

MiSeq

시스템 가이드



문서 번호: 15027617 v06 KOR 자료 번호: 20000262

2021년 1월

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

ILLUMINA PROPRIETARY

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

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

개정 이력

문서 번호	일자	개정 내용
자료 번호: 20000262 문서 번호: 15027617 v06	2021년 1월	MCS v4.0 및 Local Run Manager v3.0 업그레이드를 지원하기 위해 업데이트. Windows 10 시스템 업그레이드를 지원하기 위해 업데이트. UI 변경 사항을 반영하기 위해 이미지 및 문구 업데이트. 메인터넌스 워시 정보 업데이트. 더 이상 호환되지 않는 BaseSpace Onsite 정보 삭제. 더 이상 호환되지 않는 Illumina Experiment Manager에 대한 내용 삭제. 더 이상 지원되지 않는 MiSeq Reagent Kits v1에 대한 내용 삭제.
자료 번호: 20000262 문서 번호: 15027617 v05	2019년 6월	인덱스 사이클 정보 업데이트. 자료 번호 수정.
자료 번호: 20000262 문서 번호: 15027617 v04	2018년 7월	Local Run Manager, Sample Sheet 및 Manual 시퀀싱 모드에 대한 새로운 런 구성 옵션 추가. MiSeq Reporter 관련 내용을 Local Run Manager로 교체. '문제 해결' 부록에 Reagent Chiller의 온도 오류 해결 방법 추가.
자료 번호: 20000262 문서 번호: 15027617 v03	2018년 5월	OS 로그인에 필요한 기본 사용자 이름과 비밀번호 삭제. 사이트별 로그인 정보를 사용할 것을 권장. '시스템 맞춤 설정하기' 섹션에 Illumina Proactive 모니터링 서비스에 대한 정보 추가. 요구되는 Reagent Chiller의 온도 범위에 대한 메모를 '시약 장착부' 섹션에 추가. MiSeq Reporter를 다시 추가하고 Local Run Manager 관련 내용 삭제. 문서의 제목을 'MiSeq 시퀀싱 시스템 가이드'에서 'MiSeq 시스템 가이드'로 변경. 부분적인 문구 수정.
자료 번호: 20000262 문서 번호: 15027617 v02	2018년 1월	Local Run Manager, Sample Sheet 및 Manual 시퀀싱 모드에 대한 새로운 런 구성 옵션 추가. MiSeq Reporter 관련 내용을 Local Run Manager로 교체. '문제 해결' 부록에 Reagent Chiller의 온도 오류 해결 방법 추가. '시스템 맞춤 설정하기' 섹션에 새로운 기기 성능 데이터 수집 지침 추가. 문서의 제목을 'MiSeq 시스템 가이드'에서 'MiSeq 시퀀싱 시스템 가이드'로 변경.

문서 번호	일자	개정 내용
<p>자료 번호: 20000262 문서 번호: 15027617 v01</p>	<p>2015년 9월</p>	<p>문서의 제목을 'MiSeq 시퀀싱 시스템 가이드'에서 'MiSeq 시스템 가이드'로 변경. MCS v2.6에 새롭게 BaseSpace Onsite 정보 추가. 화면이 아닌 수행 작업 중심으로 가이드 정보 재정렬. Welcome 화면에 관한 모든 내용을 Home 화면 관련 내용으로 변경. 플로우 셀의 종류, 시약 카트리리지 내용물, 시약 카트리리지 해당 지침 등 MiSeq Reagent Kit Reagent Prep Guides에 기술되어 있는 내용 추가. 그 밖의 MiSeq Reagent Kit 관련 정보는 Illumina 웹사이트(support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.html) 참조. 메인터넌스 워시의 예상 워시 볼륨을 17.25 ml에서 51.75 ml로 수정. 시약 카트리리지를 먼저 준비한 후 필요할 경우 라이브리리를 변경 및 희석하도록 워크플로우의 수행 순서 변경. 문제 해결 관련 내용을 '부록 A'로 이동. 결과 폴더 및 플로우 셀 타일에 관한 정보를 '부록 B'로 이동. 파일 관리에 관한 내용을 '유지 관리' 장으로 이동. 포스트런 워시 지침을 '유지보수' 장에서 '시퀀싱' 장으로 이동. '런 실행하기' 장을 '시퀀싱' 장으로 변경. 1차 분석을 RTA 소프트웨어를 통한 분석으로 변경. 템플릿 라인 워시를 포함하는 포스트런 워시 절차 중 희석 지침의 6% NaOCl을 5% NaOCl로 변경. 별도 구매 소모품 목록에 5% NaOCl의 파트 번호 추가.</p>
<p>파트 번호: 15027617 Rev. O</p>	<p>2014년 9월</p>	<p>업데이트 사항</p> <ul style="list-style-type: none"> ● MCS v2.5에 새롭게 포스트런 워시 옵션에 템플릿 라인 워시가 포함되도록 업데이트. ● 차아염소산 나트륨(NaOCl)을 사용한 포스트런 워시 지침을 템플릿 라인 워시로 변경. ● 포스트런 워시의 예상 워시 볼륨 추가. <p>추가 리소스, 런 옵션, 2차 분석 옵션, 기기 워시 및 플로우 셀 캡의 색과 관련된 VeriSeq PGS 워크플로우 정보 추가.</p>
<p>파트 번호: 15027617 Rev. N</p>	<p>2014년 6월</p>	<p>VeriSeq PGS 워크플로우 관련 정보 추가. 클러스터 생성 및 밀도에 대한 런 매트릭스 업데이트. 안티바이러스 소프트웨어 정보 삭제. <i>MiSeq 시스템 현장 준비 가이드</i> 참조.</p>

문서 번호	일자	개정 내용
파트 번호: 15027617 Rev. M	2014년 1월	MCS v2.4부터 적용되는 변경 사항 기술. 문제 해결 파일 전송을 위한 Bundle Logs 기능 추가.
파트 번호: 15027617 Rev. L	2013년 10월	프리런 단계에 시스템 소프트웨어 재부팅 추가. 별도 구매 소모품 목록에 미세원심분리 튜브 추가. MiSeq 소프트웨어 장 삭제 후 해당 장의 내용을 여러 부분으로 나누어 문서에 기술. 커스텀 레시피 폴더 관련 내용 삭제. MiSeq Reagent Kit의 권장 클러스터 밀도 범위 관련 내용 삭제. MiSeq Reagent Kit 관련 세부 사항 삭제 후 Reagent Kit 기능의 개요 추가. 자세한 정보는 사용 중인 키트의 Reagent Preparation Guide 참조. 상표 고지에 내용 추가.
파트 번호: 15027617 Rev. K	2013년 8월	문서 형식 오류 수정.
파트 번호: 15027617 Rev. J	2013년 8월	MCS v2.3 및 MiSeq Reagent Kit v30에 대한 런 설명 추가. 업데이트 사항 <ul style="list-style-type: none"> • 호환 가능한 시약 키트 및 버전에 MiSeq Reagent Kit v3 포함. • 커스텀 레시피 폴더 설명에 v3 서브폴더 포함. • v2의 클러스터 밀도 범위 변경 및 v3의 클러스터 밀도 범위 추가. • 이미지 파일의 출력 경로 업데이트. Nano Flow Cell(D) 및 Micro Flow Cell(G)의 플로우 셀 바코드 수정. 구성품, 플로우 셀 종류 등 MiSeq Reagent Kit에 관한 정보 삭제. 자세한 내용은 <i>MiSeq Reagent Preparation Guide</i> (문서 번호: 15044983) 참조.
파트 번호: 15027617 Rev. H	2013년 3월	분석 워크플로우, manifest 파일, 샘플 시트를 소개하는 <i>MiSeq 관련 개념</i> 섹션 추가. FASTQ 파일 생성, manifest 파일 형식, 분석 워크플로우에 관한 상세 정보, 샘플 시트에 관한 상세 정보 삭제. 관련 내용은 <i>MiSeq Reporter User Guide</i> (파트 번호: 15028784) 또는 <i>MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide</i> (파트 번호: 15028392) 참조. 커스텀 프라이머 준비 지침 삭제. 자세한 내용은 <i>Using Custom Primers on the MiSeq</i> (파트 번호: 15041638) 참조.

문서 번호	일자	개정 내용
파트 번호: 15027617 Rev. G	2013년 1월	DNA 라이브러리 변성 및 희석 지침과 Illumina PhiX Control 준비 지침 삭제. <i>Preparing DNA Libraries for Sequencing on the MiSeq</i> (파트 번호: 15039740) 참조. 25 ml의 10% Tween 20을 500 ml의 실험용수 대신 475 ml의 실험용수에 추가하도록 기기 워시 지침 업데이트.
파트 번호: 15027617 Rev. F	2012년 11월	새로 추가된 사항 <ul style="list-style-type: none"> • 신제품인 MiSeq Reagent Nano Kit와 MiSeq Reagent Micro Kit의 설명 추가. • 플로우 셀 종류의 개요 추가. • Enrichment 분석 워크플로우의 설명 추가. 업데이트 사항 <ul style="list-style-type: none"> • MCS v2.1부터 새롭게 포스트런 워시 옵션 및 시퍼 상향 이동 명령을 추가하기 위해 Perform Wash 화면 업데이트. • Nano Kit 및 Micro Kit의 종속성을 포함하도록 버전 호환성 표 업데이트. • Reagent Kit 신제품을 포함하도록 버전 호환성 정보 업데이트.
파트 번호: 15027617 Rev. E	2012년 10월	업데이트 사항 <ul style="list-style-type: none"> • PhiX Control 준비 지침 변경 및 준비된 PhiX Control의 예상 클러스터 밀도를 1000~1200 K/mm²로 수정. • <i>라이브러리 준비</i>의 라이브러리 변성 및 희석 절차가 Nextera XT 라이브러리나 TruSeq Amplicon 라이브러리에는 적용되지 않음을 설명. • MiSeq Expansion Pack에서 MiSeq Hardware Upgrade로 업그레이드 명칭 변경. • <i>MiSeq Reporter User Guide</i>를 추가 리소스 목록에 추가.

문서 번호	일자	개정 내용
파트 번호: 15027617 Rev. D	2012년 7월	<p>MCS v2.0으로 소프트웨어 설명 업데이트.</p> <p>새로 추가된 사항</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 새로운 소프트웨어 기능, 인터페이스 및 워크플로우의 변경 사항을 설명하기 위해 <i>MCS의 변경 사항</i> 섹션 추가. ● MiSeq Reagent Kit v2(500 cycles)의 카탈로그 번호 및 설명 추가. ● 버전 호환성 및 요구 사항 섹션 추가. ● 이중 표면 플로우 셀(타일 14개) 이미징에 필요한 MiSeq Expansion Pack의 설명 추가. ● 이중 표면 플로우 셀 타일 번호 지정하기에 관한 설명 추가. ● Nextera XT 라이브러리용 PCR Amplicon 분석 워크플로우 추가. ● 워시 절차 및 예상 워시 볼륨에 10% Tween 20의 사용에 관한 내용 추가. ● RFID 읽기 실패 해결 절차에 시약 카트리지 버전 추가. <p>업데이트 사항</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 시약 관련 두문자어 IMF, CMF, AMX를 각각 v2 시약명인 IMS, CMS, AMS로 변경. ● PhiX의 농도를 8 pM에서 12.5 pM로 변경. ● 최종 용액의 최대 권장 NaOH 농도를 1 nM로 변경. ● Standby Mode 종료 후 다음 런의 설정 단계를 시작하기 위해 기기의 메인テナンス 워시가 필요함을 설명. ● Sample Sheet Parameters 섹션과 워크플로우의 샘플 시트 설정 단계 삭제. 샘플 준비 전 샘플 시트를 생성할 것을 권장. <i>MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide</i>(파트 번호: 15028392) 및 <i>Illumina Experiment Manager User Guide</i>(파트 번호: 15031335) 참조.

문서 번호	일자	개정 내용
파트 번호: 15027617 Rev. C	2012년 4월	<p>MCS v1.2로 소프트웨어 설명 업데이트. 다음과 같은 신규 절차 및 섹션 추가. BaseSpace의 개요, 커스텀 프라이머 사용하기, FASTQ 파일 생성하기, 유량 오류 해결하기, 볼륨 테스트 수행하기, 메인テナンス 워시 수행하기, 기기 Idle Mode로 전환하기(스탠바이 워시 포함)</p> <p>업데이트 사항</p> <ul style="list-style-type: none"> • Amplicon 워크플로우의 명칭을 Custom Amplicon으로 업데이트. De Novo Assembly 워크플로우의 명칭을 Assembly로 업데이트. Generate FASTQ 워크플로우 추가. • 각종 런 폴더와 파일에 대한 설명 추가. 런 폴더 이름 지정 지침 업데이트. 결과 파일 크기 추가. • 앰플리콘 시퀀싱에 필요한 유전체 폴더를 '샘플 시트 파라미터'에 추가. • 라이브러리 변성을 위한 NaOH 희석 지침 추가. • MiSeq Self-Service 관련 지침을 포함하도록 'RFID 읽기 실패 해결하기' 내용 업데이트. • 런 성능 문제 해결에 사용되는 파일 및 폴더 목록 추가.
파트 번호: 15027617 Rev. B	2011년 12월	<p>MCS v1.1로 소프트웨어 설명 업데이트. 안티바이러스 보호 정보 추가.</p> <p>업데이트 사항</p> <ul style="list-style-type: none"> • RFID 읽기 실패 해결 지침 업데이트. • 라이브러리 준비하기 - 0.2 N NaOH로 변경. • 런 폴더 명명 규칙 업데이트. • 필요한 디스크 공간 및 저장 용량 업데이트. • 런 설정 단계 - '샘플 시트 설정하기'에 자세한 정보 추가. • 런 설정 단계 - 남은 PR2의 폐기를 지시하는 '참고' 문구 추가. • 분석 소요 시간 - 2시간 초과 분석 시간 관련 내용 추가. • 분석 인풋 파일 요구 사항 - TruSeq Custom Amplicon 라이브러리에 필요한 manifest 파일 목록 제공. • 'MiSeq Reagent Kit의 구성품'에서 HT1 튜브 크기 수정. • iCom 관련 내용을 Myillumina로 변경.
파트 번호: 15027617 Rev. A	2011년 9월	최초 발행.

목차

제 1 장 개요	1
소개	1
추가 리소스	1
시스템 구성 요소	2
MiSeq 관련 개념.....	4
시스템 소프트웨어.....	5
2 차 분석 옵션	6
Sequencing Analysis Viewer	7
필요한 디스크 공간.....	8
MiSeq Reagent Kit 의 개요.....	8
제 2 장 시작하기	11
MiSeq 켜기	11
시스템 맞춤 설정하기	11
BaseSpace 업데이트 알림 설정하기	12
이메일 기본 설정하기	12
디폴트 폴더 위치 설정하기.....	12
소모품.....	13
제 3 장 시퀀싱	14
소개	14
런 소요 시간	14
클러스터 생성	15
시퀀싱	15
분석	15
시약 카트리지 해동하기	15
시약 카트리지 확인하기	16
라이브러리 변성 및 희석하기.....	16
샘플 라이브러리 로딩하기.....	16
MCS 를 사용해 런 설정하기.....	17
플로우 셀 청소하기.....	19
플로우 셀 로딩하기.....	20
시약 로딩하기	21
런 시작하기	23
런 모니터링하기.....	24
포스트런 워시 수행하기	26

제 4 장 유지 관리	30
유지 관리 빈도	30
VeriSeq PGS 워크플로우의 유지 관리 빈도.....	30
메인터넌스 워시 수행하기.....	31
스탠바이 워시 수행하기	33
Manage Files	35
소프트웨어 업데이트	36
기기 종료하기	36
부록 A 문제 해결	38
소개	38
문제 해결을 위한 로그 번들 생성하기.....	38
시스템 검사 수행하기	39
런 일시 중지 또는 중단하기.....	39
시약 카트리지 시퍼 수동 상향 이동하기.....	41
런 설정 오류 해결하기	41
RFID 읽기 실패 해결하기.....	41
볼륨 테스트 수행하기	42
예상 워시 볼륨 측정하기	42
Reagent Chiller 온도 오류 해결하기	43
Local Run Manager 분석 오류 해결하기	43
시스템 설정 구성하기	43
부록 B 결과 파일 및 폴더.....	44
런 폴더.....	44
MiSeqOutput 폴더의 내용.....	44
RTA 폴더 및 파일.....	46
색인.....	48
기술 지원	51

제1장 개요

소개	1
추가 리소스	1
시스템 구성 요소	2
MiSeq 관련 개념	4
시스템 소프트웨어	5
2차 분석 옵션	6
Sequencing Analysis Viewer	7
필요한 디스크 공간	8
MiSeq Reagent Kit의 개요	8

소개

Illumina® MiSeq™ 시스템에는 입증된 sequencing by synthesis(SBS) 기술과 짧게는 8시간 안에 DNA 샘플 처리부터 분석 데이터 제공까지 완료 가능한 혁신적인 워크플로우가 결합되어 있습니다. MiSeq은 하나의 기기에 클러스터 생성, 시퀀싱 및 데이터 분석 기능을 통합한 시스템입니다.

