

NovaSeq™ X 시리즈로 최적의 성능 확보

성공적인 런을 위한 라이브러리
로딩 농도 최적화 단계

- NovaSeq X 시리즈 플로우 셀 사용 시 최적의 라이브러리 로딩 농도 결정
- 다양한 종류의 라이브러리 풀링 시 고려해야 할 라이브러리 호환성 확인

소개

NovaSeq X 시리즈는 Illumina의 최신 대용량 시퀀싱 시스템으로, 높은 처리량(high-throughput)의 시퀀싱 워크플로우를 크게 향상시켰습니다.¹ NovaSeq X 플로우 셀에 적용된 새로운 클러스터링(clustering) chemistry와 같은 핵심 기술 혁신을 통해 연구 규모, 유연성, 지속 가능성 및 랩 운영이 개선될 수 있습니다. NovaSeq X 클러스터링 chemistry는 이전 Illumina 시퀀싱 시스템에 적용된 클러스터링 chemistry와 비교했을 때 최소량의 샘플만을 사용해 더 향상된 딥 시퀀싱(deep sequencing) 애플리케이션을 지원한다는 장점이 있습니다.

다른 시퀀싱 시스템에서의 프로젝트를 NovaSeq X 시리즈로 옮기거나, 현재 NovaSeq X 시리즈를 사용하는 프로젝트의 플로우 셀(flow cell)이나 레시피(recipe) 구성을 새롭게 바꾸려는 경우, 라이브러리 로딩을 최적화하여 데이터 수율(yield) 및 품질을 크게 향상시킬 수 있습니다. 이 Technical Note는 NovaSeq X 시리즈로 최적의 결과를 얻을 수 있도록 라이브러리 품질, 라이브러리 정량, 라이브러리 로딩 농도, 뉴클레오티드 다양성(nucleotide diversity) 및 라이브러리 풀링(pooling) 고려 사항을 안내해 드립니다.

라이브러리 품질

삽입 길이가 짧은 라이브러리와 라이브러리 준비 과정에서 유입되는 오염물(예: 어댑터 다이머(adapter dimer), 프라이머 다이머(primer dimer), 불완전하게 제작된 라이브러리)은 NovaSeq X 시리즈의 클러스터링 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있습니다. 일반적으로 삽입 길이가 짧은 라이브러리와 오염물은 클린업(cleanup) 단계나 크기 선별(size selection) 단계에서 제거됩니다. 필요시 기존의 라이브러리 준비 프로토콜에 선택적으로 비드 정제(bead purification) 단계를 추가해 더 효과적으로 삽입 길이가 짧은 라이브러리와 오염물을 제거해 볼 수도 있습니다.² 라이브러리가 준비되면, 연구자는 시퀀싱을 시작하기에 앞서 모든 라이브러리의 품질과 순도(purity)를 확인해야 합니다. Agilent사의 Bioanalyzer나 Fragment Analyzer 시스템을 사용해 라이브러리 무결성(integrity), 평균 라이브러리 삽입 크기 및 오염물을 확인합니다.

 [Optimal variant calling with Illumina DNA PCR-Free Prep on the NovaSeq X Series Technical Note](#)

라이브러리 정량

NovaSeq X 시리즈에 정확한 농도의 라이브러리를 로딩하고 최적의 결과를 얻으려면 라이브러리의 양을 정확하게 측정해야 합니다. 라이브러리의 정량에는 일관성과 정확도를 위해 크기를 정규화(size-normalized)한 qPCR 방법이 권장됩니다. 하나의 라이브러리 내 프라이머 다이머, 라이브러리 절편을 포함해 모든 DNA 종(species)을 측정하는 형광 측정기와는 달리, qPCR은 Illumina 어댑터에 상응하도록 설계된 프라이머를 이용해 기능적인 라이브러리 절편만을 측정합니다.

 [Best practices for library quantification](#)

라이브러리 로딩 농도

라이브러리 종류에 따라 최적의 로딩 농도를 확인하는 것이 매우 중요합니다. 로딩 농도란 시퀀싱을 위해 기기에 로딩된 라이브러리의 최종 농도를 의미합니다. 라이브러리를 준비한 후에는 사용하는 라이브러리의 종류, 시퀀싱 시스템 및 시약 키트에 적합한 로딩 농도로 라이브러리를 희석해야 합니다.

