

FFPE DNA样本 NGS 检测操作手册

FFPE DNA SAMPLE NGS TESTING OPERATION MANUAL



中国
武汉市东湖新技术开发区高新二路388号光谷生物加速器7栋4层
WEB: www.abclonal.com.cn
TEL: 400-999-6126
E-mail: cn.market@abclonal.com


USA
ABclonal Technology Co.,Ltd.
500W Cummings Park, Ste. 6500 Woburn,
MA 01801
WEB: www.abclonal.com
TEL: 888-754-5670
E-mail: info@abclonal.com



20211015/0.1

 Web
abclonal.com.cn

 E-mail
cn.market@abclonal.com

 Phone
400-999-6126

COMPANY PROFILE

Antibody | Protein | ELISA Kits | Enzyme | NGS | Service

公司简介

武汉爱博泰克生物科技有限公司 (ABclonal Technology Co.,Ltd.) 是全球生物试剂定制化服务领域的创新型领跑者。经过多年的深耕与发展, ABclonal旨在为生物医药前沿领域的基础研究、转化研究、精准医疗等多个领域提供专业可靠并符合市场需求的优质的产品与服务。公司主营业务包括科研抗体、分子酶产品、NGS建库试剂盒、活性重组蛋白、诊断抗原抗体原料、ELISA试剂盒以及CRO服务, CRO服务主要包括抗体与蛋白技术服务、基因与多肽合成技术服务、免疫学检测技术服务等。

ABclonal成立于2011年, 现已跻身全球化的跨国公司之列。公司总部位于中国武汉, 目前在美国波士顿设有抗体与蛋白研发中心、中国光谷生物城设有抗体生产基地、上海设有分子酶研发中心, 并在美国波士顿、日本、台湾、上海、北京、武汉、南京、成都、厦门、杭州、青岛、苏州、重庆和西安建立直销团队, 签约代理商近100家覆盖全球50多个国家与地区。在过去的10年中, 全球有超过100个国家, 超过100,000客户选择ABclonal。

FFPE DNA样本 NGS 检测操作手册

目录

一、前言	1
二、ABclonal FFPE DNA样本NGS检测全流程解决方案	2
2.1 核酸提取与质控	3
2.1.1 FFPE DNA提取	3
2.1.2 FFPE DNA定量	3
2.1.3 FFPE DNA质控	3
2.2 NGS文库构建	3
2.2.1 机械打断建库	4
2.2.2 酶切打断建库	4
2.2.3 UDI (Unique dual Index)	4
2.2.4 核酸纯化磁珠	4
2.2.5 文库质检	5
2.3 杂交捕获与生信分析	6
2.3.1 杂交捕获体系	6

1.前言

福尔马林固定石蜡包埋处理的样本 (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE), 因其可以常温长时间保存, 易于运输等特点, 是最常用的肿瘤组织样本储存方法。FFPE样本大多无法重新获取, 因此十分珍贵。全球约有2-4亿的FFPE组织样本, 是疾病诊断和科学研究最为宝贵的生物学资源之一。

随着新一代测序技术 (NGS) 的快速发展, FFPE样本除了用于组织形态观察以外, 更多的开始在分子层面进行研究。目前大部分保存的肿瘤组织为FFPE样本, 通过NGS测序技术对这些FFPE样本进行分子水平的研究, 为建立新的肿瘤分类、诊断和预后标准, 开发肿瘤早筛以及个体化医疗技术提供了有利的依据。但是, FFPE样本处理及保存过程中, 会给样本带来损伤, 从而影响后续的测序分析 (如表格1)。如何克服FFPE样本DNA提取建库困难, 充分挖掘利用FFPE中的有效核酸序列信息, 已成为当前肿瘤研究领域亟待解决的问题。

表格1. FFPE样本在测序中的常见问题

高假阳性率	福尔马林的固定会人为引入“C>T”和“G>A”突变, 给低频率突变检测造成很大的干扰
高 Duplication Rate	交联、突变、物理损伤等问题使得 DNA 的扩增更困难, 在起始量和连接效率相同的情况下, FFPE 样本需要更多的 PCR 循环
低文库丰度	初始样本量、质量和文库有效转化率决定了文库丰度, 低丰度文库的额外测序, 只是徒增了重复率 (Duplication Rates)。

2.3.2 生信分析流程	6
三、FFPE DNA样本NGS检测全流程解决方案操作流程	7
3.1 FFPE样本DNA提取 (RK30112)	7
3.2核酸质量评估 (RK20229)	9
3.3 文库构建	11
3.3.1 建库方案指导	11
3.3.2 文库构建	12
(1) 机械打断+Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2操作流程	13
(2) 打断酶+Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2操作流程	16
(3) FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina操作流程	19
(4) 机械打断+Scale ssDNA-seq Lib prep Kit for Illumina V2操作流程	22
(5) 打断酶+Scale ssDNA-seq Lib prep Kit for Illumina V2操作流程	26
3.4 FFPE样本文库的杂交捕获	31
3.5 生信分析	37

2.ABclonal FFPE DNA样本NGS检测全流程解决方案

ABclonal科学家匠心打磨,开发了适用于FFPE样本的DNA提取、质量评估、文库构建、靶向捕获、数据分析等一系列产品和服务,能为客户提供一体化研究解决方案,全方位服务客户,助力肿瘤精准诊疗!

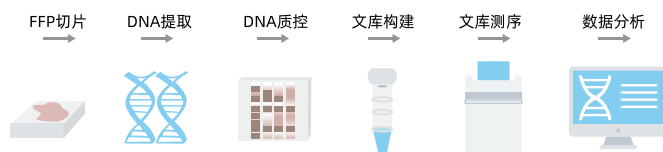


图1 FFPE样本DNA NGS检测全流程解决方案

ABclonal FFPE DNA 样本一体化解决方案



2.1 核酸提取与质控

// 2.1.1 FFPE DNA提取

FFPE样本需要先进行脱蜡处理才能提取DNA,常用的脱蜡试剂是二甲苯,但二甲苯容易造成核酸片段化,且对人体有毒害作用。同时,FFPE样本中DNA分子与其它生物大分子(蛋白质、RNA)交联在一起,需要解除交联才能有效释放出DNA。ABclonal FFPE提取试剂盒(AFTSpin FFPE DNA Isolation Kit, RK30112)同时兼容二甲苯和无毒脱蜡液两种方法,可为实验人员提供更加安全的操作流程。同时,该试剂盒提供了优化的解交联步骤,能够高效释放DNA,释放出的DNA通过硅胶膜进行进一步分离纯化,从而获得高质量的DNA。

// 2.1.2 FFPE DNA定量

FFPE DNA浓度测定推荐使用定量仪器Thermo Invitrogen Fluorometer Qubit 3.0和定量试剂盒Thermo Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit。具体操作详见供应商操作说明书。

// 2.1.3 FFPE DNA质控

Qubit定量无法判断DNA分子的完整性,而因降解产生的小片段DNA(<100bp)分子对于建库无任何意义。因此,ABclonal推荐使用FFPE DNA QC Kit (RK20229)来对FFPE DNA进行更为准确、全面的质量评估。试剂盒包含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,根据多重PCR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。

2.2 NGS文库构建

FFPE样本抽提的DNA,因福尔马林固定剂的作用,使得磷酸二酯键水解,导致不同程度的DNA断裂, DNA质量差,文库片段偏小,测序Reads比对质量低。同时,FFPE DNA构建的测序文库相比其他类型样本,例如新鲜组织、血浆样本等,测序深度及覆盖度偏低,且Duplication较高。FFPE样本在长时间非理想条件下存储,以及福尔马林的固定,不仅会导致DNA的降解,也会引入人为的假突变(C>T|G>A)。针对这些问题,ABclonal提供了特异针对FFPE样品的文库构建试剂盒。

