

# TruSeq® Nano DNA 文库制备

## 参考指南

仅供研究使用，不可用于诊断过程。

|             |    |
|-------------|----|
| 修订历史记录      | 3  |
| 简介          | 4  |
| DNA 输入建议    | 5  |
| 更多资源        | 6  |
| 操作流程简介      | 7  |
| 提示和技巧       | 8  |
| 文库制备工作流程    | 9  |
| 混合准备        | 10 |
| 片段化 DNA     | 11 |
| 修复末端并选择文库大小 | 14 |
| 腺苷酸 3' 末端   | 17 |
| 连接接头        | 18 |
| 富集 DNA 片段   | 21 |
| 验证文库        | 24 |
| 标准化并混合文库    | 25 |
| 支持信息        | 27 |
| 技术协助        | 35 |



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。

© 2015 Illumina, Inc. 保留所有权利。

**Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeqX, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, 南瓜橘色和流动底部设计**均为 Illumina, Inc. 及/或其附属公司在美国和/或其他国家/地区的商标。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

| 部件号      | 修订版 | 日期       | 更改描述   |
|----------|-----|----------|--|
| 15041110 | D   | 2015年6月  | <p>更新了试剂盒内含物品:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>试剂盒中包含ERP2或ERP3及ATL或ATL2</li> <li>删除了试剂盒以及试管部件号</li> </ul> <p>将本文档的标题更改为《参考指南》</p> <p>更新了工作流程图的设计</p> <p>对一些程序进行了重命名及合并,以提高连贯性</p> <p>将HS和LS操作流程选项合并为一个工作流程</p> <p>简化了每部分开头的耗材信息</p> <p>修改了分步说明,使其更简洁</p> <p>删除了针对旧版有经验用户操作卡的参考,并添加了针对新的操作流程指南和检查表的参考</p> <p>将BaseSpace资源参考更改为帮助中心</p> <p>将运行ERP热循环程序以转换突出量时的用量更正为100微升。</p>   |
| 15041110 | C   | 2014年12月 | <p>试剂盒名称从“样品”制备更改为“文库”制备</p> <p>添加了有关组织样品、文库、混合文库和运行的BaseSpace®参考</p> <p>去除了使用板名称(例如IMP板)的步骤,但每个程序中的第一个实例和最后一个实例除外</p> <p>更正了HS操作流程中的制备CFP程序,指明DNA板为MIDI板</p> <p>修改了纯化PCRHS操作流程,免去将样品转移到MIDI板的过程</p> <p>微珠纯化程序修改为在风干样品前取走EtOH。</p> <p>在LS操作流程中的每个扩增仪孵育操作前添加了离心步骤</p> <p>在加热孵育程序中添加了孔中的液体用量</p> <p>在耗材和设备中添加了Microseal“A”封膜</p> <p>更新了混合准备部分</p> <p>更新了更多资源</p> <p>删除了表格列表</p> <p>将SDS链接更新为<a href="http://support.illumina.com/sds.html">support.illumina.com/sds.html</a></p> |
| 15041110 | B   | 2013年11月 | <p>将“孵育1IMP”重命名为“孵育IMP”</p> <p>在耗材和设备中添加了建议的扩增仪设置</p>  |
| 15041110 | A   | 2013年5月  | 最初版本   |

## 简介

此操作流程介绍如何使用 Illumina® TruSeq® Nano DNA 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。此操作流程用于向 DNA 片段末端添加接头序列，从而生成带标签的文库，以便进行单端测序或双末端测序。

TruSeq Nano DNA 文库制备操作流程具有以下优点：

- ▶ 提供精简的工作流程
  - 采用预先混合液试剂，可减少所需的试剂容器以及移液操作
  - 采用通用接头，适用于制备单端测序、双末端和标签
- ▶ 对剪切过程进行了优化，适用于使用 350 碱基对和 550 碱基对插入大小工作流程的全基因组重测序
- ▶ 每个试剂盒都包含可根据微珠进行大小选择的试剂
- ▶ 在一个工作流程中同时提供处理低样品 (LS) 和高样品 (HS) 数量的选项
- ▶ 提供低通量 (LT) 和高通量 (HT) 试剂盒配置
- ▶ 高通量
  - 提供的接头板可同时制备 96 个双标签 DNA 样品
  - 所需剂量已针对标准 96 孔板优化
- ▶ 可用于所有样品的标签接头标记
  - 无需额外的接头和引物
  - 每个 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒内均包含建议用于制备多达 24 个供测序的样品的接头标签试管。将试剂盒 A 和 B 配合使用时，可混合多达 24 个样品
  - TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒内含 1 个 96 孔板，其中包含 96 个带唯一标签的接头组合，用于手动或自动制备 96 个带唯一标签的样品

此操作流程与单个样品测序或更低的标签混合水平兼容。

## DNA 输入建议

为获得最佳结果，请遵循输入建议。在开始文库制备之前，请先对输入 gDNA 进行定量并评估 gDNA 质量。

- ▶ 对于 350 碱基对插入大小，请使用 100 纳克输入 gDNA。
- ▶ 对于 550 碱基对插入大小，请使用 200 纳克输入 gDNA。
- ▶ 低于所指定的输入量会导致产量偏低，重复项增多。

## 定量输入 DNA

请遵循以下建议定量输入 DNA：

- ▶ 文库制备能否成功取决于输入 DNA 的定量是否准确。请使用多种方法来验证结果。
- ▶ 使用荧光法（例如 Qubit 或 PicoGreen）进行定量。
- ▶ 依赖于嵌入性荧光染料的 DNA 定量法只会测量双链 DNA，并且不容易受到多余核酸的影响。
- ▶ 请勿使用分光光度法（例如 NanoDrop），因为此类方法会测量核苷酸是否存在，可能导致 gDNA 测量不准确。
- ▶ 定量方法取决于移液方法是否准确。进行移液操作时，请勿超出容量规格限制。请确保移液器经过校准。

## 评估 DNA 质量

通常使用 260 纳米处的吸收测量值来评估 DNA 质量。

- ▶ 260 纳米处吸收量与 280 纳米处吸收量的比率用来表示样品纯度。值介于 1.8 到 2.0 之间表示 DNA 的纯度较高。
- ▶ 如果存在 RNA 或较小的核酸片段（例如核苷酸），则会对这两种吸收测量值造成影响。
- ▶ 请确保样品未受到污染。

## 阳性对照品

Illumina 建议使用 Coriell Human-1 DNA (NA 18507) 或 Promega 人类基因组 DNA (G3041) 作为此操作流程的阳性对照样品。