기능

- ▶ **전자동화** — 시약 카트리리지, 완충용액 및 플로우 셀의 로딩을 포함한 런(run) 설정 과정 완료 후 추가 작업 불필요.
- ▶ **시약 카트리리지** — 특별히 고안된 프리필드 시약 카트리리지. 페어드 엔드(paired-end) 시퀀싱 시약, 인덱싱 시약 등 클러스터 생성 및 시퀀싱용 시약으로 공급. 통합된 RFID(radio-frequency identification, 무선 주파수 식별) 모듈을 통한 정확한 소모품 추적 가능.
- ▶ **인터페이스 컨트롤** — MiSeq Control Software(MCS) 인터페이스는 기기 설정, 런 설정 및 모니터링, 유지 관리 절차 수행을 위한 컨트롤 옵션 제공.
- ▶ **편리한 플로우 셀 로딩** — 기기에 플로우 셀 로딩 시 클램핑 메커니즘(clamping mechanism)을 통해 자동으로 플로우 셀의 위치 지정. 통합된 모듈을 통한 정확한 소모품 추적 가능.
- ▶ **혁신적인 유체(fluidics) 아키텍처** — MiSeq 유체 시스템은 시퀀싱 중 chemistry cycle time(사이클 시간) 측면에서 탁월한 효율성 제공.
- ▶ **Real-Time Analysis(RTA)** — 시퀀싱 런 중 실시간으로 이미지 분석과 베이스 콜링(base calling)을 비롯한 온보드 데이터 분석 실시 및 후속 분석(downstream analysis)에 소요되는 시간을 절약해 줄 수 있는 통합형 분석 소프트웨어.
- ▶ **Local Run Manager** — 각 샘플에 대한 정렬(alignment)을 위한 RTA 분석 데이터 처리 및 각 분석 샘플에 대한 정보를 제공하는 통합형 2차 분석 소프트웨어.

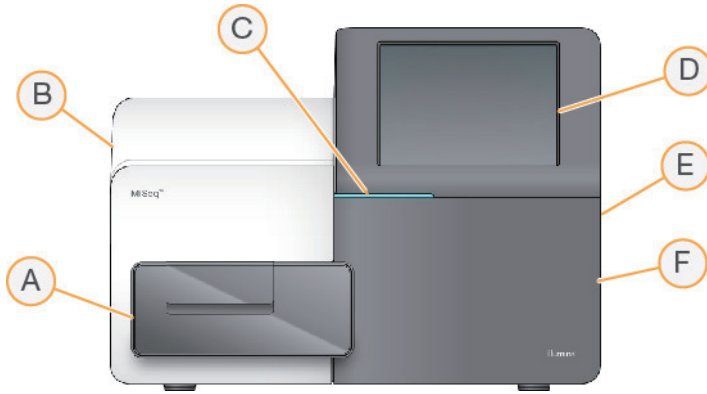
추가 리소스

Illumina 웹사이트의 [MiSeq System Support 페이지](#)에서 해당 시스템을 위해 추가로 제공되는 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
<i>Customer Protocol Selector</i>	사용자의 라이브러리 준비 방식, 런(run) 파라미터와 분석 방법에 맞춤형 엔드 투 엔드 지침 생성 및 정밀도 개선 옵션을 제공.
<i>MiSeq 시스템 현장 준비 가이드(문서 번호: 15027615)</i>	검사실 공간 요구 사항, 전기 요구 사항 및 환경 고려 사항 제공.
<i>MiSeq 시스템 안전 및 규정 준수 가이드(문서 번호: 15027616)</i>	작동 안전 고려 사항, 규정 준수 성명, 기기 라벨에 관한 정보를 제공.
<i>MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide(문서 번호: 15028392)</i>	샘플 시트에 샘플 시트 설정을 추가하는 방법 제공.
<i>MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide(문서 번호: 15039740)</i>	MiSeq으로 시퀀싱 전 수행하는 준비된 샘플 라이브러리의 변성 및 희석 절차와 PhiX Control 준비 지침 제공. 해당 단계는 대부분의 라이브러리 제품에 적용 가능.
<i>MiSeq Custom Primers Guide(문서 번호: 15041638)</i>	커스텀 프라이머의 준비 및 로딩 지침과 커스텀 프라이머용 샘플 시트 편집 방법 제공.
<i>Local Run Manager v3 소프트웨어 가이드(문서 번호: 1000000111492)</i>	Local Run Manager 소프트웨어의 개요, 소프트웨어 기능 사용 지침 및 기기 컴퓨터에 분석 모듈을 설치하는 방법 제공.
<i>BaseSpace User Guide(문서 번호: 15044182)</i>	BaseSpace 사용 지침과 각 분석 워크플로우를 위해 생성된 그래프의 설명 제공.

시스템 구성 요소

MiSeq 시스템은 터치스크린 모니터, 상태 표시 바, 전원 버튼 및 USB 포트 그리고 세 개의 장착부로 구성되어 있습니다.



- A **플로우 셀 장착부** — 런 수행 중 플로우 셀을 로딩하는 플로우 셀 스테이지(flow cell stage)가 들어 있음. 플로우 셀 스테이지 모터가 플로우 셀 로딩 시 스테이지를 밀폐형 광학 모듈 밖으로 밀어내고, 런 시작 시 스테이지를 원위치로 복귀시킴.
- B **밀폐형 광학 부품 장착부** — 플로우 셀의 이미징에 사용되는 광학 부품이 들어 있음.
- C **상태 표시 바** — 플로우 셀의 상태를 시퀀싱 준비 완료(초록색), 처리 중(파란색) 또는 주의 필요(주황색)로 표시.
- D **터치스크린 모니터** — 시스템 구성 및 런 설정을 위한 Control Software 인터페이스 표시.
- E **외부 USB 포트** — 파일 및 데이터를 터치스크린 모니터에서 기기 컴퓨터로 전송 시 사용.
- F **시약 장착부** — 시약을 적절한 온도로 보관하며, 워시 용액 및 사용한 시약 병이 들어 있음. 자석 연결로 시약 장착부의 문 고정.

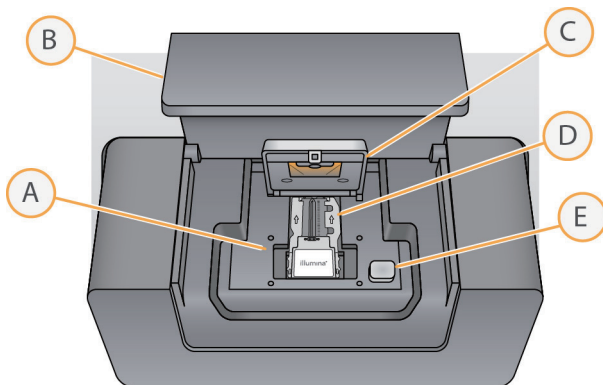
MiSeq 시스템의 인터페이스는 터치스크린 모니터를 통해 런 설정 단계별 지침을 제공합니다. 런 구성품을 로딩하려면 시약 및 플로우 셀 장착부에 접근이 가능해야 합니다.

플로우 셀 장착부

플로우 셀 장착부에는 플로우 셀 스테이지, 온도 스테이션(thermal station) 및 플로우 셀과 연결되는 유체 연결부가 들어 있습니다. 플로우 셀 스테이지가 플로우 셀을 위치시키고, 플로우 셀 클램프가 플로우 셀을 해당 위치에 단단히 고정합니다. 플로우 셀 클램프가 닫히면 클램프 힌지 근처의 핀 두 개가 자동으로 플로우 셀의 위치를 고정해 줍니다.

플로우 셀 스테이지 아래에 있는 온도 스테이션은 클러스터 생성 및 시퀀싱에 필요한 플로우 셀의 온도 변화를 제어합니다.

그림 1 플로우 셀 장착부



- A **플로우 셀 스테이지**

- B 플로우 셀 장착부의 문
- C 플로우 셀 클램프
- D 플로우 셀
- E 플로우 셀 클램프 해제 버튼

시약 장착부

시약 장착부에는 Reagent Chiller, PR2(워시 버퍼) 병 및 폐기물 수거 용기가 들어 있습니다. 일정한 온도를 유지하기 위해 Reagent Chiller는 지침이 있을 때만 열고 닫습니다.



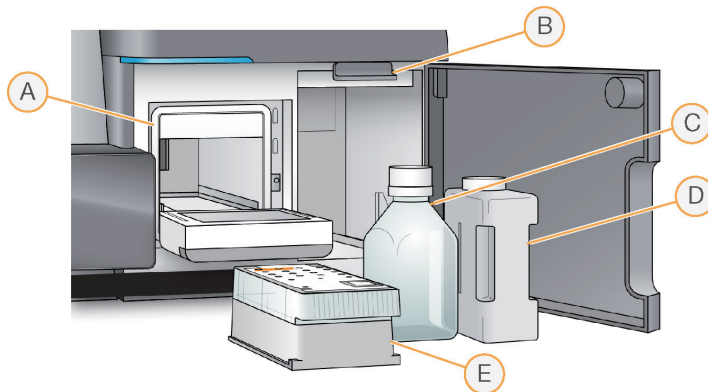
참고

Reagent Chiller의 적정 온도 범위는 2~11°C입니다.

런 수행 중에는 Reagent Chiller 안에 일회용 시약 카트리지가 들어 있습니다. 기기 워시 중에는 Reagent Chiller 안에 워시 트레이(wash tray)가 있습니다. 소프트웨어는 런 수행 중에 프로세스에 따라 적절한 시점에 자동으로 시퍼(sipper)를 각 시약 카트리지 저장소로 내려줍니다.

Reagent Chiller의 우측에는 PR2 병과 폐기물 수거 용기를 위한 슬롯이 마련되어 있습니다. 시퍼 핸들은 PR2 병과 폐기물 수거 용기를 제자리에 고정해 주고 각 용기에 적합한 시퍼를 내려 줍니다. 시약은 시퍼와 유체 라인을 통해 플로우 셀로 전달됩니다. 폐시약은 프로세스가 진행되는 동안 폐기물 수거 용기로 보내집니다.

그림 2 시약 장착부 구성 요소



- A Reagent Chiller
- B 시퍼 핸들(올라가 있을 때의 모습)
- C PR2 병
- D 폐기물 수거 용기
- E 시약 카트리지

MiSeq 관련 개념

다음은 MiSeq의 런 설정 단계에 공통적으로 적용되는 개념과 용어를 정리한 것입니다.

개념	설명
Analysis Workflow	2차 분석 절차는 Local Run Manager가 실행합니다. 런별 분석 워크플로우는 샘플 시트나 선택한 모듈에 명시되어 있습니다.

개념	설명
Manifest	Manifest 파일에는 참조 유전체 및 정렬 단계에서 사용할 표적 참조 영역이 명시되어 있습니다. 워크플로우에 manifest가 필요한 경우 manifest 파일이 샘플 시트에 명시되며 파일의 복사본이 MCS에 지정된 Manifest 폴더에 생성됩니다. Manifest 파일을 2차 분석 중에 사용하기 위해 Local Run Manager로 불러오는 것도 가능합니다.
Reference Genome	참조 유전체 파일은 분석 중에 사용되는 유전체 시퀀스가 포함되어 있는 FASTA 형식의 파일입니다. 대부분의 분석 워크플로우에서 참조 유전체 파일은 샘플 시트에 명시되어 있습니다.
Run Folder	런 폴더란 RTA 소프트웨어를 통해 구성된 폴더(MiSeqOutput 폴더) 또는 Local Run Manager를 통해 구성된 폴더(MiSeqAnalysis 폴더)를 지칭합니다. 자세한 내용은 44페이지의 런 폴더 를 참조하시기 바랍니다.
Sample Sheet	샘플 시트 파일이란 샘플 및 인덱스 시퀀스의 목록과 같이 시퀀싱 런의 설정과 분석에 사용되는 정보가 들어 있는 쉼표로 구분된 값 파일(*.csv)을 지칭합니다. 샘플 시트는 MiSeq의 런 설정 단계에 제공될 수 있습니다. 런이 시작되면 샘플 시트의 파일명이 SampleSheet.csv로 변경되고 복사본이 MiSeqTemp, MiSeqOutput 및 MiSeqAnalysis 런 폴더에 생성됩니다.

분석 워크플로우 및 manifest 파일 형식에 대한 자세한 내용은 *Local Run Manager v3 소프트웨어 가이드(문서 번호: 1000000111492)*를 참조하시기 바랍니다.

샘플 시트에 대한 자세한 내용은 *MiSeq Sample Sheet Quick Reference Guide(문서 번호: 15028392)*를 참조하시기 바랍니다.

시스템 소프트웨어

MiSeq의 Software Suite는 시퀀싱 런, 온보드 분석 및 관련 기능을 수행하는 통합된 애플리케이션을 제공합니다.

- ▶ **MiSeq Control Software(MCS)** — MCS는 기기의 작동을 제어합니다. MCS의 인터페이스는 런 시작 전 사용자에게 플로우 셀과 시약의 로딩 단계를 안내합니다. 런 진행 상황에 따른 개략적인 품질 통계 데이터가 화면에 제공됩니다.
- ▶ MCS는 런 수행 중 플로우 셀 스테이지를 작동하고, 시약을 배분하며, 플로우 셀의 온도를 제어하고, 플로우 셀의 클러스터 이미지를 캡처합니다. MCS는 Local Run Manager 소프트웨어에 명시되어 있는 파라미터에 따라 런을 수행합니다.
- ▶ **Real-Time Analysis(RTA) 소프트웨어** — RTA는 이미지 분석 및 베이스 콜링을 수행하며 사이클별로 각 베이스에 품질 점수(quality score)를 할당합니다. 이미지는 RTA로 처리하기 위해 런 폴더에 임시 저장되었다가 RTA 분석이 완료되면 자동으로 삭제됩니다.
- ▶ **Local Run Manager** — Local Run Manager는 런을 생성하고, 상태를 모니터링하며, 시퀀싱 데이터를 분석하고, 결과를 확인하는 데에 사용되는 기기에 탑재되어 있는 통합형 솔루션입니다. Local Run Manager는 샘플의 정보를 추적하고 사용자 권한도 제어합니다. 소프트웨어는 기기 컴퓨터에서 Windows 서비스로 실행되며 웹 브라우저를 통해 확인됩니다. 자세한 내용은 [7페이지의 Local Run Manager 소프트웨어](#)를 참조하시기 바랍니다.




Off-instrument로 사용 가능한 소프트웨어(선택 사항)로는 Sequencing Analysis Viewer(SAV)가 있습니다. 자세한 내용은 [7페이지의 Sequencing Analysis Viewer](#)를 참조하시기 바랍니다.

상태 아이콘

Control Software의 인터페이스에 표시되는 상태 아이콘은 런 설정 또는 런 수행 단계 중 발생하는 컨디션의 변화를 알려줍니다. 아이콘의 숫자 배치는 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.

창의 상단 여백에 있는 아이콘을 선택하여 상태 창에 표시되는 메시지의 유형을 필터링할 수 있습니다. 아이콘을 선택하면 토글을 통해 해당 컨디션을 표시하거나 숨길 수 있습니다.

상태 아이콘	상태명	설명
	상태 OK	변경 사항 없음. 시스템 상태 정상.
	경고	경고가 발생해도 런은 중단되지 않으나, 일부 경고는 발생 시 런을 계속 진행하려면 사용자가 조치를 취해야 함.
	오류	일반적으로 오류 발생 시 런은 중단되며 런을 계속 진행하려면 사용자가 조치를 취해야 함.

센서 표시

각 인터페이스 화면의 하단에 제공되는 센서 표시는 기기 구성 요소의 상태를 나타냅니다.

그림 3 센서 표시



왼쪽부터 순서대로 다음과 같은 구성 요소를 상징합니다.

- ▶ Reagent Chiller의 온도(°C)
- ▶ 플로우 셀의 온도(°C)
- ▶ BaseSpace®의 연결 상태(BaseSpace 상태 표시에 대한 자세한 정보는 6페이지의 *BaseSpace의 개요* 참조)

2차 분석 옵션

MiSeq 시퀀싱 데이터는 Local Run Manager를 사용해 기기 컴퓨터로 분석하거나, BaseSpace를 사용해 클라우드에서 분석할 수 있습니다. 이러한 애플리케이션은 여러 개의 샘플이 사용되는 런에서 샘플별로 각 유전체에 대한 정렬, 변이 및 콘티그(contig, 조립된 염기서열 조각) 조합과 관련된 정보를 생성합니다.

BaseSpace의 개요

BaseSpace®는 Illumina의 클라우드 컴퓨팅 환경입니다.

시퀀싱 런을 설정할 때는 BaseSpace에 로그인해야 합니다. BaseSpace 사용 시 로컬에 런 데이터를 저장하는 추가 옵션이 제공됩니다. 자세한 내용은 11페이지의 *시스템 맞춤 설정하기*를 참조하시기 바랍니다.

사용자가 시퀀싱 런을 시작하면 MiSeq이 BaseSpace에 연결되었고 데이터 파일이 명시된 위치로 전송되고 있음을 알려주기 위해 아래와 같이 아이콘이 변경됩니다.

BaseSpace를 사용하면 데이터 파일이 전송 중에 암호화되었다가 분석 중에 해독되며, 저장 시 다시 암호화됩니다.

BaseSpace는 런 종료 시점이나 모든 RTA 분석 파일의 전송이 완료되는 즉시 MiSeq과의 연결을 자동으로 해제합니다. 인터넷이 끊어졌다 다시 연결될 경우, 인터넷 연결이 끊어졌던 시점에 이어 분석 파일의 업로드가 재개됩니다.

마지막 베이스 콜 파일이 BaseSpace에 업로드되면 곧바로 2차 데이터 분석이 시작됩니다. BaseSpace에는 Local Run Manager를 사용한 온보드 분석과 마찬가지로 동일한 분석 워크플로우가 지원됩니다.

basespace.illumina.com에서 BaseSpace에 연결할 수 있습니다. MyIllumina 계정으로 로그인하면 됩니다. BaseSpace에 대한 자세한 내용은 *BaseSpace User Guide*(문서 번호: 15044182) 및 Illumina 웹사이트에서 BaseSpace의 Support 페이지를 참조하시기 바랍니다.

