



# FFPE DNA QC Kit

RK20229

---



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

Version: N15G02v1.2

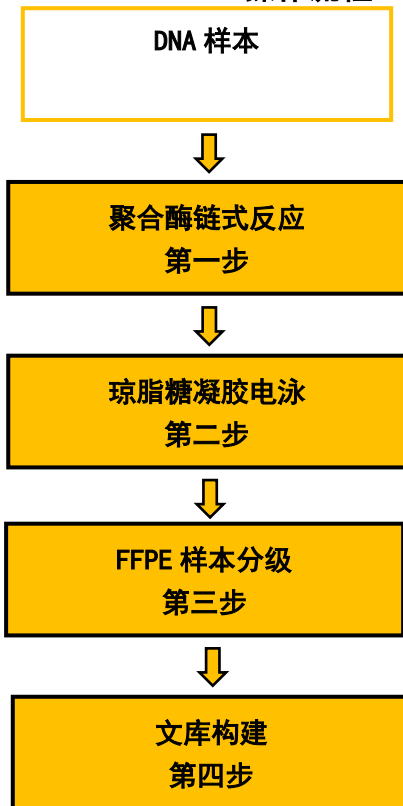
# 目录

|                     |   |
|---------------------|---|
| 1. 产品概述 .....       | 1 |
| 2. 产品组分 .....       | 2 |
| 3. 注意事项 .....       | 2 |
| 4. 操作流程 .....       | 2 |
| 第一步 聚合酶链式反应 .....   | 2 |
| 第二步 琼脂糖凝胶电泳 .....   | 3 |
| 第三步 FFPE 样本分级 ..... | 3 |
| 第四步 文库构建 .....      | 4 |
| 5. 附录 .....         | 5 |

# 1. 产品概述

本试剂盒通过多重 PCR 对 FFPE 样本完整性和质量进行评估。本试剂盒使用针对困难样本的高保真聚合酶和 4 对不同目标产物大小的特异性引物，对 FFPE DNA 进行扩增，根据多重 PCR 产物扩增条带的数量对 FFPE 样本进行分级，对后续 NGS 建库使用 PCR 循环数进行指导。

## FFPE DNA QC Kit 操作流程



## 2. 产品组分

试剂盒中的组分在适当的贮存条件下可以保存一年，所有试剂需要在-20℃保存。

表格 1. 试剂盒组分表

| 组分名称              | 8 次         | 24 次        | 96 次         |
|-------------------|-------------|-------------|--------------|
| Gloria Nova HS 2X |             |             |              |
| HF Master Mix     | 100 $\mu$ L | 300 $\mu$ L | 1200 $\mu$ L |
| Primers FIL       | 4 $\mu$ L   | 12 $\mu$ L  | 48 $\mu$ L   |

## 3. 注意事项

- 为了得到良好的评估结果，我们建议实验开始前用 Qubit®或其他定量仪器对 Input DNA 定量。另外需要注意，样本中的杂质，如：微量残留的 RNA、核苷酸、单链 DNA 以及其它污染物都会对文库的构建产生影响。
- 对酶尽量不使用漩涡振荡，可以使用移液器温和地上下吹打混匀。

## 4. 操作流程

### 第一步 聚合酶链式反应

#### 标准操作

- 推荐将所有的反应组分在冰上配制，然后快速将反应体系转移到已经预热到 98°C 的 PCR 仪中。
- 所有组分在使用前应混匀并瞬时离心。请将其他反应组分混合后，再最后加入 Gloria Nova HS 2X HF Master Mix，以防止其 3' -5' 核酸外切酶活性降解引物。
- 注意，Gloria Nova HS 2X HF Master Mix 的操作方法可能与其他聚合酶的标准方法不同。因此，请使用下面推荐的反应条件以获得最佳扩增效果。

表格 2. 推荐的 PCR 反应体系

| 组分                              | 加入量<br>(25 $\mu$ L 体系) | 终浓度             |
|---------------------------------|------------------------|-----------------|
| Gloria Nova HS 2X HF Master Mix | 12.5 $\mu$ L           | 1X              |
| Primers FIL (10 $\mu$ M )*      | 0.5 $\mu$ L            | 0.2 $\mu$ M     |
| DNA 模板                          | 5 ng                   | 0.2 ng/ $\mu$ L |
| ddH <sub>2</sub> O              | to 25 $\mu$ L          | N/A             |

\*, 备注: Primers FIL 为 4 对扩增引物的混合物, 以高质量的 Human gDNA 为模板, 可扩增出 100 bp、200bp、300 bp、400 bp 共 4 个条带; FFPE 样本根据其质量好坏, 可扩增出 0-4 个条带。

表格 3. 推荐的 PCR 反应程序

| 步骤   | 温度    | 时间       | 循环数 |
|------|-------|----------|-----|
| 预变性  | 98° C | 45 s     | 1   |
| 变性   | 98° C | 10 s     | 30  |
| 退火   | 60° C | 30 s     |     |
| 延伸   | 72° C | 30 s     |     |
| 终延伸  | 72° C | 1 min    | 1   |
| Hold | 4° C  | $\infty$ | 1   |

## 第二步 琼脂糖凝胶电泳

将上一步 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 琼脂糖凝胶浓度 4%, 电压 11 V/cm。

