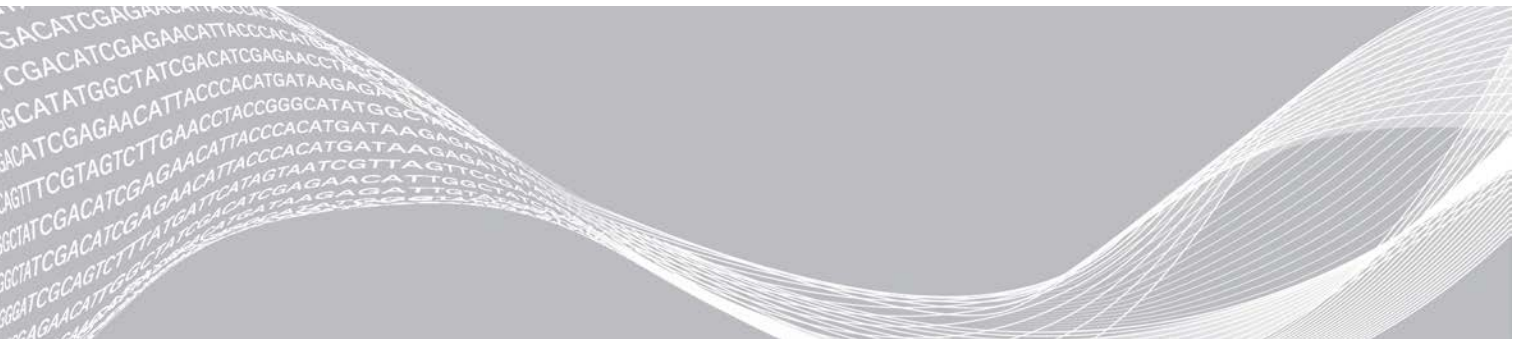


# TruSight Tumor 170

## 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、HiSeq、NextSeq、TruSight 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。

## 修订历史记录

文档	日期	更改描述
文档号 1000000024091 v01	2017 年 4 月	<ul style="list-style-type: none"><li>在“RNA/DNA 输入建议”部分中，更正了用于 RNA 样品评估的试剂盒。</li><li>在“标准化文库”介绍中，阐明了 TruSight Tumor 170 当前不支持手动文库标准化。</li><li>在耗材列表中添加了 Advanced Analytical Technologies 标准灵敏度 RNA 分析试剂盒和 Agilent RNA 6000 纳米试剂盒。</li></ul>
文档号 1000000024091 v00	2017 年 3 月	最初版本。

# 目录

<b>第 1 章 概述</b> .....	<b>1</b>
简介 .....	1
RNA/DNA 输入建议 .....	1
DNA 剪切建议 .....	2
更多资源 .....	2
<b>第 2 章 操作流程</b> .....	<b>3</b>
简介 .....	3
警告和注意事项 .....	4
提示和技巧 .....	4
文库制备工作流程 .....	6
富集工作流程 .....	7
变性与固定 RNA .....	8
合成第一链 cDNA .....	9
合成第二链 cDNA .....	10
纯化 cDNA .....	10
片段化 gDNA .....	12
执行末端修复和尾端加 A .....	14
连接接头 .....	15
纯化连接 .....	16
标签 PCR .....	17
执行第一次杂交 .....	19
执行第一次采集 .....	20
执行第二次杂交 .....	22
执行第二次采集 .....	23
扩增富集文库 .....	25
纯化已扩增的富集文库 .....	26
定量文库 .....	27
标准化文库 .....	28
准备测序 .....	30
<b>附录 A 支持信息</b> .....	<b>33</b>
简介 .....	33
缩写 .....	33
试剂盒内含物品 .....	34
耗材和设备 .....	36
<b>技术协助</b> .....	<b>39</b>

# 概述

简介	1
RNA/DNA 输入建议	1
DNA 剪切建议	2
更多资源	2

## 简介

TruSight<sup>®</sup> Tumor 170 操作流程介绍了一种基于富集的方法，可将从福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的组织样品中提取的 DNA 和 RNA 转换成针对癌症相关基因富集的可使用 Illumina<sup>®</sup> 测序系统进行测序的文库。TruSight Tumor 170 试剂盒可制备 48 个文库 (24 个来自 DNA, 24 个来自 RNA)。该试剂盒经过优化，提供较高的灵敏度和特异性，可从 170 种基因中检测出低频体细胞变异。这些变异包括单核苷酸变异 (SNV)、插入、缺失、多核苷酸变异 (MNV)、扩增、融合和剪接变异。

## 产品描述

TruSight Tumor 170 RUO 试剂盒包含文库制备试剂，可以将核苷酸样品转换为可测序的文库。TruSight Tumor 170 试剂盒还包含相关的 TruSight Tumor 170 软件。该实验分析方法会先以 FFPE 组织中提取的 DNA 和/或 RNA 作为输入样品类型。TruSight Tumor 170 应用程序中提供了变异检出算法，会报告靶向基因整个编码区域的突变 (单核苷酸变异、多核苷酸变异、插入缺失、拷贝数变异、剪接变异和基因融合)。

## RNA/DNA 输入建议

TruSight Tumor 170 实验分析方法针对定义的 RNA/DNA 输入范围进行了优化。DNA 的最佳范围在 40 纳克到 120 纳克之间 (总量) 或是 3.3 纳克/微升到 10 纳克/微升之间 (浓度)。RNA 的最佳范围在 40 纳克到 85 纳克之间 (总量) 或是 4.7 纳克/微升到 10 纳克/微升之间 (浓度)。请在开始操作流程之前对输入 RNA/DNA 进行定量。为获得足够的核苷酸原料，Illumina 建议从至少 2 立方毫米的 FFPE 组织中分离核苷酸。

- ▶ 使用可以在使用最少量样品的情况下产生高回收得率和保留样品完整性的核苷酸分离方法。与本实验分析方法测试过的其他提取方法相比，QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE 试剂盒能够产出较高的核苷酸。
- ▶ 使用采用 RNA/DNA 结合染色剂的荧光定量方法，如 QuantiFluor<sup>®</sup> (RNA) 或 AccuClear<sup>™</sup> (DNA)。
- ▶ 用不含 RNase/DNase 的水稀释原料。

为获得最佳性能，请在使用 TruSight Tumor 170 实验分析方法之前先评估 DNA 和 RNA 样品的质量。

- ▶ DNA 样品可以使用 Illumina FFPE QC 试剂盒进行评估。
- ▶ 使用 delta Cq 值 ≤ 5 的 DNA 样品。否则，可能会降低实验分析方法的性能。
- ▶ RNA 样品可以使用 Advanced Analytical Technologies Fragment Analyzer<sup>™</sup> (标准灵敏度 RNA 分析试剂盒) 或 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 纳米试剂盒) 进行评估。
- ▶ 使用 DV200 值 ≥ 20% 的 RNA 样品。否则，可能会降低实验分析方法的性能。

## 参考样品 [可选]

- ▶ 在运行文库制备时，请使用已定性的参考材料，例如 HorizonDx HD753 (DNA) 和 Agilent 通用参考 RNA。Agilent 通用参考 RNA 属于完整的 RNA 样品，应按照 [变性与固定 RNA \(第 8 页\)](#) 中的完整 RNA 程序进行处理。
- ▶ 可将来自细胞系衍生异种移植物的合格 FFPE 材料用作参考样品。
- ▶ 使用不含 RNase/DNase 的水作为非模板对照品。请勿测序非模板对照品。

**注意**

运行参考样品或非模板对照品有助于降低能处理的未知样品的总数。

## DNA 剪切建议

TruSight Tumor 170 实验分析方法经过优化，非常适合从已片段化为 90–250 碱基对（最高约 125 碱基对）的 gDNA 制备文库。该实验分析方法是通过 Covaris E220evolution™ 或 LE220 聚焦超声仪（所用参数如 [片段化 gDNA（第 12 页）](#) 中所示）得以优化的。由于样品质量以及本试验所用的超声仪器存在差异，片段大小分布可能会有所不同。如果不使用已针对 TruSight Tumor 170 进行优化的片段化方法（Covaris E220evolution 或 LE220），则请参见 TruSight Tumor 170 支持页面。

- ▶ 如剪切试管中气泡过多或存在气隙，则可能导致剪切不完整。
  - ▶ 慢慢将 gDNA 装入 Covaris 试管中，以免形成气泡。
  - ▶ 对 Covaris 试管进行离心操作，以在剪切前收集试管底部的样品。
- ▶ 如果您使用的是 LE220 Covaris 仪器，请在 Covaris 8 联微细管内未使用的孔中装入 52 微升的水，以便获得最佳性能。
- ▶ [可选] 至于已剪切样品的片段大小分布，可使用 Agilent DNA 1000 试剂盒加 Agilent Bioanalyzer 2100 进行评估。

## 更多资源

访问 Illumina 网站上的 TruSight Tumor 170 试剂盒支持页，查看相应文档、软件下载、培训资源和 Illumina 兼容产品的的相关信息，包括分析软件。

以下文档可从 Illumina 网站下载。

资源	描述
<a href="#">自定义操作流程选择器</a>	<a href="http://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，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。
<i>TruSight Tumor 170 检查表</i> (文档号 100000024092 v00)	为有经验的用户提供步骤检查表。
<i>TruSight Tumor 170 耗材和设备清单</i> (文档号 1000000031408 v00)	提供用户自备耗材和设备的交互式检查表。

