

TruSeq 基因型 Ne

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、MiniSeq、MiSeq、Nextera、NextSeq、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。

目录

第 1 章概述	1
简介	1
DNA 输入建议	1
更多资源	1
第 2 章操作流程	3
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	9
延伸及连接结合的寡核苷酸	10
扩增文库	11
纯化文库	13
标准化文库	16
混合文库	18
附录 A 支持信息	19
简介	19
缩写	19
试剂盒内含物品	20
耗材和设备	22
技术协助	25

第 1 章概述

简介	1
DNA 输入建议	1
更多资源	1

简介

此操作流程介绍如何使用 Illumina® TruSeq® 基因型 Ne 试剂盒制备多达 384 个带唯一标签的文库，以通过测序进行靶向基因分型。该试剂盒支持通过测序多达 5000 个靶点（包括单核苷酸多态性 (SNP) 和小插入缺失）来进行基因分型。这种靶向方法支持广泛的应用，例如亲子关系实验分析方法、纯度测定以及分子育种。

基因型 Ne 试剂盒具有以下优势：

- ▶ 能够可靠地识别出 SNP 及小插入缺失。
- ▶ 采用精简的基于 96 孔的工作流程，所需的手动操作时间不到 3 小时。
- ▶ 可实现基于微珠的纯化，支持自动化工作流程。
- ▶ 提供包含多达 5000 个标记的定制集合，支持任何植物或动物物种的靶向基因分型。
- ▶ 与 MiniSeq™、MiSeq® 和 NextSeq® 系统兼容，可实现高质量的测序结果。

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。

DNA 类型	支持的扩增子大小	输入
基因组 DNA	150 bp、175 bp	50 ng

稀释输入 DNA

对 DNA 进行定量和稀释，使其达到 50 纳克的输入量。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。

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。在有很多常见污染物的情况下，该方法也可以准确具体地对 dsDNA 进行定量。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。

更多资源

访问 Illumina 网站上的 TruSeq 基因型 Ne 试剂盒支持页，查看相应文档、软件下载、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	support.illumina.com/custom-protocol-selector.html 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。
<i>TruSeq 基因型 Ne</i> 检查表 (文档号 1000000033140)	为有经验的用户提供步骤检查表。
<i>TruSeq 基因型 Ne</i> 耗材和设备列表 (文档号 1000000033141)	提供用户自备耗材和设备的交互式检查表。

有关 TruSeq 基因型 Ne 试剂盒随附的测序试剂的信息，请参见您的仪器的系统指南。

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	9
延伸及连接结合的寡核苷酸	10
扩增文库	11
纯化文库	13
标准化文库	16
混合文库	18

简介

本部分介绍 TruSeq 基因型 Ne 操作流程。

- ▶ 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。
 - ▶ 尽管试剂盒中包含扩增子对照品寡核苷酸库 3 (ACP3)，但是由于不支持使用对照品，因此不会使用该试剂。
- ▶ 请使用指定的参数，遵照操作流程按序操作。
- ▶ 制备最多 384 个样品（每批 96 个样品）。

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 基因型 Ne 支持页。

要为需要平衡标签组合的 Illumina 测序系统制备文库，请参见《Nextera 低重混合指南》（出版编号 770-2011-044）。

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，都要更换吸头。
- ▶ 为**每行和每列**添加接头或引物之后，都要更换吸头。
- ▶ 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°C 至 110°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” 粘性封膜用于扩增步骤，可防止蒸发。