## 更多资源

以下文档可从 Illumina 网站下载。

| 资源   | 描述   |
|--|--|
| 《TruSeq Nano DNA 文库制备操作流程指南》(部件号 15075697)   | 仅提供操作流程说明。操作流程指南的目标受众为熟练用户。                                      |
| TruSeq Nano DNA 文库制备检查表(部件号 15075698)  | 提供操作流程步骤的检查表。该检查表的目标受众为熟练用户。                                     |
| 使用 TruSeq HT 文库制备进行双标签测序(部件号 15059916)   | 提供使用 TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒时为双标签测序制备试剂的准则。                   |
| 《TruSeq 文库制备混合指南》(部件号 15042173)  | 提供有关为需要平衡标签组合的 Illumina 测序系统制备文库的 TruSeq 混合准则。开始制备文库之前, 请先查看本指南。 |
| 《Illumina Experiment Manager 指南》(部件号 15031335) 和 IEM TruSeq DNA、RNA 或 ChIP 快速参考卡(部件号 15037152) | 提供有关创建和编辑 Illumina 测序系统和分析软件的适用样品表以及记录样品板参数的信息。                  |
| BaseSpace 帮助 (help.basespace.illumina.com)   | 提供有关还可让您在单一环境中组织样品、文库、混合文库和测序运行的 BaseSpace® 测序数据分析工具的信息。         |

请访问 Illumina 网站上的 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒支持页面或 TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒支持页面, 查看要求和兼容性、其他文档、软件下载、在线培训、常见问题和最佳实践。

## 操作流程简介

本部分介绍 TruSeq Nano DNA 文库制备操作流程。

- ▶ 使用指定的量和孵育参数，根据所述的顺序遵循操作流程。
- ▶ 此操作流程提供的单个工作流程包含使用不同类型的板作为容器的选项。
  - 针对每个选项，使用 [HS] 或 [LS] 进行区分。
  - 请根据您正在使用的容器类型，遵循相应的说明操作。
  - 每个选项可以得出等同的结果。不过，[HS] 选项能够针对不同样品产生更为一致的结果。
  - 操作流程选项之间的区别要素如下所示。

表 1 工作流程选项

| 工作流程标示符            | HS                      | LS                           |
|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| LT 试剂盒 – 可同时处理的样品数 | > 24 (使用标签接头试管*)        | ≤ 24 (使用标签接头试管*)             |
| HT 试剂盒 – 可同时处理的样品数 | > 24 (使用标签接头板)          | ≤ 24 (使用标签接头板)               |
| 板类型                | 96 孔硬壳 PCR<br>96 孔 MIDI | 96 孔 0.3 毫升 PCR<br>96 孔 MIDI |
| 孵育设备               | 微热系统                    | 96 孔扩增仪                      |
| 混合方法               | 微孔板混合器                  | 移液                           |

\* 每个 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒都包含足以制备多达 24 个样品的试剂。将 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒 A 和 B 配合使用时，可以用每个试剂盒中的 12 个不同标签总共混合多达 24 个样品。

- ▶ 请先查看最佳实践，然后再继续。请参见[更多资源](#)（第 6 页）的资源，了解如何在 Illumina 网站上访问“TruSeq Nano DNA 文库制备最佳实践”。
- ▶ 请先确认试剂盒内含物品，并确保您已备齐所需的设备和耗材，然后再继续操作。有关详细信息，请参见[支持信息](#)（第 27 页）。

## 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

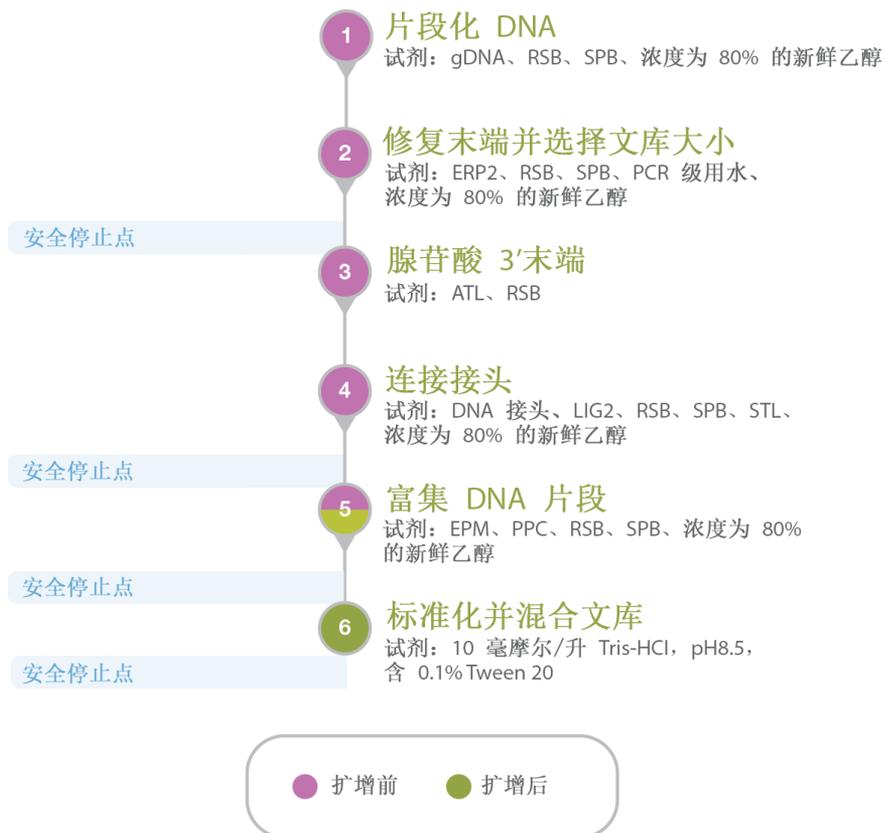
- ▶ 在执行操作流程中的下列步骤之前，请始终密封 96 孔板：
  - 摇动步骤
  - 离心步骤
  - 扩增步骤
- ▶ 使用粘性密封膜盖住板，并使用橡胶辊进行密封。
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜可在  $-40^{\circ}\text{C}$  至  $110^{\circ}\text{C}$  下发挥作用，适用于带裙边或半裙边的 PCR 板。
- ▶ Microseal “A” 粘性封膜适用于扩增，并且当所使用的孔少于 96 个时，易于切割。

### 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。

## 文库制备工作流程

图 1 TruSeq Nano DNA 文库制备工作流程



## 混合准备

如果要进行混合操作，请在开始文库制备之前，使用 IEM 或 BaseSpace 记录有关样品的信息。

- ▶ 使用 IEM 来创建和编辑 Illumina 测序系统和分析软件的样品表。
- ▶ 使用 BaseSpace 的“Prep（准备）”选项卡来组织用于 Illumina 测序系统和分析软件的样品、文库、混合文库和运行。

为需要平衡标签组合的 Illumina 测序系统制备文库时，请参阅《TruSeq 文库制备混合指南》（部件号 15042173）中的规划步骤。

## 片段化 DNA

此过程介绍如何以最佳方式将 gDNA 片段化为 350 碱基对或 550 碱基对的插入大小。Covaris 剪切生成含有 3' 或 5' 突出的 dsDNA 片段。

### 耗材

- ▶ gDNA 样品
  - 对于 350 碱基对插入大小，每个样品 100 纳克
  - 对于 550 碱基对插入大小，每个样品 200 纳克
- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ SPB（样品纯化微珠）
- ▶ 条形码标签
  - CFP（Covaris 片段化板）
  - CSP（纯化已剪切 DNA 板）
  - DNA（DNA 板）
  - IMP（插入修改板）
- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇（EtOH）
- ▶ 从以下容器中选择：
  - [HS] 96 孔 MIDI 板 (3) 和 96 孔硬壳 0.3 毫升 PCR 板 (1)
  - [LS] 96 孔 0.3 毫升 PCR 板，半裙边或无裙边 (4)
- ▶ Covaris 试管（每个样品各 1 个）
- ▶ 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  |
|-----|--------------------|---|
| RSB | -25° C 到<br>-15° C | 在室温下解冻。<br>首次解冻后，请存储在 2° C 到 8° C 温度下。    |
| SPB | 2° C 到 8° C        | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。<br>存放在室温下，以便稍后在操作流程中使用。 |