Local Run Manager 소프트웨어

Local Run Manager 소프트웨어는 런 생성, 상태 모니터링, 데이터 분석 및 결과 확인을 위해 기기에 내장되어 있는 통합형 솔루션입니다. MCS와 통합되는 소프트웨어로, 첫 분석 과정 중에 생성된 베이스 콜을 처리합니다. Local Run Manager는 시퀀싱 런이 완료되면 자동으로 2차 분석을 수행합니다.

Local Run Manager는 라이브러리 준비 과정 중에 샘플 정보를 기록하는 데에 사용되며 프로세스 전반에 걸쳐 포지티브 샘플(positive sample)을 추적할 수 있도록 해 주어 샘플별 정보를 제공합니다.

또한 Local Run Manager는 활성화된 상태에서 사용자 인증도 제어할 수 있어, 사용자에게 다양한 수준의 접근 권한을 부여합니다. 접근 권한은 MiSeq이 참조하는 데이터베이스 파일에 저장됩니다. Local Run Manager는 시퀀싱 런도 모니터링할 수 있습니다. 자세한 내용은 *Local Run Manager v3 소프트웨어 가이드*(문서 번호: 1000000111492)를 참조하시기 바랍니다.

분석 중 새로운 시퀀싱 런의 수행

MiSeq 시스템의 컴퓨팅 리소스는 시퀀싱과 분석 중 한 가지 작업에만 사용 가능합니다.

Local Run Manager를 사용하면 이전 시퀀싱 런의 2차 분석이 완료되기 전에 MiSeq에서 새로운 시퀀싱 런을 시작했을 때 확인 대화 상자가 나타납니다. 대화 상자에서 새로운 시퀀싱 런의 시작을 확인하면, 새로운 런의 시퀀싱이 완료될 때까지 이전 런의 2차 분석이 중지됩니다.

새로운 런의 시퀀싱이 완료되면 자동으로 이전 런의 2차 분석이 처음부터 다시 시작됩니다.

Sequencing Analysis Viewer

Illumina의 Sequencing Analysis Viewer(SAV)를 사용하면 진행 중인 런을 방해하지 않고 해당 런을 더 자세히 모니터링할 수 있습니다. SAV로 1차 분석 결과를 확인하려면 MiSeq이 반드시 네트워크에 연결되어 있어야 합니다.

SAV는 런 완료 후 그리고 런 수행 중 매트릭스(metrics)가 생성되는 대로 매트릭스를 확인할 수 있도록 해 줍니다. SAV를 MiSeq으로부터 독립된 별개의 컴퓨터에 설치합니다. 이때 SAV는 기기에 연결된 네트워크와 동일한 네트워크에 액세스가 가능해야 합니다. 소프트웨어를 실행한 후 해당 런의 결과 폴더(Output folder)를 찾습니다.

템플릿(template)이 생성되면 SAV는 RTA가 생성한 매트릭스를 제공하고 매트릭스를 플롯, 그래프, 테이블로 표시합니다.



참고

SAV는 Illumina의 시퀀싱 시스템(대부분 레인이 여덟 개인 플로우 셀 사용)에 범용적으로 적용 가능합니다. 일부 보기 옵션은 1~8번 레인을 포함한 드롭다운 목록을 표시합니다. MiSeq 플로우 셀의 경우 레인이 한 개이므로 **All** 또는 **Lane 1**을 선택합니다. 자세한 내용은 *Sequencing Analysis Viewer User Guide*(문서 번호: 15020619)를 참조하시기 바랍니다.

필요한 디스크 공간

통합형 기기 내장 컴퓨터의 저장 용량은 약 550 GB입니다.

소프트웨어가 런 시작 전 사용 가능한 디스크 공간을 확인합니다. 런 수행에 필요한 디스크 공간이 부족하면 필요한 디스크 공간을 알려주는 메시지가 표시됩니다.

디스크 공간을 확보하라는 메시지가 나타나면 이전에 수행한 런의 폴더를 적절히 이동하거나 삭제합니다. 자세한 내용은 35페이지의 *Manage Files*를 참조하시기 바랍니다. 적절한 디스크 공간을 확보한 후 **Restart Check**를 선택합니다.

MiSeq Reagent Kit의 개요

MiSeq Reagent Kit는 1회의 시퀀싱 런 수행 시 사용하는 일회용 시약 키트입니다. 다양한 종류와 크기의 MiSeq Reagent Kit가 마련되어 있습니다. MiSeq Reagent Kit마다 키트 전용 플로우 셀과 런 수행에 필요한 모든 시약이 포함되어 있습니다.

키트에 포함된 플로우 셀, PR2 병 및 시약 카트리지는 정확한 소모품의 추적 및 호환을 위해 무선주파수 식별(RFID)을 사용합니다.

항상 사용 중인 플로우 셀과 호환이 되는 시약 카트리지를 사용하도록 합니다. 호환되지 않는 시약 카트리지를 사용할 경우 런 설정 단계에서 호환 가능한 시약 카트리지를 로딩하라는 메시지가 나타납니다.

사용 가능한 시약 키트에 대한 설명은 Illumina 웹사이트의 [MiSeq Reagent Kits의 Product 페이지](#)에서 확인하실 수 있습니다.

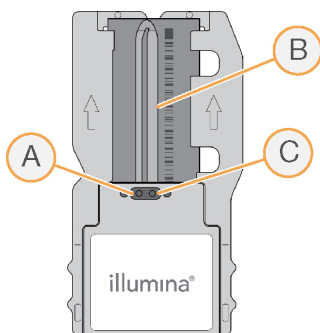
플로우 셀

MiSeq 플로우 셀은 클러스터가 생성되고 시퀀싱 반응이 일어나는 일회용 유리 기반 기판입니다.

시약은 주입구 포트를 통해 플로우 셀로 주입된 후 단일 레인의 이미징 영역을 통과한 다음 배출구 포트를 통해 플로우 셀에서 배출됩니다. 플로우 셀에서 배출되는 폐기물은 폐기물 수거 용기로 전달됩니다.

라이브러리는 런 설정 단계 전 시약 카트리지에 로딩되며 런이 시작되면 자동으로 플로우 셀로 보내집니다.

그림 4 MiSeq 플로우 셀



- A 배출구 포트
- B 이미징 영역
- C 주입구 포트

플로우 셀 캡의 색

플로우 셀의 종류는 플로우 셀 컨테이너 캡의 색으로 구분할 수 있습니다.

플로우 셀	플로우 셀 캡의 색
Standard Flow Cell PGS Flow Cell	투명
Micro Flow Cell	초록색
Nano Flow Cell	노란색

시약 카트리지의 개요

MiSeq Reagent Cartridge는 플로우 셀 한 개의 시퀀싱에 충분한 클러스터링 및 시퀀싱용 시약이 들어 있는 일회용 구성품으로 포일로 밀봉이 되어 있습니다.

카트리지의 저장소마다 번호가 할당되어 있습니다. 샘플 라이브러리는 **Load Samples**라고 표기된 17번 포지션의 카트리지에 로딩됩니다.



경고

해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있습니다. 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.

지정된 저장소

그림 5 시약 카트리지와 번호가 할당된 저장소

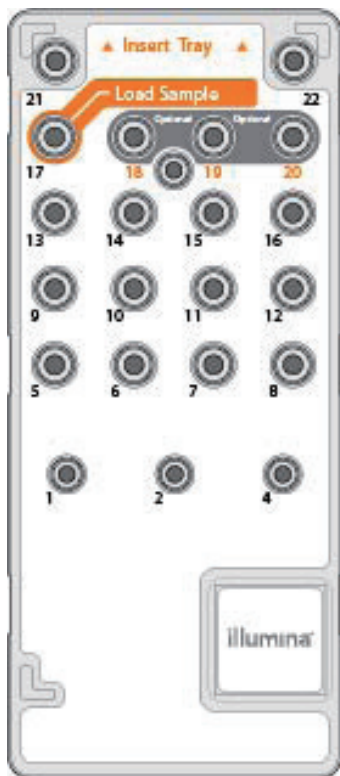


표 1 시약 카트리지 저장소

포지션	시약명	설명
8	LDR	Denaturation 시약(포름아마이드 함유)
17	Reserved	Load Sample (샘플 라이브러리 전용)
18	Reserved	커스텀 Read 1 프라이머 전용 [선택 사항]
19	Reserved	커스텀 Index Read 프라이머 전용 [선택 사항]
20	Reserved	커스텀 Read 2 프라이머 전용 [선택 사항]



참고

MiSeq Reagent Cartridge에 커스텀 프라이머를 적용하는 방법은 *MiSeq Custom Primers Guide*(문서 번호: 15041638)를 참조하시기 바랍니다.

제2장 시작하기

- MiSeq 켜기 11
- 시스템 맞춤 설정하기 11
- BaseSpace 업데이트 알림 설정하기 12
- 이메일 기본 설정하기 12
- 디폴트 폴더 위치 설정하기 12
- 소모품 13

MiSeq 켜기

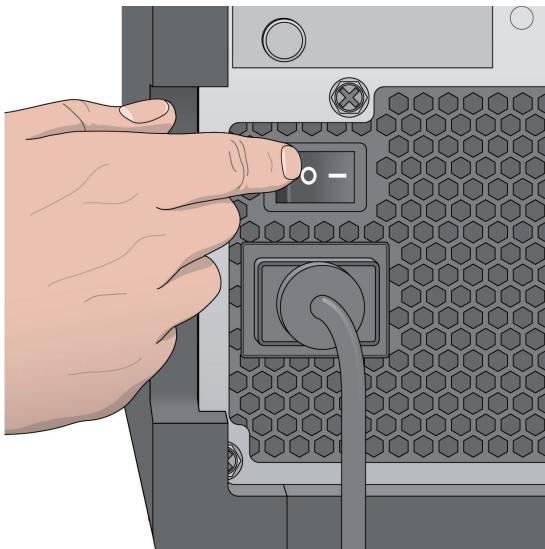
- 1 기기 뒷면에 있는 전원 토글 스위치를 [(켜짐) 위치로 설정합니다.



참고

기기는 최상의 성능을 위해 계속 켜두는 것이 좋지만, 기기를 반드시 꺼야 하는 경우 36페이지의 **기기 종료하기**를 참조하시기 바랍니다. **최소** 60초 동안 대기한 후 전원 스위치를 다시 켜짐 위치로 설정하도록 합니다.

그림 6 전원 스위치의 위치



- 2 시스템 로딩이 완료될 때까지 기다린 후 OS에 로그인합니다. 필요한 경우 해당 시설의 관리자에게 사용자 이름과 비밀번호를 요청하시기 바랍니다.
OS가 로딩되면 MiSeq Control Software(MCS)가 자동으로 실행되고 시스템을 초기화합니다.
- 3 Local Run Manager의 경우 User Management가 활성화되어 있다면 Local Run Manager용 사용자 이름과 비밀번호로 로그인한 후 **Next**를 선택합니다.

시스템 맞춤 설정하기

- 1 Main Menu에서 **System Settings**를 선택합니다.
- 2 **Run** 탭을 선택합니다.
- 3 **Post Run Wash** 또는 **Maintenance Wash**를 선택합니다.
런을 완료할 때마다 기기 위시를 수행합니다. 소프트웨어에서 후속 런 설정 전 위시를 수행할 것을 요구합니다. Post-Run Wash 옵션은 기본으로 수행되는 위시 옵션입니다. 포스트런 위시는 약 30분이 소요됩니다. 메인テナンス 위시는 약 90분이 소요됩니다.

- 4 **[선택 사항]** 자동으로 런을 시작하려면 **Start run after pre-run check. Do not prompt for confirmation.**을 선택합니다.
- 5 **BaseSpace** 탭을 선택합니다.
- 6 기기가 접속해야 할 BaseSpace 지역을 선택합니다. 이 설정을 통해 Illumina Proactive Support 및 모니터링 서비스로 전송된 데이터가 올바르게 저장될 수 있습니다.
- 7 Illumina Proactive 모니터링 서비스를 활성화하려면 **Send Instrument Performance Data to Illumina to aid technical support**를 선택합니다. MCS의 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 to aid technical support** 옵션을 비활성화하면 됩니다.

BaseSpace 업데이트 알림 설정하기

- 1 Main Menu에서 **Software Update**를 선택합니다.
- 2 **Automatically check for new software updates on BaseSpace**를 선택합니다.

이메일 기본 설정하기

RTA 분석 완료, 온보드 2차 분석 완료, 심각한 MiSeq 소프트웨어 오류 발생 시 MiSeq이 이메일 알림을 발송하도록 설정할 수 있습니다.

- 1 Main Menu에서 **System Settings**를 선택합니다.
- 2 **Email Notifications** 탭을 선택합니다.
- 3 다음 정보를 입력합니다.
 - ▶ **Local SMTP email server address** — 온스크린 키보드를 이용하여 로컬 SMTP 메일 서버 주소를 입력합니다. 필요시 SMTP 주소는 해당 시설의 관리자에게 문의하시기 바랍니다.
 - ▶ **Sender address** — 온스크린 키보드를 이용하여 발신자 이메일 주소를 입력합니다. 이 필드에는 사용자 본인의 이메일 주소나 이메일 알림 수신자의 이메일 주소를 입력하면 됩니다.
 - ▶ **Recipient addresses** — 온스크린 키보드를 이용하여 알림 수신자 각각의 이메일 주소를 모두 입력합니다. 이메일 주소는 쉼표로 구분합니다. 알림 수신자에게 테스트 이메일을 보내려면 **Test**를 선택합니다.
 - ▶ **Notify via email when** — 알림을 트리거하는 런 이벤트에 해당하는 체크 박스를 모두 선택합니다.

디폴트 폴더 위치 설정하기

폴더는 로컬 네트워크나 기기 컴퓨터에 저장될 수 있습니다.

- 1 Main Menu에서 **System Settings**를 선택합니다.
- 2 **Folders** 탭을 선택합니다.
- 3 다음 폴더의 기본 저장 위치를 입력합니다.

- ▶ **Output Folder** — 분석 결과 파일의 기본 저장 위치를 설정합니다. 파일을 공유하고 장기간 보관하려면 디폴트 결과 폴더의 위치를 네트워크상의 위치로 변경합니다. 자세한 내용은 [44페이지의 런 폴더](#)를 참조하시기 바랍니다.
- ▶ **Sample Sheet Folder** — 샘플 시트의 기본 저장 위치를 설정합니다. 샘플 시트는 라이브러리 준비 단계 전에 생성되며 런에 필요한 파라미터를 포함하고 있습니다.

소모품

런 시작 전 다음과 같은 소모품이 별도로 준비되어 있는지 확인합니다.

소모품	공급 업체	용도
분자생물학 실험용 Stock 1.0 N NaOH	일반 실험기자재 공급 업체	샘플 라이브러리 및 PhiX Control DNA의 변성
알코올 티슈, 이소프로필 70% 또는 에탄올 70%	VWR(카탈로그 번호: 95041-714*) 일반 실험용품 공급 업체	플로우 셀 홀더의 청소
일회용 장갑(powder-free)	일반 실험기자재 공급 업체	범용
실험용 티슈(low-lint)	VWR(카탈로그 번호: 21905-026*)	플로우 셀 스테이지 및 샘플을 로딩하는 위치를 덮고 있는 포일 씰의 클리닝
10 x 15 cm 렌즈 페이퍼	VWR(카탈로그 번호: 52846-001*)	플로우 셀의 청소
미세원심분리 튜브	일반 실험기자재 공급 업체	샘플 라이브러리 및 PhiX Control DNA의 변성 및 희석
MiSeq tubes	Illumina (파트 번호: MS-102-9999)	VeriSeq PGS 워크플로우의 사용을 위한 템플릿 라인의 워시(다른 워크플로우의 경우 선택 사항)
5% NaOCl	Sigma-Aldrich(카탈로그 번호: 239305*)	VeriSeq PGS 워크플로우의 사용을 위한 템플릿 라인의 워시(다른 워크플로우의 경우 선택 사항)
Tween 20	Sigma-Aldrich(카탈로그 번호: P7949)	기기 워시
플라스틱 팁(사각) 핀셋 (선택 사항)	McMaster-Carr(카탈로그 번호: 7003A22*)	플로우 셀의 배송 용기에서 플로우 셀을 꺼내는 용도
실험용수	일반 실험기자재 공급 업체	기기 워시

* 또는 동일 사양의 실험용 제품

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

제3장 시퀀싱

소개	14
런 소요 시간	14
클러스터 생성	15
시퀀싱	15
분석	15
시약 카트리지 해동하기	15
시약 카트리지 확인하기	16
라이브러리 변성 및 희석하기	16
샘플 라이브러리 로딩하기	16
MCS를 사용해 런 설정하기	17
플로우 셀 청소하기	19
플로우 셀 로딩하기	20
시약 로딩하기	21
런 시작하기	23
런 모니터링하기	24
포스트런 워시 수행하기	26

소개

이 장에 기술된 설정 단계에 따라 MiSeq에서 시퀀싱 런을 수행합니다.

세 가지 런 설정 옵션이 있습니다.

- ▶ Local Run Manager — Local Run Manager로 준비한 런을 선택합니다.
- ▶ Sample Sheet — 샘플 시트를 사용하여 런을 생성합니다. 샘플 시트의 유효성 검사(validation)는 Local Run Manager에서 수행됩니다.
- ▶ Manual — 리드별로 최대 10회의 사이클을 수동으로 입력하여 런을 생성합니다. 이 옵션을 선택하면 2차 분석이 수행되지 않습니다.