# 操作流程

简介	3
警告和注意事项	4
提示和技巧	4
文库制备工作流程	6
富集工作流程	7
变性与固定 RNA	8
合成第一链 cDNA	9
合成第二链 cDNA	10
纯化 cDNA	10
片段化 gDNA	12
执行末端修复和尾端加 A	14
连接接头	15
纯化连接	16
标签 PCR	17
执行第一次杂交	19
执行第一次采集	20
执行第二次杂交	22
执行第二次采集	23
扩增富集文库	25
纯化已扩增的富集文库	26
定量文库	27
标准化文库	28
准备测序	30

## 简介

本节介绍 TruSight Tumor 170 操作流程。

- ▶ 请先确认试剂盒内含物，并确保您已备齐所需的耗材和设备，然后再继续操作。有关详细信息，请参见 [试剂盒内含物品](#)（第 34 页）。
- ▶ 此操作流程中的一些试剂带有以颜色编码的盖子，用于识别相关的样品类型。
  - ▶ 蓝色盖子表示只用于基因组 DNA (gDNA) 样品的试剂。
  - ▶ 红色盖子表示只用于 RNA 或补充 DNA (cDNA) 样品的试剂。
- ▶ 请使用指定的参数遵照操作流程按序操作。
- ▶ 开始制备文库之前，记录样品浓度 (DNA 或 RNA) 和样品质量信息。请保存这些信息以便稍后在数据分析时使用。

RNA 和 DNA 文库可以同时制备。Illumina 建议按照以下时间表执行 TruSight Tumor 170 实验分析方法工作流程：

- ▶ 第 1 天：通过 RNA 样品进行 cDNA 合成、对 gDNA 样品进行 DNA 剪切、文库制备、开始过夜（第一次）杂交。有关详细信息，请参见 [文库制备工作流程](#)（第 6 页）。
- ▶ 第 2 天：富集、富集文库 QC 检查（文库定量）、基于微珠的富集文库标准化、将文库装入测序平台 (NextSeq<sup>®</sup>500、NextSeq 550 或 HiSeq<sup>®</sup>2500)。有关详细信息，请参见 [富集工作流程](#)（第 7 页）。

针对无法按照上述时间表执行 TruSight Tumor 170 实验分析方法工作流程的情况，在整个操作流程中指定了几个安全停止点，以便适应其他时间表。

## 警告和注意事项



### 警告

此试剂盒中的部分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​​安全信息，请参见 [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html) 中的 SDS。

## 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

- ▶ 从扩增前区域移动到扩增后区域时，请采用单向工作流程。
- ▶ 为防止带出扩增产物或探针，在扩增后区域内开始操作后，请勿再返回扩增前区域。
- ▶ 在**每个孔**中添加或转移样品之后，都要更换吸头。
- ▶ 在**每个孔**中添加标签引物之后，都要更换吸头。
- ▶ 如果手套接触到标签引物、样品或探针，请更换手套。
- ▶ 操作前后必须彻底清洁工作台表面。
- ▶ 从工作区中取走未使用的标签引物试管。

### 将板密封

- ▶ 在执行操作流程中的下列步骤之前，务必要用相应的板密封膜对板进行密封：
  - ▶ 振动步骤
  - ▶ 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、PCR 扩增和长期存储，请使用 Microseal “B”。

### 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

- ▶ 指示对板进行离心时，将板以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。

### 处理试剂

- ▶ 所有试剂使用后，立即盖紧试管的盖子，以减少蒸发、防止污染。
- ▶ 程序中不再会用到的试剂送回建议的存储条件下进行存储。



## 处理微珠

- ▶ 缓缓对微珠悬液移液。
- ▶ 移液之前彻底混匀。
- ▶ 如果在磁性分离步骤期间将微珠吸入了移液器吸头，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。
  - ▶ 将板置于磁力架上，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

下图展示了使用 TruSight Tumor 170 试剂盒时，所建议遵循的文库制备工作流程。RNA 和 DNA 文库可以同时制备。步骤之间标出了安全停止点。

图 1 TruSight Tumor 170 工作流程（第 1 部分）



## 富集工作流程

下图展示了使用 TruSight Tumor 170 试剂盒时，建议遵循的富集工作流程。步骤之间标出了安全停止点。

图2 TruSight Tumor 170 工作流程（第2部分）



## 变性与固定 RNA

在此过程中，纯化的 RNA 会变性并用随机六聚物引入，为 cDNA 合成做好准备。如果只处理纯化 DNA，请直接执行 [片段化 gDNA \(第 12 页\)](#)。

### 耗材

- ▶ EPH3 (洗脱液、引物、片段高度混合液 3 [红色盖子])
- ▶ FSM (第一链合成混合液 [红色盖子])
- ▶ RVT (逆转录酶 [红色盖子])
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜



#### 注意

以下程序需要不含 RNase 和 DNase 的环境。请用 RNase 抑制洗涤剂对工作区域进行彻底清洁。务必使用 RNA 专用设备。

### 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
EPH3	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
FSM	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
RVT	-25°C 到 -15°C	放在冰上。然后，进行短暂的离心。

- 2 在冰上解冻 RNA 样品。
- 3 对样品进行验收和定量。请参见 [RNA/DNA 输入建议 \(第 1 页\)](#)。
- 4 在不含核酸酶的水中将每个已纯化的 RNA 样品的浓度稀释到 4.7 纳克/微升到 10 纳克/微升之间。
- 5 在扩增仪上保存下列程序：
  - ▶ 如果是 FFPE 或分段 RNA，保存 LQ-RNA 程序。
    - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
    - ▶ 将反应液剂量设为 17 微升
    - ▶ 65°C 下 5 分钟
    - ▶ 保持在 4°C
  - ▶ 如果是细胞系或完整 RNA，保存 HQ-RNA 程序。
    - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
    - ▶ 将反应液剂量设为 17 微升
    - ▶ 94°C 下 8 分钟
    - ▶ 保持在 4°C
- 6 将新的 96 孔 PCR 板标为 “CF” (cDNA 片段)。

## 程序

- 1 在微量离心管中装入以下试剂，制备 FSM+RVT 预先混合液。

预先混合液成分	每 3 个样品	每 8 个样品	每 16 个样品	每 24 个样品
FSM	27 $\mu$ l	72 $\mu$ l	144 $\mu$ l	216 $\mu$ l
RVT	3 $\mu$ l	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l	24 $\mu$ l

- ▶ 至少要制备 3 个样品。
  - ▶ 使用后应丢弃所有剩余的预先混合液。
- 2 用移液器上下吸打以混匀溶液。
  - 3 将 FSM+RVT 预先混合液放在冰上，直到 **合成第一链 cDNA** (第 9 页)。
  - 4 将每个纯化 RNA 样品分别加 8.5 微升到 CF 板相应的孔中。
  - 5 将 8.5 微升 EPH3 加到每个孔中。
  - 6 盖上 Microseal “B”，并将板以 1200 转/分的速度振动 1 分钟。
  - 7 置于预编程序的扩增仪上并运行 LQ-RNA 或 HQ-RNA 程序。
  - 8 当扩增仪达到 4°C 时，立即进行下一步。

## 合成第一链 cDNA

此流程使用逆转录酶对使用随机六聚物引入到第一链 cDNA 中的 RNA 片段进行逆转录。

### 耗材

- ▶ FSM+RVT 预先混合液 (在 **变性与固定 RNA** (第 8 页) 中制备)
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 准备

- 1 在带热盖的扩增仪上将以下程序另存为 1stSS:
  - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
  - ▶ 将反应液剂量设为 25 微升
  - ▶ 25°C 下 10 分钟
  - ▶ 42°C 下 15 分钟
  - ▶ 70°C 下 15 分钟
  - ▶ 保持在 4°C

## 程序

- 1 从扩增仪上取下 CF 板。
- 2 使用 FSM+RVT 预先混合液之前，先用移液器上下吸打以混匀。
- 3 将 8 微升 FSM+RVT 预先混合液加到每个孔中。
- 4 盖上 Microseal “B”，并将板以 1200 转/分的速度振动 1 分钟。
- 5 置于扩增仪上并运行 1stSS 程序。
- 6 当扩增仪达到 4°C 时，立即进行下一步。

**提示**

如果您还要制备 DNA 文库，可以在运行 1stSS 程序时开始对 gDNA 进行片段化。请参见[片段化 gDNA](#)（第 12 页）开始操作。

## 合成第二链 cDNA

此流程会去除 RNA 模板并合成 ds cDNA。

### 耗材

- ▶ SSM（第二链混合液 [红色盖子]）
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
SSM	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。翻转 10 次进行混匀。然后，进行短暂的离心。

- 2 在带热盖的扩增仪上将以下程序另存为 2ndSS。如果盖的温度不能设为 30°C，则关闭预热盖加热选项：
  - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 30°C
  - ▶ 将反应液剂量设为 50 微升
  - ▶ 16°C 下 25 分钟
  - ▶ 保持在 4°C

### 程序

- 1 从扩增仪上取下 CF 板。
- 2 将 25 微升 SSM 加到每个孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，并将板以 1200 转/分的速度振动 1 分钟。
- 4 置于扩增仪上并运行 2ndSS 程序。
- 5 当扩增仪达到 4°C 时，继续下一步。

## 纯化 cDNA

此过程使用 SPB 从不需要的反应成分中纯化 cDNA。

### 耗材

- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ SPB（样品纯化微珠）
- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜
- ▶ 96 孔 MIDI 板 (1–2)
- ▶ [可选] 96 孔 PCR 板

