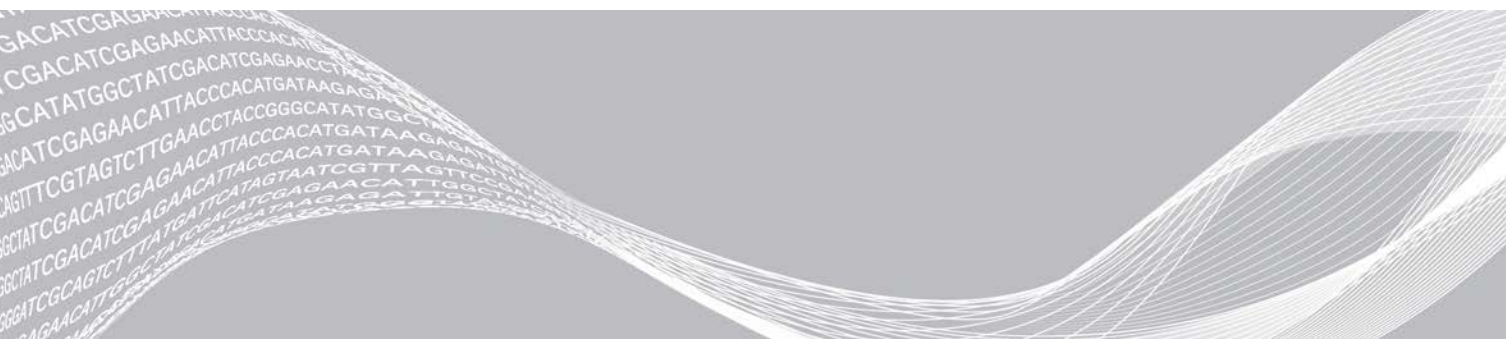


Nextera XT DNA 文库制备试剂盒

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、HiSeq、MiSeq、Nextera、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。

修订历史记录

| 文档 | 日期 | 更改描述 |
|------------------|---------------|--|
| 文档号 15031942 v02 | 2017 年 4 月 | <p>添加了以下信息：</p> <ul style="list-style-type: none"> 支持小于 5 兆碱基的基因组。 表示存在污染物的吸收率。 针对 PCR 扩增子的建议。 针对 $\geq 2 \times 250$ 次循环的运行的 AMPure XP 微珠建议。 标记和扩增步骤后，PCR 板中的试剂和文库量。 5 毫升装的 Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics, 货号 A63880)。 TruSeq 双标签测序引物试剂盒 (Illumina 商品目录号 PE-121-1003 和 FC-121-1003)。 <p>在其他资源列表中添加了以下技术说明：</p> <ul style="list-style-type: none"> 《在 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒中进行标准和基于微珠的标准化最佳实践》(出版编号 470-2016-007) 《Nextera XT 文库制备：提示和故障诊断》(出版编号 770-2015-015) <p>合并了混合文库程序中的步骤。</p> <p>将 NaOH 耗材标识为分子生物学级。</p> <p>指定使用分子级用水或 10 毫摩尔/升 Tris-HCl (pH 为 7.5-8.5) 稀释原料，以进行 DNA 质量评估。</p> <p>指定标记完成时应立即继续，以便在转座体处于活动状态时进行中和。</p> <p>指定 NPM (Nextera PCR 预先混合液) 的解冻时间为 20 分钟。</p> <p>更新了标准化文库程序，以适用各种样品数量，而非仅适用于 96 个样品。</p> <p>将 TCY 板更新为了带裙边的硬壳 96 孔 PCR 板。</p> <p>将磁力架供应商更新为了 Thermo Fisher Scientific。</p> <p>更正了简介中提供的 Nextera 试剂盒的商品目录号。</p> <p>更正了显示 Nextera 实验分析方法工作原理的图示。</p> |
| 文档号 15031942 v01 | 2016 年 1 月 | <p>更新了工作流程图的设计。</p> <p>对一些程序进行重命名及合并，以提高连贯性。</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，并添加了针对定制操作流程选择器的参考。</p> <p>解释了针对非扩增子应用的 AMPure XP 微珠建议。请参见“纯化文库”。</p> <p>添加了对低产量文库进行标准化的相关信息。请参见“标准化文库”。</p> <p>更正了实验分析方法图上的标签接头标记。</p> |
| 15031942 修订版 E | 2015 年 1 月 | <p>更正了 Nextera XT DNA 文库制备标签试剂盒 v2 套装 A (FC-131-2001) 的试剂盒内含物，现包含标签 N715。</p> |

| 文档 | 日期 | 更改描述 |
|----------------|-------------|---|
| 15031942 修订版 D | 2014 年 9 月 | <p>添加了新标签试剂盒的信息，使用该试剂盒可以制备多达 384 个双末端标签文库。</p> <p>更新了针对稀释原料的 DNA 输入建议和标记不完整的可能结果。</p> <p>添加了新的 Nextera XT 质量指标，以及有关如何对簇密度波动问题进行故障诊断的新信息。</p> <p>删除了“双标签原则”和“低重混合指南”部分。此信息可在 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒支持页面的“Nextera 低重混合指南技术说明”中找到。</p> <p>针对 v3 化学反应更新了对 MiSeq 上片段长度的参考。</p> <p>添加了在以下情况下对备用吸头的说明：在文库标准化的过程中转移 LNB1 微珠时，处理的样品少于 24 个。</p> <p>将浓度为 1 摩尔/升、pH > 12.5 的 NaOH 作为用户自备耗材添加到了耗材和设备列表中。</p> <p>从耗材和设备列表中删除了 Tween 20。操作流程中未使用该耗材。</p> |
| 15031942 修订版 C | 2012 年 10 月 | <p>在 PCR 纯化中添加了针对 MiSeq 上 2x300 运行的修改。</p> <p>添加了有关 HiSeq、HiScanSQ 和 GAIIx 上的簇生成样品这一新部分。请参见“适用于 HiSeq、HiScanSQ 和 GAIIx 的簇生成样品”。</p> <p>双标签原则部分列出了针对 Nextera XT 标签试剂盒的错误商品目录号。现已列出正确的商品目录号。</p> <p>特别强调了在将 NT（中和标记缓冲液）和 LNS1（文库标准化存储缓冲液 1）试剂用于操作流程之前，务必将它们置于室温下。</p> <p>从用户自备耗材表格中删除了对 10 毫摩尔/升 Tris-Cl（pH8.5，含 0.1% Tween 20）的引用，因为本次文库制备不会用到该耗材。</p> |
| 15031942 修订版 B | 2012 年 7 月 | <p>特别强调了在将 NT（中和标记缓冲液）和 LNS1（文库标准化存储缓冲液 1）试剂用于操作流程之前，务必将它们置于室温下。</p> <p>从用户自备耗材表格中删除了对 10 毫摩尔/升 Tris-Cl（pH8.5，含 0.1% Tween 20）的引用，因为本次文库制备不会用到该耗材。</p> |
| 15031942 修订版 A | 2012 年 5 月 | 最初版本。 |