- 2 遵照制造商的指导准则打开并设置 Covaris 仪器。
- 3 [HS] 使用频闪仪校准微孔板混合器，并将其设置为 1800 转/分。
- 4 按如下方式贴上条形码以标记反应板。
  - DNA [MIDI 或 PCR 板]
  - CFP [硬壳 PCR 或 PCR 板]
  - CSP [MIDI 或 PCR 板]
  - IMP [MIDI 或 PCR 板]

## 程序

### 标准化 gDNA

- 1 使用荧光法定量 gDNA。
- 2 在 DNA 板中用 RSB 标准化 gDNA 样品，使其最终剂量为 52.5 微升。
  - 100 纳克用于 350 碱基对插入大小
  - 200 纳克用于 550 碱基对插入大小
- 3 按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 4 按如下方式进行离心。
  - [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
  - [LS] 进行短暂的离心。

### 片段化 DNA

- 1 将 52.5 微升 DNA 样品转移到单独的 Covaris 试管中。  
将 Covaris 试管竖放在 CFP 板上的孔中。
- 2 以  $280 \times g$  的转速离心 5 秒钟。
- 3 使用以下 Covaris 设置对 DNA 进行片段化。

表 2 350 碱基对插入设置

| Covaris 设置   | M220 | S220 | S2    | E210 |
|--------------|------|------|-------|------|
| 占空比 (%)      | 20   | 5    |       | 10   |
| 强度           | —    | —    |       | 5.0  |
| 峰值/显示的功率 (瓦) | 50   | 175  | 23    | 14   |
| 每次片段化的循环数    | 200  |      |       |      |
| 持续时间 (秒)     | 65   | 50   |       | 45   |
| 模式           | —    |      | 频率扫描  |      |
| 温度 (° C)     | 20   |      | 5.5-6 |      |

表 3 550 碱基对插入设置

| Covaris 设置   | M220 | S220 | S2    | E210 |
|--------------|------|------|-------|------|
| 占空比 (%)      | 20   | 5    |       | 10   |
| 强度           | —    | —    |       | 2.0  |
| 峰值/显示的功率 (瓦) | 50   | 175  | 9     | 7    |
| 每次片段化的循环数    | 200  |      |       |      |
| 持续时间 (秒)     | 45   | 25   |       | 45   |
| 模式           | —    |      | 频率扫描  |      |
| 温度 (° C)     | 20   |      | 5.5-6 |      |

- 4 以  $280 \times g$  的转速离心 5 秒钟。
- 5 从每个 Covaris 试管中转移 50 微升上层清液到 CSP 板的相应孔中。

## 纯化片段化的 DNA

- 1 振荡 SPB 直到完全散开。
- 2 将 80 微升 SPB 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 3 在室温下孵育 5 分钟。
- 4 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 5 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 8 分钟）。
- 6 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 7 按如下方式清洗两次。
  - 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。
- 8 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的乙醇。
- 9 在磁力架上风干 5 分钟。
- 10 将 62.5 微升 RSB 加到每个孔中。
- 11 从磁力架上取下，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 12 在室温下孵育 2 分钟。
- 13 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 14 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（2-5 分钟）。
- 15 将 60 微升上层清液转移到 IMP 板的相应孔中。

## 修复末端并选择文库大小

此过程可使用末端修复混合液 2 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' 核酸外切酶活性会去除 3' 突出量，而 5' 到 3' 聚合酶活性会填充 5' 的突出量。修复末端后，将使用不同比例的 SPB（样品纯化微珠）选择相应的文库大小。

### 耗材

- ▶ ERP2 或 ERP3（末端修复混合液）
- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ SPB（样品纯化微珠）
- ▶ 条形码标签
  - ALP（接头连接板）
  - CEP（纯化末端修复板）
- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ PCR 级用水
- ▶ 试管
  - 如果样品数小于或等于 6，使用 1.7 毫升微量离心管
  - 如果样品数大于 6，使用 15 毫升圆锥形试管
- ▶ 从以下容器中选择：
  - [HS] 96 孔 MIDI 板 (2)
  - [LS] 96 孔 0.3 毫升 PCR 板，半裙边或无裙边 (2)
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 试剂盒内含有 ERP2 或 ERP3。
- ▶ 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                         |
|-------------|-----------------|----------------------------|
| ERP2 或 ERP3 | -25° C 到 -15° C | 在室温下解冻，然后置于冰上。<br>使用后送回存储。 |
| RSB         | 2° C 到 8° C     | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。          |
| SPB         | 2° C 到 8° C     | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。          |

- 2 [HS] 将微热系统预热到 30° C。
- 3 [LS] 在扩增仪上保存下列 ERP 程序：
  - 选择预热盖选项，并将其设置为 100° C
  - 30° C 下 30 分钟
  - 保持在 4° C
- 4 按如下方式贴上条形码以标记反应板。
  - ALP [MIDI 或 PCR 板]
  - CEP [MIDI 或 PCR 板]

## 程序

### 转换突出量

- 1 将 ERP2 或 ERP3 以  $600 \times g$  的转速离心 5 秒钟。
- 2 将 40 微升 ERP2 或 ERP3 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 3 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 4 按如下方式孵育。
  - [HS] 置于  $30^{\circ} \text{C}$  的微热系统上（热盖关闭）30 分钟，然后再置于冰上。
  - [LS] 置于扩增仪上并运行 ERP 程序。每个孔含有 100 微升溶液。

### 去除较大的 DNA 片段

- 1 振荡 SPB 直到完全散开。
- 2 使用 PCR 级用水将 SPB 稀释为比例为 160:100 微升的末端已修复样品。
  - 如果处理的样品数小于或等于 6，请使用一个新的 1.7 毫升微量离心管。
  - 如果处理的样品数大于 6，请使用一个新的 15 毫升圆锥形试管。
 使用以下公式确定用量，其中包括用于多个样品的 15% 多余量。

表 4 针对 350 碱基对插入大小稀释的 SPB

|         | 公式                              | 每 12 个样品的示例用量      | 您的计算 |
|---------|---------------------------------|--------------------|------|
| SPB     | 样品数 $\times 109.25 \mu\text{l}$ | 1311 $\mu\text{l}$ |      |
| PCR 级用水 | 样品数 $\times 74.75 \mu\text{l}$  | 897 $\mu\text{l}$  |      |

表 5 针对 550 碱基对插入大小稀释的 SPB

|         | 公式                          | 每 12 个样品的示例用量      | 您的计算 |
|---------|-----------------------------|--------------------|------|
| SPB     | 样品数 $\times 92 \mu\text{l}$ | 1104 $\mu\text{l}$ |      |
| PCR 级用水 | 样品数 $\times 92 \mu\text{l}$ | 1104 $\mu\text{l}$ |      |

