

# Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation

전장 유전체 시퀀싱(WGS)  
애플리케이션을 위한  
신속한 고성능  
통합 워크플로우

- 매우 정확하고 신뢰할 수 있는 결과를 생성하는 최적화된 라이브러리 프렙 키트의 성능
- 고민감도 시퀀싱 애플리케이션에 사용되는 다양한 유형의 샘플을 수용하는 유연한 프로토콜
- 적은 양의 DNA 사용을 요구하며 자동화를 지원하여 1.5시간 안에 완료되는 신속한 워크플로우



## 소개

차세대 시퀀싱(Next-generation sequencing, NGS)은 런(run)당 생성되는 데이터의 양과 질을 크게 높여주고, 결과 도출까지 소요되는 비용과 시간을 절약해 주어 유전체 연구를 수행하는 방식에 혁명을 일으켰습니다. Illumina의 시퀀싱 기술은 최근 몇 년간 빠르게 발전했지만, PCR 기반의 라이브러리 준비 프로토콜은 여전히 풀어야 할 숙제로 남아 있습니다. PCR 편향(bias)은 유전체 전체에 걸쳐 균일하지 않은 커버리지를 초래하며, 특히 염기(base) 구성이 고르지 않은 영역에서 두드러지게 나타납니다. Illumina DNA PCR-Free Tagmentation(이하 Illumina DNA PCR-Free)은 이 숙제를 풀기 위해 온비드 태그멘테이션(on-bead tagmentation)과 PCR이 필요 없는 워크플로우를 결합한 특별한 솔루션을 제공합니다(그림 1).