너무 높거나 낮은 농도의 라이브러리를 로딩하면 시퀀싱 품질 및 수율이 저하될 수 있으며, 극한 조건에서는 런 실패를 초래할 가능성도 있습니다. 언더로딩(Underloading)은 나노웰(nanowell) 이용률(% Occupied)을 낮추고 중복 리드(duplicate read) 수를 증가시킬 수 있어, 표적 커버리지(target coverage)를 달성하기 위해서는 더 많은 리드가 필요할 수 있습니다. 반면 오버로딩(overloading)은 낮은 %의 필터 통과 클러스터(% PF)를 야기할 수 있습니다.

한편 엔자임을 이용한 절편화(enzymatic fragmentation) 등으로 인해 삽입 크기 분포가 넓은 라이브러리는 로딩 농도가 높을 경우 평균 삽입 길이가 더 짧게 나타날 수 있습니다(그림 1). 따라서 새로운 종류의 라이브러리를 시퀀싱하거나 새로운 종류의 플로우 셀 또는 레시피를 사용할 때는 라이브러리 로딩 농도를 최적화(즉, 언더로딩과 오버로딩 사이의 균형 파악)하는 것을 적극 권장합니다.

다음의 실험 방법 예시를 참고해 로딩 농도를 적정(titration)하고 1차 및 2차 매트릭스를 평가하여 최적의 로딩 조건을 확인하시기 바랍니다.

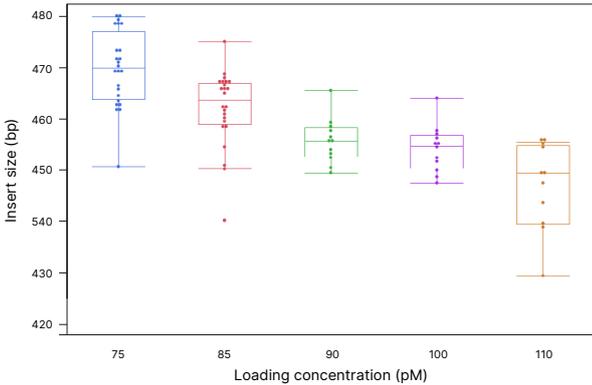


그림 1: NovaSeq X Series10B Flow Cell 사용 시 TruSeq PCR-Free 라이브러리의 최적 로딩 농도 확인 — 일반적으로 로딩 농도가 낮을수록 평균 라이브러리 삽입 크기가 큰 클러스터가 관찰됨. 상기 데이터는 NovaSeq X Control Software v1.2로 생성됨

예시: 최적의 라이브러리 로딩 농도 확인 방법

언더로딩된 농도와 오버로딩된 농도를 비롯한 넓은 농도 범위를 테스트하는 것이 매우 중요합니다. 이때 %PF, % Occupied와 같은 1차 메트릭스와 Duplicates, Insert size, Coverage와 같은 2차 메트릭스를 함께 활용하여 최적의 로딩 농도를 확인합니다.

1단계: 적정 실험 설계

NovaSeq 6000 시스템에서의 프로젝트를 NovaSeq X 시리즈로 옮기려는 경우, 표준 온보드 클러스터링 워크플로우를 사용해 NovaSeq 6000 시스템 로딩 농도의 약 30%를 중심으로 적정을 진행합니다.

이 예시에서 TruSeq™ DNA PCR-Free 라이브러리는 일반적으로 NovaSeq 6000 S4 Flow Cell을 사용한 표준 워크플로우를 통해 350 pM의 농도로 로딩되었습니다. 적정은 NovaSeq X Series 10B Flow Cell의 개별 레인(lane)에서 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120 및 160 pM의 농도로 진행되었습니다.

2단계: 나노웰 이용률 및 필터 통과 클러스터 확인

각 로딩 농도에 대해 레인별로 % PF 및 % Occupied 메트릭스를 플로팅하여 어떤 농도값이 언더로딩, 오버로딩, 또는 균형 있는 로딩 결과를 가져왔는지 확인합니다(그림 2). Sequencing Analysis Viewer 소프트웨어에서 각 레인에 대한 이 두 가지 메트릭스를 확인할 수 있습니다.

Plotting % Occupied by % PF to optimize loading for the NovaSeq X/X Plus, NovaSeq 6000, and iSeq 100

이 예시에서 40 pM 라이브러리는 양의 기울기를 보여 언더로딩된 런이었음을 알 수 있고(그림 2A), 160 pM 라이브러리는 수직에 가까운 약간 음의 기울기를 보여 오버로딩된 런이었음을 알 수 있습니다(그림 2B). 80~100 pM의 농도로 테스트한 모든 라이브러리는 % PF vs % Occupied 플롯에서 최적의 로딩 모양을 나타냈습니다(그림 2C).