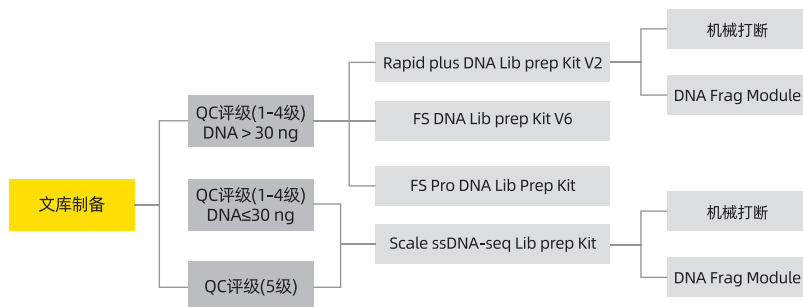


图2. ABclonal建库产品搭配示意图

// 2.2.1 机械打断建库

如果使用机械打断方法进行后续文库构建, 推荐使用Covaris Focused-ultrasonicator M220或Cavaris其它型号打断仪。具体操作详见供应商操作说明书。

如果样品量充足, 大于30ng且FFPE QC定级在1-4级, 建议使用ABclonal Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20255) 建库。RK20255是一款升级的DNA文库制备试剂盒, 搭配独特的DNA损伤修复模块II (DDRE II), 能够修复FFPE样本中损伤的DNA, 提高文库构建的成功率和文库产量, 同时并不会增加测序的假阳性。Damaged DNA Repair Enzymes II (DDRE II) 是专门针对FFPE样本设计的修复试剂, 由多种酶按照一定的配方混合而成, 经过优化和验证可修复切割、缺口、碱基氧化、3'端损伤/封闭、无嘌呤嘧啶位点以及胞嘧啶脱氨形成尿嘧啶。

表格2. DDRE II可以修复的DNA损伤类型

DNA 损伤类型
DNA 缺口 (gap)
碱基缺失 (AP 位点)
DNA 切割 (nick)
碱基转化 (dUTP 等)
DNA 末端损伤
碱基交联
碱基氧化 (8-oxo-dGTP 等)
错误 DNA 结构

部分FFPE DNA因为初始含量低或者降解严重, 导致样本中可用于建库的完整双链DNA (dsDNA) 分子数很少。因此在构建文库时需要增加PCR循环数, 才能获得符合上机需求的文库产量。然而PCR循环数太高, 会导致文库偏好性增加, 有效数据量降低, 不仅增加了测序成本, 还会影响分析结果, 甚至导致稀有基因型检测不到。

若FFPE DNA量较低 (小于30ng) 或者损伤严重 (FFPE QC 5级), 用于建库的完整双链DNA (dsDNA) 分子数很少, 用常规的建库方式无法获得符合上机测序要求的文库量, ABclonal建议使用 Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20228)建库。Scale ssDNA-seq能直接以片段化的单链DNA为起始模板构建文库, 而不受样本中完整dsDNA含量的限制, 极大的提高了困难样本的文库构建质量。

// 2.2.2 酶切打断建库

相比机械打断, 酶切打断的方法更加温和, 并且能够更好的保留DNA完整性。酶切法打断操作方便, 打断、末端修复和加A一步完成, 减少了实验步骤, 便于同时操作多个样本。相对于超声打断法, 酶切法打断操作更为简单, 转管次数更少, 样本损耗量也更低, 可以兼容更低的样本起始量。最重要的是, 酶切法打断不需要使用专门的打断仪器和耗材, 能够降低建库的门槛和成本。ABclonal推出 FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina (RK20261), 试剂盒将DNA样本酶切片段化、末端修复与加dA合并为一步, 无需纯化, 直接可以进行测序接头连接。整个实验过程可以在2h内完成, 并对不同物种和不同投入量的DNA样本具有良好的兼容性。ABclonal通过体系优化, 大幅减少了假阳性的产生, 提高了测序结果的准确性。对于FFPE样本, ABclonal FS试剂盒在建库产量上展现出了卓越的性能。

为满足客户更多需求, 兼容其它DNA建库Kit, ABclonal将酶切模块独立出来, 推出DNA Frag Module (RK20260), 该试剂盒是一款酶法打断DNA的试剂模块, 可将完整的DNA样本根据不同片段化时间打断成预期的不同大小片段的DNA, 打断的DNA可搭配Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20255) 或 Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20228) 进行后续DNA文库构建。

// 2.2.3 UDI (Unique dual Index)

测序仪工作时发生的标签跳跃/转换现象(index hopping), 以及标签试剂或者样品间的交叉污染, 混合样品在PCR扩增时发生的模板调换、测序反应错误以及数据分析错误等, 导致不同样本之间产生错配问题。在文库的P5和P7端带上独特的标签—UDI (Unique Dual Index), 通过P5 Index 2和P7 Index 1成组设计, 两端Index交叉验证, 可以有效降低Index错误分配的现象。ABclonal Unique Dual Index for Illumina (RK21622~RK21627) 含有192种位于P5和P7双端Index, 且P5和P7端的Index是唯一配对的, 不会再出现其他的Index组合。该产品适用于大量样本同时上机测序, 可任意搭配机械打断建库、酶切建库产品。

// 2.2.4 核酸纯化磁珠

AFTMag NGS DNA Clean Beads (RK20257) 是ABclonal开发的一款高性能的DNA纯化磁珠, 基于SPRI(Solid Phase Reverse Immobilization)原理, 适用于NGS文库构建中的DNA片段纯化与大小分选。AFTMag NGS DNA Clean Beads除搭配ABclonal建库试剂外, 可兼容市场上主流的NGS文库构建试剂盒 (DNA、RNA), 使用方式、文库产量与片段大小与AMPure XP Beads高度一致, 因此可以无缝替代AMPure XP Beads, 有效降低建库成本。

// 2.2.5文库质检

文库质检推荐使用Agilent Bioanalyzer 2100、PerkinElmer LabChip Gx或Bioptic Bio-Fragment Analyzer Qsep 100等仪器。

2.3杂交捕获与生信分析

目标序列捕获测序是目前基因组学研究中的一个热点技术，仅对感兴趣的基因组区域进行富集测序，不仅能够有效降低测序成本，还可以对目标区域进行深度测序，增加了目标区域内遗传变异的检测灵敏度和准确性，所以非常适合基因分型和稀有变异检测。目标序列捕获测序在遗传病和肿瘤疾病的研究中取得了重要成果。由于杂交探针捕获不需要PCR引物设计，因此遗漏突变的可能性较小，而且在序列复杂性方面表现更好。

// 2.3.1 杂交捕获体系

ABclonal杂交捕获体系提供了可以适用于Illumina高通量测序平台的杂交捕获试剂，其中包括磁珠洗脱试剂、杂交缓冲液试剂、捕获缓冲液试剂、洗脱缓冲液试剂 (Hybridization and Wash Kit, BK0003)，通用Blocker封闭试剂 (ILM Universal Blockers-X1, BM0010)，磁珠 (Streptavidin Beads, BM0011)，人基因组重复序列封闭试剂 (Human Cot DNA, BM0009)，2X HiFi PCR Mix(Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS, RM20386)，10X PCR Primers(RM20205)等。该体系具有良好的灵敏性和特异性，可以广泛应用于复杂疾病相关致病基因的研究以及健康筛查等众多领域。

// 2.3.2 生信分析流程

基于高通量测序的检测方法完成研发后，在应用时，需要建立一系列的分析性能指标并对其进行性能确认，以确定该方法能够提供准确的检测结果并满足预期用途。ABclonal拥有强大的生信研发团队，不仅在“湿实验”完美助力客户，同时也为相应产品和解决方案提供生信分析支撑。

3.FFPE DNA样本NGS检测操作流程

3.1 FFPE样本DNA提取 (RK30112)

//产品概述

本试剂盒为FFPE样本的总DNA提取提供了一个简单快速的解决方案。本产品提供二甲苯和无毒脱蜡液两种脱蜡方案供选择，两种脱蜡方案提取效果基本相当。如果样本含量过低，比如穿刺样本，推荐使用二甲苯进行脱蜡。

原理：对组织样品直接裂解和消化，释放出来的核酸成分选择性吸附于特殊材料离心柱内硅基质膜，随后通过洗涤液的作用，将蛋白质、无机盐离子和许多有机杂质去除。最后用洗脱液将纯净的核酸洗脱下来。



