



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

用于肿瘤基因检测的高通量测序文库构建技术规范

Technical regulation of next-generation sequencing library preparation for
tumor-based genetic testing

(草稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由 归口。

本文件起草单位：南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：

用于肿瘤基因检测的高通量测序文库构建技术规范

1 范围

本文件规定了利用二代测序技术对肿瘤样本进行高通量检测的文库构建的要求，描述了对应的文库构建方法、要求与构建流程。

本文件适用于肿瘤基因检测的高通量测序文库构建。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范

GB/T 38165-2019 人体外周血中循环游离 DNA 浓度检测基于 Alu 序列实时荧光 PCR 法

GB/T 25170-2010 畜禽基因组 BAC 文库构建与保存技术规程

GB/T191 包装储运图示标志

GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息（标示）第2部分：专业用体外诊断试剂

二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识

3 术语和定义

GB/T 29859-2013 及 GB/T 30989-2014 界定的以及下列术语和定义适用于本文件，为了便于使用，以下重复列出了 GB/T 29859-2013 及 GB/T 30989-2014 中的某些术语和定义。

3.1

高通量测序 Next-Generation Sequencing; NGS

以一次并行几十万到几百万条核酸分子序列测定和一般读长较短等为标志，适用于 DNA 的测序技术。

注：参见 GB/T 35890-2018

3.2

文库 library

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术等所得到的一个重建分子群，如基因组文库、互补 DNA 文库、噬菌体展示肽文库等。

注：参见 GB/T 30989-2014

3.3

测序通量 Throughput of Gene Sequencing

单次测序可获得序列信息的基因片段数量或可测定的脱氧核糖核酸和核糖核酸（以碱基表示）的数量。

注：参见 GB/T 29859-2013；GB/T 30989-2014

3.4

循环游离 DNA circulating cell-free DNA；cfDNA

血液中来源于细胞凋亡和坏死的细胞外游离状态的短片段 DNA。

注：参见 GB/T 38165-2019

3.5

DNA 片段化 fragmentation

将 DNA 溶液暴露于超声或酶反应液中，使 DNA 溶液中的 DNA 发生断裂，得到目标范围长度的 DNA 片段。

注：修改自专利，利用射线实现供二代测序使用的 DNA 片段化的方法及装置

3.6

末端修复 End Preparation

反应体系中，在 dNTP 存在下，利用聚合酶将片段化 DNA 的末端补平或切平。

3.7

5'端磷酸化

利用多聚核苷酸激酶将 5'羟基转变成 5'磷酸基团且将 3'磷酸基团转变成 3'羟基。

3.8

3'端加 A dA-tailing

在过量 dATP 存在下，利用不具有 3'-5'外切活性的聚合酶在双链 DNA 3'末端加上 dATP。

注：参见专利，一种 DNA 末端修复与加 A 的方法。引 3.6-3.8

3.9

接头 Adapter

一段人工合成的长度较短的能与平末端或者黏性末端匹配（连接）的 DNA 片段。

注：参见 SF/T 0070-2020

3.10

标签 index/barcode

一段特征性的脱氧核苷酸短片段，在多样本混合检测时，充当识别特定样本来源的唯一标志。

注：参见 GA/T 1693-2020

3.11

DNA 连接 DNA Ligation

在 DNA 连接酶催化下，靶 DNA 片段与载体 DNA 相邻的 5'端磷酸与 3'端羟基之间形成

磷酸二酯键的过程。

注：参见 GB/T 25170-2010

3.12

富集/纯化 Enrichment

通过物理和化学方法使 DNA 从样品的不同组分中分离出来。利用不同的纯化方法, 去除样品中的蛋白质、脂肪、多糖及其他次生代谢物, 及 DNA 提取过程中加入的三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇和乙酸钠等, 获得纯化的 DNA。

注：参见 NY/T 674-2003

3.13

聚合酶链反应 Polymerase Chain Reaction; PCR

是一项对特定的 DNA 片段进行体外酶促快速扩增的分子生物学技术。通过模拟 DNA 的自然复制过程, 引物按照碱基配对与 DNA 模板互补结合以后, 在 DNA 多聚酶的作用下, 按照碱基配对的原则 (A 对 T, C 对 G), 从引物开始合成与模板 DNA 互补的 DNA 链。