目录

| | |
|----------------------------|-----------|
| 第 1 章概述 | 1 |
| 简介 | 1 |
| DNA 输入建议 | 1 |
| 更多资源 | 2 |
| 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 |
| 标记基因组 DNA | 6 |
| 扩增文库 | 7 |
| 纯化文库 | 9 |
| 检查文库 | 11 |
| 标准化文库 | 11 |
| 混合文库 | 13 |
| 附录 A 支持信息 | 14 |
| 简介 | 14 |
| Nextera XT 实验分析方法的工作原理是什么？ | 14 |
| Nextera XT 质量指标 | 15 |
| 缩写 | 15 |
| Nextera XT DNA 文库制备试剂盒 | 16 |
| 耗材和设备 | 19 |
| 技术协助 | 21 |

第 1 章概述

| | |
|----------------|---|
| 简介 | 1 |
| DNA 输入建议 | 1 |
| 更多资源 | 2 |

简介

本操作流程介绍了如何基于 DNA 制备多达 384 个双末端标签文库，以便后续在 Illumina® 测序系统上进行测序。Nextera® XT 文库制备试剂盒和 Nextera XT 标签试剂盒中提供的试剂用于片段化 DNA 并将接头序列添加到 DNA 模板中。

该试剂盒具备以下功能：

- ▶ 使用标记（一种单酶反应），可在短短 5 分钟之内片段化 DNA 并添加部分接头序列。
- ▶ 采用预先混合液试剂，可减少所需的试剂容器、移液和手动操作时间。
- ▶ 只需 1 纳克输入 DNA。
- ▶ Nextera XT 通常支持小于 5 兆碱基的基因组，而 Nextera DNA 通常支持大于 5 兆碱基的基因组。

表 1 Nextera 试剂盒应用示例

| Nextera XT (FC-131-1024、FC-131-1096) | Nextera DNA (FC-121-1030、FC-121-1031) |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 小基因组、扩增子、质粒 | 大基因组或复杂基因组 |
| PCR 扩增子 (> 300 碱基对) * | 人类基因组 |
| 质粒 | 非人类哺乳动物基因组（例如小鼠、大鼠、牛） |
| 微生物基因组（例如原核生物、古生菌） | 植物基因组（例如拟南芥、玉米、稻米） |
| 串联扩增子 | 无脊椎动物基因组（例如果蝇） |
| 双链 cDNA | |
| 单细胞 RNA-Seq | |

* 为确保均匀覆盖整个 DNA 片段，请使用大小大于 300 碱基对的扩增子。有关详细信息，请参见 *PCR 扩增子*（第 2 页）。

DNA 输入建议

Nextera XT 操作流程已针对 1 纳克的 DNA 输入进行了优化。请在制备文库之前对原料进行定量。用分子级用水或 10 毫摩尔/升 Tris HCl (pH 为 7.5-8.5) 稀释原料。

输入 DNA 定量

相较于机械片段化，本操作流程中使用的酶 DNA 片段化对 DNA 输入更为灵敏。成功与否取决于输入 DNA 的定量是否准确。

使用荧光法对输入 DNA 定量。例如，如果您使用 Qubit dsDNA BR 实验分析方法系统，请使用 2 微升的每个 DNA 样品以及 198 微升的 Qubit 工作溶液。避免使用测量核苷酸总数的方法，例如 NanoDrop 或其他紫外吸收法。

评估 DNA 质量

紫外吸收法是评估 DNA 样品质量的常用方法。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。本操作流程已针对吸收率的值为 1.8-2.0 的 DNA 进行了优化，值介于 1.8 到 2.0 之间即表明 DNA 样品的纯度较高。针对 260/230 的比率，目标值为 2.0-2.2。如果值超出此范围，则表示存在污染物。有关完整的污染列表，包括来源、避免方法以及对文库的影响，请参见《Nextera XT 文库制备：提示和故障诊断》（出版编号 770-2015-015）。

用分子级用水或 10 毫摩尔/升 Tris HCl (pH 为 7.5-8.5) 稀释原料。如果标记不完整，则可能会导致文库制备失败、簇生成不佳或者支架数量高于预期。

PCR 扩增子

PCR 扩增子必须大于 300 碱基对。在文库纯化步骤中，短于 300 碱基对的扩增子可能会流失。

标记无法直接将接头添加到片段的末端，因此，预期每个末端的测序覆盖范围约有 50 碱基对的降幅。为确保能够充分覆盖扩增子目标区域，请在设计引物时加长引物以使之在每个末端超出目标区域 50 碱基对。