//注意事项

本试剂盒在室温储存12个月不影响使用效果。低温下，消化液可能会有沉淀形成，需55°C水浴让沉淀完全溶解。

//实验前准备试剂及仪器

- 55°C、56°C和90°C水浴锅
- 二甲苯或无毒脱蜡液(Deparaffinization Buffer)
- 无水乙醇

//操作流程

| 标准方案

- ① 切片：用干净刀片去除多余石蜡，把样品(<20mg)剪切成尽量小的碎片或切片，并转移至1.5 mL离心管中。把石蜡样品切成10-20 μm薄片，有利于消化。若受条件限制无法切成薄片，也可以用剪刀或刀片把样品剪切成尽量小的碎片。
- ② 脱蜡：目前最常用的脱蜡方法主要是二甲苯和无毒蜡液脱蜡法，分别按照方案A和B进行脱蜡。

方案A: 二甲苯去除石蜡 (经典方案)

- ▶ A1.加入1 mL二甲苯至样品中, 高速涡旋10-30 s。
- ▶ A2.14,000x g离心2 min, 小心吸弃上清液, 不要吸到沉淀。
- ▶ A3.加入1 mL无水乙醇, 涡旋10-30 s, 14,000xg离心2 min。
- ▶ A4.彻底吸弃上清液, 不要吸到沉淀。
- ▶ A5.打开管盖, 室温或37°C晾干15 min以彻底去除乙醇。
- ▶ A6.按第③步进行操作。

方案B: 无毒蜡液去除石蜡

- ▶ B1.加入0.6 mL 脱蜡液 (Deparaffinization Buffer)至样品中,剧烈涡旋5 s。
- ▶ B2.短暂离心让样品浸泡到脱蜡液中, 56°C水浴5 min, 剧烈涡旋15 s。
- ▶ B3.14,000x g离心2 min。
- ▶ B4.彻底吸弃上清液, 不要吸到沉淀。
- ▶ B5.按第③步进行操作。

- ③ 裂解: 加入200 μ L消化液 (Digestion Buffer) 和20 μ L蛋白酶K至样品中, 涡旋混匀, 56°C温育1-2小时或直到样品完全消化, 其间需倒混匀数次。样品也可以消化过夜, 过夜消化对提取结果无负面影响。
- ④ 加热: 90°C水浴60 min。90°C处理可以去除DNA与蛋白质的交联, 明显提高DNA的产量。
- ⑤ (可选)若消化液仍存在明显不消化的杂质, 10,000x g离心3 min去除杂质, 转移上清液至新的离心管。若需去除RNA, 加入5 μ L 100 mg/mL RNase A至上清中, 静置5 min。
- ⑥ 结合: 加入200 μ L μ L结合液 (Binding Buffer) 和200 μ L无水乙醇至样品中, 涡旋混匀15 s。把吸附柱装在收集管中, 转移混合液至柱子, 10000x g离心30-60 s。
备注: 结合液 (Binding Buffer) 和无水乙醇可按1:1比例预先混合。
- ⑦ 清洗: 倒弃滤液, 把吸附柱装回收集管中, 加入500 μ L洗涤液1 (Wash Buffer 1) 至吸附柱上, 10,000x g离心30 ~ 60s; 倒弃滤液, 把吸附柱装回收集管中, 加入650 μ L洗涤液2 (Wash Buffer 2) 至吸附柱中, 10,000xg离心30 ~ 60s; 倒弃滤液, 把吸附柱装回收集管中, 10,000x g离心空吸附柱3min。
- ⑧ 洗脱DNA: 将吸附柱转移至新的1.5 mL离心管中, 加入15 ~ 50 μ L洗脱液 (Elution Buffer) 至吸附柱的膜中央。放置1 min, 10,000x g离心1 min; 丢弃吸附柱, 把DNA保存于2 ~ 8°C, 长期保存需放置于-20°C或-80°C。

| 简易方案

- ① 把石蜡组织切片(1~3片)转移至1.5 mL离心管。加入0.6 mL脱蜡液 (Deparaffinization Buffer) 至样品中, 剧烈涡旋5 s。短暂离心让样品浸泡到脱蜡液 (Deparaffinization Buffer) 中, 56°C水浴5 min, 剧烈涡旋15 s。
 - ② 13,000x g离心2 min让组织块沉淀到管底。
 - ③ 加入200 μ L消化液 (Digestion Buffer) 和20 μ L蛋白酶K至管底, 轻轻吸打混匀3~5次, 短暂离心让样品浸泡消化液 (Digestion Buffer) 中。
 - ④ 55°C温浴60 min, 90°C温浴60 min。
 - ⑤ 13,000x g离心1 min。转移下层裂解液至新的离心管中, 按标准方案的第⑥-⑧进行操作。
- 备注: 上层为石蜡和脱蜡液形成有机相, DNA样品在下层中。

3.2核酸质量评估 (RK20229)

//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建库试剂盒选择和PCR循环数进行指导。



//注意事项

- 为了得到良好的评估结果, 实验开始前需要确保DNA样本的质量合格, 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。
- 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°C保存。

//操作流程

| 聚合酶链式反应

- ① 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。
 - ② 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3. 推荐的PCR反应体系

组分	加入量 (25 μ L 体系)	终浓度
Gloria Nova HS 2X HF Master Mix	12.5 μ L	1X
Primers FIL (10 μ M)*	0.5 μ L	0.2 μ M
DNA 模板	5 ng	0.2 ng/ μ L
ddH ₂ O	to 25 μ L	N/A

*, 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4. 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	∞	1

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。

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。

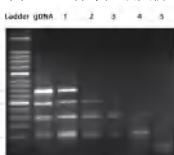
表格5. FFPE样本分级标准*

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

*，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。PCR产物条带以是否清晰可见作为判断的依据。

//质控结果解析

图3 FFPE样本分级实例



上图中1、2、3、4、5是5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2、级别3、级别4、级别5。Ladder, DNA Marker; gDNA, Human Blood gDNA; 1, FFPE样本1; 2, FFPE样本2; 3, FFPE样本3; 4, FFPE样本4; 5, FFPE样本5

3.3 文库构建

//3.3.1建库方案指导

//DNA建库Kit选择

根据QC分级结果和可用于文库构建的FFPE样本量，推荐使用ABclonal以下三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RK20261_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。

//DNA片段化方式选择

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RK20260-FS DNA Frag Module进行打断，打断后75°C加热10 min失活。

//不同类型Kit及起始量样品扩增循环数选择

不同类型Kit文库构建的具体推荐PCR循环数如表6、表7和表8所示。

表格6. RK20255 FFPE样本推荐循环数（文库产量1 μg）

样本投入量 *		200 ng	200-30 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7. RK20261 FFPE样本推荐循环数 (文库产量1 µg)

样本投入量 *		200 ng	200-30 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	/	/
	FFPE 5 级	/	/

表格8. RK20228 FFPE样本推荐循环数 (文库产量1 µg)

样本投入量 *		200 ng	200-30 ng	30-5 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

*, 注: 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 (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。

//3.3.2文库构建

//实验前准备

- 磁力架
- 80%乙醇
- 提前约30 min将AFTMag NGS DNA Clean Beads从4°C冰箱取出, 使其温度平衡至室温。使用前, 请旋涡振荡或充分颠倒以保证混匀。

(1) 机械打断+Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2操作流程



//机械打断

推荐使用Covaris Focused-ultrasonicator M220或Covaris其它型号打断仪, 具体操作详见供应商操作说明书, 打断到250 bp。FFPE样本分级属于4级、5级的样本, 因降解比较严重, 不需要进行打断可直接进行文库构建。

//末端修复

- ① 在无菌PCR管中准备如下反应体系:

表格9. 末端修复反应体系

试剂	体积
片段化的 DNA	X µL
End Prep Buffer II	7 µL
End Prep Enzymes	3 µL
Damaged DNA Repair Enzymes II*	3 µL
Nuclease-free Water	Up to 60 µL
总体积	60 µL

