 '권장 라이브러리 풀 Plexity' 표 업데이트. NovaSeq Xp Workflow 요약 및 플로우 셀 준비 섹션에 플로우 셀을 포장에서 꺼낸 후 12시간 이내에 사용해야 함을 명시하는 문장 추가.</p>
<p>문서 번호: 1000000019358 v05</p>	<p>2017년 12월</p>	<p>시퀀싱 워크플로우 다이어그램에 Xp Workflow에 사용하는 빈 라이브러리 튜브에 대한 명확한 설명 추가. Standard Workflow의 '라이브러리 및 PhiX Control(선택 사항) 변성하기' 섹션에서 5단계 표에 기술된 Tris-HCl 볼륨 업데이트. NovaSeq Xp Workflow의 'ExAmp Master Mix 준비하기' 섹션에서 4단계 끝부분에 최상의 결과를 위해서는 볼텍싱이 필요함을 명시하는 참고 문구 추가. NovaSeq Xp Workflow의 '라이브러리를 플로우 셀에 로딩하기' 섹션에서 3단계 끝부분에 샘플을 천천히 로딩할 것을 상기시키는 문구 추가.</p>

문서	날짜	개정 내용
<p>자료 번호: 20023471 문서 번호: 1000000019358 v04</p>	<p>2017년 10월</p>	<p>기기의 기능 설명란에 개별 레인 로딩 정보 추가. '소모품' 표에 NovaSeq Xp 2-Lane Kit 및 NovaSeq Xp 4-Lane Kit 추가. NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack 및 NovaSeq 4-Lane Manifold Pack 추가. '장비' 표에 NovaSeq Xp Flow Cell Dock 및 NovaSeq Xp Workflow용 P200 ul 피펫 추가. NovaSeq Xp Workflow를 위한 '소모품 준비하기' 장 추가. '폐시약 수거 용기 비우기'를 '시퀀싱' 장에서 'NovaSeq Standard Workflow' 장 및 'NovaSeq Xp Workflow' 장의 도입부로 이동. Standard Workflow에서 '풀링된 라이브러리 농도' 표 및 '권장 로딩 농도' 표 업데이트.</p>
<p>자료 번호: 20020483 문서 번호: 1000000019358 v03</p>	<p>2017년 9월</p>	<p>S1 Flow Cell 및 S4 Flow Cell 지원 등 NovaSeq Control Software v1.2에 대한 설명 업데이트. S1 Flow Cell 및 S4 Flow Cell의 듀얼 플로우 셀 런 수행 시 필요한 디스크 용량 정보 추가. 특정 *.json 파일의 명명 규칙 기술. '키트 및 액세서리' 장에서 키트의 개요에 기술된 정보 재정렬. '키트 및 액세서리' 장에 시약 및 라이브러리 로딩 키트의 구성, 구성품, 호환성 라벨 표시에 대한 설명 제공. '별도 구매 소모품' 섹션에 NovaSeq 6000 Reagent Kit 추가. 라이브러리 풀링 및 변성 지침에 S1 Flow Cell 및 S4 Flow Cell에 관한 정보가 포함되도록 업데이트. S1 및 S2는 2시간, S4는 4시간 동안 항온 수조에서의 해동이 필요하다는 시약 카트리지 해동 지침 업데이트. S4 구성품을 포함하도록 라이브러리 튜브, 시약 카트리지 및 플로우 셀에 대한 설명 업데이트. '유지 관리' 장에 자동 소프트웨어 업데이트에 대한 섹션 추가. <i>Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint</i>(출판 번호: 970-2012-013)를 언급한 부분을 <i>NovaSeq Series and HiSeq X Ten Data Quality Comparison</i>(출판 번호: 770-2017-010)으로 대체. 제6장의 '런 파라미터 입력하기' 섹션에 명시된 3단계에 참고 문구 추가. '플로우 셀 타입' 섹션에 S1 및 S4 타입 관련 정보가 포함되도록 업데이트.</p>

문서	날짜	개정 내용
자료 번호: 20018871 문서 번호: 1000000019358 v02	2017년 4월	다음 정보 추가. • Illumina가 제공하는 런 수행에 필요한 소모품. • 시약 키트 구성품의 보관 조건. • 권장 라이브러리 로딩 농도. • 플로우 셀 2개 사용 시 NaOH 희석. • 로딩 전 플로우 셀을 실온으로 해동하는 단계. • 폐시약 수거 용기를 비운 후 장갑을 교체하는 단계. • 타사 LIMS 시스템의 LIMS 아웃풋 설정. • 샘플 시트 명명 규칙. • Process Management 화면 아이콘 및 문제 해결 방법. • Windows 보안 기능 및 설정 지침을 포함하는 부록. • 기술지원팀의 연락처. 시약 카트리지가 해동 시간을 4시간으로 변경. 1% PhiX spike-in 볼륨을 0.9 µl로 변경하고 10 mM Tris-HCl(pH 8.5)를 사용하여 10 nM PhiX를 희석하도록 PhiX spike-in 지침 업데이트. 미립자가 육안으로 확인되는 경우에만 플로우 셀과 플로우 셀 스테이지를 세척하도록 지침 업데이트. 메인터넌스 워시 빈도를 14일로 변경. 지침 간 통일성을 위해 소모품 준비 지침을 재정렬하고 통합함. 프렌치 도어를 액체 장착부 문으로 명칭 변경.
자료 번호: 20018406 문서 번호: 1000000019358 v01	2017년 3월	Process Management 화면의 열 이름을 Sequencing으로 수정.
자료 번호: 20015871 문서 번호: 1000000019358 v00	2017년 2월	최초 발행.

목차

제1장 개요	1
소개	1
추가 리소스	2
시퀀싱의 개요	2
시퀀싱 워크플로우	3
기기 구성품	5
제2장 키트 및 액세서리	10
키트의 개요	10
Reagent Kit의 구성품	11
NovaSeq Xp Kit의 구성품	15
NovaSeq Xp Flow Cell Dock	15
기호 설명	16
제3장 시작하기	18
기기 켜기	18
설정하기	19
별도 구매 소모품 및 장비	24
제4장 Standard Workflow: 소모품 준비	27
방법	27
SBS 카트리지와 클러스터 카트리지가 해동하기	27
폐시약 수거 용기 비우기	28
플로우 셀 준비하기	30
시퀀싱을 위해 라이브러리 풀링 및 변성하기	30
제5장 NovaSeq Xp Workflow: 소모품 준비	31
NovaSeq Xp Workflow의 요약	31
방법	32
SBS 카트리지와 클러스터 카트리지가 해동하기	32
폐시약 수거 용기 비우기	33
플로우 셀 준비하기	35
ExAmp 시약 해동하기	35
시퀀싱을 위해 라이브러리 풀링, 변성 및 로딩하기	35

제6장 시퀀싱	40
시퀀싱 런 설정하기	40
런 진행 상황 모니터링하기	46
시차를 두고 런 시작하기	47
런 삭제하기	47
30번 포지션 분리하기	48
자동 포스트런 워시 수행하기	48
제7장 유지 관리	50
예방적 유지 관리	50
메인テナンス 워시 수행하기	50
소프트웨어 업데이트	54
부록 A 문제 해결	55
문제 해결 리소스	55
문제 해결 파일	55
프리런 검사 오류	55
Process Management를 통한 문제 해결	56
클러스터링 시작 전 런 실패	56
런 종료	57
기기 종료	58
부록 B Real-Time Analysis	59
Real-Time Analysis 소프트웨어의 개요	59
Real-Time Analysis 소프트웨어의 워크플로우	61
부록 C 시퀀싱 결과 폴더 및 파일	64
시퀀싱 결과 폴더 구조	64
시퀀싱 결과 파일	65
부록 D Windows 보안	66
보안 구성	66
비밀번호 요구 사항	66
Windows 방화벽	66
강화된 완화 경험 툴킷	66
소프트웨어 제한 정책	67
색인	70

제1장 개요

소개	1
추가 리소스	2
시퀀싱의 개요	2
시퀀싱 워크플로우.....	3
기기 구성품	5

소개

Illumina® NovaSeq™ 6000 시퀀싱 시스템은 벤치탑 시스템과 같은 효율과 가격 대비 효과를 제공하며, 규모 조정 가능한 처리량 옵션과 유연한 시퀀싱 기술을 지원하는 프로덕션 규모의 플랫폼입니다.

기능

- ▶ **규모 조정 가능한 시퀀싱** — NovaSeq 6000은 광범위한 응용 분야에서 프로덕션 규모로 수행되는 확장된 시퀀싱에 사용되며 고품질의 데이터를 제공합니다.
- ▶ **유연한 아웃풋 옵션** — NovaSeq 6000은 아웃풋 범위가 광범위한 듀얼 플로우 셀 시스템입니다. 플로우 셀 1개를 시퀀싱하거나 리드 길이(read length)가 각기 다른 플로우 셀 2개를 동시에 시퀀싱할 수 있습니다. 4가지 유형의 플로우 셀과 다양한 리드 길이를 조합해 사용 가능합니다.
- ▶ **패턴화된 플로우 셀** — 패턴화된 플로우 셀이 촘촘한 클러스터를 생성합니다. 나노웰 간 간격이 좁아 클러스터 밀도와 데이터 아웃풋이 증가됩니다.
- ▶ **기기 내 ExAmp 혼합** — NovaSeq 6000은 간소화된 시퀀싱 워크플로우를 통해 ExAmp 시약과 라이브러리를 혼합하고, 라이브러리를 증폭하며, 클러스터를 생성합니다.
- ▶ **개별 레인 로딩** — NovaSeq Xp Flow Cell Dock로 플로우 셀의 개별 레인(lane)에 라이브러리를 미리 로딩할 수 있어 라이브러리 로딩 볼륨이 감소됩니다.
- ▶ **고처리량 라인 스캔 기술** — NovaSeq 6000은 양방향 스캔 기술이 탑재된 카메라로, 빠른 속도로 2개의 색상 채널에서 동시에 플로우 셀의 이미지를 획득합니다.
- ▶ **Real-Time Analysis(RTA)** — NovaSeq 6000은 RTA를 구현한 RTA3를 사용합니다. 이 통합된 소프트웨어는 이미지 분석과 베이스 콜링(base calling) 기능을 제공합니다.
- ▶ **BaseSpace™ Sequence Hub 통합** — 시퀀싱 워크플로우가 데이터 분석, 보관, 협업이 이루어지는 Illumina의 유전체학 컴퓨팅 환경인 BaseSpace Sequence Hub와 통합되었습니다. 런 수행 중 생성되는 파일이 BaseSpace Sequence Hub 로 실시간 전송됩니다.
- ▶ **BaseSpace Clarity LIMS 지원** — 전 과정에 걸친 샘플 및 시약의 추적, 자동화된 워크플로우 그리고 통합된 기기의 작동을 통해 작업의 효율이 높아집니다.

추가 리소스

Illumina 웹사이트의 [NovaSeq 6000 Sequencing System Support 페이지](#)에서 시스템 관련 추가 리소스를 확인하실 수 있습니다. 추가 리소스는 소프트웨어, 교육, 호환 제품 및 아래 표의 문서로 구성됩니다. 항상 Support 페이지에서 최신 버전의 문서를 확인하시기 바랍니다.

리소스	설명
Custom Protocol Selector	라이브러리 준비 방법, 런 파라미터 및 시퀀싱 런(run)에 사용되는 분석 방법에 알맞은 사용법 등이 정의된 문서를 생성하는 마법사.
NovaSeq 시리즈 현장 준비 가이드 (문서 번호: 1000000019360)	검사실 공간 요구 사항, 전기 요구 사항, 환경 및 네트워크 고려 사항 제공.
NovaSeq 시리즈 안전 및 규정 준수 가이드 (문서 번호: 1000000019357)	작동 안전 고려 사항, 규정 준수 성명, 기기 라벨에 관한 정보를 제공.
RFID 리더 규정 준수 가이드 (문서 번호: 100000002699)	규정 준수 인증 및 안전 고려 사항 등 기기의 RFID 리더에 대한 정보 제공.
NovaSeq Series Custom Primers Guide (문서 번호: 1000000022266)	Illumina의 시퀀싱 프라이머를 커스텀 시퀀싱 프라이머로 대체하는 방법에 관한 정보 제공.
NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide (문서 번호: 1000000106351)	시퀀싱 런을 위해 준비한 라이브러리의 변성(denaturation) 및 희석(dilution) 지침과 선택 사항인 PhiX Control의 준비 지침 제공.

시퀀싱의 개요

클러스터 생성

클러스터 생성 단계에서는 단일 DNA 분자가 플로우 셀 표면에 결합하는 동시에 증폭되어 클러스터를 형성합니다. Standard Workflow에서는 클러스터 생성 단계 전 기기 안에서 ExAmp Master Mix와 라이브러리가 혼합됩니다. NovaSeq Xp Workflow에서는 기기 밖에서 ExAmp 시약과 라이브러리가 혼합된 후 플로우 셀로 로딩됩니다. 볼륨은 플로우 셀 유형과 워크플로우에 따라 결정됩니다.

시퀀싱

양방향 스캔 및 2채널 시퀀싱 기법을 사용하여 클러스터의 이미지가 획득됩니다. 카메라는 빨간빛과 초록빛을 감지하는 센서를 사용하여 각 스와스(swath)의 이미지를 얻는 동시에 전체 스와스의 빨간색 및 초록색 이미지를 생성합니다. 이미징 작업이 완료되면, 패턴화된 플로우에서 정해진 위치를 기준으로 한 각 클러스터의 빨간색 신호 대 초록색 신호 비율을 바탕으로 각 타일 내 클러스터에 대한 베이스 콜링이 진행됩니다. 이 프로세스는 시퀀싱 사이클마다 반복됩니다.

분석

런 진행 중 NovaSeq Control Software(NVCS)가 데이터 분석을 위해 자동으로 베이스 콜(»*.cbcl) 파일을 지정된 결과 폴더(Output folder)로 전송합니다.

응용 분야에 따라 여러 가지 분석 방법을 활용해 볼 수 있습니다. 자세한 정보는 [Illumina 웹사이트의 BaseSpace Sequence Hub Support 페이지](#)를 참조하시기 바랍니다.

시퀀싱 워크플로우



SBS 카트리지와 클러스터 시약 카트리지를 해동합니다.



라이브러리를 풀링(pooling)한 후 변성(denaturation)합니다. Standard Workflow에서는 라이브러리를 라이브러리 튜브에 넣습니다. NovaSeq Xp Workflow에서는 ExAmp와 라이브러리의 혼합액을 플로우 셀에 로딩합니다. 두 워크플로우 모두 라이브러리 튜브를 해동한 클러스터 카트리지에 로딩합니다. 자세한 정보는 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)를 참조하시기 바랍니다.



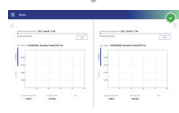
소프트웨어 인터페이스에서 **Sequence**를 선택한 후 듀얼 플로우 셀 런(Dual flow cell run) 또는 싱글 플로우 셀 런(Single flow cell run)을 선택합니다.



이전 런에서 사용한 소모품을 기기에서 꺼낸 후 현재 런에 사용할 새 소모품을 넣습니다.



Run Setup 화면에서 런 파라미터를 지정합니다. BaseSpace Sequence Hub가 이미 설정되어 있다면 Log In 화면에서 로그인합니다. 프리런 검사(pre-run check)가 끝나면 자동으로 런이 시작됩니다.



런의 모니터링은 Sequence 화면 및 런 모니터링 기능이 활성화된 경우에는 BaseSpace Sequence Hub 또는 네트워크 컴퓨터에 설치된 Sequencing Analysis Viewer(SAV)를 통해 수행이 가능합니다. 데이터가 지정된 결과 폴더(Output folder)로 전송됩니다.



시퀀싱이 완료되면 기기 워시가 자동으로 시작됩니다.

라이브러리 로딩 방법

라이브러리는 선택한 워크플로우에 따라 다음 중 한 가지 방법을 통해 NovaSeq 6000 플로우 셀에 로딩됩니다. 시퀀싱 런 설정 방법은 워크플로우에 따라 다릅니다. 항상 선택한 방법에 알맞은 지침을 따르도록 합니다. 자세한 정보는 27페이지의 *Standard Workflow: 소모품 준비* 및 31페이지의 *NovaSeq Xp Workflow: 소모품 준비*를 참조하시기 바랍니다.

표 1 라이브러리 로딩 방법

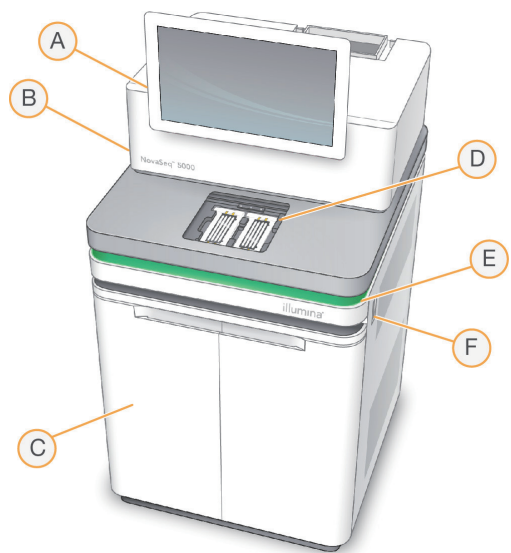
워크플로우	라이브러리 풀 로딩 및 ExAmp 혼합 방법	개별 레인 어드레스 지정 및 데이터 분석	로딩 볼륨* SP/S1-S2-S4 모드(µl)
Standard	1개의 라이브러리 풀이 라이브러리 튜브에 로딩되면, 기기 안에서 라이브러리 튜브 안 라이브러리 풀이 ExAmp 시약과 혼합된 후 클러스터링(clustering) 및 시퀀싱을 위해 플로우 셀에 자동으로 로딩됨. 시퀀싱 전 부스트 단계에서는 클러스터링 효율성을 높이는 데 도움이 되는 Conditioning Mix를 생성하기 위해 클러스터 카트리지와 라이브러리 튜브 안의 시약을 사용함.	1개의 라이브러리 풀이 플로우 셀의 모든 레인에 골고루 분배된 후 시퀀싱이 시작됨. 모든 레인의 리드(read)가 종합적으로 분석됨.	150-225-465 µl (플로우 셀 전체)
NovaSeq Xp	1개 또는 그 이상의 라이브러리(라이브러리 개수는 플로우 셀 레인 개수에 상응)가 기기 밖에서 ExAmp 시약과 수동으로 혼합된 후 NovaSeq Xp Flow Cell Dock를 통해 플로우 셀의 각 레인에 로딩됨. 라이브러리 로딩이 완료된 플로우 셀은 클러스터링과 시퀀싱을 위해 기기에 로딩됨. 시퀀싱 전 부스트 단계에서는 클러스터링 효율성을 높이는 데 도움이 되는 Conditioning Mix를 생성하기 위해 클러스터 카트리지의 시약을 빈 라이브러리 튜브를 사용해 혼합함.	각각의 라이브러리는 플로우 셀의 개별 레인에 따로 로딩된 후 시퀀싱이 시작됨. 다양한 풀, 동일한 풀의 분액 또는 임의의 조합 사용 가능. 다양한 레인의 리드가 상황에 따라 개별적으로 또는 종합적으로 분석됨.	27-33-45 µl (개별 레인)

* NovaSeq Xp Workflow에는 Standard Workflow보다 25~50% 낮은 변성 라이브러리 농도 적용.

기기 구성품

NovaSeq 6000 시퀀싱 시스템은 터치스크린 모니터, 상태 표시 바, 전원 버튼 및 USB 포트 그리고 3개의 장착부로 구성되어 있습니다.

그림 1 외부 구성품



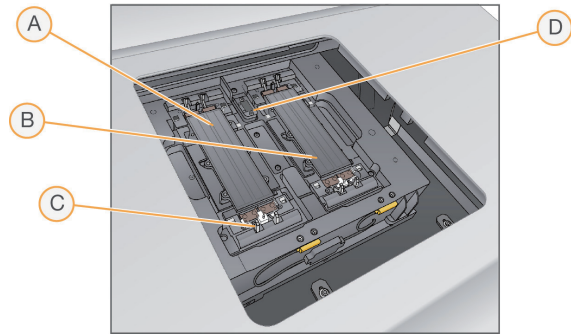
- A 터치스크린 모니터 — 시스템 구성과 런 설정 및 모니터링에 사용되는 NVCS 인터페이스 표시.
- B 광학 부품 장착부 — 플로우 셀의 이중 표면 이미징에 사용되는 광학 부품 포함.
- C 액체 장착부 — 시약 및 버퍼 카트리지와 폐시약 수거 용기 포함.
- D 플로우 셀 장착부 — 플로우 셀 고정부.
- E 상태 표시 바 — 플로우 셀의 상태를 시퀀싱 준비 완료(초록색), 처리 중(파란색) 또는 주의 필요(주황색)로 표시.
- F 전원 버튼 및 USB 포트 — 전원 버튼 및 주변 장치 연결에 사용되는 USB 연결부.

플로우 셀 장착부

플로우 셀 장착부에는 좌측에 플로우 셀 A, 우측에 플로우 셀 B를 고정하는 플로우 셀 스테이지(flow cell stage)가 들어 있습니다. 각 위치에는 자동으로 플로우 셀을 배치한 후 고정하는 클램프가 4개씩 장착되어 있습니다.

플로우 셀 스테이지에 마운트된 광학 정렬 타겟(optical alignment target)이 광학 부품의 문제를 진단하고 보정합니다. NVCS에 메시지가 표시되면 시퀀싱 결과 개선을 위해 광학 정렬 타겟이 시스템을 재정렬하고 카메라 초점을 조정합니다.

그림 2 플로우 셀 스테이지



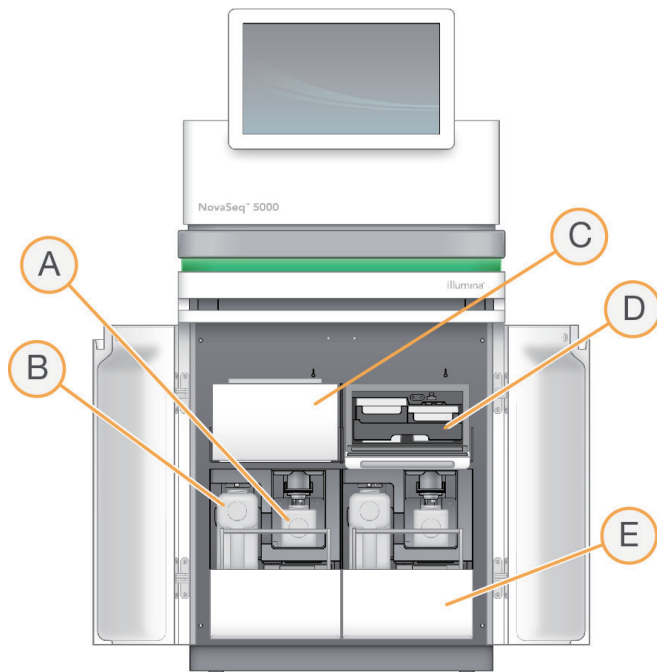
- A 플로우 셀 A 홀더
- B 플로우 셀 B 홀더
- C 플로우 셀 클램프(한 면에 제공되는 4개의 클램프 중 1개)
- D 광학 정렬 타겟

소프트웨어가 플로우 셀 장착부 문의 개폐를 제어합니다. 런이나 메인テナンス 위시 수행 전 플로우 셀을 로딩할 때 자동으로 문이 열립니다. 플로우 셀이 로딩되면 소프트웨어가 장착부의 문을 닫고, 플로우 셀을 올바른 위치로 옮긴 후, 클램프를 조이고, 진공 씬을 형성합니다. 센서가 플로우 셀의 장착 여부와 호환성을 확인합니다.

액체 장착부

런을 설정하려면 액체 장착부에 시약과 버퍼를 넣고 폐시약 수거 용기를 비워야 합니다. 액체 장착부에는 2개의 문이 달려 있으며, 동일한 형태의 플로우 셀 A 칸과 플로우 셀 B 칸으로 나뉘어져 있습니다.

그림 3 액체 장착부 구성품



- A 소형 폐시약 수거 용기 – 사용한 클러스터 카트리리지 시약이 수거되는 용기. 용이한 캡 보관을 위한 캡 홀더 제공.
- B 대형 폐시약 수거 용기 – 사용한 SBS 카트리리지와 버퍼 카트리리지 시약이 수거되는 용기. 용이한 캡 보관을 위한 캡 홀더 제공.
- C Reagent Chiller – SBS 카트리리지와 클러스터 카트리지를 냉장 보관.
- D Reagent Chiller 서랍 – 색상으로 구분된 위치에 따라 왼쪽 서랍(회색 라벨)에는 SBS 카트리리지, 오른쪽 서랍(주황색 라벨)에는 클러스터 카트리리지 수납.
- E 버퍼 서랍 – 왼쪽 서랍에는 대형 시약 수거 용기, 오른쪽 서랍에는 버퍼 카트리리지 수납.