更多资源

访问 Illumina 网站上的 [Nextera XT DNA 文库制备试剂盒支持页面](#)，查看相应文档、软件下载、培训资源和 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，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。 |
| 《Nextera XT DNA 文库制备试剂盒检查表》 (文档号 1000000006566) | 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。 |
| 《Nextera 低重混合指南》 (出版编号 770-2011-044) | 提供了针对 Nextera XT 文库制备的混合指导准则和双标签策略。 |
| 《在 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒中进行标准和基于微珠的标准化的最佳实践》 (出版编号 470-2016-007) | 提供了针对对 Nextera XT 文库进行基于微珠的标准化的最佳实践。 |
| 《Nextera XT 文库制备：提示和故障诊断》 (出版编号 770-2015-015) | 提供了用于解决制备 Nextera XT 文库时可能发生的标记不足、样品污染及其他问题的最佳实践。 |

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 |
| 标记基因组 DNA | 6 |
| 扩增文库 | 7 |
| 纯化文库 | 9 |
| 检查文库 | 11 |
| 标准化文库 | 11 |
| 混合文库 | 13 |

简介

本章介绍了 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒操作流程。

- ▶ 请先查看最佳实践，然后再继续。请参见[更多资源（第 2 页）](#)，了解如何在 Illumina 网站上访问最佳实践。
- ▶ 请先确认试剂盒内含物，并确保您已备齐所需的设备和耗材，然后再继续操作。请参见[支持信息（第 14 页）](#)的支持信息。
- ▶ 使用指定的量和孵育参数，根据所示的顺序遵循操作流程。

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 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒支持页面。

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。如需摇动、离心和长期存储，请使用 Microseal “B”。
- ▶ 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。

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。

处理微珠

- ▶ 缓缓对微珠悬液移液。
- ▶ 混合时要充分彻底。
- ▶ 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上，然后等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- ▶ 清洗微珠时：
 - ▶ 对板使用适合的磁块。
 - ▶ 分配液体，以便润湿各孔侧边上的微珠。
 - ▶ 将板置于磁块上，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

下图展示了使用 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒（8 个样品）的工作流程。步骤之间标出了安全停止点。

图 1 Nextera XT 工作流程



标记基因组 DNA

此步骤使用 Nextera 转座子来标记 gDNA，这一过程只需一步即可将 DNA 片段化，然后用接头序列对 DNA 进行标记。

耗材

- ▶ ATM（扩增子标记混合液）
- ▶ TD（标记 DNA 缓冲液）
- ▶ NT（中和标记缓冲液）
- ▶ gDNA（每个样品 0.2 纳克/微升）
- ▶ 硬壳 96 孔 PCR 板，带裙边
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

准备

1 准备下列耗材：

| 物品 | 存储 | 说明 |
|------|---------------|-----------------------------------|
| gDNA | -25°C 到 -15°C | 在冰上解冻。翻转解冻后的试管 3 到 5 次，然后进行短暂的离心。 |
| ATM | -25°C 到 -15°C | 在冰上解冻。翻转解冻后的试管 3 到 5 次，然后进行短暂的离心。 |
| TD | -25°C 到 -15°C | 在冰上解冻。翻转解冻后的试管 3 到 5 次，然后进行短暂的离心。 |
| NT | 15°C 到 30°C | 检查是否有沉淀。如有，请振荡试管，直至所有微粒都已重悬。 |

2 在扩增仪上保存下列标记程序：

- ▶ 选择预热盖选项
- ▶ 55°C 下 5 分钟
- ▶ 保持在 10°C

程序

- 1 将以下剂量的液体按所列的顺序加到新的硬壳带裙边 PCR 板的每个孔中。用移液器上下吸打以混匀溶液。
 - ▶ TD（10 微升）
 - ▶ 标准化 gDNA（5 微升）
- 2 将 5 微升 ATM 加到每个孔中。用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 3 在 20°C 下以 $280 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
- 4 置于预编程的扩增仪上并运行标记程序。当样品达到 10°C 时，请**立即**执行第 5 步，因为此时转座体仍处于活动状态。
- 5 将 5 微升 NT 加到每个孔中。用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 6 在 20°C 下以 $280 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
- 7 在室温下孵育 5 分钟。
PCR 板装有 25 微升经过标记且已中和的 gDNA，所有这些 gDNA 将在下一步使用。

扩增文库

此步骤使用有限循环的 PCR 程序来扩增标记后的 DNA。PCR 会将标签 1 (i7)、标签 2 (i5) 和完整接头序列添加到上一步骤中制备的标记后 DNA。标签引物和 Nextera PCR 预先混合液将直接添加到上一步骤中制备的 25 微升标记后 gDNA。

形成簇需要接头和序列。请使用足量的建议输入 DNA 和指定的 PCR 循环次数，以确保产生高质量的测序结果。

在为文库规划标签方案时，请在 PCR 板的每一列中使用相同的标签（标签 1 (i7)）。此方案允许使用多通道移液器将标签从试管转移到板上。请参见[更多资源（第 2 页）](#)，了解有关访问低重混合技术说明的信息。

耗材

- ▶ NPM (Nextera PCR 预先混合液)
- ▶ 标签 1 引物 (N7XX)
- ▶ 标签 2 引物 (S5XX)
- ▶ TruSeq® 标签板定位装置
- ▶ Microseal “A” 封膜

准备

1 准备下列耗材：

| 物品 | 存储 | 说明 |
|----------------|---------------|--|
| 标签接头 (i5 和 i7) | -25°C 到 -15°C | 仅准备要使用的接头。在室温下解冻 20 分钟。翻转每个试管将试剂混匀。然后，进行短暂的离心。 |
| NPM | -25°C 到 -15°C | 在冰上解冻 20 分钟。 |

