

# TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒

## 参考指南



本文档及其内容归 Illumina, Inc. 及其附属公司（“Illumina”）所有，并且仅供其客户用于与本文档内所描述的产品用途相关的合同用途，不得用于其他任何目的。在未获得 Illumina 的事先书面同意的情况下，不得出于任何目的使用或分发本文档及其内容，和/或以其他任何方式对其进行传播、披露或复制。Illumina 不通过本文档向第三方授权其任何专利、商标、所有权或习惯法权利或类似权利。

本文档中的说明必须由具备资格且受过相关培训的人员严格且明确执行，以确保本文档中描述的产品能够获得适当且安全的使用。在使用此类产品之前，相关人员必须通读并理解本文档中的所有内容。

未能完整阅读并明确遵守本文档中包含的所有说明可能会导致产品损坏、对用户或其他人员造成人身伤害以及对其他财产造成损害。

对于由不当使用本文档中描述的产品（包括其部件或软件）引起的任何后果，ILLUMINA 概不承担任何责任。

© 2017 Illumina, Inc. 保留所有权利。

Illumina、DesignStudio、TruSeq 和流动底部设计是 Illumina, Inc. 及/或其附属公司在美国和/或其他国家/地区的注册商标或正在注册的商标。所有其他名称、徽标和其他商标均为其各自所有者的财产。

仅供研究 - 不适合人类或动物的任何临床或治疗性使用。本产品包括由 Promega Corporation 生产，供 Illumina, Inc. 配送的 2800M 对照品 DNA。



## 修订历史记录

文档	日期	更改描述
文档号 1000000002191 v04	2017 年 6 月	<p>添加了杂交寡核苷酸库步骤中的扩增仪程序。</p> <p>添加了针对双库操作流程每个库中唯一标签组合的要求。</p> <p>解释了定量和稀释 DNA 的程序。</p> <p>更新了去除未结合的寡核苷酸的步骤：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 将简介中的 SW1 清洗步骤数量更正为三个。</li> <li>• 在程序中指定了 HYB 板，并且在清洗微珠时将该板置于磁力架上。</li> </ul>
文档号 1000000002191 v03	2016 年 3 月	<p>添加了备用双链操作流程。</p> <p>更新了“扩增文库”中的 PCR 循环次数准则。</p> <p>修改了“杂交寡核苷酸库”中的扩增仪程序。</p> <p>对“杂交寡核苷酸库”中的 ELE/ELB 混合液说明做了解释。</p> <p>更正了 LNW1 的存储温度。</p>
文档号 1000000002191 v02	2016 年 2 月	<p>将“标准化文库”中的 LNA1 用量更正为 44 微升。</p> <p>将温度添加到“杂交寡核苷酸库”中的扩增仪程序。</p>
文档号 1000000002191 v01	2016 年 1 月	<p>修改了“杂交寡核苷酸库”中的扩增仪程序。</p> <p>删除了针对旧版有经验用户操作卡的参考，并添加了针对定制操作流程选择器的参考。</p> <p>对一些程序进行重命名及合并，以提高连贯性。</p>
文档号 1000000002191 v00	2015 年 10 月	最初版本

# 目录

<b>第 1 章概述</b> .....	<b>1</b>
简介 .....	1
DNA 输入建议 .....	1
更多资源 .....	2
<b>第 2 章操作流程</b> .....	<b>3</b>
简介 .....	3
提示和技巧 .....	3
文库制备工作流程 .....	5
DNA 定量和稀释 .....	6
杂交寡核苷酸库 .....	7
去除未结合的寡核苷酸 .....	10
延伸及连接结合的寡核苷酸 .....	11
扩增文库 .....	12
纯化文库 .....	14
标准化文库 .....	17
混合文库 .....	20
<b>附录 A 支持信息</b> .....	<b>21</b>
简介 .....	21
缩写 .....	21
试剂盒内含物品 .....	22
耗材和设备 .....	23
扩增仪 HYB 程序 .....	26
<b>技术协助</b> .....	<b>29</b>

# 第 1 章概述

简介 .....	1
DNA 输入建议 .....	1
更多资源 .....	2

## 简介

此操作流程介绍如何使用 Illumina® TruSeq® 定制扩增子低输入量文库制备试剂盒制备多达 96 个带唯一标签的基因组 DNA (gDNA) 双末端文库。该试剂盒支持向上跨 600 千碱基对基因组的靶向区域测序，其单次多重反应中包含多达 1,536 个扩增子。这种具有高度靶向性的方法支持广泛的应用，可快速有效地发现、验证和筛查基因变异。

TruSeq 定制扩增子低输入操作流程提供：

- ▶ 精简的基于 96 孔的工作流程，可使用自动化方式处理。
- ▶ 多重分析功能，在一次反应中可扩增多达 1,536 个扩增子；一次运行中可测序多达 96 个样品。
- ▶ 快速简单的工作流程，一个板内的 96 个样品可生成多达 1,536 个扩增子，所需的手动操作时间不到 3 小时。

TruSeq 定制扩增子低输入文库制备操作流程支持：

- ▶ 合格的 FFPE 样品。
- ▶ 低至 10 纳克的 DNA 输入量，具体视 DNA 质量而定。
- ▶ 定制设计，可使用 Illumina 在线 DesignStudio™ 软件针对多种扩增子大小及参考基因组创建和管理项目。
- ▶ 自动数据分析，可使用仪器上的简单自动分析软件对所有样品进行变异检出和分析。
- ▶ 一套完全集成的 DNA 数据化解决方案可提供的便利性，包括在线探针设计和订购、实验分析方法、测序、自动分析数据，并提供查看结果的离线软件。

## 备用双链操作流程

本指南包含一套备用双链操作流程，用于添加另一组镜像的补充扩增子，以靶向两条 DNA 链的所有基因位点。备用操作流程允许制备多达 96 个带唯一标签的 gDNA 双末端文库（库 A 和库 B 分别含 48 个）。建议对福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）样品采用该操作流程。设计配置期间或设计完成之后，您都可以在 DesignStudio 中对双链操作流程进行配置。

## DNA 输入建议

在开始文库制备之前，请先对输入 DNA 进行定量并评估 DNA 质量。输入越大，文库产量就会越大，特异性（百分比比对序列）等测序指标也会提升。

DNA 类型	支持的扩增子大小 (bp)	DNA 质量	DCq	输入 (ng)*
基因组 DNA	150、175、250	高	--	10
FFPE 基因组 DNA	150、175	高	-1 到 1	10
		中	>1.0-2.5	20-50
		低	2.5-4.0	50-100

\* 输入量依 DCq 而定。有关详细信息，请参见《TruSeq FFPE DNA 文库制备质量控制参考指南》（文档号 100000002136 v00）。

## 输入 DNA 定量

使用基于荧光的定量方法（例如 Qubit dsDNA 实验分析方法试剂盒或 PicoGreen）对起始基因组材料进行定量。不要使用基于紫外光谱仪的方法。

基于荧光的方法使用双链 DNA (dsDNA) 特定染色剂 即使 在有很多常见污染物的情况下也可以准确具体地对 dsDNA 进行定量。相反，由于 gDNA 制备样品上通常存在 RNA 和其他污染物，因此基于 260 OD 读数的紫外光谱仪方法可能会高估 DNA 浓度。

## 评估 DNA 质量

使用 TruSeq FFPE DNA 文库制备质量控制试剂盒（Illumina 商品目录号 FC-121-9999）可以确定 TruSeq 定制扩增子低输入文库的 FFPE DNA 质量和输入量。