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。

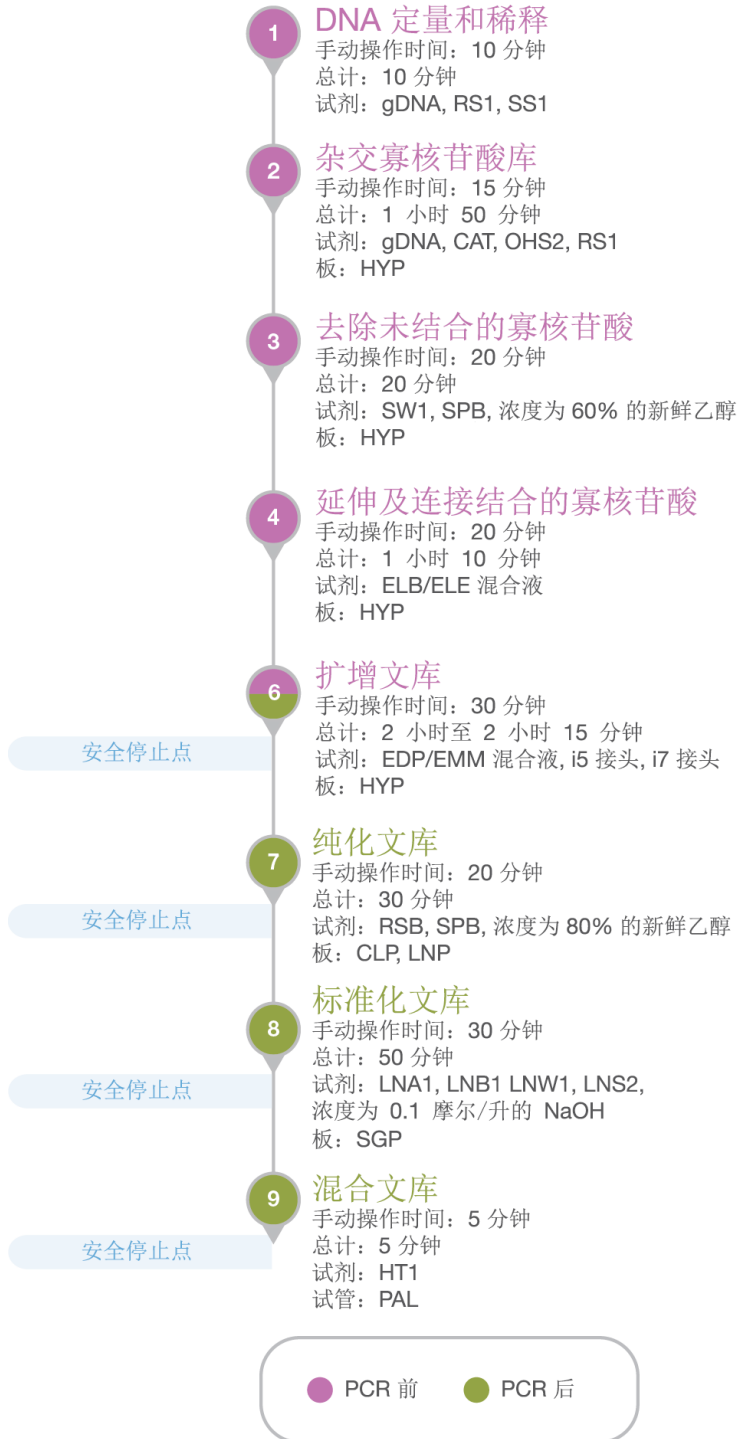
处理微珠

- ▶ 缓缓对微珠悬液移液。
- ▶ 使用前将微珠恢复到室温。
- ▶ 在使用的前一刻充分振荡微珠，使之完全散开。液体的颜色应均匀。
- ▶ 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。
 - ▶ 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

下图介绍了 TruSeq 基因型 Ne 文库制备工作流程。

图1 TruSeq 基因型 Ne 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。

耗材

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

关于试剂

- ▶ 您可以稀释并存储比当前操作流程所需用量更多的 DNA，供以后使用。稀释 RS1 和 SS1 中的 DNA，如程序中所述。
- ▶ 在微量离心管中制备等份稀释的 DNA，并将其存储在 -25°C 至 -15°C 下，最长可存储 4 周。
- ▶ 将解冻且稀释的 DNA 存储在 2°C 至 8°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°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。
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。
SS1	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。

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 25 纳克/微升。
- 3 使用相同的荧光定量方法对稀释的 DNA 重新定量。
- 4 在微量离心管中，将 RS1 中浓度为 25 纳克/微升的 DNA 进一步稀释为总量为 4 微升，总 DNA 输入量为 50 纳克的溶液。
- 5 将 1 微升 SS1 加到 4 微升 DNA 输入量为 50 纳克的溶液中。
混合后可得到 5 微升 DNA 输入量为 50 纳克的溶液。