폐시약

유체(fluidics) 시스템은 잠재적 유해 물질인 클러스터 카트리리지 시약을 소형 폐시약 수거 용기로 보내도록 설계되어 있습니다. SBS 카트리리지와 버퍼 카트리리지 시약은 대형 폐시약 수거 용기로 보내집니다. 단, 폐시약이 관을 통해 이동하는 중 교차 오염이 발생할 수 있습니다. 안전을 위해 2개의 폐시약 수거 용기에는 잠재적 유해 화학 물질이 들어 있는 것으로 간주하시기 바랍니다. 화학 물질에 관한 자세한 정보는 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)에서 확인하실 수 있습니다.

참고

폐시약을 기기 밖에서 수거하도록 시스템이 설치되어 있는 경우, 폐시약을 대형 수거 용기로 전달하는 관은 기기 외부에 있어야 합니다. 클러스터 카트리리지 시약은 항상 소형 수거 용기로 보내집니다.

시스템 소프트웨어

NovaSeq 6000의 Software Suite는 시퀀싱 런, 온보드 분석 및 관련 기능을 수행하는 통합된 애플리케이션을 제공합니다.





- ▶ **NovaSeq Control Software(NVCS)** — 시퀀싱 런 설정 과정을 단계별로 안내하고, 기기의 작동을 제어하며, 런 진행 상황에 따른 통계 데이터를 표시합니다. NVCS는 런 설정 중 소모품의 적절한 장착 및 제거 방법을 시연하는 영상을 보여 줍니다.
- ▶ **Real-Time Analysis(RTA)** — 런 과정 중 이미지 분석과 베이스 콜링을 수행합니다. NovaSeq 6000은 성능의 최적화를 위한 아키텍처, 보안, 여러 향상된 기능을 탑재한 RTA3를 사용합니다. 자세한 정보는 [59페이지의 Real-Time Analysis](#)를 참조하시기 바랍니다.
- ▶ **Universal Copy Service(UCS)** — 런이 진행되는 동안 RTA3 및 NVCS의 결과 파일을 결과 폴더(Output folder)로 복사합니다. 설정에 따라 UCS는 BaseSpace Sequence Hub로도 데이터를 전송합니다. 런 수행 중 UCS에 장애가 발생하면 자체적으로 몇차례 재연결 후 자동으로 데이터 전송을 재개하려는 시도를 하게 됩니다.

상태 아이콘

NVCS 인터페이스의 상태 아이콘은 런 상태를 표시합니다. 아이콘의 숫자 배지는 특정 상태에 대한 컨디션의 수를 나타냅니다.

런 상태가 변경되면 아이콘이 깜박이며 사용자에게 경고합니다. 해당 컨디션에 대한 설명을 보려면 아이콘을 선택하면 됩니다. 경고 메시지를 삭제하려면 **Acknowledge**를 선택한 후 **Close**를 선택해 대화 상자를 닫습니다.

표 2 NVCS 상태 아이콘

상태 아이콘	상태명	설명
	상태 양호	시스템 상태 정상.
	처리 중	시스템 처리 중.
	경고	경고가 발생하여 사용자의 확인이 필요함. 경고가 발생해도 런은 중단되지 않으며, 다음 단계 진행 전 사용자가 따로 조치를 취할 필요는 없음.
	오류	오류가 발생함. 오류 발생 시 런을 계속 진행하려면 사용자가 조치를 취해야 함.

Process Management

Process Management 화면을 통해 Compute Engine(CE)과 하드 드라이브(C:)에 접근할 수 있습니다. 또한 런 진행 상황 모니터링, 런 삭제, 디스크 용량 관리도 수행할 수 있습니다. C:\에 저장된 파일이나 폴더를 직접 삭제하지 않도록 주의합니다.

Process Management 화면에는 사용 가능한 디스크 용량, CE 및 C:\에서 사용 중인 용량, 디스크 용량을 사용 중인 런의 상태가 표시됩니다. Run Date 및 Name 열을 통해 런을 구분할 수 있습니다. Run Status, BaseSpace 및 Network 열은 특정 런의 프로세스별 상태를 보여줍니다.

표 3 Process Management 화면의 상태 아이콘

프로세스	아이콘	설명
Run Status	 Running	런 진행 중.
	 Complete	런의 시퀀싱 단계 완료.
Network	 Copying	네트워크의 결과 폴더(Output folder)로 파일 복사 중.
	 Complete	네트워크의 결과 폴더로 모든 파일 복사 완료.
	N/A	해당 없음. 네트워크의 결과 폴더 업로드가 설정된 런이 아니거나, 업로드 상태를 알 수 없음. 문제 발생 시 해결 방법은 56페이지의 <i>Process Management</i> 를 통한 문제 해결 참조.
BaseSpace	 Uploading	BaseSpace Sequence Hub로 파일 업로드 중.
	 Complete	BaseSpace Sequence Hub로 모든 파일 업로드 완료.
	N/A	해당 없음. BaseSpace Sequence Hub 업로드가 설정된 런이 아니거나, 업로드 상태를 알 수 없음. 문제 발생 시 해결 방법은 56페이지의 <i>Process Management</i> 를 통한 문제 해결 참조.

플로우 셀 런을 시작하기에 앞서, 필요한 최소한의 CE 및 C:\ 용량을 확보해 두어야 합니다.



참고

싱글 플로우 셀 런에는 아래 표에 명시되어 있는 최소 용량의 절반만이 필요합니다.

표 4 듀얼 플로우 셀 런에 필요한 최소 CE 및 C:\ 용량

플로우 셀	사이클당 필요한 CE 용량	플로우 셀 페어당 CE 용량
SP	.5 Gb	5 Gb
S1	1.35 Gb	20 Gb
S2	2.7 Gb	20 Gb
S4	4.3 Gb	40 Gb

런에 필요한 총 CE 용량은 '사이클당 필요한 CE 용량' 열에 명시된 값에 Read 1, Read 2, Index 1 및 Index 2의 길이를 합한 값을 곱하여 계산합니다(43페이지의 *런 파라미터 입력하기* 참조). 예를 들어, 페어드 엔드(paired-end) 150사이클 듀얼 플로우 셀 S4 런을 8베이스(base) 길이의 듀얼 인덱스를 사용해 수행할 때 필요한 CE 용량은 1.37 Tb((151 * 2 + 8 * 2) * 4.3)입니다.

디스크 용량을 확보하는 방법은 47페이지의 *런 삭제하기*를 참조하시기 바랍니다.

제2장 키트 및 액세서리

키트의 개요	10
Reagent Kit의 구성품	11
NovaSeq Xp Kit의 구성품	15
NovaSeq Xp Flow Cell Dock.....	15
기호 설명.....	16

키트의 개요

NovaSeq 6000으로 런을 수행하려면 NovaSeq 6000 Reagent Kit가 필요합니다. NovaSeq Xp Workflow를 사용하는 경우에는 NovaSeq Xp Kit가 추가로 필요합니다. 두 키트는 다음과 같은 옵션으로 제공됩니다.

실제 실험 설계에 적합한 사이즈의 키트를 선택하여 사용하기 바랍니다. Illumina는 런 길이가 300 사이클을 넘는 경우에만 Reagent Kit(500 cycles)를 사용하는 것을 권장합니다.

1회의 런에 필요한 전체 품목은 24페이지의 **별도 구매 소모품 및 장비**를 참조하시기 바랍니다.

표 5 키트 옵션





키트 이름	v1.0 Reagent의 Illumina 카탈로그 번호	v1.5 Reagent의 Illumina 카탈로그 번호
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles) – 40 pack	20039236	해당 없음
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles) – 20 pack	20039234	해당 없음
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles) – 10 pack	20039233	해당 없음
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 cycles)	20012866	20028312
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (200 cycles)	20027466	20028313
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (35 cycles)	해당 없음	20044417
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (300 cycles)	20012860	20028314
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (200 cycles)	20012861	20028315
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (100 cycles)	20012862	20028316
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (300 cycles)	20012863	20028317
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (200 cycles)	20012864	20028318
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (100 cycles)	20012865	20028319
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles)	20029137	20028402
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (300 cycles)	20027465	20028400
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (200 cycles)	20040326	20040719
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (100 cycles)	20027464	20028401
NovaSeq Xp 2-Lane Kit	20021664	20043130
NovaSeq Xp 4-Lane Kit	20021665	20043131

호환성 표시

호환 가능한 키트 구성품의 확인을 위해 플로우 셀과 카트리지의 라벨에는 키트 모드(**SP, S1, S2** 또는 **S4**)가 기호로 표시되어 있습니다. NovaSeq Xp Manifold는 여러 모드를 지원하며, 2-lane(SP, S1, S2 Flow Cell용) 또는 4-lane(S4 Flow Cell용)이라고 라벨에 표시되어 있습니다.

다른 모드의 키트 구성품은 동일한 런에 사용할 수 없습니다. 예를 들어, S1 카트리지는 S2 Flow Cell과 함께 사용하지 않습니다.

v1.0 SBS/CPE 카트리지와 v1.5 카트리지를 섞어서 사용하는 것도 허용되지 않습니다. 두 카트리지를 섞어 사용할 경우 오류 메시지가 나타납니다.

키트 모드	라벨	설명
SP 키트 구성품		SP Flow Cell은 650~800M개의 필터를 통과하는 싱글 리드(single-read)를 생성. 2 x 150 bp에서 최대 250 Gb, 2 x 250 bp에서 최대 400 Gb의 데이터 아웃풋 지원.
S1 키트 구성품		S1 Flow Cell은 최대 1.6B개의 필터를 통과하는 싱글 리드를 생성. 2 x 150 bp에서 최대 500 Gb의 데이터 아웃풋 지원. S1 키트는 비교적 적은 수의 샘플을 빠른 속도로 시퀀싱하는 대부분의 고처리량 애플리케이션에 적합.
S2 키트 구성품		S2 Flow Cell은 최대 4.1B개의 필터를 통과하는 싱글 리드를 생성. 2 x 150 bp에서 최대 1250 Gb의 데이터 아웃풋 지원. S2 Flow Cell은 고속 시퀀싱이 필요한 대부분의 고처리량 애플리케이션에 적합하며, S1 Flow Cell보다 더 높은 시퀀싱 아웃풋으로 더 많은 리드 생성 가능.
S4 키트 구성품		S4 Flow Cell은 최대 10B개의 필터를 통과하는 싱글 리드를 생성. 2 x 150 bp에서 최대 3000 Gb의 데이터 아웃풋 지원. 최대의 아웃풋을 지원하기 위해 개발된 4-lane 버전의 플로우 셀로, 다양한 종(species)과 커버리지 뎁스(depth)에 걸쳐 비용 대비 효율적인 전장 유전체 시퀀싱(whole-genome sequencing, WGS) 수행 가능.

각 모드의 자세한 사양은 Illumina 웹사이트의 [NovaSeq Reagent Kits Product 페이지](#)에서 확인하실 수 있습니다.

Reagent Kit의 구성품

각 NovaSeq 6000 Reagent Kit는 다음과 같은 구성품을 제공합니다. 정확한 소모품의 추적과 호환을 위해 각 구성품에는 무선주파수 식별(radio-frequency identification, RFID) 기술이 적용되어 있습니다.

최적의 성능을 위해 키트를 수령하는 즉시 키트 구성품을 명시된 온도에 보관하도록 합니다.

표 6 키트 구성품

수량	키트 구성품	보관 온도
1	라이브러리 튜브	15~30°C
1	플로우 셀	2~8°C
1	버퍼 카트리지	15~30°C
1	클러스터 카트리지	-25~-15°C
1	SBS 카트리지	-25~-15°C

주의

카트리지를 떨어뜨리지 않도록 주의합니다. 떨어뜨릴 경우 부상이 발생할 수 있습니다. 카트리지에서 새어 나온 시약에 피부가 닿으면 자극을 유발할 수 있습니다. 사용 전 카트리지에 균열이 있는지 확인하시기 바랍니다.

라이브러리 튜브

NovaSeq 6000 라이브러리 튜브는 클러스터 카트리지의 8번 포지션에 삽입되는 16 mm 튜브입니다. 용이한 식별을 위해 8번 포지션은 주황색 원으로 **Library Tube**라는 표시가 되어 있습니다. 필요시 라이브러리를 보관할 수 있도록 튜브에 나사형 캡이 달려 있습니다. 클러스터 카트리지에 튜브를 삽입하기 전 캡을 제거했는지 확인하시기 바랍니다.

그림 4 라이브러리 튜브



라이브러리 튜브는 워크플로우에 따라 둘 중 하나의 방법으로 사용됩니다.

- ▶ **Standard** — 풀링 및 변성된 라이브러리를 라이브러리 튜브에 넣은 후 캡을 닫지 않은 채로 튜브를 클러스터 카트리지에 삽입합니다. 런이 시작되면 기기가 라이브러리와 ExAmp 시약을 라이브러리 튜브 안에서 혼합합니다. 혼합된 용액은 자동으로 플로우 셀로 로딩됩니다.
- ▶ **NovaSeq Xp** — 캡을 닫지 않은 빈 라이브러리 튜브를 클러스터 카트리지에 삽입합니다. 런 수행 중 시약이 라이브러리 튜브 안에서 혼합된 후 플로우 셀로 로딩됩니다.

플로우 셀

NovaSeq 6000 플로우 셀은 카트리지에 포함되어 있는 패턴화된 플로우 셀입니다. 플로우 셀은 순서대로 나열된 수십억 개의 나노웰로 구성되어 있는 유리 기반의 기질(substrate)이며, 아웃풋 리드 수와 시퀀싱 데이터의 양을 증가시킵니다. 이 나노웰 안에서 클러스터가 생성된 후 시퀀싱이 수행됩니다.

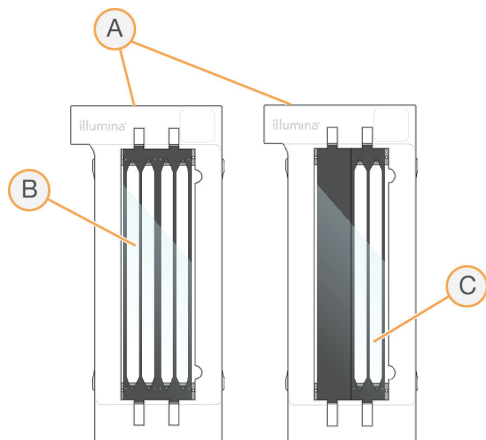
각 플로우 셀에는 풀링된 라이브러리를 시퀀싱하는 레인이 포함되어 있습니다. SP, S1 및 S2 Flow Cell에는 각각 두 개의 레인이 있고, S4 Flow Cell에는 네 개의 레인이 있습니다. 다수의 스와스(swath)에서 레인별 이미지가 획득되면, 소프트웨어가 각 스와스의 이미지를 타일(tile)이라는 더 작은 조각으로 분할합니다. 자세한 정보는 60페이지의 **플로우 셀 타일**을 참조하시기 바랍니다.



참고

S1 Flow Cell 사용 시 NVCS v1.3.1 또는 이후 버전을 사용해야 합니다. SP Flow Cell 사용 시 NVCS v1.6 또는 이후 버전을 사용해야 합니다.

그림 5 플로우 셀



- A 플로우 셀 카트리지
- B 레인이 4개인 플로우 셀(S4)
- C 레인이 2개인 플로우 셀(SP, S1 및 S2)

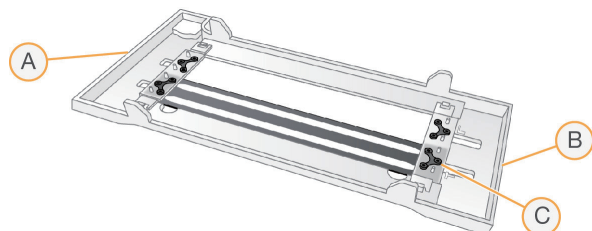
각 플로우 셀의 밑면에는 4개의 개스킷이 있습니다. 라이브러리와 시약은 플로우 셀의 주입단에 있는 개스킷을 통해 플로우 셀 레인으로 주입됩니다. 사용한 시약은 배출단에 있는 개스킷을 통해 레인에서 배출됩니다.



참고

플로우 셀을 취급할 때 개스킷을 만지지 않도록 주의합니다.

그림 6 플로우 셀의 밑면



- A 배출단
- B 주입단
- C 개스킷(4개 중 1개)

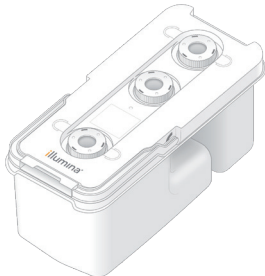

버퍼 카트리지, 클러스터 카트리지 및 SBS 카트리지


NovaSeq 6000 버퍼 카트리지, 클러스터 카트리지 및 SBS 카트리지에는 시약, 버퍼, 워시 용액이 충전되어 있는 포일로 밀봉된 저장소가 있습니다. 시약 키트에는 각 카트리지 타입 중 하나의 카트리지가 포함됩니다.

카트리지는 기기에 직접 로딩되며, 로딩 오류를 줄이기 위해 각기 다른 색상과 라벨로 구분되어 있습니다. Reagent Chiller와 버퍼 서랍 안의 가이드가 올바른 로딩 방향을 알려 줍니다.

카트리지의 라벨에는 S1/S2 또는 SP/S1/S2와 같이 지원되는 모드가 명시되어 있습니다. 카트리지는 라벨에 명시되어 있는 모드에만 사용할 수 있습니다.

표 7 시약 카트리지

카트리지	설명
 <p>NovaSeq 6000 버퍼 카트리지</p>	<p>시퀀싱 버퍼가 충전되어 있는 최대 중량 6.8 kg의 카트리지. 플라스틱 핸들이 달려 있어 카트리지의 운반, 로딩 및 언로딩이 용이함. 상단 플레이트에 오목하게 패인 부분이 있어 카트리지 적재 가능.</p>
 <p>NovaSeq 6000 클러스터 카트리지</p>	<p>클러스터링 시약, 인덱싱 시약, 페어드 엔드 시약 및 워시 용액이 충전되어 있는 카트리지. 지정된 라이브러리 튜브 위치가 표시되어 있음. 클러스터 카트리지의 주황색 라벨로 SBS 카트리지와 구별 가능.</p>

카트리지	설명
<p>NovaSeq 6000 SBS 카트리지</p> 	<p>키트가 지원하는 사이클 횟수(500, 300, 200, 100 또는 35)에 적합한 볼륨의 시퀀싱 시약이 충전되어 있는 카트리지. 3개의 시약 포지션 주위에 자동 포스트런 워시 전용 포지션이 하나씩 따로 지정되어 있음. SBS 카트리지의 회색 라벨로 클러스터 카트리지와 구별 가능.</p>

클러스터 카트리지 저장소

분리 가능한 저장소

30번 포지션의 Denaturation Reagent(변성 시약)에는 유기 아마이드 생식 독소인 포름아마이드(formamide)가 들어 있습니다. 시퀀싱 런 후 사용되지 않고 남은 시약을 안전하게 처리할 수 있도록 저장소는 분리가 가능하도록 설계되었습니다.



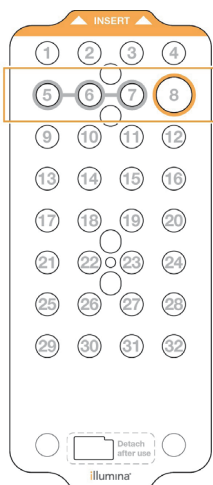
참고

클러스터 카트리지 위에 SBS 카트리지를 올려 두지 않습니다. 30번 포지션이 분리될 수 있습니다.

지정된 저장소

3개의 포지션은 커스텀 프라이머에 배정되어 있고, 비어 있는 1개의 포지션은 라이브러리 튜브에 배정되어 있습니다. 샘플 추적이 가능하도록 라이브러리 튜브는 런 설정 단계에서 클러스터 카트리지에 삽입되며, 런이 종료될 때까지 카트리지에 그대로 남아 있습니다.

그림 7 번호가 할당된 저장소



포지션	적용 대상
5, 6, 7	커스텀 프라이머(선택 사항)
8	라이브러리 튜브

커스텀 프라이머에 대한 자세한 정보는 *NovaSeq Series Custom Primers Guide*(문서 번호: 1000000022266)를 참조하시기 바랍니다.

NovaSeq Xp Kit의 구성품

각 NovaSeq Xp Kit는 일회용 제품이며 다음과 같은 품목으로 구성되어 있습니다. 최적의 성능을 위해 키트를 수령하는 즉시 키트 구성품을 명시된 온도에 보관하도록 합니다.



참고

소모품인 DPX1 및 DPX2에는 각각 JPX1 및 JPX2라는 라벨이 부착되어 있을 수 있습니다. v1.0 또는 v1.5 Reagent Kit와 호환 가능합니다.

표 8 NovaSeq Xp Kit의 구성품

수량	키트 구성품	보관 온도
1	DPX1/JPX1	-25~-15°C
1	DPX2/JPX2	-25~-15°C
1	DPX3	-25~-15°C
1	NovaSeq Xp Manifold	키트와 함께 보관 또는 실온 보관.

Xp Kit의 시약

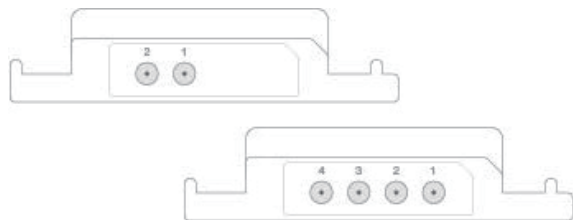
DPX1/JPX1, DPX2/JPX2 및 DPX3은 NovaSeq Xp Workflow에 사용되는 ExAmp 시약이며, 각각 개별 튜브에 들어 있습니다. 세 가지 시약을 혼합하면 나중에 플로우 셀에 로딩하기 전에 라이브러리 풀과 혼합될 ExAmp Master Mix를 만들 수 있습니다.

NovaSeq Xp Manifold

NovaSeq Xp Manifold는 라이브러리 풀을 개별 플로우 셀 레인에 직접 로딩하기 위해 NovaSeq Xp Flow Cell Dock에 장착하는 구성품입니다. NovaSeq Xp Manifold의 양쪽 측면에는 용이한 도크 장착을 돕는 암(arm)이 있습니다.

NovaSeq Xp Manifold는 2레인 및 4레인 플로우 셀에 사용할 수 있도록 각각 2웰 및 4웰 옵션으로 제공됩니다. 각 웰은 1개의 플로우 셀 레인에 할당됩니다. 플로우 셀은 NovaSeq Xp Flow Cell Dock에 거꾸로 장착됩니다. 따라서 웰의 번호는 뒤집힌 플로우 셀의 레인 번호와 일치하도록 오른쪽에서 왼쪽으로 표기되어 있습니다.

그림 8 웰 번호가 표기된 NovaSeq Xp Manifold

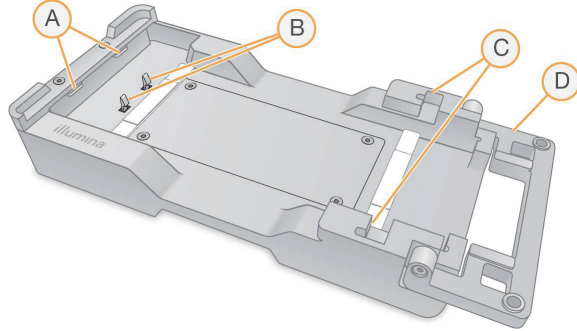


NovaSeq Xp Flow Cell Dock

NovaSeq Xp Flow Cell Dock는 라이브러리를 플로우 셀에 바로 로딩하는 데 사용하는 액세서리이며 재사용이 가능합니다. 사용자는 플로우 셀을 뒤집어 도크에 로딩하고 NovaSeq Xp Manifold를 플로우 셀 위에 장착합니다.

2개의 돌출부(브라켓 아래)와 2개의 스프링에 맞춰 플로우 셀을 올바른 방향으로 장착할 수 있습니다. 측면의 패인 홈은 NovaSeq Xp Manifold의 암을 올바른 방향으로 고정하고 균일한 간격으로 배치해 줍니다. 180° 회전하는 자석 클램프는 NovaSeq Xp Manifold를 플로우 셀 위에 단단히 고정합니다.

그림 9 NovaSeq Xp Flow Cell Dock






- A 로딩을 돕는 돌출부(브래킷 아래)
- B 플로우 셀을 정렬하는 스프링
- C NovaSeq Xp Manifold의 암을 고정하는 홈
- D 플로우 셀과 NovaSeq Xp Manifold를 고정하는 클램프

기호 설명

아래 표는 소모품이나 소모품 포장지에 표시되어 있는 기호를 설명합니다.