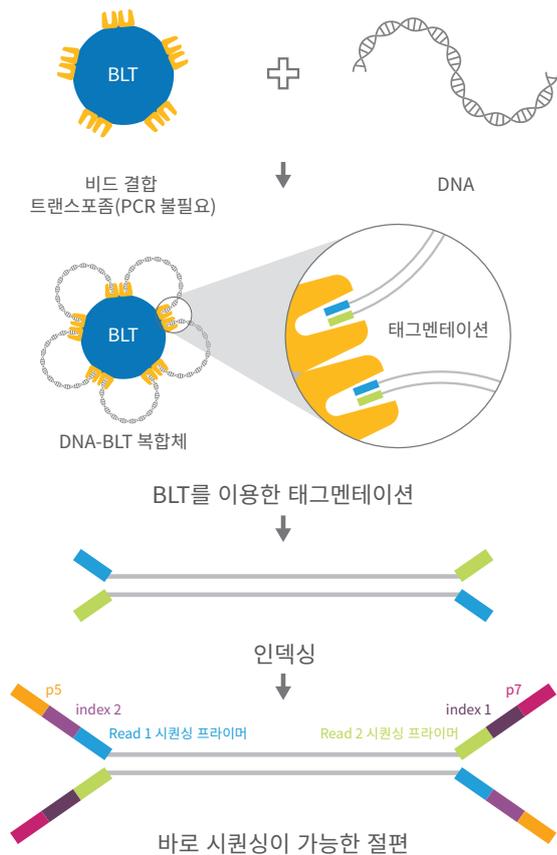


그림 1: Illumina DNA PCR-Free chemistry — 효율적인 샘플 라이브러리 준비 및 인덱싱 솔루션

## Illumina DNA PCR-Free 방법

태그멘테이션은 트랜스포좀을 매개로 하는 반응(transposome-mediated reaction)으로, 태깅(tagging)과 DNA 절편화(fragmentation)를 하나의 신속한 반응으로 결합합니다. 온비드 태그멘테이션은 비드로 결합된 트랜스포좀(bead-bound transposome)을 사용하여 용액 내 태그멘테이션에 비해 더 균일한 태그멘테이션 반응을 일으킵니다. 비드로 결합된 트랜스포좀이 DNA로 포화(saturation)된 후에는 태그멘테이션이 추가적으로 일어날 수 없기 때문에 일관적인 라이브러리 수율(yield)과 균등한 라이브러리 삽입 크기를 제공합니다.<sup>1,2</sup> 또한 Illumina DNA PCR-Free chemistry는 PCR 증폭(amplification) 단계를 배제함으로써 PCR로 인한 편향을 제거하고 매칭된 종양/정상 샘플의 변이 확인이나 인간 전장 유전체 시퀀싱(whole-genome sequencing, WGS)과 같은 민감한 애플리케이션에서도 매우 정확한 시퀀싱 정보를 생성합니다. Illumina DNA PCR-Free assay는 추출된 유전체 DNA(genomic DNA, gDNA) 사용 시 90분 이내, 혈액이나 타액과 같은 채취한 샘플 사용 시 2.5시간 이내에 완료할 수 있습니다(표 1).

표 1: Illumina DNA PCR-Free의 사양

파라미터	Illumina DNA PCR-Free	TruSeq™ DNA PCR-Free
DNA 유형	gDNA, 혈액, 타액, 플라스미드(plasmid), 건조 혈액 반점(dried blood spot, DBS)	gDNA
DNA 사용량	25~300 ng <sup>a</sup>	1~2 µg
절편화 방법	온비드 태그멘테이션	Covaris 초음파 분쇄기
샘플 멀티플렉싱 (Multiplexing)	듀얼 인덱스 384개 <sup>b</sup>	듀얼 인덱스 96개
사용 가능한 시퀀싱 시스템	MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 550, NextSeq™ 1000, NextSeq™ 2000, NovaSeq™ 6000, NovaSeq X	모든 Illumina 시퀀싱 시스템
워크플로우 소요 시간 <sup>c</sup>	약 90분 <sup>d</sup> : 추출된 gDNA, 약 2.5시간: 채취한 혈액 또는 타액 샘플	약 11시간
라이브러리 삽입 크기 <sup>e</sup>	450 bp	350 bp 또는 550 bp

a. Illumina DNA PCR-Free의 최대 사용량: 2 µg  
 b. 멀티플렉싱된 라이브러리 간 편차를 완화하기 위한 인덱스 보정 방법은 [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing](#) 참조.  
 c. 워크플로우 소요 시간은 DNA 추출 및 정량화, 태그멘테이션 및 라이브러리 풀링(pooling) 단계를 포함함.  
 d. gDNA(300 ng)를 포화시키는 데 소요되는 워크플로우 시간  
 e. 라이브러리 삽입 크기를 350 bp 또는 550 bp로 조정하는 방법은 [Tunable insert sizes with Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation](#) 참조.

## 인간 WGS 연구가 요구하는 매우 균일한 전장 유전체 커버리지

커버리지 균일성은 1회의 시퀀싱 런에서 유전체 전체에 걸친 데이터의 포괄성을 측정한 값입니다. 커버리지가 균일하면 평균 시퀀싱 디프스(depth)와 거리가 있는 변이를 더 정확하게 검출할 수 있습니다.<sup>3</sup> 다양한 GC 함량에 대한 커버리지 성능을 평가하기 위해 Illumina DNA PCR-Free와 TruSeq DNA PCR-Free의 커버리지 데이터를 표준화(normalization)한 후 이를 인간 유전체 내 GC 함량(%)에 대해 플로팅했습니다. 인간 유전체 데이터는 대부분 20~70% GC 시퀀스로 구성되어 있습니다. 두 가지 키트 모두 인간 WGS 데이터(그림 2)에서 넓은 범위의 GC 함량(%)에 걸쳐 균일한 커버리지를 보여 Illumina DNA PCR-Free가 인간 WGS 연구에 매우 적합하다는 것을 확인할 수 있습니다.