注：参见 GB/T 30989-2014

3.14

杂交捕获 Capture by Hybridization

核酸探针或引物被设计成与靶序列互补并结合, 与基因组靶序列相结合的生物素标记的探针将与链酶亲和素磁珠紧密结合而被捕获下来。

注：参见专利：杂交富集捕获 DNA 测序文库洗涤溶液及洗涤方法。

3.15 引物 Primer

在聚合作用起始时, 用作复制起点的具有一定长度和顺序的寡核苷酸链 (或相关分子)。

注：参见 GB/T 30989-2014

3.16 NA12878 标准品

2014 年由美国国家标准与技术研究院(NIST)敲定为检测人类基因测序数据中识别单核苷酸多态性(SNP)与碱基插入缺失(Indel)准确度的标准样品。

注：参见 T_SZGIA 2-2018

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

cDNA: 互补脱氧核糖核酸 (Complementary DNA)

OD: 光密度 (Optical Density)

FFPE: 甲醛固定与石蜡包埋 (Formalin Fixed and Paraffin Embedded)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diaminete Traacetic Acid)

TAE: Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液 (Tris Acetate-EDTA buffer)

SNP: 单核苷酸多态性

InDel: 小片段序列的插入或者删除

5 试剂盒要求

5.1 外观

试剂盒外观应完整清洁, 内装试剂齐全, 无泄漏, 无破损, 标志标签字迹清楚。

5.2 装量

液体性状试剂的装量应不少于其标签的标示值。

5.3 精密度

5.3.1 批内精密度

在同一实验室, 由同一操作员使用同一批次试剂盒, 按相同测试方法, 使用企业自行标定的参考品进行 10 次以上独立文库构建, 其浓度值的重复性误差 CV 应不大于 15%, 文库主峰偏差小于 20 bp。

5.3.2 批间精密度

在不同实验室, 由不同操作员使用不同批次试剂盒, 按相同测试方法, 使用企业自行标定的参考品进行 10 次以上独立文库构建, 其浓度值的重复性误差 CV 应不大于 15%, 文库主峰偏差小于 20 bp。

5.4 预文库产量

预文库的产量应符合杂交捕获投入量的要求, 生产企业应规定, 文库产量应进行描述, 一般用 ng 表示。

5.5 预文库片段分布

试剂盒构建的预文库的片段分布应符合上机测序设定的大小, 生产企业应规定文库片段分布的检测方法。

5.6 文库测序下机数据

对 NA12878 标准品进行测序和分析后, 与标准集进行比较, 测序仪的下机原始数据应达到以下指标:

错误率大于等于 1% 的碱基的比例 (Q20) $\leq 20\%$; GC 含量 $\leq 44\%$; N 区的 4X 覆盖度

≥99%；非 N 区的去重测序深度 ≥30X；对解读目标区域的覆盖度(4X) 等于 100%；SNP 精确度 ≥99%；SNP 灵敏度 ≥99%；InDel 精确度 ≥92%；InDel 灵敏度 ≥96%

注：以上指标数值参见 T_SZGIA 2-2018

6. 检验方法

6.1 外观

目测法检查外观，结果应符合 5.1 的要求。

6.2 装量

使用与液体量对应的通用量具测量，结果应符合 5.2 的要求。

6.3 精密度

使用试剂盒按照说明书对同一企业自行标定的参考品进行文库构建，共计 10 次，按照企业规定的检测方法测量浓度值，根据数据计算重复性误差 CV 值，其结果应符合 5.3 的要求。

6.4 文库产量

使用试剂盒对企业自行标定的参考品进行文库构建，按照企业规定的检测方法检测文库产量，结果应符合 5.4 要求。

6.5 文库片段分布

使用试剂盒对企业自行标定的参考品进行文库构建，按照企业规定的检测方法检测文库片段分布，结果应符合 5.5 要求。

6.6 文库测序下机数据

对 NA12878 样本进行测序和分析后相应下机数据指标应达到 5.6 的要求。

7. 标识标签和使用说明书

应符合 GB/T 29791.2 的规定。

8. 包装、运输、贮存

8.1 包装

包装试剂盒应按生产企业的要求包装。包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的规定。

8.2 运输

试剂盒应按照生产企业的要求运输。

8.3 贮存

试剂盒应在生产企业规定条件下保存。

9 仪器耗材

核酸染料、琼脂糖、 $1\times$ TAE 电泳缓冲液、DNA Marker、建库试剂盒、无水乙醇、灭菌超纯水、 $0.1\times$ TE、洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)。

低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪、紫外分光光度计、水浴锅、电泳仪、可调式微量移液器、Thermo Qubit 荧光定量仪、Covaris 超声波 DNA 破碎仪、生物安全柜、荧光定量 PCR 仪、凝胶成像系统。