表 1 50 纳克 DNA 输入示例

试剂	常备浓度	容量
DNA	25 ng/ μl	2 μl
RS1	--	2 μl
SS1	5 倍	1 μl

杂交寡核苷酸库

此步骤对定制寡核苷酸库（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

- ▶ ELB（延伸连接缓冲液）
- ▶ ELE（延伸连接酶）
- ▶ CAT（TruSeq 基因型 Ne 寡核苷酸）
- ▶ OHS2（寡核苷酸测序杂交试剂 2）
- ▶ RS1（重悬溶液 1）
- ▶ HYP（杂交板）条形码标签
- ▶ 稀释的 DNA
- ▶ 96 孔 PCR 板
- ▶ Microseal “B” 粘性封膜
- ▶ 微量离心管
- ▶ 不含 RNase/DNase 的 8 联管和管帽
- ▶ 为后续步骤做准备：
 - ▶ 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​​安全信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

关于试剂

- ▶ CAT
 - ▶ 您可以稀释并存储多于所需量的 CAT，供以后使用。稀释 RS1 中的 CAT，如程序中所述。
 - ▶ 使用多通道移液器从 PCR 8 联管分配稀释的 CAT，8 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°C 至 -15°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。

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	-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。
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，为去除未结合的寡核苷酸的程序做准备。请勿超过 25° C。
SW1	2° C 到 8° C	搁置以使其恢复到室温，为去除未结合的寡核苷酸的程序做准备。
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。

3 将一块新的 96 孔 PCR 板标为“HYP”。

程序

- 1 在微量离心管中的每个样品孔中，用 2.5 微升 RS1 稀释 2.5 微升 CAT。
- 2 脉冲振荡以混匀溶液，然后进行短暂的离心。
- 3 将 5 微升 RS1 加到一个孔中，用作非模板对照品。
- 4 将 5 微升稀释的 DNA 加到剩余的孔中。
- 5 将 5 微升稀释的 CAT 加到所有孔中。
- 6 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。
- 7 如果形成了气泡，请在 100 × g 下将板离心 20 秒钟。
- 8 置于预编程序的扩增仪上并运行 HYB 程序。

- 9 如果样品个数为 96 个，请按以下所示混合 ELE 和 ELB。如果样品个数多达 384 个，请予以相应扩展。
- 将 137 微升 ELE 转移到 ELB 试管的溶液中。
 - 轻弹并翻转以混匀溶液。请勿振荡。

**注意**

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°C 到 -15°C 下，最长可存储 3 个月。冷冻解冻重复次数不得超过六次。

- 10 将 ELB/ELE 混合液置于冰上，供延伸及连接结合的寡核苷酸的程序期间使用。

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。在通风罩中使用 SW1。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 中的 SDS。

关于试剂

- ▶ 移液时，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

- 将 3 毫升 SPB 转移到一个试管中，以供 PCR 前过程使用。
- 将 6 毫升 SPB 转移到一个试管中，以供 PCR 后过程使用。
- 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

- 将 25 微升 SPB 加到 HYB 板的每个孔中。缓慢吸打以混匀溶液。
- 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

- ▶ EDP（增强的 DNA 聚合酶）
- ▶ ELB/ELE 混合液
- ▶ EMM（增强的预先混合液）
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜
- ▶ 微量离心管（1 个）
- ▶ 为后续步骤做准备：
 - ▶ 标签 1 (i7) 接头 (N7XX)
 - ▶ 标签 2 (i5) 接头 (S5XX)

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。
 - ▶ 制备足量的混合液。
 - ▶ 如果需要，可将等分的混合液存储于 -25°C 到 -15°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	仅准备要使用的接头。在室温下解冻 20 分钟，为扩增文库的程序做准备。翻转每个试管将试剂混匀。然后，进行短暂的离心。

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，请以 100 × g 的转速离心 20 秒钟。
- 置于扩增仪上并运行 EXT_LIG 程序。
- 按以下所示在微量离心管中混合 EDP 和 EMM。