*, 注: End Prep Buffer II呈现黄色。

- ② 使用移液器上下吹打, 充分混匀。将PCR管放到PCR仪上, 反应程序见表10, PCR仪热盖设置为 75°C; 之后4°C 保存。

表格10. 末端修复反应程序

温度	时间
30°C	30 min
65°C	30 min
4°C	∞

//接头连接

① 准备如下反应体系:

表格11. 接头连接反应体系

试剂	体积
End Prep Reaction Mix	60 μ L
Ligation Buffer	30 μ L
ddH ₂ O	5 μ L
Ligation Enzymes II	10 μ L
Truncated Adapter	5 μ L
总体积	110 μ L

*. 注: ddH₂O、Ligation Buffer、Ligation Enzymes可配制预混液, 但Truncated Adapter需要单独添加。所有操作均于冰上进行。

② 将PCR管放置于PCR仪上, 反应程序为20°C、15 min, PCR仪不设热盖, 之后12°C保存。

③ DNA样本纯化

- 每个样本中加入88 μ L (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads, 混匀。
- 室温孵育5 min。
- 将PCR管于磁力架上静置2 min, 待溶液澄清后, 移除上清液(注意不要碰到磁珠)。
- 加入200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠, 孵育30 s后移除上清。
- 重复步骤d。
- 保持PCR管在磁力架上, 使用10 μ L移液器移除管底残留的乙醇, 打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 在21 μ L ddH₂O中重悬磁珠, 室温静置1 min, 使磁珠上的DNA充分释放。
- 将PCR管于磁力架上静置2 min, 转移20 μ L上清液至一个新PCR管中, 以便文库扩增。纯化后的接头连接产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

//文库扩增

① 配制如下PCR反应体系:

表格12. 文库扩增体系

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μ L
UDI Primer	5 μ L
总体积	50 μ L

② 移液器吹打混匀并瞬时离心。设置如下PCR扩增程序:

表格13. 文库扩增程序

文库	时间	Cycles
98°C	1 min	1
98°C	10 s	6-14
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

*. 注: 具体PCR循环数可参见相关表格6。

- 向扩增产物中加入50 μ L (1X) AFTMag NGS DNA Clean Beads, 混匀。
- 室温下孵育5 min。将样本于磁力架上静置2 min, 待溶液澄清后, 移除上清液(不要碰到磁珠)。
- 加入200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠, 孵育30 s后移除上清。重复一次。
- 保持PCR管在磁力架上, 用10 μ L移液器移除管底残留的乙醇, 打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 在31 μ L ddH₂O中重悬磁珠, 室温静置1 min, 使磁珠上的DNA充分释放。
- 将样本于磁力架上静置2 min, 转移30 μ L上清液至一个新PCR管中。
- 文库保存在-20°C, 以便于进行文库质量检测 and 上机测序。纯化后的PCR产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

(2) 打断酶+Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2操作流程

//DNA的片段化

FFPE样本分级属于4级、5级的样本，因降解比较严重，不需要进行打断可直接进行文库构建。

- 1 在无菌PCR管中准备如下反应体系：

表格14. 片段化反应体系

试剂	体积
模板 DNA(溶于 1X TE Buffer 中)	X μ L
DNA Frag Reaction Buffer	5 μ L
DNA Frag Enzyme Mix	5 μ L
1X TE Buffer	Up to 50 μ L
总体积	50 μ L

*，注：打断体系为 1X TE Buffer 体系，请勿换成超纯水体系，以免对片段化大小与文库峰型产生影响。

- 2 使用移液器上下吹打，充分混匀，或使用振荡器涡旋混匀。将PCR管放到PCR仪上，反应程序见表15，PCR仪热盖设置为 85°C；之后4°C 保存。

表格15. 片段化反应程序

温度	时间
32°C	10 min
75°C	10 min
4°C	∞

//末端修复

- 1 在无菌PCR管中准备如下反应体系：

表格16. 末端修复反应体系

试剂	体积
酶切片段化的 DNA	47 μ L
End Prep Buffer II	7 μ L
End Prep Enzymes	3 μ L
Damaged DNA Repair Enzymes II*	3 μ L
总体积	60 μ L

*，注：End Prep Buffer II呈现黄色。

- 2 使用移液器上下吹打，充分混匀。将PCR管放到PCR仪上，反应程序见表17，PCR仪热盖设置为 75°C；之后4°C 保存。

表格17. 末端修复反应程序

温度	时间
30°C	30 min
65°C	30 min
4°C	∞

//接头连接

- 1 准备如下反应体系：

表格18. 接头连接反应体系

试剂	体积
End Prep Reaction Mix	60 μ L
Ligation Buffer	30 μ L
ddH ₂ O	5 μ L
Ligation Enzymes II	10 μ L
Truncated Adapter	5 μ L
总体积	110 μ L

*，注：ddH₂O、Ligation Buffer、Ligation Enzymes可配制预混液，但Truncated Adapter需要单独添加。所有操作均于冰上进行。

- 将PCR管放置于PCR仪上，反应程序为20°C、15 min，PCR仪不设热盖，之后12°C保存。
- DNA样本纯化

- 每个样本中加入88 μL (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，混匀。
- 室温孵育5 min。
- 将PCR管于磁力架上静置2 min，待溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。
- 加入200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育30 s后移除上清。
- 重复步骤d。
- 保持PCR管在磁力架上，使用10 μL移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 在21 μL ddH₂O中重悬磁珠，室温静置1 min，使磁珠上的DNA充分释放。
- 将PCR管于磁力架上静置2 min，转移20 μL上清液至一个新PCR管中，以便文库扩增。纯化后的接头连接产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

//文库扩增

- 配制如下PCR反应体系：

表格19. 文库扩增体系

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μL
UDI Primer	5 μL
总体积	50 μL

- 移液器吹打混匀并瞬时离心。设置如下PCR扩增程序：

表格20. 文库扩增程序

温度	时间	Cycles
98°C	1 min	1
98°C	10 s	6-12
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

*, 注：具体PCR循环数可参见相关表格6。

- 向扩增产物中加入50 μL (1X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，混匀。室温下孵育5 min。
- 将样本于磁力架上静置2 min，待溶液澄清后，移除上清液（不要碰到磁珠）。
- 加入200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育30 s后移除上清。重复一次。
- 保持PCR管在磁力架上，用10 μL移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 在31 μL ddH₂O中重悬磁珠，室温静置1 min，使磁珠上的DNA充分释放。
- 将样本于磁力架上静置2 min，转移30 μL上清液至一个新PCR管中。
- 文库保存在-20°C，以便于进行文库质量检测和上机测序。纯化后的PCR产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

(3) FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina操作流程



//片段化与末端修复

FFPE样本分级属于4级、5级的样本，因降解比较严重，不需要进行打断可直接进行文库构建。

- 在置于冰上的无菌PCR管中准备如下反应体系：

表格21. 片段化与末端修复反应体系

试剂	体积
Input DNA	X μL
FS Fro Buffer I	5 μL
FS Pro Enzymes I	10 μL
1X TE Buffer	Up to 50 μL
总体积	50 μL

*, 注：推荐Input DNA溶解于1X TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)。配置体系时，FS Pro Enzymes I最后加入。

- 使用移液器上下吹打或震荡，保证体系充分混匀后，短暂进行离心。
- 立即将PCR管放到提前预热到32°C的PCR仪上，运行表22中反应程序，PCR仪热盖设置为75°C；温度降至4°C后，立即冰上进行下一步实验，不要在4°C Hold。

表格22. 片段化与末端修复反应程序

温度	时间
32°C	5 min
65°C	30 min
4°C	降至 4°C立即进行下一步

//接头连接

① 准备如下反应体系:

表格23. 接头连接反应体系

试剂	体积
End Prep Reaction Mix	50 μ L
Ligation Buffer	20 μ L
Ligation Enzymes	5 μ L
Truncated Adapter	5 μ L
总体积	80 μ L