## GC 또는 AT 함량이 높은 영역에 대한 커버리지 균일성

인간 유전체 전사(transcription) 과정에 관여하는 구조적 요소로 인해 인간 유전자 프로모터(promotor) 영역은 GC가 풍부하거나 GC가 부족한 경우가 많고 PCR 증폭이 어려울 수 있습니다.<sup>4</sup> PCR이 배제된 키트로 준비한 인간 WGS 라이브러리는 GC가 풍부한 특정 프로모터 영역에서 향상된 커버리지를 보일 수 있습니다. Illumina DNA PCR-Free, TruSeq DNA PCR-Free 및 TruSeq DNA Nano(PCR 포함)의 커버리지 성능을 비교하기 위해 인간 세포주 NA12878 gDNA(Coriell Institute)를 사용해 라이브러리를 준비했습니다. 모든 라이브러리는 HiSeq™ 시스템\*에서 2 × 150 bp 런을 설정하여 시퀀싱했습니다. 데이터는 32~40× 커버리지로 다운샘플링(downsampling), 데이터가 많은 쪽을 적게 추출했습니다. Illumina DNA PCR-Free 및 TruSeq DNA PCR-Free의 데이터 세트는 TruSeq DNA Nano 데이터보다 인간 *RNPEPL1* 유전자에서 GC가 풍부한 갭 영역(high-GC gap region)에 대한 우수한 커버리지를 보여줍니다(그림 3). Illumina DNA PCR-Free를 사용하면 분석이 어려운 영역의 커버리지도 향상할 수 있습니다.

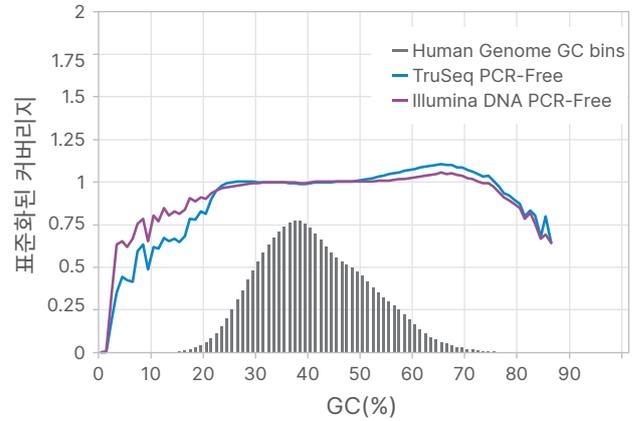
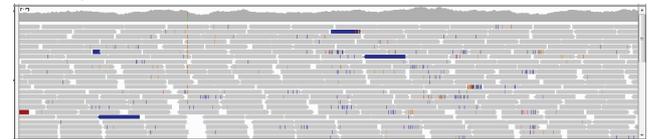


그림 2: Illumina DNA PCR-Free의 커버리지 균일성 — Illumina DNA PCR-Free는 인간 유전체에서 다양한 GC 함량에 대한 균일한 커버리지를 보임.

Illumina DNA PCR-Free



TruSeq PCR-Free



TruSeq Nano

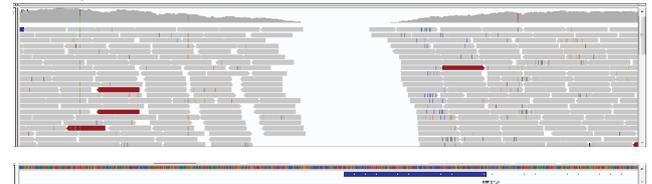


그림 3: GC가 풍부한 영역에 대한 리드 커버리지 비교 — Illumina DNA PCR-Free는 GC가 풍부한 인간 *RNPEPL1* 유전자의 프로모터 영역에 대해 TruSeq DNA PCR-Free 및 TruSeq DNA Nano 라이브러리 플랫폼 키트보다 우수한 리드(read) 커버리지를 보임. 상기 리드 맵은 BaseSpace™ Sequence Hub에서 Integrative Genomics Viewer(IGV) 앱을 이용해 시각화함.