런이 시작되면 사용자가 따로 취할 조치는 없습니다.

시퀀싱 런의 모니터링에 다음 중 한 옵션을 선택합니다.

- ▶ BaseSpace Sequence Hub.
- ▶ 기기의 Sequencing 화면을 통한 모니터링.
- ▶ Sequencing Analysis Viewer(SAV)를 통한 원격 모니터링. 선택 사항으로, Illumina 웹사이트에서 다운로드 가능한 애플리케이션.
- ▶ Local Run Manager를 통한 원격 모니터링.

시퀀싱 런이 완료되면 기기를 세척합니다.

런 소요 시간

런 소요 시간은 수행된 사이클 횟수에 따라 다릅니다. 페어드 엔드(paired-end) 런의 경우 최대 2 x 301회의 시퀀싱 사이클을 수행할 수 있으며 MCS v2.3 이상의 버전 사용 시 런에 Index Read를 추가할 수 있습니다.

런 소요 시간은 또한 사용 중인 MiSeq 시약의 버전과 기기에 설치된 성능 향상 업그레이드에 따라 차이가 있습니다.

예상 런 소요 시간 및 기타 사양은 Illumina 웹사이트의 [Specifications for the MiSeq System](#) 페이지에서 확인하시기 바랍니다.

리드당 사이클 횟수

시퀀싱 런 수행 시 리드(read)당 사이클 횟수는 분석된 사이클 횟수에 1을 더한 수입니다. 여분의 사이클은 페이징(phasing) 및 프리페이징(prephasing) 계산에 필요합니다.

예를 들어, 300사이클 페어드 엔드 런의 경우 두 개의 리드로 301회의 사이클(즉, 2 x 301)을 수행하므로 총 사이클 횟수는 602회입니다. 런이 종료되면 2 x 300 사이클이 분석됩니다.

클러스터 생성

클러스터 생성 중 단일 DNA 분자는 플로우 셀 표면에 결합된 후 클러스터 형성을 위해 브릿지 증폭(bridge amplification)됩니다.

시퀀싱

클러스터 생성 후 LED 및 형광 표지된 4종류의 디데옥시뉴클레오티드(dideoxynucleotide, ddNTP) 각각에 특이적인 필터 조합을 사용해 클러스터의 이미징을 수행합니다. 타일 1개의 이미징이 완료되면 플로우 셀이 다음 타일을 노출할 수 있는 위치로 이동합니다. 이 프로세스는 시퀀싱 사이클마다 반복됩니다. 이미지 분석 후 소프트웨어가 베이스 콜링, 필터링 및 품질 점수 할당을 수행합니다.

분석

Local Run Manager 모드나 Sample Sheet 모드에서 런이 완료되면 정렬 및 변이 검출을 포함한 2차 분석을 위해 Local Run Manager 분석 소프트웨어가 자동으로 실행됩니다. 2차 분석은 다른 컴퓨터에서 인터넷 연결을 통해 모니터링할 수 있습니다. 자세한 내용은 17페이지의 *Local Run Manager 옵션 설정하기*를 참조하시기 바랍니다.

시약 카트리지를 해동하기

시약 카트리지를 실온의 항온 수조에서 해동합니다.



참고

또는 시약을 밤새 2~8°C의 저장고에서 해동합니다. 이 온도에서는 시약을 최대 1주일까지 안정적으로 보관할 수 있습니다.

- 1 -25~-15°C에서 보관 중이던 시약 카트리지를 꺼냅니다.
- 2 실온의 DIW가 시약 카트리지의 밑부분이 잠길 정도의 높이로 채워져 있는 수조에 시약 카트리지를 위치시킵니다. 물이 시약 카트리지에 표시된 수위 한계선을 넘지 않도록 주의합니다.

그림 7 수위 한계선



- 3 시약 카트리가 완전히 해동될 때까지 실온의 수조에 그대로 둡니다.
 - ▶ MiSeq v3 카트리지 — 약 60~90분
 - ▶ MiSeq v2 카트리지 — 약 60분
- 4 수조에서 카트리지를 꺼낸 후 작업대에 가볍게 쳐서 카트리지의 밑부분에서 물기를 빼줍니다. 카트리지의 밑부분을 닦아 말립니다.

시약 카트리지를 확인하기

- 1 시약 카트리지를 10번 앞뒤로 돌려 해동된 시약을 섞여준 다음 모든 포지션이 해동되었는지 확인합니다.
- 2 1번, 2번 및 4번 포지션의 시약이 완전히 섞였는지, 또 침전물은 없는지 확인합니다.
- 3 시약 안의 기포를 줄이기 위해 카트리지를 작업대에 가볍게 쳐 줍니다.



참고

MiSeq 시퍼 튜브는 각 저장소의 밑부분에서 시약을 빨아들이기 때문에 저장소에는 기포가 없어야 합니다.

- 4 시약 카트리지는 최대 6시간 동안 얼음 위에 두거나 런을 설정할 준비가 끝날 때까지 2~8°C에 보관합니다. 최상의 결과를 위해 곧바로 샘플을 로딩하고 런을 설정하시기 바랍니다.



경고

해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있습니다. 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.

라이브러리 변성 및 희석하기

사용 중인 종류의 라이브러리에 필요한 경우 라이브러리를 변성 및 희석한 후 PhiX Control(선택 사항)을 넣습니다. 자세한 내용은 *MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide*(문서 번호: 15039740)를 참조하시기 바랍니다. VeriSeq PGS 워크플로우 사용 시 *VeriSeq PGS Library Preparation Guide*(문서 번호: 15052877)를 참조하시기 바랍니다.

이 단계는 모든 종류의 라이브러리에 적용되지 않습니다. 일부 Illumina Sample Preparation Method로 바로 사용이 가능한 풀링된 라이브러리의 정규화된 농도를 얻을 수 있습니다. 자세한 내용은 샘플 라이브러리의 준비에 사용되는 키트를 위해 제공되는 Sample Preparation Guide를 참조하시기 바랍니다.



참고

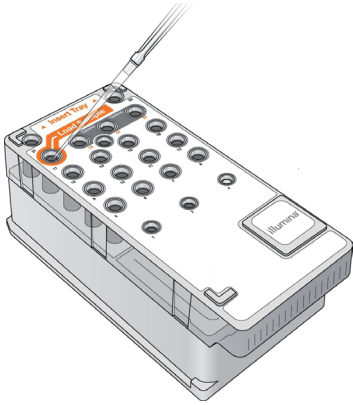
커스텀 프라이머 사용 시 *MiSeq Custom Primers Guide*(문서 번호: 15041638)의 지침에 따라 프라이머를 준비하고 샘플 시트를 설정하도록 합니다.

샘플 라이브러리 로딩하기

시약 카트리지가 완전히 해동되어 사용할 준비가 되면 준비된 라이브러리를 카트리지에 로딩합니다.

- 1 실험실 티슈(low-lint)로 **Load Samples**라고 표기된 저장소를 덮고 있는 포일 씬을 닦습니다.
- 2 깨끗한 1 ml 피펫으로 포일 씬에 구멍을 냅니다.
- 3 피펫으로 준비된 600 µl의 라이브러리를 **Load Samples** 저장소에 분주합니다. 이때 피펫이 포일 씬에 닿지 않도록 주의합니다.

그림 8 라이브러리 로딩



4 MCS 인터페이스를 통해 바로 런 설정 단계로 넘어갑니다.

MCS를 사용해 런 설정하기

- 1 시스템 소프트웨어를 재부팅하려면 Main Menu에서 **Reboot**를 선택합니다.
- 2 **[선택 사항]** Folders 탭에서 MiSeqOutput, Recipe, Sample Sheet 및 Manifest 폴더의 위치를 확인합니다. 자세한 내용은 12페이지의 [디폴트 폴더 위치 설정하기](#)를 참조하시기 바랍니다.
- 3 런 설정 단계를 시작하려면 Home 화면에서 **Sequence**를 선택합니다. Home 화면에서 **Sequence**를 선택하면 Sequence Mode Selection(Local Run Manager, Sample Sheet, Manual), BaseSpace Option, Load Flow Cell, Load Reagents, Review, Pre-Run Check 런 설정 화면이 순서대로 나타납니다.

Local Run Manager 옵션 설정하기

- 1 Home 화면에서 **Sequence**를 선택합니다.
- 2 Sequence Mode Selection 화면에서 **Local Run Manager**를 선택합니다.
- 3 **[선택 사항]** BaseSpace Options 화면에서 **Use BaseSpace™**를 선택합니다. 자세한 내용은 18페이지의 [BaseSpace 옵션 설정하기](#)를 참조하시기 바랍니다.
- 4 **Next**를 선택합니다.
- 5 수행 가능한 런 목록에서 런 이름을 선택합니다.
- 6 **[선택 사항]** 해당 분석과 관련이 있는 샘플의 목록을 확인하려면 **Preview Samples**를 선택합니다.
- 7 **Next**를 선택해 20페이지의 [플로우 셀 로딩하기](#) 단계로 넘어갑니다.



참고

플로우 셀을 로딩하기 전에 플로우 셀을 청소합니다. 자세한 내용은 19페이지의 [플로우 셀 청소하기](#)를 참조하시기 바랍니다.

Sample Sheet 옵션 설정하기

- 1 Home 화면에서 **Sequence**를 선택합니다.
- 2 Sequence Mode Selection 화면에서 **Sample Sheet**를 선택합니다.
- 3 **[선택 사항]** BaseSpace Options 화면에서 **Use BaseSpace™**를 선택합니다. 자세한 내용은 18페이지의 [BaseSpace 옵션 설정하기](#)를 참조하시기 바랍니다.

- 4 **Next**를 선택합니다.
- 5 샘플 시트 파일을 찾아 선택합니다.
선택된 파일은 유효성 검사나 런 생성을 위해 Local Run Manager로 전송됩니다.
- 6 **[선택 사항]** Local Run Manager를 통한 2차 분석을 건너뛰려면 **Disable Local Run Manager Secondary Analysis**를 선택합니다.
- 7 샘플 시트에 오류가 있다면 수정합니다.
- 8 **Next**를 선택해 20페이지의 **플로우 셀 로딩하기** 단계로 넘어갑니다.



참고

플로우 셀을 로딩하기 전에 플로우 셀을 청소합니다. 자세한 내용은 19페이지의 **플로우 셀 청소하기**를 참조하시기 바랍니다.

BaseSpace 옵션 설정하기

BaseSpace를 통한 2차 분석도 수행이 가능합니다(선택 사항).

Local Run Manager Mode나 Sample Sheet Mode를 선택했다면 원할 경우 BaseSpace를 통해 2차 분석을 수행할 수 있습니다.

- 1 **[선택 사항]** BaseSpace Options 화면에서 **Use BaseSpace™**를 선택합니다.
이 옵션을 선택하면 해당 런의 raw data가 MiSeq에 저장됩니다.
- 2 다음 중 하나를 선택합니다.
 - ▶ **Send all run data to BaseSpace Sequence Hub for remote monitoring and data analysis.**
 - ▶ **Only send run information files to BaseSpace Sequence Hub so runs can be monitored remotely.**
- 3 Myllumina 계정의 로그인 정보를 입력합니다.
- 4 **Next**를 선택합니다.

Manual 옵션 설정하기

- 1 Home 화면에서 **Sequence**를 선택합니다.
- 2 Sequence Mode Selection 화면에서 **Manual**을 선택합니다.
- 3 **[선택 사항]** **Use run monitoring only**를 선택한 후 Myllumina 계정의 로그인 정보를 입력합니다.



참고

Manual Mode에서는 BaseSpace Sequence Hub Analysis and Storage 옵션이 지원되지 않습니다.

- 4 **Next**를 선택합니다.
- 5 모든 사이클에 대한 Read Type, Read Length 및 Custom Primers 값을 설정합니다. Index Read당 최대 10회의 사이클을 입력할 수 있습니다.
- 6 **Next**를 선택해 20페이지의 **플로우 셀 로딩하기** 단계로 넘어갑니다.



참고

플로우 셀을 로딩하기 전에 플로우 셀을 청소합니다. 자세한 내용은 19페이지의 **플로우 셀 청소하기**를 참조하시기 바랍니다.

플로우 셀 청소하기

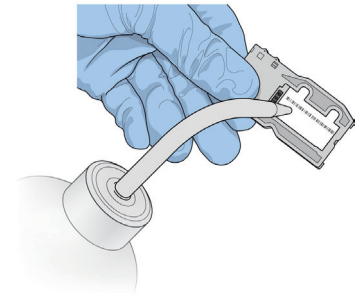
- 1 일회용 장갑(powder-free)을 양손에 끼니다.
- 2 플라스틱 포셉으로 플라스틱 카트리지 밑부분을 집어 플로우 셀을 플로우 셀 용기에서 빼냅니다.

그림 9 플로우 셀 꺼내기



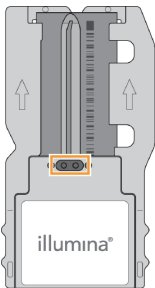
- 3 유리 및 플라스틱 카트리지에서 과도한 염분이 완전히 제거될 때까지 실험용수로 플로우 셀을 가볍게 헹굽니다. 과도한 염분은 기기에 장착된 플로우 셀에 영향을 줄 수 있습니다. 염분이 이미징 영역에 달라붙으면 이미징 성능에도 영향을 줄 수 있습니다.

그림 10 플로우 셀 헹구기



- 4 플로우 셀 포트의 검은색 개스킷에 주의하면서 보풀이 없는 렌즈 클리닝 티슈로 플로우 셀과 카트리지의 물기를 완전히 제거합니다. 개스킷과 유리가 있는 부분은 가볍게 두드려 물기를 제거해 줍니다.

그림 11 플로우 셀 포트 및 개스킷



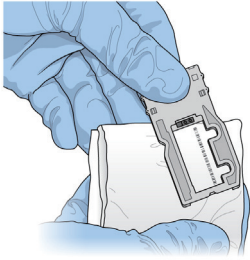
- 5 알코올 티슈로 플로우 셀 유리를 닦습니다. 유리에 얼룩, 지문, 보풀, 티슈의 섬유 등이 남아 있지 않은지 확인합니다.



참고

플로우 셀 포트의 개스킷은 알코올 티슈로 닦지 않습니다.

그림 12 플로우 셀 건조하기

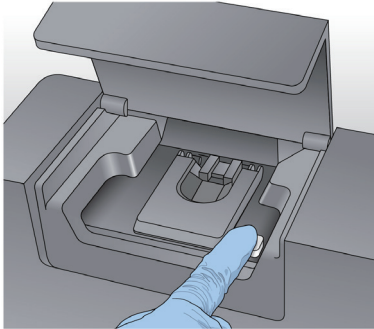


- 6 남아 있는 알코올은 보풀이 없는 렌즈 클리닝 티슈로 제거합니다.
- 7 플로우 셀 포트에 이물질이 없고 개스킷이 플로우 셀 포트에 제대로 끼워져 있는지 확인합니다. 개스킷이 빠져 있다면 플로우 셀 포트에 완전히 끼워질 때까지 살짝 눌러 줍니다.

플로우 셀 로딩하기

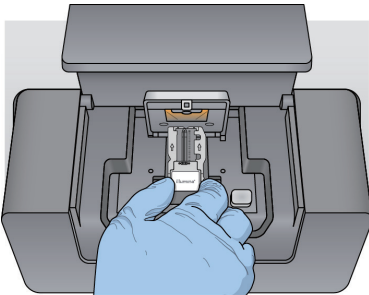
- 1 플로우 셀 장착부의 문을 위로 열고 플로우 셀 클램프 우측에 위치한 해제 버튼을 누릅니다. 플로우 셀 클램프가 열립니다.

그림 13 플로우 셀 클램프 열기



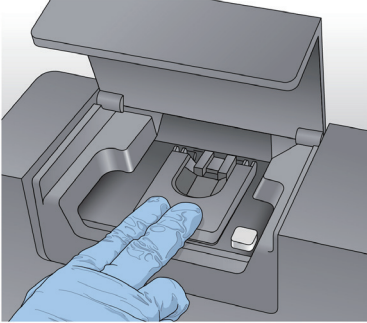
- 2 플로우 셀 스테이지에 보풀이 없는지 확인합니다. 플로우 셀 스테이지에 보풀이나 잔해물이 있다면 알코올 티슈 또는 에탄올이나 이소프로판올에 적신 보풀이 없는 티슈로 닦아 줍니다. 보풀이나 잔여물이 없이 완전히 마를 때까지 플로우 셀 스테이지의 표면을 조심스럽게 닦아 줍니다.
- 3 플로우 셀의 가장자리를 잡고 플로우 셀 스테이지 위에 올려 놓습니다.

그림 14 스테이지에 플로우 셀 올리기



- 4 플로우 셀 클램프를 가볍게 누르면 플로우 셀이 덮이면서 닫힙니다. 플로우 셀 클램프가 닫히면서 정렬 핀이 플로우 셀의 위치를 잡아 줍니다. "딸깍"하는 소리가 나면 플로우 셀 클램프가 제대로 고정된 것입니다.