## 稀释输入 DNA

- ▶ 根据 DNA 的类型和质量对其进行定量，并稀释至所需的输入量。有关详细信息，请参见 [DNA 输入建议](#)（第 1 页）。
- ▶ 您可以稀释并存储多于所需量的 DNA，供以后使用。按 [DNA 定量和稀释](#)（第 6 页）中所述，稀释 RS1 和 SS1 中的 DNA 并加以存储。

## 更多资源

请访问 Illumina 网站上的 [TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒支持页面](#) 以下载软件，查看相应文档、培训资源以及 Illumina 兼容产品的相关信息。

以下文档可从 Illumina 网站下载。

资源	描述
自定义操作流程选择器	<a href="https://support.illumina.com/custom-protocol-selector.html">support.illumina.com/custom-protocol-selector.html</a> 用来生成定制的端到端文档的向导，会针对测序运行所用的文库制备方法、运行参数和分析方法而调整。
TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒检查表 (文档号 100000002204)	为有经验的用户提供步骤检查表。
TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒耗材和设备清单 (文档号 100000002296)	提供用户自备耗材和设备的交互式检查表。
TruSeq FFPE DNA 文库制备质量控制参考指南 (文档号 100000002136)	提供有关如何使用 TruSeq FFPE DNA 质量控制试剂盒，确定 FFPE 提取的 gDNA 样品的片段化状态和扩增潜能的说明。

# 第 2 章操作流程

简介	3
提示和技巧	3
文库制备工作流程	5
DNA 定量和稀释	6
杂交寡核苷酸库	7
去除未结合的寡核苷酸	10
延伸及连接结合的寡核苷酸	11
扩增文库	12
纯化文库	14
标准化文库	17
混合文库	20

## 简介

本章介绍 TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒操作流程。

- ▶ 对于 16 个样品装试剂盒，一次应至少制备 8 个样品。对于 96 个样品装试剂盒，一次应至少制备 16 个样品。
- ▶ 请使用指定的参数，遵照操作流程按序操作。
- ▶ 请先确认试剂盒内含物品，并确保您已备齐所需的耗材和设备，然后再继续操作。对于 PCR 前和 PCR 后程序，此操作流程需要使用不同的磁力架。

## 混合准备

如果您计划对文库进行混合，请在制备文库之前先记录样品相关信息。有关详细信息，请参见 TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒支持页面。

## 提示和技巧

除非在操作流程中指定了安全停止点，否则请立即执行下一步骤。

## 避免交叉污染

- ▶ 添加或转移**每个样品**之后，均请更换吸头。
- ▶ 为**每行和每列**添加接头或引物之后，均请更换吸头。
- ▶ 从工作区中取走未使用的标签接头试管。

## 将板密封

- ▶ 在执行操作流程中的下列步骤之前，请始终密封 96 孔板：
  - ▶ 摇动步骤
  - ▶ 振荡步骤
  - ▶ 离心步骤
  - ▶ 扩增步骤
- ▶ 使用粘性密封膜盖住板，并使用橡胶辊进行密封。
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜可在  $-40^{\circ}\text{C}$  至  $110^{\circ}\text{C}$  下发挥作用，适用于带裙边或半裙边的 PCR 板。如需振动、离心和长期存储，请使用 Microseal “B”。
- ▶ Microseal “A” 粘性封膜适用于扩增。

## 板转移

- ▶ 在不同的板间转移剂量时，请将一个板各孔中的指定剂量转移到另一个板的相应孔中。

## 离心

- ▶ 可在此程序的的任何步骤中进行离心，使位于孔底部的液体或微珠汇合，以免样品流失。
  - ▶ 要使微珠聚成颗粒，请以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。

## 处理微珠

- ▶ 缓慢吸打。
- ▶ 混合时要充分彻底。
- ▶ 如果微珠已吸入移液器吸头，请重新将其分配到磁力架上的板中，然后等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- ▶ 清洗微珠时：
  - ▶ 对板使用适合的磁力架。
  - ▶ 分配液体，以便润湿各孔侧边上的微珠。
  - ▶ 让板留在磁力架上，直到说明指示将其取下。
  - ▶ 当板在磁力架上时切勿摇动板。请勿摇荡微珠沉淀。

## 文库制备工作流程

下图介绍了 TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒的工作流程。

图 1 TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒工作流程



## DNA 定量和稀释

此步骤会对输入 DNA 进行定量和稀释，使其达到适当的浓度以及所需的稀释度，以供后续步骤使用。对于 FFPE 样品，请准备两份或三份 DNA 样品，以提高变异检出的敏感度。

### 耗材

- ▶ RS1（重悬溶液 1）
- ▶ SS1（样品稳定溶液 1）
- ▶ 基因组 DNA
- ▶ LoBind 微量离心管

### 关于试剂

- ▶ 您可以稀释并存储比所需用量更多的 DNA，供以后使用。稀释 RS1 和 SS1 中的 DNA，如程序中所述。
- ▶ 在 LoBind 微量离心管中制备等份稀释的 DNA，并将其存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下，最长可存储 4 周。
- ▶ 将解冻且稀释的 DNA 存储在  $2^{\circ}\text{C}$  至  $8^{\circ}\text{C}$  下，最长可存储 2 周。
- ▶ 避免对稀释的 DNA 进行重复冷冻和解冻。

### 准备

- 1 准备下列耗材。

试剂	存储	说明
DNA	$2^{\circ}\text{C}$ 到 $8^{\circ}\text{C}$	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。请勿振荡。
RS1	$15^{\circ}\text{C}$ 到 $30^{\circ}\text{C}$	如果溶液之前存储于 $2^{\circ}\text{C}$ 至 $8^{\circ}\text{C}$ 下，则将其搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
SS1	$2^{\circ}\text{C}$ 到 $8^{\circ}\text{C}$	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。

### 程序

- 1 使用 Qubit 或 PicoGreen 等荧光法对 DNA 进行定量。
- 2 将 RS1 中的 DNA 稀释至 10-25 纳克/微升，具体取决于初始 DNA 浓度以及所需的 DNA 输入量。  
对于优质 DNA，建议将其稀释至 10-25 纳克/微升。有关对中低质量 DNA 的建议，请参见 [DNA 输入建议](#)（第 1 页）。
- 3 使用相同的荧光定量方法对稀释的 DNA 重新定量。
- 4 按以下方式进一步稀释 LoBind 试管中的 DNA。对于双链操作流程，请多制备约 10% 的 DNA，以备移液错误时待用。
  - a 稀释 RS1 中所需的 DNA 输入量，制成最终剂量为 4 微升的溶液。
  - b 将 1 微升 SS1 加到 4 微升稀释的 DNA 中。

示例：如果您在第 2 步中已将优质 DNA 稀释至 10 纳克/微升，请将 RS1 中的溶液从 10 纳克/微升稀释至 2.5 纳克/微升，制成 4 微升稀释的 DNA。

## 杂交寡核苷酸库

此过程对定制寡核苷酸库（其中包含您的目标靶向区域特定的上游和下游寡核苷酸）进行杂交。执行复制操作，以提高体细胞变异检出的可信度。

### 耗材

- ▶ CAT（定制扩增子寡核苷酸试管）
- ▶ [双链操作流程] CAT A（定制扩增子寡核苷酸试管 A）
- ▶ [双链操作流程] CAT B（定制扩增子寡核苷酸试管 B）
- ▶ OHS2（寡核苷酸杂交测序试剂 2）
- ▶ 2800M（对照品 DNA 2800M）
- ▶ ACP3（对照品寡核苷酸库）
- ▶ RS1（重悬溶液 1）
- ▶ HYP（杂交板）条形码标签
- ▶ 稀释的 DNA
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ Microseal “A” 粘性封膜
- ▶ LoBind 微量离心管
- ▶ 不含 RNase/DNase 的八联管和管帽
- ▶ 为后续程序做准备：
  - ▶ ELB（延伸连接缓冲液）
  - ▶ ELE（延伸连接酶）
- ▶ 为后续程序做准备：
  - ▶ SPB（样品纯化微珠）
  - ▶ SW1（严格清洗液 1）