\* HiSeq 시스템은 더 이상 제공되지 않지만, 해당 정보는 표 1에 명시되어 있는 다른 시스템에도 적용됩니다.

## 다양한 DNA 사용량에 걸쳐 확인된 우수한 성능

ILLUMINA DNA PCR-Free의 성능은 다양한 양의 DNA를 사용해 평가했습니다. 라이브러리는 TruSeq DNA PCR-Free에는 600 ng, ILLUMINA DNA PCR-Free에는 20~200 ng<sup>†</sup>의 인간 세포주 gDNA(Coriell Institute, 카탈로그 번호: NA12878)를 사용해 준비했습니다. 라이브러리는 NovaSeq 6000 시스템에서 2 × 150 bp 런을 설정하여 시퀀싱했고 평균 40× 커버리지로 다운샘플링했습니다. 이후 Q-Score(quality score, 품질 점수), 베이스 콜링(base calling) 및 변이 검출 매트릭스를 비교했습니다. 각 라이브러리의 데이터는 정확도가 매우 높았으며, NovaSeq 6000 시스템에서 시퀀싱했을 때 Q30 85%의 염기가 기록되었습니다(그림 4A). 해당 데이터 세트는 상염색체(autosome)와 엑손(exon) 내에서 동등한 베이스 콜링 성능을 보였으며, 변이 검출 성능 또한 동등한 수준으로 확인되었습니다(그림 4B). 20 ng의 적은 사용량<sup>†</sup>을 비롯한 모든 DNA 사용량 조건에 걸쳐 동등한 데이터 품질, 베이스 콜링 성능 및 변이 검출 성능이 관찰되었습니다.

## 온비드 태그멘테이션과 PCR이 필요 없는 프로토콜

ILLUMINA DNA PCR-Free는 온비드 태그멘테이션 및 PCR이 필요 없는 chemistry의 장점을 하나의 키트에 결합하여 강력한 성능을 제공합니다. ILLUMINA DNA PCR-Free의 온비드 포화점(on-bead saturation point)은 300 ng 이상의 gDNA입니다. 온비드 포화는 300 ng 이상의 DNA 사용 시 안정적인 라이브러리 삽입 크기 제어와 표준화된 수율을 가능케 합니다. 이 프로토콜은 라이브러리 준비 전후의 정량화 단계를 최소화해 줍니다. 표준화된 라이브러리는 볼륨에 따라 풀링이 가능하므로 많은 시간이 소요되는 개별 라이브러리의 정량을 피할 수 있습니다. ILLUMINA DNA PCR-Free는 정량화 및 PCR 단계를 제거하여 간소화된 90분 안에 완료되는 assay를 제공합니다(그림 5). 표준화는 150 ng 이상의 DNA를 사용할 때 이루어지지만, 적게는 20 ng<sup>†</sup>의 DNA만을 사용해도 시퀀싱이 가능한 고성능 라이브러리를 만들 수 있습니다. 적은 양의 DNA를 사용해 PCR 없이 라이브러리를 준비할 수 있으므로 DBS를 사용해 WGS 연구를 하는 등 새로운 애플리케이션을 시도해 볼 수 있습니다.

## 높은 처리량을 요구하는 애플리케이션을 위한 효율적인 샘플 멀티플렉싱

ILLUMINA DNA PCR-Free는 ILLUMINA 시퀀싱 시스템에서 정확한 샘플 디멀티플렉싱(demultiplexing)을 지원하는 ILLUMINA DNA Unique Dual Indexes와 호환이 됩니다. 또 최대 384개의 인덱스를 사용할 수 있어 대용량 시퀀싱 프로젝트에 필요한 뛰어난 유연성을 제공할 수 있습니다.