## 第三步 FFPE 样本分级

根据上一步中 PCR 产物扩增结果, 对 FFPE 样本进行分级。分级标准如下表所示。

表格 4. FFPE 样本分级标准\*

| PCR 产物条带数目 | FFPE 级别 |
|------------|---------|
| 4          | 1       |
| 3          | 2       |
| 2          | 3       |
| 1          | 4       |
| 0          | 5       |

\*, 备注: 为保证实验结果的可靠性, 每次实验均需以高质量 Human Blood gDNA 进行扩增做为对照, 只有对照扩增出 4 条正确的条带时, 实验组的结果才是可信的。

## 第四步 文库构建

根据上一步的分级结果和可用于文库构建的 FFPE 样本量, 推荐使用 ABclonal 以下几款建库试剂盒进行后续文库构建。

FFPE 样本量大于 30 ng, 且评级为 1-4 级时, 使用 RK20255\_Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 或 BK0029\_FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina 进行文库构建; FFPE 样本量小于等于 30 ng 或评级为 5 时, 使用 RK20228\_Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (10 pg-200 ng) 进行文库构建; FFPE 样本量小于 5 ng 时, 放弃使用此样本进行文库构建。

使用 RK20255\_Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 或 RK20228\_Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (10 pg-200 ng) 进行文库构建时, 样本可以采用机械打断或酶切打断。机械打断时, 根据不同打断仪器推荐条件进行打断; 酶切打断时, 推荐使用 BK0033-FS DNA Frag Module 进行打断, 打断后 75°C 加热十分钟失活。

文库构建具体推荐 PCR 循环数如下表 5 和表 6 所示。

表格 5. RK20255 和 BK0029 不同等级 FFPE 样本推荐循环数（文库产量 1 μg）

| 样本量     |          | 大于等于 200 ng | 30-200 ng |
|---------|----------|-------------|-----------|
| 样本投入量   |          | 200 ng      | 30-200 ng |
| PCR 循环数 | FFPE 1 级 | 6           | 6-9       |
|         | FFPE 2 级 | 7           | 7-10      |
|         | FFPE 3 级 | 9           | 9-12      |
|         | FFPE 4 级 | 11          | 11-14     |
|         | FFPE 5 级 | /           | /         |

表格 6. RK20228 不同等级 FFPE 样本推荐循环数（文库产量 1 μg）

| 样本量     |          | 大于等于 200 ng | 30-200 ng | 5-30 ng |
|---------|----------|-------------|-----------|---------|
| 样本投入量   |          | 200 ng      | 30-200 ng | 5-30 ng |
| PCR 循环数 | FFPE 1 级 | /           | /         | 9-12    |
|         | FFPE 2 级 | /           | /         | 10-13   |
|         | FFPE 3 级 | /           | /         | 11-14   |
|         | FFPE 4 级 | /           | /         | 12-15   |
|         | FFPE 5 级 | 13          | 13-16     | 13-16   |

\*样本投入量：如样本量大于等于 200 ng，投入 200 ng；如小于 200 ng，按实际样本量投入，不低于 5 ng。

当样本量为 200-30 ng 或 30-5 ng 时，PCR 循环数需根据投入量的变化进行调整。比如当使用 RK20255 进行文库构建时，样本量为 200-30 ng、FFPE 样本等级为 1 级时，推荐的 PCR 循环数为 6-9（意即当样本量为 200 ng 时，PCR 循环数为 6；当样本量为 30 ng 时，PCR 循环数为 9；200-30 ng 之间的样本量，根据样本量减半循环数加 1 的原则进行调整），其它情况以此类推。

## 5. 附录

### 5.1 FFPE 样本分级实例

下图中 2、3、4 是 3 个不同的 FFPE 样本，按照琼脂糖凝胶电泳结果，分别分为级别 1、级别 1、级别 3。Ladder, DNA Marker; 1, Human Blood gDNA; 2, FFPE 样本 1; 3, FFPE 样本 2; 4, FFPE 样本 3。

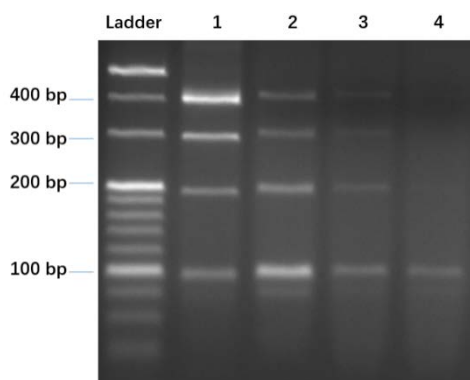


图 1 5.1 FFPE 样本分级实例

## 中国

[www.abclonal.com.cn](http://www.abclonal.com.cn)

中国总部：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷国际生物医药企业加速器三期 7 栋 4 层

上海分部：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院 2 号楼 4 楼

北京分部：北京市朝阳区北沙滩甲 1 号中科电大厦 702 室

南京分部：南京市白下区石鼓路 98 号阳光大厦 20 楼 C 座

成都分部：成都市金牛区一环路北三段 1 号金牛万达广场 SOHO D 座 3210 室

杭州分部：杭州市西湖区古墩路 671 号申悦国际 B 座 1530

电话：400-999-6126

邮箱：[cn.market@abclonal.com](mailto:cn.market@abclonal.com)