样品数量	EDP	EMM
1	1.1 µl	21 µl
96	106 µl	2006 µl

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。
- 将 EDP/EMM 混合液置于冰上，供扩增文库的程序期间使用。

扩增文库

此流程可扩展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。

耗材

- ▶ EDP/EMM 混合液
- ▶ 标签 1 接头 (N7XX)
- ▶ 标签 2 接头 (S5XX)
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

准备

- 在扩增仪上保存以下 PCR 程序，需执行多少次 PCR 循环应以下表为准。
 - ▶ 95° C 下 3 分钟
 - ▶ X 次以下循环：
 - ▶ 98° C 下 20 秒钟
 - ▶ 68° C 下 20 秒钟
 - ▶ 72° C 下 30 秒钟
 - ▶ 72° C 下 1 分钟
 - ▶ 保持在 10° C

扩增子复杂度	PCR 循环次数 (X) ¹
< 96 个扩增子	28
97–384 个扩增子	26
385–999 个扩增子	25
1000–1999 个扩增子	24
2000–5000 个扩增子 ²	23

¹ 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。

² 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

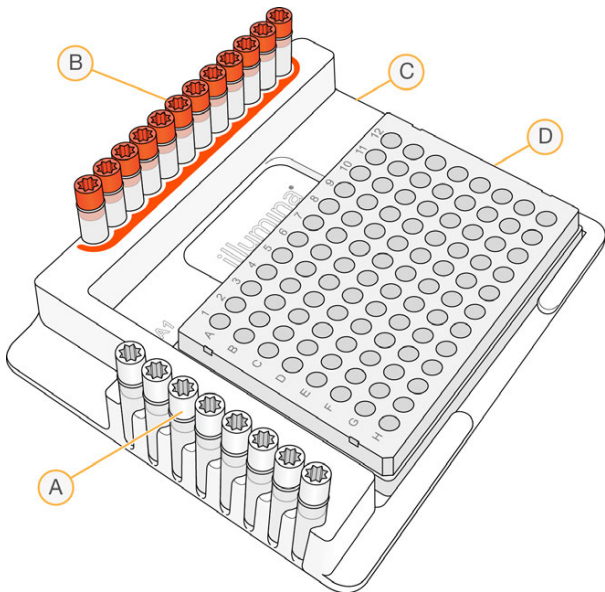
PCR 循环次数是以 50 纳克的 DNA 输入和 CAT 中的扩增子个数为依据的。

- 若要使用无冰冷藏箱，请将温度平衡到 2° C 至 8° C。

程序

- 在 TruSeq 标签板定位装置的 1–12 列布置标签 1 (i7) 接头。
- 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 以 $280 \times g$ 的转速离心 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°C 至 8°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