* 注: ddH₂O、Ligation Buffer、Ligation Enzymes可配制预混液, 但Truncated Adapter需要单独添加。所有操作均于冰上进行。

- ② 将PCR管放置于PCR仪上, 反应程序为22°C、15 min, PCR仪不设热盖, 之后4°C保存(降至4°C立即进行下一步)。
- ③ DNA样本纯化。

- a每个样本中加入64 μ L (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads, 混匀。
- b 室温孵育5 min。
- c 将PCR管于磁力架上静置2 min, 待溶液澄清后, 移除上清液(注意不要碰到磁珠)。
- d 加入200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠, 孵育30 s后移除上清。
- e 重复步骤d。
- f 保持PCR管在磁力架上, 使用10 μ L移液器移除管底残留的乙醇, 干燥至无乙醇残留。
- g 在21 μ L ddH₂O中重悬磁珠, 室温静置1 min, 使磁珠上的DNA充分释放。
- h 将PCR管于磁力架上静置2 min, 转移20 μ L上清液至一个新PCR管中, 以便进行片段分选或文库扩增。

//文库扩增

① 配制如下PCR反应体系

表格24. 文库扩增体系

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μ L
UDI Primer	5 μ L
总体积	50 μ L

② 移液器吹打混匀并瞬时离心。设置如下PCR扩增程序:

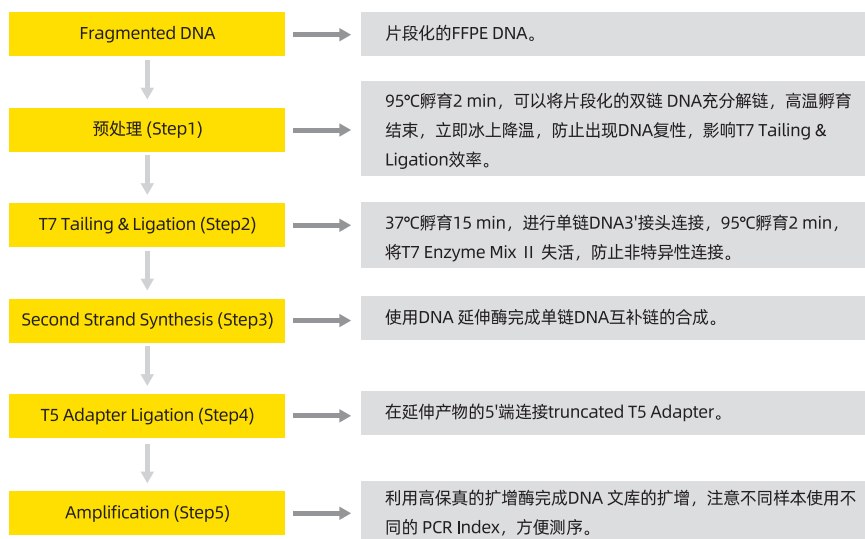
表格25. 文库扩增程序

温度	时间	Cycles
98°C	1 min	1
98°C	10 s	6-12
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

* 注: 具体PCR循环数可参见相关表格7。

- ③ 向扩增产物中加入50 μ L (1X) AFTMag NGS DNA Clean Beads, 混匀。室温下孵育5 min。
- ④ 将样本于磁力架上静置2 min, 待溶液澄清后, 移除上清液(注意不要碰到磁珠)。
- ⑤ 加入200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠, 孵育30 s后移除上清。重复一次。
- ⑥ 保持PCR管在磁力架上, 用10 μ L移液器移除管底残留的乙醇, 打开管盖干燥至无乙醇残留。
- ⑦ 在31 μ L ddH₂O中重悬磁珠, 室温静置1 min, 使磁珠上的DNA充分释放。
- ⑧ 将样本于磁力架上静置2 min, 转移30 μ L上清液至一个新PCR管中用于文库扩增。
- ⑨ 文库保存在-20°C, 以便于进行文库质量检测 and 上机测序。纯化后的PCR产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

(4) 机械打断+Scale ssDNA-seq Lib prep Kit for Illumina V2操作流程



Scale ssDNA-seq Lib prep Kit for Illumina V2建库流程

//机械打断

推荐使用Covaris Focused-ultrasonicator M220或Covaris其它型号打断仪, 具体操作详见供应商操作说明书, 打断到250 bp。FFPE样本分级属于4级、5级的样本, 因降解比较严重, 不需要进行打断可直接进行文库构建。

//DNA模板预处理

热循环仪 (PCR 仪) 提前置于95°C, 热盖温度设定为105°C, 配制T7 Tailing & Ligation 预混液, 冰上放置待用。

- 1 取片段化DNA 放在 0.2 mL 的 PCR 管中, 加入 Low-EDTA TE 稀释到总体积为 30.5 μ L。
- 2 待 PCR 仪器稳定到 95°C后, 将 PCR 管放入PCR 仪中, 进行 95°C孵育 2 min 后, 立即将 PCR 管置于冰上进行冷却, 静置 2 min。

//T7 Tailing & Ligation

- 1 热循环仪 (PCR 仪) 提前置于 37°C, 热盖温度 105°C。按照下面表配制 T7 Tailing & Ligation 预混液, 需要在预处理前配制好, 冰上放置时间最好不要超过 20 min。

表格26. T7 Tailing & Ligation 体系

试剂	体积
T7 Buffer	4 μ L
T7 Adapter	2.5 μ L
T7 Enzyme Mix II	3 μ L
Total	9.5 μ L

- 2 取9.5 μ L T7 Tailing & Ligation预混液加入到冰上放置的预处理 DNA 样本PCR 管中, 使用移液器进行吹打混匀, 然后瞬时离心使得反应液至管底。
- 3 将 PCR 管置于 PCR 仪 (热盖 105°C) 中, 进行 T7 Tailing & Ligation。

表格27. T7 Tailing & Ligation程序

温度	时间
37°C	15 min
95°C	2 min
4°C	Hold

//Second Strand Synthesis Reaction

- 1 热循环仪 (PCR 仪) 提前置于 98°C, 热盖 105°C。按照下表体系配置 Second Strand Synthesis Reaction 预混液。

表格28. Second Strand Synthesis体系

试剂	体积
2X Synthesis Mix	43 μ L
Synthesis Reagent	3 μ L
总体积	46 μ L

- 2 取46 μ L Second Strand Synthesis Reaction 预混液加入到 T7 Tailing & Ligated mix中, 使用移液器进行吹打混匀, 然后瞬时离心使得反应液至管底。
- 3 将 PCR 管置于 PCR 仪 (热盖 105°C) 中, 进行二链合成反应:

表格29. Second Strand Synthesis程序

温度	时间
98°C	1 min
60°C	2 min
68°C	5 min
4°C	Hold

- 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C 取出，室温静置平衡 30 min，使用前涡旋或者震荡混匀。
- 待 Second Strand Synthesis Reaction 结束后，在产物中加入 105 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.2X)，吹打混匀。
- 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 ~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。
- 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇静置 30 s，弃除全部上清。
- 重复④，将磁珠用 80% 乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干。
- 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，将 PCR 管移出磁力架，加入 21 μL Low-EDTA TE，吹打混匀，然后室温静置 2 min。

注：若投入 FFPE 样品 DNA 量少于 10 ng，建议采用 50 μL Low-EDTA TE 洗脱，再使用 1.2X 磁珠（60 μL 磁珠）进行再次纯化，最后使用 21 μL Low-EDTA TE 洗脱进行下面步骤。此步骤可以显著减少在有效模板过低的情况下导致的文库中存在接头二聚体情况。

- 将 PCR 管放置到磁力架上室温静置，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清液至另一新的 PCR 管中备用。

//T5 Adapter Ligation

- 按照下面表格配制 T5 Adapter Ligation 反应体系，依次加入如下组分，使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表格30. T5 Adapter Ligation体系

试剂	体积
Double Stranded DNA	20 μL
Low-EDTA TE	4 μL
T5 Buffer II *	8 μL
T5 Adapter II *	5 μL
Ligase Mix*	3 μL
Total	40 μL