기호	설명
	소모품의 유효 기간. 정확한 결과를 위해 표시된 날짜 이전 소모품 사용 권장.
	제조사(Illumina)를 나타내는 기호.
	연구 전용(Research Use Only, RUO) 제품.
	소모품 식별용 부품 번호. ¹
	소모품의 제조 배치/로트 식별용 배치 코드. ¹
	일련 번호.
	빛이나 열로부터 보호가 필요함을 나타냄. 직사광선을 피해 보관.

기호	설명
	건강 유해성을 나타내는 기호.
	유해성 경고 표시.
	보관 온도(섭씨) 범위. 표시된 온도에서 제품 보관. ²

¹ REF는 개별 구성품을 식별하고 LOT는 구성품이 속해 있는 로트/배치를 식별함.

² 보관 온도는 배송 온도와 다를 수 있음.

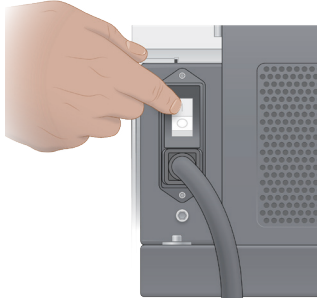
제3장 시작하기

기기 켜기..... 18
 설정하기..... 19
 별도 구매 소모품 및 장비 24

기기 켜기

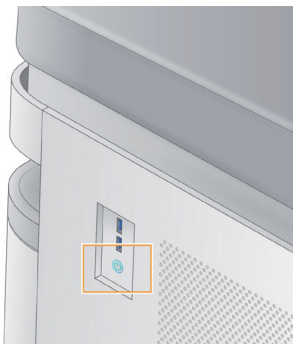
- 1 기기 뒷면에 있는 전원 토글 스위치를 (켜짐) 위치로 설정합니다.

그림 10 전원 스위치의 위치



- 2 기기 오른쪽에 있는 전원 버튼에 파란색 불이 켜질 때까지 기다렸다가 버튼을 누릅니다.

그림 11 전원 버튼의 위치



사용자 계정

NVCS v1.5 및 이후 버전에서는 사용자 계정이 관리자(Administrator)와 일반 사용자(User), 이렇게 두 가지 종류로 나뉩니다. 각각에 부여되는 권한은 다음 표에 정리되어 있습니다.

권한	관리자	일반 사용자
시퀀싱 런 설정, 시작, 모니터링	X	X
소프트웨어 다운로드 및 업데이트	X	
다른 사용자가 시작한 현재 진행 중인 런 상태 확인	X	
응답이 없는 UCS 프로세스 종료	X	

애플리케이션 데이터 파일은 C:/ProgramData에 저장됩니다. 애플리케이션은 C:/Program Files에 설치됩니다. NVCS는 어느 계정을 사용해도 전체 화면으로 실행됩니다.

시스템에 로그인하기

- 1 OS가 로딩되면 해당 시설의 사용자명과 비밀번호를 입력하여 Windows에 로그인합니다.
- 2 NVCS를 실행합니다.

소프트웨어가 실행된 후 시스템이 초기화됩니다. 초기화가 완료되면 Home 화면이 나타납니다.

NVCS가 사용자 권한 앱으로 실행됩니다. 관리자 계정으로 로그인되어 있지 않은 상태에서 Software Update와 같이 관리자 권한이 필요한 기능을 실행하려고 할 경우, 관리자 계정으로 로그인하라는 메시지가 나타납니다.

시퀀싱 런의 진행 상황에 관한 정보를 계속 확인하려면 NVCS가 실행 중일 때와 시퀀싱 런이 진행 중일 때 로그인 상태를 유지합니다.

설정하기

NVCS는 다음과 같은 설정 옵션을 제공합니다.

- ▶ 런 설정 모드(Manual 또는 File-Based)
- ▶ NovaSeq Xp Workflow
- ▶ BaseSpace Sequence Hub
- ▶ Software Update



참고

Workflow Selection 또는 Automatic Checks for Software Updates를 설정하기 전에 Mode Selection이 설정되어 있는지 확인합니다.

런 설정 모드

- ▶ **Manual** — 이후 분석을 위해 데이터를 지정된 결과 폴더로 전송하는 디폴트 모드.
- ▶ **File-Based** — 런 파라미터를 정의하는 데 BaseSpace Clarity LIMS 또는 다른 LIMS 시스템의 파일을 사용하는 모드. 자세한 정보는 [20페이지의 LIMS 런 설정 파일명 설정하기](#) 참조.

런 설정 모드를 선택할 때는 런 설정 폴더(Run setup folder)의 기존 위치를 지정해야 합니다. 이 폴더는 필수 항목이며, 위치 지정 후 Invalid Location(유효하지 않은 위치) 메시지가 나타나면 입력한 위치가 존재하지 않음을 의미합니다.

두 가지 런 설정 모드 모두 분석을 위해 데이터를 BaseSpace Sequence Hub로 전송하는 옵션을 지원합니다.

Manual Mode 설정하기

- 1 Main Menu에서 **Settings**를 선택합니다.
Settings 화면에서 Mode Selection 탭이 열립니다.
- 2 **Manual**을 선택합니다.
- 3 **[선택 사항]** 원하는 결과 폴더의 네트워크 위치를 직접 입력하거나 검색합니다.
폴더 위치로 C:\, D:\ 또는 Z:\ 드라이브를 설정하지 않습니다. 해당 드라이브를 선택할 경우 Invalid Drive Error (유효하지 않은 드라이브 오류)가 발생할 수 있습니다.
이 폴더 위치가 기본 설정값입니다. 결과 폴더의 위치는 런마다 변경 가능합니다.
- 4 **[선택 사항]** Illumina Proactive 모니터링 서비스를 활성화하려면 **Send Instrument Performance Data to Illumina**를 선택합니다. 사용 중인 NVCS의 버전에 따라 소프트웨어 인터페이스에 실제 표시되는 설정 옵션의 명칭이 본 가이드에 명시된 명칭과 다를 수 있습니다.

이 옵션을 활성화해두면 기기 성능 데이터가 Illumina로 전송됩니다. Illumina는 기기 성능 데이터를 활용하여 발생하는 문제를 더 간단하게 해결하고 잠재적인 작동 오류를 감지하여, 능동적으로 기기를 유지 관리하고 기기의 가동 시간을 최대로 늘려 줍니다. 해당 서비스의 장점은 *Illumina Proactive Technical Note(문서 번호: 1000000052503)*에서 더 자세히 확인하실 수 있습니다.

Illumina Proactive의 특징

- ▶ 시퀀싱 데이터는 Illumina로 전송하지 않습니다.
- ▶ 기기가 인터넷 접속이 가능한 네트워크에 연결되어 있어야 합니다.
- ▶ 서비스는 기본적으로 활성화되어 있습니다. 서비스의 사용을 원치 않는 경우 **Send Instrument Performance Data to Illumina** 옵션을 비활성화하면 됩니다.

5 **Save**를 선택합니다.

File-Based Mode 설정하기

1 Main Menu에서 **Settings**를 선택합니다.

Settings 화면에서 Mode Selection 탭이 열립니다.

2 **File-Based**를 선택합니다.

3 LIMS 파일이 들어 있는 런 설정 폴더의 네트워크 위치를 직접 입력하거나 검색합니다.

런을 설정하기 전에 필요한 LIMS 파일이 런 설정 폴더에 들어 있는지 확인합니다.

런 설정 중에 소프트웨어가 라이브러리 튜브 ID나 플로우 셀 ID를 사용하여 현재 런의 파일 위치를 찾습니다.

4 **[선택 사항]** 원하는 결과 폴더의 네트워크 위치를 직접 입력하거나 검색합니다.

폴더 위치를 C:\, D:\ 또는 Z:\ 드라이브로 설정하지 않습니다. 해당 드라이브로 설정할 경우 Invalid Drive Error가 발생할 수 있습니다.

결과 폴더 위치는 런별로 변경할 수 있습니다.

5 **[선택 사항]** Illumina Proactive 모니터링 서비스를 활성화하려면 **Send Instrument Performance Data to Illumina**를 선택합니다. 사용 중인 NVCS의 버전에 따라 소프트웨어 인터페이스에 실제 표시되는 설정 옵션의 명칭이 본 가이드에 명시된 명칭과 다를 수 있습니다.

이 옵션을 활성화해두면 기기 성능 데이터가 Illumina로 전송됩니다. Illumina는 기기 성능 데이터를 활용하여 발생하는 문제를 더 간단하게 해결하고 잠재적인 작동 오류를 감지하여, 능동적으로 기기를 유지 관리하고 기기의 가동 시간을 최대로 늘려 줍니다. 해당 서비스의 장점은 *Illumina Proactive Technical Note(문서 번호: 1000000052503)*에서 더 자세히 확인하실 수 있습니다.

Illumina Proactive의 특징

- ▶ 시퀀싱 데이터는 Illumina로 전송하지 않습니다.
- ▶ 기기가 인터넷 접속이 가능한 네트워크에 연결되어 있어야 합니다.
- ▶ 서비스는 기본적으로 활성화되어 있습니다. 서비스의 사용을 원치 않는 경우 **Send Instrument Performance Data to Illumina** 옵션을 비활성화하면 됩니다.

서비스가 활성화되어 있다면 외부 인터넷 연결이 되어야 이 옵션을 선택할 수 있습니다.

6 **Save**를 선택합니다.

LIMS 런 설정 파일명 설정하기

시스템이 File-Based Mode로 설정되어 있고 BaseSpace Clarity LIMS가 아닌 타사의 LIMS 소프트웨어를 사용하는 경우, LIMS가 *.json 형식의 런 설정 파일을 생성하도록 설정합니다. Standard Workflow에서는 파일 이름과 라이브러리 튜브 ID가 반드시 일치해야 합니다. 파일의 Flowcell_ID 필드는 입력하지 않아도 됩니다. NovaSeq Xp Workflow에서는 파일 이름과 플로우 셀 ID가 반드시 일치해야 하며, 반드시 플로우 셀 ID와 라이브러리 ID를 파일에 입력해야 합니다. 파일 이름과 입력값은 대소문자를 구분하지 않습니다.

외부 LIMS 소프트웨어를 사용하는 경우 NovaSeq LIMS API를 통해 NovaSeq 6000과 연결 가능합니다. API의 엔드포인트에 대한 자세한 정보는 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다.

필드 이름	값
run_name	원하는 런 이름(영문, 하이픈, 밑줄 입력 가능)
run_mode	다음 모드 중 하나 선택 <ul style="list-style-type: none"> • SP • S1 • S2 • S4
workflow_type	NoIndex, SingleIndex 또는 DualIndex
librarytube_ID	라이브러리 튜브의 RFID
rehyb*	True 또는 False
sample_loading_type	NovaSeqStandard 또는 NovaSeqXp
Flowcell_ID	플로우 셀의 ID
paired_end	True 또는 False
read1	최대 251(추가 UMI 리드 사이클까지 최대 259)까지 입력 가능
read2	최대 251(추가 UMI 리드 사이클까지 최대 259)까지 입력 가능
index_read1	입력값 제한 없음
index_read2	입력값 제한 없음
output_folder	이스케이프 시퀀스(Escape sequence)를 사용하기 위해 백슬래시(\) 2개를 포함하는 결과 폴더의 경로
samplesheet	이스케이프 시퀀스를 사용하기 위해 백슬래시(\) 2개를 포함하는 샘플 시트(Sample Sheet)나 다른 *.csv 파일의 경로
use_basespace	True 또는 False
basespace_mode	RunMonitoringOnly 또는 RunMonitoringAndStorage
use_custom_read1_primer	True 또는 False
use_custom_read2_primer	True 또는 False
use_custom_index_read1_primer	True 또는 False
use_custom_index_read2_primer	True 또는 False

* NVCS v1.4.0 또는 이전 버전은 재혼성화(rehybridization) 미지원.

파일명이 H6655DMXX.json인 *.json 파일의 예:

```
{
  "run_name": "2x151_PhiX",
  "run_mode": "S2",
  "workflow_type": "NoIndex",
  "sample_loading_type": "NovaSeqXp",
  "librarytube_ID": "NV1236655-LIB",
  "flowcell_ID": "H6655DMXX",
  "rehyb": false,
  "paired_end": true,
  "read1": 151,
  "read2": 151,
  "index_read1": 0,
  "index_read2": 0,
  "output_folder": "\\s\sgnt-prd-isi01\NovaSEQ\SeqRuns",
  "attachment": "\\s\sgnt-prd-isi01\NVSQ\SampleSheet.csv",
  "use_basespace": false,
```

```

"basespace_mode": null,
"use_custom_read1_primer": false,
"use_custom_read2_primer": false,
"use_custom_index_read1_primer": false
}

```

기본 인덱스 사이클 수 설정하기

Standard Workflow에 기본으로 적용할 인덱스 사이클 수를 다음과 같이 설정할 수 있습니다.

- 1 Main Menu에서 **Settings**를 선택합니다.
Settings 화면에서 Mode Selection 탭이 열립니다.
- 2 **Workflow Selection** 탭을 선택합니다.
- 3 **Index Cycles** 텍스트 상자에 기본 인덱스 사이클 수를 입력합니다.
- 4 **Save**를 선택합니다.

NovaSeq Standard Workflow 및 NovaSeq Xp Workflow

NovaSeq Standard Workflow와 NovaSeq Xp Workflow는 모두 Illumina의 전유 기술인 ExAmp chemistry를 사용합니다.

▶ Standard Workflow

NovaSeq Standard Workflow는 Illumina의 전유 기술인 ExAmp cluster chemistry의 2가지 핵심 단계를 기기 자체에서 자동 수행합니다.

- ▶ ExAmp Master Mix 준비
- ▶ Master Mix를 플로우 셀로 로딩

기기 자체에서 Master Mix를 준비하고 제공하므로 사용자의 개입이 최소화되어 준비된 믹스의 가변성을 줄여줍니다.

Standard Workflow의 런 설정 단계에서는 권장 농도로 변성되고 중성화된 라이브러리 풀이 들어 있는 라이브러리 튜브를 클러스터 카트리지의 8번 포지션에 삽입합니다. 권장 농도에 대한 자세한 정보는 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)를 참조하시기 바랍니다. 런 시작 이후의 단계는 기기 자체에서 수행되므로 사용자 개입이 필요 없습니다. 여기에는 ExAmp 시약을 클러스터 카트리지에서 라이브러리 튜브로 옮기는 단계, 시약 및 라이브러리 풀 믹스를 준비하는 단계, 준비된 믹스를 플로우 셀의 모든 레인으로 로딩하는 단계가 포함됩니다.

기기에서 자체적인 클러스터링 작업이 끝나면, 두 워크플로우에 공통된 몇 가지 단계가 진행됩니다. 여기에는 Conditioning Mix를 클러스터링된 플로우 셀에 적용하는 단계와 sequencing by synthesis(SBS) 기술의 적용을 위해 클러스터를 준비하는 추가적인 chemistry 단계가 포함됩니다. Conditioning Mix는 클러스터 카트리지 안의 시약과 런 설정 단계에서 삽입된 라이브러리 튜브 안의 시약을 이용하여 클러스터링 작업 중에 만들어집니다. Conditioning Mix는 NovaSeq 기기의 클러스터링 효율성을 높이는 데 도움을 줍니다.

▶ NovaSeq Xp Workflow

NovaSeq Xp Workflow는 NovaSeq Xp Flow Cell Dock와 특정 플로우 셀에 적합한 소모품 키트(NovaSeq Xp 2-Lane Kit 또는 NovaSeq Xp 4-Lane Kit)를 사용하여 다양한 라이브러리나 라이브러리 풀을 NovaSeq 플로우 셀의 개별 레인에 로딩할 수 있도록 해줍니다. NovaSeq Xp Kit에는 클러스터링에 필요한 ExAmp 시약과 레인 로딩에 필요한 NovaSeq Xp Manifold가 포함되어 있습니다.

ExAmp와 라이브러리 혼합액이 준비되면, NovaSeq Xp Flow Cell Dock와 NovaSeq Xp Manifold를 이용해 플로우 셀의 개별 레인에 로딩됩니다. 자동 액체 분주기(automated liquid handler)를 사용하여 ExAmp와 라이브러리 혼합액을 준비한 후 매니폴드에 로딩하여 플로우 셀을 충전하는 것도 가능합니다. 플로우 셀에 샘플이 로딩되면 빈 라이브러리 튜브를 클러스터 카트리지의 8번 포지션에 삽입합니다. 그 다음 플로우 셀이 기기에 장착되면 시퀀싱 런이 시작됩니다.

런이 시작되면 두 워크플로우에 공통적으로 적용되는 몇 가지 단계가 진행됩니다. 여기에는 Conditioning Mix를 클러스터링된 플로우 셀에 적용하는 단계와 SBS의 적용을 위해 클러스터를 준비하는 추가적인 chemistry 단계가 포함됩니다. Conditioning Mix는 클러스터링 작업 중에 클러스터 카트리지 안의 시약과 런 설정 단계에서 삽입한 라이브러리 튜브 안의 시약을 사용하여 만들어집니다. Conditioning Mix는 NovaSeq 기기의 클러스터링 효율성을 높이는 데 도움을 줍니다.

NovaSeq Xp Workflow 설정하기

- 1 Main Menu에서 **Settings**를 선택합니다.
Settings 화면에서 Mode Selection 탭이 열립니다.
- 2 **Workflow Selection** 탭을 선택합니다.
- 3 NovaSeq Xp Workflow를 활성화하려면 **Enable Workflow Selection**을 선택합니다.
- 4 [선택 사항] NovaSeq Xp를 디폴트 워크플로우로 설정하려면 **NovaSeq Xp**를 선택합니다.
- 5 **Save**를 선택합니다.

BaseSpace Sequence Hub 설정하기

다음 지침에 따라 BaseSpace Sequence Hub의 기본 설정을 구성합니다. 런 설정 중 현재 런의 BaseSpace Sequence Hub 사용을 비활성화하거나 Run Monitoring and Storage 설정을 변경할 수 있습니다. BaseSpace Sequence Hub에 연결하려면 인터넷 연결이 필요합니다.

- 1 Main Menu에서 **Settings**를 선택합니다.
Settings 화면에서 Mode Selection 탭이 열립니다.
- 2 **BaseSpace Sequence Hub** 체크 박스를 선택합니다.
- 3 Configuration 옵션을 1개 선택합니다.
 - ▶ **Run Monitoring and Storage** — 원격 모니터링 및 데이터 분석을 위해 런 데이터를 BaseSpace Sequence Hub로 전송. 이 옵션 선택 시 런과 함께 샘플 시트를 업로드해야 함.
 - ▶ **Run Monitoring Only** — 런의 원격 모니터링을 위해 CBCL 파일을 제외한 런 파일, InterOp 파일, 로그 파일을 BaseSpace Sequence Hub로 전송.
- 4 Hosting Location 드롭다운 메뉴에서 **EU(Frankfurt)** 또는 **USA(N. Virginia)**를 선택합니다.
이 옵션을 통해 데이터가 업로드되는 위치가 결정됩니다.
- 5 BaseSpace Enterprise 사용자는 다음의 지침을 따릅니다.
 - a **Private Domain** 체크 박스를 선택합니다.
 - b BaseSpace Sequence Hub 통합 인증(single sign-on, SSO)에 사용하는 도메인 이름을 입력합니다.
- 6 **Save**를 선택합니다.

샘플 시트 이름

NVCS v1.3.1 또는 이전 버전을 실행 중인 경우, NovaSeq 6000 런에 사용하고 BaseSpace Sequence Hub에 업로드하는 샘플 시트의 이름은 반드시 SampleSheet.csv(대소문자 구분)로 설정해야 합니다. 샘플 시트의 이름이 잘못 설정된 상태에서 Run Monitoring and Storage 옵션이 활성화되어 있으면 BaseSpace Sequence Hub는 해당 런을

주의가 필요한 런으로 플래그 표시합니다. 플래그 표시된 런은 **More | Fix Sample Sheet and Requeue**를 선택한 후 적합한 샘플 시트를 입력하는 방법을 통해 FASTQ 생성 큐로 보낼 수 있습니다. 시퀀싱 데이터는 샘플 시트가 제공될 때까지 FASTQ 파일로 변환될 수 없습니다.

NVCS v1.4 또는 이후 버전을 실행 중인 경우에는 샘플 시트 이름에 대한 제한은 없습니다.

데이터를 FASTQ 파일로 로컬 변환하기 위해 bcl2fastq2 Conversion Software v2.19 또는 이후 버전을 사용하고 있다면, Command Line(명령줄) 옵션 `--sample-sheet`를 사용하여 위치에 상관없이 모든 CSV 파일을 지정할 수 있습니다. Command Line을 사용하면 어떠한 파일 이름도 입력이 가능합니다.

Software Update 기능 설정하기

소프트웨어 업데이트 자동 확인 기능은 기본적으로 활성화되어 있습니다. 자동 업데이트 확인 기능은 Settings에서 비활성화하거나 활성화할 수 있습니다.

- 1 Main Menu에서 **Settings**를 선택합니다.
- 2 **Software Update**를 선택합니다.
- 3 **If enabled, the instrument will display a notification when a Software Update is available** 체크 박스를 선택합니다.
- 4 **Save**를 선택합니다.

별도 구매 소모품 및 장비

아래 표에 명시된 별도 구매 소모품 및 장비는 소모품 준비, 시퀀싱 및 시스템 유지 관리에 사용됩니다.

소모품

소모품	공급 업체	용도
1 N NaOH	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 변성을 위해 0.2 N 농도로 희석하여 사용.
500 ml 원심분리 병	일반 실험기자재 공급 업체	메인터넌스 위시를 위한 Tween 20의 희석에 사용.
30 ml 원심분리 튜브	일반 실험기자재 공급 업체	메인터넌스 위치에 사용하는 NaOCl을 희석할 때 사용.
일회용 장갑(powder-free)	일반 실험기자재 공급 업체	범용
70% 이소프로필 알코올 티슈 또는 70% 에탄올 알코올 티슈	VWR(카탈로그 번호: 95041-714) 또는 동일 사양 제품 일반 실험기자재 공급 업체	런 수행 전 구성품 클리닝 및 다용도로 사용.
실험용 티슈(low-lint)	VWR(카탈로그 번호: 21905-026) 또는 동일 사양 제품	플로우 셀 스테이지 건조 및 다용도로 사용.
1.5 ml 미세원심분리 튜브 (Microcentrifuge tube)	VWR(카탈로그 번호: 20170-038) 또는 동일 사양 제품	NaOH 및 라이브러리의 희석 시 양을 합칠 때 사용.
시약용(Reagent grade) 5% NaOCl	Sigma-Aldrich(카탈로그 번호: 239305)	메인터넌스 위치에 사용.
NovaSeq 6000 Reagent Kit	Illumina(10페이지의 <i>키트의 개요</i> 참조)	시퀀싱 런 수행에 사용.
20 µl 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 희석 및 로딩을 위한 피펫팅에 사용.
200 µl 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 희석 및 로딩을 위한 피펫팅에 사용.

소모품	공급 업체	용도
1000 µl 피펫 팁	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 희석 및 로딩을 위한 피펫팅에 사용.
시약 또는 분광광도계 실험용 이소프로필 알코올(99%), 100 ml 병	일반 실험기자재 공급 업체	광학 대물 렌즈의 주기적인 세척을 위한 세척 카트리지를 사용할 때 함께 주입.
Tween 20	Sigma-Aldrich(카탈로그 번호: P7949)	메인턴نس 워시에 사용.
실험용수	일반 실험기자재 공급 업체	라이브러리 변성에 사용하는 NaOH을 희석할 때 사용. 메인턴نس 워시에 사용하는 Tween 20 및 NaOCl을 희석할 때 사용.
[NovaSeq Xp Workflow] 다음 키트 중 1개. • NovaSeq Xp 2-Lane Kit • NovaSeq Xp 4-Lane Kit	Illumina: • 카탈로그 번호: 20021664 • 카탈로그 번호: 20021665	라이브러리를 플로우 셀에 수동으로 로딩할 때 사용. • SP, S1 및 S2 Flow Cell용 2-Lane Kit • S4 Flow Cell용 4-Lane Kit
[NovaSeq Xp Workflow] 다음 키트 중 1개. • NovaSeq Xp 2-Lane Kit v1.5 • NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	Illumina: • 카탈로그 번호: 20043130 • 카탈로그 번호: 20043131	라이브러리를 플로우 셀에 수동으로 로딩할 때 사용. • SP, S1 및 S2 Flow Cell용 2-Lane Kit • S4 Flow Cell 용 4-Lane Kit
[NovaSeq Xp Workflow] 0.5 ml 및 1.7 ml 튜브	일반 실험기자재 공급 업체	ExAmp 믹싱에 사용.
[NovaSeq Xp Workflow] [선택 사항] 다음 Manifold Pack 중 1개. • NovaSeq Xp 2-Lane Manifold Pack • NovaSeq Xp 4-Lane Manifold Pack	Illumina: • 카탈로그 번호: 20021666 • 카탈로그 번호: 20021667	라이브러리를 플로우 셀에 수동으로 로딩할 때 사용하는 여분의 NovaSeq Xp용 Manifold.
[선택 사항] PhiX Control v3	Illumina(카탈로그 번호: FC-110-3001)	PhiX Control의 spike-in에 사용.

illumina 키트에 포함된 소모품

플로우 셀 1개를 시퀀싱하려면 NovaSeq 6000 Reagent Kit 1개가 필요합니다. 각 키트는 아래 표에 명시된 소모품으로 구성되어 있습니다. 듀얼 플로우 셀 런에는 2개의 키트를 사용합니다.