#### 警告

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关其他环境、健康和安全管理信息，请参见 [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) 中的 SDS。

### 关于试剂

- ▶ CAT（或者双链 CAT A 和 CAT B）
  - ▶ 您可以稀释并存储多于所需量的 CAT（或者 CAT A 和 B），供以后使用。稀释 RS1 中的 CAT（或者 CAT A 和 B），如以下程序（或针对 48 个样品的程序（双链）（第 9 页））中所述。
  - ▶ 使用多通道移液器从 PCR 八联管分配稀释的 CAT，八联管中的每支试管包含 70 微升试剂。
  - ▶ 制备等分的稀释 CAT，并将其存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下，最长可存储 12 个月。
- ▶ OHS2
  - ▶ 由于试剂的粘度较高，请缓慢吸出并分配。
  - ▶ 每次使用前都要充分振荡，然后进行短暂的离心。确保所有沉淀物均已溶解。
  - ▶ 混合时要充分彻底。

## ▶ 2800M

- ▶ 在要制备的每批样品中包含 2800M 对照品 DNA。使用此对照品可在需要帮助时让 Illumina 技术支持进行故障诊断。如果您的实验分析方法中未包含此对照品，Illumina 将无法提供帮助。
- ▶ ACP3 专门与 2800M 对照品 DNA 搭配使用。

## 准备

### 1 准备下列耗材。

试剂	存储	说明
DNA	2°C 到 8°C	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。请勿振荡。
CAT 或者 CAT A 和 CAT B (适用于双链)	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻 30 分钟。 振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
ACP3	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻 30 分钟。 振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
OHS2	2°C 到 8°C	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 充分振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
2800M	2°C 到 8°C	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
RS1	15°C 到 30°C	如果溶液之前存储于 2°C 至 8°C 下，则将其搁置 30 分钟， 使其恢复到室温。 振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
SPB	2°C 到 8°C	搁置以使其恢复到室温，为后续程序做准备。 请勿超过 25°C。
SW1	2°C 到 8°C	搁置以使其恢复到室温，为后续程序做准备。
ELB	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻 20 分钟，然后置于冰上。
ELE	-25°C 到 -15°C	置于冰上。

### 2 在 Bio-Rad 扩增仪上保存以下 HYB 程序（反应液剂量为 25 微升）：

- ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C。
  - ▶ 第 1 步：在 95°C 下持续 3 分钟。
  - ▶ 第 2 步：从 90°C 开始，递减 0.5°C，保持 30 秒，然后每秒降温 0.1°C。
  - ▶ 第 3 步：第 2 步再执行 59 次。
  - ▶ 第 4 步：从 60°C 开始，递减 0.5°C，保持 1 分钟，然后每秒降温 0.1°C。
  - ▶ 第 5 步：第 4 步再执行 19 次。
  - ▶ 第 6 步：从 50°C 开始，递减 1°C，保持 2 分钟，然后每秒降温 0.1°C。
  - ▶ 第 7 步：第 6 步再执行 9 次。
  - ▶ 第 8 步：从 40°C 开始，保持 10 分钟，然后每秒降温 0.1°C。
- 此 HYB 程序为常规程序。有关具体的编程说明，请参见 [扩增仪 HYB 程序（第 26 页）](#)。

### 3 将新的 96 孔 PCR 板标为“HYP”。

## 针对 96 个样品的程序

- 1 在 LoBind 微量离心管的每个样品孔中，用 2.5 微升 RS1 稀释 2.5 微升 CAT。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 2 在 LoBind 微量离心管中，用 2.5 微升 RS1 稀释 2.5 微升 ACP3。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。

- 3 在 LoBind 微量离心管中，用 2 微升 RS1 和 1 微升 SS1 稀释 2 微升 2800M。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 4 将 5 微升稀释的 2800M 加到 HYP 板的一个孔中。
- 5 将 5 微升稀释的 ACP3 加到含有稀释的 2800M 的孔中，用作实验分析方法的对照品。
- 6 将 5 微升 RS1 加到 1 个孔中，用作非模板对照品。
- 7 将 5 微升稀释的 DNA 加到剩余的孔中。
- 8 将 5 微升稀释的 CAT 加到所有孔中（含有 2800M 的孔除外）。
- 9 将 15 微升 OHS2 加到每个孔中。使用 P20 移液器缓慢吸打以混匀溶液。
- 10 如果形成了气泡，请在  $100 \times g$  下将板离心 20 秒钟。
- 11 置于预编程序的扩增仪上并运行 HYB 程序。
- 12 按以下方式混合 ELE 和 ELB。
  - ▶ [16 个样品装试剂盒] 将 18 微升 ELE 转移到 ELB 试管。轻弹并翻转以混匀溶液。请勿振荡。
  - ▶ [96 个样品装试剂盒] 将 137 微升 ELE 转移到 ELB 试管。轻弹并翻转以混匀溶液。请勿振荡。



#### 注意

即使需要处理的样品数少于 16 或 96 个，也要制备足够试剂盒所用的 ELE/ELB 混合液。如有必要，可将等分的混合液存储于  $-25^{\circ}\text{C}$  到  $-15^{\circ}\text{C}$  下，最长可存储 3 个月。冷冻解冻重复次数不得超过六次。

- 13 将 ELB/ELE 混合液置于冰上。  
该混合液在对结合的寡核苷酸执行延伸及连接程序时会使用。

## 针对 48 个样品的程序（双链）

- 1 在 LoBind 微量离心管的每个样品孔中，用 2.5 微升 RS1 稀释 2.5 微升 CAT A。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 2 在 LoBind 微量离心管的每个样品孔中，用 2.5 微升 RS1 稀释 2.5 微升 CAT B。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 3 在 LoBind 微量离心管中，用 2.5 微升 RS1 稀释 2.5 微升 ACP3。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 4 在 LoBind 微量离心管中，用 2 微升 RS1 和 1 微升 SS1 稀释 2 微升 2800M。脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 5 将 5 微升稀释的 2800M 加到 HYP 板的一个孔中。
- 6 将 5 微升稀释的 ACP3 加到含有稀释的 2800M 的孔中，用作实验分析方法的对照品。
- 7 将 5 微升 RS1 加到一个孔中，用作非模板对照品。
- 8 将 5 微升稀释的 DNA 加到板左半边的孔中，从第 1 列开始加。
- 9 将 5 微升稀释的 DNA 加到板右半边的孔中，从第 7 列开始加。不要将 DNA 加到含有 2800M 的孔中。
- 10 将 5 微升稀释的 CAT A 加到含有 CAT A 要用到的 DNA 的每个孔中。
- 11 将 5 微升稀释的 CAT B 加到含有 CAT B 要用到的 DNA 的每个孔中。
- 12 将 15 微升 OHS2 加到每个孔中。使用 P20 移液器缓慢吸打以混匀溶液。
- 13 如果形成了气泡，请在  $100 \times g$  下将板离心 20 秒钟。

