|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

1. 相關試劑: 操作人員/日期:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 試劑名稱 | Lot No. | Exp. Date |
| Nextera XT Index Primer 1 (N7 series) |  |  |
| Nextera XT Index Primer 2 (S5 series) |  |  |
| 2 KAPA HiFi HotStart ReadyMix |  |  |
| AMPure XP 磁珠 |  |  |

1. 將癌症單基因Amplicon作業之PCR產物，依照等比例(1:1)取出混和均勻，其最終體積為9 mL。
2. 於-20℃冰箱取出Nextera XT Index Primer 1與 Primer 2 置於冰上回溫。

|  |  |
| --- | --- |
| Components | Volume (L) |
| Amplicon PCR pooling product | 9 |
| Nextera XT Index Primer 1 (N7 ) | 3 |
| Nextera XT Index Primer 2 (S5 ) | 3 |
| 2 KAPA HiFi HotStart ReadyMix | 15 |
| Total Volume | 30 |

1. 開啟ABI veriti 96 well thermal cycler(編號: )儀器電源。選擇PCR程序名稱為「16S Index PCR」，確認PCR條件是否如下表所示：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Step | | 溫度(℃) | 時間 | Cycle |
| Step 1 | Pre-denaturation | 95 | 3分 | 1 |
| Step 2 | Denaturation | 95 | 30秒 | 8 |
| Primer Annealing | 55 | 30秒 |
| Elongation | 72 | 30秒 |
| Step 3 | Extension | 72 | 5分 | 1 |
| Preservation | 4 | ∞ |

1. 接著將混和好的檢體放置於PCR儀器中，確定蓋子蓋緊後，點選「start」開始PCR程序，使用時間 : ，共 小時。
2. 於4℃冷藏冰箱中取出AMPure XP 磁珠並震盪30秒，確定磁珠均勻的散開。
3. 接著將第二階段PCR產物(Index PCR產物)中，每管加入33.6L的磁珠，使用微量吸管緩慢的上下重覆混和10次左右。
4. 於室溫下靜置5分鐘後，接著放置於磁座上靜置2分鐘，直到上清液呈現清澈狀。
5. 移除上清液，加入200L 新鮮配製的80%酒精清洗並靜置於磁座30秒。
6. 小心移除上清液，重覆以80%酒精清洗並靜置於磁座30秒。
7. 使用P20 pipette tips 移除剩餘的酒精。
8. 將Index PCR產物連同磁座放置於生物安全操作台中，依照「生物安全操作台作業標準書FA01-024」開啟風扇，打開管蓋風乾10分鐘，確保酒精完全揮發乾淨。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

1. 將Index PCR產物tube放置於一般微量離心管架子中，加入28L 10 mM Tris pH 8.5到Index PCR產物tube中，並使用微量吸管均勻的上下混合10次。
2. 於室溫下靜置2分鐘，接著放置於磁座上靜置2分鐘，直到上清液呈現清澈狀。
3. 小心的吸取25L到新的1.5mL微量離心管中，並標示檢體編號，到此步驟Library檢體已製備完成。
4. 依照「毛細管電泳分析儀Qsep100作業標準書FA01-007」開啟儀器電源，並進行毛細管電泳作業，以確認所製備的Library size: bp.
5. 依照「Qubit螢光定量儀作業標準書FA01-034」定量每管Library濃度: ng/μL。