표 9 NovaSeq 6000 Reagent Kit에 포함된 소모품

소모품(각 1개)	용도
버퍼 카트리지	런에 사용할 시퀀싱 버퍼 제공.
클러스터 카트리지	런에 사용할 클러스터링 시약, 인덱싱 시약, 페어드 엔드 시약 제공.
플로우 셀	클러스터링 및 시퀀싱 반응이 플로우 셀에서 진행됨.
SBS 카트리지	런에 사용할 시퀀싱 시약 제공.
라이브러리 튜브	사용자가 풀링 및 변성한 라이브러리를 담거나 시퀀싱의 클러스터링 효율성을 높이는 Conditioning Mix를 준비하는 데 사용하는 빈 튜브.

NovaSeq Xp Workflow에 따라 라이브러리를 플로우 셀에 직접 로딩하는 경우 각 Reagent Kit마다 NovaSeq Xp Kit를 추가하시기 바랍니다. 각 NovaSeq Xp Kit는 아래 표에 명시된 소모품으로 구성되어 있습니다.



참고

소모품인 DPX1 및 DPX2에는 각각 JPX1 및 JPX2라는 라벨이 부착되어 있을 수 있습니다. 모두 v1.0 또는 v1.5 Reagent Kit와 호환 가능합니다.

표 10 NovaSeq Xp Kit에 포함된 소모품

소모품(각 1개)	용도
DPX1/JPX1	ExAmp Master Mix 준비에 사용.
DPX2/JPX2	
DPX3	
NovaSeq Xp Manifold	라이브러리를 플로우 셀에 로딩할 때 사용.

실험용수 관련 가이드라인

기기 절차 수행 시 항상 실험용수 또는 탈이온수(deionized water, DIW)를 사용합니다. 수도물은 절대 사용하지 않습니다. 다음과 같은 물 또는 이와 동등한 물만 사용합니다.

- ▶ 탈이온수(DIW)
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18 MΩ의 물
- ▶ Milli-Q 물
- ▶ Super-Q 물
- ▶ 분자생물학 실험용수

장비

품목	공급 업체
-25~-15°C 냉동고	일반 실험기자재 공급 업체
500 ml 멸균 메스 실린더	일반 실험기자재 공급 업체
얼음통	일반 실험기자재 공급 업체
20 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
200 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
1000 µl 피펫	일반 실험기자재 공급 업체
2~8°C 냉장고	일반 실험기자재 공급 업체
향온 수조*	일반 실험기자재 공급 업체
[NovaSeq Xp Workflow] NovaSeq Xp Flow Cell Dock	Illumina(카탈로그 번호: 20021663)

* 시약 카트리지가 2개와 적절한 수위까지 물을 담을 수 있는 크기의 수조(예: 61 cm × 91.4 cm × 25.4 cm) 사용.

제4장 Standard Workflow: 소모품 준비

방법	27
SBS 카트리지와 클러스터 카트리지가 해동하기	27
폐시약 수거 용기 비우기	28
플로우 셀 준비하기	30
시퀀싱을 위해 라이브러리 풀링 및 변성하기	30

방법

샘플이나 소모품을 준비하기 전에 사용 중인 NVCS 버전이 아래 표에 명시된 최소 소프트웨어 요구 사항을 충족하는지 확인하시기 바랍니다.

표 11 최소 소프트웨어 요구 사항

플로우 셀	v1.0 Reagent Kit의 최소 지원 소프트웨어 버전	v1.5 Reagent Kit의 최소 지원 소프트웨어 버전
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	모든 버전 지원	1.7
S4	1.2.0	1.7

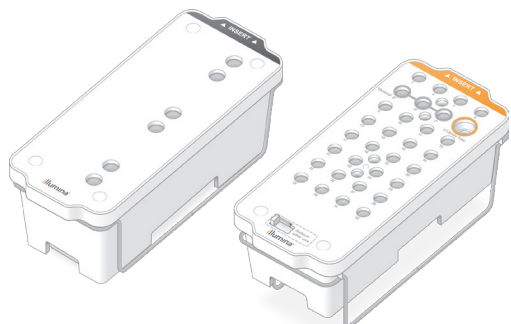
- ▶ 필수 소모품과 장비가 준비되어 있는지 확인합니다. 자세한 내용은 24페이지의 *별도 구매 소모품 및 장비*를 확인하시기 바랍니다.
- ▶ 소모품을 준비할 때는 항상 라벨을 통해 구성품 간의 호환성을 확인하도록 합니다. SP, S1, S2, S4 구성품을 서로 섞어서 사용하지 않습니다.
- ▶ 서로 다른 버전의 시약 키트를 섞어서 사용하지 않습니다.
 - ▶ v1.0 SBS 카트리는 v1.0 CPE 카트리와만 함께 사용 가능합니다.
 - ▶ v1.5 SBS 카트리는 v1.5 CPE 카트리와만 함께 사용 가능합니다.
- ▶ 명시된 볼륨, 농도, 온도 그리고 지속 시간을 사용하여 기술된 순서대로 지침을 따르도록 합니다.
- ▶ 지침에 정지점이 따로 명시되어 있지 않다면 다음 단계를 바로 진행하도록 합니다.

SBS 카트리지 및 클러스터 카트리지 해동하기

- 1 시퀀싱 런이 진행 중인 경우 카트리가 해동되는 시점에 기기의 양쪽이 모두 이용 가능할지 확인합니다.
- 2 -25~-15°C에서 보관 중이던 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지를 꺼냅니다.

- 3 각각의 카트리지를 와이어 해동 랙 안에 넣습니다.
기기와 함께 제공되는 랙은 수조 안에서 카트리가 뒤집히는 것을 방지해 줍니다.

그림 12 와이어 해동 랙 안의 카트리지



- 4 실온의 수조(19~25°C)에서 해동합니다.
물에 카트리가 절반 정도 잠기도록 합니다.
- 5 다음 표에서 해동 소요 시간을 확인하시기 바랍니다.



주의

뜨거운 물로 시약을 해동하면 데이터 품질이 저하되거나 런이 실패할 수 있습니다.

카트리지	해동 소요 시간
SP, S1 & S2 SBS 카트리지	4시간
SP, S1, & S2 클러스터 카트리지	최대 2시간
S4 SBS 카트리지	4시간
S4 클러스터 카트리지	최대 4시간

- 6 종이 타월로 카트리지 밑부분을 닦아줍니다. 웰 사이도 꼼꼼히 닦아 물기를 제거합니다.
- 7 포일 씬에 물기가 남아 있는지 확인합니다. 물기가 있으면 보풀이 없는 티슈로 닦아 제거합니다.
- 8 저장소에 얼음이 남아있지 않은지 확인하기 위해 각 카트리지의 밑부분을 검사합니다. 얼음이 남아있지 않다면 시약이 해동된 것입니다.
- 9 각 카트리지를 10회 앞뒤로 뒤집어 시약을 섞습니다.
- 10 기포를 줄이기 위해 각 카트리지의 밑부분을 작업대에 가볍게 쳐 줍니다.
- 11 시약을 4시간 안에 기기에 로딩할 수 없다면 2~8°C에 보관합니다. 최대 24시간까지 보관 가능합니다.

폐시약 수거 용기 비우기

다음 지침에 따라 **매** 시퀀싱 런 후 폐시약 수거 용기를 비웁니다. 폐시약이 외부로 배출되도록 시스템을 설치한 경우, 소형 수거 용기에 폐시약이 수거되며 시퀀싱 런마다 용기를 비워줘야 합니다. 대형 수거 용기는 제자리에 장착되어 있어야 합니다.

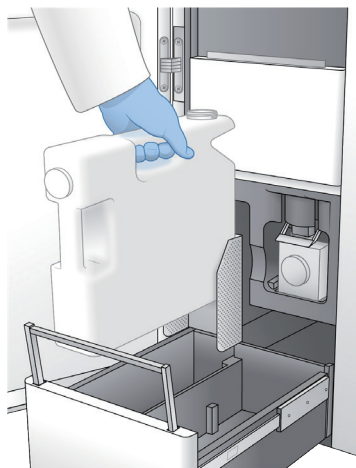


경고

이 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다. 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

- 1 다음 지침에 따라 소형 폐시약 수거 용기를 꺼내서 비웁니다.
 - a 레버를 올리고 장착부에서 소형 폐시약 수거 용기를 꺼냅니다. 이때 수거 용기의 측면을 잡도록 합니다.
 - b 수거 용기 앞에 있는 캡 홀더에서 나사형 캡을 꺼냅니다.
 - c 시약이 흘러나오지 않도록 수거 용기 입구를 캡으로 막아줍니다.
 - d 수거 용기 안의 시약이 다른 용기의 내용물과 섞이지 않도록 주의하면서 관련 규정에 따라 시약을 폐기합니다.
 - e 캡을 닫지 않은 빈 수거 용기를 다시 장착부에 넣은 후 레버를 내립니다. 캡은 캡 홀더에 넣어 보관합니다.
- 2 다음 절차에 따라 대형 폐시약 수거 용기를 꺼내서 비웁니다.
 - a 상단 핸들을 잡고 버퍼 서랍의 왼쪽 칸에 들어 있는 대형 폐시약 수거 용기를 꺼냅니다.
 - b 수거 용기 앞에 있는 캡 홀더에서 나사형 캡을 꺼냅니다.
 - c 시약이 흘러나오지 않도록 수거 용기 입구를 캡으로 막아줍니다.
 - d 관련 규정에 따라 시약을 폐기합니다. 용기를 비울 때는 양쪽 손잡이를 모두 잡습니다.
 - e 캡을 열고 빈 수거 용기를 다시 버퍼 서랍에 넣습니다. 캡은 캡 홀더에 넣어 보관합니다.

그림 13 빈 수거 용기 재장착



- 3 기기 표면의 오염을 방지하기 위해 새 장갑(powder-free)을 양손에 착용합니다.
- 4 버퍼 서랍을 닫은 후 액체 장착부의 문을 닫습니다.



경고

폐시약 수거 용기를 비우지 않으면 런이 종료되거나 수거 용기가 넘칠 수 있으며, 이로 인해 기기의 손상이나 안전 문제가 발생할 수 있습니다.

플로우 셀 준비하기

- 1 2~8°C에서 보관 중이던 새 플로우 셀 패키지를 꺼냅니다.
- 2 밀봉 상태의 플로우 셀 패키지를 실온에 도달할 때까지 10~15분간 방치합니다. 플로우 셀은 패키지에서 꺼낸 후 12시간 이내에 사용하도록 합니다.

시퀀싱을 위해 라이브러리 풀링 및 변성하기

로딩 농도는 라이브러리 준비, 정량화, 표준화 방법에 따라 차이가 있습니다. 관련 지침은 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)를 참조하시기 바랍니다. 라이브러리 풀링이 끝나면 38페이지의 SBS 카트리지가 및 클러스터 카트리지를 준비하기 단계를 진행합니다.



주의

라이브러리 튜브는 꼭 필요한 경우에만 보관하도록 합니다. -25~-15°C에서 장기간 보관하면 중복 리드 수가 증가하여 수율이 감소할 수 있습니다.

SBS 카트리지가 및 클러스터 카트리지를 준비하기

- 1 저장소에 얼음이 남아있지 않은지 확인하기 위해 각 카트리지의 밑부분을 검사합니다. 얼음이 남아있지 않다면 시약이 해동된 것입니다.
- 2 각 카트리지를 10회 앞뒤로 뒤집어 시약을 섞습니다.
- 3 기포를 줄이기 위해 각 카트리지의 밑부분을 작업대에 가볍게 쳐 줍니다.

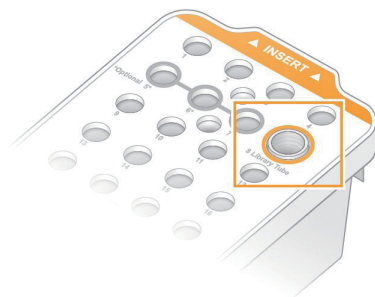
커스텀 프라이머 준비하기

커스텀 프라이머가 필요한 라이브러리를 사용하는 경우 NovaSeq Series Custom Primers Guide(문서 번호: 1000000022266)의 지침에 따라 커스텀 프라이머를 준비하시기 바랍니다.

라이브러리 튜브 로딩하기

- 1 밑부분의 라이브러리를 건드리지 않도록 주의하면서 변성 및 희석된 라이브러리 풀이 들어 있는 라이브러리 튜브를 캡을 닫지 않은 채로 클러스터 카트리지의 라이브러리 튜브 포지션(8번)에 삽입합니다.

그림 14 캡을 닫지 않은 채로 8번 포지션에 삽입된 라이브러리 튜브



제5장 NovaSeq Xp Workflow: 소모품 준비

NovaSeq Xp Workflow의 요약..... 31
 방법 32
 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지를 해동하기 32
 폐시약 수거 용기 비우기 33
 플로우 셀 준비하기..... 35
 ExAmp 시약 해동하기 35
 시퀀싱을 위해 라이브러리 풀링, 변성 및 로딩하기..... 35

NovaSeq Xp Workflow의 요약

샘플이나 소모품을 준비하기 전에 사용 중인 NVCS 버전이 아래 표에 명시된 최소 소프트웨어 요구 사항을 충족하는지 확인하시기 바랍니다.

표 12 최소 소프트웨어 요구 사항

플로우 셀	v1.0 Reagent Kit의 최소 지원 소프트웨어 버전	v1.5 Reagent Kit의 최소 지원 소프트웨어 버전
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	모든 버전 지원	1.7
S4	1.2.0	1.7



참고

NVCS는 시차를 두고 새로운 런을 시작하는 기능을 지원합니다. 자세한 내용은 47페이지의 *시차를 두고 런 시작하기*를 확인하시기 바랍니다.

NovaSeq Xp Workflow의 모든 단계를 명시된 순서대로 완료하도록 합니다.



참고

1~4단계는 동시에 진행할 수 있으며, 반드시 5단계를 진행하기 전에 완료해야 합니다.

- 1 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지를 해동합니다.
- 2 폐시약 수거 용기를 비웁니다.
- 3 밀봉 상태의 플로우 셀 패키지를 실온에 도달할 때까지 10~15분간 방치합니다. 플로우 셀은 패키지에서 꺼낸 후 12시간 이내에 사용하도록 합니다.
- 4 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)에 기술되어 있는 사용 중인 라이브러리에 해당하는 프로토콜을 참조하여 라이브러리를 표준화 및 풀링한 후, 원할 경우 PhiX Control을 넣습니다.



참고

명시된 순서대로 5~11단계를 완료합니다.

- 5 ExAmp 시약을 해동합니다.
- 6 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)를 참조하여 새로 희석한 NaOH을 준비합니다.

- 7 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)를 참조하여 라이브러리 풀을 변성 및 중성화합니다.
- 8 플로우 셀 및 도크를 준비합니다.
- 9 ExAmp Master Mix를 준비합니다.
- 10 ExAmp와 라이브러리의 혼합액을 플로우 셀에 로딩합니다.
- 11 빈 라이브러리 튜브를 클러스터 카트리지의 8번 포지션에 삽입합니다.

방법

- ▶ 필수 소모품과 장비가 준비되어 있는지 확인합니다. 자세한 내용은 24페이지의 *별도 구매 소모품 및 장비*를 확인하시기 바랍니다.
- ▶ 기기의 전원이 켜져 있고 런을 수행하기에 충분한 저장 공간이 확보되어 있는지 확인합니다. 자세한 내용은 8페이지의 *Process Management*를 확인하시기 바랍니다.
- ▶ 31페이지의 *NovaSeq Xp Workflow의 요약에 기술되어 있는 ExAmp 시약 해동하기* 단계를 시작하기 전에 기기 양쪽의 자동 포스트런 워시가 완료되었는지 확인합니다.
- ▶ 소모품을 준비할 때는 항상 라벨을 통해 구성품 간의 호환성을 확인하도록 합니다. 기기의 한쪽 측면에서 SP, S1, S2 및 S4 구성품 또는 2레인 및 4레인 구성품을 섞어서 사용하지 않습니다.
- ▶ 서로 다른 버전의 시약 키트를 섞어서 사용하지 않습니다.
 - ▶ v1.0 SBS 카트리지는 v1.0 CPE 카트리지와만 함께 사용 가능합니다.
 - ▶ v1.5 SBS 카트리지는 v1.5 CPE 카트리지와만 함께 사용 가능합니다.
- ▶ 명시된 볼륨, 농도, 온도, 작업 시간을 사용하여 기술된 순서대로 지침을 따르도록 합니다.
- ▶ 혼합을 진행할 때를 제외하고는 모든 시약과 라이브러리는 얼음 위에 올려둡니다.
- ▶ 지침에 정지점이 따로 명시되어 있지 않다면 다음 단계를 바로 진행하도록 합니다.
- ▶ 2레인 플로우 셀은 반드시 2개의 레인이 모두 채워져 있어야 시퀀싱을 시작할 수 있습니다. 4레인 플로우 셀은 1개의 레인이 일부 채워져 있거나 완전히 비어 있어도 시퀀싱을 시작할 수 있습니다.
- ▶ ExAmp 시약을 수동으로 혼합했을 때 결과에 차이가 발생하는 가장 큰 원인은 부정확한 ExAmp 구성품의 볼륨과 불충분한 혼합입니다. 시약은 충분히 혼합하시기 바랍니다.

참고

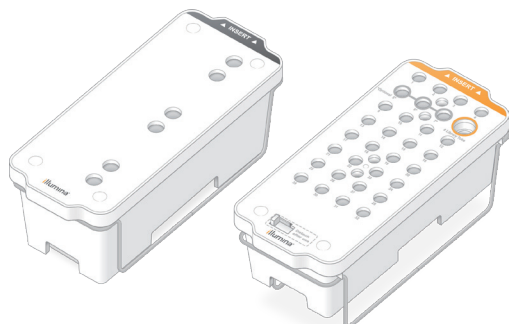
라이브러리를 플로우 셀에 로딩한 후 지체없이, 또는 늦어도 30분 이내에, 시퀀싱 런을 시작하도록 합니다.

SBS 카트리지 및 클러스터 카트리지 해동하기

- 1 시퀀싱 런이 진행 중인 경우 카트리지가 해동되는 시점에 기기의 양쪽이 모두 이용 가능할지 확인합니다.
- 2 -25~-15°C에서 보관 중이던 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지를 꺼냅니다.

- 3 각각의 카트리지를 와이어 해동 랙 안에 넣습니다.
기기와 함께 제공되는 랙은 수조 안에서 카트리가 뒤집히는 것을 방지해 줍니다.

그림 15 와이어 해동 랙 안의 카트리지



- 4 실온의 수조(19~25°C)에서 해동합니다.
물에 카트리가 절반 정도 잠기도록 합니다.
- 5 다음 표에서 해동 소요 시간을 확인하시기 바랍니다.



주의

뜨거운 물로 시약을 해동하면 데이터 품질이 저하되거나 런이 실패할 수 있습니다.

카트리지	해동 소요 시간
SP, S1 & S2 SBS 카트리지	4시간
SP, S1 & S2 클러스터 카트리지	최대 2시간
S4 SBS 카트리지	4시간
S4 클러스터 카트리지	최대 4시간

- 6 종이 타월로 카트리지 밑부분을 닦아줍니다. 웰 사이도 꼼꼼히 닦아 물기를 제거합니다.
- 7 포일 씬에 물기가 있는지 확인합니다. 물기가 있으면 보풀이 없는 티슈로 닦아 제거합니다.
- 8 저장소에 얼음이 남아있지 않은지 확인하기 위해 각 카트리지의 밑부분을 검사합니다. 얼음이 남아있지 않다면 시약이 해동된 것입니다.
- 9 각 카트리지를 10회 앞뒤로 뒤집어 시약을 섞습니다.
- 10 기포를 줄이기 위해 각 카트리지의 바닥 부분을 작업대에 가볍게 쳐 줍니다.
- 11 시약을 4시간 안에 기기에 로딩할 수 없다면 2~8°C에 보관합니다. 최대 24시간까지 보관 가능합니다.

폐시약 수거 용기 비우기

다음 지침에 따라 **매** 시퀀싱 런 후 폐시약 수거 용기를 비웁니다. 폐시약이 외부로 배출되도록 시스템을 설치한 경우, 소형 수거 용기에 폐시약이 수거되며 시퀀싱 런마다 용기를 비워줘야 합니다. 대형 수거 용기는 제자리에 장착되어 있어야 합니다.

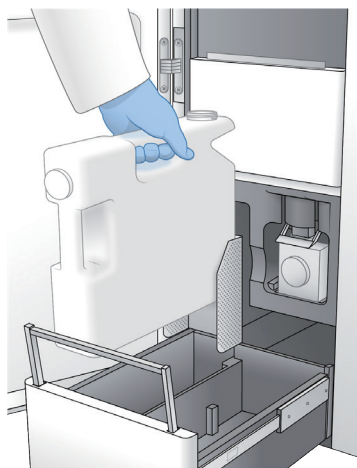


경고

이 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다. 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

- 1 다음 지침에 따라 소형 폐시약 수거 용기를 꺼내서 비웁니다.
 - a 레버를 올리고 장착부에서 소형 폐시약 수거 용기를 꺼냅니다. 이때 수거 용기의 측면을 잡도록 합니다.
 - b 수거 용기 앞에 있는 캡 홀더에서 나사형 캡을 꺼냅니다.
 - c 시약이 흘러나오지 않도록 수거 용기 입구를 캡으로 막아줍니다.
 - d 수거 용기 안의 시약이 다른 용기의 내용물과 섞이지 않도록 주의하면서 관련 규정에 따라 시약을 폐기합니다.
 - e 캡을 닫지 않은 빈 수거 용기를 다시 장착부에 넣은 후 레버를 내립니다. 캡은 캡 홀더에 넣어 보관합니다.
- 2 다음 절차에 따라 대형 폐시약 수거 용기를 꺼내서 비웁니다.
 - a 상단 핸들을 잡고 버퍼 서랍의 왼쪽 칸에 들어 있는 대형 폐시약 수거 용기를 꺼냅니다.
 - b 수거 용기 앞에 있는 캡 홀더에서 나사형 캡을 꺼냅니다.
 - c 시약이 흘러나오지 않도록 수거 용기 입구를 캡으로 막아줍니다.
 - d 관련 규정에 따라 시약을 폐기합니다. 용기를 비울 때는 양쪽 손잡이를 모두 잡습니다.
 - e 캡을 열고 빈 수거 용기를 다시 버퍼 서랍에 넣습니다. 캡은 캡 홀더에 넣어 보관합니다.

그림 16 빈 수거 용기 재장착



- 3 기기 표면의 오염을 방지하기 위해 새 장갑(powder-free)을 양손에 착용합니다.
- 4 버퍼 서랍을 닫은 후 액체 장착부의 문을 닫습니다.



경고

폐시약 수거 용기를 비우지 않으면 런이 종료되거나 수거 용기가 넘칠 수 있으며, 이로 인해 기기의 손상이나 안전 문제가 발생할 수 있습니다.

플로우 셀 준비하기

- 1 2~8°C에서 보관 중이던 새 플로우 셀 패키지를 꺼냅니다.
- 2 밀봉 상태의 플로우 셀 패키지를 실온에 도달할 때까지 10~15분간 방치합니다. 플로우 셀은 패키지에서 꺼낸 후 12시간 이내에 사용하도록 합니다.

ExAmp 시약 해동하기

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 DPX1/JPX1 튜브, DPX2/JPX2 튜브 및 DPX3 튜브를 각각 1개씩 꺼냅니다.
- 2 실온에서 10분간 해동합니다.
- 3 얼음 위에 올려둡니다.



참고

개봉하지 않은 ExAmp 시약을 다시 냉동해야 할 경우 해동 직후 냉동하시기 바랍니다. ExAmp 시약은 단 한 번만 재냉동이 가능합니다. 남은 시약은 냉동하거나 혼합하여 사용할 수 없습니다.

시퀀싱을 위해 라이브러리 풀링, 변성 및 로딩하기

로딩 농도는 라이브러리 준비, 정량화, 표준화 방법에 따라 차이가 있습니다. 관련 지침은 NovaSeq 6000 Denature and Dilute Guide(문서 번호: 1000000106351)를 참조하시기 바랍니다. 라이브러리 풀링이 끝나면 35페이지의 [플로우 셀 및 도크 준비하기](#) 단계를 진행합니다.