14 置于预编程程序的扩增仪上并运行 HYB 程序。

15 按以下方式混合 ELE 和 ELB。

- ▶ [16 个样品] 将 18 微升 ELE 转移到 ELB 试管中。轻弹并翻转以混匀溶液。请勿振荡。
- ▶ [96 个样品] 将 137 微升 ELE 转移到 ELB 试管中。轻弹并翻转以混匀溶液。请勿振荡。



#### 注意

即使需要处理的样品数少于 16 或 96 个，也要制备足够试剂盒所用的 ELE/ELB 混合液。如有必要，可将等分的混合液存储于  $-25^{\circ}\text{C}$  到  $-15^{\circ}\text{C}$  下，最长可存储 3 个月。冷冻解冻重复次数不得超过六次。

16 将 ELB/ELE 混合液置于冰上。

该混合液在对结合的寡核苷酸执行延伸及连接程序时会使用。

## 去除未结合的寡核苷酸

此步骤使用 SPB 从 gDNA 中去除未结合的寡核苷酸。使用 SW1 清洗三遍，再用浓度为 60% 的乙醇清洗一遍，确保完全去除未结合的寡核苷酸。

## 耗材和设备

- ▶ SW1 (严格清洗液 1)
- ▶ SPB (样品纯化微珠)
- ▶ 新制备的浓度为 60% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ 磁力架
  - ▶ DynaMag-96 Side Skirted Magnet (与 96 孔全裙边 PCR 板配合使用)
  - ▶ DynaMag-96 Side Magnet (与 Eppendorf 96 孔 twin.tec PCR 板配合使用)



#### 警告

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关其他环境、健康和安全隐患，请参见 [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) 中的 SDS。

## 关于试剂

- ▶ 使用 SW1 冲洗位于孔侧边的所有微珠。
- ▶ SPB
  - ▶ 确保微珠处于室温下。
  - ▶ 每次使用前都要用力振荡 SPB。
  - ▶ 混合时要充分彻底。

## 准备

- 1 将 3 毫升 SPB 转移到一个试管中，以供 PCR 前过程使用。
- 2 将 6 毫升 SPB 转移到一个试管中，以供 PCR 后过程使用。
- 3 使用纯乙醇为每个孔制备 200 微升浓度为 60% 的新鲜乙醇。

## 程序

- 1 将 25 微升 SPB 加到 HYB 板的每个孔中。缓慢吸打以混匀溶液。
- 2 在室温下孵育 5 分钟。
- 3 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 4 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 5 将板置于磁力架上，按以下方式清洗微珠三次。
  - a 将 80 微升 SW1 加到每个孔中。
  - b 在室温下孵育 30 秒钟。
  - c 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 6 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的 SW1。
- 7 将 80 微升浓度为 60% 的乙醇加到每个孔中。
- 8 在室温下孵育 30 秒钟。
- 9 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 10 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的乙醇。
- 11 风干 5 分钟。**立即**执行下一步。

## 延伸及连接结合的寡核苷酸

此步骤用于连接杂交的上游和下游寡核苷酸。DNA 聚合酶从上游寡核苷酸开始延伸，通过靶向区域后由一个 DNA 连接酶连接到下游寡核苷酸的 5' 末端。最后形成的产物包含目标靶向区域，而且扩增所需的序列排列在这些区域的两侧。

## 耗材

- ▶ ELB/ELE 混合液
- ▶ Microseal “A” 粘性密封膜
- ▶ LoBind 微量离心管
- ▶ 为后续程序做准备：
  - ▶ EDP（增强的 DNA 聚合酶）
  - ▶ EMM（增强的预先混合液）
- ▶ 为后续程序做准备：
  - ▶ 标签 i7 接头（A7XX）
  - ▶ 标签 i5 接头（A5XX）

## 关于试剂

- ▶ EMM 的冷冻解冻重复次数不得超过六次。
- ▶ ELB/ELE 混合液
  - ▶ 翻转并轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。请勿振荡。
  - ▶ 即使需要处理的样品数少于 16 或 96 个，也要制备足量的混合液。
  - ▶ 如果需要，可将等分的混合液存储于  $-25^{\circ}\text{C}$  到  $-15^{\circ}\text{C}$  下，最长可存储 3 个月。
  - ▶ 冷冻解冻重复次数不得超过六次。

## 准备

- 在扩增仪上保存以下 EXT\_LIG 程序（反应液剂量为 22 微升）：
  - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
  - ▶ 37°C 下 45 分钟
  - ▶ 70°C 下 20 分钟
  - ▶ 保持在 4°C
- 准备下列耗材。

试剂	存储	说明
ELB/ELE 混合液	-25°C 到 -15°C	如果混合液为冷冻状态，请先在室温下解冻，然后再置于冰上。翻转并轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。请勿振荡。
EDP	-25°C 到 -15°C	置于冰上。轻弹以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
EMM	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻 20 分钟。振荡试管混匀溶液。
标签接头 (i7 和 i5)	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻 20 分钟。振荡每个试管以混匀溶液。使用 1.7 毫升 Eppendorf 试管进行短暂的离心。置于冰上以供后续程序使用。

## 程序

- 从磁力架上取下板。
- 使用 P100 或 P200 移液器，将 22 微升 ELB/ELE 混合液加到每个孔中。
- 使用设置为 20 微升的移液器或者 P20 移液器，上下吸打以混匀溶液。请确保移液器中没有残留微珠。
- 如果形成了气泡，请在 100 × g 下离心 20 秒钟。
- 置于扩增仪上并运行 EXT\_LIG 程序。
- 按以下所示在 LoBind 微量离心管中混合 EDP 和 EMM。

样品数量	EDP (μl)	EMM (μl)
1	1.1	21
16	17.6	334
48	53	1003
96	106	2006

容量中包含额外的 10%。

- 用移液器上下吸打以混匀 EDP/EMM 混合液，然后进行短暂的离心。置于冰上，供下一个步骤使用。

## 扩增文库

此流程可扩增延伸连接产物并添加标签 1 (i7) 接头、标签 2 (i5) 接头以及形成簇所需的序列。

每个样品必须具有唯一的标签组合，包括单独库中用于双库设计的样品。确保 CAT A 库中样品与 CAT B 库中样品的标签组合均不相同。

## 耗材

- ▶ EDP/EMM 混合液
- ▶ 标签 i7 接头 (A7XX)
- ▶ 标签 i5 接头 (A5XX)
- ▶ Microseal “A” 粘性封膜
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜



### 注意

如要在将板放到扩增仪上之前密封板，请使用 Microseal “A”。如需振动、离心和长期存储，请使用 Microseal “B”。

## 准备

- 1 在扩增仪上保存以下 PCR 程序。根据下表确定循环次数。  
PCR 循环次数是以 10 纳克的 DNA 输入和 CAT 中的扩增子个数为依据的。
  - ▶ 95°C 下 3 分钟
  - ▶ X 次以下循环：
    - ▶ 98°C 下 20 秒钟
    - ▶ 67°C 下 20 秒钟
    - ▶ 72°C 下 40 秒钟
  - ▶ 72°C 下 1 分钟
  - ▶ 保持在 10°C

复杂度	PCR 循环次数 (X) <sup>1,2</sup>
< 96 个扩增子	32
97-384 个扩增子	29
385-700 个扩增子	28
701-999 个扩增子	27
1,000-1,536 个扩增子 <sup>3</sup>	25