3단계: 중복 리드 확인

중복 리드의 비율(% Duplicates)을 분석해 목표 농도 범위를 좁힙니다. 이 예시에서는 최적의 농도 범위가 80~120 pM로 좁혀졌으며, 이 범위에서 중복 리드는 ≤ 15%였습니다. 이 중에서 중복이 적었던 90 pM, 100 pM 및 120 pM의 농도에 초점을 맞췄습니다(그림 3).

4단계: 평균 커버리지 검토

모든 농도에 대한 커버리지를 분석합니다. 커버리지는 애플리케이션에 따라 차이가 있으며, 동일한 레인에 로딩된 라이브러리 수의 영향을 받습니다. 이 예시에서는 30x 커버리지 값이 90 pM 및 100 pM 농도일 때 최적의 농도로 신뢰도를 높였습니다(그림 3).

5단계: 라이브러리 삽입 크기 분석

라이브러리 삽입 크기를 검토합니다. 일부 라이브러리 유형의 경우 로딩 농도가 증가하면 라이브러리 삽입 크기가 감소할 수 있습니다. 실제 라이브러리 및 애플리케이션에 알맞은 최적의 범위는 워크플로우 요구 사항에 따라 다를 수 있습니다.

이 예시에서 90~120 pM 농도의 샘플들은 평균 라이브러리 삽입 크기가 약 421~427 bp로 비슷했습니다(그림 3). 따라서 NovaSeq X Series 10B Flow Cell을 사용한 전장 유전체 시퀀싱(whole-genome sequencing, WGS) 수행 시 최적의 TruSeq DNA PCR-Free 라이브러리 로딩 농도는 90 pM과 100 pM입니다.

NovaSeq X Control Software v1.3은 높은 로딩 농도에 대한 향상된 허용치를 제공하므로 적은 중복 리드와 더 많은 사용 가능한 리드를 감안할 수 있습니다. 여기서 중요한 것은 이 소프트웨어가 직접적으로 중복 리드를 줄이는 것이 아니라, 일반적으로 로딩 농도가 높을수록 중복 리드가 줄어드는 것으로 관찰된다는 점입니다. 로딩 농도를 높였을 때는 라이브러리 삽입 크기의 감소와 풀링 변동 계수(coefficient of variation, CV)의 증가를 면밀하게 모니터링해야 합니다. 구 버전에서 NovaSeq X Control Software v1.3으로 업그레이드한 경우 다시 로딩 농도를 적정할 필요는 없지만, 원한다면 로딩 농도를 다시 최적화해 볼 수 있습니다.

최적화된 로딩 농도에 대한 다른 예시는 [NovaSeq X Plus 제품 지원 문서의 라이브러리 변성 및 희석하기 섹션](#)을 참조하시기 바랍니다.