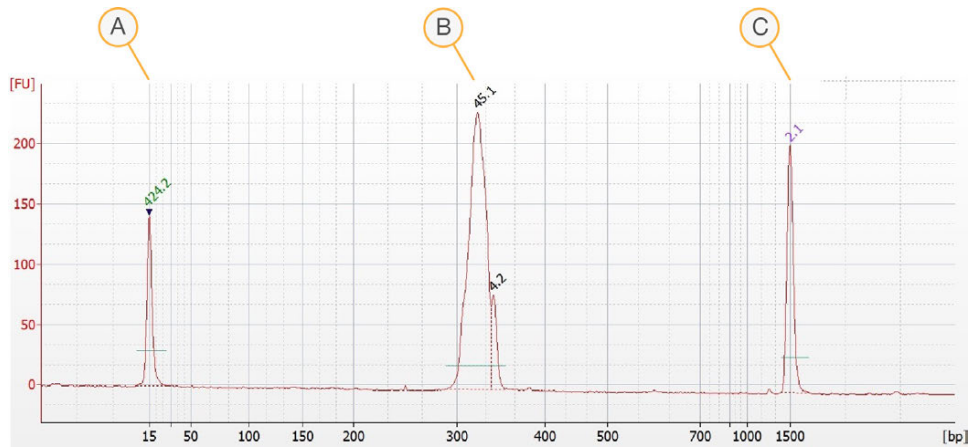
- 1 以 280 × g 的转速将 HYP 板离心 1 分钟。
- 2 将 36 微升 SPB 加到 CLP 板的每个孔中。
- 3 将 HYP 板置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 1 分钟）。
- 4 从 HYP 板的每个孔中，分别转移 45 微升清澈的上层清液到 CLP 板的相应孔中。请尽可能不要转移微珠。
- 5 将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 6 在室温下孵育 5 分钟。
- 7 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
- 8 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 9 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 10 按以下方式清洗两次。
 - 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。
- 11 使用 20 微升移液器从每个孔中取出残余的 EtOH。
- 12 从磁力架上取下，并风干长达 5 分钟。
- 13 将 25 微升 RSB 加到每个孔中。
- 14 将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 15 如果微珠未重悬，请用移液器上下吸打以混匀，然后以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 16 在室温下孵育 2 分钟。
- 17 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
- 18 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 19 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。
- 20 针对 CLP 板中的残余液体，采用以下任一方法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。
- ▶ 如果样品个数不超过 96 个，使用 D1000 ScreenTape 实验分析方法，通过 Agilent 2200 TapeStation 按 1 微升分装。
- ▶ 如果样品个数不超过 288 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。

表 2 预期的 PCR 产物大小

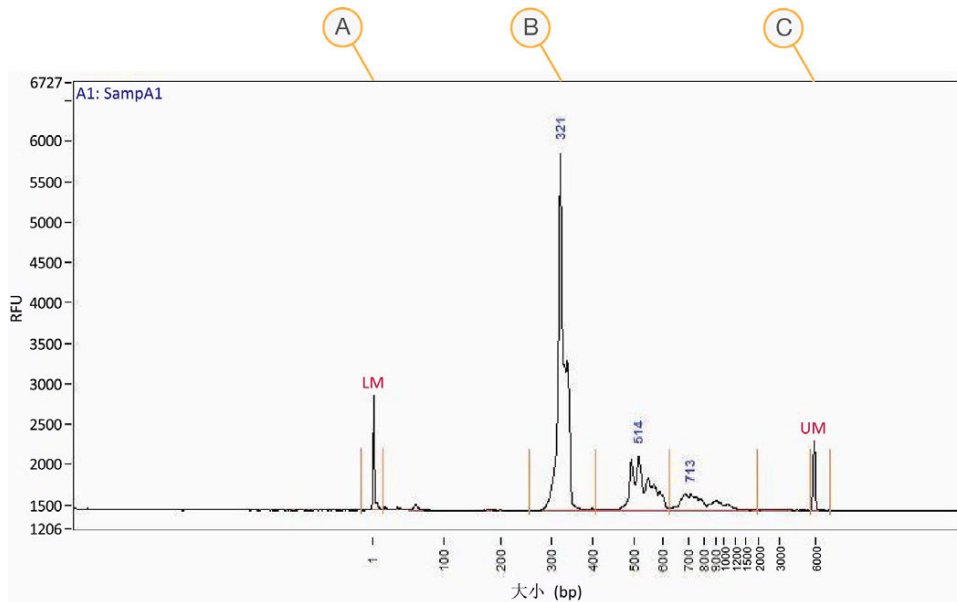
扩增子大小	PCR 产物大小
150 bp	~280 bp
175 bp	~310 bp

图 3 Bioanalyzer 轨迹示例



- A 标记较低
- B 175 碱基对扩增子的预期 PCR 产物 (约 320 碱基对)
- C 标记较高

图 4 Fragment Analyzer 示例



- A 标记较低
- B 175 碱基对扩增子的预期 PCR 产物 (约 320 碱基对)
- C 标记较高

安全停止点

若要停止操作，请将板密封并在 -25°C 至 -15°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、健康和信息安全，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。



警告

此组试剂包含 β -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。
- ▶ 使用前充分振荡 LNB1，确保其已重悬。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	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 将一块新的 MIDI 板标为“SGP”。