그림 15 플로우 셀 클램프 닫기



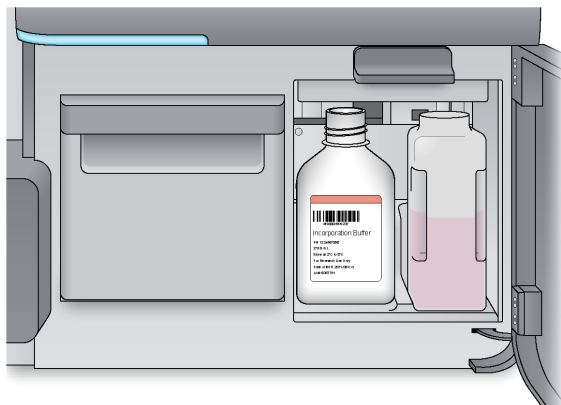
- 5 소프트웨어가 플로우 셀의 RFID를 식별하지 못할 경우 41페이지의 *RFID 읽기 실패 해결하기*를 참조하시기 바랍니다.
- 6 플로우 셀 장착부의 문을 닫습니다.
- 7 **Next**를 선택합니다.

시약 로딩하기

PR2 로딩 및 폐기물 수거 용기 확인하기

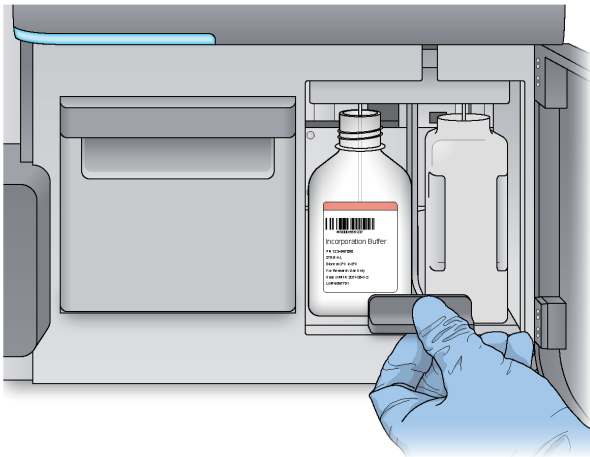
- 1 2~8°C에서 보관 중이던 PR2 병을 꺼냅니다. 병을 상하로 뒤집어 가며 내용물을 잘 섞은 다음 뚜껑을 엽니다.
- 2 시약 장착부의 문을 엽니다.
- 3 시퍼 핸들을 잡고 제자리에 고정될 때까지 올려 줍니다.
- 4 워시 용기를 꺼내고 PR2 병을 넣어 줍니다.

그림 16 PR2 병 로딩하기



- 5 폐기물 수거 용기 안의 내용물은 적절한 폐기물 전용 용기에 폐기합니다.
- 6 시퍼 핸들을 천천히 내립니다. 시퍼가 제대로 PR2 병과 폐기물 수거 용기 안으로 들어갔는지 확인합니다.

그림 17 시퍼 핸들 내리기



- 7 소프트웨어가 PR2 병의 RFID를 식별하지 못하면 41페이지의 *RFID 읽기 실패 해결하기*를 참조하시기 바랍니다.
- 8 **Next**를 선택합니다.

시약 카트리지 로딩하기

- 1 Reagent Chiller의 문을 엽니다.



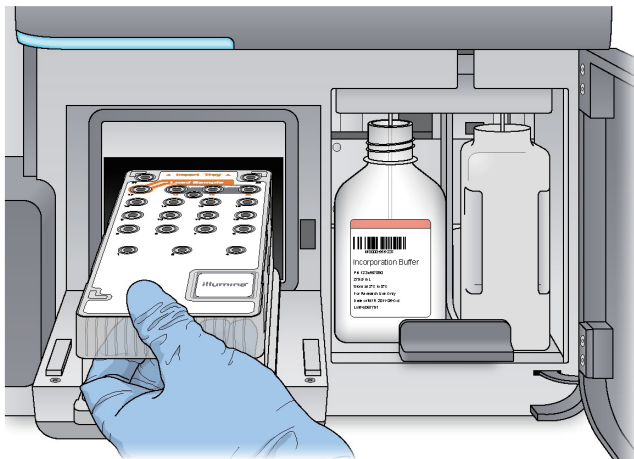
참고

Reagent Chiller의 문을 장시간 열어 두지 않도록 주의합니다.

- 2 Illumina 라벨이 있는 시약 카트리지의 끝부분을 잡고 더 이상 시약 카트리지가 들어가지 않을 때까지 Reagent Chiller에 밀어 넣습니다.

항상 로딩한 플로우 셀과 호환이 되는 시약 카트리지를 사용하도록 합니다. 시약 카트리지가 호환되지 않으면 화면에 메시지가 나타납니다. **Back**을 선택하여 적합한 시약 카트리지를 넣거나 **Home**을 선택하여 Home 화면으로 돌아갑니다.

그림 18 시약 카트리지 로딩하기



- 3 Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
- 4 소프트웨어가 시약 카트리지의 RFID를 식별하지 못할 경우 41페이지의 *RFID 읽기 실패 해결하기*를 참조하시기 바랍니다.

- 5 시약 카트리지가 플로우 셀과 호환되지 않으면 메시지가 나타납니다. **Back**을 선택하여 호환 가능한 카트리지를 로딩하거나 **Exit**를 선택하여 Home 화면으로 돌아갑니다.
- 6 시약 장착부의 문을 닫습니다.
- 7 **Next**를 선택합니다.

런 시작하기

플로우 셀과 시약을 로딩한 후 런을 시작하기에 앞서 런 파라미터를 검토하고 프리런 검사를 수행합니다.



참고

Run Settings에서 **Start run after pre-run check** 옵션을 선택했다면 런이 자동으로 시작됩니다. 자세한 내용은 11페이지의 [시스템 맞춤 설정하기](#)를 참조하시기 바랍니다.

런 파라미터 검토하기

- 1 Experiment Name, Module Name, Read Type, Read Length 및 Custom Primers 파라미터를 검토합니다. 해당 파라미터는 샘플 시트에 명시되어 있습니다.
- 2 **[선택 사항]** Local Run Manager Mode나 Manual Mode에서는 **Edit**를 선택하여 Read Type, Read Length 또는 Custom Primers 파라미터를 변경한 후 **Save**를 선택합니다.



참고

인덱스는 반드시 샘플 시트에서 변경해야 합니다. Sample Sheet Mode에서는 변경 사항을 반드시 원본 샘플 시트에 적용한 후 다시 로딩해야 합니다.

- 3 **Change Folder**를 선택하여 폴더 위치를 확인합니다.
- 4 필요하면 폴더 위치를 변경한 후 **Save and Continue**를 선택합니다.
- 5 **Next**를 선택합니다.

폴더 변경하기

폴더 위치를 변경하려면 **Change Folder**를 선택하고 원하는 위치를 찾습니다. Review 화면에서 해당 옵션을 사용하면 이후 수행하는 모든 런에 변경된 폴더 위치가 적용됩니다.

프리런 검사 검토하기

런 시작 전 시스템이 모든 런 구성 요소, 디스크 공간 및 네트워크 연결 상태를 검사합니다.

프리런 검사를 통과하지 못하는 항목이 있을 경우 화면에 메시지가 나타나고 오류 해결 방법이 제공됩니다. 자세한 내용은 41페이지의 [런 설정 오류 해결하기](#)를 참조하시기 바랍니다.

모든 항목이 프리런 검사를 통과하면 **Start Run**을 선택합니다.

런 시작 전 유의해야 할 사항



경고

MiSeq은 진동에 민감합니다. 런 시작 후 기기에 손을 대면 시퀀싱 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있습니다.

런을 일시 중지해야 하는 경우를 제외하고는 **Start Run** 선택 후 플로우 셀 장착부나 시약 장착부의 문을 열거나 기기의 모니터에 손을 대지 않도록 주의합니다. 자세한 내용은 40페이지의 **런 일시 중지하기**를 참조하시기 바랍니다.



경고

런을 시작하기 전에 MiSeq에 열려 있는 파일은 모두 닫고, 런 수행 중에는 파일을 열지 않습니다.

런 모니터링하기

런 수행 중 기기의 Sequencing 화면을 통해 런을 모니터링합니다. Sequencing 화면은 보기 전용 화면입니다.

아래와 같은 런 모니터링 옵션도 제공됩니다.

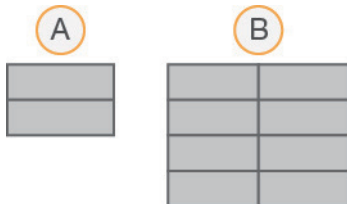
- ▶ 기기 컴퓨터로부터 독립된 별개의 컴퓨터에 설치된 Sequencing Analysis Viewer(SAV)를 통한 런 모니터링. 네트워크 연결 필요. 자세한 내용은 7페이지의 *Sequencing Analysis Viewer*를 참조하시기 바랍니다. 또는 BaseSpace에 연결되어 있는 경우 BaseSpace상에서 SAV를 통한 런 모니터링 가능.
- ▶ 기기가 동일한 네트워크에 연결되어 있는 경우 Local Run Manager를 통한 원격 런 모니터링. Local Run Manager는 런 진행 상황 및 시퀀싱 정보(예: Total Clusters, % Clusters PF, Read 1 and Read 2% >= Q30, Last Scored Cycle) 제공. 자세한 내용은 7페이지의 *Local Run Manager 소프트웨어*를 참조하시기 바랍니다.

1 기기의 Sequencing 화면에서 아래와 같이 런 진행 상황, 강도 및 품질 점수를 모니터링합니다.

- ▶ **Run Progress** — 상태 표시 바에 표시되는 런 진행 상황 및 완료된 사이클 횟수.
- ▶ **Intensity** — 각 타일에 대한 90번째 백분위수의 클러스터 강도.

Intensity 영역의 그림은 이미지가 생성 중인 타일과 표면의 수를 보여줍니다.

- ▶ 플로우 셀의 위 표면의 이미지만 생성될 경우 단일 컬럼 표시.
- ▶ 플로우 셀의 위와 아래 표면의 이미지가 생성될 경우 두 개의 컬럼 표시.



A 타일 2개, 위 표면만 표시.

B 타일 4개, 위와 아래 표면 표시.

- ▶ **Q-Score All Cycles** — 측정된 품질 점수인 Q30을 넘는 베이스의 평균 백분율. Q-score는 부정확한 베이스 콜의 발생 확률을 예측한 값을 의미. Q-score의 계산은 Cycle 25 이후 시작.

Q-Score	부정확한 베이스 콜의 발생 확률
Q40	1/10,000
Q30	1/1,000

Q-Score	부정확한 베이스 콜의 발생 확률
Q20	1/100
Q10	1/10

- ▶ **Cluster Density(K/mm²)** — 해당 런의 제품 밀리미터 당 클러스터 수.
- ▶ **Clusters Passing Filter(%)** — 품질을 측정하는 Illumina의 Chastity Filter를 기반으로 계산한 필터를 통과하는 클러스터의 백분율. 해당 데이터는 Cycle 25 이후 표시.



참고

베이스 콜의 신호 순도(chastity)는 가장 강한 한 신호의 강도를 가장 강한 두 신호의 합으로 나눈 값을 의미합니다. 첫 25회의 사이클에서 두 개 이상의 베이스 콜의 신호 순도가 0.6 미만이면 리드는 품질 필터를 통과하지 못합니다.

- ▶ **Estimated Yield(Mb)** — 메가베이스 단위로 측정된 해당 런의 예상 베이스 콜 수. 해당 데이터는 Cycle 25 이후 표시.

2 런이 완료되면 Next 버튼이 나타납니다. 다음 단계로 진행하기 전에 Sequencing 화면에서 결과를 검토합니다.



참고

Next를 선택하기 전까지는 Sequencing 화면을 계속 볼 수 있습니다. Next를 선택하면 Sequencing 화면으로 돌아갈 수 없습니다.

3 **Next**를 선택하여 시퀀싱 화면에서 나간 다음 포스트런 위시를 실행합니다.

템플릿 생성

템플릿 생성은 X와 Y 좌표 위치에 따라 전체 플로우 셀 표면에서 클러스터의 위치를 정하는 과정입니다. Real-Time Analysis(RTA)는 런의 초기 사이클을 사용해 템플릿을 생성합니다.

클러스터 위치의 템플릿이 만들어지면 이후 모든 이미징 사이클을 통해 생성되는 이미지는 해당 템플릿에 맞춰 정렬됩니다. 4개의 뉴클레오티드 색상 채널에서 개별 클러스터의 강도가 추출되며, 정규화된 클러스터 강도로부터 베이스 콜이 생성됩니다.

런 메트릭스

런 메트릭스(metrics)는 런 수행 중 여러 시점에 걸쳐 Sequencing 화면에 표시됩니다. 클러스터 생성 단계에는 메트릭스가 표시되지 않습니다.

시퀀싱이 시작되면 다음과 같은 메트릭스가 명시된 사이클에 표시됩니다.

메트릭	키트	사이클
Intensity	MiSeq Reagent Kits, v3	Cycle 1–7
	MiSeq Reagent Kits, v2	Cycle 1–4
		Cycle 1–4
Intensity and Cluster Density	MiSeq Reagent Kits, v3	Cycle 8–25
	MiSeq Reagent Kits, v2	Cycle 5–25
		Cycle 5–25
Intensity, Cluster Density, % PF, Yield, and Q-scores	MiSeq Reagent Kits, v3 MiSeq Reagent Kits, v2	Cycle 26에서 런 종료 시점까지

MiSeq의 런 사양은 Illumina 웹사이트의 Specifications for the MiSeq System 페이지(www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn)를 참조하시기 바랍니다.

RTA 분석 결과

시퀀싱 런의 RTA 분석 결과에는 미가공 이미지 파일로부터 생성되어 품질 점수(quality core)가 할당된 베이스 콜 파일(*.bcl)이 포함되어 있습니다. RTA 파일 및 폴더의 목록은 [46페이지의 RTA 폴더 및 파일](#)을 참조하시기 바랍니다.

포스트런 워시 수행하기

포스트런 워시(post-run wash)는 시퀀싱 런마다 일반적으로 수행하는 기기의 세척 작업을 의미합니다. 런이 완료되면 매번 기기 워시를 수행해야 합니다. 소프트웨어 프롬프트에 따라 워시 구성품을 기기에 넣고 워시를 진행합니다. 포스트런 워시는 약 20분이 소요됩니다.

런이 완료되면 즉시 워시를 수행하도록 합니다. 다음 런 설정을 시작하기 전에 워시를 먼저 수행해야 합니다. 런 완료 직후가 아닌 다른 시점에 포스트런 워시를 수행하려면 Perform Wash 화면에 명령어를 입력하면 됩니다.



참고

사용한 플로우 셀은 기기에 그대로 둡니다. 워시를 수행하려면 플로우 셀은 반드시 기기에 로딩되어 있는 상태여야 합니다.

정기적인 워시를 통해 다음과 같이 기기의 성능을 유지해 줄 수 있습니다.

- ▶ 유체 라인과 시퍼의 잔여 시약 제거.
- ▶ 유체 라인과 시퍼의 염분 축적과 결정화 방지.
- ▶ 이전 런으로 인한 교차 오염 방지.

MCS v2.5나 이후 버전을 사용하는 경우, 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite, NaOCl) 용액을 사용한 템플릿 라인 워시(template line wash)가 포함되어 있는 포스트런 워시 옵션을 선택할 수 있습니다. 해당 워시는 약 30분이 소요됩니다. 자세한 내용은 [27페이지의 템플릿 라인 워시 절차](#)를 참조하시기 바랍니다.



참고

VeriSeq PGS 워크플로우를 사용하고 있다면 템플릿 라인 워시가 포함된 포스트런 워시를 수행하도록 합니다. 자세한 내용은 [27페이지의 템플릿 라인 워시 절차](#)를 참조하시기 바랍니다.

소모품

- ▶ Tween 20
- ▶ 실험용수
- ▶ NaOCl(템플릿 라인 워시가 포함된 포스트런 워시에 사용)
- ▶ MiSeq Tube(파트 번호: MS-102-9999, 템플릿 라인 워시가 포함된 포스트런 워시에 사용)

절차

- 1 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 새로 만든 워시 용액으로 워시 구성품을 준비해 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.

- 3 런이 완료되면 **Start Wash**를 선택합니다.
소프트웨어가 자동으로 Reagent Chiller 내부의 시퍼를 올립니다.
Post-Run Wash 화면에서 **Perform optional template line wash**를 선택하지 **않도록 주의합니다**. 템플릿 라인
워시에는 다른 절차를 적용해야 합니다. 자세한 내용은 27페이지의 **템플릿 라인 워시 절차**를 참조하시기 바랍니다.
- 4 시약 장착부와 Reagent Chiller의 문을 열고 사용한 시약 카트리지를 Reagent Chiller에서 밀어 꺼냅니다.
- 5 워시 트레이를 Reagent Chiller에 더 이상 들어가지 않을 때까지 밀어 넣은 다음 Reagent Chiller의 문을 닫아 줍니다.
- 6 PR2 병과 폐기물 수거 용기 앞의 시퍼 핸들을 잡고 제자리에 고정될 때까지 올려 줍니다.
- 7 PR2 병을 꺼내고 워시 용기를 넣어 줍니다.



참고

각 런 완료 후 PR2 병은 폐기합니다. 남은 PR2는 재사용하지 않습니다.

- 8 폐기물 수거 용기를 꺼내고 내용물을 적절한 방법을 사용해 폐기합니다. 시약 장착부에 폐기물 수거 용기를 다시 넣어
줍니다.



경고

해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있습니다. 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.

- 9 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
 - 10 시약 장착부의 문을 닫습니다.
 - 11 **Next**를 선택합니다.
- 워시가 완료되면 사용한 플로우 셀, 워시 트레이, 남은 워시 용액이 들어 있는 워시 용기는 그대로 기기에 둡니다.