*，注：可以提前配制 T5 Buffer II 和 T5 Adapter II 的预混液，切不可将 T5 Buffer II、T5 Adapter II 和 Ligase Mix 预混，以免出现接头自连反应。

- 将 PCR 管置于 PCR 仪（热盖加热功能关闭，或者热盖不要合上）中，进行连接反应。

表格31. T5 Adapter Ligation程序

温度	时间
25°C	15 min
4°C	Hold

- 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C 取出，室温静置平衡 30 min，使用前涡旋或者震荡混匀。
- 连接反应结束后，加入 40 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X) 到连接产物中，吹打混匀。
- 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。
- 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。
- 重复④，将磁珠用 80% 乙醇再次清洗一次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干。
- 干燥磁珠 2-3 min，将 PCR 管移出磁力架，加入 21 μL Low-EDTA TE，吹打混匀，然后室温静置 2 min。
- 将 PCR 管放置到磁力架上，室温静置直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清液至另一新的 PCR 管中备用。

//文库扩增

- 按照下表配制 PCR 反应体系：

表格32. PCR 反应体系

试剂	体积
纯化后的连接产物	20 μL
2X PCR Master Mix	25 μL
UDI Primer	5 μL
Total	50 μL

- 使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底，放置到 PCR 仪中。按照如下程序进行 PCR 反应：

表格33. PCR 反应程序

温度	时间	Cycles
98°C	45 s	1
98°C	15 s	9-16
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	1

*，注：具体PCR循环数可参见相关表格8。

- 3 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，室温静置平衡30 min，使用前涡旋或者震荡混匀。
- 4 反应结束后，加入 50 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X) 到 PCR 反应产物，吹打混匀。
- 5 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。
- 6 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。
- 7 重复⑥，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干。
- 8 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入 21 μL Low-EDTA TE，吹打混匀。
- 9 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20μL 文库至另一新的离心管中，-20°C 保存或用于后续测序分析。纯化后的PCR产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

(5) 打断酶+Scale ssDNA-seq Lib prep Kit for Illumina V2操作流程

//DNA的片段化

FFPE样本分级属于4级、5级的样本，因降解比较严重，不需要进行打断可直接进行文库构建。

- 1 在无菌PCR管中准备如下反应体系：

表格34. 片段化反应体系

试剂	体积
模板 DNA(溶于 1X TE Buffer 中)	X μL
DNA Frag Reaction Buffer	3 μL
DNA Frag Enzyme Mix	3 μL
1X TE Buffer	Up to 30 μL
总体积	30 μL

*，注：打断体系为1X TE Buffer体系，请勿换成超纯水体系，以免对片段化大小与文库峰型产生影响。

- 2 使用移液器上下吹打，充分混匀,或使用振荡器涡旋混匀。将PCR管放到PCR仪上，反应程序见表35，PCR仪热盖设置为 85°C；之后4°C 保存。

表格35. 片段化反应程序

温度	时间
32°C	10 min
75°C	10 min
4°C	∞

//DNA模板预处理

- 1 热循环仪（PCR 仪）提前置于95°C，热盖温度设定为105°C，配制T7 Tailing & Ligation 预混液，冰上放置待用。
- 2 取片段化DNA 放在 0.2 mL 的 PCR 管中，加入 ddH₂O 稀释到总体积为 30.5 μL。
- 3 待 PCR 仪器稳定到 95°C后，将 PCR 管放入PCR 仪中，进行 95°C孵育 2 min 后，立即将 PCR 管置于冰上进行冷却，静置 2 min。

//T7 Tailing & Ligation

- 1 热循环仪（PCR 仪）提前置于 37°C，热盖温度 105°C。按照下面表配制 T7 Tailing & Ligation 预混液，需要在预处理前配制好，冰上放置时间最好不要超过 20 min。

表格36. T7 Tailing & Ligation 体系

试剂	体积
T7 Buffer	4 μL
T7 Adapter	2.5 μL
T7 Enzyme Mix II	3 μL
Total	9.5 μL

- 2 取25 μL T7 Tailing & Ligation预混液加入到冰上放置的预处理 DNA 样本PCR 管中，使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。
- 3 将 PCR 管置于 PCR 仪（热盖 105°C）中，进行 T7 Tailing & Ligation。

表格37. T7 Tailing & Ligation程序

温度	时间
37°C	15 min
95°C	2 min
4°C	Hold

//Second Strand Synthesis Reaction

- 热循环仪 (PCR 仪) 提前置于 98°C, 热盖 105°C。按照下表体系配置 Second Strand Synthesis Reaction 预混液。

表格38. Second Strand Synthesis体系

试剂	体积
2X Synthesis Mix	43 μ L
Synthesis Reagent	3 μ L
总体积	46 μ L

- 取46 μ L Second Strand Synthesis Reaction 预混液加入到 T7 Tailing & Ligated mix中, 移液器吹打混匀, 瞬时离心反应液至管底;
- 将 PCR 管置于 PCR 仪 (热盖 105°C) 中, 进行二链合成反应。

表格39. Second Strand Synthesis程序

温度	时间
98°C	1 min
60°C	2 min
68°C	5 min
4°C	Hold

- 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads从2-8°C取出, 室温静置平衡30 min, 使用前涡旋或者震荡混匀。
- 待Second Strand Synthesis Reaction结束后, 在产物中加入105 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.2X), 吹打混匀。
- 室温静置5 min, 然后转移至磁力架上5 min, 直至溶液变澄清, 小心弃除上清。
- 将离心管保持在磁力架上, 加入200 μ L 80%乙醇静置 30 s, 弃除全部上清。重复一次, 将磁珠用 80%乙醇再洗 1次, 用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。
- 干燥磁珠2-3 min, 待酒精挥发完全后, 将PCR管移出磁力架, 加入21 μ L ddH₂O, 吹打混匀, 然后室温静置 2 min。

注: 若投入FFPE样品DNA量少于10 ng, 建议采用50 μ L ddH₂O洗脱, 再使用1.2X磁珠 (60 μ L磁珠) 进行再次纯化 (重复步骤7.4.5-7.4.9), 最后使用21 μ L ddH₂O洗脱进行下面步骤。此步骤可以显著减少在有效模板过低的情况下导致的文库中存在接头二聚体情况。

- 将PCR 管放置到磁力架上室温静置, 直到溶液变澄清, 小心吸取20 μ L上清液至另一新的 PCR 管中备用。

//T5 Adapter Ligation

- 按照下面表格配制 T5 Adapter Ligation 反应体系, 依次加入如下组分, 使用移液器进行吹打混匀, 然后瞬时离心使得反应液至管底。

表格40. T5 Adapter Ligation体系

试剂	体积
Double Stranded DNA	20 μ L
LOW-EPTA TE	4 μ L
T5 Buffer II *	8 μ L
T5 Adapter II *	5 μ L
Ligase Mix*	3 μ L
Total	40 μ L

*, 注: 可以提前配制 T5 Buffer II 和 T5 Adapter II 的预混液, 切不可将 T5 Buffer II、T5 Adapter II 和 Ligase Mix 预混, 以免出现接头自连反应。

- 将 PCR 管置于 PCR 仪 (热盖加热功能关闭, 或者热盖不要合上) 中, 进行连接反应。

表格41. T5 Adapter Ligation程序

温度	时间
25°C	15 min
4°C	Hold

- 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出, 室温静置平衡30 min, 使用前涡旋或者震荡混匀。
- 连接反应结束后, 加入 40 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X)到连接产物中, 吹打混匀。
- 室温静置 5 min, 然后转移至磁力架上5 min, 直至溶液变澄清, 小心弃除上清。
- 将离心管保持在磁力架上, 加入 200 μ L 80%乙醇, 静置 30 s, 弃全部上清。重复一次。将磁珠用80%乙醇再次清洗一次, 用 10 μ L枪头将残留液体彻底吸干。
- 干燥磁珠 2-3 min, 将 PCR 管移出磁力架, 加入21 μ L ddH₂O, 吹打混匀, 然后室温静置 2 min。
- 将PCR 管放置到磁力架上, 室温静置直到溶液变澄清, 小心吸取 20 μ L 上清液至另一新的PCR 管中备用。