程序

- 将每文库 44 微升 LNA1 加到新的 15 毫升圆锥形试管中。
- 使用 P1000 移液器重悬 LNB1。
- 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。
- 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。
- 以 1800 转/分的速度振动 30 分钟。
如果振动持续时间不足 30 分钟，则文库表示和簇密度可能会受到影响。
- 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 取走并丢弃所有上层清液。
- 从磁力架中取走。
- 按以下方式清洗两次。
 - 将 45 微升 LNW1 添加到每个文库孔中。
 - 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。
 - 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
 - 取走并丢弃所有上层清液。
- 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的 LNW1。
- 从磁力架中取走。
- 将 30 微升新鲜的浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH 加到每个孔中。
- 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。
- 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 将 30 微升 LNS2 加到 SGP 板的每个孔中。
- 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。
- 将 SGP 板以 $1000 \times g$ 的转速离心 1 分钟。

安全停止点

若要停止操作，请将板密封并在 -25°C 至 -15°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。

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 8 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 以 $1000 \times g$ 的转速离心 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 将 SGP 板以 $1000 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
- 2 将 5 微升的每个文库逐列转移到 8 联管。
- 3 将板密封并存储在 -25°C 至 -15°C 下。
- 4 将 8 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°C 至 -15°C 下存储，最长可存放 7 天。

支持信息

简介	19
缩写	19
试剂盒内含物品	20
耗材和设备	22

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
ACP3	扩增子对照品寡核苷酸库 3
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
CAT	TruSeq 基因型 N ₀ 寡核苷酸
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
SGP	存储板
SNP	单核苷酸多态性
SPB	样品纯化微珠
SS1	样品稳定溶液 1
SW1	严格清洗液 1

试剂盒内含物品

请确保您已备齐本部分中指定的所有试剂盒组件后再开始执行文库制备程序。TruSeq 基因型 Ne 试剂盒以自定义配置提供，其中包含文库制备试剂、标签接头和测序试剂。

试剂盒名称	商品目录号
TruSeq 基因型 Ne (96 个样品)	20018978

文库制备试剂

用于制备 TruSeq 基因型 Ne 文库的试剂在三个 DNA 扩增子实验分析方法 v2 盒和一个寡核苷酸盒中提供。

1 号盒 – DNA 扩增子实验分析方法 v2 (16 个样品)，存储于 PCR 前区域中 –25° C 至 –15° C 的温度下

数量	试剂	描述
1	ACP3	扩增子对照品寡核苷酸库 3
1	EDP	增强的 DNA 聚合酶
1	ELB	延伸连接缓冲液
1	ELE	延伸连接酶
1	EMM	增强的预先混合液

1 号盒中还装有 HYP 条形码标签。

2 号盒 – DNA 扩增子实验分析方法 v2 (16 个样品)，存储于 PCR 前区域中

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

3 号盒 – DNA 扩增子实验分析方法 v2，存储于 PCR 后区域中

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	LNS2	文库标准化存储缓冲液 2	15° C 到 30° C
2	LNW1	文库标准化清洗液 1	2° C 到 8° C
2	RSB	重悬缓冲液	15° C 到 30° C

3 号盒中还装有 CLP、LNP、SGP、PAL 和 DAL 条形码标签。

TruSeq 基因型 Ne 寡核苷酸盒，存储于 -25° C 至 -15° C 的温度下

数量	试剂	描述
1	CAT	TruSeq 基因型 Ne 寡核苷酸

标签接头

Nextera® XT 标签试剂盒 v2 套装 A-D 中提供了 TruSeq 基因型 Ne 文库的标签接头。混合全部四个套装可获得 384 个标签组合。

Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 A（96 个标签，192 个样品），存储于 PCR 前区域中 -25° C 至 -15° C 的温度下

数量	试剂名称
8	标签接头 S502、S503、S505-S508、S510 和 S511
12	标签接头 N701-N707、N710-N712、N714 和 N715

Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 B（96 个标签，192 个样品），存储于 PCR 前区域中 -25° C 至 -15° C 的温度下

数量	试剂名称
8	标签接头 S502、S503、S505-S508、S510 和 S511
12	标签接头 N716、N718-N724 和 N726-N729

Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 C（96 个标签，192 个样品），存储于 PCR 前区域中 -25° C 至 -15° C 的温度下

数量	试剂名称
8	标签接头 S513、S515-S518 和 S520-S522
12	标签接头 N701-N707、N710-N712、N714 和 N715

Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 D（96 个标签，192 个样品），存储于 PCR 前区域中 -25° C 至 -15° C 的温度下

数量	试剂名称
8	标签接头 S513、S515-S518 和 S520-S522
12	标签接头 N716、N718-N724 和 N726-N729

标签接头更换管帽，存储于 PCR 前区域中 15° C 至 30° C 的温度下

数量	描述
1	i7 标签管帽，橙色
1	i5 标签管帽，白色

测序试剂

TruSeq 基因型 Ne 试剂盒包含在 MiniSeq、NextSeq 或 MiSeq 系统上执行测序运行所需的试剂盒和流动槽。

MiniSeq 试剂

数量	描述	存储温度
1	MiniSeq 试剂夹盒 (150 次循环)	-25° C 到 -15° C
1	MiniSeq 流动槽	2° C 到 8° C
1	杂交缓冲液 (HT1)	-25° C 到 -15° C

NextSeq 试剂

数量	描述	存储温度
1	NextSeq 500 高输出试剂夹盒 v2 (150 次循环)	-25° C 到 -15° C
1	NextSeq 500 高输出流动槽 v2	2° C 到 8° C
1	NextSeq 500/550 缓冲液夹盒 v2	15° C 到 30° C
1	NextSeq 配件箱 v2	-25° C 到 -15° C

MiSeq 试剂盒 v3

表 3 1号盒 (共2盒)

数量	描述	存储温度
1	MiSeq v3 试剂托盘 (150 次循环, PE)	-25° C 到 -15° C
1	杂交缓冲液 (HT1)	-25° C 到 -15° C

表 4 2号盒 (共2盒)

数量	描述	存储温度
1	PE MiSeq 流动槽	2° C 到 8° C
1	结合缓冲液 (PR2)	2° C 到 8° 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。

针对 PCR 前和 PCR 后程序, 请分别使用一套单独的耗材和设备。PCR 前和 PCR 后程序需要使用不同类型的磁力架。

耗材

耗材	供应商
10 摩尔/升 NaOH, 分子生物学级 ¹	一般实验室供应商
20 微升带滤芯移液器吸头	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
微量离心管	一般实验室供应商
Microseal “B” 粘性密封胶	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 8 联管和管帽	一般实验室供应商
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 ²	Illumina, 商品目录号 FC-130-1005

¹ 使用片剂制备或使用标准溶液。

² 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 扩增仪 。	一般实验室供应商

设备	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

为相应的扩增仪型号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 S1000	标准	0.1° C	已加热，在 100° C 保持恒温	---	Bio-Rad 硬壳 96 孔带裙边 PCR 反应板，薄型，带裙边
Bio-Rad C1000	标准	0.1° C	已加热，在 100° C 保持恒温	---	Bio-Rad 硬壳 96 孔带裙边 PCR 反应板，薄型，带裙边
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
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

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
电子邮箱：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	
奥地利	+43 800006249	+43 19286540
比利时	+32 80077160	+32 34002973
中国	400.635.9898	
丹麦	+45 80820183	+45 89871156
芬兰	+358 800918363	+358 974790110
法国	+33 805102193	+33 170770446
德国	+49 8001014940	+49 8938035677
香港	800960230	
爱尔兰	+353 1800936608	+353 016950506
意大利	+39 800985513	+39 236003759
日本	0800.111.5011	
荷兰	+31 8000222493	+31 207132960
新西兰	0800.451.650	
挪威	+47 800 16836	+47 21939693
新加坡	+1.800.579.2745	
西班牙	+34 911899417	+34 800300143
瑞典	+46 850619671	+46 200883979
瑞士	+41 565800000	+41 800200442
台湾	00806651752	
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
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) 获取。

产品文档 — 可通过 Illumina 网站下载 PDF 版本。请转到 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®