## 자동화 지원 워크플로우

ILLUMINA DNA PCR-Free는 신속하고 간소화된 워크플로우를 기반으로 자동화가 매우 쉽습니다. 비드 기반 워크플로우는 일관적이고 자체 표준화가 가능하므로 연구자는 채취한 혈액 또는 타액 샘플로 시작해 ILLUMINA Lysis 프로토콜을 실행한 후 정량화 단계 없이 라이브러리를 준비할 수 있습니다. 이러한 기능들을 기반으로 리퀴드 핸들링 플랫폼(liquid handling platform)에서 채취한 샘플 배치(batch)를 자동으로 처리하는 간편한 워크플로우가 지원됩니다.

호환성을 확인하기 위해 TruSeq DNA PCR-Free의 자동화된 워크플로우와 PCR 없이 엔자임(enzyme)을 이용하는 두 가지 워크플로우를 ILLUMINA DNA PCR-Free의 워크플로우와 비교했습니다. 워크플로우별로 Hamilton사의 리퀴드 핸들링 로봇에서 96개 샘플 배치로 라이브러리를 준비하는 조건하에 필요한 터치포인트의 수, 실험 기구 수, 팁 수 및 소요 시간을 계산해 비교한 결과, ILLUMINA DNA PCR-Free 워크플로우의 라이브러리 준비 시간이 매우 짧은 것을 확인할 수 있었습니다(표 2).

## ILLUMINA DNA PCR-Free로 절감되는 비용

NGS 라이브러리를 준비할 때 사용하는 실험 기구, 팁과 qPCR 시약은 추가적인 비용을 발생시킵니다. 비드 기반 기술의 큰 장점은 특정 배치에서 준비한 모든 라이브러리를 비드를 이용해 자동으로 표준화할 수 있다는 것입니다. 자체적인 표준화를 통해 개별 라이브러리의 정량화가 필요 없으므로 동일한 볼륨을 기준으로 라이브러리를 간편하게 풀링할 수 있습니다. 멀티플렉싱된 라이브러리 간 발생하는 인덱스 특이적 성능 편차를 보정하는 방법은 [Balancing sample coverage for whole-genome sequencing](#) Technical Note를 참조하시기 바랍니다.

<sup>†</sup> ILLUMINA DNA PCR-Free의 최대 사용량은 2 µg입니다.