**注意**

为使实验分析方法达到最佳性能，必须使用正确类型的板。要在此步骤后继续执行操作流程，请使用 MIDI 板。要在此步骤后存储样品，请使用 PCR 板。有关详细信息，请参见 [准备](#) (第 11 页)。

**关于试剂**

- ▶ 每次使用前都要振荡 SPB。
- ▶ 需频繁振荡 SPB，以确保微珠均匀散布。
- ▶ 由于溶液的粘度较高，请缓慢吸出并分配 SPB。

**准备**

## 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
SPB	2°C 到 8°C	恢复至室温。 使用 SPB 前，请先振荡 1 分钟。
RSB	2°C 到 8°C 或 -25°C 到 -15°C	恢复至室温。 如果 RSB 存储在 -25°C 到 -15°C 下，使用前，请先在室温下解冻并振荡。

- 2 将新的 96 孔 MIDI 板标为 “BIND1”。
- 3 将新的 96 孔 MIDI 板标为 “PCF” (已纯化的 cDNA 片段)。
  - ▶ [可选] 要在此步骤后存储板，请使用新的 96 孔 PCR 板。
- 4 新鲜制备浓度为 80% 的乙醇。

**程序****结合**

- 1 从扩增仪上取下 CF 板。
- 2 将 90 微升 SPB 加到 BIND1 板的每个孔中。
- 3 将 CF 板的每个样品分别转移 50 微升到 BIND1 板相应的孔中。
- 4 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 在室温下孵育 5 分钟。

**清洗**

- 1 将 BIND1 板置于磁力架上 5 分钟。
- 2 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 3 按以下方式进行清洗：
  - a 在磁力架上时，加入 200 微升浓度为 80% 的新鲜乙醇。
  - b 等待 30 秒钟，然后取走并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 4 重复步骤 3 (a-b)，以进行第二次清洗。

**注意**

为使实验分析方法达到最佳性能，必须进行两次清洗。

- 5 使用装有细吸头的 P20 移液器，从每个孔中取走残余的上层清液。

**洗脱**

- 1 从磁力架上取下 BIND1 板。
- 2 将 22 微升 RSB 加到每个孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，以 1500 转/分的速度振动 2 分钟。
- 4 在室温下孵育 2 分钟。
- 5 在磁力架上放置 2 分钟。
- 6 从 BIND1 板的每个孔中，分别转移 20 微升洗脱液到 PCF 板相应的孔中。
- 7 将 30 微升 RSB 加到 PCF 板的每个孔中，然后用移液器上下吸打至少 10 次以混匀溶液。
- 8 继续执行**末端修复和尾端加 A**（第 14 页），或盖上 Microseal “B” 并存储。

**提示**

如果您还要制备 DNA 文库，可以将纯化的 cDNA 片段和剪切的 DNA 样品存储在同一个板中。请务必对孔进行标记。有关详细信息，请参见**片段化 gDNA**（第 12 页）中的准备部分。

**安全停止点**

要停止操作，请在 PCR 板上盖上 Microseal “B” 并以  $280 \times g$  的转速进行短暂的离心。在  $2^{\circ}\text{C}$  到  $8^{\circ}\text{C}$  下可以存放一夜，在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下最长可存放 7 天。

**片段化 gDNA**

此过程使用 Covaris 聚焦超声仪对 gDNA 进行最佳分段，以获得 90–250 碱基对的片段大小。Covaris 剪切生成含有 3' 或 5' 突出的 dsDNA 片段。

如果您只要处理纯化 RNA，请跳过此步骤，直接执行**末端修复和尾端加 A**（第 14 页）。

**耗材**

- ▶ TEB (TE 缓冲液)
- ▶ Covaris 8 联微细管
- ▶ 96 孔 MIDI 板
- ▶ [可选] 96 孔 PCR 板

**注意**

为使实验分析方法达到最佳性能，必须使用正确类型的板。要在此步骤后继续执行操作流程，请使用 MIDI 板。要在此步骤后存储样品，请使用 PCR 板。有关详细信息，请参见**准备**（第 13 页）。

**提示**

如果您还要制备 cDNA 文库（从 RNA 样品），可以将纯化的 cDNA 片段和剪切的 DNA 样品存储在 PCF 板中。请务必对孔进行标记。有关详细信息，请参见**准备**（第 13 页）。



## 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
TEB	2°C 到 8°C	恢复至室温。翻转以混匀溶液。

- 2 遵照制造商的指导准则打开并设置 Covaris 仪器。此仪器需要大约 1 小时进行排气。
- 3 从以下选项中选择一种板：
  - ▶ 如果只处理 gDNA，请使用新的 96 孔 MIDI 板。
  - ▶ 如果还要同时处理 cDNA 样品，请继续使用 *纯化 cDNA* (第 10 页) 时使用的 PCF 板。
  - ▶ [可选] 要在此步骤后存储剪切的 gDNA，请使用 96 孔 PCR 板。
- 4 对 LP (文库制备) 板进行标记 (或重新标记)。
- 5 将 gDNA 样品置于室温下解冻。翻转以混匀溶液。
- 6 参见 *RNA/DNA 输入建议* (第 1 页)，对样品进行验收或定量。
- 7 在 TEB 中将每个已纯化的 DNA 样品稀释到 3.3 纳克/微升到 10 纳克/微升之间的浓度。

## 程序

- 1 将每个已稀释且纯化的 gDNA 样品分别加 12 微升到 Covaris 8 联微细管中。
- 2 将 40 微升 TEB 加到每个样品中。



### 提示

如果您使用的是 LE220 Covaris 仪器，请在 Covaris 8 联微细管内未使用的孔中装入 52 微升的水，以便获得最佳性能。

- 3 用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 4 用封箔口对微细管联管进行密封。
- 5 进行短暂的离心。
- 6 如果使用的是 Covaris E220evolution 或 LE220 型号，请使用以下设置对 gDNA 进行片段化。如果使用的是其他 Covaris 型号，请参见 TruSight Tumor 170 支持页面。

设置	E220evolution	LE220
峰值入射功率	175 瓦	450 瓦
占空比	10%	30%
每次分段的循环数	200	200
处理时间	280 秒	250 秒
温度	7°C	7°C
增强器	是	不适用

- 7 将每个已剪切的 gDNA 样品分别转移 50 微升到 LP 板 (或 PCF 板，如果还要同时处理 cDNA) 相应的孔中。
- 8 [可选] 如果 PCF 板是 MIDI 板，并且您打算在完成此步骤后存储该板，请分别将 50 微升的 cDNA 和 50 微升的已剪切 gDNA 样品转移到新的 96 孔 PCR 板相应的孔中。
  - ▶ 对 LP 板进行标记。

**提示**

将已剪切的gDNA样品转移到LP板时，可以使用装有细吸头的P20移液器，按20微升、20微升、10微升的量分三次移液。

**安全停止点**

要停止操作，请在PCR板上盖上Microseal“B”并以280 × g的转速进行短暂的离心。在2°C到8°C下可以存放一夜，在-25°C至-15°C下最长可存放7天。

**执行末端修复和尾端加A**

此过程使用末端修复尾端加A预先混合液(ERA1)将片段化产生的突出量转换为平末端。此混合液中的3'到5'核酸外切酶活动会去除3'突出量，而5'到3'聚合酶活动会填充5'的突出量。在此反应期间，会为3'末端尾端加A，以防止它们在接头连接反应期间相互连接。

**耗材**

- ▶ ERA1-A (末端修复尾端加A酶混合液1)
- ▶ ERA1-B (末端修复尾端加A缓冲液1)
- ▶ Microseal“B”粘性密封膜
- ▶ 1.7毫升微量离心管
- ▶ [可选] 96孔MIDI板

**注意**

如果是使用PCR板存储gDNA和/或cDNA样品，请遵照[准备](#) (第14页) 中的第4步来转移板。

**准备****1 准备下列耗材。**

物品	存储	说明
ERA1-A	-25°C 到 -15°C	放在冰上。进行短暂的离心，然后用移液器上下吸打以混匀。
ERA1-B	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。进行短暂的离心，然后用移液器上下吸打以混匀。如果存在结晶，请用手将试管焐热，然后用移液器上下吸打以混匀，直到结晶溶解为止。

- 2 使cDNA和剪切的gDNA恢复到室温。
- 3 如果cDNA和gDNA样品存储在单独的MIDI板上，请将所有样品都移到同一个MIDI板上。
- 4 [可选] 如果cDNA和/或剪切的gDNA样品存储在96孔PCR板上，请将50微升的cDNA和/或剪切的gDNA样品转移到一个新的96孔MIDI板上相应的孔中。
- 5 对LP2 (文库制备2) MIDI板进行标记 (或重新标记)。
- 6 使用MIDI加热插块按如下所述预热2个Hybex孵育器：
  - ▶ 将Hybex孵育器预热到30°C。
  - ▶ 将Hybex孵育器预热到72°C。

**程序**

- 1 在微量离心管中装入以下试剂，制备ERA1预先混合液。

预先混合液成分	每 3 个样品	每 8 个样品	每 16 个样品	每 24 个样品
ERA1-B	26 $\mu$ l	69 $\mu$ l	138 $\mu$ l	207 $\mu$ l
ERA1-A	10 $\mu$ l	27 $\mu$ l	54 $\mu$ l	81 $\mu$ l

- ▶ 至少要制备 3 个样品。
  - ▶ 使用后应丢弃所有剩余的预先混合液。
- 2 用移液器上下吸打至少 10 次以混匀 ERA1 预先混合液，然后将其置于冰上。
  - 3 将 10 微升 ERA1 预先混合液加到 LP2 板的每个样品中。
  - 4 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - 5 在 30°C 的 Hybex 孵育器中孵育 30 分钟。
  - 6 立即转移到另一个 72°C 的 Hybex 孵育器中再孵育 20 分钟。
  - 7 将板置于冰上 5 分钟。