- 3 振荡稀释的 SPB 直到完全散开。
- 4 将 160 微升稀释的 SPB 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 5 在室温下孵育 5 分钟。
- 6 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 7 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 5 分钟）。
- 8 将 250 微升上层清液转移到 CEP 板的相应孔中。
- 9 倒掉剩余的稀释 SPB。

## 去除较小的 DNA 片段

- 1 振荡未稀释的 SPB 直到完全散开。
- 2 将 30 微升未稀释的 SPB 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 3 在室温下孵育 5 分钟。
- 4 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 5 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 5 分钟）。
- 6 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 7 按如下方式清洗两次。
  - 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。
- 8 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的乙醇。
- 9 在磁力架上风干 5 分钟。
- 10 将 20 微升 RSB 加到每个孔中。
- 11 从磁力架上取下，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 12 在室温下孵育 2 分钟。
- 13 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 14 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 5 分钟）。
- 15 将 17.5 微升上层清液转移到 ALP 板的相应孔中。

## 安全停止点

如要停止操作，请将板密封并存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  的温度下，最长可存放 7 天。

## 腺苷酸 3' 末端

向平末端片段的 3' 末端添加单个“A”核苷酸可防止平末端片段在接头连接反应期间相互连接。接头 3' 末端上对应的单个“T”核苷酸补充了供接头连接到片段的突出量。此策略可确保形成较低比例的嵌合体（连接的模板）。

### 耗材

- ▶ ATL 或 ATL2 (A-Tailing 混合液)
- ▶ RSB (重悬缓冲液)
- ▶ [HS] Microseal “B” 粘性密封膜

## 准备

- 1 准备下列耗材。

| 物品         | 存储              | 说明                  |
|------------|-----------------|---------------------|
| ATL 或 ATL2 | -25° C 到 -15° C | 在室温下解冻。<br>使用后送回存储。 |
| RSB        | 2° C 到 8° C     | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。   |

- 2 [HS] 预热 2 个微热系统，一个预热到 37° C，另一个预热到 70° C。
- 3 [LS] 在扩增仪上保存下列 ATAIL70 程序：
  - 选择预热盖选项，并将其设置为 100° C
  - 37° C 下 30 分钟
  - 70° C 下 5 分钟
  - 4° C 下 5 分钟
  - 保持在 4° C

## 程序

- 1 以 600 × g 的转速将 ATL 或 ATL2 离心 5 秒钟。
- 2 将 12.5 微升 ATL 或 ATL2 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 3 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
- 4 按如下方式孵育。
  - [HS]
    - a 置于 37° C 的微热系统上（热盖关闭）30 分钟。
    - b 移到 70° C 的微热系统上（热盖关闭），放置 5 分钟。
    - c 置于冰上 5 分钟。
  - [LS]
    - a 置于扩增仪上并运行 ATAIL70 程序。每个孔含有 30 微升溶液。
    - b 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。

## 连接接头

此过程可以将多个标签接头连接到 DNA 片段末端，做好让其在流动槽中杂交的准备。

### 耗材

- ▶ DNA 接头（试管或 DAP）
- ▶ LIG2（连接混合液 2）
- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ SPB（样品纯化微珠）
- ▶ STL（停止连接缓冲液）
- ▶ 条形码标签
  - CAP（纯化 ALP 板）
  - DAP（DNA 接头板）
  - PCR（聚合酶链反应板）
- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇（EtOH）
- ▶ 从以下容器中选择：
  - [HS] 96 孔 MIDI 板（1）和 96 孔硬壳 0.3 毫升 PCR 板（1）
  - [LS] 96 孔 0.3 毫升 PCR 板，半裙边或无裙边（2）
- ▶ [HS] Microseal “B” 粘性密封膜

### 关于试剂

- ▶ 在操作过程中，未经指示请勿将 LIG2 从存储环境中取出。
- ▶ 使用后需立即将 LIG2 送回存储。
- ▶ 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   |
|--------|-----------------|--|
| DNA 接头 | -25° C 到 -15° C | 在室温下解冻 10 分钟。<br>使用后送回存储。<br>DAP 最多可以经受 4 个冷冻解冻循环。 |
| RSB    | 2° C 到 8° C     | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。                                  |
| STL    | -25° C 到 -15° C | 在室温下解冻。<br>使用后送回存储。                                |
| SPB    | 2° C 到 8° C     | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。                                  |

- 2 [HS] 将微热系统预热到 30° C。
- 3 [LS] 在扩增仪上保存下列 LIG 程序：
  - 选择预热盖选项，并将其设置为 100° C
  - 30° C 下 10 分钟
  - 保持在 4° C
- 4 按如下方式贴上条形码以标记反应板。
  - CAP [MIDI 或 PCR]
  - PCR [硬壳 PCR 或 PCR]

## 程序

## 添加标签接头

- 1 [HT 试剂盒] 除去 DAP 上的密封带。
- 2 按如下方式对 DNA 接头进行离心操作。

| 试剂   | 速度      | 持续时间 |
|------|---------|------|
| 接头试管 | 600 × g | 5 秒钟 |
| DAP  | 280 × g | 1 分钟 |

- 3 [HT 试剂盒] 按如下方式准备 DAP。
  - a 取下塑料盖。如果不是要同时处理整块板，请保留此盖。
  - b 贴上 DAP 条形码。
- 4 取出在 -25° C 至 -15° C 温度下存储的 LIG2。
- 5 将下列试剂按所示顺序加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。

| 试剂     | 剂量 (微升) |
|--------|---------|
| RSB    | 2.5     |
| LIG2   | 2.5     |
| DNA 接头 | 2.5     |

- [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 6 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
  - 7 按如下方式孵育。
    - [HS] 置于 30° C 的微热系统上 (热盖关闭) 10 分钟，然后再置于冰上。
    - [LS] 置于扩增仪上并运行 LIG 程序。每个孔含有 37.5 微升溶液。
  - 8 将 STL 以 600 × g 的转速离心 5 秒钟。
  - 9 将 5 微升 STL 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
    - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
    - [LS] 用移液器上下吸打。
  - 10 [HS] 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。

## 纯化连接的片段

- 1 振荡 SPB 直到完全散开。
- 2 使用第 1 轮的用量执行步骤 2a 到 2m。
  - a 将 SPB 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。

|     | 第 1 轮   | 第 2 轮 |
|-----|---------|-------|
| SPB | 42.5 μl | 50 μl |

- [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- b 在室温下孵育 5 分钟。
  - c [HS] 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
  - d 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止 (2-5 分钟)。
  - e 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。

- f 按以下方式清洗两次。
  - 将 200 微升新制备的浓度为 80% 的乙醇加到每个孔中。
  - 在磁力架上孵育 30 秒钟。
  - 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- g 使用 20 微升移液器从每个孔中取走残余的乙醇。
- h 在磁力架上风干 5 分钟。
- i 将 RSB 加到每个孔中。

|     | 第 1 轮        | 第 2 轮        |
|-----|--------------|--------------|
| RSB | 52.5 $\mu$ l | 27.5 $\mu$ l |