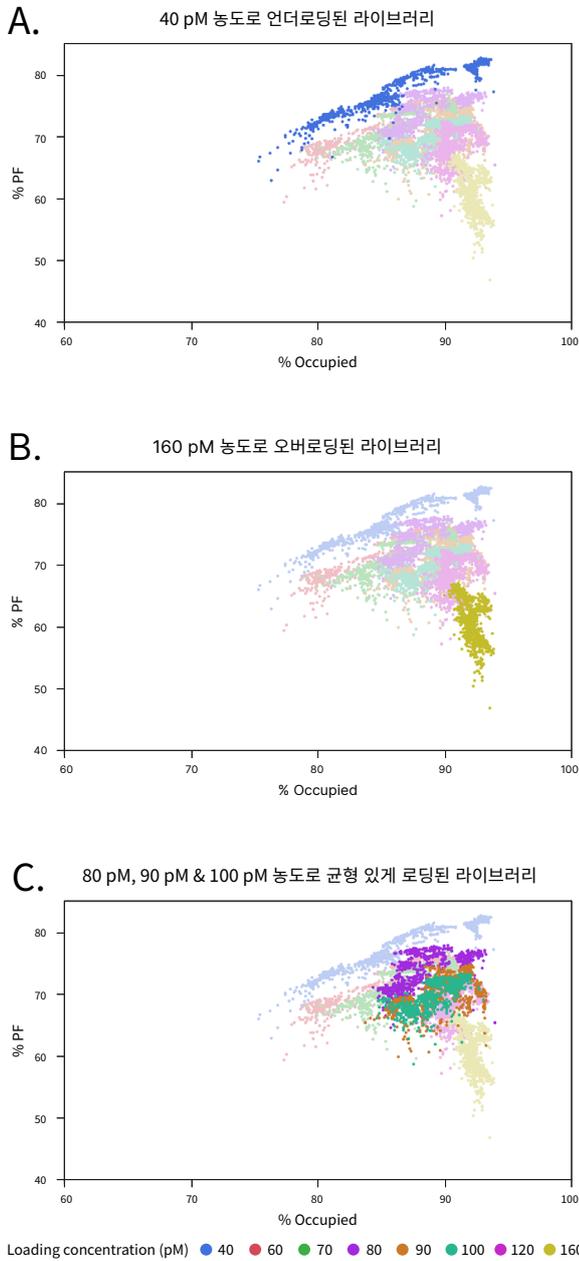


그림 2: NovaSeq X Series 10B Flow Cell 사용 시 WGS 런 최적화를 위한 나노웰 이용률 및 필터 통과 클러스터 비율 확인 — 다양한 라이브러리 로딩 농도에 걸친 필터 통과 클러스터(% PF) vs 나노웰 이용률(% Occupied)을 플로팅한 적정 실험 예시로, 점은 카메라의 각 화각(field of view)을 나타내며 2번의 플로우 셀 런에 걸쳐 산출한 평균을 의미함. (A) 40 pM의 농도로 언더로딩된 런, (B) 160 pM의 농도로 오버로딩된 런, (C) 80 pM, 90 pM 및 100 pM의 농도로 균형 있게 로딩된 런. 상기 데이터는 NovaSeq X Control Software v1.2로 생성됨

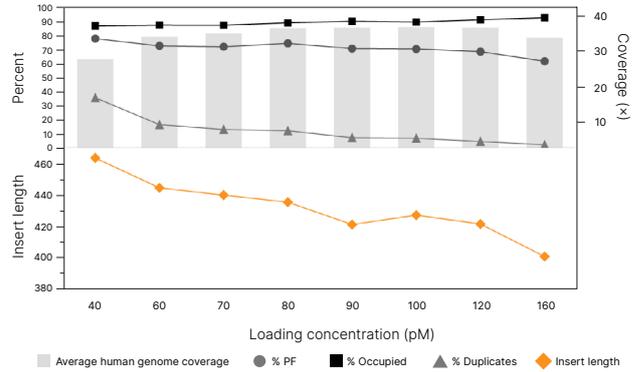


그림 3: NovaSeq X Series 10B Flow Cell 사용 시 WGS 런 최적화 — 중복 리드 비율, 평균 커버리지, 라이브러리 삽입 크기를 분석한 적정 실험 예시. 상기 데이터는 NovaSeq X Control Software v1.2로 생성됨

뉴클레오티드 다양성

뉴클레오티드 다양성은 런의 모든 사이클에 존재하는 각 염기(A, C, G, 또는 T)의 상대적 비율을 의미합니다. 뉴클레오티드 균형은 시퀀싱 시스템의 컬러 매트릭스 수정(color matrix correction)과 강도 정규화(intensity normalization)에 중요합니다. 뉴클레오티드 다양성을 높이고 균형 있는 시그널을 생성하려면, PhiX를 spike-in하되 처음에는 높은 %로 시작했다가 런 성능을 고려하여 spike-in 양을 줄여 나갑니다. 또는 다양성이 낮은 라이브러리를 다양성이 높은 다른 라이브러리와 풀링합니다.



[What is nucleotide diversity and why is it important?](#)

[How much PhiX spike in is recommended when sequencing low diversity libraries on Illumina platforms?](#)

라이브러리 풀링

NovaSeq X 시리즈는 개별적으로 로딩이 가능한 레인을 통해 매우 유연한 샘플 멀티플렉싱(multiplexing) 옵션을 제공합니다. 여러 가지 라이브러리를 하나의 레인에 함께 풀링하거나 동일한 플로우 셀에 풀링하는 경우, 최적의 결과를 위해 다음의 모범 사례를 따르도록 합니다.

클러스터링 효율(Clustering efficiency) 차이로 인한 커버리지 이슈를 방지하기 위해 라이브러리의 삽입 크기가 확연하게 다를 경우(예: 전장 유전체 라이브러리 vs microRNA 라이브러리), 라이브러리를 각각 다른 레인에 로딩하도록 합니다. 또는 삽입 길이가 크게 다른 라이브러리를 혼합하는 경우 긴 라이브러리를 더 많이 spike-in합니다. 정확한 spike-in 비율은 각각의 라이브러리 유형에 따라 실증적으로 결정해야 합니다.