## 连接接头

此过程将接头连接到 cDNA 和/或 gDNA 片段的末端。

### 耗材

- ▶ ALB1（接头连接缓冲液 1）
- ▶ SUA1（通用短接头 1）
- ▶ STL（停止连接缓冲液）
- ▶ LIG3（DNA 连接酶 3）
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ ALB1 粘度较高。请缓慢移液以免形成气泡。

## 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
ALB1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
SUA1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
STL	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
LIG3	-25°C 到 -15°C	放在冰上。 进行短暂的离心，然后用移液器上下吸打以混匀。

## 程序

- 1 将 60 微升 ALB1 加到每个孔中。
- 2 将 5 微升 LIG3 加到每个孔中。
- 3 振荡 SUA1 至少 10 秒钟。
- 4 将 10 微升 SUA1 加到每个孔中。

- 5 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 6 在室温下孵育 30 分钟。
- 7 加入 5 微升 STL。
- 8 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。

## 纯化连接

此过程使用 SPB 纯化 cDNA 或 gDNA 片段，并去除不需要的产物。

### 耗材

- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ SPB (样品纯化微珠)
- ▶ RSB (重悬缓冲液)
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 每次使用前都要振荡 SPB。
- ▶ 需频繁振荡 SPB，以确保微珠均匀散布。
- ▶ 由于悬液的粘度较高，请缓慢吸出并分配 SPB。

## 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
SPB	2°C 到 8°C	恢复至室温。使用 SPB 前，请先振荡 1 分钟。
RSB	2°C 到 8°C 或 -25°C 到 -15°C	恢复至室温。 如果 RSB 存储在 -25°C 到 -15°C 下，使用前，请先在室温下解冻并振荡。

- 2 将新的 96 孔 PCR 板标为 “LS” (文库样品)。
- 3 新鲜制备浓度为 80% 的乙醇。

## 程序

### 结合

- 1 将 112 微升 SPB 加到 LP2 板的每个孔中。
- 2 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 3 在室温下孵育 5 分钟。

### 清洗

- 1 将 LP2 板置于磁力架上 10 分钟。
- 2 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。

- 3 按以下方式进行清洗：
  - a 在磁力架上时，加入 200 微升浓度为 80% 的新鲜乙醇。
  - b 等待 30 秒钟，然后取走并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 4 重复步骤 3 (a-b)，以进行第二次清洗。

**注意**

为使实验分析方法达到最佳性能，必须进行两次清洗。

- 5 使用装有细吸头的 P20 移液器，从每个孔中取走残余的上层清液。

## 洗脱

- 1 从磁力架中取下。
- 2 将 27.5 微升 RSB 加到每个孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，以 1500 转/分的速度振动 2 分钟。
- 4 在室温下孵育 2 分钟。
- 5 在磁力架上放置 2 分钟。
- 6 将 LP2 板的每种洗脱液分别转移 25 微升到 LS 板相应的孔中。

## 标签 PCR

在此步骤中，将使用引物扩增 cDNA 和/或 gDNA 片段，这些引物会添加标签序列以进行样品多重分析。产物包含 DNA 片段，且簇生成所需的序列和接头排列在这些片段的两侧。

## 耗材

- ▶ EPM (增强型 PCR 混合液)
- ▶ UPXX (唯一标签引物混合液)，请参见 [试剂盒内含物品 \(第 34 页\)](#)
- ▶ CPXX (组合标签引物混合液)，请参见 [试剂盒内含物品 \(第 34 页\)](#)
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

## 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
EPM	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
UPXX	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
CPXX	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。

- 2 为每个 RNA 文库分配 1 份 UPXX 标签引物混合液，为每个 DNA 文库分配 1 份 CPXX 标签引物混合液 (XX = 标签引物混合液编号)。
  - ▶ 还可将 UPXX 标签引物混合液用于 DNA 文库。
  - ▶ 不得将 CPXX 标签引物混合液用于 RNA 文库。
  - ▶ 低重测序运行应使用 3 个文库，且这 3 个文库应包含以下其中一组 UPXX 标签引物，这样才能提供足够的多样性。

为低重运行选择以下其中一组标签引物：

- ▶ [UP01、UP02、UP03]
- ▶ [UP04、UP05、UP06]
- ▶ [UP07、UP08、UP09]
- ▶ [UP10、UP11、UP12]

有关详细信息，请参见 [试剂盒内含物品（第 34 页）](#)。



#### 注意

如果在单个流动槽上测序多个文库，请为各个文库样品分配不同的标签引物混合液。



#### 注意

处理标签引物时，请避免交叉污染。打开标签引物混合液试管后，请丢弃原先的管帽，使用新的管帽。



#### 注意

确保只将 UPXX 标签引物混合液分配给 RNA 文库。将 CPXX 标签引物混合液分配给 RNA 文库可能会导致性能下降。

3 于扩增后区域，在带热盖的扩增仪上将以下程序另存为 I-PCR：

- ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
- ▶ 将反应液剂量设为 50 微升
- ▶ 98°C 下 30 秒钟
- ▶ 15 次以下循环：
  - ▶ 98°C 下 10 秒钟
  - ▶ 60°C 下 30 秒钟
  - ▶ 72°C 下 30 秒钟
- ▶ 72°C 下 5 分钟
- ▶ 保持在 10°C

## 程序

- 1 将 5 微升标签引物混合液（UPXX 或 CPXX）加到 LS 板的每个孔中。  
（有关标签引物混合液的详细信息，请参见 [准备（第 17 页）](#)。）
- 2 将 20 微升 EPM 加到每个孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，并将板以 1500 转/分的速度振动 1 分钟。



#### 注意

请在扩增后区域执行以下步骤，以防止带出扩增产物。

- 4 以 280 × g 的转速进行短暂的离心。
- 5 置于预编程序的扩增仪上并运行 I-PCR 程序。
- 6 完成 I-PCR 程序后，将板重新标为 “ALS”（已扩增的文库样品）。
- 7 进行短暂的离心。

## 安全停止点

要停止操作，请在 PCR 板上盖上 Microseal “B” 并以 280 × g 的转速进行短暂的离心。在 2°C 到 8°C 下可以存放一夜，在 -25°C 至 -15°C 下最长可存放 30 天。

## 执行第一次杂交

在此过程中，会将特定于 TruSight Tumor 170 所靶向的 170 种基因的寡核苷酸混合文库杂交到 **标签 PCR**（第 17 页）期间所生成的 RNA 和/或 DNA 文库。为确保能够富集靶向区域，需要进行两个杂交步骤。本步骤执行第一次杂交，需要过夜（8 到 24 小时）。

### 耗材

- ▶ TCA1（目标采集添加剂 1）
- ▶ TCB1（目标采集缓冲液 1）
- ▶ OPR1（肿瘤学探针 RNA 1 [红色盖子]）
- ▶ OPD1（肿瘤学探针 DNA 1 [蓝色盖子]）
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 只能将 OPR1（红色盖子）用于 RNA 文库。
- ▶ 只能将 OPD1（蓝色盖子）用于 DNA 文库。

### 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
TCB1	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡 1 分钟以重悬。然后，进行短暂的离心。如果存在结晶，请用手将试管焐热，然后进行振荡，直到结晶溶解为止。
TCA1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
OPR1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
OPD1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。

- 2 如果 ALS 板存储在 -25°C 至 -15°C 下，则在室温下解冻并离心。
- 3 将新的 96 孔 PCR 板标为 “HYB1”（杂交 1）。
- 4 在带热盖的扩增仪上将以下程序另存为 HYB1：
  - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
  - ▶ 将反应液剂量设为 50 微升
  - ▶ 95°C 下 10 分钟
  - ▶ 85°C 下 2.5 分钟
  - ▶ 75°C 下 2.5 分钟
  - ▶ 65°C 下 2.5 分钟
  - ▶ 保持在 57°C

### 程序

- 1 将每种 RNA 和/或 DNA 文库分别加 20 微升到 HYB1 板中。
- 2 将 15 微升 TCB1 加到每个孔中。

- 3 将10微升TCA1加到每个孔中。
- 4 加入合适的探针：
  - ▶ 如果是RNA文库，加入5微升OPR1（红色盖子）。
  - ▶ 如果是DNA文库，加入5微升OPD1（蓝色盖子）。
- 5 盖上Microseal“B”，并将板以1800转/分的速度振动2分钟。
- 6 置于预编程序的扩增仪上并运行HYB1程序。在57°C下过夜（8到24小时）杂交。

## 执行第一次采集

这一步使用SMB（链霉亲和素磁力微珠）采集杂交到目标靶向区域的探针。三份采用EEW2的热清洗液可以从微珠中去除非特定的结合。然后从微珠中洗脱富集文库，准备用于第二轮杂交。

### 耗材

- ▶ SMB（链霉亲和素磁力微珠）
- ▶ ET2（洗脱靶缓冲液2）
- ▶ EE2（富集洗脱液2）
- ▶ HP3（2摩尔/升NaOH）
- ▶ EEW2（增强型富集清洗液2）
- ▶ 96孔MIDI板
- ▶ 96孔PCR板
- ▶ Microseal“B”粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 在此程序中，请务必使用SMB，而不要使用SPB。
- ▶ 需频繁振荡SMB，以确保微珠悬浮。