//文库扩增

- ① 按照下表配制PCR 反应体系：

表格42. PCR 反应体系

试剂	体积
纯化后的连接产物	20 μ L
2X PCR Master Mix	25 μ L
UDI Primer	5 μ L
Total	50 μ L

- ② 使用移液器进行吹打混匀，瞬时离心使得反应液至管底，放置到 PCR 仪中。按照如下程序进行 PCR 反应。

表格43. PCR 反应程序

温度	时间	Cycles
98°C	45 s	1
98°C	15 s	9-16
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	1

*, 注：具体PCR循环数可参见相关表格8。

- ③ 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，室温静置平衡30 min，使用前涡旋或者震荡混匀。
 ④ 反应结束后，加入 50 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X) 到 PCR 反应产物，吹打混匀。
 ⑤ 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。
 ⑥ 将离心管保持在磁力架上，加入200 μ L 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。
 ⑦ 重复⑥，将磁珠用 80%乙醇再洗1次，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。
 ⑧ 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入21 μ L ddH₂O，吹打混匀。
 ⑨ 室温静置 2 min，磁力架上1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μ L 文库至另一新的离心管中，-20°C保存或用于后续测序分析。纯化后的PCR产物可以暂时放置在4°C/-20°C保存1-2周左右。

3.4 FFPE样本文库的杂交捕获

//产品概述

ABclonal杂交捕获体系提供了可以适用于Illumina高通量测序平台的杂交捕获试剂，其中包括磁珠洗脱试剂，杂交缓冲液试剂，捕获缓冲液试剂，洗脱缓冲液试剂 (Hybridization and Wash Kit, BK0003)，通用Blocker封闭试剂 (ILM Universal Blockers-X1, BM0010)，磁珠 (Streptavidin Beads, BM0011)，人基因组重复序列封闭试剂 (Human Cot DNA, BM0009)，2X HiFi PCR Mix(Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS, RM20386)，10X PCR Primers (RM20205)等。

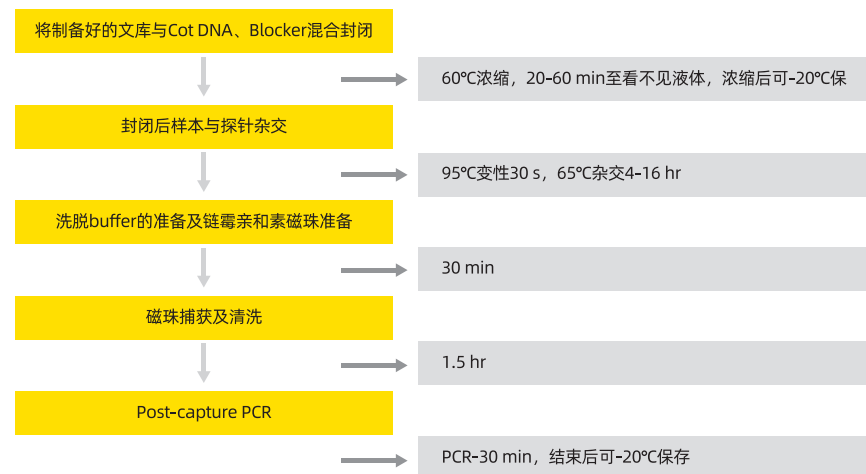
//产品保存

运输与保存：ABclonal杂交捕获试剂盒必须保存在-25~-15°C条件下。如果保存条件合理，在有效期内试剂盒的试剂组分能够保持完整活性。该试剂盒对温度比较敏感，长途运输尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式。请不要尝试采用冰袋进行长途运输。

产品操作：使用前，尽量保证所有试剂溶液完全融解，无沉淀，瞬时离心至管底部。其中10X High Stringency Buffer、10X Low Stringency Buffer在室温溶解依然不会出现澄清，此时可以65°C进行水浴至澄清后再稀释至1X使用。此外2X Hybridization Buffer再使用前如果发现结晶析出应在65°C水浴锅中水浴至完全溶解。产品组分使用后，请尽快放置于-25~-15°C条件下进行保存。

产品质量控：试剂盒组分经过了严格的质量控制，主要包括组分污染测试、功能性试验验证、应用场景测试和产品批次稳定性测试等工序。

//流程图



//操作步骤

该操作步骤主要包括将制备好的文库与Cot DNA、Blocker混合封闭、封闭后样本与探针杂交、洗脱buffer的准备及链霉亲和素磁珠准备、磁珠捕获及清洗、Post-capture PCR。

//制备好的文库与Cot DNA、Blocker混合封闭

- 1 将Blocker与Human Cot DNA放置室温溶解，旋涡振荡混匀并离心，置于冰上备用。
- 2 取一个新的1.5 mL管中按照表格44加入组分：

表格44. 封闭反应体系配制

Component	Volume (μL) Per Reaction
DNA library	500 ng DNA Library
Human Cot DNA	5 μL
ILM Universal Blockers-X1	2 μL

*，注：如果多个文库杂交，请每个子文库取500 ng进行混合。

- 3 涡旋振荡混匀，瞬时离心至管底部。用真空浓缩仪在60°C条件下进行浓缩，至看不见液体为止。浓缩好的混合物可以暂时放置在4°C过夜或者-20°C保存1-2周左右。

//封闭后样本与探针杂交

- 1 将ABclonal Hybridization and Wash Kit置于室温融化。
注：如果2X Hybridization Buffer中有结晶析出，置于65°C温浴 10-30 min后，立即摇匀至溶液澄清。
- 2 对于浓缩后的混合物，按照下表加入其它组分：

表格45. 杂交反应体系配制

Component	Volume (μL) Per Reaction
2X Hybridization Buffer	8.5
Hybridization Buffer Enhancer	2.7
Capture Probes	2
Nuclease-Free Water	3.8
Total Volume	17

- 3 用移液枪吹打数次混匀后，室温孵育5-10 min。轻轻旋涡混匀后，短暂离心。
- 4 将1.5 mL管中液体转移至0.2 mL PCR 管中并短暂离心将液体离至管底。盖紧管盖，立即放入事先准备的PCR仪中，保持100°C热盖，按照下表程序进行反应：

表格46. 杂交反应程序

Temperature	Reaction time
95°C	30 sec
65°C	4-16 h
65°C	Hold

//洗脱buffer的准备及链霉亲和素磁珠准备

准备洗脱buffer

- 1 按照下表配制1X working solutions（单个反应）：

表格47. 1X Working Buffer配制表

Component	Concentrated buffer(μL)	Nuclease-Free Water(μL)	Total(μL)
2X Bead Washing Buffer	160	160	320
10X Low stringency Buffer	28	252	280
10X High stringency Buffer	32	288	320
10X Washing Buffer I	16	144	160
10X Washing Buffer II	16	144	160

*，注：配制好的1X Working Buffer可以室温放置保存1个月。

- 2 按照下表体积对稀释后的1X Low Stringency Buffer和1X High Stringency Buffer进行预热（单个反应）：

表格48. 1X杂交Buffer预热条件表

Component	Volumes(μL)	Temperature
Low stringency Buffer	110	65°C
High stringency Buffer	320	65°C

*，注：需要预热的Buffer至少预热1-2 h后使用。

链霉亲和素磁珠准备

- 1 先将链霉亲和素磁珠4°C取出放置室温孵育至少30min。
- 2 旋涡振荡磁珠15 s使其完全悬浮起来。
- 3 对于每个杂交反应，取50 μL Streptavidin Beads于0.2 mL PCR管中。
- 4 将PCR管置于磁力架上1 min，至溶液澄清后吸除上清。
- 5 将PCR管从磁力架上取出，加入100 μL 1X Bead Washing Buffer，旋涡振荡30 s。
- 6 再次将PCR管置于磁力架上1 min，至溶液澄清后吸除上清。
- 7 重复步骤⑤和⑥两遍（少量的Buffer残留不会影响文库与Beads结合）。