2 在扩增仪上保存下列程序：

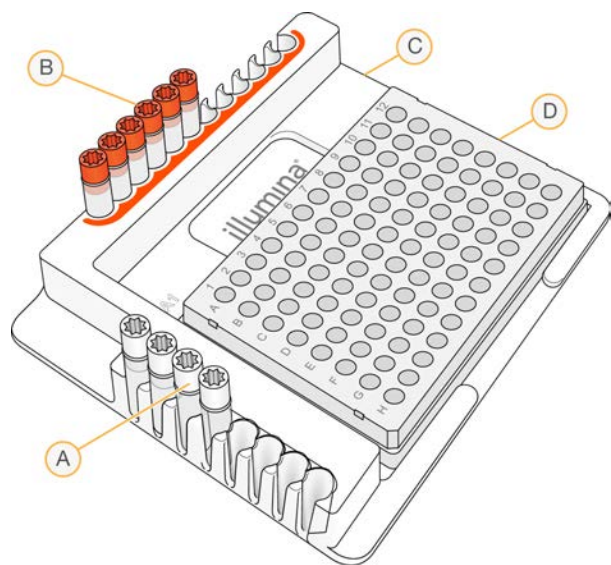
- ▶ 选择预热盖选项。
- ▶ 72°C 下 3 分钟
- ▶ 95°C 下 30 秒钟
- ▶ 12 次以下循环：
 - ▶ 95°C 下 10 秒钟
 - ▶ 55°C 下 30 秒钟
 - ▶ 72°C 下 30 秒钟
- ▶ 72°C 下 5 分钟
- ▶ 保持在 10°C

程序

1 [24 个文库] 按如下方式在 TruSeq 标签板定位装置中布置标签引物。

- ▶ 在 TruSeq 标签板定位装置的 1-6 列布置标签 1 (i7) 接头。
- ▶ 在 TruSeq 标签板定位装置的 A-D 行布置标签 2 (i5) 接头。

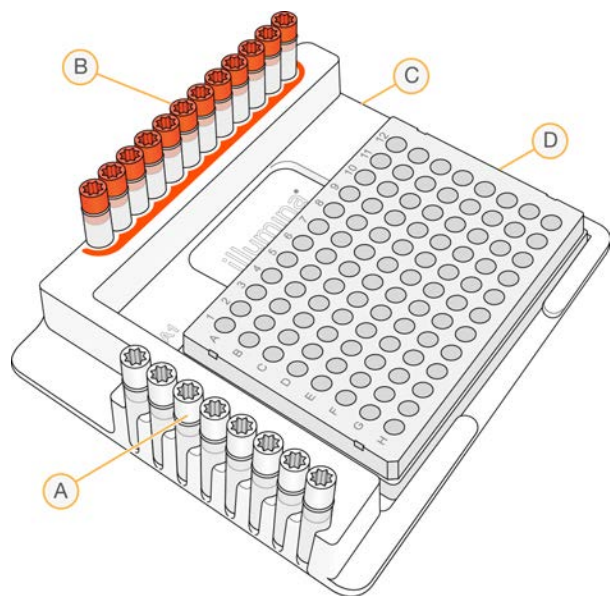
图2 TruSeq 标签板定位装置设置 (24 个文库)



- A A-D行: 标签2 (i5) 接头 (白色管帽)
- B 1-6列: 标签1 (i7) 接头 (橙色管帽)
- C TruSeq 标签板定位装置
- D 硬壳PCR板

- 2 [96 个文库] 按如下方式在 TruSeq 标签板定位装置中布置标签引物。
 - ▶ 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3 TruSeq 标签板定位装置设置 (96 个文库)



- 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 硬壳 PCR 板

- 3 使用多通道移液器，将 5 微升的每个标签 1 (i7) 接头添加到每列中。将每个 i7 接头试管上的管帽更换为新的橙色管帽。
- 4 使用多通道移液器，将 5 微升的每个标签 2 (i5) 接头添加到每行中。将每个 i5 接头试管上的管帽更换为新的白色管帽。
- 5 将 15 微升 NPM 添加到含有标签接头的每个孔中。用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 6 在 20°C 下以 $280 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
- 7 置于预编程序的扩增仪上并运行 PCR 程序。
剂量为 50 微升。

安全停止点

如要停止操作，请将板密封并存储在 2°C 至 8°C 下，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 AMPure XP 微珠来纯化文库 DNA 和去除较短的文库片段。

耗材

- ▶ RSB（重悬缓冲液）
- ▶ AMPure XP 微珠
- ▶ 新制备的浓度为 80% 的乙醇 (EtOH)
- ▶ 96 孔 MIDI 板
- ▶ 硬壳 96 孔 PCR 板，带裙边

关于试剂

- ▶ AMPure XP 微珠属于用户自备耗材。
- ▶ 每次使用前都要振荡 AMPure XP 微珠。
- ▶ 频繁振荡 AMPure XP 微珠，以确保微珠均匀散布。
- ▶ 请始终制备浓度为 80% 的新鲜乙醇用于清洗步骤。乙醇会从空气中吸收水分，因而会影响结果。

准备

- 1 准备下列耗材：

| 物品 | 存储 | 说明 |
|--------------|---------------|--|
| RSB | -25°C 至 -15°C | 在室温下解冻。 首次解冻后，RSB 可存储在 2°C 到 8°C 下。 |
| AMPure XP 微珠 | 2°C 至 8°C | 在台面上搁置 30 分钟，使其恢复到室温。 |

- 2 使用纯乙醇制备浓度为 80% 的乙醇。

程序

- 1 在 20°C 下以 $280 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
- 2 将 50 微升 PCR 产物从 PCR 板的每个孔转移到新 MIDI 板的相应孔中。



注意

PCR 产物与微珠量之比为 3:2。例如，50 微升 PCR 产物对应 30 微升 AMPure。如果得到的 PCR 产物少于 50 微升，则应相应地调整 AMPure 微珠比率。

- 3 将 30 微升 AMPure XP 微珠加到每个孔中。
一般而言，Nextera XT 文库制备过程中的扩增子越小，生成的插入大小范围就越小。要从微珠纯化步骤中最大限度地恢复较小的片段，请使用以下条件。

| 输入大小（碱基对） | AMPure XP 建议 | AMPure XP 量（微升） |
|---------------|---|--|
| 300-500 | 1.8x AMPure XP | 90 |
| > 500 | 0.6x AMPure XP (如果是 $\geq 2 \times 250$ 次循环，则为 0.5x AMPure XP) * | 30 (如果是 $\geq 2 \times 250$ 次循环，则为 25 微升) * |
| gDNA 或其他基因组输入 | 0.6x AMPure XP | 30 |