### 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
EE2	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
EEW2	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡1分钟以重悬。
SMB	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡1分钟。 如果有微珠沉淀，请用移液器上下吸打让沉淀物散开，然后振荡以重悬。
ET2	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
HP3	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。

- 2 使用MIDI加热插块将Hybex孵育器预热到57°C。
- 3 将新的96孔MIDI板标为“CAP1”。
- 4 将新的96孔PCR板标为“ELU1”（洗脱液1）。



## 程序

### 结合

- 1 从扩增仪上取下 HYB1 板。
- 2 将 150 微升 SMB 加到 CAP1 板的每个孔中。
- 3 将 HYB1 板的每个文库分别转移 50 微升到 CAP1 板相应的孔中。
- 4 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 在 57°C 的 Hybex 孵育器中孵育 25 分钟。
- 6 在磁力架上放置 2 分钟。
- 7 在磁力架上时，使用移液器取走并丢弃上层清液。

### 清洗

- 1 按以下方式进行清洗：
  - a 从磁力架上取下 CAP1 板。
  - b 将 200 微升 EEW2 加到每个孔中。
  - c 用移液器上下吸打 5 次以混匀溶液。每次采集文库时都要使用干净的吸头。
  - d 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 4 分钟。  
如果还有微珠沉淀，请取下 Microseal 并用移液器上下吸打以混匀溶液，确保所有微珠都重悬。盖上新的 Microseal “B”。
  - e 在 57°C 的 Hybex 孵育器中孵育 5 分钟。
  - f 在磁力架上放置 2 分钟。
  - g 在磁力架上时，使用移液器取出并丢弃每个孔中的上层清液。
- 2 重复步骤 1 (a-g)，以进行第二次清洗。
- 3 重复步骤 1 (a-g)，以进行第三次清洗。



#### 注意

为使实验分析方法达到最佳性能，必须进行三次清洗。

- 4 使用装有细吸头的 P20 移液器，从每个孔中取走所有残余的上层清液。

### 洗脱

- 1 在微量离心管中装入以下试剂，制备 EE2+HP3 洗脱混合液。

洗脱混合液成分	每 3 个样品	每 8 个样品	每 16 个样品	每 24 个样品
EE2	95 $\mu$ l	228 $\mu$ l	456 $\mu$ l	684 $\mu$ l
HP3	5 $\mu$ l	12 $\mu$ l	24 $\mu$ l	36 $\mu$ l

- ▶ 至少要制备 3 个样品。
- ▶ 使用后应丢弃所有剩余的洗脱混合液。

- 2 稍作振荡进行混匀。
- 3 从磁力架上取下 CAP1 板。

- 4 将 17 微升 EE2+HP3 洗脱混合液加到每个样品沉淀中。
- 5 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 6 在磁力架上放置 2 分钟。
- 7 从 CAP1 板的每个孔中小心转移 15 微升洗脱液到 ELU1 板。

**注意**

如果转移的洗脱液少于指定剂量，可能会影响实验分析方法性能。

- 8 将 5 微升 ET2 加到 ELU1 板的每种洗脱液中。
- 9 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。

## 执行第二次杂交

这一步第二次将富集 RNA 和/或 DNA 文库的靶向区域与采集探针结合。第二次杂交可确保采集区域的高特异性。为确保文库富集达到最佳性能，第二次杂交步骤应执行至少 1.5 小时，最多不超过 4 小时。

### 耗材

- ▶ TCA1（目标采集添加剂 1）
- ▶ TCB1（目标采集缓冲液 1）
- ▶ OPR1（肿瘤学探针 RNA 1 [红色盖子]）
- ▶ OPD1（肿瘤学探针 DNA 1 [蓝色盖子]）
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 只能将 OPR1（红色盖子）用于 RNA 文库。
- ▶ 只能将 OPD1（蓝色盖子）用于 DNA 文库。

### 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
TCB1	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡 1 分钟以重悬。然后，进行短暂的离心。如果存在结晶，请用手将试管焐热，然后进行振荡，直到结晶溶解为止。
TCA1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
OPR1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
OPD1	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。

- 2 在带热盖的扩增仪上将以下程序另存为 HYB2：

- ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 100°C
- ▶ 将反应液剂量设为 50 微升
- ▶ 95°C 下 10 分钟
- ▶ 85°C 下 2.5 分钟
- ▶ 75°C 下 2.5 分钟
- ▶ 65°C 下 2.5 分钟
- ▶ 保持在 57°C

## 程序

- 1 将 15 微升 TCB1 加到 ELU1 板的每个孔中。
- 2 将 10 微升 TCA1 加到每个孔中。
- 3 加入合适的探针：
  - ▶ 如果是 RNA 文库，加入 5 微升 OPR1（红色盖子）。
  - ▶ 如果是 DNA 文库，加入 5 微升 OPD1（蓝色盖子）。
- 4 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 置于预编程序的扩增仪上并运行 HYB2 程序。在 57°C 下杂交 1.5 到 4 小时。

## 执行第二次采集

这一步使用 SMB（链霉亲和素磁力微珠）采集杂交到目标靶向区域的探针。RSB 用于冲洗采集的文库，并从微珠中去除非特定的结合。然后从微珠中洗脱富集文库，准备用于测序。

## 耗材

- ▶ SMB（链霉亲和素磁力微珠）
- ▶ ET2（洗脱靶缓冲液 2）
- ▶ EE2（富集洗脱液 2）
- ▶ HP3（2 摩尔/升 NaOH）
- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ 96 孔 MIDI 板
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

## 关于试剂

- ▶ 在此程序中，请务必使用 SMB，而不要使用 SPB。
- ▶ 需频繁振荡 SMB，以确保微珠悬浮。

## 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
EE2	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
SMB	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡 1 分钟。 如果有微珠沉淀，请用移液器上下吸打让沉淀物散开，然后振荡以重悬。
ET2	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
HP3	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
RSB	2°C 到 8°C 或 -25°C 到 -15°C	恢复至室温。 如果 RSB 存储在 -25°C 到 -15°C 下，使用前，请先在室温下解冻并振荡。

- 2 使用 MIDI 加热插块将 Hybex 孵育器预热到 57°C。

- 3 将新的 96 孔 MIDI 板标为“CAP2”。
- 4 将新的 96 孔 PCR 板标为“ELU2”（洗脱液 2）。

## 程序

### 结合

- 1 从扩增仪上取下 ELU1 板。
- 2 将 150 微升 SMB 加到 CAP2 板的每个孔中。
- 3 将 ELU1 板的每个文库分别转移 50 微升到 CAP2 板相应的孔中。
- 4 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 在 57°C 的 Hybex 孵育器中孵育 25 分钟。
- 6 在磁力架上放置 2 分钟。
- 7 在磁力架上时，使用移液器小心取出并丢弃每个孔中的上层清液。

### 清洗

- 1 从磁力架上取下 CAP2 板。
- 2 将 200 微升 RSB 加到每个孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 4 分钟。  
如果还有微珠沉淀，请取下 Microseal 并用移液器上下吸打以混匀溶液，确保所有微珠都重悬。盖上新的 Microseal “B”。
- 4 在磁力架上放置 2 分钟。
- 5 在磁力架上时，使用移液器小心取走并丢弃所有上层清液。
- 6 使用装有细吸头的 P20 移液器，从每个孔中取走所有残余的上层清液。

### 洗脱

- 1 在微量离心管中装入以下试剂，制备新鲜的 EE2+HP3 洗脱混合液。

洗脱混合液成分	每 3 个样品	每 8 个样品	每 16 个样品	每 24 个样品
EE2	95 $\mu$ l	228 $\mu$ l	456 $\mu$ l	684 $\mu$ l
HP3	5 $\mu$ l	12 $\mu$ l	24 $\mu$ l	36 $\mu$ l

- ▶ 至少要制备 3 个样品。
- ▶ 使用后应丢弃所有剩余的洗脱混合液。

- 2 振荡试管混匀溶液。
- 3 从磁力架上取下 CAP2 板。
- 4 将 22 微升 EE2+HP3 洗脱混合液加到每个样品沉淀中。
- 5 盖上 Microseal “B”，并将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 6 在磁力架上放置 2 分钟。
- 7 从 CAP2 板的每个孔中转移 20 微升洗脱液到 ELU2 板。

**注意**

如果转移的洗脱液少于指定剂量，可能会影响实验分析方法性能。

- 8 将5微升ET2加到ELU2板的每种洗脱液中。
- 9 盖上Microseal“B”，并将板以1800转/分的速度振动2分钟。

**安全停止点**

要停止操作，请在PCR板上盖上Microseal“B”并以 $280 \times g$ 的转速进行短暂的离心。在 $2^{\circ}\text{C}$ 到 $8^{\circ}\text{C}$ 下可以存放一夜，在 $-25^{\circ}\text{C}$ 至 $-15^{\circ}\text{C}$ 下最长可存放7天。

**扩增富集文库**

此步骤使用引物来扩增富集文库。

**耗材**

- ▶ PPC3 (PCR引物混合液3)
- ▶ EPM (增强型PCR混合液)
- ▶ Microseal“B”粘性密封膜

**准备**

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
EPM	$-25^{\circ}\text{C}$ 到 $-15^{\circ}\text{C}$	在冰上解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
PPC3	$-25^{\circ}\text{C}$ 到 $-15^{\circ}\text{C}$	在室温下解冻。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。