플로우 셀 및 도크 준비하기

- 1 NovaSeq Xp Flow Cell Dock를 평평한 표면에 올려둡니다. 플로우 셀을 기기에 로딩하기 전까지 수평을 유지합니다.
- 2 도크에 미립자가 없는지 확인합니다.
- 3 플로우 셀 유리 표면의 오염을 방지하기 위해 새 장갑(powder-free)을 양손에 착용합니다.
- 4 평평한 표면 위에서 플로우 셀이 든 포일 패키지를 포일의 한쪽 모서리부터 벗겨 개봉합니다.
- 5 플로우 셀을 덮고 있는 투명한 플라스틱 커버를 제거합니다.
- 6 패키지에서 플로우 셀을 꺼냅니다. 이때 플로우 셀의 양쪽 측면을 잡아 유리나 밀면의 개스킷을 직접 만지지 않도록 합니다.
- 7 양쪽 유리 표면 중 미립자가 보이는 표면이 있으면 보풀이 없는 알코올 티슈로 닦은 후 보풀이 적은 실험용 티슈로 닦아줍니다.
- 8 패키지는 적절한 방법으로 폐기합니다.

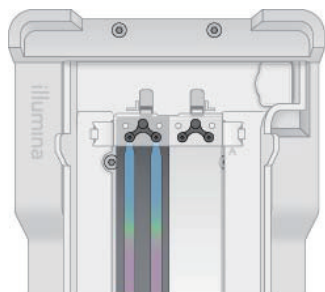


참고

플로우 셀에 약간의 스크래치나 경미한 외관 결함 있는 것은 정상이며, 이는 데이터 품질 및 수율에 영향을 주지 않는 것으로 간주됩니다. 따라서 Illumina는 이러한 플로우 셀을 평소대로 사용할 것을 권장하고 있습니다.

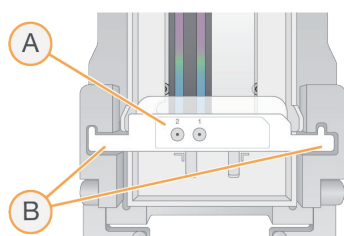
- 9 상단 표면이 **아래**를 향하도록 플로우 셀을 뒤집어 줍니다.
- 10 플로우 셀의 배출단을 브래킷 아래로 밀어 넣은 후 도크에 올려 놓습니다. 자세한 내용은 12페이지의 [플로우 셀 및 15페이지의 NovaSeq Xp Flow Cell Dock](#)를 참조하시기 바랍니다.

그림 17 플로우 셀 장착



- 11 웰이 위를 향한 상태에서 NovaSeq Xp Manifold가 플로우 셀의 주입단 위로 가도록 장착합니다. NovaSeq Xp Manifold의 암이 도크의 고정부에 잘 끼워졌는지 확인합니다.

그림 18 NovaSeq Xp Manifold 장착



- A 위를 향하고 있는 NovaSeq Xp Manifold의 웰
- B 도크의 고정부에 끼워 넣은 NovaSeq Xp Manifold의 암

- 12 클램프를 조여 플로우 셀과 NovaSeq Xp Manifold를 고정한 후 개스킷을 밀봉합니다.
- 13 라이브러리 풀을 플로우 셀에 로딩한 후 NovaSeq Xp Manifold는 폐기합니다. NovaSeq Xp Manifold는 일회용 제품입니다.

ExAmp Master Mix 준비하기

ExAmp Master Mix를 준비할 때는 필요한 볼륨의 2배 이상을 담을 수 있는 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)를 사용하도록 합니다.

- ▶ 2레인 플로우 셀: 0.5 ml 또는 1.7 ml 튜브 사용
- ▶ 4레인 플로우 셀: 1.7 ml 튜브 사용

ExAmp 시약을 수동으로 혼합했을 때 결과에 차이가 발생하는 가장 큰 원인은 부정확한 사용 볼륨과 불충분한 혼합입니다. 시약은 충분히 혼합하시기 바랍니다.

참고

소모품인 DPX1 및 DPX2에는 각각 JPX1 및 JPX2라는 라벨이 부착되어 있을 수 있습니다. v1.0 또는 v1.5 Reagent Kit와 호환 가능합니다.

- 1 DPX1/JPX1 및 DPX2/JPX2를 위아래로 뒤집거나 짧게 볼텍싱하여 혼합합니다.
- 2 DPX3를 짧게 볼텍싱하여 혼합합니다.
보관 중에 ExAmp 시약이 분리되었을 수 있습니다. ExAmp 시약은 점성이 있습니다. 특히 DPX2/JPX2 및 DPX3는 점성이 높습니다. DPX3는 높은 점성 때문에 위아래로 뒤집어도 잘 혼합되지 않습니다.
- 3 DPX1/JPX1, DPX2/JPX2, DPX3를 짧게 원심분리합니다.
- 4 적절한 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)를 사용해 기술된 순서대로 시약을 아래 표에 명시된 볼륨만큼 혼합합니다.

추가 순서	시약*	2레인 플로우 셀(SP/S1/S2) 사용량(μl)	4레인 플로우 셀(S4) 사용량(μl)
1	DPX1/JPX1	126	315
2	DPX2/JPX2	18	45
3	DPX3	66	165

*DPX/JPX 시약의 튜브 캡은 각기 다른 색으로 구분(DPX1/JPX1 빨간색, DPX2/JPX2 노란색, DPX3 파란색)되어 있을 수 있습니다. 튜브 캡 교체 시 색상을 그대로 유지하시기 바랍니다.

위의 볼륨을 혼합하면 SP, S1, S2 모드에서는 210 μl의 ExAmp Master Mix를, S4 모드에서는 525 μl의 Master Mix를 만들 수 있습니다. 이는 각 모드에 충분한 양입니다. 라이브러리를 플로우 셀에 로딩할 때 피펫팅 오류가 발생할 수 있어 넉넉한 양을 준비합니다.

- 5 거품이 생기지 않도록 천천히 피펫팅하고 분주하도록 하며, 팁에 남은 용액이 없이 전량이 분주되었는지 확인합니다.
- 6 20~30초간 또는 완전히 혼합될 때까지 볼텍싱합니다.

참고

ExAmp Master Mix는 볼텍싱을 해도 안정적입니다.

혼합액이 탁해 보일 수도 있는데, 이는 정상입니다.

- 7 최대 280 × g의 속도로 1분간 원심분리합니다.
- 8 최적의 시퀀싱 성능을 위해 바로 다음 단계를 진행합니다. 필요시 Master Mix는 최대 1시간까지 얼음 위에 보관 가능합니다. 실온 보관 시 30분 이내에 사용하시기 바랍니다.

라이브러리를 플로우 셀에 로딩하기

최상의 결과를 위해 다음을 준수하시기 바랍니다.

- ▶ 로딩된 플로우 셀의 온도를 실온으로 유지합니다. 냉장 보관하거나 얼음 위에 두지 않습니다.
 - ▶ 배양(incubation) 시간이 길어지면 필터를 통과하는 클러스터의 비율(%PF)이 감소할 수 있습니다.
 - ▶ 라이브러리 풀을 플로우 셀에 로딩한 후 30분 이내에 런을 시작합니다.
 - ▶ ExAmp와 라이브러리 혼합액은 지체없이 사용해야 최상의 결과를 얻을 수 있습니다.
- 1 다음과 같이 ExAmp Master Mix를 각각의 변성된 라이브러리 풀에 넣은 후 20~30초간 볼텍싱하여 혼합합니다. 튜브 스트립을 사용하는 경우 균질해질 때까지 피펫팅하여 혼합합니다.

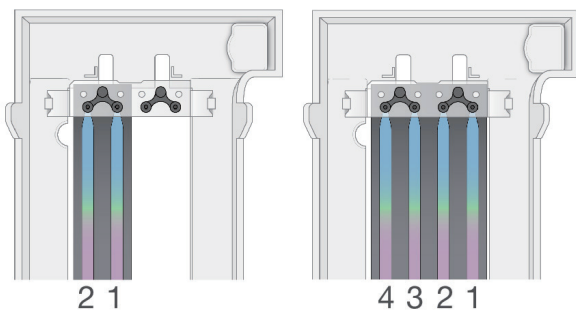
모드	변성된 라이브러리 풀(μl)	ExAmp Master Mix(μl)	생성 볼륨(μl)
SP/S1	27	63	90
S2	33	77	110
S4	45	105	150

- 2 최대 280 × g의 속도로 1분간 원심분리합니다.
- 3 p200 μl 피펫을 사용하여 적정량의 ExAmp와 라이브러리 혼합액을 각각의 NovaSeq Xp Manifold 웰에 넣습니다.
 - ▶ 거품이 생기지 않도록 천천히 샘플을 로딩합니다.
 - ▶ 사용할 레인에 상응하는 웰에 라이브러리 풀 혼합액을 분주했는지 확인합니다.
 - ▶ 피펫팅할 때 웰의 바닥에 있는 필터에 팁이 닿지 않도록 합니다.
 - ▶ 하나의 레인이 완전히 충전될 때까지 기다렸다가 나머지 매니폴드 웰에 혼합액을 분주할 필요는 없습니다.

모드	ExAmp와 라이브러리 혼합액의 웰별 볼륨(μl)
SP/S1	80
S2	95
S4	130

NovaSeq Xp Manifold 웰의 번호는 플로우 셀 레인의 번호와 일치합니다. 플로우 셀을 뒤집으면 레인의 번호 순서도 역순이 됩니다.

그림 19 역순으로 표시된 레인 번호



- ExAmp와 라이브러리 혼합액을 모든 매니폴드 웰에 분주한 후, 혼합액이 각 레인의 반대쪽 끝에 도달할 때까지 2분 정도 기다립니다.

레인의 배출단에 작은 기포가 생길 수 있는데, 이는 정상입니다. 레인이 모두 충전된 후에도 소량의 혼합액이 매니폴드 웰에 남아 있을 수 있습니다.



주의

레인의 충전여부나 버블의 존재유무를 확인하기 위해 플로우 셀을 기울이지 않습니다. 플로우 셀을 기울이면 ExAmp와 라이브러리 혼합액이 흘러나올 수 있습니다. 완전히 충전되지 않는 레인이 있더라도 임의로 해결하려고 시도하지 않습니다. 일부만 채워진 레인의 데이터 수율은 감소할 수 있습니다. 플로우 셀에서 직접 샘플을 회수하려고 시도하지 않습니다.



참고

플로우 셀 운반 시 기울이지 않도록 주의합니다.

SBS 카트리지가 및 클러스터 카트리지가 준비하기

- 저장소에 얼음이 남아있지 않은지 확인하기 위해 각 카트리지의 밑부분을 검사합니다. 얼음이 남아있지 않다면 시약이 해동된 것입니다.
- 각 카트리지를 10회 앞뒤로 뒤집어 시약을 섞습니다.
- 기포를 줄이기 위해 각 카트리지의 바닥 부분을 작업대에 가볍게 쳐 줍니다.

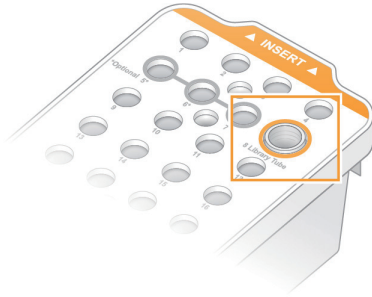
커스텀 프라이머 준비하기

커스텀 프라이머가 필요한 라이브러리를 사용하는 경우 NovaSeq Series Custom Primers Guide(문서 번호: 1000000022266)의 지침에 따라 커스텀 프라이머를 준비하시기 바랍니다.

빈 라이브러리 튜브 로딩하기

- 1 NovaSeq 6000 Reagent Kit와 함께 제공된 라이브러리 튜브의 캡을 엽니다.
- 2 빈 라이브러리 튜브를 캡을 닫지 않은 채로 클러스터 카트리지의 **Library Tube** 위치(8번)에 삽입합니다. RFID를 스캔하거나 기기 내에서 시약을 혼합하려면 반드시 빈 라이브러리 튜브가 준비되어 있어야 합니다. 라이브러리 튜브의 바코드는 LIMS 파일에 명시되어 있는 바코드와 비교해 확인하지 않습니다. RFID를 이용해 사용한 적이 없는 새 튜브인지 확인합니다.

그림 20 캡을 닫지 않은 채로 8번 위치에 삽입된 라이브러리 튜브



제6장 시퀀싱

시퀀싱 런 설정하기.....	40
런 진행 상황 모니터링하기.....	46
시차를 두고 런 시작하기.....	47
런 삭제하기.....	47
30번 포지션 분리하기.....	48
자동 포스트런 워시 수행하기.....	48

시퀀싱 런 설정하기

Illumina는 NVCS가 실행 중이거나 시퀀싱 런이 진행 중일 때는 로그인 상태를 유지할 것을 권장하고 있습니다.

- 1 먼저 기기 표면에 물품이 있다면 모두 제거합니다.
시퀀싱 런이 진행되는 동안 표면을 깨끗하게 유지하고 기기에 기대지 않도록 합니다. 플로우 셀의 문에 압력을 가하면 문이 열릴 수 있고, 이로 인해 런이 중단될 수도 있습니다. 런은 한 번 중단되면 재개되지 않습니다.



참고

시차를 두고 새로운 런을 시작하는 기능이 지원됩니다. 타이머를 통해 언제 시차를 둔 런을 시작할 수 있는지 알 수 있습니다. 자세한 정보는 47페이지의 *시차를 두고 런 시작하기*를 참조하시기 바랍니다.

- 2 Home 화면에서 **Sequence**를 선택한 후 싱글 플로우 셀 런 또는 듀얼 플로우 셀 런을 선택합니다.

- ▶ **A+B** – 듀얼 플로우 셀 런 설정.
- ▶ **A** – A에 싱글 플로우 셀 런 설정.
- ▶ **B** – B에 싱글 플로우 셀 런 설정.

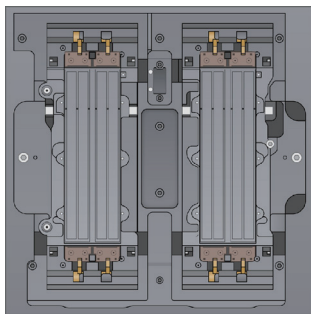
소프트웨어에서 Load 단계부터 시작하는 단계별 런 설정 화면을 표시합니다.

- 3 **OK**를 눌러 경고 메시지를 확인한 후 플로우 셀의 문을 엽니다.

플로우 셀을 기기에 로딩하기

- 1 이전 런에 사용한 플로우 셀이 아직 기기에 남아 있다면 꺼냅니다.
- 2 플로우 셀 스테이지에 미립자가 있다면 알코올 티슈로 유체 인터페이스(fluidic interface)와 광학 정렬 타겟(optical alignment target)의 유리 표면 등 플로우 셀 스테이지 전체를 닦아준 후 보풀이 없는 티슈로 닦아줍니다.

그림 21 플로우 셀 스테이지



- 3 **[Standard Workflow]** 다음 지침에 따라 패키지에서 플로우 셀을 꺼냅니다.

- a 플로우 셀 유리 표면의 오염을 방지하기 위해 새 장갑(powder-free)을 양손에 착용합니다.
- b 포일 패키지를 평평한 표면 위에 올려놓고 포일의 한쪽 모서리부터 벗겨 패키지를 개봉합니다.
- c 플로우 셀을 덮고 있는 투명한 플라스틱 커버를 제거합니다.

- d 패키지에서 플로우 셀을 꺼냅니다. 이때 플로우 셀의 양쪽 측면을 잡아 유리나 밑면의 개스킷을 만지지 않도록 합니다.
- e 양쪽 유리 표면 중 미립자가 보이는 표면이 있으면 보풀이 없는 알코올 티슈로 닦은 후 보풀이 적은 실험용 티슈로 닦아줍니다.
- f 패키지는 적절한 방법으로 폐기합니다.



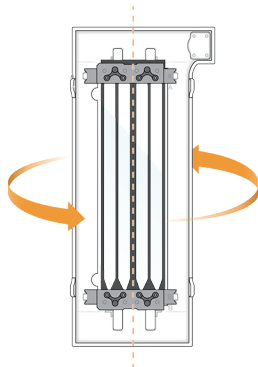
참고

플로우 셀에 약간의 스크래치나 경미한 외관 결함 있는 것은 정상이며, 이는 데이터 품질 및 수율에 영향을 주지 않는 것으로 간주됩니다. 따라서 Illumina는 이러한 플로우 셀을 평소대로 사용할 것을 권장하고 있습니다.

4 **[NovaSeq Xp Workflow]** 다음 절차에 따라 장착된 플로우 셀을 도크에서 분리합니다.

- a 플로우 셀과 매니폴드를 고정하고 있는 클램프를 풀어줍니다.
- b 플로우 셀에 액체를 흘리지 않도록 주의하며 매니폴드를 조심스럽게 꺼내어 폐기합니다.
- c 플로우 셀에 액체를 흘린 경우 보풀이 없는 알코올 티슈로 닦은 후 보풀이 적은 실험용 티슈로 닦아줍니다.
- d 플로우 셀의 양쪽 측면을 잡고 플로우 셀을 도크에서 분리합니다. 플로우 셀의 수평을 유지합니다.
- e 개스킷에 잔여 물질이 있다면 4개의 플로우 셀 개스킷을 보풀이 없는 티슈로 닦아줍니다. 개스킷을 만지지 않습니다.
- f 긴 축을 기준으로 플로우 셀을 뒤집어 상단 표면이 위를 향하도록 해 줍니다.

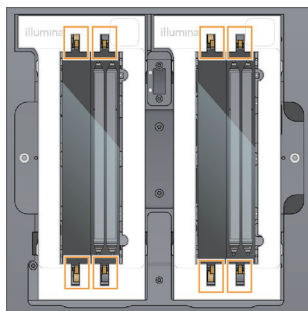
그림 22 긴 축을 기준으로 뒤집은 플로우 셀



- g 도크를 보관하기 전에 도크에 미립자가 없는 것을 확인합니다.

5 플로우 셀을 4개의 클램프 위치에 잘 맞춘 후 플로우 셀 스테이지에 장착합니다.

그림 23 클램프 위치에 맞춰 장착된 플로우 셀



6 **Close Flow Cell Door**를 선택합니다.

플로우 셀의 문이 닫히고 센서와 RFID가 확인되면 플로우 셀의 ID가 화면에 표시됩니다.

SBS 카트리지와 클러스터 카트리지 로딩하기

참고

NovaSeq Xp Workflow에서는 클러스터 카트리지를 로딩하기 전에 캡을 닫지 않은 빈 라이브러리 튜브를 카트리지에 삽입해야 합니다.

- 1 액체 장착부의 문을 연 후 Reagent Chiller의 문을 엽니다.
- 2 사용한 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지를 꺼냅니다.
사용한 카트리지의 포일 씰에는 구멍이 뚫려 있습니다.
- 3 관련 규정에 따라 사용하고 남은 시약과 소모품을 폐기합니다.
클러스터 카트리지 30번 포지션의 안전한 폐기에 관한 자세한 정보는 [48페이지의 30번 포지션 분리하기](#)를 참조하시기 바랍니다.
- 4 준비한 카트리지의 **Insert** 라벨이 기기 뒷면을 향하도록 잡고 카트리지를 Reagent Chiller 서랍에 넣습니다.
 - ▶ 왼쪽 칸: SBS 카트리지(회색 라벨)
 - ▶ 오른쪽 칸: 캡을 닫지 않은 라이브러리 튜브가 들어있는 클러스터 카트리지(주황색 라벨)

그림 24 장착된 시약 카트리지

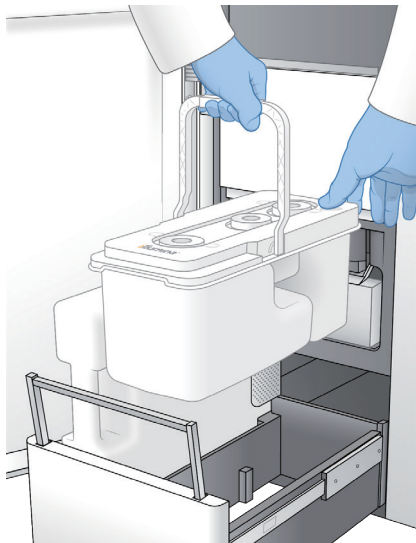


- 5 서랍을 Reagent Chiller 안으로 밀어 넣은 후 Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
센서와 RFID가 확인됩니다. 라이브러리 튜브와 카트리지 2개의 ID가 화면에 표시됩니다.

버퍼 카트리지 로딩하기

- 1 금속 핸들을 당겨 버퍼 서랍을 엽니다.
- 2 버퍼 서랍의 오른쪽 칸에서 사용한 버퍼 카트리지를 꺼냅니다.
사용한 버퍼 카트리지의 포일 씰에는 구멍이 뚫려 있습니다.
- 3 새 버퍼 카트리지의 **illumina** 라벨이 서랍 정면을 향하도록 잡고 카트리지를 서랍에 넣습니다. 서랍의 바닥과 양쪽 측면에 돌출되어 있는 가이드에 카트리지를 맞춰 끼웁니다.
버퍼 카트리지를 올바르게 삽입했다면, 흔들림이 없고 서랍을 제대로 닫을 수 있습니다.

그림 25 버퍼 카트리지 로딩하기



- 4 양쪽 폐시약 수거 용기가 모두 비워졌다면, 두 폐시약 수거 용기가 비어 있음을 확인하는 체크 박스를 선택합니다.



경고

폐시약 수거 용기를 비우지 않으면 런이 종료되거나 수거 용기가 넘칠 수 있으며, 이로 인해 기기의 손상이나 안전 문제가 발생할 수 있습니다.

- 5 다음 중 화면에 표시되는 버튼을 선택합니다.
 - ▶ **Log In** — BaseSpace Sequence Hub에 로그인할 수 있는 Log In 화면을 여는 버튼. 23페이지의 *BaseSpace Sequence Hub 설정하기* 단계로 이동.
 - ▶ **Run Setup** — BaseSpace Sequence Hub를 건너 뛰고 런 파라미터를 입력할 수 있는 Run Setup 화면을 여는 버튼. 43페이지의 *런 파라미터 입력하기* 단계로 이동.

화면에 표시되는 버튼은 시스템의 BaseSpace Sequence Hub 설정 여부에 따라 결정됩니다.

BaseSpace Sequence Hub에 로그인하기

NVCS를 실행하면 BaseSpace Sequence Hub에서 기본으로 설정했던 Workgroup이 사용자의 Workgroup으로 선택됩니다. 기본 Workgroup을 설정하지 않았었다면 개인 Workgroup이 선택됩니다.

- 1 **[선택 사항]** 현재 런에 적용할 BaseSpace Sequence Hub 설정값으로 변경합니다.
 - ▶ BaseSpace Sequence Hub를 비활성화하려면 **BaseSpace Sequence Hub** 체크 박스를 선택 해제한 후 **Run Setup**을 선택하여 로그인 없이 다음 단계로 이동.
 - ▶ 원격 모니터링 및 데이터 분석을 위해 런 데이터를 BaseSpace Sequence Hub로 전송하려면 **Run Monitoring and Storage** 선택. 해당 옵션을 사용하려면 샘플 시트가 필요함.
 - ▶ 원격 런 모니터링을 위해 InterOp 파일, runinfo.xml 파일 및 runParameters.xml 파일을 BaseSpace Sequence Hub로 전송하려면 **Run Monitoring Only** 선택.
- 2 BaseSpace Sequence Hub 사용자명과 비밀번호를 입력한 후 **Sign In**을 선택합니다.
- 3 화면에 메시지가 표시되면 런 데이터를 업로드하려는 Workgroup을 선택한 후 **Run Setup**을 선택합니다. 이 메시지는 사용자가 복수의 Workgroup에 속해 있는 경우에만 표시됩니다.

런 파라미터 입력하기

- 1 NovaSeq Xp Workflow가 활성화되어 있다면 Workflow Type을 선택합니다.

- ▶ **NovaSeq Xp** 선택 시 빈 라이브러리 튜브의 삽입 여부를 확인.
 - ▶ **NovaSeq Standard** 선택 시 라이브러리 튜브에 샘플이 들어 있는지 확인.
- 2 현재 런에 사용하고 싶은 이름을 Run Name 필드에 입력합니다.
Run Name 필드에는 영문, 하이픈, 밑줄을 입력할 수 있습니다.
 - 3 시퀀싱 런에 사용할 리드별 사이클 횟수와 인덱스 길이를 입력합니다.
인덱스 사이클 횟수는 최대값 제한이 없으나, 리드 사이클 수와 인덱스 사이클 수의 합은 키트의 사이클 횟수보다 적어야 합니다.
 - ▶ **Read 1** — v1.0 300 Cycle Kit의 경우 최대 151, v1.0 500 Cycle Kit의 경우 최대 251 입력.
v1.5 300 Cycle Kit의 경우 최대 159 입력, v1.5 500 Cycle Kit의 경우 최대 259 입력.
 - ▶ **Index 1** — Index 1(i7) 프라이머의 사이클 횟수 입력.
 - ▶ **Index 2** — Index 2(i5) 프라이머의 사이클 횟수 입력.
 - ▶ **Read 2** — v1.0 300 Cycle Kit의 경우 최대 151, v1.0 500 Cycle Kit의 경우 최대 251 입력.
v1.5 300 Cycle Kit의 경우 최대 159 입력, v1.5 500 Cycle Kit의 경우 최대 259 입력. 일반적으로 Read 1의 값과 동일한 값 입력.