<sup>1</sup> 如果是 FFPE 样本或 DNA 输入小于 10 纳克，请增加一次循环。

<sup>2</sup> 要达到所需的文库产量和特异性，请根据寡核苷酸库优化 PCR 循环次数。

<sup>3</sup> 对于高复杂度集合，如果设计的扩增子大小较大，则比对特异性可能会有所降低。



### 注意

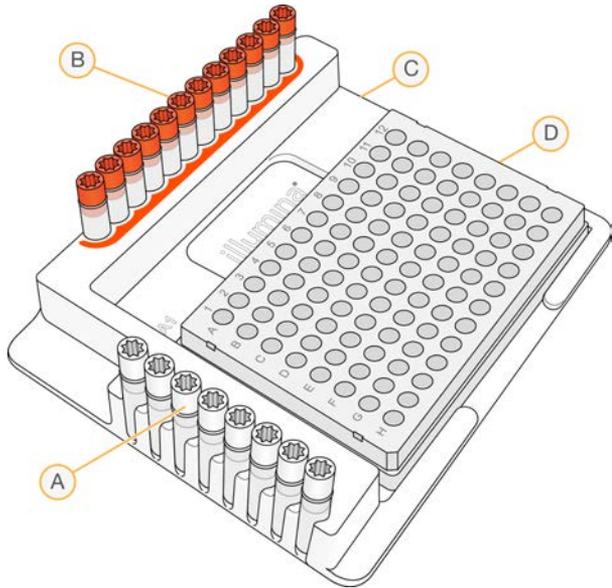
在处理 2800M/ACP3 对照品时，请使用与 CAT 相同的条件。

- 2 若要使用无冰冷藏箱，请将温度平衡到 2°C 至 8°C。

## 程序

- 1 在 TruSeq 标签板定位装置的 1-12 列布置标签 1 (i7) 接头。
- 2 在 TruSeq 标签板定位装置的 A-H 行布置标签 2 (i5) 接头。

图2 TruSeq 标签板定位装置



- A A-H行：标签2 (i5) 接头 (白色管帽)
- B 1-12列：标签1 (i7) 接头 (橙色管帽)
- C TruSeq 标签板定位装置
- D HYP 板

- 3 将包含微珠的 HYP 板置于 TruSeq 标签板定位装置上。
- 4 将 4 微升的各标签 1 (i7) 接头从上到下添加到各列。将每个 i7 接头试管上的管帽更换为新的橙色管帽。
- 5 将 4 微升的各标签 2 (i5) 接头从左到右添加到各行。将每个 i5 接头试管上的管帽更换为新的白色管帽。
- 6 将板置于含冰或无冰的冷藏箱上。
- 7 将 20 微升的 EDP/EMM 混合液添加到每个孔中。用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 8 在  $280 \times g$  下离心 1 分钟。
- 9 将板置于含冰或无冰的冷藏箱上。
- 10 立即转移到 PCR 后区域。
- 11 置于预编程的扩增仪上，然后运行相应循环次数的 PCR 程序。  
PCR 期间，微珠保留在孔中。

### 安全停止点

若要停止操作，请将板密封并在  $2^{\circ}\text{C}$  至  $8^{\circ}\text{C}$  下存储，最长可存放 2 天。或者，请将板整夜留在扩增仪上。

## 纯化文库

此步骤使用 SPB (样品纯化微珠) 纯化来自其他反应成分的 PCR 产物。

### 耗材和设备

- ▶ RSB (重悬缓冲液)
- ▶ SPB (样品纯化微珠)

- ▶ 条形码标签
  - ▶ CLP (纯化板)
  - ▶ LNP (文库标准化板)
- ▶ 96 孔 MIDI 板 (2)
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜
- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ 96 孔磁力架 (与 96 孔 MIDI 存储板搭配使用)

## 关于试剂

- ▶ 在使用 SPB 之前，请先用力振荡。

## 准备

- 1 准备下列耗材。

试剂	存储	说明
SPB	2°C 到 8°C	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。请勿超过 25°C。
RSB	15°C 到 30°C	若为冷冻状态，请在室温下解冻 20 分钟。振荡试管混匀溶液。

- 2 使用纯乙醇为每个孔制备 400 微升浓度为 80% 的新鲜乙醇。
- 3 将一块新的 MIDI 板标为 CLP。
- 4 将一块新的 MIDI 板标为 LNP。

## 程序

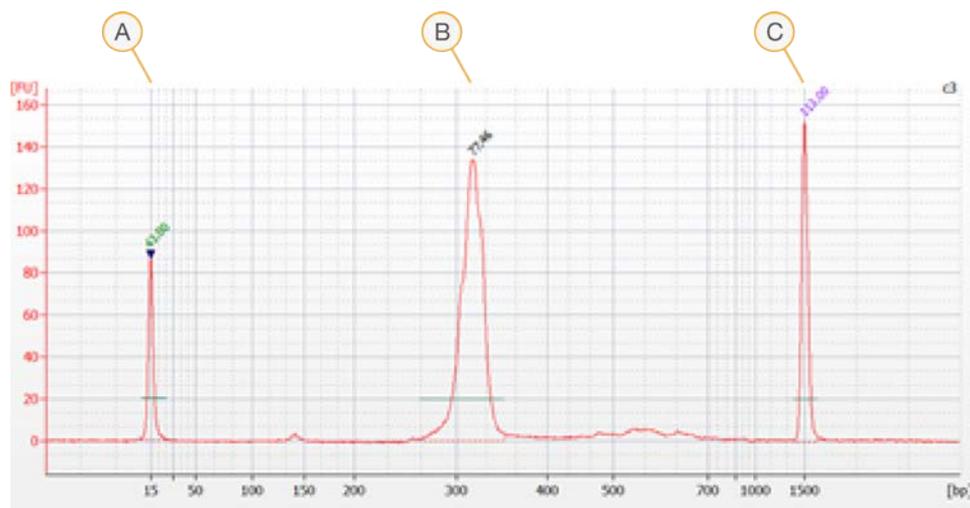
- 1 在 280 × g 下将 HYP 板离心 1 分钟。
- 2 从 HYP 板的每个孔中，分别转移 45 微升上层清液到 CLP 板的相应孔中。请尽可能不要转移微珠。
- 3 将 36 微升 SPB 加到 CLP 板的每个孔中。
- 4 将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 在室温下孵育 5 分钟。
- 6 在 280 × g 下离心 1 分钟。
- 7 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止 (约 2 分钟)。
- 8 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 9 按以下方式清洗两次。
  - a 将 200 微升新制备的浓度为 80% 的乙醇加到每个样品孔中。
  - b 在磁力架上孵育 30 秒钟。
  - c 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 10 使用 20 微升移液器从每个孔中取出残余的 EtOH。
- 11 从磁力架上取下，并风干 5 分钟。
- 12 将 25 微升 RSB 加到每个孔中。
- 13 将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。

- 14 请确保所有微珠均已重悬。如有必要，请用移液器上下吸打以混匀溶液，并重复振动步骤。
- 15 在室温下孵育 2 分钟。
- 16 在  $280 \times g$  下离心 1 分钟。
- 17 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 18 从 CLP 板的每个孔中，分别转移 20 微升已纯化的文库到 LNP 板的相应孔中。
- 19 针对 CLP 板中的残余液体，采用以下方法之一对样品和对照品进行等分：
  - ▶ 通过 4% 琼脂糖凝胶按 5 微升分装。
  - ▶ 如果样品个数不超过 6 个，使用 DNA 1000 芯片，通过 Agilent Bioanalyzer 按 1 微升分装。
  - ▶ 如果样品个数大于 16-96 个，使用标准灵敏度 NGS 片段分析试剂盒，通过 Advanced Analytical Fragment Analyzer 按 2 微升分装。
  - ▶ 如果样品个数为 2-96 个，使用 D1000 ScreenTape 实验分析方法，通过 Agilent 2200 TapeStation 按 1 微升分装。