참고

시퍼는 내려간 상태로 유지되는데, 이는 정상입니다. 시퍼가 마르거나 시스템에 공기가 유입되는 것을 방지하기
위해 사용하지 않는 워시 용액은 워시 트레이와 워시 용기에 그대로 남겨 두도록 합니다.

템플릿 라인 워시 절차

- 1 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수
있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수
있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 실험용수를 사용해 NaOCl 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 864 µl의 실험용수에 36 µl의 5% NaOCl을 첨가합니다. 이 경우 1:25 NaOCl 희석액을 만들 수 있습니다.

- b MiSeq Tube(파트 번호: MS-102-9999)에 들어 있는 950 µl의 실험용수에 50 µl의 1:25 NaOCl 희석액을 넣습니다.

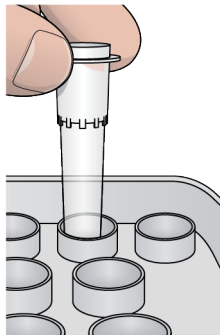


참고

정확한 농도의 NaOCl을 사용하는 것이 중요합니다. 제품 라벨에 명시된 NaOCl 퍼센트 농도를 반드시 확인하시기 바랍니다. 농도가 너무 높으면 이후 수행하는 런에서 클러스터 생성에 실패할 수 있습니다. 5% NaOCl이 없다면 실험용수로 1 ml의 0.01% NaOCl 용액을 만들어 사용합니다. NaOCl을 메인テナンス 워시 또는 스텐바이 워시로 사용하지 **않도록 주의합니다.**

- 3 새로 만든 워시 용액으로 워시 구성품을 준비해 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.
- 4 워시 트레이의 17번 포지션에 0.01% NaOCl 워시 용액이 들어 있는 MiSeq Tube를 넣습니다. 튜브의 상단만 워시 트레이 위로 보일 때까지 넣어 줍니다. 튜브가 17번 포지션에서 Tween 20과 실험용수 워시 용액을 밀어냅니다.

그림 19 워시 트레이 17번 위치의 MiSeq Tube



참고

NaOCl이 들어 있는 MiSeq Tube는 반드시 워시 트레이의 17번 포지션에 넣도록 합니다. 다른 위치에 튜브를 넣으면 이후 수행하는 런에서 클러스터 생성이 실패하거나 MiSeq 기기의 유체 시스템이 손상될 수 있습니다.

- 5 런이 완료되면 **Start Wash**를 선택합니다. 소프트웨어가 자동으로 Reagent Chiller 내부의 시퍼를 올립니다.
- 6 Post-Run Wash 화면에서 **Perform optional template line wash**를 선택합니다. VeriSeq PGS 워크플로우를 사용할 경우 **Perform optional template line wash** 옵션은 이미 선택되어 있습니다. MCS는 각 런이 완료된 후 어떠한 포스트런 워시가 수행되는지 추적합니다. 포스트런 워시 수행 시 **Perform optional template line wash** 옵션을 선택하지 않으면 다음 시퀀싱 런을 시작할 때 Run Review 화면에 표시됩니다.
- 7 시약 장착부와 Reagent Chiller의 문을 열고 사용한 시약 카트리지를 Reagent Chiller에서 밀어 꺼냅니다.
- 8 워시 트레이를 Reagent Chiller에 더 이상 들어가지 않을 때까지 밀어 넣은 다음 Reagent Chiller의 문을 닫아 줍니다.
- 9 PR2 병과 폐기물 수거 용기 앞의 시퍼 핸들을 잡고 제자리에 고정될 때까지 올려 줍니다.
- 10 PR2 병을 꺼내고 워시 용기를 넣어 줍니다.



참고

각 런 완료 후 PR2 병은 폐기합니다. 남은 PR2는 재사용하지 않습니다.

- 11 폐기물 수거 용기를 꺼내고 내용물을 적절한 방법을 사용해 폐기합니다. 시약 장착부에 폐기물 수거 용기를 다시 넣어 줍니다.



경고

해당 시약 세트는 잠재적 유해 화학물질을 함유하고 있습니다. 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.

- 12 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
- 13 시약 장착부의 문을 닫습니다.
- 14 **Next**를 선택합니다.

워시가 완료되면 사용한 플로우 셀, 워시 트레이, 남은 워시 용액이 들어 있는 워시 용기는 그대로 기기에 둡니다.



참고

시퍼는 내려간 상태로 유지되는데, 이는 정상입니다. 시퍼가 마르거나 시스템에 공기가 유입되는 것을 방지하기 위해 사용하지 않는 워시 용액은 워시 트레이와 워시 용기에 그대로 남겨 두도록 합니다.

제4장 유지 관리

- 유지 관리 빈도 30
- VeriSeq PGS 워크플로우의 유지 관리 빈도..... 30
- 메인テナンス 워시 수행하기 31
- 스탠바이 워시 수행하기 33
- Manage Files 35
- 소프트웨어 업데이트 36
- 기기 종료하기 36

유지 관리 빈도

다음과 같은 유지 관리 작업을 권장 빈도로 수행합니다.



참고

VeriSeq PGS 워크플로우 수행 시 VeriSeq PGS의 유지 관리 빈도를 따르도록 합니다. 자세한 내용은 30페이지의 *VeriSeq PGS 워크플로우의 유지 관리 빈도*를 참조하시기 바랍니다.

표 2 정상 작동 중 유지 관리

작업	빈도
포스트런 워시	런 완료 후
메인テナンス 워시	매월
스탠바이 워시	Idle Mode(7일 이상 미사용) 준비, 기기가 idle 상태일 경우 30일마다
기기 종료	필요시

표 3 Idle Mode 중 유지 관리(7일 이상 미사용)

작업	빈도
스탠바이 워시	매월
기기 종료	필요시

VeriSeq PGS 워크플로우의 유지 관리 빈도

VeriSeq PGS 워크플로우 수행 시 다음과 같은 유지 관리 절차를 권장 빈도로 수행합니다.

표 4 정상 작동 중 유지 관리

작업	빈도
포스트런 워시	런 완료 후
메인テナンス 워시	매월
Perform Wash 화면에서 포스트런 워시 수행	Idle Mode에 들어간 후(3일 이상 미사용)
스탠바이 워시	Idle Mode(7일 이상 미사용) 준비, 기기가 idle 상태일 경우 30일마다
기기 종료	필요시

표 5 Idle Mode 중 유지 관리(7일 이상 미사용)

작업	빈도
스텐바이 워시	매월
기기 종료	필요시

메인テナンス 워시 수행하기

최적의 성능을 위해 30일 마다 메인テナンス 워시를 수행합니다.

메인テナンス 워시는 약 90분이 소요됩니다. 메인テナンス 워시는 시스템을 꼼꼼히 세척하는 작업이며 총 3단계로 구성되어 있습니다.

런이 완료되면 다음 런을 시작하기 전에 메인テナンス 워시가 수행되도록 기기를 설정할 수 있습니다. 자세한 내용은 11페이지의 [시스템 맞춤 설정하기](#)를 참조하시기 바랍니다.

별도 구매 소모품

- ▶ Tween 20(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호: P7949)
- ▶ 실험용수

절차

- 1 사용한 플로우 셀이 기기에 들어 있는지 확인합니다.
- 2 Home 화면에서 **Perform Wash**를 선택합니다.
- 3 Perform Wash 화면에서 **Perform Maintenance Wash**를 선택합니다.
소프트웨어가 자동으로 Reagent Chiller 내부의 시퍼를 올립니다.

1차 워시 수행하기

- 1 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 새로 만든 워시 용액으로 워시 구성품을 준비해 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.
- 3 기기에 워시 트레이와 워시 용기를 넣습니다.
 - a 시약 장착부와 Reagent Chiller의 문을 열고 사용한 시약 카트리지를 또는 워시 트레이를 Reagent Chiller에서 밀어 꺼냅니다.
 - b 워시 트레이를 더 이상 Reagent Chiller에 들어가지 않을 때까지 밀어 넣어 줍니다. Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
 - c PR2 병과 폐기물 수거 용기 앞의 시퍼 핸들을 잡고 제자리에 고정될 때까지 올린 후, PR2 병을 꺼내고 워시 용기를 넣어 줍니다.



참고

각 런 완료 후 PR2 병은 폐기합니다. 남은 PR2는 재사용하지 않습니다.

- a 폐기물 수거 용기를 꺼내고 내용물을 적절한 방법을 사용해 폐기합니다. 시약 장착부에 폐기물 수거 용기를 다시 넣어 줍니다.
- b 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
- c 시약 장착부의 문을 닫습니다.

4 **Next**를 선택합니다. 1차 워시가 시작됩니다.

2차 워시 수행하기

워시 단계마다 워시 용액을 새로 만들어 사용해야 합니다. 이전 워시에 사용했던 워시 용액을 다시 사용하면 폐기물이 유체 라인으로 전달될 수 있습니다.

- 1 다음의 절차에 따라 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 1차 워시가 완료되면 워시 트레이와 워시 용기를 꺼내고 남은 워시 용액을 폐기합니다.
- 3 다음의 절차에 따라 새로 워시 용액을 만들어 워시 구성품을 다시 채워 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.
- 4 다음의 절차에 따라 워시 트레이와 워시 용기를 넣습니다.
 - a 워시 트레이를 더 이상 Reagent Chiller에 들어가지 않을 때까지 밀어 넣어 줍니다. Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
 - b 워시 용기를 넣은 후 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
 - c 시약 장착부의 문을 닫습니다.
- 5 **Next**를 선택합니다. 2차 워시가 시작됩니다.

3차 워시 수행하기

- 1 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 2차 워시가 완료되면 워시 트레이와 워시 용기를 꺼내고 남은 워시 용액을 폐기합니다.
- 3 새로 워시 용액을 만들어 워시 구성품을 다시 채워 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.
- 4 워시 트레이와 워시 용기를 로딩합니다.

- a 워시 트레이를 더 이상 Reagent Chiller에 들어가지 않을 때까지 밀어 넣어 줍니다. Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
- b 워시 용기를 넣은 후 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
- c 시약 장착부의 문을 닫습니다.

5 **Next**를 선택합니다. 3차 워시가 시작됩니다.

워시 완료 후

워시가 완료되면 사용한 플로우 셀, 워시 트레이, 남은 워시 용액이 들어 있는 워시 용기는 그대로 기기에 둡니다.



참고

시퍼는 내려간 상태로 유지되는데, 이는 정상입니다. 시퍼가 마르거나 시스템에 공기가 유입되는 것을 방지하기 위해 사용하지 않는 워시 용액은 워시 트레이와 워시 용기에 그대로 남겨 두도록 합니다.

스탠바이 워시 수행하기

향후 7일 안에 기기를 다시 사용할 계획이 없다면 스탠바이 워시를 수행하여 기기와 기기 유체 라인을 idle 상태로 만들 준비를 합니다. 기기가 idle 상태일 경우 30일마다 스탠바이 워시를 수행해 줍니다.

스탠바이 워시는 약 2시간이 소요됩니다. 스탠바이 워시는 잔여 시약이나 축적된 염분이 있는 포지션을 각각 세척하는 작업으로, 2회의 워시가 연속으로 수행됩니다. 워시별로 약 60분이 소요됩니다.

스탠바이 워시가 완료되면 기기는 Standby Mode에 들어 가고 기기의 상태를 알려 주는 메시지가 Home 화면에 표시됩니다. 기기가 Standby Mode에 있다면 시퀀싱 런 시작 전 반드시 메인テナンス 워시를 수행해 줘야 합니다.

별도 구매 소모품

- ▶ Tween 20(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호: P7949)
- ▶ 실험용수

절차

- 1 사용한 플로우 셀이 기기에 들어 있는지 확인합니다.
- 2 Home 화면에서 **Perform Wash**를 선택합니다.
- 3 Wash Options 화면에서 **Perform Standby Wash**를 선택합니다.
소프트웨어가 자동으로 Reagent Chiller 내부의 시퍼를 올립니다.

1차 워시 수행하기

- 1 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 새로 만든 워시 용액으로 워시 구성품을 준비해 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.

- 3 기기에 워시 트레이와 워시 용기를 넣습니다.
 - a 시약 장착부와 Reagent Chiller의 문을 열고 사용한 시약 카트리지를 Reagent Chiller에서 밀어 꺼냅니다.
 - b 워시 트레이를 더 이상 Reagent Chiller에 들어가지 않을 때까지 밀어 넣어 줍니다. Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
 - c PR2 병과 폐기물 수거 용기 앞의 시퍼 핸들을 잡고 제자리에 고정될 때까지 올린 후, PR2 병을 꺼내고 워시 용기를 넣어 줍니다.



참고

각 런 완료 후 PR2 병은 폐기합니다. 남은 PR2는 재사용하지 않습니다.

- a 폐기물 수거 용기를 꺼내고 내용물을 적절한 방법을 사용해 폐기합니다. 시약 장착부에 폐기물 수거 용기를 다시 넣어 줍니다.
 - b 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
 - c 시약 장착부의 문을 닫습니다.
- 4 **Next**를 선택합니다. 1차 워시가 시작됩니다.

2차 워시 수행하기

워시 단계마다 워시 용액을 새로 만들어 사용해야 합니다. 이전 워시에 사용했던 워시 용액을 다시 사용하면 폐기물이 유체 라인으로 전달될 수 있습니다.

- 1 다음의 절차에 따라 Tween 20과 실험용수를 사용해 워시 용액을 새로 준비합니다.
 - a 45 ml의 실험용수에 5 ml의 100% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 10% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - b 475 ml의 실험용수에 25 ml의 10% Tween 20을 넣습니다. 이 경우 0.5% Tween 20 워시 용액을 만들 수 있습니다.
 - c 상하로 5회 뒤집어 잘 섞어 줍니다.
- 2 1차 워시가 완료되면 워시 트레이와 워시 용기를 꺼내고 남은 워시 용액을 폐기합니다.
- 3 다음의 절차에 따라 새로 워시 용액을 만들어 워시 구성품을 다시 채워 줍니다.
 - a 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 워시 용액을 넣습니다.
 - b 500 ml 워시 용기에 350 ml의 워시 용액을 넣습니다.
- 4 다음의 절차에 따라 워시 트레이와 워시 용기를 넣습니다.
 - a 워시 트레이를 더 이상 Reagent Chiller에 들어가지 않을 때까지 밀어 넣어 줍니다. Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
 - b 워시 용기를 넣은 후 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
 - c 시약 장착부의 문을 닫습니다.
- 5 **Next**를 선택합니다. 2차 워시가 시작됩니다.

워시 완료 후

워시가 완료되면 사용한 플로우 셀, 워시 트레이, 남은 워시 용액이 들어 있는 워시 용기는 그대로 기기에 둡니다.



참고

시퍼는 내려간 상태로 유지되는데, 이는 정상입니다. 시퍼가 마르거나 시스템에 공기가 유입되는 것을 방지하기 위해 사용하지 않는 워시 용액은 워시 트레이와 워시 용기에 그대로 남겨 두도록 합니다.

Manage Files

Home 화면에서 Manage Files를 선택하면 기기 컴퓨터에서 파일을 이동, 업로드, 삭제하거나 샘플 시트의 이름을 변경할 수 있습니다.

파일 삭제하기

- 1 Manage Files 화면의 어떤 탭에서나 **Browse**를 선택한 후 기기에서 액세스 가능한 파일을 찾습니다.
- 2 다음 중 한 가지 방법을 사용합니다.
 - ▶ 목록에서 원하는 파일 또는 폴더 이름 옆의 체크 박스를 하나씩 선택합니다.
 - ▶ 목록에 있는 파일과 폴더를 모두 선택하려면 Delete 버튼 좌측의 체크 박스를 선택합니다. 해당 옵션은 Runs, Sample Sheets, Manifests, Genomes 및 Recipes 탭에 제공됩니다.
- 3 **Delete**를 선택합니다.



참고

Delete 명령어는 Bundle Logs를 제외한 모든 탭에서 사용 가능합니다.

런 폴더 이동하기

Move 명령어는 런 폴더를 새 위치로 복사한 후 이전 위치에서 해당 폴더를 삭제할 때 사용됩니다.

- 1 Manage Files 화면의 Runs 탭에서 **Browse**를 선택한 후 기기에서 액세스가 가능한 파일을 찾습니다.
- 2 목록에서 원하는 파일 또는 폴더 이름 옆의 체크 박스를 하나씩 선택합니다.
- 3 **Move**를 선택합니다.
- 4 **Browse Network**를 선택한 후 앞서 선택한 파일 또는 폴더의 새 위치를 선택합니다.
- 5 **OK**를 선택합니다.

파일 업로드하기

Upload 명령어는 Sample Sheets 및 Genomes 탭에서 사용 가능합니다.

MiSeq이 네트워크에 연결되지 않은 경우 해당 기능을 사용하면 USB 드라이브에 있는 파일을 기기 컴퓨터로 업로드할 수 있습니다.

- 1 Manage Files 화면의 Sample Sheets 또는 Genomes 탭에서 **Browse**를 선택한 후 기기에서 액세스가 가능한 파일을 찾습니다.
- 2 **Upload**를 선택합니다.
- 3 **Browse Network**를 선택한 후 원하는 파일이 저장되어 있는 위치를 찾습니다.
- 4 **OK**를 선택합니다.
해당 파일이 Directory 필드에 표시된 폴더로 업로드됩니다.