*仅适用于使用 HiSeq 快速 v2 试剂的 MiSeq® 或 HiSeq® 2500。

- 4 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 5 在室温下孵育 5 分钟。
- 6 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 7 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 8 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。
- 9 使用 20 微升移液器从每个孔中取出残余的 80% 乙醇。
- 10 在磁力架上风干 15 分钟。
- 11 从磁力架中取下。
- 12 将 52.5 微升 RSB 加到每个孔中。
- 13 以 1800 转/分的速度振动 2 分钟。
- 14 在室温下孵育 2 分钟。
- 15 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 16 将 50 微升上层清液从 MIDI 板转移到新的硬壳 PCR 板中。

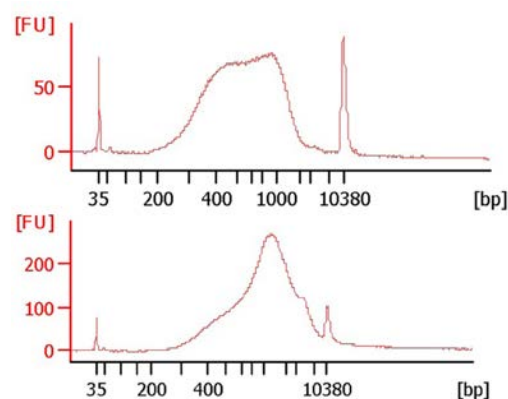
安全停止点

如要停止操作，请将板密封并存储在 -25°C 至 -15°C 下，最长可存放 7 天。

检查文库

- 1 使用高灵敏度 DNA 芯片在 Agilent Technology 2100 Bioanalyzer 上运行 1 微升未稀释的文库。
下图显示了在 HiSeq 2500 系统上成功测序的文库轨迹示例。典型文库具有大约 250-1000 碱基对的广泛大小分布，如顶部面板中所示。许多文库都可以测序，其平均片段大小可小至 250 碱基对或大至 1500 碱基对。

图4 对照品 gDNA 的文库大小分布



标准化文库

此过程会标准化每个文库的数量，以确保混合文库中的文库表示更为统一。



注意

如果最终文库产量低于 10-15 纳摩尔/升，请手动对文库进行标准化。对低产量文库进行基于微珠的标准化可能会导致样品过度稀释，且测序产量偏低。有关详细信息，请参见《在 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒中进行标准和基于微珠的标准化的最佳实践》（出版编号 470-2016-007）。

耗材

- ▶ 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）
- ▶ LNS1（文库标准化存储缓冲液 1）
- ▶ 0.1 摩尔/升 NaOH（不超过 7 天）（每 96 个样品 3 毫升）
- ▶ 96 孔 MIDI 板
- ▶ 硬壳 96 孔 PCR 板，带裙边
- ▶ 15 毫升圆锥形试管
- ▶ Microseal “B” 粘性密封膜

关于试剂

- ▶ 用力振荡 LNA1，确保所有沉淀都已溶解。在灯光前仔细检查。
- ▶ 用力振荡 LNB1，期间不时将其倒转（至少 1 分钟）。重复此操作，直到所有微珠都已重悬，并且倒转试管时试管底部没有微珠。

- ▶ 务必为 LNA1 使用大口径移液器吸头。
- ▶ 仅混合当前实验所需的 LNA1 和 LNB1 用量。将剩余的 LNA1 和 LNB1 分别存储在建议的温度下。
- ▶ 由于溶液的粘度较高，请缓慢吸出并分配微珠。



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。

准备

1 准备下列耗材：

| 物品 | 存储 | 说明 |
|------|---------------|---|
| LNA1 | -25°C 到 -15°C | 在通风橱下制备。 恢复至室温。必要时使用 20°C 到 25°C 的水浴槽。 |
| LNB1 | 2°C 到 8°C | 恢复至室温。必要时使用 20°C 到 25°C 的水浴槽。 |
| LNW1 | 2°C 到 8°C | 恢复至室温。必要时使用 20°C 到 25°C 的水浴槽。 |
| LNS1 | 室温 | 恢复至室温。 |

程序

- 1 将 20 微升上层清液从硬壳 PCR 板转移到新的 MIDI 板中。
- 2 将每样品 44 微升 LNA1 加到新的 15 毫升圆锥形试管中。考虑到移液会导致样品流失，请额外计算大约 5% 的样品。
例如：对于 96 个样品，应将 4.4 毫升 LNA1 加到试管中（100 个样品 × 44 微升 = 4.4 毫升）。
- 3 使 LNB1 完全重悬。用移液器上下吸打以混匀溶液。
- 4 将每样品 8 微升 LNB1（包括额外 5% 的量）加到装有 LNA1 的 15 毫升圆锥形试管中。翻转以混匀溶液。
例如：对于 96 个样品，应将 800 微升 LNB1 转移到装有 LNA1 的试管中（100 个样品 × 8 微升 = 800 微升）。
- 5 将微珠混合液倒入水槽中。
- 6 将 45 微升 LNA1 和 LNB1 混合液加到含有文库的每个孔中。
- 7 以 1800 转/分的速度振动 30 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 45 微升 LNW1 加到每个孔中。
 - b 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。
 - c 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
 - d 取出并丢弃每个孔中的所有上层清液。
- 11 将 30 微升浓度为 0.1 摩尔/升的 NaOH 加到每个孔中。
- 12 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。