表 1 预期的 PCR 产物大小

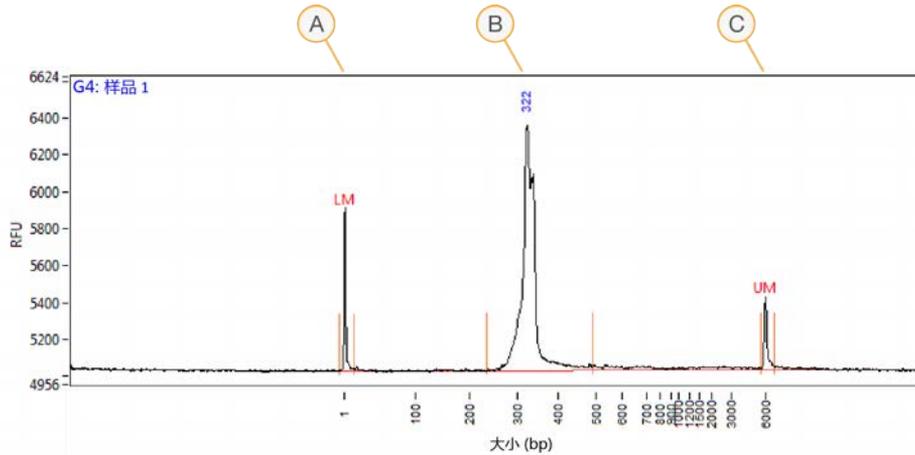
扩增子大小	PCR 产物大小
150 bp	~280 bp
175 bp	~310 bp
250 bp	~350 bp
2800M	~310 bp

图 3 Bioanalyzer 轨迹示例



- A 标记
- B 200 碱基对扩增子的预期 PCR 产物（约 350 碱基对）
- C 标记

图 4 Fragment Analyzer 示例 (所示的是预期的 2800M/ACP3 PCR 产物)



- A 标记
- B 200 碱基对扩增子的预期 PCR 产物 (约 350 碱基对)
- C 标记

### 安全停止点

若要停止操作，请将板密封并在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下存储，最长可存放 6 个月。

## 标准化文库

此步骤规范了每个文库的数量，以确保混合文库中的均衡表示。只有含 DNA 的样品才需要通过后续步骤进行处理。

### 耗材和设备

- ▶ LNA1 (文库标准化添加剂 1)
- ▶ LNB1 (文库标准化微珠 1)
- ▶ LNW1 (文库标准化清洗液 1)
- ▶ LNS2 (文库标准化存储缓冲液 2)
- ▶ SGP (存储板) 条形码标签
- ▶ 新制备的浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH
- ▶ 96 孔带裙边的 PCR 板
- ▶ 15 毫升圆锥形试管
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜
- ▶ 96 孔磁力架 (与 96 孔 MIDI 存储板搭配使用)



#### 警告

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关其他环境、健康和安全管理信息，请参见 [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) 中的 SDS。

**警告**

此组试剂包含  $\beta$ -巯基乙醇。在通风罩中或通风良好的区域执行以下程序。

**关于试剂**

- ▶ 混合时要充分彻底。
- ▶ 仅混合当前实验所需的 LNA1 和 LNB1 用量。
- ▶ 使用 P1000 移液器将 LNB1 转移到 LNA1。
- ▶ 将剩余的 LNA1 和 LNB1 分别存储在相应的温度下。
- ▶ 确保在使用前重悬 LNB1。要想在流动槽上获取一致的簇密度，必须进行均匀重悬。

**准备**

- 1 准备下列耗材。

试剂	存储	说明
LNA1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 振荡试管混匀溶液。在灯光前仔细检查。确保所有沉淀物均已溶解。
LNB1	2°C 到 8°C	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 振荡至少 1 分钟。 不时将其倒转，使之重悬。确保试管底部没有沉淀。
LNW1	2°C 到 8°C	在室温下解冻。搁置 30 分钟，使其恢复到室温。
LNS2	15°C 到 30°C	若为冷冻状态，请在室温下解冻 20 分钟。 振荡试管混匀溶液。

- 2 制备新鲜的浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH。
- 3 将新的 96 孔板标为“SGP”。

**程序**

- 1 将每文库 44 微升 LNA1 加到新的 15 毫升圆锥形试管中。
- 2 使用 P1000 移液器重悬 LNB1。
- 3 每个文库转移 8 微升 LNB1 到装有 LNA1 的 15 毫升圆锥形试管中。倒转以混匀溶液。
- 4 将 45 微升 LNA1/LNB1 加到 LNP 板的每个孔中。  
每个孔包含 20 微升文库。
- 5 以 1800 转/分的速度振动 30 分钟。  
如果持续时间超出或少于 30 分钟，都可能会影响文库表示和簇密度。
- 6 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 7 取走并丢弃所有上层清液。
- 8 从磁力架中取走。
- 9 按以下方式清洗两次。
  - a 将 45 微升 LNW1 添加到每个文库孔中。
  - b 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。
  - c 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
  - d 取走并丢弃所有上层清液。

- 10 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的 LNW1。
- 11 从磁力架中取走。
- 12 将 30 微升新鲜的浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH 加到每个孔中。
- 13 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。
- 14 将 LNP 板置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 15 将 30 微升 LNS2 加到 SGP 板的每个孔中。
- 16 从 LNP 板的每个孔中，分别转移 30 微升上层清液到 SGP 板的相应孔中。
- 17 在  $1000 \times g$  下离心 1 分钟。

#### **安全停止点**

若要停止操作，请将板密封并在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下存储，最长可存放 30 天。

## 混合文库

此步骤通过将等量标准化文库组合在一支试管中来混合文库。



### 注意

在双链操作流程中，两个文库分别代表从 CAT A 和 CAT B 生成的每种样品。要分析每种样品的结果，它们所对应的 CAT A 和 CAT B 文库必须在同一流动槽上一起运行。

## 耗材

- ▶ PAL (Pooled Amplicon Library, 混合扩增子文库) 条形码标签
- ▶ 微量离心管
- ▶ 不含 RNase/DNase 的八联管和管帽

## 准备

- 1 如果 SGP 板是冷冻存储的，请按以下方式做准备：
  - a 在室温下解冻。
  - b 在  $1000 \times g$  下离心 1 分钟。
  - c 用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 2 将一支新的 Eppendorf 试管标为“PAL”。

## 程序

- 1 在  $1000 \times g$  下离心 1 分钟。
- 2 将 5 微升的每个文库逐列转移到八联管。
- 3 将板密封并存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下。
- 4 将八联管的内含物转移到 PAL 试管中。用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 5 对混合文库进行变性及稀释，达到测序运行所需的相应装入浓度。  
有关说明，请参见您的仪器的变性和稀释文库指南。

## 安全停止点

若要停止操作，请盖上试管盖，并将其在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下存储，最长可存放 7 天。