- j 从磁力架上取下，然后按如下方式彻底混匀。
    - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
    - [LS] 用移液器上下吸打。
  - k 在室温下孵育 2 分钟。
  - l [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
  - m 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（2-5 分钟）。
- 3 将 50 微升上层清液转移到 CAP 板的相应孔中。
  - 4 使用**第 2 轮**的用量在新板上重复步骤 2a 到 2m。
  - 5 将 25 微升上层清液转移到 PCR 板的相应孔中。

### 安全停止点

如要停止操作，请将板密封并存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  的温度下，最长可存放 7 天。

## 富集 DNA 片段

此过程使用 PCR 来选择性地富集这些两端都有接头分子的 DNA 片段，并扩增文库中 DNA 的量。通过固定在接头两端的 PCR 引物混合液来执行 PCR。最大限度地降低 PCR 循环次数，以免文库表达失真。



### 注意

PCR 针对两端都连接到接头的片段执行富集。两端总共只有 1 个接头或都没有接头的片段是连接反应中无效的副产物。这两种片段都不能用于生成簇。不含接头的片段无法杂交到流动槽中的表面结合引物。只有一端上有接头的片段可以杂交到表面结合引物，但无法形成簇。

## 耗材

- ▶ EPM (增强型 PCR 混合液)
- ▶ PPC (PCR 引物混合液)
- ▶ RSB (重悬缓冲液)
- ▶ SPB (样品纯化微珠)
- ▶ TSP1 (靶标样品板) 条形码标签
- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ 从以下容器中选择：
  - [HS] 96 孔硬壳 0.3 毫升 PCR 板 (1)
  - [LS] 96 孔 0.3 毫升 PCR 板，半裙边或无裙边 (1)
- ▶ [HS] Microseal “A” 封膜
- ▶ 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。

| 试剂  | 存储                 | 说明   |
|-----|--------------------|--|
| PPC | -25° C 到<br>-15° C | 在室温下解冻。<br>翻转将其混匀，然后以 600 × g 的转速离心 1 分钟。请勿振荡。<br>使用后送回存储。 |
| EPM | -25° C 到<br>-15° C | 在冰上解冻。<br>翻转将其混匀，然后以 600 × g 的转速离心 1 分钟。请勿振荡。<br>使用后送回存储。  |
| SPB | 2° C 到 8° C        | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。  |
| RSB | 2° C 到 8° C        | 搁置 30 分钟，使其恢复到室温。  |

- 2 在扩增仪上保存以下 PCRNano 程序：
  - 选择预热盖选项，并将其设置为 100° C
    - 95° C 下 3 分钟
  - 8 次以下循环：
    - 98° C 下 20 秒钟
    - 60° C 下 15 秒钟
    - 72° C 下 30 秒钟
  - 72° C 下 5 分钟
  - 保持在 4° C
- 3 贴上 TSP1 条形码以标记硬壳 PCR 或 PCR 板。

## 程序

### 扩增 DNA 片段

- 1 放在冰上，并将 5 微升 PPC 加到每个孔中。
- 2 将 20 微升 EPM 加到每个孔中，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1600 转/分的速度振动 20 秒钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 3 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
- 4 置于扩增仪上并运行 PCRNano 程序。每个孔含有 50 微升溶液。

### 纯化扩增后 DNA

- 1 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
- 2 振荡 SPB 直到完全散开。
- 3 将 SPB 加到每个孔中。用量取决于所用的接头类型。

| 接头类型 | SPB 量   |
|------|---------|
| 接头试管 | 50 µl   |
| DAP  | 47.5 µl |

- 4 按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 5 在室温下孵育 5 分钟。
- 6 [HS] 以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
- 7 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（2-5 分钟）。
- 8 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 9 按如下方式清洗两次。
  - 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走残余的乙醇。
- 11 在磁力架上风干 5 分钟。

- 12 将 32.5 微升 RSB 加到每个孔中。
- 13 从磁力架上取下，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 14 在室温下孵育 2 分钟。
- 15 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 16 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（2-5 分钟）。
- 17 将 30 微升上层清液转移到 TSP1 板的相应孔中。

### 安全停止点

如要停止操作，请将板密封并存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  的温度下，最长可存放 7 天。

## 验证文库

执行下列程序可对文库定量，并检查文库质量。

## 定量文库

为了在 Illumina 测序平台上获得最高质量的数据，请务必在流动槽的每条道中创建最佳的簇密度。优化簇密度需要准确定量 DNA 文库。通过使用 dsDNA 结合染色剂或 qPCR 的荧光定量法来定量文库。

TruSeq Nano DNA 文库制备文库定量已通过使用**耗材和设备**（第 30 页）中指定的 KAPA 文库定量试剂盒进行验证。请遵循 KAPA 说明和 KAPA 标准。要以纳摩尔/升为单位计算文库浓度，请执行以下插入大小调整：

- 对于 350 碱基对文库，请使用 470 碱基对作为平均片段长度
- 对于 550 碱基对文库，请使用 670 碱基对作为平均片段长度

您可以从 Kapa Biosystems 网站 ([www.kapabiosystems.com](http://www.kapabiosystems.com)) 下载适用于 Illumina 测序平台的 KAPA 文库定量试剂盒技术数据表。

## 检查文库质量

通过检查文库大小分布确认片段大小。仅为了定性目的，在 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 上运行样品。

- 1 执行下列操作：
  - 如果使用的是高灵敏度 DNA 芯片：
    - 以 1:100 的比例用水稀释 DNA 文库。
    - 运行 1 微升稀释的 DNA 文库。
  - 如果使用的是 DNA 7500 芯片，请运行 1 微升未稀释 DNA 文库。

图 2 示例 350 碱基对插入文库稀释

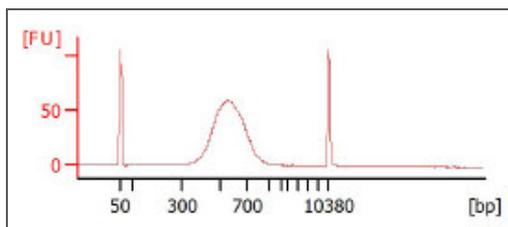
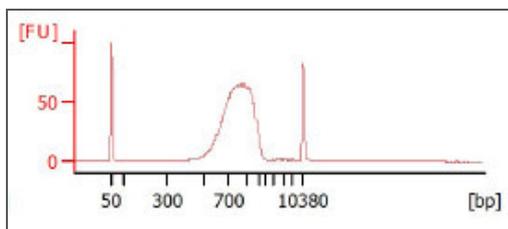


图 3 示例 550 碱基对插入文库稀释



## 标准化并混合文库

此过程介绍如何制备适用于簇生成的 DNA 模板。带标签的 DNA 文库在 DCT 板中标准化为 10 纳摩尔/升，然后在 PDP 板中等量混合。不带标签的 DNA 文库在 DCT 板中标准化为 10 纳摩尔/升。