- 13 在 5 分钟的洗脱期间，为一个新的 96 孔 PCR 板贴上 SGP 标签以用作存储板。
- 14 将 30 微升 LNS1 加到 SGP 板的每个孔中。置于一旁。
- 15 5 分钟洗脱后，请确保 MIDI 板中的所有样品都已重悬。用移液器上下吸打以混匀溶液，或者将板置于台上轻轻拍打。
- 16 以 1800 转/分的速度振动 5 分钟。
- 17 置于磁力架上，并等到液体变得清澈为止（约 2 分钟）。
- 18 将上层清液从 MIDI 板转移到 SGP 板。
- 19 以 $1000 \times g$ 的转速离心 1 分钟。

**注意**

文库变性后会变为单链 DNA，而单链 DNA 在琼脂糖凝胶或 Bioanalyzer 芯片上的溶解度不是很好。因此，为确保质量，请使用在纯化程序的第 16 步中留下的双链 DNA。

安全停止点

如要停止操作，请将板密封并存储在 -25°C 至 -15°C 下，最长可存放 7 天。

混合文库

混合文库将等量标准化文库组合在一支试管中。混合之后，先对混合文库进行稀释和热变性，然后再装入文库以用于测序运行。

耗材

- ▶ 粘性 PCR 封箔口
- ▶ Eppendorf LoBind 微量离心管
- ▶ PCR 八联管

准备

- 1 要为测序运行做准备，请按照您的仪器说明开始解冻试剂。
- 2 如果 SGP 板在 -25°C 至 -15°C 下冷冻存储，则在室温下解冻。用移液器上下吸打以混匀溶液。

程序

- 1 在 20°C 下以 $1000 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
- 2 将一支新的 Eppendorf 试管标为“PAL”。
- 3 将 SGP 板中的每个文库分别转移 5 微升到 PAL 试管中。翻转以混匀溶液。
- 4 对混合文库进行稀释，达到测序系统所需的装入浓度。
有关说明，请参见您的系统的变性和稀释文库指南。
- 5 在 -25°C 至 -15°C 温度下，将未使用的混合文库存储在 PAL 试管和 SGP 板中最多 7 天。

支持信息

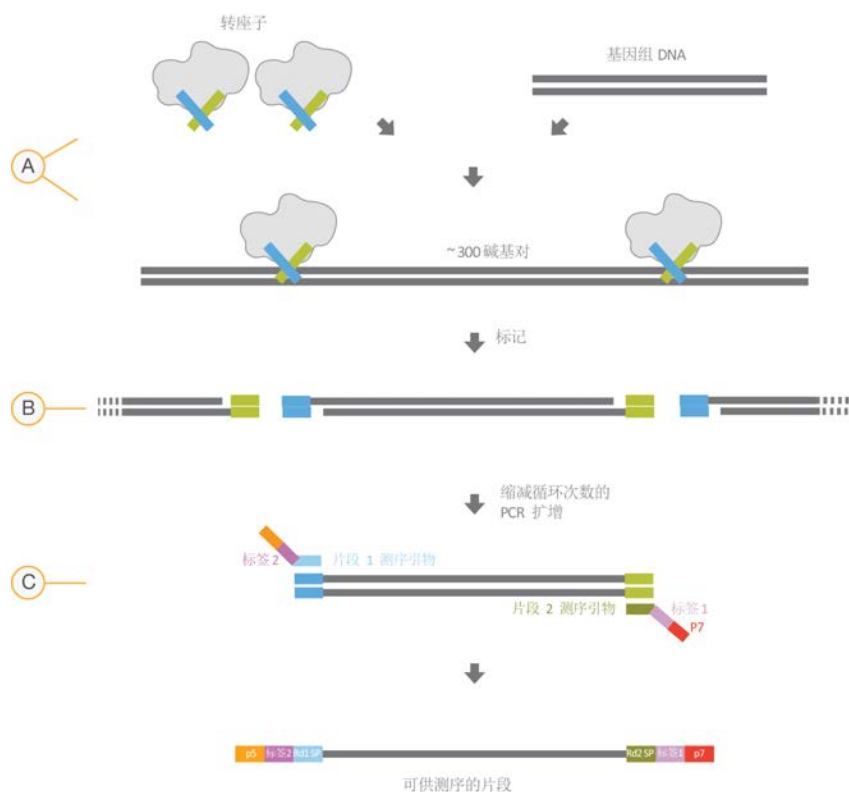
| | |
|----------------------------|----|
| 简介 | 14 |
| Nextera XT 实验分析方法的工作原理是什么? | 14 |
| Nextera XT 质量指标 | 15 |
| 缩写 | 15 |
| Nextera XT DNA 文库制备试剂盒 | 16 |
| 耗材和设备 | 19 |

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。

Nextera XT 实验分析方法的工作原理是什么?

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒使用精心设计的转座体来标记基因组 DNA，这一过程只需一步即可将 DNA 片段化，然后用接头序列对 DNA 进行标记。有限循环的 PCR 使用接头来扩增插件 DNA。该 PCR 步骤还会将标签接头序列添加到 DNA 的两端，从而可在 Illumina 测序平台上对混合文库进行双序列标签测序。



- A 与模板DNA结合的NexteraXT转座体（带接头）
- B 通过标记进行片段化和添加接头
- C 通过有限循环的PCR添加标签接头序列

Nextera XT 质量指标

在使用 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒制备的文库中，以下两个因素可能会导致簇密度出现波动：

- ▶ 标记后平均样品大小过大或过小。
- ▶ 开始基于微珠的标准化步骤时，最终样品浓度因产量低而过低。

要对簇密度的波动问题进行故障诊断，请考虑检查文库大小和文库浓度。有关详细信息，请参见《Nextera XT 文库制备：提示和故障诊断》（出版编号 770-2015-015）。

检查文库大小

大分子簇的效率比小分子低。如果标记后的片段大小大于预期，则可能出现簇数量偏低的情况，反之亦然。标记后的平均预期文库大小介于 400 碱基对与 1.2 千碱基之间。

在 PCR 纯化步骤之后，使用高灵敏度 Bioanalyzer 轨迹检查文库大小。寻找长而低的平稳轨迹。或者，借助 qPCR 引物对文库进行 PCR 扩增，然后在琼脂糖凝胶上运行产物。有关这些引物的序列，请参见《测序文库 qPCR 定量指南》（文档号 11322363）。