注：本步骤中磁珠无需室温晾干，直接进行下一步骤即可。

- 8 在每个杂交反应的磁珠中，加入按照下表组分配制的磁珠重悬液：

表格49. 磁珠重悬液配制表

Component	Volume (μL) Per Reaction
2X Hybridization Buffer	8.5
Hybridization Buffer Enhancer	2.7
Nuclease-Free Water	5.8
Total Volume	17

- 9 轻轻振荡10 s进行混匀，瞬间离心，即磁珠混合液。

//磁珠捕获及洗脱

磁珠捕获

- 1 保持杂交混合液处于65°C，将磁珠混合液加入杂交混合液中，轻轻旋涡振荡混匀，瞬间离心。
- 2 将PCR管置于预先设置好的PCR仪上，65°C孵育45 min（热盖75°C），每10-12 min取出PCR管轻轻振荡混匀，防止磁珠沉降，注意每次取出振荡混匀时迅速，尽量避免温度降低，保持在65°C。

热洗脱

- 1 PCR管中取出后应立即加入100 μL预热的1X Low Stringency Buffer，轻轻振荡混匀，防止气泡产生。
- 2 短暂离心，放置于磁力架上2 min，至溶液澄清去除上清。
- 3 将PCR管移除磁力架，加入150 μL预热的1X High Stringency Buffer，轻轻振荡混匀，防止气泡产生。
- 4 将PCR管中置于65°C孵育5 min。
- 5 短暂离心，将PCR管置于磁力架上2 min，至溶液澄清后去除上清。重复步骤③-⑤一次。

注：热洗脱步骤对温度要求较严格，每次操作尽量避免温度降低，保持在65°C。

室温洗脱

- 1 加入150 μL 室温的1X Low Stringency Buffer，轻轻振荡混匀。
 - 2 室温孵育2 min，每隔30 s，混匀一次。
 - 3 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上1 min，至溶液澄清后吸除上清。
 - 4 将PCR管移除磁力架，加入150 μL 室温的1X Washing Buffer I，轻轻振荡混匀。
 - 5 室温孵育2 min，每隔30 s，混匀一次。
 - 6 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上1 min，至溶液澄清后吸除上清。
 - 7 将PCR管移除磁力架，加入150 μL 室温的1X Washing Buffer II，轻轻振荡混匀。
 - 8 室温孵育2 min，每隔30 s，混匀一次。
 - 9 孵育结束后，短暂离心并置于磁力架上1 min，至溶液澄清后吸除上清。
- 注：本步骤中磁珠无需室温晾干，直接进行下一步骤即可。
- 10 加入20 μL Nuclease-Free Water，用移液枪上下吹打数次，将磁珠完全重悬。

//Post-Capture PCR

- 1 按照下表配制扩增体系：

表格50. 杂交后PCR扩增体系

组分	体积
Library-bounded beads	20 μL
10X PCR Primers	1.25 μL
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μL
总反应体积	50 μL

- 2 涡旋振荡，瞬时离心至管底部。然后，立即进行PCR反应程序，如下表所示：

表格51. 杂交后PCR扩增程序

温度	时间	循环数
98°C	45 s	1
98°C	15 s	Variable*
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	1

*，注：PCR的循环数要根据文库杂交个数以及杂交探针的大小来定。如要过夜杂交16 h，PCR的循环数相应杂交4 h时的循环数降低一个循环数。

表格52. 杂交后PCR扩增循环数选择指南

Probe Panel size	1-plex	4-plex	8-plex	12-plex
>100,000 probes	10cycles	8cycles	7cycles	6cycles
10,000-100,000 probes	12cycles	10cycles	9cycles	8cycles
500-10,000 probes	13cycles	11cycles	10cycles	10cycles
1-500 probes	14cycles	12cycles	11cycles	11cycles

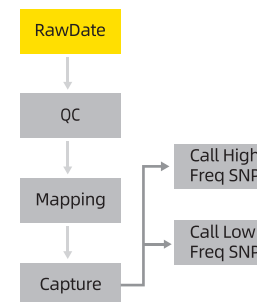
- ③ PCR反应结束后，直接进行产物纯化。
- ④ 在每个样本管中加75 μL （1.5倍体积）的AFTMag NGS DNA Clean Beads磁珠，用移液器吹打或者振荡充分混匀。
- ⑤ 放置在室温下孵育5 min后，转移到磁力架上室温孵育2 min左右。
- ⑥ 待溶液澄清后，小心吸走并丢弃上清，千万不要吸走或触碰到磁珠。
- ⑦ 使用125 μL 80%乙醇漂洗磁珠30 s，然后小心吸走并丢弃乙醇，千万不要吸走或触碰到磁珠。重复一次。
- ⑧ 将磁珠在室温下晾干5 min至磁珠表面不反光即可（磁珠不要过度干燥）。
- ⑨ 移走磁力架，在每个样本管中加入21 μL 超纯水重悬磁珠，用移液器吹打或者振荡充分混匀，室温孵育1 min。
- ⑩ 再将每个样品管放置在磁力架上室温下孵育2 min，至溶液澄清。
- ⑪ 小心吸走20 μL 上清液，并转移到一个新的PCR管。纯化后的PCR产物可以暂时放置在4 $^{\circ}\text{C}$ / -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存1-2周左右。

//捕获文库质检

- ① 对捕获后的文库进行定量，记录浓度，计算总量。推荐使用Qubit荧光定量仪或qPCR。
- ② 使用Agilent 2100分析仪对捕获后的文库进行峰型质检和平均大小的计算。质检后的文库可进行上机测序或置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.5 生信分析

//生信分析操作流程



//原始数据质检 (QC)

使用fastp软件对于下机的原始数据进行QC，过滤掉影响后续分析的低质量数据。
`fastp -i R1.fq.gz -l R2.fq.gz -o R1.clean.fq.gz -O R2.clean.fq.gz -h Sample.html -j Sample.json`
 fastp软件执行结束后，统计Sample.json中记录的质检信息。

//数据比对 (Mapping)

使用bwa软件对于质检后的数据进行比对。
`bwa mem -t 16 -M -R "@RG\tID:Sample\tPL:illumina\tLB:1\tSM:Sample" Ref R1 R2 | samtools view -Sb -> Sample.raw.bam && samtools sort -n -o Sample.nsort.bam Sample.raw.bam && samtools fixmate -m Sample.nsort.bam Sample.fixmate.bam && samtools sort -o Sample.bam Sample.fixmate.bam && samtools rmdup Sample.bam Sample.rmdup.bam && samtools index Sample.bam && samtools index Sample.rmdup.bam`
 其中Sample.bam为排序过后的原始比对文件，Sample.rmdup.bam为在Sample.bam的基础上去除duplication的比对文件。

//捕获数据统计 (Capture)

使用bamdst软件对于比对后的数据进行捕获统计。
`bamdst Sample.rmdup.bam -p panel.bed -o OUTDIR`
 自写脚本统计捕获效率。

//高频突变 (Call High Freq SNP)

使用GATK检测遗传性突变 (即高频突变)。

```
gatk HaplotypeCaller --emit-ref-confidence GVCF --output OUTDIR/Sample.g.vcf --input Sample.rmdup.bam  
--reference Ref --intervals panel.bed  
gatk CombineGVCFs --reference Ref --output all.g.vcf -V sample1.g.vcf -V sample2.g.vcf  
gatk GenotypeGVCFs --reference Ref --output all.vcf --variant all.g.vcf
```

//低频突变 (Call Low Freq SNP)

使用Varscan检测体细胞突变 (即低频突变)。

```
samtools mpileup -q 1 -d 30000 -f Ref -l panel.bed Sample.rmdup.bam 1>Sample.mpileup 2>>Sample.mp.log  
&& varscan mpileup2snp $mpileup --min-var-freq 0.0001 --p-value 1 --min-reads2 1 --strand-filter 0  
--output-vcf 1 > Sample.varscan.vcf  
编写脚本统计相应信息。
```