- 2 如果ELU2板存储在 $-25^{\circ}\text{C}$ 至 $-15^{\circ}\text{C}$ 下，则在室温下解冻并离心。
- 3 在带热盖的扩增仪上将以下程序另存为EL-PCR：
  - ▶ 选择预热盖选项，并将其设置为 $100^{\circ}\text{C}$
  - ▶ 将反应液剂量设为50微升
  - ▶  $98^{\circ}\text{C}$ 下30秒钟
  - ▶ 18次以下循环：
    - ▶  $98^{\circ}\text{C}$ 下10秒钟
    - ▶  $60^{\circ}\text{C}$ 下30秒钟
    - ▶  $72^{\circ}\text{C}$ 下30秒钟
  - ▶  $72^{\circ}\text{C}$ 下5分钟
  - ▶ 保持在 $10^{\circ}\text{C}$

**程序**

- 1 将5微升PPC3加到ELU2板的每个孔中。
- 2 将20微升EPM加到每个孔中。
- 3 盖上Microseal“B”，并将板以1500转/分的速度振动2分钟。
- 4 以 $280 \times g$ 的转速进行短暂的离心。
- 5 置于扩增仪上并运行EL-PCR程序。

## 纯化已扩增的富集文库

此步骤使用 SPB（样品纯化微珠）从不需要的反应成分中纯化富集文库。

### 耗材

- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ SPB（样品纯化微珠）
- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ 96 孔 MIDI 板
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 每次使用前都要振荡 SPB。
- ▶ 需频繁振荡 SPB，以确保微珠均匀散布。
- ▶ 由于溶液的粘度较高，请缓慢吸出并分配 SPB。

### 准备

- 1 准备下列耗材。

物品	存储	说明
SPB	2°C 到 8°C	恢复至室温。使用 SPB 前，请先振荡 1 分钟。
RSB	2°C 到 8°C 或 -25°C 到 -15°C	恢复至室温。 如果 RSB 存储在 -25°C 到 -15°C 下，使用前，请先在室温下解冻并振荡。

- 2 将新的 96 孔 MIDI 板标为 “BIND2”。
- 3 将新的 96 孔 PCR 板标为 “PL”（纯化文库）。
- 4 新鲜制备浓度为 80% 的乙醇。

### 程序

#### 结合

- 1 从扩增仪上取下 ELU2 板。
- 2 将 110 微升 SPB 加到 BIND2 板的每个孔中。
- 3 将 ELU2 板的每个文库分别转移 50 微升到 BIND2 板相应的孔中。
- 4 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 在室温下孵育 5 分钟。

#### 清洗

- 1 将 BIND2 板置于磁力架上 5 分钟。
- 2 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。

- 3 按以下方式进行清洗：
  - a 在磁力架上时，加入 200 微升浓度为 80% 的新鲜乙醇。
  - b 等待 30 秒钟，然后取走并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 4 重复步骤 3 (a-b)，以进行第二次清洗。



#### 注意

为使实验分析方法达到最佳性能，必须进行两次清洗。

- 5 使用装有细吸头的 P20 移液器，从每个孔中取走残余的上层清液。

## 洗脱

- 1 从磁力架上取下 BIND2 板。
- 2 将 32 微升 RSB 加到每个孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 4 在室温下孵育 2 分钟。
- 5 在磁力架上放置 2 分钟。
- 6 将 BIND2 板的每种洗脱液分别转移 30 微升到 PL 板相应的孔中。

### 安全停止点

要停止操作，请在 PCR 板上盖上 Microseal “B” 并以  $280 \times g$  的转速进行短暂的离心。在  $2^{\circ}\text{C}$  到  $8^{\circ}\text{C}$  下可以存放一夜，在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下最长可存放 30 天。

## 定量文库

精确定量可确保有足够的文库用于流动槽上的簇生成。使用荧光定量方法（用户自备）在文库标准化之前评估富集文库的数量。为实现高效的基于微珠的文库标准化，每个文库的浓度不得低于 3 纳克/微升。经证明，AccuClear 超高敏感度 dsDNA 定量试剂盒非常适用于本操作流程中的文库定量。

## 建议的准则

- 1 与荧光定量试剂盒、文库和空白溶液一起提供的 DNA 标准溶液应全部按一式三份运行。
- 2 确定每种溶液的平均相对荧光单位 (RFU)。
- 3 计算以下值：
  - ▶ 标准溶液平均 RFU - 空白溶液平均 RFU = 标准溶液标准化 RFU
  - ▶ 文库平均 RFU - 空白溶液平均 RFU = 每个文库的标准化 RFU

## 评估数量

按照以下标准评估每个文库产生的标准化 RFU。

荧光测量值	建议
$\leq$ 空白溶液平均 RFU	如果纯化的 DNA 或 RNA 样品符合数量与质量规格，则重复执行文库制备和富集。
$>$ 空白溶液平均 RFU (且) $<$ 标准溶液标准化 RFU	继续 <b>标准化文库</b> 。 注意：使用 RFU 低于标准溶液标准化 RFU 的文库时，可能无法产出足够的测序结果，因此可能无法可靠地检出样品中可能存在的变异。
$\geq$ 标准溶液标准化 RFU	继续 <b>标准化文库</b> 。

## 标准化文库

此过程会使用基于微珠的标准化对每个文库的数量进行标准化，以确保混合的文库中的文库表示一致。

TruSight Tumor 170 当前不支持手动文库标准化。如果您想要手动对文库进行标准化，请联系 Illumina 技术支持。

### 耗材

- ▶ 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 2)
- ▶ HP3 (2 摩尔/升 NaOH)
- ▶ PCR 级用水
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ 96 孔 MIDI 板
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜
- ▶ 1.7 毫升微量离心管 (2 个)

### 关于试剂

- ▶ 需频繁振荡 LNB1，以确保微珠均匀散布。

### 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。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
LNS2	15°C 到 30°C	恢复至室温。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。
LNB1	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡 1 分钟，以确保微珠均匀散布。用移液器上下吸打 LNB1 沉淀，以确保重悬。
LNW1	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡以重悬。
HP3	2°C 到 8°C	恢复至室温。振荡以重悬。然后，进行短暂的离心。

- 2 如果 PL 板存储在 -25°C 至 -15°C 下，则在室温下解冻并离心该板。
- 3 将新的 96 孔 MIDI 板标为 “BIND3”。
- 4 将新的 96 孔 PCR 板标为 “NL” (标准化文库)。

### 程序

- 1 在新的微量离心管中装入以下试剂，制备 LNA1+LNB1 预先混合液。

预先混合液成分	每 3 个样品	每 8 个样品	每 16 个样品	每 24 个样品
LNA1	132 µl	352 µl	704 µl	1056 µl
LNB1	24 µl	64 µl	128 µl	192 µl

- 2 振荡试管混匀溶液。



- 3 在新的微量离心管中装入以下试剂，制备新鲜的浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH 溶液。

溶液成分	每 3 个样品	每 8 个样品	每 16 个样品	每 24 个样品
PCR 级用水	114 $\mu$ l	304 $\mu$ l	608 $\mu$ l	912 $\mu$ l
HP3	6 $\mu$ l	16 $\mu$ l	32 $\mu$ l	48 $\mu$ l

- 4 振荡试管混匀溶液。

## 结合

- 1 将 45 微升 LNA1+LNB1 预先混合液加到 BIND3 板的每个孔中。
- 2 将 PL 板的每个文库分别加 20 微升到 BIND3 板相应的孔中。
- 3 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 10 分钟。
- 4 将 BIND3 板置于磁力架上 2 分钟。
- 5 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。

## 清洗

- 1 按以下方式进行清洗：
  - a 从磁力架上取下 BIND3 板。
  - b 将 45 微升 LNW1 加到每个孔中。
  - c 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - d 在磁力架上放置 2 分钟。
  - e 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 2 重复步骤 1 (a-e)，以进行第二次清洗。



### 注意

为使实验分析方法达到最佳性能，必须进行两次清洗。

- 3 使用装有细吸头的 P20 移液器，从每个孔中取走所有残余的上层清液。

## 洗脱

- 1 将 32 微升浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH 溶液加到每个孔中。
- 2 盖上 Microseal “B”，以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 3 将 BIND3 置于磁力架上 2 分钟。
- 4 将 BIND3 板的每种洗脱液分别转移 30 微升到 NL 板相应的孔中。
- 5 将 30 微升 LNS2 加到 NL 板的每个文库中。
- 6 用移液器上下吸打以混匀。

## 安全停止点

要停止操作，请在 PCR 板上盖上 Microseal “B” 并以  $280 \times g$  的转速进行短暂的离心。在  $2^{\circ}\text{C}$  到  $8^{\circ}\text{C}$  下可以存放一夜，在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下最长可存放 30 天。

## 准备测序

请遵循下列程序使 NextSeq 系统上的 TruSight Tumor 170 测序获得最佳簇密度：

- ▶ 每次运行测序 16 个文库（8 个 DNA 和 8 个 RNA），以实现每个样品的最高覆盖率。
- ▶ 如果只对 DNA 文库测序，样品不要超过 10 个。
- ▶ 如果只对 RNA 文库测序，样品不要超过 16 个。
- ▶ [可选] 加入低浓度 PhiX 添加对照品作为比对和错误率计算的阳性对照品。有关详细信息，请参见 Illumina 网站上的 PhiX 对照品 v3 支持页。