# 支持信息

简介 .....	21
缩写 .....	21
试剂盒内含物品 .....	22
耗材和设备 .....	23
扩增仪 HYB 程序 .....	26

## 简介

本指南中介绍的操作流程假定您已查看本附录内容，确认了试剂盒中的物体，并且已取得所有需要的耗材和设备。

## 缩写

缩写	定义
2800M	对照品 DNA 2800M
ACP3	扩增子对照品寡核苷酸库 3
CAT	自定义扩增子寡核苷酸试管
CAT A CAT B	自定义扩增子寡核苷酸试管 A 自定义扩增子寡核苷酸试管 B
CLP	纯化板
EDP	增强的 DNA 聚合酶
ELB	延伸连接缓冲液
ELE	延伸连接酶
EMM	增强的预先混合液
HT1	杂交缓冲液
HYP	杂交板
LNA1	文库标准化添加剂 1
LNB1	文库标准化微珠 1
LNP	文库标准化板
LNS2	文库标准化存储缓冲液 2
LNW1	文库标准化清洗液 1
OHS2	寡核苷酸测序杂交试剂 2
PAL	混合的扩增子文库
RS1	重悬溶液 1
RSB	重悬缓冲液
SPB	样品纯化微珠
SGP	存储板
SS1	样品稳定溶液 1
SW1	严格清洗液 1

## 试剂盒内含物品

请确保您已备齐本节指定的所有试剂后再继续执行文库制备程序。需要一个 TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒和一个 TruSeq 定制扩增子标签试剂盒。

试剂盒名称	商品目录号
TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒 (16 个样品)	FC-134-2002
TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒 (96 个样品)	FC-134-2001
TruSeq 定制扩增子标签试剂盒 (96 个标签, 384 个样品)	FC-130-1003

## TruSeq 定制扩增子低输入试剂盒内含物品 (16 个样品, FC-134-2002) (96 个样品, FC-134-2001)

### 1 号盒, 存储于 PCR 前区域

数量	试剂	描述	存储温度
1	ACP3	扩增子对照品寡核苷酸库 3	-25°C 到 -15°C
1	ELE	延伸连接酶	-25°C 到 -15°C
1	ELB	延伸连接缓冲液	-25°C 到 -15°C
1	EDP	增强的 DNA 聚合酶	-25°C 到 -15°C
1	EMM	增强的预先混合液	-25°C 到 -15°C
1	2800M	2800M 对照品 DNA	2°C 到 8°C

此盒中还装有 HYP 条形码标签。

### 2 号盒

数量	试剂	描述	存储区域	存储温度
1	SS1	样品稳定溶液 1	PCR 前	2°C 到 8°C
1	SPB	样品纯化微珠	PCR 前	2°C 到 8°C
1	OHS2	寡核苷酸测序杂交试剂 2	PCR 前	2°C 到 8°C
1	SW1	严格清洗液 1	PCR 前	2°C 到 8°C
1	RS1	重悬溶液 1	PCR 前	15°C 到 30°C
1	LNB1	文库标准化微珠 1	PCR 后	2°C 到 8°C

### 3 号盒, 存储于 PCR 后区域

数量	试剂	描述	存储温度
1	HT1	杂交缓冲液	-25°C 到 -15°C
1	LNA1	文库标准化添加剂 1	-25°C 到 -15°C
1	LNW1	文库标准化清洗液 1	2°C 到 8°C
1	LNS2	文库标准化存储缓冲液 2	15°C 到 30°C
1	RSB	重悬缓冲液	15°C 到 30°C

此盒中还装有板的条形码标签。

## TruSeq 定制扩增子标签试剂盒 (96 个标签, 384 个样品) (FC-130-1003)

1 号盒 – 存储于 PCR 前区域中  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  的温度下

数量	试剂	描述
1	A501	i5 标签接头
1	A502	i5 标签接头
1	A503	i5 标签接头
1	A504	i5 标签接头
1	A505	i5 标签接头
1	A506	i5 标签接头
1	A507	i5 标签接头
1	A508	i5 标签接头
1	A701	i7 标签接头
1	A702	i7 标签接头
1	A703	i7 标签接头
1	A704	i7 标签接头
1	A705	i7 标签接头
1	A706	i7 标签接头
1	A707	i7 标签接头
1	A708	i7 标签接头
1	A709	i7 标签接头
1	A710	i7 标签接头
1	A711	i7 标签接头
1	A712	i7 标签接头

标签接头更换管帽, 存储于 PCR 前区域中  $15^{\circ}\text{C}$  至  $30^{\circ}\text{C}$  的温度下

数量	描述
1	i5 标签管帽, 白色
1	i7 标签管帽, 橙色

### 耗材和设备

开始执行操作流程之前, 请确保已准备好所需的用户自备耗材和设备。

操作流程已经过优化, 并使用所列项目对其进行验证。如果使用其他耗材和设备来代替, 则不保证性能保持同样水准。

针对 PCR 前和 PCR 后程序, 请分别使用一套专用的耗材和设备。PCR 前和 PCR 后程序需要使用不同的磁力架。

## 耗材

耗材	供应商
10 摩尔/升 NaOH, 分子生物学级 <sup>1</sup>	一般实验室供应商
20 微升屏障移液器吸头	一般实验室供应商
20 微升多通道移液器	一般实验室供应商
20 微升单通道移液器	一般实验室供应商
200 微升带滤芯移液器吸头	一般实验室供应商
200 微升多通道移液器	一般实验室供应商
200 微升单通道移液器	一般实验室供应商
1000 微升带滤芯移液器吸头	一般实验室供应商
1000 微升多通道移液器	一般实验室供应商
1000 微升单通道移液器	一般实验室供应商
以下板类型之一： • 硬壳 96 孔带裙边 PCR 板，薄型，带裙边 • Eppendorf 96 孔 twin.tec PCR 板，带半裙边	以下供应商之一，视板类型而定： • Bio-Rad, 商品目录号 HSP-9601 • Fisher Scientific, 商品目录号 E9-510-20303
0.8 毫升 96 孔存储板 (MIDI 板)	Fisher Scientific, 商品目录号 AB-0859 或 AB-0765
粘性封膜器	一般实验室供应商
15 毫升圆锥形试管	一般实验室供应商
DNA 分子量标记	一般实验室供应商
分子生物学专用 100% 乙醇	一般实验室供应商
冰桶	一般实验室供应商
LoBind 1.5 毫升微量离心管	Eppendorf, 部件号 022431021
Microseal “A” 封膜	Bio-Rad, 商品目录号 MSA-5001
Microseal “B” 粘性密封膜	Bio-Rad, 商品目录号 MSB-1001
PCR 级用水	一般实验室供应商
不含 RNase/DNase 的八联管和管帽	一般实验室供应商
TruSeq FFPE DNA 文库制备质量控制试剂盒	Illumina, 商品目录号 FC-121-9999
以下文库质量评估方法之一： • 4% 琼脂糖凝胶 • 标准灵敏度 NGS 片段分析试剂盒 (1-6000 碱基对) • DNA 1000 试剂盒	以下供应商之一，视方法而定： • 一般实验室供应商 • Advanced Analytical Technologies, 部件号 DNF-473 • Agilent Technologies, 商品目录号 5067-1504
[可选] TruSeq 标签板定位装置套件 <sup>2</sup>	Illumina, 商品目录号 FC-130-1005

<sup>1</sup> 使用片剂制备或使用标准溶液。

<sup>2</sup> 用于设置标签接头的可重复使用的部件。

## 设备

### PCR 前设备

设备	供应商
适用于 96 孔板的无冰冷藏箱	一般实验室供应商
96 孔扩增仪（带热盖） 参见 <a href="#">扩增仪</a> 。	一般实验室供应商
以下其中一种磁力架（根据 PCR 板类型而定）： • DynaMag-96 Side Skirted Magnet（与 96 孔全裙边 PCR 板配合使用） • DynaMag-96 Side Magnet（与 Eppendorf 96 孔 twin.tec PCR 板配合使用）	Life Technologies； • 商品目录号 12027 • 商品目录号 12331D
微孔板离心机	一般实验室供应商