참고

Read 1 및 Read 2의 분석 사이클 횟수는 입력한 값보다 1회 적습니다. 예를 들어, 페어드 엔드(paired-end) 150사이클 런(즉, 2 × 150 bp 런)을 수행하려면 Read 1 및 Read 2의 사이클 횟수로 151를 입력합니다.

v1.0 키트로 페어드 엔드 런 수행 시 네 항목의 합산 횟수는 선택한 시약 키트에 표시되어 있는 사이클 횟수보다 최대 23사이클 더 많아도 되며, 싱글 리드 런에서는 최대 30사이클 더 많아도 됩니다.

v1.5 키트로 페어드 엔드 런과 싱글 리드 런 수행 시 네 항목의 합산 횟수는 시약 키트에 표시되어 있는 사이클 횟수보다 최대 38사이클 더 많아도 됩니다.

S4 35 Cycle Kit로는 총 72사이클을 수행할 수 있습니다. 4개 항목의 합산 횟수가 표시된 횟수보다 최대 37사이클 더 많아도 됩니다. 디플트 리드 값은 변경 가능하며, 4개 리드에 사이클 횟수를 분배하여 입력할 수 있습니다(예: 36, 10, 10, 0).

- 4 **Advanced Options**를 펼쳐 현재 런의 설정을 적용합니다.
따로 명시되지 않는 한 해당 설정은 선택 항목입니다.
 - ▶ **v1.0 Custom Primers** — **Custom Primers** 체크 박스 선택 후 적합한 체크 박스 선택. Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation 라이브러리는 v1.0 키트 사용 시 커스텀 Read 1(VP10) 시퀀싱 프라이머 필요. 자세한 내용은 NovaSeq Series Custom Primers Guide(문서 번호: 1000000022266) 참조.
 - ▶ **Read 1** — Read 1에 커스텀 프라이머 사용.
 - ▶ **Read 2** — Read 2에 커스텀 프라이머 사용.
 - ▶ **Custom Index** — Index 1에 커스텀 프라이머 사용.
 - ▶ **v1.5 Custom Primers** — **Custom Primers** 체크 박스 선택 후 적합한 체크 박스 선택. Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation 라이브러리는 v1.5 키트 사용 시 커스텀 프라이머를 사용할 필요 없음. 자세한 내용은 NovaSeq Series Custom Primers Guide(문서 번호: 1000000022266) 참조.
 - ▶ **Read 1** — Read 1에 커스텀 프라이머 사용.
 - ▶ **Read 2** — Read 2에 커스텀 프라이머 사용.
 - ▶ **Custom Index** — Index 1 및 Index 2 리드에 커스텀 프라이머 사용.
 - ▶ **Output Folder** — **Browse** 선택 후 현재 런의 결과 폴더 변경 가능. 이 폴더는 해당 런이 BaseSpace Sequence Hub에 연결되어 있지 않을 경우 런 데이터(run data) 저장에 필요함.
 - ▶ **Samplesheet** — BaseSpace Sequence Hub를 사용하여 런을 모니터링하거나 저장하는 경우 **Browse** 선택 후 필요한 샘플 시트나 다른 CSV 파일 업로드 가능. CSV 파일은 결과 폴더로 복사되며 런 파라미터에는 영향을 주지 않음. v1.0 Workflow와 v1.5 Workflow는 서로 다른 전략을 활용하므로 업로드한 샘플 시트 형식(Index Read 2 어댑터 지침)의 적합여부 확인 필요. Forward Strand Workflow는 v1.0 Reagent Kit 사용. Reverse Complement Workflow는 v1.5 Reagent Kit 사용.

- ▶ **Custom Recipe** — 해당 런에 XML 형식의 커스텀 레시피를 사용하려면 **Custom Recipe** 선택 후 **Browse** 선택. v1.0용 커스텀 레시피는 v1.5와 호환 불가. 자세한 내용은 Illumina 기술지원팀에 문의.



참고

커스텀 레시피에서 클러스터링 단계는 변경할 수 없습니다.

- 5 **Review**를 선택합니다.
소프트웨어가 해당 레시피에 명시된 파라미터의 적합여부를 확인합니다.

런 파라미터 확인하기

- 1 Review 화면에 표시된 런 파라미터를 확인합니다.
- 2 **[선택 사항] Back**을 선택하여 Run Setup 화면으로 돌아가 런 파라미터를 변경합니다.
- 3 **Start Run**을 선택합니다.
프리런 검사가 자동으로 시작됩니다.

프리런 검사 결과 검토하기

- 1 프리런 검사가 완료될 때까지 5분 정도 기다립니다.
검사가 성공적으로 완료되면 런이 자동으로 시작됩니다.



참고

하드 디스크 용량이 부족해지는 것을 방지하기 위해 일단 런이 시작되면 어떠한 데이터도 C:\에 복사하지 않습니다.

- 2 플로우 셀 미감지와 같은 센서 오류로 인해 프리런 검사에 실패할 경우 반드시 워크플로우를 종료했다가 다시 시작해야 합니다.
- 3 다른 이유로 인해 프리런 검사에 실패할 경우에는 **Retry**를 선택하여 실패한 검사를 다시 시작하거나 **Retry All**을 선택하여 모든 검사를 다시 시작합니다. 오류가 발생하면 런 시작 전에 해결해야 합니다. 오류 해결 방법은 [55페이지의 프리런 검사 오류](#)를 참조하시기 바랍니다.
- 4 **Error** 아이콘을 눌러 오류에 대한 자세한 정보를 확인합니다.
- 5 정렬 검사 실패 오류 발생 시 다음과 같은 방법으로 해결합니다.
 - a **Reload**를 선택한 후 **OK**를 눌러 Load 화면으로 돌아갑니다.
 - b 기기 위에 물품이 있다면 모두 제거한 후 **OK**를 누릅니다.
 - c 플로우 셀을 다시 로딩한 후 **Run Setup**을 선택합니다.
 - d 각 화면의 지시에 따라 각각의 RFID를 다시 스캔한 후 Pre-Run Checks 화면으로 돌아갑니다.
 - e 검사를 다시 수행합니다.

런 진행 상황 모니터링하기

- 1 메트릭스(metrics)가 화면에 표시되면 런 진행 상황, Intensity 및 Q-Score를 확인합니다. 런 메트릭스에 관한 자세한 정보는 59페이지의 *부록 B Real-Time Analysis*를 참조하시기 바랍니다.

그림 26 시퀀싱 런 진행 상황 및 메트릭스



- A 완료 시간 — 런 완료 일시(yyyy-mm-dd hh:mm).
- B 런 진행 상황 — 현재 런 단계. 진행 표시줄의 크기는 각 단계의 런 비율에 비례하지 않음.
- C Q-Score — Quality Score(품질 점수)의 분포.
- D Intensity — 타일별 90번째 백분위수의 클러스터 강도. 플롯의 색상은 빨간색 채널과 초록색 채널을 의미함.
- E Clusters Passing Filter(%) — 필터를 통과하는 클러스터의 백분율.
- F Projected Total Yield(Gb) — FC 런의 예상 수율. 레인별 메트릭스 선택 시(H) 레인별 현재 수율을 나타내는 수치가 표시됨. 수치는 런이 진행됨에 따라 사이클별로 업데이트됨.
- G Q30 — Q-Score가 30점 이상인 런에 대한 베이스 콜(base call)의 백분율.
- H 레인별 상세 정보 — E, F, G 항목의 값 선택 시 선택한 항목의 데이터가 레인별로 상세하게 표시됨.



참고

NVCS 실행 도중 종료 또는 재시작을 하려면 반드시 종료 또는 재시작이 진행되기 전에 이를 확인해야 합니다.

런 메트릭스

소프트웨어는 런이 진행되는 동안 생성된 메트릭스를 표시합니다. 메트릭스는 RTA3가 생성하고 InterOp 파일에 쓰여진 데이터를 기반으로 하며, 플롯, 그래프, 표의 형식으로 제공됩니다.

클러스터링에는 2시간 정도가 소요되며, 시퀀싱은 Cycle 1부터 시작됩니다. 메트릭스는 시퀀싱이 진행됨에 따라 업데이트됩니다. Clusters Passing Filter, Projected Total Yield, Q-Score 수치는 Cycle 26 후부터 제공됩니다.

Cycle 26 전까지는 제공되는 수치가 없으며 N/A가 대신 표시됩니다.

프로세스 상태

Process Management 화면에는 각 런의 상태가 표시됩니다. Main Menu에서 **Process Management**를 선택합니다. Process Management 화면에서 다음과 같이 Run Name별 프로세스 상태를 확인할 수 있습니다.

- ▶ **Run Status** — CBCL 파일의 처리.
- ▶ **Network** — Universal Copy Service를 통한 파일의 전송.
- ▶ **BaseSpace** — 옵션을 선택한 경우 BaseSpace Sequence Hub로의 파일 업로드.

하나의 프로세스가 끝나면 초록색 체크가 표시됩니다. 자세한 정보는 8페이지의 *Process Management*를 참조하시기 바랍니다.

시차를 두고 런 시작하기

기기의 한 쪽에서 런이 진행되는 동안 Idle 상태인 반대쪽에서 런을 설정하고 시작할 수 있습니다. 이러한 작업을 “Staggered start(시차를 둔 시작)”이라고 합니다. Staggered run(시차를 둔 런)은 런이 진행되는 동안 다음과 같이 카운트다운 타이머에 표시되는 상태에 따라 특정한 시점에 설정됩니다.

- ▶ **Run Start: Available** — Staggered start 가능. 시차를 두고 런을 시작할 수 없게 되는 날짜와 시간이 표시됨. 현재 사이클이 완료된 후 시차를 두고 새로운 런을 시작하려면 **Sequence** 선택.
- ▶ **Run Start: Unavailable** — Staggered start 불가능. 기기의 반대쪽에서 시차를 두고 런을 시작할 수 있는 날짜와 시간이 표시됨.
- ▶ **Waiting...** — Staggered start가 불가능한 상태에서 사용자가 새로운 런을 시도했을 경우 상태가 Waiting으로 변경되며, 기기가 새로운 런을 시작할 준비를 마칠 것으로 예상되는 날짜와 시간이 표시됨. 시차를 두고 런을 시작할 수 있는 경우 기기가 런 설정 단계를 진행함.

사용자가 새로운 런을 설정하면 소프트웨어가 필요한 경우 인접한 플로우 셀에서 진행 중이던 런을 자동으로 일시 중지했다가 재개합니다. 런이 일시 중지되면 시스템은 안전 상태로 바뀝니다.

절차

- 1 Home 화면에서 **Sequence**를 선택한 후 **A** 또는 **B**를 선택합니다.
현재 Idle 상태인 쪽을 선택해야 합니다.
- 2 인접한 플로우 셀에서 진행 중인 런이 일시 중지될 때까지 기다립니다. 새로운 런을 취소한 후 일시 중지되는 것을 방지하려면 **Cancel**을 선택합니다.
인접한 플로우 셀의 런에서 클러스터 생성, 페어드 엔드 재합성(resynthesis), 이미징 또는 워시를 수행 중인 경우, 소프트웨어가 해당 런을 일시 중지하기 전에 현재 단계를 먼저 완료합니다.
- 3 인접한 플로우 셀의 런이 일시 중지된 후 플로우 셀의 문이 열리면 새로운 런을 설정합니다.
새로운 런은 우선 일시 중지되었던 런이 자동으로 재개된 후에 시작됩니다.

런 삭제하기

데이터 전송이 완료된 후 Process Management에서 현재 런을 삭제하여 확보된 디스크 용량을 다음 런에 사용할 수 있습니다. 런 삭제는 CE 및 C:\ 공간만을 확보하며, 시스템 유지 관리 파일을 삭제하거나, 네트워크에 영향을 주거나, BaseSpace Sequence Hub 복사본에 영향을 주지 않습니다. 시퀀싱이 진행 중인 런은 삭제할 수 없습니다.

- 1 Main Menu에서 **Process Management**를 선택합니다.

- 2 **[선택 사항]** 런의 프로세스별로 데이터 전송 완료를 알려주는 초록색 체크가 표시되는지 확인합니다.
네트워크 또는 BaseSpace Sequence Hub로 런의 데이터 전송이 완료되지 않은 경우 해당 런을 삭제할 수는 있지만 모든 데이터는 손실됩니다.
- 3 **Delete Run**을 선택한 후 **Yes**를 선택해 런 삭제를 확인합니다.
- 4 **Done**을 선택합니다.

30번 포지션 분리하기

클러스터 카트리지의 30번 포지션 안의 저장소에는 포름아마이드(formamide)가 들어 있습니다. 이 저장소는 사용한 클러스터 카트리지에서 분리한 후 따로 폐기해야 합니다.



경고

이 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다. 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

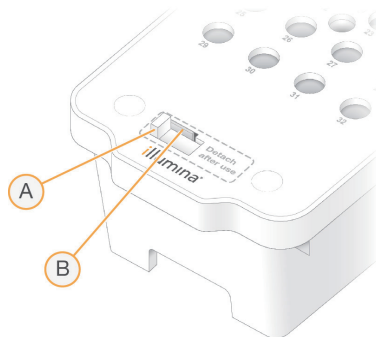
- 1 장갑을 끼고 **Detach after use** 라벨 옆의 흰색 플라스틱 탭을 오른쪽으로 밀니다.
- 2 저장소 밑에 손을 받치거나 저장소를 단단한 표면에 올려 놓고 투명한 플라스틱 탭을 Illumina 라벨 방향으로 누르면 클러스터 카트리지 아래쪽으로 저장소가 해제됩니다.



참고

클러스터 카트리지 보관 시 겹겹이 쌓아두지 않습니다. 카트리지를 쌓아두면 저장소가 의도치 않게 분리될 수 있습니다.

그림 27 분리 가능한 30번 포지션



- A 흰색 플라스틱 탭을 밀어 분리
- B 투명한 플라스틱 탭을 눌러 해제

- 3 관련 규정에 따라 저장소를 폐기합니다.

자동 포스트런 워시 수행하기

시퀀싱이 완료되면 소프트웨어가 자동으로 포스트런 워시(post-run wash)를 시작합니다. 워시에는 80분 정도가 소요됩니다. 시스템이 17번 포지션으로부터 0.24% 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite, NaOCl)을 흡입한 후 0.12%로 희석합니다. 0.12% NaOCl은 플로우 셀을 통해 ExAmp 시약 포지션과 라이브러리 포지션으로 주입된 후 폐시약 수거 용기로 보내집니다. 시스템에서 교차 오염을 방지하기 위해 템플릿 워시(template wash)를 수행합니다.

워시가 완료되면 시스템은 안전 상태로 바뀌고 Home 버튼이 활성화됩니다. 다음 런을 시작할 때까지 소모품은 제자리에 둡니다. 워시 완료 후 시스템에 공기가 유입되는 것을 방지하기 위해 시퍼(sipper)는 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지 안에 그대로 둡니다. 폐시약 수거 용기를 비울 때에는 시퍼를 들어 올리고 비웁니다.



참고

자동 포스트런 워시 중 오류가 발생하여 포스트런 워시가 완료되지 않은 경우에는 메인テナンス 워시 (maintenance wash)를 수행해야 합니다.

제7장 유지 관리

예방적 유지 관리	50
메인テナンス 워시 수행하기	50
소프트웨어 업데이트	54

예방적 유지 관리

Illumina는 매년 예약을 통해 예방적 유지 관리 서비스(preventive maintenance service)를 받을 것을 권장하고 있습니다. 서비스 계약을 체결하지 않은 경우, 담당 Territory Account Manager 또는 Illumina 기술지원팀과 상담 후 유료로 예방적 유지 관리 서비스를 받으시기 바랍니다.

메인テナンス 워시 수행하기

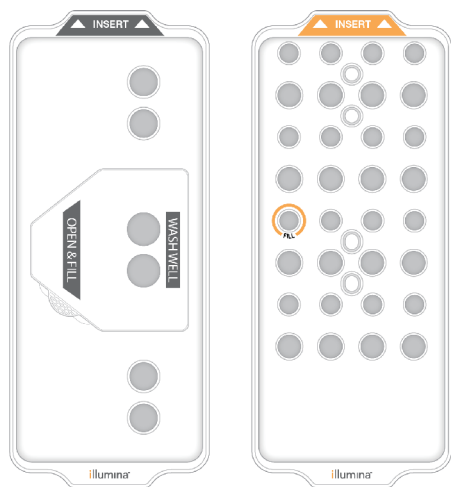
소프트웨어는 다음과 같은 상황에 메인テナンス 워시를 요청하는 메시지를 표시합니다.

- ▶ 지난 14일 내에 4레인 런 완료 후 포스트런 워시를 수행하지 않은 경우
- ▶ 지난 14일 내에 메인テナンス 워시를 수행하지 않은 경우
- ▶ 포스트런 워시가 실패했거나 완료되지 않은 경우

메인テナンス 워시는 별도 구매 소모품인 Tween 20 및 NaOCl의 희석액을 사용하여 시스템을 세척하는 작업입니다. 희석액은 워시 카트리지에서 플로우 셀, 폐시약 수거 용기 및 각 카트리지의 저장소로 로딩되어 모든 시퍼를 세척합니다. 워시에는 80분 정도가 소요됩니다.

메인テナンス 워시에는 사용한 버퍼 카트리지와 및 기기와 함께 제공된 SBS 워시 카트리지, 클러스터 워시 카트리지, 4레인 워시 플로우 셀(또는 사용한 4레인 플로우 셀)이 필요합니다. 워시 카트리지도 시약 카트리지와처럼 로딩 오류를 방지하기 위해 각기 다른 색상으로 구분되어 있습니다. SBS 워시 카트리지의 중앙에는 Tween 20 희석액이 분주되는 웰이 1개 있습니다. NaOCl 희석액은 클러스터 워시 카트리지의 저장소 1개에 분주됩니다.

그림 28 SBS 워시 카트리지(좌) 및 클러스터 워시 카트리지(우)



워시 용액 준비하기

- 1 400 ml의 실험용수를 500 ml 원심분리기용 병에 넣습니다.
- 2 여기에 0.2 ml의 100% Tween 20을 넣으면 최소 400 ml의 0.05% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다. 새로 만든 Tween 20 희석액을 사용하면 유체 시스템 안으로 생물 오염물질이 유입되는 것을 제한할 수 있습니다.

- 3 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.
- 4 SBS 워시 카트리지의 중앙에 위치한 웰의 뚜껑을 제거합니다.
- 5 중앙 웰에 워시 용액을 분주합니다. 용액을 최소 필요 볼륨 표시선까지 채웁니다. 다른 저장소는 그대로 비워 둡니다.

그림 29 MIN FILL VOLUME 표시선까지 채워진 중앙 웰



- 6 다음을 30 ml 원심분리 튜브(centrifuge tube)에 넣고 혼합하여 20 ml의 시약용 0.25% NaOCl을 만듭니다.
 - ▶ 1 ml의 시약용(reagent grade) 5% NaOCl
 - ▶ 19 ml의 탈이온수(DIW)

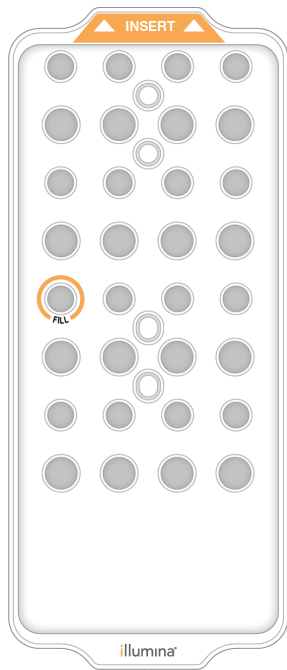


주의

시약용 NaOCl만 사용하도록 합니다. 범용 표백제는 필터 통과 리드 비율이 낮은 런을 유발하는 암모니아 화합물을 함유하고 있을 수 있으므로 사용을 피합니다.

- 7 앞뒤로 뒤집어 혼합합니다.
- 8 5 ml의 시약용 0.25% NaOCl을 클러스터 워시 카트리지에 분주합니다. 카트리지 내 포지션은 주황색 원 안에 Ffill이라는 글씨로 표시되어 있습니다. 나머지 저장소는 그대로 비워 둡니다.

그림 30 0.25% NaOCl의 포지션



워시 플로우 셀 로딩하기

- 1 먼저 기기 표면에 물품이 있다면 모두 제거합니다.
메인テナンス 워시가 진행되는 동안 표면을 깨끗하게 유지하고 기기에 기대지 않도록 합니다. 플로우 셀의 문에 압력을 가하면 문이 열릴 수 있고, 이로 인해 워시가 중단될 수 있습니다.
- 2 Home 화면에서 **Wash**를 선택한 후 어느 쪽을 세척할지 선택합니다.
 - ▶ **A+B** – A와 B 동시 워시.
 - ▶ **A** – A만 워시.
 - ▶ **B** – B만 워시.
 소프트웨어에서 단계별 워시 화면을 표시합니다.



참고

한쪽만 메인テナンス 워시를 진행하려면 반대쪽이 Idle 상태에 있거나 SBS 리드 사이클을 수행 중이어야만 합니다. NVCS에 표시되는 시차를 둔 런의 시작 시간은 기기가 새로운 런이나 워시를 시작할 수 있는 상태를 의미합니다. 자세한 내용은 47페이지의 *시차를 두고 런 시작하기*를 확인하시기 바랍니다.

- 3 **OK**를 눌러 경고를 읽었음을 확인한 후 플로우 셀의 문을 엽니다.
- 4 워시 플로우 셀이나 사용한 4레인 플로우 셀이 아직 장착되어 있지 않다면 장착하도록 합니다.
- 5 **Close Flow Cell Door**를 누릅니다.
문이 닫히고 센서와 RFID가 확인되면 플로우 셀의 ID가 화면에 표시됩니다.

워시 카트리지를 로딩하기

메인テナンス 워시를 수행하려면 워시 카트리지가 필요합니다. 이미 사용한 SBS 카트리지와 클러스터 카트리는 재사용하지 않습니다.

- 1 액체 장착부의 문을 연 후 Reagent Chiller의 문을 엽니다.

- 2 사용한 SBS 카트리지와 클러스터 시약 카트리지를 꺼냅니다. 관련 규정에 따라 사용하고 남은 시약과 소모품을 폐기합니다.
클러스터 카트리지 30번 포지션의 안전한 폐기에 관한 자세한 정보는 [48페이지의 30번 포지션 분리하기](#)를 참조하시기 바랍니다.
- 3 워시 카트리지의 **Insert** 라벨이 기기 뒷면을 향하도록 잡고 카트리지를 Reagent Chiller 서랍에 넣습니다.
 - ▶ 왼쪽 칸: SBS 카트리지(회색 라벨)
 - ▶ 오른쪽 칸: 클러스터 카트리지(주황색 라벨)
- 4 서랍을 Reagent Chiller 안으로 밀어 넣은 후 Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
센서 확인과 각 카트리지의 RFID 스캔이 끝나면 화면에 표시됩니다.
- 5 버퍼 서랍을 엽니다.
- 6 사용한 버퍼 카트리지가 버퍼 서랍에 들어 있지 않다면 넣어 줍니다.

폐시약 수거 용기 비우기

다음 지침에 따라 **매** 메인터넌스 워시 후 폐시약 수거 용기를 비웁니다. 폐시약이 외부로 배출되도록 시스템을 설치한 경우, 소형 수거 용기에 폐시약이 수거되며 대형 수거 용기는 제자리에 장착되어 있어야 합니다.



경고

이 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있으므로 흡입, 섭취, 피부 접촉, 눈 접촉 시 부상을 초래할 수 있습니다. 노출 위험이 있으므로 보안경, 장갑, 실험복 등 적합한 보호 장비를 착용하도록 합니다. 사용한 시약은 화학 폐기물로 취급하고 국가 및 해당 지역 법률 및 규정에 따라 폐기합니다. 그 밖의 환경, 건강, 안전 관련 정보는 support.illumina.com/sds.html의 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하시기 바랍니다.