通过下列程序使 HiSeq 2500 系统上的 TruSight Tumor 170 测序获得最佳簇密度：

- ▶ 每次运行测序 12 个文库（6 个 DNA 和 6 个 RNA），以实现每个样品的最高覆盖率。
- ▶ 如果只对 DNA 文库测序，样品不要超过 6 个。
- ▶ 如果只对 RNA 文库测序，样品不要超过 12 个。
- ▶ [可选] 加入低浓度 PhiX 添加对照品作为比对和错误率计算的阳性对照品。有关详细信息，请参见 Illumina 网站上的 PhiX 对照品 v3 支持页。
- ▶ 如果要对其他 DNA 和 RNA 文库组合进行测序，请联系 Illumina 技术支持。

## 耗材

- ▶ 标准化文库（NL 板）
- ▶ NextSeq 500/550 高输出试剂盒 v2（300 次循环）
- ▶ HT1（杂交缓冲液）
- ▶ 用于 HiSeq 系统的 HiSeq 试剂
  - ▶ HiSeq 快速 SBS 试剂盒 v2
  - ▶ HiSeq 快速簇生成试剂盒 v2 双末端测序和单端测序
- ▶ 微量离心管（扣入盖和螺旋盖）
- ▶ PhiX 对照品 v3

## 准备

1 根据使用的 Illumina 测序平台选择以下其中一个耗材选项。

- ▶ [选项 1] 为 NextSeq 系统运行准备下列耗材：

物品	存储	说明
NextSeq 高输出试剂夹盒 (300 次循环)	-25°C 到 -15°C	放入装有室温清水的水槽中，直至解冻成功（大约 60 分钟）。
HT1（杂交缓冲液）	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。
NextSeq 缓冲液夹盒	15°C 到 30°C	放在室温下。
NextSeq 高输出流动槽	2°C 到 8°C	拆开流动槽包装。在室温下搁置 30 分钟。

- ▶ [选项 2] 为 HiSeq 2500 系统运行准备下列耗材：

物品	存储	说明
HiSeq 快速 SBS 试剂盒 v2	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。
HT1（杂交缓冲液）	-25°C 到 -15°C	在室温下解冻。振荡以重悬。

物品	存储	说明
HiSeq 快速簇生成试剂盒 v2 双末端测序和单端测序	15°C 到 30°C	放在室温下。
移植的 HiSeq 快速 PE 流动 槽 v2	2°C 到 8°C	搁置 30 分钟，使其恢复到室温。

- 如果 NL 板存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  下，则在室温下解冻并离心。
- 将加热块预热到  $96^{\circ}\text{C}$ 。
- 将一个螺旋盖微量离心管标为“PRL”（混合 RNA 文库）。
- 将一个螺旋盖微量离心管标为“PDL”（混合 DNA 文库）。
- 将一个螺旋盖微量离心管标为“DIL1”（稀释液 1）。
- 将一个扣入盖微量离心管标为“DIL2”（稀释液 2）。

## 程序

### 混合文库

- 将 NL 板的每个标准化 RNA 文库分别转移 10 微升到 PRL 试管中。
- 将 NL 板的每个标准化 DNA 文库分别转移 10 微升到 PDL 试管中。
- 振荡每个试管以混匀溶液。
- 对每个试管进行短暂的离心。
- 在  $96^{\circ}\text{C}$  的加热块中孵育 2 分钟。
- 将每个试管翻转 2 次混匀溶液。
- 进行短暂的离心，然后放在冰上 5 分钟。



#### 提示

PRL 和 PDL 试管在  $-25^{\circ}\text{C}$  到  $-15^{\circ}\text{C}$  下最多可以存储 30 天。如果您使用的 PRL 和 PDL 试管是冷冻存储的，请先重复步骤 5-7，对试管进行重新变性、混合及冷却，然后再继续**制备第一种稀释液**（第 31 页）。

### 制备第一种稀释液

如果要测序的 DNA 文库和 RNA 文库数量相同，请以 DNA 对 RNA 4:1 的比例混合。如果要测序的文库数量不同（例如，7 份 DNA + 3 份 RNA），请联系 Illumina 技术支持。

根据测序的文库类型选择以下其中一个混合程序。

#### ▶ 同时测序 cDNA 和 DNA 文库：

- 将 20 微升 PDL 转移到一个空的 DIL1 试管中。
- 将 5 微升 PRL 加到 DIL1 中。
- 将 475 微升 HT1 缓冲液加到 DIL1 中，制备 1:20 稀释液。
- 振荡试管混匀溶液。
- 然后，进行短暂的离心。
- 继续为 *NextSeq 稀释文库*（第 32 页）或为 *HiSeq 稀释文库*（第 32 页）。

► **只对DNA文库测序：**

- 1 将 10 微升 PDL 转移到一个空的 DIL1 试管中。
- 2 将 190 微升 HT1 缓冲液加到 DIL1 中，制备 1:20 稀释液。
- 3 振荡试管混匀溶液。
- 4 然后，进行短暂的离心。
- 5 继续为 *NextSeq* 稀释文库（第 32 页）或为 *HiSeq* 稀释文库（第 32 页）。

► **只对cDNA文库测序：**

- 1 将 10 微升 PRL 转移到一个空的 DIL1 试管中。
- 2 将 190 微升 HT1 缓冲液加到 DIL1 试管中，制备 1:20 稀释液。
- 3 振荡试管混匀溶液。
- 4 然后，进行短暂的离心。
- 5 继续为 *NextSeq* 稀释文库（第 32 页）或为 *HiSeq* 稀释文库（第 32 页）。

## 制备第二种稀释液

根据所使用的测序系统，采用适当的稀释操作流程。

### 为 NextSeq 稀释文库

执行以下步骤制备样品文库，用于 NextSeq 系统：

- 1 将 40 微升 DIL1 转移到一个空的 DIL2 试管中。
- 2 将 1360 微升 HT1 缓冲液加到 DIL2 中。
- 3 [可选] 加入 2.5 微升变性 20 pM PhiX。
- 4 振荡试管混匀溶液。
- 5 然后，进行短暂的离心。
- 6 如《*NextSeq 500 系统指南*》（文档号 15046563）或《*NextSeq 550 系统指南*》（文档号 15069765）中所述，将 1300 微升 DIL2 装入已解冻的 NextSeq 系统试剂夹盒中。

### 为 HiSeq 稀释文库

执行以下步骤制备样品文库，用于 HiSeq 系统：

- 1 将 130 微升 DIL1 转移到一个空的 DIL2 试管中。
- 2 将 1170 微升 HT1 缓冲液加到 DIL2 中。
- 3 [可选] 加入 2.5 微升变性 20 pM PhiX。
- 4 振荡试管混匀溶液。
- 5 然后，进行短暂的离心。
- 6 将 DIL2 试管总量装入 HiSeq 2500 系统的模板装入工作站中。有关试剂制备在内的各项说明，请参见《*HiSeq 2500 系统指南*》（文档号 15035786）。

# 支持信息

简介 .....	33
缩写 .....	33
试剂盒内含物品 .....	34
耗材和设备 .....	36

## 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
1stSS	第一链合成
2ndSS	第二链合成
ALS	已扩增的文库样品
cDNA	补充 DNA
CF	cDNA 片段
DIL1	稀释液 1
DIL2	稀释液 2
ELU1	洗脱液 1
ELU2	洗脱液 2
gDNA	基因组 DNA
HQ-RNA	高质量 RNA
HYB1	杂交 1
LQ-RNA	低质量 RNA
LS	文库样品
LP	文库制备
LP2	文库制备 2
NL	标准化文库
PCF	已纯化的 cDNA 片段
PDL	混合 DNA 文库
PL	已纯化的文库
PNL	已混合的标准化文库
PRL	混合 RNA 文库

## 试剂盒内含物品

请确保您已备齐本部分中指定的试剂后再继续执行操作流程。

### 注意

- ▶ 1号、8号和9号盒中的试剂带有以颜色编码的盖子，用以识别相关的文库。
  - ▶ 蓝色盖子表示只用于DNA文库的试剂。
  - ▶ 红色盖子表示只用于RNA文库的试剂。

耗材	商品目录号
TruSight Tumor 170 NextSeq 试剂盒（24 个样品文库制备试剂盒、（3 个）NextSeq 500/550 高输出 v2 试剂盒 [300 次循环]）	OP-101-1003
TruSight Tumor 170（1 组文库制备，24 个样品）	OP-101-1004

## 文库制备

### 1号盒 – 文库制备 - RNA（扩增前）

数量	试剂	描述	存储温度
1	FSM	第一链合成混合液	-25°C 到 -15°C
1	SSM	第二链混合液	-25°C 到 -15°C
1	EPH3	洗脱液、引物、片段高度混合液 3	-25°C 到 -15°C
1	RVT	逆转录酶	-25°C 到 -15°C

### 2号盒 – 文库制备 - DNA（扩增前）

数量	试剂	描述	存储温度
2	ERA1-A	末端修复尾端加 A 酶混合液 1	-25°C 到 -15°C
2	ERA1-B	末端修复尾端加 A 缓冲液 1	-25°C 到 -15°C
2	ALB1	接头连接缓冲液 1	-25°C 到 -15°C
2	LIG3	DNA 连接酶 3	-25°C 到 -15°C
2	SUA1	通用短接头 1	-25°C 到 -15°C
2	STL	停止连接缓冲液	-25°C 到 -15°C
2	EPM	增强型 PCR 混合液	-25°C 到 -15°C

### 3号盒 – 文库制备（扩增前）

数量	试剂	描述	存储温度
1	RSB	重悬缓冲液	2°C 到 8°C 或 -25°C 到 -15°C
2	SPB	样品纯化微珠	2°C 到 8°C
1	TEB	TE 缓冲液	2°C 到 8°C