### 耗材

- ▶ 1.7 毫升微量离心管 (1) (当处理的样品 > 48 个时)
- ▶ 从以下容器中选择：
  - [HS]
    - 96 孔 MIDI 板 (2) (第二块板用于混合)
  - [LS]
    - 96 孔 MIDI 板 (2) (第二块板用于混合 > 40 个的样品)
    - 96 孔 0.3 毫升 PCR 板，半裙边或无裙边 (1) (用于混合 ≤ 40 个的样品)
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜
- ▶ 10 毫摩尔/升 Tris-HCl, pH8.5, 含 0.1% Tween 20
- ▶ 条形码标签
  - DCT (稀释簇模板)
  - PDP (混合 DCT 板) (仅限混合)

### 准备

- 1 按如下方式贴上条形码以标记反应板。
  - DCT [MIDI 板]
  - [仅限混合] PDP [MIDI (> 40 个样品) 或 PCR (≤ 40 个样品) 板]

### 程序

#### 制作 DCT

- 1 将 10 微升文库转移到 DCT 板的相应孔中。
- 2 使用 10 毫摩尔/升 Tris-HCl (pH 8.5, 含 0.1% Tween 20) 将文库浓度标准化为 10 纳摩尔/升，然后按如下方式彻底混匀。
  - [HS] 以 1000 转/分的速度振动 2 分钟。
  - [LS] 用移液器上下吸打。



#### 注意

根据每个文库的产量定量数据的不同，每个孔的最终容量可能会在 10-400 微升之间浮动。

- 3 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 4 执行下列操作：
  - 要混合文库，请继续进行工作流程中的下一步骤。
  - 如果不混合文库，请继续进行簇生成。有关详细信息，请参见您所用 Illumina 平台的相应系统指南。

#### 制作 PDP

- 1 如果要混合 2-24 个样品，请将每种标准化文库各转移 10 微升到 PDP 板的一个孔中。
- 2 如果要混合 25-48 个样品，请执行以下操作。

- a 将每列标准化文库各转移 5 微升到 PDP 板的第 1 列中，然后按如下方式彻底混匀。
    - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
    - [LS] 用移液器上下吸打。
  - b [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
  - c 将第 1 列的每个孔中的溶液转移到孔 A2 中。
- 3 如果要混合 49-96 个样品，请执行以下操作。
- a 将每列标准化文库各转移 5 微升到 PDP 板的第 1 列中，然后按如下方式彻底混匀。
    - [HS] 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
    - [LS] 用移液器上下吸打。
  - b [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
  - c 将第 1 列每个孔中的溶液转移到一个 1.7 毫升微量离心管中。
- 4 按如下方式彻底混匀。
- [HS] 将板以 1800 转/分的速度振动 2 分钟或振荡试管。
  - [LS] 用移液器上下吸打。
- 5 [HS] 以  $280 \times g$  的转速离心 1 分钟。
- 6 继续进行簇生成。有关详细信息，请参见您所用 Illumina 测序平台的相应系统指南。

### 安全停止点

如要停止操作，请将板密封或盖上试管盖，然后存储在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  的温度下，最长可存放 7 天。

## 支持信息

本指南中提供的操作流程假定您熟悉本节内容，并且已备齐所需的设备和耗材。

## 缩写

| 缩写   | 定义                          |
|------|-----------------------------|
| ALP  | 接头连接板                       |
| ATL  | A-Tailing 混合液               |
| CAP  | 纯化 ALP 板                    |
| CEP  | 纯化末端修复板                     |
| CFP  | Covaris 片段化板                |
| CSP  | 纯化已剪切 DNA 板                 |
| DAP  | DNA 接头板                     |
| DCT  | 稀释簇模板板                      |
| DNA  | 客户样品 DNA 板                  |
| EPM  | 增强型 PCR 混合液                 |
| ERP  | 末端修复混合液                     |
| HS   | 高样品                         |
| HT   | 高通量                         |
| IEM  | Illumina Experiment Manager |
| IMP  | 插入修改板                       |
| LIG  | 连接混合液                       |
| LS   | 低样品                         |
| LT   | 低通量                         |
| PDP  | 混合稀释板                       |
| PPC  | PCR 引物混合液                   |
| RSB  | 重悬缓冲液                       |
| SPB  | 样品纯化微珠                      |
| STL  | 停止连接缓冲液                     |
| TSP1 | 靶标样品板 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后再开始执行操作流程。

TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒包装在套装 A 和套装 B 中。每个 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒包含最多可制备 24 个样品的足量试剂。将套装 A 和套装 B 配合使用时，可以用每个试剂盒中的 12 个不同标签总共混合多达 24 个样品。

表 6 TruSeq Nano DNA 文库制备试剂盒

| 试剂盒名称                             | 商品目录号        | 支持的样品数量 | 标签数量 |
|-----------------------------------|--------------|---------|------|
| TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒 - 套装 A | FC -121 4001 | 24      | 12   |
| TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒 - 套装 B | FC-121-4002  | 24      | 12   |
| TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒        | FC-121-4003  | 96      | 96   |

## TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒

TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒包含 2 个盒子：套装 A 或套装 B 盒子，以及 SP 微珠盒。

24 个样品 – 套装 A 或套装 B 盒，在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  温度下存储

您随试剂盒收到的是盒 A 还是盒 B 取决于您订购的套装。这些盒中还装有板条形码标签。



注意  
试剂盒中包含 ERP2 或 ERP3 及 ATL 或 ATL2。

## 套装 A

| 数量 | 试剂          | 描述            |
|----|-------------|---------------|
| 1  | RSB         | 重悬缓冲液         |
| 1  | ERP2 或 ERP3 | 末端修复混合液       |
| 1  | ATL 或 ATL2  | A-Tailing 混合液 |
| 1  | LIG2        | 连接混合液 2       |
| 1  | STL         | 停止连接缓冲液       |
| 1  | PPC         | PCR 引物混合液     |
| 1  | EPM         | 增强型 PCR 混合液   |
| 1  | AD002       | DNA 接头标签 2    |
| 1  | AD004       | DNA 接头标签 4    |
| 1  | AD005       | DNA 接头标签 5    |
| 1  | AD006       | DNA 接头标签 6    |
| 1  | AD007       | DNA 接头标签 7    |
| 1  | AD012       | DNA 接头标签 12   |
| 1  | AD013       | DNA 接头标签 13   |
| 1  | AD014       | DNA 接头标签 14   |
| 1  | AD015       | DNA 接头标签 15   |
| 1  | AD016       | DNA 接头标签 16   |
| 1  | AD018       | DNA 接头标签 18   |
| 1  | AD019       | DNA 接头标签 19   |

## 套装 B

| 数量 | 试剂         | 描述            |
|----|------------|---------------|
| 1  | RSB        | 重悬缓冲液         |
| 1  | ERP2或ERP3  | 末端修复混合液       |
| 1  | ATL 或 ATL2 | A-Tailing 混合液 |
| 1  | LIG2       | 连接混合液 2       |
| 1  | STL        | 停止连接缓冲液       |
| 1  | PPC        | PCR 引物混合液     |
| 1  | EPM        | 增强型 PCR 混合液   |
| 1  | AD001      | DNA 接头标签 1    |
| 1  | AD003      | DNA 接头标签 3    |
| 1  | AD008      | DNA 接头标签 8    |
| 1  | AD009      | DNA 接头标签 9    |
| 1  | AD010      | DNA 接头标签 10   |
| 1  | AD011      | DNA 接头标签 11   |
| 1  | AD020      | DNA 接头标签 20   |
| 1  | AD021      | DNA 接头标签 21   |
| 1  | AD022      | DNA 接头标签 22   |
| 1  | AD023      | DNA 接头标签 23   |
| 1  | AD025      | DNA 接头标签 25   |
| 1  | AD027      | DNA 接头标签 27   |