- ▶ **短文库表示输入 DNA 过少** — 使用荧光法对输入 DNA 重新定量。先增加 10%-25% 的输入 DNA。如果文库峰值低于 400 碱基对，并且您想继续使用此文库，则进一步稀释该文库。
- ▶ **长文库表示输入 DNA 过多或存在抑制物** — 开始先使用较少的输入 DNA，确保输入 DNA 不含抑制物，然后重复定量步骤。

有关文库稀释的详细信息，请参见您的测序系统的变性和稀释文库指南。

检查文库浓度

如果扩增后的文库浓度为 10-15 纳摩尔/升或更高，则基于微珠的标准化最为有效。在文库纯化之后，使用高灵敏度 dsDNA Qubit 测量文库浓度，并使用 Bioanalyzer 测量文库大小来计算摩尔浓度。

如果您开始使用的是优质 DNA，而在文库纯化之后得出的产量较低，则可能是 AMPure 纯化或扩增步骤出现了问题。如果结果表明是其中的一种情况，请确认 PCR 预先混合液妥当地存储在无霜冰柜中，温度为 -25°C 到 -15°C。请确认最低冻融循环次数。

Illumina 网站提供了以下资源：

- ▶ **微珠处理的最佳实践** — 从 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒支持页面选择“Best Practices（最佳实践）”选项卡，然后查看“Handling Magnetic Beads（处理磁力微珠）”。
- ▶ **在线培训单元** — 请参阅第 2.4 节“TruSeq：样品纯化微珠大小选择及最佳实践”，这是针对微珠处理指导的简短培训。要访问此培训，请选择 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒支持页面上的“Training（培训）”选项卡。

缩写

| 缩写 | 定义 |
|------|--------------|
| ATM | 扩增子标记混合液 |
| CAA | 纯化扩增板 |
| CAN | 纯化扩增 NTA 板 |
| LNA1 | 文库标准化添加剂 1 |
| LNB1 | 文库标准化微珠 1 |
| LNS1 | 文库标准化存储缓冲液 1 |

| 缩写 | 定义 |
|------|-------------------|
| LNW1 | 文库标准化清洗液 1 |
| LNP | 文库标准化板 |
| NT | 中和标记缓冲液 |
| NPM | Nextera PCR 预先混合液 |
| NTA | Nextera XT 标记扩增子板 |
| PAL | 混合的扩增子文库 |
| RSB | 重悬缓冲液 |
| SGP | 存储板 |
| TD | 标记 DNA 缓冲液 |

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒包装分 96 个标签装（384 个样品）或 24 个标签装（96 个样品），并采用干冰装运（除非另有说明）。试剂盒中某些组件的存储温度与装运温度不同。请务必将试剂盒组件存储在指定的温度下。

每个试剂盒配有相应的标签试剂盒，其中包含 96 个标签或 24 个标签。结合 Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 A-D 可获取 384 种标签组合。

TruSeq v3 试剂盒中提供的测序引物与 Nextera XT 文库不兼容。因此，在 HiSeq 2500 仪器上使用 TruSeq v3 试剂对 Nextera XT 文库进行测序时，需要使用 Illumina TruSeq 双标签测序引物试剂盒中提供的测序引物。该试剂盒分为双末端测序（PE-121-1003）和单端测序（FC-121-1003）两种版本。每次运行需要使用一个试剂盒。

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒 – 96 个标签

| 耗材 | 商品目录号 |
|---|-------------|
| Nextera XT DNA 文库制备试剂盒 | FC-131-1096 |
| Nextera XT 标签试剂盒（96 个标签，384 个样品） | FC-131-1002 |
| Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 A（96 个标签，384 个样品）* | FC-131-2001 |
| Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 B（96 个标签，384 个样品）* | FC-131-2002 |
| Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 C（96 个标签，384 个样品）* | FC-131-2003 |
| Nextera XT 标签试剂盒 v2 套装 D（96 个标签，384 个样品）* | FC-131-2004 |
| TruSeq 标签板定位装置套件 | FC-130-1005 |

* 结合套装 A-D 可获取 384 个标签组合。

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒，96 个标签（FC-131-1096）

96 个标签装试剂盒内含物，1 号盒

| 数量 | 缩写 | 试剂名称 | 存储温度 |
|----|-----|-----------------|---------------|
| 1 | ATM | 扩增子标记混合液，96 次反应 | -25°C 到 -15°C |
| 2 | TD | 标记 DNA 缓冲液 | -25°C 到 -15°C |

| 数量 | 缩写 | 试剂名称 | 存储温度 |
|----|------|-------------------|---------------|
| 1 | NPM | Nextera PCR 预先混合液 | -25°C 到 -15°C |
| 4 | RSB | 重悬缓冲液 | -25°C 到 -15°C |
| 1 | LNA1 | 文库标准化添加剂 1 | -25°C 到 -15°C |
| 2 | LNW1 | 文库标准化清洗液 1 | 2°C 到 8°C |
| 1 | HT1 | 杂交缓冲液 | -25°C 到 -15°C |

96 个标签装试剂盒内含物，2 号盒

| 数量 | 缩写 | 试剂名称 | 存储温度 |
|----|------|--------------|-----------|
| 1 | NT | 中和标记缓冲液 | 室温 |
| 1 | LNB1 | 文库标准化微珠 1 | 2°C 到 8°C |
| 1 | LNS1 | 文库标准化存储缓冲液 1 | 室温 |

标签试剂盒（96 个标签）（FC-131-1002）

| 数量 | 试剂名称 | 存储温度 |
|--------|--------------------------|---------------|
| 8 个试管 | 标签引物，S502 到 S508，以及 S517 | -25°C 到 -15°C |
| 12 个试管 | 标签引物，N701 到 N712 | -25°C 到 -15°C |