### PCR 后设备

设备	供应商
96 孔磁力架（与 96 孔 MIDI 存储板搭配使用）	Life Technologies，商品目录号 AM10027
以下其中一个： • BioShake iQ 高速热混合器 • BioShake XP 高速实验室混合器	Q.Instruments； • 货号 1808-0506 • 货号 1808-0505
微孔板离心机	一般实验室供应商
以下文库质量评估方法之一： • Fragment Analyzer 全自动毛细管电泳系统 • 2100 Bioanalyzer 桌面系统 • 凝胶电泳用品和设备 • Agilent 2200 TapeStation	以下供应商之一，视方法而定： • Advanced Analytical Technologies，部件号 FSv2-CE2 或 FSv2-CE10 • Agilent Technologies，商品目录号 G2940CA • 一般实验室供应商 • Agilent Technologies，商品目录号 G2964AA
适合 1.5 毫升离心管的加热块	一般实验室供应商

## 扩增仪

对于选定扩增仪型号，请使用以下建议的设置。在制备文库之前，先验证任何未列出的扩增仪。



### 注意

Bio-Rad 扩增仪可提供卓越的特异性。

扩增仪	块类型	升降温率	盖子温度	块速率	容器类型
Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2	标准	0.1°C	已加热，在 100°C 保持恒温	--	Bio-Rad Hard-Shell 96 孔带裙边 PCR 反应板，低位，全裙边
Bio-Rad S1000	标准	0.1°C	已加热，在 100°C 保持恒温	--	Bio-Rad Hard-Shell 96 孔带裙边 PCR 反应板，低位，全裙边
Bio-Rad C1000	标准	0.1°C	已加热，在 100°C 保持恒温	--	Bio-Rad Hard-Shell 96 孔带裙边 PCR 反应板，低位，全裙边
Bio-Rad T100	标准	0.1°C	已加热，在 100°C 保持恒温	--	Eppendorf twin.tec 96 孔 PCR 板，半裙边

扩增仪	块类型	升降温率	盖子温度	块速率	容器类型
Applied Biosystems GeneAmp PCR 系统 9700	金制	1%	已加热, 在 100°C 保持恒温	9600 (用于 HYB 和 EXT_ LIG 程序) 或最大值 (用于 PCR 程序)	Eppendorf twin.tec 96 孔 PCR 板, 半裙边
Applied Biosystems Veriti 96 孔	合金制	2% 至 2.1%	已加热, 在 100°C 保持恒温	--	Eppendorf twin.tec 96 孔 PCR 板, 半裙边

## 扩增仪 HYB 程序

杂交寡核苷酸库步骤中的扩增仪程序因扩增仪型号而异。下面的表格提供了某些型号的相应程序。请在保存 HYB 程序时参考这些表格。

### Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2、S1000、C1000 和 T100

步骤	升降温速度	增量 (°C)	温度 (°C)	保持时间
1	--	--	95	3 分钟
2	0.1 °C/s	-0.5	90	30 秒
3		第 2 步再执行 59 次		
4	0.1 °C/s	-0.5	60	1 分钟
5		第 4 步再执行 19 次		
6	0.1 °C/s	-1	50	2 分钟
7		第 6 步再执行 9 次		
8	0.1 °C/s	--	40	10 分钟

### Applied Biosystems GeneAmp PCR 系统 9700

- ▶ 先从 95°C 开始, 保持 3 分钟。
- ▶ 选择 41 个温度和 2 个循环操作流程。由于最少循环次数为 2 次, 因此请务必包含暂停步骤, 以防止扩增仪的温度回到 95°C。
- ▶ 按下表中所列的数据设置温度和时间。
- ▶ 将每个温度的升降温率修改为 1%。
- ▶ 在循环结束时暂停一次。
- ▶ 在执行暂停步骤时取下 HYB 板。
- ▶ 执行操作流程时, 应将时间设置为 90 分钟, 这样 HYB 板保持在 40°C 下的时间就不会超过 10 分钟。

步骤	升降温速度 (%)	温度 (°C)	保持时间
1	无	95	3 分钟
2	1	95	45 秒
3	1	90	45 秒
4	1	85	45 秒
5	1	80	45 秒
6	1	75	1 分钟

步骤	升降温速度 (%)	温度 (°C)	保持时间
7	1	74	1 分钟
8	1	73	1 分钟
9	1	72	1 分钟
10	1	71	1 分钟
11	1	70	1 分钟
12	1	69	2 分钟
13	1	68	2 分钟
14	1	67	2 分钟
15	1	66	2 分钟
16	1	65	2 分钟
17	1	64	2 分钟
18	1	63	2 分钟
19	1	62	2 分钟
20	1	61	2 分钟
21	1	60	2 分钟
22	1	59	2 分钟
23	1	58	2 分钟
24	1	57	2 分钟
25	1	56	2 分钟
26	1	55	2 分钟
27	1	54	2 分钟
28	1	53	2 分钟
29	1	52	2 分钟
30	1	51	2 分钟
31	1	50	2 分钟
32	1	49	3 分钟
33	1	48	3 分钟
34	1	47	3 分钟
35	1	46	3 分钟
36	1	45	3 分钟
37	1	44	3 分钟
38	1	43	3 分钟
39	1	42	3 分钟
40	1	41	3 分钟
41	1	40	10 分钟
42	--	暂停	99:59

## Applied Biosystems Veriti 96 孔扩增仪

步骤	升降温速度	增量 (°C)	温度 (°C)	保持时间
1	--	--	95	3 分钟
2	2.1%	-0.5	90	30 秒
3			第 2 步再执行 59 次	
4	2%	-0.5	60	1 分钟
5			第 4 步再执行 19 次	
6	2.1%	-1	50	2 分钟
7			第 6 步再执行 9 次	
8	2%	--	40	10 分钟

# 技术协助

如需技术协助，请与 Illumina 技术支持部门联系。

网站：[www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
电子邮箱：[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Illumina 客户支持部门电话号码

地区	免费电话	区域性
北美	+1.800.809.4566	
澳大利亚	+1.800.775.688	
爱尔兰	+353 1800936608	+353 016950506
奥地利	+43 800006249	+43 19286540
比利时	+32 80077160	+32 34002973
丹麦	+45 80820183	+45 89871156
德国	+49 8001014940	+49 8938035677
法国	+33 805102193	+33 170770446
芬兰	+358 800918363	+358 974790110
荷兰	+31 8000222493	+31 207132960
挪威	+47 800 16836	+47 21939693
日本	0800.111.5011	
瑞典	+46 850619671	+46 200883979
瑞士	+41 565800000	+41 800200442
台湾	00806651752	
西班牙	+34 911899417	+34 800300143
香港	800960230	
新加坡	+1.800.579.2745	
新西兰	0800.451.650	
意大利	+39 800985513	+39 236003759
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
中国	400.635.9898	
其他国家/地区	+44.1799.534000	

**安全数据表 (safety data sheet, 简称 SDS)** — 可通过 Illumina 网站 ([support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html)) 获取。

**产品文档** — 可通过 Illumina 网站下载 PDF 版本。请转到 [support.illumina.com](http://support.illumina.com)，选择一个产品，然后选择 Documentation & Literature (文档与文献)。



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (北美洲以外地区)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

仅供研究使用，不可用于诊断过程。

© 2017 Illumina, Inc. 保留所有权利。

**illumina**<sup>®</sup>