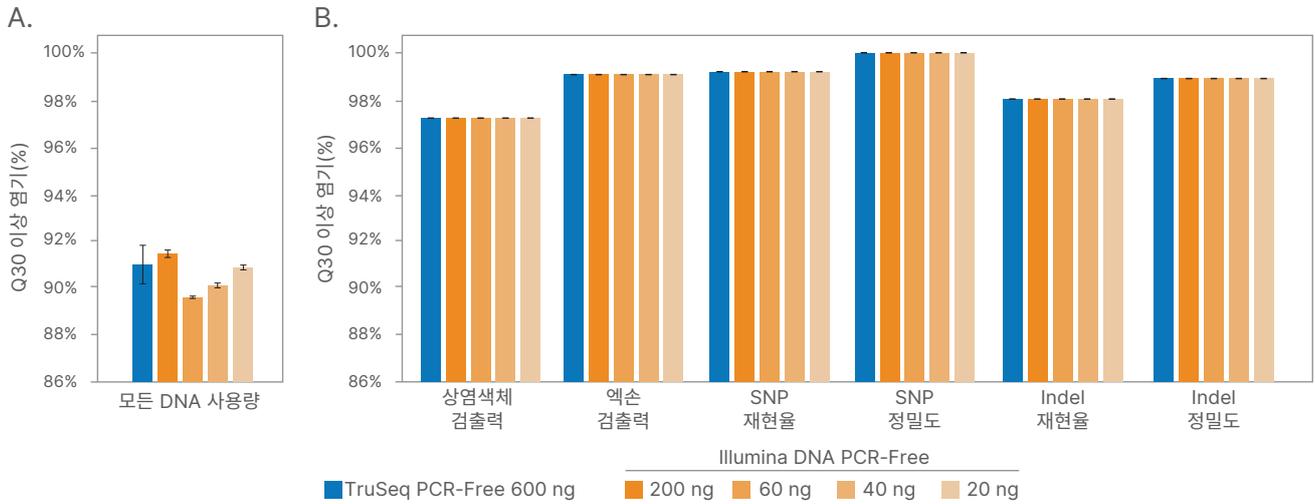


그림 4: 다양한 DNA 사용량에서 확인된 Illumina DNA PCR-Free Prep의 성능 — 다양한 양의 DNA를 사용해 준비한 Illumina DNA PCR-Free 라이브러리는 (A) 모든 DNA 사용량에 걸쳐 품질 기준을 통과했고 (B) 동등한 검출력을 보임. Q30 점수 (추론 베이스 콜 정확도 99.9%); 상염색체 검출력(상염색체 내 기준을 통과한 지노타입 콜(genotype call)이 1개 있는 non-N 레퍼런스 위치의 %); 엑손 검출력(엑손 내 기준을 통과한 지노타입 콜이 1개 있는 non-N 레퍼런스 위치의 %); SNP=single nucleotide polymorphism(단일 염기 다형성); Indel= insertion-deletion(삽입-결실); 정밀도(Precision)는 정확도를 의미하며 [진양성 콜 수/(진양성 콜 수 + 위양성 콜 수)]의 비율로 계산됨; 재현율(Recall)은 민감도를 의미하며 [진양성 콜 수/(진양성 콜 수 + 위음성 콜 수)]의 비율로 계산됨.

TruSeq DNA PCR-Free		
어댑터 라이게이션(Ligation) 및 인덱스 태깅을 통한 라이브러리 준비	수동 라이브러리 정량화 및 표준화	수동 풀링
5시간	2시간	0.5시간

Illumina DNA PCR-Free, 혈액 또는 타액		
Illumina Lysis Kit	PCR 없이 BLT를 이용한 라이브러리 준비	볼륨 기준 풀링
약 1.5시간	1.5시간	0.5시간

Illumina DNA PCR-Free, gDNA		
PCR 없이 BLT를 이용한 라이브러리 준비	볼륨 기준 풀링	
1.5시간	0.5시간	

그림 5: Illumina DNA PCR-Free 워크플로우 — 절편화/태그멘테이션부터 라이브러리 클린업(cleanup) 단계까지 90분 안에 완료되는 신속한 Illumina DNA PCR-Free 워크플로우. Data on file, Illumina Inc., 2019.

표 2: 샘플 96개 사용 시 필요한 자동화 소모품<sup>a</sup>

방법	샘플 유형	터치포인트 수	96개 샘플용 플레이트 수	팁 수	시간
TruSeq DNA PCR-Free	gDNA	20	20	5,504	10시간 10분
Illumina DNA PCR-Free (+ 선택적인 풀의 qPCR 정량화)	혈액, 타액	2(6)	10(12)	2,016 (2,072)	2시간 32분 (4시간 7분)
Illumina DNA PCR-Free (+ 선택적인 풀의 qPCR 정량화)	gDNA	2(6)	8(10)	1,604 (1,660)	1시간 32분 (3시간 7분)

a. 96코어 헤드 + 8채널 리퀴드 핸들링 시스템을 갖춘 Hamilton STAR에 적합한 Hamilton 소프트웨어를 사용해 모델링함. qPCR은 샘플 단위로 모든 워크플로우의 자동화 모델링에 포함됨. Illumina DNA PCR-Free 워크플로우를 제외한 모든 워크플로우는 각 샘플을 qPCR로 측정, 조정 및 풀링하는 것으로 가정함. 샘플의 풀링은 24개의 샘플로 구성된 4개의 풀을 기준으로 함. Data on file, Illumina Inc., 2019.