标签试剂盒 v2 套装 A（FC-131-2001）

| 数量 | 试剂名称 | 存储温度 |
|--------|---|---------------|
| 8 个试管 | 标签引物，S502，S503，S505 到 S508，S510，以及 S511 | -25°C 到 -15°C |
| 12 个试管 | 标签引物，N701 到 N707，N710 到 N712，N714，以及 N715 | -25°C 到 -15°C |

标签试剂盒 v2 套装 B（FC-131-2002）

| 数量 | 试剂名称 | 存储温度 |
|--------|---|---------------|
| 8 个试管 | 标签引物，S502，S503，S505 到 S508，S510，以及 S511 | -25°C 到 -15°C |
| 12 个试管 | 标签引物，N716，N718 到 N724，以及 N726 到 N729 | -25°C 到 -15°C |

标签试剂盒 v2 套装 C（FC-131-2003）

| 数量 | 试剂名称 | 存储温度 |
|--------|---|---------------|
| 8 个试管 | 标签引物，S513，S515 到 S518，以及 S520 到 S522 | -25°C 到 -15°C |
| 12 个试管 | 标签引物，N701 到 N707，N710 到 N712，N714，以及 N715 | -25°C 到 -15°C |

标签试剂盒 v2 套装 D（FC-131-2004）

| 数量 | 试剂名称 | 存储温度 |
|--------|--------------------------------------|---------------|
| 8 个试管 | 标签引物，S513，S515 到 S518，以及 S520 到 S522 | -25°C 到 -15°C |
| 12 个试管 | 标签引物，N716，N718 到 N724，以及 N726 到 N729 | -25°C 到 -15°C |

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒 – 24 个标签

| 耗材 | 商品目录号 |
|---------------------------------|-------------|
| Nextera XT DNA 文库制备试剂盒 | FC-131-1024 |
| Nextera XT 标签试剂盒（24 个标签，96 个样品） | FC-131-1001 |
| TruSeq 标签板定位装置套件 | FC-130-1005 |

Nextera XT DNA 文库制备试剂盒，24 个标签 (FC-131-1024)

24 个标签装试剂盒内含物，1 号盒

| 数量 | 缩写 | 试剂名称 | 存储温度 |
|----|------|-------------------|---------------|
| 1 | ATM | 扩增子标记混合液，24 次反应 | -25°C 到 -15°C |
| 1 | TD | 标记 DNA 缓冲液 | -25°C 到 -15°C |
| 1 | NPM | Nextera PCR 预先混合液 | -25°C 到 -15°C |
| 1 | RSB | 重悬缓冲液 | -25°C 到 -15°C |
| 1 | LNA1 | 文库标准化添加剂 1 | -25°C 到 -15°C |
| 1 | LNW1 | 文库标准化清洗液 1 | 2°C 到 8°C |
| 1 | HT1 | 杂交缓冲液 | -25°C 到 -15°C |

24 个标签装试剂盒内含物，2 号盒

| 数量 | 缩写 | 试剂名称 | 存储温度 |
|----|------|--------------|-----------|
| 1 | NT | 中和标记缓冲液 | 室温 |
| 1 | LNB1 | 文库标准化微珠 1 | 2°C 到 8°C |
| 1 | LNS1 | 文库标准化存储缓冲液 1 | 室温 |

标签试剂盒（24 个标签）(FC-131-1001)

| 数量 | 试剂名称 | 存储温度 |
|-------|--------------------------|---------------|
| 4 个试管 | 标签引物，S502 到 S504，以及 S517 | -25°C 到 -15°C |
| 6 个试管 | 标签引物，N701 到 N706 | -25°C 到 -15°C |

TruSeq 标签板定位装置套件

每个套件包含两个标签板定位装置，在文库扩增期间，可使用这两个装置来布置尚未分配到 96 孔板的标签引物。标签板定位装置既可用于 24 个样品装试剂盒，也可用于 96 个样品装试剂盒。

| 耗材 | 商品目录号 |
|------------------|-------------|
| TruSeq 标签板定位装置套件 | FC-130-1005 |

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。

耗材

| 耗材 | 供应商 |
|--|---|
| 10 微升移液器吸头 | 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 |
| 1000 微升移液器吸头 | 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 |
| 200 微升移液器吸头 | 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 |
| 96 孔存储板，圆孔，0.8 毫升（MIDI 板） | Fisher Scientific，商品目录号 AB-0859 |
| Agencourt AMPure XP（60 毫升试剂盒或 5 毫升试剂盒） | Beckman Coulter Genomics，货号 A63881（60 毫升） Beckman Coulter Genomics，货号 A63880（5 毫升） |
| 蒸馏水 | 一般实验室供应商 |
| 分子生物学用无水纯乙醇（500 毫升） | Sigma-Aldrich，产品号 E7023 |
| Microseal “A” 封膜 | Bio-Rad，商品目录号 MSA-5001 |
| Microseal “B” 粘性密封膜 | Bio-Rad，商品目录号 MSB-1001 |
| 分子生物学级 NaOH，浓度为 1 摩尔/升，pH > 12.5 | 一般实验室供应商 |
| 不含 RNase/DNase 的一次性多通道试剂槽 | VWR，商品目录号 89094-658 |
| 超纯水 | 一般实验室供应商 |
| 硬壳 96 孔 PCR 板 | Bio-Rad，商品目录号 HSP-9601 |

设备

| 设备 | 供应商 |
|----------|--|
| 高速微孔板混合器 | VWR，商品目录号 13500-890（110 伏/120 伏） VWR，商品目录号 14216-214（230 伏） |
| 磁力架 96 | Thermo Fisher Scientific，商品目录号 AM10027 |
| 微孔板离心机 | 一般实验室供应商 |
| 振荡器 | 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。

| 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 | 聚丙烯板和试管 |
| MJ Research DNA Engine Tetrad | 已计算 | 已加热 | 板 |
| Eppendorf Mastercycler Pro S | Gradient S，模拟试管 | 已加热 | 板 |

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