- 1 소형 폐시약 수거 용기를 꺼내 관련 규정에 따라 시약을 폐기합니다. 수거 용기 안의 시약이 다른 병의 내용물과 섞이지 않도록 주의합니다.
- 2 소형 폐시약 수거 용기를 장착부에 다시 넣습니다.
- 3 대형 폐시약 수거 용기를 꺼내 관련 규정에 따라 시약을 폐기합니다.
- 4 대형 폐시약 수거 용기를 버퍼 서랍에 다시 넣습니다.
- 5 일회용 장갑(powder-free)을 양손에 끼입니다.
- 6 버퍼 서랍을 닫은 후 액체 장착부의 문을 닫습니다.
센서와 RFID가 확인됩니다. 각 워시 구성품의 ID가 화면에 표시됩니다.

워시 시작하기

- 1 두 폐시약 수거 용기가 모두 비어 있음을 확인하는 체크 박스를 선택한 후 **Start Wash**를 선택합니다.
워시가 시작되고 예상 워시 완료 시간이 표시됩니다.



경고

폐시약 수거 용기를 비우지 않으면 워시가 종료되거나 수거 용기가 넘칠 수 있으며, 이로 인해 기기의 손상이나 안전 문제가 발생할 수 있습니다.

- 2 워시가 완료되면 **Home**을 선택합니다.

- 3 다음 런을 시작할 때까지 소모품은 제자리에 둡니다.
 워시 완료 후 시스템에 공기가 유입되는 것을 방지하기 위해 시퍼는 SBS 카트리지와 클러스터 카트리지 안에 그대로 둡니다. 폐시약 수거 용기를 비울 때에는 시퍼를 들어 올리고 비웁니다.

소프트웨어 업데이트

소프트웨어 업데이트는 NVCS v1.4 또는 이후 버전부터 제공됩니다. 소프트웨어 업데이트는 NVCS에서 직접 다운로드하여 설치할 수 있습니다. 소프트웨어 업데이트 자동 확인 기능은 기본적으로 활성화되어 있습니다. 업데이트 자동 확인 기능은 Settings에서 활성화하거나 비활성화할 수 있습니다.



참고

소프트웨어 업데이트를 확인하고 업데이트를 다운로드하려면 NovaSeq 6000이 반드시 인터넷에 연결되어 있어야 합니다.

24시간마다 자동으로 업데이트가 확인됩니다. 업데이트가 있으면 Main Menu에 알림이 표시됩니다. 업데이트 알림은 모든 사용자에게 제공되지만, 관리자만이 업데이트를 다운로드하고 설치할 수 있습니다.

NovaSeq Xp Workflow에서는 샘플이나 소모품을 준비하기 전에 사용 중인 NVCS 버전이 아래 표에 명시된 최소 소프트웨어 요구 사항을 충족하는지 확인해야 합니다.

표 13 최소 소프트웨어 요구 사항

플로우 셀	v1.0 Reagent Kit의 최소 지원 소프트웨어 버전	v1.5 Reagent Kit의 최소 지원 소프트웨어 버전
SP	1.6	1.7
S1	1.3.1	1.7
S2	모든 버전 지원	1.7
S4	1.2.0	1.7



참고

시퀀싱 런, 워시, 런 설정, 결과 폴더 또는 BaseSpace Sequence Hub로의 파일 전송이 진행 중인 경우에는 소프트웨어를 업데이트할 수 없습니다. NovaSeq Xp Workflow가 진행 중인 경우 라이브러리를 플로우 셀에 장착하고 시퀀싱이 완료될 때까지 기다렸다가 소프트웨어를 업데이트하시기 바랍니다.

수동으로 업데이트를 확인하거나 업데이트를 다운로드하여 설치하려면 다음을 참조하시기 바랍니다.

- 1 Main Menu에서 **Software Update**를 선택합니다.
 사용 가능한 업데이트에 대한 릴리스 노트(release note)를 제공하는 소프트웨어 업데이트 화면이 표시됩니다. 자동 소프트웨어 업데이트 확인 기능이 활성화되어 있지 않다면 수동으로 업데이트를 확인하거나 자동 업데이트 확인 기능을 활성화할 수 있습니다.
- 2 업데이트를 다운로드하고 설치하려면 다운로드와 설치에 약 30분이 소요됨을 이해하였음을 확인하는 체크 박스를 선택합니다.
- 3 **Download and Install**을 선택합니다.
 다운로드가 완료되면 NVCS가 종료되고 Installer가 실행됩니다. Installer의 지침에 따라 설치를 완료합니다. 다운로드 또는 설치 중에 오류가 발생하면 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다.

부록 A 문제 해결

문제 해결 리소스.....	55
문제 해결 파일.....	55
프리런 검사 오류.....	55
Process Management를 통한 문제 해결.....	56
클러스터링 시작 전 런 실패.....	56
런 종료.....	57
기기 종료.....	58

문제 해결 리소스

기술적인 문의 사항은 [Illumina 웹사이트의 NovaSeq 6000 Sequencing System Support 페이지](#)를 참조하시기 바랍니다. Support 페이지에서는 Documentation, Software Downloads, FAQs와 같은 메뉴를 이용하실 수 있습니다. Technical Bulletins를 이용하려면 MyIllumina 계정으로 로그인하시기 바랍니다.

런 품질이나 성능 관련 문제는 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다. 연락처는 [74페이지의 기술 지원](#)에서 확인하시기 바랍니다. BaseSpace Sequence Hub가 제공하는 런 요약 내용의 링크를 Illumina 기술지원팀에 보내주시면 보다 원활하게 문제를 해결할 수 있습니다.

문제 해결 파일

주요 파일	폴더	설명
런 정보 파일(RunInfo.xml)	Root	다음과 같은 런 설정값 포함 <ul style="list-style-type: none">• 런의 사이클 횟수• 런의 리드 수• 인덱스 리드 여부• 플로우 셀 스왑스 및 타일 개수
런 파라미터 파일 (RunParameters.xml)	Root	런 이름, 런 파라미터 및 RFID 정보(일련 번호, 로트 번호, 유효 기간, 카탈로그 번호)와 같은 런 구성품에 대한 정보 포함.
InterOp 파일(*.bin)	InterOp	Sequencing Analysis Viewer에 사용되는 바이너리 형식의 보고서 파일. InterOp 파일은 런이 진행됨에 따라 업데이트됨.
로그 파일	Logs	사용한 시약 정보를 비롯해 기기에서 사이클별로 수행한 단계를 기술하고, 런에 사용한 소프트웨어와 펌웨어 버전 정보를 포함한 파일. [InstrumentName]_CurrentHardware.csv 파일에는 기기 부품의 일련 번호가 정리되어 있음.

프리런 검사 오류

프리런 검사 중 오류가 발생하면 다음과 같은 방법으로 오류를 해결할 수 있습니다. 듀얼 플로우 셀 런 설정 시 한쪽만 검사에 실패할 경우 실패한 쪽의 런은 취소하고 통과한 쪽에서만 런을 수행할 수 있습니다.

프리런 검사에 실패하면 해당 런에 사용하는 플로우 셀, 시약 및 버퍼의 RFID는 잠기지 않으므로 이들 소모품은 다음 런에 사용할 수 있습니다. 런이 시작되고 시퍼가 시약 카트리지의 포일 씬에 구멍을 뚫고 나면 모든 RFID가 잠깁니다.

시스템 검사	실패 원인	권장 조치
센서	장착부의 문이 열려 있거나, 소모품 올바르게 장착되지 않았거나, 최소 1개의 센서가 작동하지 않음.	Retry 선택 후 화면의 지시에 따라 오류 해결.
디스크 용량	선택한 결과 폴더 위치가 꽉 차서 디스크 용량이 부족함.	Process Management 화면을 통해 선택한 결과 폴더 위치에서 디스크 용량 확보.
시스템 연결	RTA3 연결, 유체 시스템 연결 또는 기타 연결이 중단됨.	Retry 선택 후 화면의 지시에 따라 오류 해결.
정렬	플로우 셀의 위치가 이미지를 방해함.	화면의 지시에 따라 플로우 셀 재장착.

드립 트레이

기기 하부에 내장된 드립 트레이는 누출되는 시약이나 냉각제를 모으고, 수거 용기에서 흘러나오는 폐시약을 담습니다. 일반적인 상황에서는 드립 트레이에 액체가 들어 있지 않습니다. 누출은 기기에 이상이 발생하였다는 뜻입니다. 폐시약 수거 용기는 정기적으로 비우지 않으면 넘칠 수 있습니다.

프리런 검사가 실시되는 동안 센서는 드립 트레이에 액체가 있는지를 감지합니다.

- ▶ 드립 트레이에 액체가 들어 있어도 가득 차 있지 않다면 런을 진행할 수는 있으나, 반드시 Illumina 기술지원팀에 먼저 연락하시기 바랍니다. 연락처는 [74페이지의 기술 지원](#)에서 확인하시기 바랍니다.
- ▶ 드립 트레이에 액체가 가득 차 있다면 런을 진행할 수 없습니다. 반드시 Illumina 기술지원팀에 연락하시기 바랍니다.

경고

매 런 후 폐시약 수거 용기를 비웁니다. 두 폐시약 수거 용기 중 하나만 가득 차도 런이 중단됩니다. 폐시약 수거 용기가 하나만 넘쳐도 기기를 손상시켜 Illumina 직원이 현장을 방문해야 하며 안전 문제가 발생할 수도 있습니다.

Process Management를 통한 문제 해결

다음 표는 N/A 아이콘 오류 발생 시 Process Management 화면을 통해 해결하는 방법을 제공합니다.

- ▶ BaseSpace 옆에 N/A 아이콘이 표시되고, 런이 BaseSpace Sequence Hub로 업로드되도록 설정된 경우.
- ▶ Network 옆에 N/A 아이콘이 표시되고, 런이 네트워크의 결과 폴더(Output folder)로 업로드되도록 설정된 경우.

런 상태	문제 해결 방법
런을 수행 중일 때	Process Management 화면을 닫고 5분간 기다렸다가 화면을 다시 열기
런을 수행하지 않을 때	기기 종료 후 재시작했다가 Process Management 화면 다시 열기

위와 같은 조치 후에도 N/A 아이콘이 계속 표시된다면 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다. 연락처는 [74페이지의 기술 지원](#)에서 확인하시기 바랍니다.

클러스터링 시작 전 런 실패

클러스터링을 시작하기 전에 소프트웨어가 런에 실패할 경우, 시약 카트리지가, 라이브러리 튜브(샘플 포함), 플로우 셀(즉시 재사용 시)은 보관해 두었다가 새로운 런에 사용할 수 있습니다. 이미 클러스터링이 시작되어 시퍼가 포일 씬에 구멍을 뚫고 시약이 라이브러리 튜브와 플로우 셀로 로딩되었다면, 소모품과 라이브러리는 다른 런에 사용할 수 없습니다.

런 실패 후 보관해 두었던 시약 카트리리지, 라이브러리 튜브, 플로우 셀을 사용하여 새로운 런을 설정하는 방법에는 두 가지가 있습니다.

- ▶ **즉시 새로운 런 설정하기** — 런 실패 후 4시간 안에 새로운 런 설정. 시약 카트리리지, 라이브러리 튜브, 플로우 셀은 기기에 장착된 상태로 보관.



참고

NovaSeq Xp Workflow로 최적의 결과를 얻으려면 최대한 빨리 새로운 런을 시작합니다.

- ▶ **나중에 새로운 런 설정하기** — 런 실패 후 3주 안에 새로운 런 설정. 시약 카트리리지와 라이브러리 튜브를 기기에서 꺼낸 후 따로 보관. 해당 소모품은 날짜가 적힌 라벨을 부착하여 원래 명시된 조건 하에 보관.



참고

플로우 셀은 재사용이 불가능하므로 반드시 폐기해야 합니다. Illumina 기술지원팀을 통해 교체용 플로우 셀에 대해 문의하시기 바랍니다.

즉시 새로운 런 설정하기

NovaSeq Xp Workflow에서 런에 실패했다면 최적의 결과를 위해 최대한 빨리 새로운 런을 시작합니다.

- 1 런에 실패했을 때 기기의 반대 쪽이 Idle 상태라면 기기를 재부팅합니다. 그렇지 않으면 **Home**을 선택합니다.
- 2 새로운 런을 설정합니다.
- 3 장착된 플로우 셀은 그대로 둡니다.
- 4 NVCS가 시약 카트리리지의 RFID를 다시 스캔하도록 Reagent Chiller의 문과 버퍼 서랍을 열었다가 다시 닫습니다. 카트리리지, 라이브러리 튜브, 플로우 셀은 런 실패 후 최대 4시간까지 기기에 장착된 상태로 둘 수 있습니다.
- 5 필요시 폐시약 수거 용기를 비운 후 기기에 다시 넣어 둡니다.
- 6 런 설정을 진행합니다.

나중에 새로운 런 설정하기

- 1 런에 실패하면 **Home**을 선택합니다.
- 2 기기에 장착된 소모품을 꺼내기 위해 새로운 런 또는 메인テナンス 위시를 설정합니다.
- 3 화면의 지시에 따라 다음과 같이 소모품을 꺼내어 보관합니다.
 - ▶ 라이브러리 튜브는 캡을 닫아 -25~-15°C에서 보관합니다. 최대 3주까지 보관 가능합니다.
 - ▶ SBS 카트리리지와 클러스터 카트리지는 -25~-15°C에서 재보관합니다.
 - ▶ 버퍼 카트리지는 빛을 차단한 채 실온에서 재보관합니다. 카트리지는 구멍이 뚫리지 않았다면 새로운 런에 재사용할 수 있습니다.
- 4 **End**를 선택하여 런 또는 메인テナンス 위시를 취소한 후 **Yes**를 선택하여 취소를 확인합니다. 메인テナンス 위시는 취소하지 않고 완료되기를 기다려도 됩니다.

런 종료

NovaSeq 6000 시스템에서 런을 한번 종료하면 다시 되돌릴 수 **없습니다**. 소프트웨어가 런을 재개하거나 시퀀싱 데이터를 저장할 수 없으며, 소모품도 재사용할 수 없습니다.

- 1 **End**를 선택한 후 **Yes**를 선택하여 종료를 확인합니다.
Read 1 후 런이 종료되었다면 소프트웨어는 자동으로 포스트런 워시를 시작합니다.
- 2 화면의 지시에 따라 다음 중 하나의 워시 옵션을 선택합니다.
 - ▶ **End Run Without Wash** — 런 종료 후 메인터넌스 워시 시작.
 - ▶ **End Run and Wash** — 런 종료 후 자동으로 포스트런 워시 시작.
 - ▶ **Cancel** — 현재 런 계속 진행.
 런이 클러스터링 완료 단계와 Read 1 완료 단계 사이에서 종료되었다면 소프트웨어가 위와 같은 워시 옵션을 표시합니다. 그렇지 않으면 소프트웨어가 자동으로 포스트런 워시를 시작합니다.
- 3 End Run Without Wash 옵션을 선택한 경우 소프트웨어의 지시에 따라 메인터넌스 워시를 설정합니다.

기기 종료

기기를 종료하면 모든 소프트웨어와 시스템이 안전하게 종료되고 기기 전원이 꺼집니다. 상태 표시 바가 초록색에서 흰색으로 바뀌면서 기기가 종료 중임을 알려줍니다.

일반적인 상황이라면 기기를 종료할 필요는 없습니다.

소프트웨어 충돌이 발생하는 경우에는 반드시 기기를 전체적으로 종료했다가 전원을 다시 켜야 합니다.

NVCS가 실행 중일 때 기기를 종료하거나 재시작하려면, 사용자는 기기가 종료되거나 재시작되기 전에 반드시 이를 확인해야 합니다.

- 1 Main Menu에서 **Shutdown Instrument**를 선택합니다.
- 2 화면이 공백으로 바뀌면 기기 뒷면에 있는 토글 스위치를 꺼짐 위치로 눌러 전원을 끕니다.
- 3 최소 60초 기다렸다가 기기를 다시 켵니다.



주의

기기를 임의로 이전하지 않습니다. 부적절한 운반은 기기의 광학부 정렬 및 데이터 무결성에 영향을 줄 수 있습니다. 기기를 이전해야 하는 경우 Illumina 담당자에게 문의하시기 바랍니다.

부록 B Real-Time Analysis

Real-Time Analysis 소프트웨어의 개요 59
Real-Time Analysis 소프트웨어의 워크플로우 61

Real-Time Analysis 소프트웨어의 개요

NovaSeq 6000 시퀀싱 시스템은 기기의 Compute Engine(CE)에서 Real-Time Analysis 소프트웨어를 구현한 RTA3를 실행합니다. RTA3는 카메라가 전송한 이미지에서 강도를 추출하고, 베이스 콜링을 수행하며, 베이스 콜에 품질 점수를 배정하고, PhiX에 정렬하며, Sequencing Analysis Viewer를 통한 데이터 검토를 위해 InterOp 파일 형식으로 데이터를 보고합니다.

RTA3는 처리 시간을 최적화하기 위해 메모리에 정보를 저장합니다. RTA3 종료 시 처리 작업은 재개되지 않으며 메모리에서 처리 중이던 런 데이터는 모두 손실됩니다.

RTA3 입력 데이터

RTA3의 처리 작업에는 로컬 시스템 메모리에 있는 타일 이미지가 필요합니다. RTA3는 NVCS로부터 런 정보와 명령을 전달받습니다.

RTA3 출력 데이터

각 색상 채널의 이미지는 타일 형식으로 메모리에서 RTA3로 전달됩니다. RTA3는 이러한 이미지를 바탕으로 품질 점수가 배정된 베이스 콜 파일과 필터 파일을 출력합니다. 그 외 모든 파일은 지원 출력 파일입니다.

파일 유형	설명
베이스 콜 파일	각 분석 타일은 결합된 베이스 콜(*.cbcl) 파일에 포함되며 레인과 표면이 동일한 타일은 레인 및 표면별로 1개의 *.cbcl 파일로 취합.
필터 파일	파일마다 클러스터의 필터 통과 여부를 명시하는 필터(*.filter) 파일 생성.
클러스터 위치 파일	클러스터 위치(*.locs) 파일은 1개의 타일 내 모든 클러스터의 X 및 Y 좌표 포함. 런당 1개의 클러스터 위치 파일 생성.

결과 파일은 BaseSpace Sequence Hub의 후속 분석에서 사용됩니다. 또는 FASTQ 파일 변환에 bcl2fastq 변환 소프트웨어를 사용하고 타사의 소프트웨어 분석 솔루션을 사용할 수 있습니다. NovaSeq 파일에는 bcl2fastq2 Conversion Software v2.19 또는 이후 버전을 사용합니다. Illumina 웹사이트의 [bcl2fastq Downloads 페이지](#)에서 bcl2fastq2의 최신 버전을 다운로드하실 수 있습니다.

RTA3는 실시간 런 품질 매트릭스를 타일, 사이클 및 리드 관련 매트릭스를 포함하는 바이너리 형식의 InterOp 파일로 저장하여 제공합니다. Sequencing Analysis Viewer를 통해 실시간 매트릭스를 확인하려면 InterOp 파일이 필요합니다. Illumina 웹사이트의 [Sequencing Analysis Viewer Downloads 페이지](#)에서 Sequencing Analysis Viewer의 최신 버전을 다운로드하실 수 있습니다.

오류 처리

RTA3는 로그 파일을 생성하여 이를 Logs 폴더에 저장합니다. 오류는 텍스트 파일 형식(*.log)으로 기록됩니다. 처리 완료 시 다음과 같은 로그 파일이 최종 출력 위치로 전송됩니다.

- ▶ info_00000.log 파일은 중요한 런 이벤트를 요약합니다.
- ▶ error_00000.log 파일은 런 수행 중 발생한 오류의 목록을 보여줍니다.
- ▶ warning_00000.log 파일은 런 수행 중 발생한 경고의 목록을 보여줍니다.

플로우 셀 타일

타일(Tile)이란 플로우 셀에 있는 작은 이미징 영역을 의미합니다. 카메라는 스와스(swath)별로 1개의 이미지를 획득하며, RTA3가 이 이미지를 처리할 수 있도록 소프트웨어가 이미지를 타일로 분할합니다. 총 타일 개수는 플로우 셀에서 몇 개의 레인, 스와스 및 표면의 이미지의 획득 여부에 따라 달라집니다.

- ▶ SP Flow Cell에는 총 312개의 타일이 들어 있습니다.
- ▶ S1 Flow Cell에는 총 624개의 타일이 들어 있습니다.
- ▶ S2 Flow Cell에는 총 1408개의 타일이 들어 있습니다.
- ▶ S4 Flow Cell에는 총 3744개의 타일이 들어 있습니다.

표 14 플로우 셀 타일

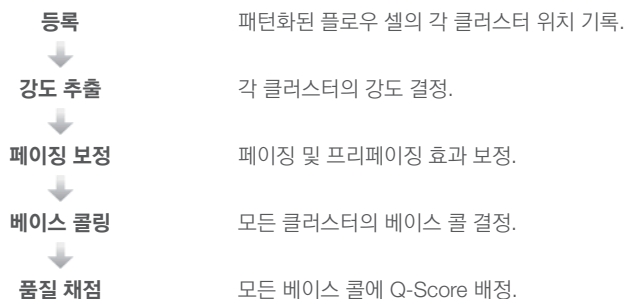
플로우 셀 구성요소	SP	S1	S2	S4	설명
레인	2	2	2	4	인풋 포트와 아웃풋 포트를 포함하는 물리적 채널.
표면	1	2	2	2	S1, S2 및 S4 Flow Cell은 상단 표면과 하단 표면의 이미지가 획득됨. 타일 상단 표면의 이미지가 먼저 획득됨. SP Flow Cell은 하단 표면의 이미지만 획득됨.
레인당 스와스	2	2	4	6	카메라가 1장의 이미지로 촬영하는 플로우 셀 레인 내 컬럼.
스와스당 타일	78	78	88	78	타일은 스와스의 일부분으로 플로우 셀의 이미징 영역을 묘사함.
총 생성 타일	312	624	1408	3744	레인 × 표면 × 스와스 × 스와스당 타일 개수 = 총 타일 개수.

타일 이름 지정

타일 이름은 플로우 셀상의 타일 포지션을 나타내는 5자리 숫자입니다. 예를 들어 1_1205라는 타일 이름은 1번 레인, 상단 표면, 2번 스와스, 5번 타일을 의미합니다.

- ▶ 첫 번째 자리는 레인 번호를 나타냄.
 - ▶ SP, S1 및 S2 Flow Cell: 1 또는 2
 - ▶ S4 Flow Cell: 1, 2, 3 또는 4
- ▶ 두 번째 자리는 표면으로 1은 상단 표면을, 2는 하단 표면을 나타냄.
SP Flow Cell에는 하단 표면만 있으므로 두 번째 자리는 항상 2임.
- ▶ 세 번째 자리는 스와스 번호를 나타냄.
 - ▶ SP 또는 S1 Flow Cell: 1 또는 2
 - ▶ S2 Flow Cell: 1, 2, 3 또는 4
 - ▶ S4 Flow Cell: 1, 2, 3, 4, 5 또는 6
- ▶ 마지막 두 자리는 타일 번호를 나타냄. 번호는 플로우 셀의 배출단부터 유입단까지 순서대로 01에서 88 혹은 7801 부여됨.
 - ▶ SP, S1 및 S4 Flow Cell: 01~78
 - ▶ S2 Flow Cell: 01~88

Real-Time Analysis 소프트웨어의 워크플로우



등록

등록 단계에서는 이미지가 패턴화된 플로우 셀의 육각형의 나노웰 어레이에 정렬됩니다. 나노웰은 순서대로 배치되어 있기 때문에 1개의 타일 내 클러스터마다 X 및 Y 좌표가 미리 지정됩니다. 클러스터 포지션은 각 런의 클러스터 위치(s.locs) 파일에 쓰여집니다.

특정 사이클에서 이미지 등록 실패가 발생하는 경우 해당 사이클에서는 관련 타일에 대한 베이스 콜이 생성되지 않습니다. Sequencing Analysis Viewer를 사용하면 등록에 실패한 이미지를 확인할 수 있습니다.

강도 추출

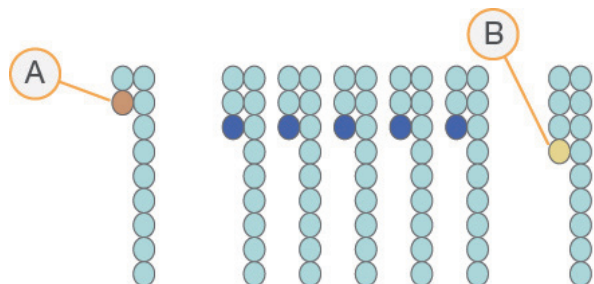
등록 완료 후 강도(intensity) 추출 단계를 통해 해당 이미지를 바탕으로 각 나노웰의 강도가 계산됩니다. 등록에 실패했을 경우 해당 타일의 강도는 추출되지 않습니다.

페이징 보정

시퀀싱 반응이 일어날 때 하나의 클러스터 내 DNA 가닥(strand)은 각각 사이클당 1 베이스만큼 연장됩니다. 페이징(phasing)과 프리페이징(prephasing)은 현재의 포함(incorporation) 사이클에서 한 가닥이 역위상(out of phase)될 때 발생합니다.