한 번의 런에서 리드 길이나 인덱스 사이클 수가 다른 라이브러리를 혼합하는 경우, 시퀀싱에는 긴 사이클을 사용하고, 샘플 시트(sample sheet)에는 BCL Convert 실행 중 트리밍(trimming)을 위해 짧은 사이클 횟수를 할당합니다.

플로우 셀에 전체적으로 다크 사이클 레시피(dark cycle recipe)를 적용해야 하는 라이브러리를 혼합할 때는 주의를 기울여야 합니다.³ 다크 사이클이 호환되는 다른 유형의 라이브러리만 런에 로딩해야 합니다(표 1). Cycle 1부터 시작되는 고유한 분자 식별자(unique molecular identifier, UMI) 시퀀스가 있는 라이브러리(예: Illumina cfDNA Prep with Enrichment)는 다크 사이클이 호환되지 않습니다. NovaSeq X Control Software v1.3 사용 시 PhiX spike-in이 5% 이상이라는 전제하에 Illumina mRNA 라이브러리와 Total RNA stranded 라이브러리는 다크 사이클 없이 시퀀싱할 수 있습니다.

또한 low-plexity(즉, 2 plex 라이브러리에서 8 plex 라이브러리까지) 풀링 시 최적의 색상 균형을 위해 XLEAP-SBS™ chemistry의 인덱스 어댑터 풀링 전략을 따르도록 합니다.



표 1: 라이브러리 유형별 다크 사이클 시퀀싱 호환성

라이브러리 프랩 키트	다크 사이클 호환성	
	호환 가능(다크 사이클 레시피 허용)	호환 불가능(다크 사이클 없이 다른 플로우 셀 사용)
Illumina Stranded Total RNA Prep	X	
Illumina Stranded mRNA Prep	X	
Illumina RNA Prep with Enrichment	X	
TruSeq RNA Prep 제품 라인	X	
Illumina DNA Prep	X	
Illumina DNA PCR-Free Prep	X	
Illumina DNA Prep with Enrichment	X	
Illumina cfDNA Prep with Enrichment		X
TruSeq DNA Prep 제품 라인	X	
TruSight™ Oncology 500 Tissue & ctDNA 제품 라인		X
대부분의 단일세포 라이브러리 프랩 제품 라인		X

요약

NovaSeq X 시리즈의 혁신적인 클러스터링 chemistry는 최소량의 샘플만으로도 더 높은 처리량, 더 데이터 집약적인 애플리케이션, 더 향상된 딥 시퀀싱을 지원합니다. 이 Technical Note에 소개된 모범 사례에 따라 라이브러리 품질 확인, 라이브러리 로딩 농도 최적화, 라이브러리 풀링을 진행하면 NovaSeq 시리즈로 최적의 성능을 확보할 수 있습니다.

상세 정보

[NovaSeq X 및 NovaSeq X Plus 시퀀싱 시스템](#)

[High-accuracy next-generation sequencing with the NovaSeq X Series Technical Note](#)

[Optimizing cluster density on Illumina sequencing systems Technical Note](#)

[Cluster optimization overview](#)

[다크 사이클 시퀀싱](#)

참고 문헌

1. Illumina. NovaSeq X and NovaSeq X Plus Sequencing Systems specification sheet. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-x-series-spec-sheet-m-us-00197/novaseq-x-series-specification-sheet-m-us-00197.pdf. Published 2022. Updated 2024. Accessed April 17, 2024.
2. Illumina. Optimal variant calling with Illumina DNA PCR-Free Prep on the NovaSeq X Series technical note. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/ilmn-dna-pcr-free-prep-novaseq-x-tech-note-m-gl-02388/ilmn-dna-pcr-free-prep-novaseq-x-tech-note-m-gl-02388.pdf. Published 2023. Accessed April 17, 2024.
3. Illumina. Custom recipes for Illumina Stranded libraries on NovaSeq X Series. knowledge.illumina.com/instrumentation/novaseq-x-x-plus/instrumentation-novaseq-x-x-plus-faq-list/000008394. Published 2023. Updated 2024. Accessed May 31, 2024.



무료 전화(한국) 080-234-5300

techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. All rights reserved.

모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.

특정 상표 정보는 www.illumina.com/company/legal.html을 참조하십시오.

M-GL-02678 v2.0 KOR