샘플 시트 이름 변경하기

- 1 Manage Files 화면의 Sample Sheets 탭에서 다음 옵션 중 한 가지를 선택합니다.
 - ▶ 원하는 샘플 시트 옆의 체크 박스를 하나씩 선택합니다.
 - ▶ 목록에 있는 샘플 시트를 모두 선택하려면 Delete 버튼 좌측의 체크 박스를 선택합니다.
- 2 **Rename**를 선택합니다.
- 3 키보드 아이콘을 선택한 후 온스크린 키보드를 이용하여 샘플 시트의 이름을 변경합니다.
- 4 **Next**를 선택합니다.
- 5 **Back**를 선택합니다.

소프트웨어 업데이트

시스템이 인터넷 액세스가 되는 네트워크에 연결되어 있다면 Home 화면에서 기기 소프트웨어를 자동으로 업데이트할 수 있습니다. BaseSpace 업데이트를 자동으로 확인하도록 소프트웨어를 설치하는 것도 가능합니다. 자세한 내용은 12페이지의 *BaseSpace 업데이트 알림 설정하기*를 참조하시기 바랍니다.

기기가 인터넷 액세스가 되는 네트워크에 연결되어 있지 않다면 기기 소프트웨어를 수동으로 업데이트할 수 있습니다.

소프트웨어 자동으로 업데이트하기

사용 가능한 소프트웨어 업데이트가 있는 경우 Home 화면에 **Update Available** 버튼이 표시됩니다. 업데이트가 없으면 이 버튼은 표시되지 않습니다. 이 옵션을 활성화하기 위해 MiSeq이 인터넷 액세스가 되는 네트워크에 연결되어 있는지 확인하시기 바랍니다.

- 1 Home 화면에서 **Update Available**를 선택합니다.
- 2 대화 상자에서 업데이트 실행을 확인합니다.
기기 재부팅이 필요합니다. 재부팅 후 업데이트 설치가 자동으로 진행됩니다.

소프트웨어 수동으로 업데이트하기

Manual Update 기능을 통해 MiSeq 인터페이스에서 설치 가능한 소프트웨어 파일이 있는 위치를 찾아 기기의 Control Software와 Analysis Software를 업데이트합니다.

- 1 Main Menu에서 **Software Update**를 선택합니다.
- 2 **Browse**를 선택하여 설치 가능한 새 소프트웨어 버전 파일이 있는 위치로 이동합니다.
- 3 설치 가능한 소프트웨어 파일의 경로가 화면에 나타나면 **Save and Update**를 선택합니다.
- 4 대화 상자에서 업데이트 실행을 확인합니다.
기기 재부팅이 필요합니다. 재부팅 후 업데이트 설치가 자동으로 진행됩니다.

기기 종료하기

기기는 항상 켜두는 것이 가장 좋지만, 기기를 반드시 꺼야 한다면 다음 절차에 따라 Windows를 종료한 후 유체 라인을 준비하도록 합니다.

- 1 메인テナンス 위시를 수행합니다. 자세한 내용은 31페이지의 *메인テナンス 위시 수행하기*를 참조하시기 바랍니다.
- 2 폐기물 수거 용기를 꺼내고 내용물을 적절한 방법을 사용해 폐기합니다. 시약 장착부에 폐기물 수거 용기를 다시 넣어 줍니다.
- 3 시약 장착부의 문을 닫습니다.

- 4 Home 화면에서 **Manage Instrument**를 선택합니다.
- 5 **Shut Down**을 선택합니다.
이 명령어는 소프트웨어를 종료합니다.
- 6 전원 토글 스위치를 OFF 위치로 설정합니다.



참고

기기를 종료한 후 전원 토글 스위치를 다시 ON 위치로 설정하기 전에 항상 **최소** 60초 동안 기다립니다.

부록 A 문제 해결

소개	38
문제 해결을 위한 로그 번들 생성하기	38
시스템 검사 수행하기	39
런 일시 중지 또는 중단하기	39
시약 카트리지 시퍼 수동 상향 이동하기	41
런 설정 오류 해결하기	41
RFID 읽기 실패 해결하기	41
볼륨 테스트 수행하기	42
예상 워시 볼륨 측정하기	42
Reagent Chiller 온도 오류 해결하기	43
Local Run Manager 분석 오류 해결하기	43
시스템 설정 구성하기	43

소개

이 섹션에서는 일반적인 문제 발생 시 Illumina 기술지원팀에 문의하기 전에 수행할 수 있는 일반적인 문제 해결 단계를 제시합니다. 대부분의 경우 오류가 발생하면 화면에 해결 방법이 제공됩니다.

기술적인 문의 사항이 있는 경우 Illumina 웹사이트 > MiSeq Support 페이지 > FAQs를 참조하거나 MyIllumina 계정으로 로그인한 후 Bulletins를 확인해 보시기 바랍니다.

런 품질이나 수행 관련 문제는 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다. 자세한 내용은 51페이지의 [기술 지원](#)을 참조하시기 바랍니다.

일반적으로 문제 해결을 요청하면 Illumina 기술지원 담당자가 문제가 발생한 런과 관련된 파일의 복사본을 요청합니다. Manage Files 화면의 Bundle Logs 탭에서 문제 해결에 필요한 파일을 묶어 압축할 수 있습니다. 자세한 내용은 38페이지의 [문제 해결을 위한 로그 번들 생성하기](#)를 참조하시기 바랍니다.

문제 해결을 위한 로그 번들 생성하기

Bundle Logs는 문제 해결을 위해 Illumina 기술지원팀에 전송할 파일을 하나로 묶어 주는 기능입니다. Manage Files 화면의 Bundle Logs 탭에서 복수의 파일을 선택해 번들(bundle)이라는 단위로 모아 줍니다. 번들은 자동으로 zip 파일로 압축됩니다.

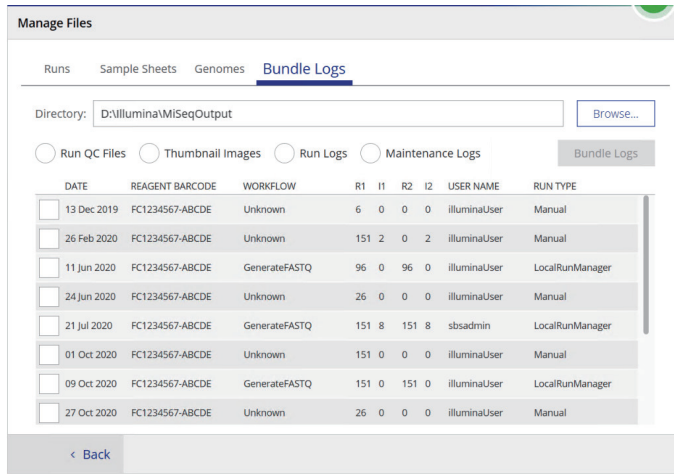
Bundle Logs 기능은 한 번에 특정 런과 관련된 파일을 하나의 번들 유형(bundle type)으로 묶어 줍니다. Illumina 기술지원팀이 요청 시 런별 및 번들 유형별로 Bundle Logs 단계를 반복합니다.

- 1 Manage Files 화면에서 **Bundle Logs** 탭을 선택합니다.
- 2 **Browse**를 선택한 후 MiSeqOutput 디렉터리로 이동합니다.
- 3 번들로 묶어줄 파일 유형으로 Run QC Files, Thumbnail Images, Run Logs, 또는 Maintenance Logs를 선택합니다.
- 4 Run 옆의 상자를 선택합니다.
- 5 **Bundle Logs**를 선택합니다.
해당 번들에 들어 있는 모든 파일의 목록 등 번들에 대한 정보를 제공하는 Bundle Files 화면이 나타납니다.
Bundle Logs 기능과 관련된 개별 폴더 및 파일에 대한 자세한 내용은 *MiSeq Output and Analysis Folders Quick Reference Card*(문서 번호: 15034791)를 참조하시기 바랍니다.
- 6 **Next**를 선택합니다.
- 7 압축된 번들 파일을 저장하고 싶은 위치로 이동합니다.
- 8 **Save**를 선택합니다.

모든 파일이 번들로 묶이면 Bundle Logs 탭이 다시 열립니다.

9 압축된 번들을 Illumina 기술지원팀에 전송합니다.

그림 20 Bundle Logs 탭



시스템 검사 수행하기

System Check 화면은 일반적으로 Live Help 세션 중 Illumina 기술지원 담당자와 연락할 때 사용됩니다. 이 기능은 기기가 정상 작동 중이거나 유지 관리 작업 중에는 필요하지 않습니다.

볼륨 테스트(volume test)와 같은 일부 시스템 검사는 Illumina 기술지원팀에 지원을 요청하기 전에 수행해 볼 수 있습니다. 볼륨 테스트는 센서를 통해 기포가 통과할 때 유량(volume)을 추정하는 방식으로 유체 시스템의 상태를 점검합니다. 자세한 내용은 42페이지의 **볼륨 테스트 수행하기**를 참조하시기 바랍니다.



주의

Tip/Tilt 및 Full Optics 검사는 특수한 플로우 셀이 필요하며 반드시 Illumina의 테크니션이 수행해야 합니다.

- 1 Main Menu에서 **System Check**를 선택합니다.
- 2 다음 중 하나를 선택해 진행합니다.
 - ▶ 원하는 검사를 하나씩 선택합니다.
 - ▶ **Select All**을 선택하여 모든 검사를 수행합니다.
- 3 **Next**를 선택합니다.
선택한 검사가 완료되면 검사 결과가 화면에 표시됩니다.
- 4 **[선택 사항]** 소프트웨어 인터페이스에서 검사 결과의 요약 내용을 보려면 **Show Details**를 선택합니다.
- 5 **[선택 사항]** 검사 결과를 *.csv 형식으로 USB 드라이브에 저장하려면 **Export Results**를 선택합니다.
- 6 **Done**을 선택합니다.

런 일시 중지 또는 중단하기

MiSeq은 런 수행 시 사용자의 관여 없이 처음부터 끝까지 모든 단계를 완료하도록 설계되었으나, 필요시 사용자가 Sequencing 화면에서 런을 일시 중지하거나 중단할 수 있습니다.

런 일시 중지하기

사용자는 런이 완료되기 전에 일시적으로 런을 중지할 수 있습니다. 예를 들어, 폐기물 수거 용기가 가득 찬 것으로 여겨질 경우 런을 일시 중지할 수 있습니다. 런은 일시 중지했다가 재개할 수 있습니다.

Pause를 선택하면 현재 명령이 완료된 후에 런이 일시 중지되며 플로우 셀은 안전한 곳으로 이동됩니다.

Sequencing 화면에서 런을 일시 중지하려면 **Pause**를 선택합니다. 표시된 버튼이 Resume 버튼으로 변경됩니다. 런을 재개할 준비가 되면 **Resume**을 선택합니다.

그림 21 일시 중지된 런의 Sequencing 화면

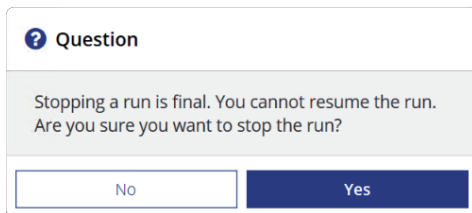


런 중단하기

시퀀싱 런이 완료되기 전에 Sequencing 화면에서 **Stop** 버튼을 눌러 진행 중인 런을 중단할 수 있습니다. 런이 올바르게 잡게 설정되었거나 데이터 품질이 낮거나 하드웨어 오류가 발생한 경우 런을 중단하는 것이 가능합니다.

런이 중단되면 현재 명령이 완료되지 않은 채로 플로우 셀 스테이지가 전방 위치로 이동합니다. Real-Time Analysis 소프트웨어는 마지막으로 완료된 사이클의 분석을 지속합니다.

그림 22 런 중단하기



런을 중단하면 다시 되돌릴 수 없습니다. 런은 한 번 중단하면 재개할 수 없습니다. 런을 중단하면 워시 외에는 어떠한 작업도 수행할 수 없습니다.

시약 카트리지 시퍼 수동 상향 이동하기

런이 의도치 않게 중단되거나 런 수행 중 오류가 발생하면 시약 카트리지 시퍼가 자동으로 위로 이동하지 않을 수 있습니다. 이 경우 시약 카트리지를 제거하려면 사용자가 직접 시약 카트리지 시퍼를 잡고 올려야 합니다.

- 1 Home 화면에서 **Perform Wash**를 선택합니다.
- 2 **Raise Sippers**를 선택합니다.
- 3 시약 카트리지를 꺼냅니다.

런 설정 오류 해결하기

프리런 검사에서 실패한 검사 항목이 있는 경우 빨간색 아이콘(X)이 해당 항목 옆에 표시됩니다. 오류에 대한 설명과 해결 방법이 담긴 메시지가 화면에 표시됩니다.

오류	조치
X Free Disk Space	디스크 공간이 부족하면 필요한 디스크 공간을 알려 주는 메시지가 나타납니다. Manage Files 기능을 사용하여 기기 내장 컴퓨터에 필요한 디스크 공간을 확보합니다.
X Network Connection Active	네트워크 케이블이 기기에 연결되어 있는지 확인합니다. 네트워크 연결이 복원되지 않는다면 Manage Instrument 화면에서 Reboot 를 선택하여 소프트웨어를 재부팅합니다. 그래도 연결이 복원되지 않으면 Manage Instrument 화면에서 Shut Down 을 선택한 후 전원 스위치를 사용하여 기기를 끕니다. 최소 60초간 기다린 다음 기기를 다시 켜고 소프트웨어를 실행합니다.
X Primary Analysis Ready	이전 런의 1차 분석이 완료되지 않았습니다. 1차 분석 시간은 기본 1시간으로 설정되어 있으며, 카운트다운 숫자가 화면에 표시됩니다. 선택 가능한 옵션은 1시간 대기과 Terminate Analysis 입니다. 완료되지 않은 사이클에 대한 2차 분석은 중단됩니다.

RFID 읽기 실패 해결하기

시스템이 소모품의 RFID를 읽지 못하는 경우 Illumina 웹사이트에서 임시 바이패스 코드를 받을 수 있습니다. 임시 바이패스 코드의 유효 기간은 7일입니다.

- 1 다음 단계 진행 전 항상 RFID 읽기를 다시 시도해 봅니다. RFID 읽기에 또 실패하면 **Enter Code**를 선택합니다.
- 2 인터넷에 연결된 컴퓨터에서 my.illumina.com 페이지를 연 후 페이지 상단의 톨 바에서 **Sign In**을 선택합니다.
- 3 MyIllumina 계정으로 로그인합니다.
톨 바의 Sign In 버튼이 사용자의 이름으로 바뀝니다.
- 4 사용자 이름 위에 마우스를 올린 후 **Account**를 선택합니다. **My Tools** 컬럼에서 **MiSeq Self-Service**를 클릭합니다.
- 5 MiSeq Self-Service 페이지에 **MiSeq serial number**를 입력합니다.
- 6 Type of Override Code 드롭다운 목록에서 **RFID Override**를 선택합니다.
- 7 코드를 생성하려면 **Get Code**를 선택합니다.
- 8 MCS 인터페이스로 돌아가 **Enter Code**를 선택합니다.
- 9 온스크린 키보드를 사용하여 임시 바이패스 코드를 입력한 후 **Next**를 선택합니다.
- 10 해당 플로우 셀, PR2 병 또는 시약 카트리지의 바코드 번호를 입력합니다.

소모품	바코드 번호 위치
플로우 셀	플로우 셀 용기 라벨의 바코드 상단에 위치. 플로우 셀의 바코드 번호는 A(Standard), G(Micro) 또는 D(Nano)로 시작. 예: A0E61
PR2 병	PR2 병 라벨의 바코드 하단에 위치. 예: MS0011881-PR2
시약 카트리지	시약 카트리지 라벨의 바코드 하단에 위치. 예: MS0010744-300

11 시약 카트리지의 바이패스 코드 입력 시 키트의 버전 번호를 입력합니다. **Enter Reagent Kit Barcode**를 선택한 후 시약 카트리지의 바코드 번호와 키트의 버전 번호를 직접 입력합니다.



주의

올바르지 않은 시약 키트 버전을 입력하면 시퀀싱 데이터에 부정적인 영향을 줄 수 있습니다.

12 **Enter**를 선택합니다.

볼륨 테스트 수행하기

유체 라인에 이물질이 있으면 시약 전달 및 시퀀싱 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있습니다. 유체 라인에 이물질이 있는 것으로 의심되면 볼륨 테스트를 수행합니다.

볼륨 테스트는 센서를 통해 기포가 통과할 때 기포 사이의 유량(volume)을 추정하여 유체 시스템의 상태를 점검합니다. 볼륨 테스트를 수행하려면 반드시 실험용수를 워시 트레이와 워시 용기에 넣고 사용한 플로우 셀을 올바르게 위치시켜야 합니다. 화면의 프롬프트를 따라 테스트를 수행합니다.

- 1 사용한 플로우 셀이 기기에 들어 있는지 확인합니다.
- 2 Main Menu에서 **System Check**를 선택합니다.
- 3 **Conduct Volume Test**를 선택한 후 **Next**를 선택합니다.
- 4 워시 트레이의 각 웰에 6 ml의 실험용수를 넣습니다.
- 5 500 ml 워시 용기에 350 ml의 실험용수를 넣습니다.
- 6 기기에 워시 트레이와 워시 용기를 넣습니다.
 - a 시약 장착부와 Reagent Chiller의 문을 열고 워시 트레이가 Reagent Chiller에 더 이상 들어가지 않을 때까지 밀어 넣습니다. Reagent Chiller의 문을 닫습니다.
 - b 폐기물 수거 용기를 꺼내고 내용물을 적절한 방법을 사용해 폐기합니다. 시약 장착부에 폐기물 수거 용기를 다시 넣어 줍니다.
 - c 시퍼가 워시 용기와 폐기물 수거 용기 안으로 들어갈 때까지 시퍼 핸들을 천천히 내려 줍니다.
- 7 **Next**를 선택합니다.
볼륨 테스트가 완료되면 테스트 결과가 화면에 나타납니다.
테스트에 통과하지 못하면 메인テナンス 워시를 수행합니다. 자세한 내용은 31페이지의 **메인テナンス 워시 수행하기**를 참조하시기 바랍니다.
- 8 메인テナンス 워시가 완료되면 볼륨 테스트를 다시 수행합니다.