- ▶ 페이징은 베이스가 뒤쳐질 때 발생합니다.
- ▶ 프리페이징은 베이스가 건너될 때 발생합니다.

그림 31 페이징 및 프리페이징



- A 리드에 베이스 페이징이 발생하는 경우
- B 리드에 베이스 프리페이징이 발생하는 경우

RTA3는 페이징 및 프리페이징 효과를 보정하여 런 전반에 걸쳐 모든 사이클에서 데이터 품질을 극대화합니다.

베이스 콜링

베이스 콜링은 특정 사이클에서 1개의 타일 내 모든 클러스터에 대한 베이스(A, C, G 또는 T)를 결정하는 단계입니다. NovaSeq 6000 시퀀싱 시스템은 2채널 시퀀싱 기법을 사용하여 빨간색 채널과 초록색 채널을 통해 획득하는 두 장의 이미지만으로 네 개의 DNA 베이스에 대한 데이터를 인코딩할 수 있습니다.

N은 콜이 없음(No call)을 의미합니다. 클러스터가 필터를 통과하지 않거나, 등록이 실패하거나, 클러스터가 이미지 밖으로 나갈 경우 N이 표시됩니다.

빨간색과 초록색 이미지에서 각 클러스터의 강도를 추출하고 비교하여 네 개의 집단(population)을 얻습니다. 각 집단은 1개의 베이스를 나타냅니다. 베이스 콜링 단계에서는 각 클러스터가 어떤 집단에 속하는지가 결정됩니다.

그림 32 클러스터 강도의 시각화

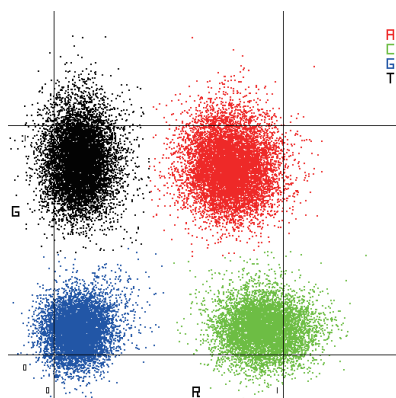


표 15 2채널 시퀀싱의 베이스 콜

베이스	빨간색 채널	초록색 채널	결과
A	1(On)	1(On)	빨간색과 초록색 채널에서 강도를 보이는 클러스터.
C	1(On)	0(Off)	빨간색 채널에서만 강도를 보이는 클러스터.
G	0(Off)	0(Off)	알려진 클러스터 위치에서 강도를 보이지 않는 클러스터.
T	0(Off)	1(On)	초록색 채널에서만 강도를 보이는 클러스터.

필터를 통과하는 클러스터

RTA3는 데이터 품질 임계값 미만의 리드를 제거하기 위해 런 수행 중 raw data를 필터링합니다. 이때 중복되는 저품질의 클러스터가 제거됩니다.

2채널 분석 시 RTA3는 집단 기반의 시스템을 사용해 특정 베이스 콜의 신호 순도(chastity, 강도 순도 측정)를 파악합니다. 첫 25회의 사이클에서 한 개 이하의 베이스 콜이 고정 임계값 미만의 신호 순도를 보일 때 클러스터가 필터를 통과(pass filter, PF)합니다. 필터를 통과한 클러스터에 대해 26번째 사이클에서 타일의 부분집합을 대상으로 PhiX 정렬을 수행합니다. 필터를 통과하지 않는 클러스터는 베이스 콜링이나 정렬 단계를 거치지 않습니다.

Q-Score

Q-Score(Quality Score, 품질 점수)는 부정확한 베이스 콜의 발생 확률을 예측한 값입니다. Q-Score가 높을수록 베이스 콜의 품질과 정확도가 높을 가능성이 큼니다. Q-Score가 결정되면 결과가 베이스 콜(*.cbcl) 파일에 기록됩니다.

Q-Score는 사소한 오류가 발생할 확률을 간결하게 표시합니다. Q-Score는 Q(X) 형식으로 표시되며, (X)는 배정된 점수를 나타냅니다. 아래 표는 Q-Score와 오류 발생 확률의 상관관계를 보여줍니다.

Q-Score Q(X)	오류 발생 확률
Q40	0.0001(1/10,000)
Q30	0.001(1/1000)
Q20	0.01(1/100)
Q10	0.1(1/10)

품질 채점 및 보고

품질 채점 단계에서는 각 베이스 콜에 대한 여러 예측 인자를 계산한 뒤 계산된 값을 이용해 Q-Table(품질 표)에서 Q-Score를 찾습니다. Q-Table은 시퀀싱 플랫폼의 특정 구성 및 chemistry 버전에 따라 생성되는 런의 품질을 정확히 예측하기 위해 생성됩니다.



참고

품질 채점은 수정된 Phred 알고리즘 버전을 기반으로 합니다.

RTA3은 베이스 콜의 신뢰도에 따라 각 베이스 콜에 셋 중 하나의 Q-Score를 배정합니다. 이 Q-Score 보고 모델은 정확성이나 성능에 영향을 주지 않으면서 필요한 저장 용량 및 대역폭은 줄여 줍니다.

품질 채점에 대한 자세한 정보는 *NovaSeq™ 6000 System Quality Scores and RTA3 Software*(출판 번호: 770-2017-010)를 참조하시기 바랍니다.

부록 C 시퀀싱 결과 폴더 및 파일

시퀀싱 결과 폴더 구조	64
시퀀싱 결과 파일	65

시퀀싱 결과 폴더 구조

NVCS는 결과 폴더의 이름을 자동으로 생성합니다.

📁 **Config** — 런의 구성 설정.

📁 **Logs** — 작업 단계, 기기 분석, RTA3 이벤트를 설명하는 로그 파일.

📁 **Data**

 📁 **Intensities**

 📁 **BaseCalls**

 📁 **L00[X]** — 레인, 표면 및 사이클별 하나의 파일로 취합된 베이스 콜 파일(*.cbcl).

 📄 s.locs — 런의 클러스터 위치 파일.

📁 **InterOp** — Sequencing Analysis Viewer가 사용하는 바이너리 파일.

📁 **Recipe** — 특정 런의 레시피 파일.

📁 **Thumbnail Images** — 모든 10번째 타일의 썸네일 이미지.

📁 **LIMS** — 적용되는 경우 런 설정 파일(*.json).

📄 RTA3.cfg

📄 RunInfo.xml

📄 RunParameters.xml

📄 RTAComplete.txt

📄 CopyComplete.txt

📄 SampleSheet.csv — 샘플 시트 또는 적용되는 경우 다른 첨부 파일.

📄 SequenceComplete.txt

시퀀싱 결과 파일

파일 유형	파일 설명, 위치, 이름
베이스 콜 파일	<p>각각의 분석된 클러스터가 하나로 결합된 베이스 콜 파일에 포함되며, 사이클, 레인 그리고 표면당 하나의 파일로 취합됨. 취합된 파일은 모든 클러스터에 대한 베이스 콜과 인코딩된 Q-Score를 포함함.</p> <p>베이스 콜 파일은 BaseSpace Sequence Hub 또는 bcl2fastq2에서 사용됨.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1</p> <p>L[lane]_[surface].cbcl, 예: L001_1.cbcl</p>
클러스터 위치 파일	<p>플로우 셀별로 바이너리 클러스터 위치 파일에 타일 내 클러스터의 X 및 Y 좌표가 포함됨. 플로우 셀의 나노웰 레이아웃과 일치하는 육각형 레이아웃이 해당 좌표를 사전 정의함.</p> <p>Data\Intensities</p> <p>s_[lane].locs</p>
필터 파일	<p>필터 파일은 클러스터의 필터 통과 여부를 명시하며, 25번의 데이터 사이클을 이용해 26번째 사이클에 생성됨. 타일별로 한 개의 필터 파일이 생성됨.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001</p> <p>s_[lane]_[tile].filter</p>
InterOp 파일	<p>Sequencing Analysis Viewer에 사용되는 바이너리 형식의 보고서 파일. InterOp 파일은 런이 진행됨에 따라 업데이트됨.</p> <p>InterOp 폴더</p>
런 정보 파일	<p>런 이름, 리드당 사이클 횟수, 인덱스 리드 여부, 플로우 셀의 스왑스 및 타일 개수에 대한 정보를 포함함. 런 정보 파일은 런 시작 시점에 생성됨.</p> <p>[Root folder], RunInfo.xml</p>
썸네일 파일	<p>활성화되어 있는 경우, 각 색상 채널(빨간색 및 초록색)의 모든 10번째 타일의 썸네일 이미지.</p> <p>Thumbnail_Images\L001\C[X.1] — 각 사이클의 서브폴더에 파일이 저장됨.</p> <p>s_[lane]_[tile]_[channel].jpg — 썸네일 이미지에는 타일 번호가 포함됨.</p>

부록 D Windows 보안

- 보안 구성..... 66
- 비밀번호 요구 사항..... 66
- Windows 방화벽..... 66
- 강화된 완화 경험 툴킷 66
- 소프트웨어 제한 정책 67

보안 구성

기기 제어 컴퓨터를 구동하는 Windows OS는 원치 않는 소프트웨어의 실행을 방지하는 보안 구성을 포함하고 있습니다. 부록 D는 보안 구성에 대한 설명과 필요에 따라 맞춤 설정하는 방법을 제공합니다.

일반적인 상황에서는 기본 보안 구성을 변경할 필요가 없습니다. 보안 구성을 변경해야 하는 경우에는 숙련된 관리자가 신중하게 계획을 수립한 후에 변경 작업을 관리하도록 합니다.



주의

이러한 보안 구성은 시스템 성능에 영향을 주고 보안성을 저하시킬 수 있으므로 설정 변경이 필요한지 확신이 없거나 설정 변경이 가져올 영향을 알 수 없는 경우 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다.

비밀번호 요구 사항

다음 표에는 기기 제어 컴퓨터의 비밀번호 정책이 정리되어 있습니다. 최초 로그인 시 소프트웨어에 비밀번호 변경을 요청합니다.

표 16 디폴트 비밀번호 정책

정책	보안 설정
최근 암호 기억	비밀번호 5개 기억
최대 비밀번호 사용 기간	180일
최소 비밀번호 사용 기간	0일
최소 비밀번호 길이	10자
비밀번호는 복잡성을 만족해야 함	비활성
해독 가능한 암호화를 사용해 비밀번호 저장	비활성

Windows 방화벽

Windows 방화벽은 잠재적인 위협을 제거하기 위해 내부로 유입되는 트래픽을 필터링하여 제어 컴퓨터를 보호합니다. 방화벽은 모든 인바운드 연결을 차단하기 위해 기본적으로 활성화되어 있습니다. 방화벽이 활성화된 상태에서 아웃바운드 연결을 허용하도록 합니다. 아웃바운드 연결에 대한 자세한 정보는 *NovaSeq 시리즈 현장 준비 가이드(문서 번호: 1000000019360)*를 참조하시기 바랍니다.

강화된 완화 경험 툴킷

강화된 완화 경험 툴킷(Enhanced Mitigation Experience Toolkit, EMET)은 소프트웨어의 취약성이 악용되는 것을 방지하며 인증서 신뢰(Certificate Trust) 기능을 제공합니다. 이 기능은 악성 인증서를 사용한 공격 행위를 감지하여 중단시킵니다.

소프트웨어 제한 정책

Windows 소프트웨어 제한 정책(Software Restriction Policies, SRP)은 특정 소프트웨어의 실행만을 허용하는 규칙을 사용합니다. NovaSeq 6000의 SRP 규칙은 인증서, 파일 이름 및 확장자, 디렉토리를 기반으로 합니다.

SRP는 제어 컴퓨터에서 원치 않는 소프트웨어가 실행되지 않도록 기본적으로 활성화되어 있습니다. IT 담당자 또는 시스템 관리자는 규칙을 추가하거나 삭제하여 보안 수준을 맞춤 설정할 수 있습니다. 시스템이 도메인에 추가되면 로컬 그룹 정책 개체(Group Policy Object, GPO)가 자동으로 규칙을 변경하고 SRP를 비활성화할 수 있습니다.



주의

SRP를 비활성화하면 보호 기능이 실행되지 않습니다. 규칙을 변경하면 디폴트 보호 기능이 무시됩니다.

허용되는 SRP 규칙

NovaSeq 6000 시퀀싱 시스템에서 SRP는 기본적으로 다음 규칙을 허용합니다.

인증서

DigitalSystems
Illumina, Inc.
NovaSeq

실행 파일

Portmon.exe
Procmon.exe
Procmon64.exe
Tcpview.exe

파일 확장자

*.bin
*.cbcl
*.cfg
*.config
*.csv
*.dat
*.focus
*.imf1
*.ims
*.jpg
*.json
*.lnk
*.locs
*.log
*.manifest
*.sdf
*.tif
*.txt
*.xml

디렉토리

%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%
%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows NT\CurrentVersion\SystemRoot%
C:\CrashDumps*
C:\Illumina*
C:\Illumina Maintenance Logs*

디렉토리

C:\LocalSymbols\
 C:\Program Files (x86)\Chromium\Application\
 C:\Program Files (x86)\EMET 5.5\
 C:\Program Files (x86)\Illumina\
 C:\Program Files (x86)\Internet Explorer\
 C:\Program Files (x86)\LibreOffice 5\
 C:\Program Files\Illumina\
 C:\ProgramData\Illumina\
 C:\ProgramData\Package Cache\
 C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix\
 C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs\
 C:\Users\sbsuser\Desktop\FSE turn over to customer.bat
 D:\Illumina\

SRP 규칙 추가 및 삭제하기

SRP 규칙을 추가하거나 삭제하여 시스템 보안 기능을 맞춤 설정합니다. 규칙을 변경하려면 먼저 SRP를 일시적으로 비활성화해야 합니다.



주의

SRP를 비활성화하면 디폴트 보호 기능이 무시됩니다.

- 1 OS에 로그인합니다.
- 2 다음과 같이 SRP를 비활성화합니다.
 - a C:\Illumina\Security 디렉토리로 이동합니다.
 - b Disable.reg를 더블 클릭합니다.
 - c **Yes**를 선택하여 변경을 확인합니다.

터치스크린 인터페이스를 사용하는 경우 우클릭 대신 약 2초간 화면을 길게 누릅니다.
- 3 **Start**를 선택한 후 **Run**을 선택합니다.
- 4 Open 필드에 **secpol.msc**를 입력합니다.
- 5 Local Security Policy 대화 상자에서 **Software Restriction Policies**를 펼친 후 **Additional Rules**를 선택합니다.
- 6 다음 절차에 따라 규칙을 추가합니다.
 - a Action 메뉴에서 **New Path Rule**을 선택합니다.
 - b Path 필드에 허용할 인증서, 파일 이름, 파일 확장자 또는 디렉토리를 입력합니다.
 - c Security Level 목록에서 **Unrestricted**를 선택합니다.
 - d **[선택 사항]** Description 필드에 규칙을 생성하는 이유를 입력합니다.
 - e **OK**를 선택하면 규칙이 추가됩니다.
- 7 다음 절차에 따라 규칙을 삭제합니다.
 - a 삭제할 규칙을 선택한 후 **Delete**를 선택합니다.
 - b **Yes**를 선택하여 삭제를 확인합니다.
- 8 Local Security Policy 대화 상자를 닫습니다.
- 9 **지체없이** SRP를 재활성화합니다.

- a C:\Illumina\Security 디렉토리로 이동합니다.
- b Enable.reg를 더블 클릭합니다.

10 SRP 규칙을 처음 변경한 것이라면 로그아웃했다가 다시 로그인해야 변경된 규칙이 적용됩니다.

색인

기호

%PF 37

번호

2레인 플로우 셀 12
2채널 시퀀싱 2, 62
4레인 플로우 셀 12
30번 포지션 48, 53

ㄱ

강도 61
개별 레인 어드레스 지정 4, 15
개스킷 13, 35, 41
거품 37
결과 폴더 19-20
결과 폴더 이름 64
경고 8
고객 지원 74
공급 업체 24
관련 문서 2, 74
관리자 계정 18
관리자 계정 권한 18
광학 부품 5
광학 정렬 타겟 5, 40
교차 오염 7, 48
그룹 정책 개체 67
기기 성능 데이터 19-20
기기의 운반 58
기기 이전 58
기본 설정 19, 23
기술 지원 74
깜빡이는 아이콘 8

ㄴ

나노웰 61
냉동고 사양 26
냉장고 사양 26
넘침 29, 34, 56
누출 56

ㄷ

데이터 업로드 43

데이터 전송 8, 47
데이터 품질 62
도크 35, 41
 구성품 15
드립 트레이 56
등록 실패 61
디스크 용량 8, 56

ㄹ

라이브러리
 보관 57
라이브러리 튜브 14, 56
 보관 11, 57
 카트리지 내 57
런
 메트릭스 46, 59
 모니터링 23, 43
 삭제 8
 시차를 둔 시작 47
 일시 중지 47
 재시작 58
런 설정 19
런 설정 모드 19
런 설정 폴더 19-20
런 완료 시간 46
레인 12, 60
레인 번호 지정 15, 38
로그 파일 55, 59
로딩 농도 22
로딩 볼륨 2
로트 번호 16
리드의 수 11

ㅁ

메인テナンス 워시
 소모품 24, 50
 워시 용액 50
모드 10
문제 해결 55
 관련 문서 2

ㅂ

방화벽 66
배치 코드 16
버퍼 카트리지 42, 53

- 베이스 콜 파일 59, 65
- 보관 조건 16
- 보안 67
 - 맞춤 설정 68
- 보안 구성 66
- 부품 번호 16
- 분석 23
- 분석 방법 3
- 분석 설정 19
- 비밀번호 정책 66
- 빨간색 채널 62

人

- 사양 10
- 사이클 수 22
- 사이클 횟수 44
- 상태 표시 바 5, 58
- 샘플 시트 23, 43-44
- 샘플 시트 이름 23
- 샘플 추적 14
- 센서 6, 53, 56
- 소모품
 - 메인터넌스 워시 50
 - 실험용수 26
 - 제거 48, 53
 - 포장지 16
- 소요 시간
 - 메인터넌스 워시 50
 - 시퀀싱 런 46
 - 자동 포스트런 워시 48
 - 클러스터 생성 47
- 수율 46
- 수조 28, 33
- 스왑스 2, 12, 60
- 스캔 2
- 시스템 연결 56
- 시약 카트리지
 - 꺼내기 42
 - 라벨 표시 10, 13
 - 보관 11, 56
 - 준비 27, 32
- 시약 키트 보관 11, 15
- 시퀀싱 단계 2
- 시퀀싱 런
 - 삭제 47
- 시퀀싱 사이클 46
- 시퍼 위치 49, 54
- 신호 순도 62
- 실험용수 가이드라인 26
- 싱글 리드 런 44
- 썸네일 65

○

- 아웃바운드 연결 66
- 아이콘 8-9
- 안전 보건 자료 7
- 액체 장착부 7
- 예방적 유지 관리 50
- 오류 8, 55
 - 발생 확률 62-63
- 오류 로그 59
- 온라인 교육 2
- 와이어 해동 랙 28, 33
- 워시
 - 빈도 50
 - 소요 시간 48, 50
- 워시 용액 13
- 워시 카트리지 50, 52
- 워시 플로우 셀 50
- 워크플로우 22
- 웰 15
- 웰 번호 지정 38
- 웹사이트 Support 페이지 55
- 유체 시스템 7, 50
- 유체 시스템 연결 문제 56
- 유해 화학물질 7, 17
- 유효 기간 16
- 응용 분야 1
- 이미지 59
- 이미징 2, 60
- 인바운드 연결 66
- 인증서 신뢰 66

ㄹ

- 장갑 착용 29, 34, 53
- 장착부 5
- 재혼성화 21
- 전원 18
- 전원 끄기 58
- 전원 켜기 18
- 정렬 실패 56
- 제어 컴퓨터 66
- 제조사 16
- 종료 후 재시작 58
- 증폭 2

ㅍ

- 차아염소산 나트륨(NaOCl) 48, 50
- 초기화 19
- 초록색 채널 62

ㅋ

- 카메라 1, 5, 60
- 카탈로그 번호 10
 - 별도 구매 소모품 24
- 카트리지
 - 적재 13
- 캡 홀더 29, 34
- 커스텀 프라이머 2, 14, 44
- 콜이 없음 62
- 클러스터 강도 61
- 클러스터링 소요 시간 46
- 클러스터 위치 파일 59, 65
- 클러스터 카트리지 11
- 키트 구성품 25
- 키트 구성품의 라벨 10
- 키트 옵션 10

ㄷ

- 타사 LIMS 20
- 타일 2, 12, 59
- 타일 이름 지정 60

ㅍ

- 파일
 - 런별 55
- 패턴화된 플로우 셀 1, 12
- 페이징 및 프리페이징 61
- 폐시약 7, 28, 33, 43
- 폐시약 수거 7
- 포름아마이드 폐기 14, 48
- 포스트런 워시 48
- 표면 번호 지정 60
- 프리런 검사 55
- 플로우 셀
 - 닦기 35, 40
 - 라벨 표시 10
 - 보관 11, 35
 - 사양 10
 - 스크래치 35, 41
- 플로우 셀 스테이지 5, 40
- 플로우 셀의 스크래치 35, 41
- 플로우 셀 클램프 5
- 플로우 셀 홀더 6
- 플롯 색상 46
- 피펫 26
- 필터를 통과하는 클러스터 46
- 필터 통과(PF) 62
- 필터 파일 59, 65

ㅎ

- 하드 드라이브 8, 19-20
- 허용되는 규칙 67
- 현장 요구사항 2, 66

B

- BaseSpace Enterprise 23
- BaseSpace Sequence Hub 1, 23
 - 도메인 23
 - 연결 및 연결 해제 43
 - Support 페이지 3
- bcl2fastq2 24, 59

C

- CBCL 파일 3, 47, 62
- Compute Engine(CE) 8, 59
- Control Software 8

D

- DPX 시약 보관 15
- DPX/JPX 시약 호환성 15

E

- EMET 66
- ExAmp 시약 12, 36
 - 보관 15
 - 해동 35
 - 혼합 방법 3
- ExAmp Master Mix 2, 37

F

- FASTQ 변환 24, 59

G

- GPO 67

H

- Hosting Location 23

I

Illumina Proactive 모니터링 서비스 19-20
Index Read 44
InterOp 파일 55, 59, 65

J

JPX 시약 보관 15

L

LIMS 1, 19
LIMS 런 설정 파일 20
LIMS 설정 20

N

NovaSeq Xp의 정의 4
NovaSeq Xp Flow Cell Dock 15, 35
NovaSeq Xp Manifold 36
 보관 15
NovaSeq Xp Manifold의 월 번호 15
NovaSeq Xp Workflow 22

O

OS 19, 66

P

PhiX
 정렬 59
 카탈로그 번호 25
Phred 알고리즘 63
Process Management 47

Q

Q-Score 46, 62-63
Q-Table 63

R

Read 1 58
Reagent Chiller 7
Real-Time Analysis 1, 8
RFID 11, 55
RunInfo.xml 55, 65

S

Sequencing 화면 46
Sequencing Analysis Viewer 59, 61
Software Suite 8
SRP 67
SRP 기본 허용 규칙 67
Standard의 정의 4
Standard Workflow 22

T

Technical Bulletins 55
Tween 20 50

U

Universal Copy Service 8, 47
USB 포트 5

W

Windows
 보안 66

기술 지원

기술 지원은 Illumina 기술지원팀에 요청하시기 바랍니다 .

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

Illumina 고객지원팀 연락처

지역	무료 전화 번호	지역 전화 번호
북미	+1.800.809.4566	
호주	+1.800.775.688	
오스트리아	+43 800006249	+43 19286540
벨기에	+32 80077160	+32 34002973
중국	400.066.5835	
덴마크	+45 80820183	+45 89871156
핀란드	+358 800918363	+358 974790110
프랑스	+33 805102193	+33 170770446
독일	+49 8001014940	+49 8938035677
홍콩, 중국	800960230	
아일랜드	+353 1800936608	+353 016950506
이탈리아	+39 800985513	+39 236003759
일본	0800.111.5011	
네덜란드	+31 8000222493	+31 207132960
뉴질랜드	0800.451.650	
노르웨이	+47 800 16836	+47 21939693
싱가포르	+1.800.579.2745	
대한민국	+82 80 234 5300	
스페인	+34 911899417	+34 800300143
스웨덴	+46 850619671	+46 200883979
스위스	+41 565800000	+41 800200442
대만, 중국	00806651752	
영국	+44 8000126019	+44 2073057197
기타 국가	+44.1799.534000	

안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS) — Illumina 웹사이트(support.illumina.com/sds.html)에서 확인하실 수 있습니다.

제품 관련 문서 — support.illumina.com에서 다운로드하실 수 있습니다.



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.

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]