24 个样品 – SP 微珠盒，在 2° C 至 8° C 温度下存储

| 数量 | 试剂  | 描述     |
|----|-----|--------|
| 1  | SPB | 样品纯化微珠 |

## TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒

TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒包含 3 个盒子：1 个核心试剂盒、1 个接头板盒和 1 个 SP 微珠盒。

96 个样品 – (盒 1, 共 2 盒)，在 -25° C 至 -15° C 温度下存储

此盒中还装有板条形码标签。



**注意**  
试剂盒中包含 ERP2 或 ERP3 及 ATL 或 ATL2。

表 7 TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒，96 个样品 (盒 1, 共 2 盒)，部件号 15041877

| 数量 | 试剂          | 描述            |
|----|-------------|---------------|
| 1  | RSB         | 重悬缓冲液         |
| 2  | ERP2 或 ERP3 | 末端修复混合液       |
| 2  | ATL 或 ATL2  | A-Tailing 混合液 |
| 2  | LIG2        | 连接混合液 2       |
| 2  | STL         | 停止连接缓冲液       |
| 2  | PPC         | PCR 引物混合液     |
| 2  | EPM         | 增强型 PCR 混合液   |

96 个样品 – 接头板盒，在  $-25^{\circ}\text{C}$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  温度下存储

| 数量 | 试剂  | 描述           |
|----|-----|--------------|
| 1  | DAP | DNA 接头板，96 重 |

96 个样品 – SP 微珠盒，在  $2^{\circ}\text{C}$  至  $8^{\circ}\text{C}$  温度下存储

| 数量 | 试剂  | 描述     |
|----|-----|--------|
| 6  | SPB | 样品纯化微珠 |

## 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。有些物品是否必需取决于要执行的工作流程（HS 或 LS），这些物品将在单独的表中指定。

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。

表 8 用户自备的耗材

| 耗材  | 供应商   |
|---|---|
| 1.7 毫升微量离心管                                 | 一般实验室供应商  |
| 15 毫升圆锥形试管                                  | 一般实验室供应商  |
| 10 微升带滤芯移液器吸头                               | 一般实验室供应商  |
| 10 微升多通道移液器                                 | 一般实验室供应商  |
| 10 微升单通道移液器                                 | 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  |
| 96 孔存储板，圆孔，0.8 毫升（MIDI 板）                   | Fisher Scientific, 部件号 AB-0859                          |
| 以下其中一个：<br>• DNA 7500 试剂盒<br>• 高灵敏度 DNA 试剂盒 | Agilent Technologies, 部件号<br>• 5067-1506<br>• 5067-4626 |
| 分子生物学用无水纯乙醇（500 毫升）                         | Sigma-Aldrich, 部件号 E7023                                |

| 耗材   | 供应商                                    |
|--|--|
| 冰桶   | 一般实验室供应商                               |
| KAPA 文库定量试剂盒 – Illumina/通用                                   | KAPA Biosystems, 部件号 KK4824            |
| Microseal “A” 封膜   | Bio-Rad, 部件号 MSA-5001                  |
| Microseal “B” 粘性密封膜  | Bio-Rad, 部件号 MSB-1001                  |
| 6x16 毫米微细管, AFA 纤维, 带<br>• 钳口盖或<br>• 预裂弹扣盖 (用于 Covaris M220) | Covaris, 部件号<br>• 520052 或<br>• 520045 |
| PCR 级用水  | 一般实验室供应商                               |
| Qubit dsDNA HS 实验分析方法试剂盒                                     | Life Technologies, 商品目录号 Q32851        |
| RNaseZap (用于表面去污)  | 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                               |
| 不含 RNase/DNase 的一次性多通道试剂槽                                    | VWR, 部件号 89094-658                     |
| 10 毫摩尔/升 Tris-HCl, pH8.5                                     | 一般实验室供应商                               |
| Tween 20   | Sigma-Aldrich, 部件号 P7949               |
| [可选] 采用 dsDNA 结合染色剂的荧光定量                                     | 一般实验室供应商                               |

表 9 用户自备的耗材 – 用于 HS 工作流程的其他物品

| 耗材   | 供应商  |
|--|--|
| 96 孔硬壳 0.3 毫升 PCR 板                          | Bio-Rad, 部件号 HSP-9601                                    |
| 96 孔 0.3 毫升无裙边 PCR 板或<br>Twin.tec 96 孔 PCR 板 | E&K Scientific, 部件号 480096 或<br>Eppendorf, 部件号 951020303 |

表 10 用户自备的设备

| 设备   | 供应商   |
|--|---|
| 2100 Bioanalyzer 桌面系统                                  | Agilent Technologies, 部件号 G2940CA                 |
| 96 孔扩增仪 (带热盖)<br>请参见 <a href="#">扩增仪</a> (第 32 页)。     | 一般实验室供应商  |
| 以下 Covaris 系统之一:<br>• S2<br>• S220<br>• E210<br>• M220 | Covaris M220, 部件号 500295<br>有关所有其他型号, 请联系 Covaris |
| 磁力架 96   | Life Technologies, 商品目录号 AM10027                  |
| 微孔板离心机   | 一般实验室供应商  |

| 设备                                      | 供应商      |
|---|----------|
| 振荡器                                     | 一般实验室供应商 |
| qPCR 系统<br>请参见 <i>qPCR</i> 系统 (第 33 页)。 | 一般实验室供应商 |
| [可选] 用于使用 dsDNA 结合染色剂进行定量的荧光检测仪         | 一般实验室供应商 |

表 11 用户自备的设备 – 用于 HS 工作流程的其他物品

| 设备  | 供应商  |
|---|--|
| 高速微孔板混合器  | VWR, 商品目录号<br>• 13500–890 (110 V/120 V) 或<br>• 14216–214 (230 V) |
| SciGene TruTemp 加热系统<br>注意: 建议使用两个系统来进行后续的加热程序。 | Illumina, 商品目录号<br>• SC–60–503 (110 V) 或<br>• SC–60–504 (220 V)  |
| 加热系统的 MIDI 板插件<br>注意: 建议使用两个插件来进行后续的加热程序。       | Illumina, 商品目录号 BD–60–601  |
| 频闪仪   | 一般实验室供应商   |

## 扩增仪

下表列出了针对 Illumina 建议的扩增仪及其他同类型号的建议设置。如果贵实验室的扩增仪未列在其中, 请先验证扩增仪, 然后再执行 TruSeq Nano DNA 文库制备操作流程。

| 扩增仪                                  | 温度模式 | 盖子温度               | 容器类型 |
|--------------------------------------|------|--------------------|------|
| Bio–Rad DNA Engine Tetrad 2          | 已计算  | 已加热, 在 100° C 保持恒温 | 板    |
| MJResearch PTC 225 DNA Engine Tetrad | 已计算  | 已加热, 在 100° C 保持恒温 | 板    |
| Bio–Rad S1000                        | 不适用  | 已加热, 在 100° C 保持恒温 | 板    |