예상 워시 볼륨 측정하기

예상 워시 볼륨의 측정을 통해 워시 유체의 성능을 확인할 수 있습니다.

- 1 워시 시작 전 폐기물 수거 용기를 먼저 비웁니다.
- 2 워시가 완료되면 폐기물 수거 용기의 워시 볼륨을 측정합니다.

워시 유형	예상 워시 볼륨
포스트런 워시	17.25 ml
템플릿 라인 워시를 포함하는 포스트런 워시	25.5 ml
스탠바이 워시	46 ml
메인터너스 워시	51.75 ml

Reagent Chiller 온도 오류 해결하기

Reagent Chiller의 적정 온도 범위는 2~11°C입니다. 센서 표시에 Reagent Chiller의 온도가 표시됩니다. 자세한 내용은 6페이지의 [센서 표시](#)를 참조하시기 바랍니다.

Reagent Chiller가 적정 온도 범위를 벗어났다는 오류 메시지가 나타나면 Illumina 기술지원팀에 문의하시기 바랍니다.

Reagent Chiller에 대한 자세한 내용은 4페이지의 [시약 장착부](#)를 참조하시기 바랍니다.

Local Run Manager 분석 오류 해결하기

분석 오류와 관련된 자세한 내용은 *Local Run Manager v3 소프트웨어 가이드*(문서 번호: 1000000111492)를 참조하시기 바랍니다. 해당 가이드에는 분석을 다시 큐로 보내는 방법이 기술되어 있습니다.

시스템 설정 구성하기

MCS는 시스템 설정에 필요한 명령어를 사용할 수 있는 몇 가지 화면을 제공합니다. 일반적으로 소프트웨어 설정은 MiSeq 설치 중에 진행됩니다.

IP 및 DNS 설정하기

네트워크 또는 시설 변경으로 인해 IP 주소와 DNS 서버 주소를 설정해야 할 경우 다음의 절차에 따라 진행합니다.

- 1 Main Menu에서 **System Settings**를 선택합니다.
 - ▶ **Obtain an IP address automatically** 또는 **Use the following IP address**를 선택합니다.
Use the following IP address를 선택하는 경우 IP address, Subnet mask 및 Default gateway를 설정합니다.
 - ▶ **Obtain DNS address automatically** 또는 **Use the following DNS server address**를 선택합니다.
Use the following DNS server addresses를 선택하는 경우 Preferred DNS server address 및 Alternate DNS server address를 설정합니다.
- 2 **Save and Continue**를 선택합니다.

부록 B 결과 파일 및 폴더

런 폴더.....	44
MiSeqOutput 폴더의 내용	44
RTA 폴더 및 파일.....	46

런 폴더

MiSeq은 각 런 수행 후 다음과 같은 목적을 가진 세 종류의 런 폴더를 생성합니다.

- ▶ **D:\Illumina\MiSeqTemp** — 런이 시작되면 기기 컴퓨터의 로컬 디스크에 임시 런 폴더가 생성되며, 이 폴더는 MCS와 RTA의 작업 영역으로 사용됩니다. MiSeqTemp 폴더에 액세스할 필요는 없습니다. 해당 폴더의 내용은 7일 후에 삭제됩니다.
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqOutput** — RTA는 MiSeqTemp 폴더에 있는 파일을 MiSeqOutput 폴더로 복사합니다. RTA는 1차 분석 파일이 생성되면 해당 파일을 MiSeqOutput 폴더에 다시 복사한 후 MiSeqAnalysis 폴더를 구성합니다. 포커스 이미지와 썸네일 이미지는 MiSeqOutput 폴더에 복사되지 않습니다. 자세한 내용은 [46페이지의 RTA 폴더 및 파일](#)을 참조하시기 바랍니다.
- ▶ 결과 폴더의 위치는 Run Options 화면의 Output Folder 필드를 통해 변경할 수 있습니다. 자세한 내용은 [12페이지의 디폴트 폴더 위치 설정하기](#)를 참조하시기 바랍니다.
- ▶ **D:\Illumina\MiSeqAnalysis** — RTA가 분석을 완료하면 Local Run Manager는 기기의 로컬 디스크에 있는 MiSeqAnalysis 폴더에 액세스하여 2차 분석을 시작합니다. MiSeqAnalysis 폴더에 쓰여진 파일은 모두 MiSeqOutput 폴더로 다시 복사됩니다. 자세한 내용은 [44페이지의 MiSeqOutput 폴더의 내용](#)을 참조하시기 바랍니다.

로컬에 분석 파일을 복제하지 않고 BaseSpace를 사용해 분석을 수행하는 경우 기기의 로컬 디스크에 있는 MiSeqAnalysis 폴더는 비어 있습니다.

루트 폴더 이름 지정

루트 런 폴더의 이름으로 런 수행일, 기기 번호 및 런에 사용된 플로우 셀을 식별합니다.

폴더 이름은 다음과 같은 기본 형식에 따라 지정됩니다.

연월일_<기기번호>_<런번호>_<플로우셀바코드>

런 번호는 기기에서 런이 수행될 때마다 1씩 증가합니다.

MiSeqOutput 폴더의 내용

RTA 분석 완료 후 MiSeqOutput 폴더는 2차 분석에 필요한 파일로 구성됩니다. 2차 분석 완료 후 MiSeqOutput 폴더와 MiSeqAnalysis 폴더의 내용은 동일합니다. 다만, MiSeqOutput 폴더에는 Images와 Thumbnail_Images라는 이미지 파일이 담긴 서브폴더 두 개가 들어 있습니다. 두 서브폴더는 2차 분석에 필요하지 않습니다.

파일

Output 폴더와 Analysis 폴더에 복사되는 파일은 다음과 같습니다.

- ▶ **SampleSheet.csv** — 해당 런 및 뒤이은 분석을 위한 파라미터를 제공합니다. 런 시작 후 샘플 시트는 루트 폴더에 복사되며 이름은 SampleSheet.csv로 변경됩니다. 복사본은 Data\Intensities and Data\Intensities\BaseCalls에 쓰여집니다.
- ▶ **runParameters.xml** — 런 파라미터의 요약과 해당 런과 사용된 플로우 셀과 시약의 RFID 등 런 구성 요소 정보를 포함합니다.
- ▶ **RunInfo.xml** — 해당 시퀀싱 런의 리드 수 및 사이클의 수와 같은 하이 레벨 런 정보와 인덱스 리드 여부를 포함합니다.

폴더

시퀀싱 런이 진행되는 동안 다음과 같은 폴더가 Output 폴더와 Analysis 폴더에 복사됩니다.

- ▶ **<Run folder name>\Config** — 런 구성 파일을 포함합니다.
- ▶ **<Run folder name>\Data** — Intensities, BaseCalls 및 Alignment라는 서브폴더를 포함합니다. Local Run Manager가 생성한 데이터는 Alignment 서브폴더에 들어 있습니다.
- ▶ **<Run folder name>\Data\RTA Logs** — 리드별로 RTA가 수행한 각 단계를 설명하는 로그 파일을 포함합니다.
- ▶ **<Run folder name>\Data\Intensities\BaseCalls** — 베이스 콜(*.bcl) 파일, 매트릭스(matrix) 파일 및 페이징(phasing) 파일이 들어 있는 서브폴더를 포함합니다. 2차 분석 진행 중 Local Run Manager가 해당 폴더에 FASTQ 파일을 씁니다. 자세한 내용은 *Local Run Manager v3 소프트웨어 가이드(문서 번호: 1000000111492)*를 참조하시기 바랍니다.
- ▶ **<Run folder name>\Recipe** — 런에 사용된 레시피를 포함합니다.
- ▶ **<Run folder name>\Logs** — 사이클별로 기기가 수행한 모든 단계를 기술한 로그 파일을 포함합니다.
- ▶ **<Run folder name>\InterOp** — 클러스터 밀도, 강도, 품질 점수 및 전반적인 런 품질 등 다양한 1차 분석 매트릭스를 요약하기 위해 Sequencing Analysis Viewer(SAV)가 사용한 바이너리 파일을 포함합니다.

그 밖에 임시 런 폴더에 생성되는 모든 파일과 폴더는 Output 폴더와 Analysis 폴더에 복사되지 않습니다. 해당 파일과 폴더에는 분석이나 문제 해결에 필요하지 않는 임시 파일이 들어 있습니다.

Local Run Manager는 2차 분석 중 Alignment 폴더와 같은 다른 폴더를 추가합니다. 자세한 내용은 *Local Run Manager v3 소프트웨어 가이드(문서 번호: 1000000111492)*를 참조하시기 바랍니다.

RTA 폴더 및 파일

다음 표는 1차 분석 중 Real-Time Analysis(RTA)가 생성하는 폴더와 파일을 정리한 것입니다. 이 중 대부분의 파일은 Local Run Manager 소프트웨어의 2차 분석에 사용됩니다.

주요 파일	서브폴더	설명
RTAComplete.txt	루트 폴더	베이스 콜 분석 완료 시 생성되는 마커 파일. 2차 분석의 시작을 트리거하는 파일.
SampleSheet.csv	루트 폴더	런 수행 전 읽혀지고 런 폴더로 복사된 후 2차 분석에 사용되는 파일.
RunInfo.xml	루트 폴더	리드(인덱스 리드 포함)의 경계와 런에 선택된 품질 표를 식별하는 파일.
*.bcl 파일	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	*.bcl 파일은 1회의 사이클, 1개의 타일에 대한 RTA 베이스 콜링 및 베이스 품질의 분석 결과 포함.
*.stats 파일	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001\CX.X	특정 사이클/타일에 대한 RTA 베이스 콜링 통계 자료를 포함하는 *.stats 파일.
*.filter 파일	Data\ Intensities\BaseCalls	타일별 필터 결과를 포함하는 *.filter 파일.
*.txt	Data\RTALogs	1차 분석의 로그 파일.
*.cif 파일	Data\ Intensities\L001\CX.X	바이너리 *.cif 파일은 1회의 사이클, 1개의 타일에 대한 RTA 이미지 분석 결과 포함. 자세한 내용은 47페이지의 플로우 셀 타일 번호 지정 을 참조.
*.locs 파일	Data\ Intensities\BaseCalls\ L001	클러스터의 좌표를 보고하는 파일. 각각의 *.locs 파일은 1개의 타일을 나타냄.
*.jpg 파일	Thumbnail_Images\ L001\CX.X	썸네일 이미지는 사이클 및 베이스별로 생성되며, 런 문제 해결에 사용 가능. 이러한 파일은 이미지 분석에 사용되며 Analysis 폴더로 복사되지 않음. 이미지 파일 이름에 대한 자세한 내용은 47페이지의 플로우 셀 타일 번호 지정 을 참조.

플로우 셀 타일

시퀀싱 런이 진행되는 동안 타일이라는 작은 이미징 영역에서 플로우 셀의 단일 레인이 이미징됩니다. MiSeq 플로우 셀은 모두 한 개의 레인을 가지고 있지만 타일의 수는 어떠한 종류의 플로우 셀을 사용하느냐에 따라 달라집니다.

플로우 셀	MiSeq Reagent Kit	타일	이미징 표면	이미징되는 타일의 수
Standard Flow Cell	MiSeq Reagent Kits, v3	19개	위와 아래	총 38개
PGS Flow Cell	MiSeq Reagent Kit v3-PGS	19개	위와 아래	총 38개
Standard Flow Cell	MiSeq Reagent Kits, v2	14개	위와 아래	총 28개
Micro Flow Cell	MiSeq Reagent Micro Kits, v2	4개	위와 아래	총 8개
Nano Flow Cell	MiSeq Reagent Nano Kits, v2	2개	위만 해당	총 2개

시퀀싱 런 진행 중 각 타일이 이미징될 때마다 1개의 Output 파일이 생성됩니다. 자세한 내용은 47페이지의 [플로우 셀 타일 번호 지정](#)을 참조하시기 바랍니다.

플로우 셀 타일 번호 지정

시퀀싱 런 진행 중 각 타일이 이미징될 때마다 1개의 Output 파일이 생성되며, 각 파일의 이름에는 4자리 타일 번호가 할당됩니다. Nano Flow Cell 외의 모든 플로우 셀은 위와 아래 표면에서 이미징됩니다. 각 타일의 Output 파일은 Data\Intensities\BaseCalls\L001의 런 폴더에서 찾을 수 있습니다.

플로우 셀	MiSeq Reagent Kit	타일	이미징 표면	이미지 파일 이름
Standard Flow Cell PGS Flow Cell	MiSeq Reagent Kits, v3	1~19개	위	1101 ~ 1119
			아래	2101 ~ 2119
		1~14개	위	1101 ~ 1114
			아래	2101 ~ 2114
Micro Flow Cell	MiSeq Reagent Micro Kits, v2	1~4개	위	1101 ~ 1104
			아래	2101 ~ 2104
		1~2개	위만 해당	1101 ~ 1102

색인

기호

2차 분석 7

ㄱ

경고 6

고객 지원 51

관련 문서 1, 51

교육 1

구성 요소

광학 부품 3

시약 장착부 3, 4

시약 카트리지 9

플로우 셀 8, 46

플로우 셀 장착부 3~4

기기를 idle 상태로 전환하기 33

기기 종료 36

기기 종료하기 36

기술 지원 51

깜박이는 아이콘 6

ㄴ

네트워크 설정 43

ㄷ

디스크 공간

확인 8

ㄹ

런 모니터링하기 24

런 설정 화면 17

런 소요 시간 14

런 일시 중지하기 40

런 중단하기 40

런 폴더

1차 분석 파일 46

Temp, Output, Analysis 44

관리 35

내용 44

이름 지정 44

정의 5

레시피 관리하기 35

리드당 사이클 횟수 15

ㅁ

메인터넌스 워시 31

문제 해결

Bundle Logs 38

RFID 41

런과 관련된 파일 38

유체 라인 42

ㅂ

볼륨 테스트 42

분석 워크플로우

정의 4

ㅅ

샘플 시트

기기에 복사 35

런 폴더 내 46

정의 5

센서 표시 6

소모품 13

실험용수 13

소프트웨어

디스크 공간 확인 8

런 소요 시간 14

업데이트 36

스탠바이 워시 33

시스템 설정 43

시약

키트 8

시약 로딩하기

PR2 21

카트리지 22

시약 장착부 3

시약 카트리지 9

저장소 10

해동하기 15

확인하기 16

시퀀싱 15

시퍼 핸들 4

실험용수 관련 가이드라인 13

ㅇ

아이콘

센서 6

- 오류 6
- 워시
 - Idle 상태 준비하기 33
 - 기기 종료 준비하기 36
 - 메인터넌스 31
 - 스탠바이 33
 - 예상 볼륨 42
 - 이점 26
 - 포스트런 26
 - 포스트런 워시 설정 11
- 워시 볼륨 42
- 워크플로우
 - 런 소요 시간 14
- 유체
 - 문제 해결 42
 - 워시 31, 33
- 이메일 알림 12

ㅈ

- 참조 유전체
 - 파일 형식 5

ㅋ

- 클러스터 생성 15

ㅌ

- 타일 번호 지정 47
- 템플릿 라인 워시 26
- 템플릿 생성 7, 25

ㅍ

- 파일 및 폴더 복사하기 35
- 파일 및 폴더 삭제하기 35
- 파일 및 폴더 이동하기 35
- 폐기물 수거 용기 4
- 포스트런 워시 26
- 폴더 위치
 - 디폴트 설정 12
 - 현재 런 23
- 플로우 셀
 - 개요 8
 - 단일 레인 8
 - 청소하기 19
 - 캡의 색 9
 - 타일 46
 - 타일 번호 지정 47
- 플로우 셀 장착부 3~4
- 플로우 셀 클램프 4

로마자

B

- BaseSpace
 - 업데이트 12
 - 연결 6
- Bundle Logs 35

C

- Control Software 5

D

- DNS 설정 43

I

- Illumina Proactive 모니터링 서비스 12
- InterOp 폴더 45
- IP 주소 43

L

- Local Run Manager 1
 - 개요 7

M

- manifest 파일
 - 기기에 복사하기 35
 - 정의 5
- MiSeq Self-Service 41

P

- PR2 로딩 21

R

- Reagent Chiller의 온도 6
- Real-Time Analysis 1, 5
 - 결과 46
 - 런 폴더 44
 - 템플릿 생성 25
- RFID
 - PR2 21
 - 문제 해결 41
 - 시약 카트리지가 22
 - 추적 1
- RTACComplete.txt 46

RunInfo.xml 44, 46
Run Options 11~12
runParameters.xml 44

S

Sequencing Analysis Viewer 7, 24
Sequencing 화면 24
Software Suite 5
Software Update 12
Support 페이지 1

V

VeriSeq PGS 워크플로우
유지 관리 빈도 30
플로우 셀 8

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.html에서 확인하실 수 있습니다.

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

문서 번호: 15027617 v06 KOR

자료 번호: 20000262



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566(북미 이외 지역)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

연구 전용입니다. 진단 절차에는 사용할 수 없습니다.

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina[®]