일반적으로 PCR을 거치지 않는 라이브러리는 qPCR을 통해 정량화되므로 Illumina DNA PCR-Free는 전반적인 라이브러리 준비 프로토콜(예: PCR 라이브러리 증폭 및 라이브러리 준비 이후 정량화)에서 걸쳐 실시되는 qPCR의 횟수를 크게 줄이거나 아예 없애 줍니다. qPCR에 사용되는 시약, 실험 기구, 정량에 사용되는 시약, 팁, 타사의 추출 키트 등으로 인해 추가로 발생하는 비용을 모델링한 결과, Illumina DNA PCR-Free 워크플로우는 상당한 비용 절감 효과가 있었습니다.<sup>5</sup> 예를 들어 총 비용 중 추가 발생 비용이 차지하는 비중은 TruSeq PCR-Free 워크플로우가 약 56%, PCR 없이 엔자임을 이용하는 키트는 약 44%인 것으로 나타났습니다.† Illumina DNA PCR-Free 워크플로우의 경우, 총 비용 중 추가 발생 비용은 약 21%만을 차지하여 다른 라이브러리 프랩 키트에 비해 비용 절감의 폭이 큰 것을 알 수 있습니다.‡

## 요약

Illumina DNA PCR-Free는 온비드 태그멘테이션 및 PCR이 필요 없는 chemistry의 장점을 결합한 특별한 솔루션을 제공합니다. 온비드 태그멘테이션을 통해 비드 기반 표준화, 불륨을 기준으로 한 간편한 라이브러리 풀링 그리고 라이브러리 준비 단계 전후 정량화 단계 생략이 지원됩니다. PCR이 없는 워크플로우는 반복적이거나 고르지 않은 유전체 영역에서도 매우 균일한 커버리지를 제공하며, 워크플로우를 간소화하여 전반적인 소요 시간을 단축해 줍니다. 또 통합된 Flex Lysis Reagent Kit는 혈액, 타액 및 DBS와 같은 채취한 샘플을 워크플로우에 적용할 수 있도록 해 줍니다. Illumina DNA PCR-Free는 인간 WGS 연구, 미생물 유전체 *de novo* 어셈블리(assembly) 또는 종양/정상 샘플의 변이 검출 등 민감한 애플리케이션에 대해 뛰어난 사용 용이성, 균일한 커버리지, 정확도 높은 데이터를 제공합니다.

## 상세 정보

[Illumina DNA PCR-Free Prep](#)

† 라이브러리 프랩 키트 관련 비용은 본 계산을 위해 매칭된 비용입니다. 추가 비용은 가변적이며 워크플로우 가정에 따라 총 비용의 일부로 계산됩니다(표 2).

## 제품 목록

제품	카탈로그 번호
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (24 samples)	20041794
Illumina DNA PCR-Free Prep, Tagmentation (96 samples)	20041795
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091660
Illumina Lysis Reagent Kit	20042221

## 참고 문헌

1. Illumina. Illumina DNA Prep. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/illumina-dna-prep-data-sheet-770-2020-009.pdf) Published 2020. Accessed September 1, 2023.
2. Bruinsma S, Burgess J, Schlingman D, et al. [Bead-linked transposomes enable a normalization-free workflow for NGS library preparation](#). *BMC Genomics*. 2018;19(1):722. Published 2018 Oct 1. doi:10.1186/s12864-018-5096-9
3. Illumina. Comparison of TruSeq Sample Preparation Kits. [illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote\\_truseq\\_comparison.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/products/technotes/technote_truseq_comparison.pdf) Published 2013. Accessed January 31, 2022.
4. Bajic VB, Choudhary V, Hock CK. [Content analysis of the core promoter region of human genes](#). *In Silico Biol*. 2004;4(2):109-125.
5. Data on file. Illumina, Inc., 2019.



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

© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.  
 모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.  
 특정 상표 정보는 [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html)을 참조하십시오.  
 M-KR-00219 KOR