## 4号盒 – 文库制备 – 唯一 PCR 标签引物混合液（扩增前）

数量	试剂	描述	存储温度
1	UP01	唯一标签引物混合液 01	-25°C 到 -15°C
1	UP02	唯一标签引物混合液 02	-25°C 到 -15°C
1	UP03	唯一标签引物混合液 03	-25°C 到 -15°C
1	UP04	唯一标签引物混合液 04	-25°C 到 -15°C
1	UP05	唯一标签引物混合液 05	-25°C 到 -15°C
1	UP06	唯一标签引物混合液 06	-25°C 到 -15°C
1	UP07	唯一标签引物混合液 07	-25°C 到 -15°C
1	UP08	唯一标签引物混合液 08	-25°C 到 -15°C
1	UP09	唯一标签引物混合液 09	-25°C 到 -15°C
1	UP10	唯一标签引物混合液 10	-25°C 到 -15°C
1	UP11	唯一标签引物混合液 11	-25°C 到 -15°C
1	UP12	唯一标签引物混合液 12	-25°C 到 -15°C
1	UP13	唯一标签引物混合液 13	-25°C 到 -15°C
1	UP14	唯一标签引物混合液 14	-25°C 到 -15°C
1	UP15	唯一标签引物混合液 15	-25°C 到 -15°C
1	UP16	唯一标签引物混合液 16	-25°C 到 -15°C

## 5号盒 – 文库制备 – 组合 PCR 标签引物混合液（扩增前）

数量	试剂	描述	存储温度
1	CP01	组合标签引物混合液 01	-25°C 到 -15°C
1	CP02	组合标签引物混合液 02	-25°C 到 -15°C
1	CP03	组合标签引物混合液 03	-25°C 到 -15°C
1	CP04	组合标签引物混合液 04	-25°C 到 -15°C
1	CP05	组合标签引物混合液 05	-25°C 到 -15°C
1	CP06	组合标签引物混合液 06	-25°C 到 -15°C
1	CP07	组合标签引物混合液 07	-25°C 到 -15°C
1	CP08	组合标签引物混合液 08	-25°C 到 -15°C
1	CP09	组合标签引物混合液 09	-25°C 到 -15°C
1	CP010	组合标签引物混合液 10	-25°C 到 -15°C
1	CP011	组合标签引物混合液 11	-25°C 到 -15°C
1	CP012	组合标签引物混合液 12	-25°C 到 -15°C
1	CP013	组合标签引物混合液 13	-25°C 到 -15°C
1	CP014	组合标签引物混合液 14	-25°C 到 -15°C
1	CP015	组合标签引物混合液 15	-25°C 到 -15°C
1	CP016	组合标签引物混合液 16	-25°C 到 -15°C

## 富集

### 6号盒 – 富集（扩增后）

数量	试剂	描述	存储温度
2	TCB1	目标采集缓冲液 1	2°C 到 8°C
2	SMB	链霉亲和素磁力微珠	2°C 到 8°C
2	HP3	2 摩尔/升 NaOH	2°C 到 8°C
2	ET2	洗脱靶 2	2°C 到 8°C
2	LNB1	文库标准化微珠 1	2°C 到 8°C
2	LNW1	文库标准化清洗液 1	2°C 到 8°C
1	RSB	重悬缓冲液	2°C 到 8°C 或 -25°C 到 -15°C
2	SPB	样品纯化微珠	2°C 到 8°C
2	LNS2	文库标准化存储 2	15°C 到 30°C

► 收到 LNS2 试管后，将其从 2°C 到 8°C 盒中取出，存放在 15°C 到 30°C 盒中。

### 7号盒 – 富集（扩增后）

数量	试剂	描述	存储温度
2	TCA1	目标采集添加剂 1	-25°C 到 -15°C
4	EEW2	增强型富集清洗液 2	-25°C 到 -15°C
2	EE2	富集洗脱液 2	-25°C 到 -15°C
2	EPM	增强型 PCR 混合液	-25°C 到 -15°C
2	PPC3	PCR 引物混合液 3	-25°C 到 -15°C
2	LNA1	文库标准化添加剂 1	-25°C 到 -15°C

### 8号盒 – TruSight Tumor 170 Content Set（仅适用于 DNA）

数量	试剂	描述	存储温度
1	OPD1	肿瘤学 DNA 探针主库	-25°C 到 -15°C

### 9号盒 – TruSight Tumor 170 Content Set（仅适用于 RNA）

数量	试剂	描述	存储温度
1	OPR1	肿瘤学 RNA 探针主库	-25°C 到 -15°C

## 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。



## 耗材

耗材	供应商
[可选] 含 1 份 DNA 标准溶液的 AccuClear 超高灵敏度 dsDNA 定量试剂盒	Biotium, 商品目录号 31029
[可选] AllPrep DNA/RNA FFPE 试剂盒	QIAGEN, 商品目录号 80234
[可选] QuantiFluor RNA 系统	Promega, 商品目录号 E3310
[可选] Agilent DNA 1000 试剂盒	Agilent, 商品目录号 5067-1504
[可选] Agilent RNA 6000 纳米试剂盒	Agilent, 商品目录号 5067-1511
[可选] 标准灵敏度 RNA 分析试剂盒	Advanced Analytical Technologies, 商品目录号 DNF-471-0500
[可选] FFPE QC 试剂盒	Illumina, 商品目录号 WG-321-1001
[可选] DNA 参考标准	Horizon Diagnostics, 商品目录号 HD753
[可选] 通用人类参考 RNA	Agilent, 商品目录号 740000
8 联微细管	Covaris, 部件号 520053
E220evolution 8 联微细管托架接头 (与 E220evolution 搭配使用)	Covaris, 部件号 500430
12 排 8 联微细管托架接头 (与 LE220 搭配使用)	Covaris, 部件号 500191
1.7 毫升微量离心管 (不含核酸酶)	一般实验室供应商
2 毫升微量离心管 (不含核酸酶)	一般实验室供应商
15 毫升圆锥形试管	一般实验室供应商
50 毫升圆锥形试管	一般实验室供应商
20 微升防倒吸移液器吸头	一般实验室供应商
200 微升防倒吸移液器吸头	一般实验室供应商
1 毫升防倒吸移液器吸头	一般实验室供应商
0.8 毫升 96 孔存储板 (MIDI 板)	Fisher Scientific, 部件号 AB-0859
0.2 毫升 96 孔聚丙烯 PCR 板	一般实验室供应商
96 孔黑色透明平底微孔板	Coming, 部件号 3904
不含核酸酶的试剂槽 (一次性 PVC 水槽)	VWR, 部件号 89094-658
Microseal "B" 粘性密封膜 (粘性板密封件)	Bio-Rad, 部件号 MSB-1001
PCR 级用水	一般实验室供应商
分子生物学用无水乙醇	Sigma-Aldrich, 部件号 E7023
HiSeq 快速 SBS 试剂盒 v2 (200 次循环)	Illumina, 商品目录号 FC-402-4021
HiSeq 快速簇生成试剂盒 v2 — 双末端测序和单端测序	Illumina, 商品目录号 GD-402-4002
NextSeq 500/550 高输出试剂盒 v2 (300 次循环)	Illumina, 商品目录号 FC-404-2004

## 设备 (扩增前)

设备	供应商
扩增仪	一般实验室供应商
加热块 (1.5 毫升微量离心管)	一般实验室供应商

设备	供应商
(2 个) 加热块 (Hybex 孵育器, 加热底座)	SciGene, 商品目录号 • 1057-30-O (115 伏) 或 • 1057-30-2 (230 伏)
(2 个) MIDI 加热插块 (与 Hybex 搭配使用)	Illumina, 商品目录号 BD-60-601
台式离心机 (板离心机)	一般实验室供应商
微量离心管 (1.5 毫升试管)	一般实验室供应商
磁力架 96	Thermo Fisher, 商品目录号 AM10027
振荡器	一般实验室供应商
板混合器 (BioShake XP)	Q Instruments, 部件号 1808-0505
Covaris 聚焦超声仪	• Covaris, 部件号 500219 (型号 LE220) 或 • Covaris, 部件号 500429 (型号 E220evolution)
[可选] 2100 Bioanalyzer 桌面系统	Agilent, 部件号 G2940CA
[可选] Fragment Analyzer 全自动毛细管电泳系统	Advanced Analytical Technologies, 部件号 FSv2-CE2 或 FSv2-CE10

## 设备 (扩增后)

设备	供应商
加热块 (1.5 毫升微量离心管)	一般实验室供应商
加热块 (Hybex 孵育器, 96 孔板)	SciGene, 商品目录号 • 1057-30-O (115 伏) 或 • 1057-30-2 (230 伏)
MIDI 加热插块 (与 Hybex 搭配使用)	Illumina, 商品目录号 BD-60-601
台式离心机 (板离心机)	一般实验室供应商
微量离心管 (1.5 毫升试管)	一般实验室供应商
磁力架 96	Thermo Fisher, 商品目录号 AM10027
振荡器	一般实验室供应商
板混合器 (BioShake XP)	Q Instruments, 部件号 1808-0505
扩增仪	一般实验室供应商
NextSeq 系统	Illumina, 商品目录号 • SY-415-1001 或 • SY-415-1002
[可选] 2100 Bioanalyzer 桌面系统	Agilent, 部件号 G2940CA
[可选] Fragment Analyzer 全自动毛细管电泳系统	Advanced Analytical Technologies, 部件号 FSv2-CE2 或 FSv2-CE10
[可选] HiSeq 系统	Illumina, 商品目录号 SY-401-2501

# 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

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®