## qPCR 系统

下表列出了已经过验证适用于 TruSeq Nano DNA 文库制备操作流程的 qPCR 系统。

| 设备                       | 供应商                   |
|--------------------------|-----------------------|
| CFX96 Touch 实时 PCR 检测系统* | Bio-Rad, 部件号 185-5195 |
| Mx3000P qPCR 系统          | Agilent, 部件号 401511   |

\* 请使用处于 Cq 测定模式下的 CFX Manager 软件版本 3.0; 单个阈值; 基线设置: 基线减去拟合曲线, 并针对数据分析应用荧光偏移修正。此设置可以修正由仪器所导致的标准曲线荧光强度异常情况。有关软件安装, 请联系 Bio-Rad。

## 带标签的接头序列

本部分介绍带标签的接头序列。

### 带标签的接头试管序列

TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒包含以下带标签的接头序列。

- ▶ 标签编号不连续。没有标签 17、24 或 26。
- ▶ 序列包含 7 个碱基。( ) 括号内显示的第 7 个碱基未包含在标签片段中。请在样品表中仅记录前 6 个碱基。对于标签 13 及以上, 第 7 个碱基 (在括号内) 可能不是 A, 在第 7 次标签片段循环中可以看出这一点。
- ▶ 有关用于测序标签片段的循环次数的详细信息, 请参见您所用 Illumina 测序平台的系统指南。

表 12 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒套装 A 带标签的接头序列

| 接头    | 序列        | 接头    | 序列        |
|-------|-----------|-------|-----------|
| AD002 | CGATGT(A) | AD013 | AGTCAA(C) |
| AD004 | TGACCA(A) | AD014 | AGTTCC(G) |
| AD005 | ACAGTG(A) | AD015 | ATGTCA(G) |
| AD006 | GCCAAT(A) | AD016 | CCGTCC(C) |
| AD007 | CAGATC(A) | AD018 | GTCCGC(A) |
| AD012 | CTTGTA(A) | AD019 | GTGAAA(C) |

表 13 TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒套装 B 带标签的接头序列

| 接头    | 序列        | 接头    | 序列        |
|-------|-----------|-------|-----------|
| AD001 | ATCACG(A) | AD020 | GTGGCC(T) |
| AD003 | TTAGGC(A) | AD021 | GTTTCG(G) |
| AD008 | ACTTGA(A) | AD022 | CGTACG(T) |
| AD009 | GATCAG(A) | AD023 | GAGTGG(A) |
| AD010 | TAGCTT(A) | AD025 | ACTGAT(A) |
| AD011 | GGCTAC(A) | AD027 | ATTCCT(T) |

## 带标签的接头板序列

TruSeq Nano DNA HT 文库制备试剂盒中的 DAP 包含以下带标签的接头序列。

样品表中记录的带标签的接头序列包含 8 个碱基，且所有这 8 个碱基都在标签片段期间进行测序。

表 14 带标签的接头 1 序列

| 接头   | 序列       | 接头   | 序列       |
|------|----------|------|----------|
| D701 | ATTACTCG | D707 | CTGAAGCT |
| D702 | TCCGGAGA | D708 | TAATGCGC |
| D703 | CGCTCATT | D709 | CGGCTATG |
| D704 | GAGATTCC | D710 | TCCGCGAA |
| D705 | ATTCAGAA | D711 | TCTCGCGC |
| D706 | GAATTCGT | D712 | AGCGATAG |

表 15 带标签的接头 2 序列

| 接头   | 序列       | 接头   | 序列        |
|------|----------|------|-----------|
| D501 | TATAGCCT | D505 | AGGCGAAG  |
| D502 | ATAGAGGC | D506 | TAATCTTA  |
| D503 | CCTATCCT | D507 | CAGGACGT  |
| D504 | GGCTCTGA | D508 | GTA CTGAC |

图 4 DAP 双标签布局

|   | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10        | 11        | 12        |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A | D701-D501 | D702-D501 | D703-D501 | D704-D501 | D705-D501 | D706-D501 | D707-D501 | D708-D501 | D709-D501 | D710-D501 | D711-D501 | D712-D501 |
| B | D701-D502 | D702-D502 | D703-D502 | D704-D502 | D705-D502 | D706-D502 | D707-D502 | D708-D502 | D709-D502 | D710-D502 | D711-D502 | D712-D502 |
| C | D701-D503 | D702-D503 | D703-D503 | D704-D503 | D705-D503 | D706-D503 | D707-D503 | D708-D503 | D709-D503 | D710-D503 | D711-D503 | D712-D503 |
| D | D701-D504 | D702-D504 | D703-D504 | D704-D504 | D705-D504 | D706-D504 | D707-D504 | D708-D504 | D709-D504 | D710-D504 | D711-D504 | D712-D504 |
| E | D701-D505 | D702-D505 | D703-D505 | D704-D505 | D705-D505 | D706-D505 | D707-D505 | D708-D505 | D709-D505 | D710-D505 | D711-D505 | D712-D505 |
| F | D701-D506 | D702-D506 | D703-D506 | D704-D506 | D705-D506 | D706-D506 | D707-D506 | D708-D506 | D709-D506 | D710-D506 | D711-D506 | D712-D506 |
| G | D701-D507 | D702-D507 | D703-D507 | D704-D507 | D705-D507 | D706-D507 | D707-D507 | D708-D507 | D709-D507 | D710-D507 | D711-D507 | D712-D507 |
| H | D701-D508 | D702-D508 | D703-D508 | D704-D508 | D705-D508 | D706-D508 | D707-D508 | D708-D508 | D709-D508 | D710-D508 | D711-D508 | D712-D508 |

## 技术协助

如需技术协助，请与 Illumina 技术支持部门联系。

表 16 Illumina 常用联系信息

|      |                          |
|------|--------------------------|
| 网站   | www.illumina.com         |
| 电子邮件 | techsupport@illumina.com |

表 17 Illumina 客户支持部门电话号码

| 地区   | 联系号码           | 地区      | 联系号码            |
|------|----------------|---------|-----------------|
| 北美   | 1.800.809.4566 | 瑞典      | 020790181       |
| 澳大利亚 | 1.800.775.688  | 瑞士      | 0800.563118     |
| 爱尔兰  | 1.800.812949   | 台湾      | 00806651752     |
| 奥地利  | 0800.296575    | 西班牙     | 900.812168      |
| 比利时  | 0800.81102     | 香港      | 800960230       |
| 丹麦   | 80882346       | 新加坡     | 1.800.579.2745  |
| 德国   | 0800.180.8994  | 新西兰     | 0800.451.650    |
| 法国   | 0800.911850    | 意大利     | 800.874909      |
| 芬兰   | 0800.918363    | 英国      | 0800.917.0041   |
| 荷兰   | 0800.0223859   | 中国      | 400.635.9898    |
| 挪威   | 800.16836      | 其他国家/地区 | +44.1799.534000 |
| 日本   | 0800.111.5011  |         |                 |

### 安全数据表

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

### 产品文档

可从 Illumina 网站上下载产品文档 (PDF)。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)**。



部件号 15041110 修订版 D CHS



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