10 文库构建流程

10.1 样本质量检测

10.1.1 DNA 的完整性检测

组织 DNA 与血浆游离 DNA 等核酸样本均应进行检测前的质量分析，包括核酸的浓度和纯度分析。组织 DNA 样本应进行核酸完整性分析，以判断 DNA 质量。血浆游离 DNA 样本应进行片段长度分布分析，以判断是否存在血细胞基因组 DNA 的污染。

注：二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识，声明 11

将提取的 DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳或 Agilent 2100 Bioanalyzer 及其他等效替代产品进行检测。完整性较好的 DNA 样品呈现出明显而清晰的单一条带。

10.1.2 样本的浓度和纯度检测

利用仪器检测核酸的浓度及纯度：核酸浓度可在仪器上直接读出，核酸样品纯度用 OD_{260}/OD_{280} 值检测，纯度较高的 DNA OD_{260}/OD_{280} 值应为 1.7-1.9。

10.2 基因检测文库制备

文库制备方法根据不同的片段化形式可以分为机械打断法建库和片段化酶法建库，具体制备流程见附录 A 和 B。在 PCR 扩增前，使用特异分子标签 (UMIs 或 UMD) 标记技术，以便于准确识别天然重复序列，区分低频突变和检测过程中引入的错误。制备好的文库可以进行杂交捕获，从而对目标区域进行富集，杂交捕获流程见附录 C。除此之外，还有多重扩增子建库的方法可以直接对靶向片段进行富集建库，具体流程见附录 D。

注：针对不同的样本类型如低质量的 FFPE DNA 和 cfDNA 需根据具体情况选择是否

进行 DNA 片段化。

10.3 文库质控

使用 Qubit 仪器或其他等效产品检测文库浓度，Agilent 2100 Bioanalyzer 及其他等效替代产品进行文库片段分布检测，确保出库浓度和峰形在偏差允许范围内。

11 文库保存与记录

11.1 样品保存

质控合格的文库应可以妥善保存在-80°C超低温冰箱中，以保证其在后续分析中的稳定性，避免反复冻融。

11.2 结果记录

应做好样品信息、建库人员、建库方案、文库浓度、文库峰形等文档的登记、标记和存档，便于复核。

附录 A

机械法打断 DNA 的文库构建方法

1. 适用范围

兼容多种样本类型：基因组 DNA、游离 DNA、石蜡切片 DNA、多重扩增子等。

2. 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯或生化试剂。

VAHTS® Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 (ND607) 试剂盒或 VAHTS® Universal DNA Library Prep Kit for MGI (NDM607)试剂盒、纯化磁珠、DNA Adapter、无水乙醇、灭菌超纯水、 $0.1 \times TE$ 、洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)、低吸附 EP 管、RNase-free PCR 管、磁力架等。

3. 仪器设备

电泳系统、凝胶成像系统、超微量分光光度计、超声破碎仪、全自动核酸蛋白分析系统、荧光定量仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、制冰机

4. 建库步骤

4.1 DNA 片段化

使用超声波破碎仪进行 DNA 打断，打断后 DNA 用全自动核酸蛋白分析系统检测 DNA 的片段分布。

4.2 末端修复 & 5'端磷酸化和 3'端加 dA 尾

4.2.1 配制末端修复组分：

以 VAHTS® Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 为例，将各试剂置于冰上，融化，于灭菌 PCR 管中配制如下反应：

组分	体积
Input DNA	x µl
End Prep Mix 4	15 µl
ddH ₂ O	To 65 µ

4.2.2 使用移液器轻轻吹打混匀（请勿振荡混匀），并短暂离心将反应液收集至管底。

4.2.3 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖 105 °C	On
20°C	15 min
65°C	15 min
4°C	Hold

4.2.4 当反应结束后，将 PCR 管从 PCR 仪中取出放冰上。

4.3 接头连接

4.3.1 将此步骤所需试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

4.3.2 在末端修复后的 PCR 管中配制如下反应：

组分	体积
End Preparation 产物	65 µl
Rapid Ligation buffer 2	25 µl
Rapid DNA ligase	5 µl
DNA Adapter X	5 µl
总计	100 µl

4.3.3 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。

4.3.4 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖 105 °C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

4.4 连接产物纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

4.5 PCR 文库富集。

4.5.1 将对纯化后的 Adapter Ligation 产物进行 PCR 扩增。将所需组分解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制如下反应：

组分	体积
纯化或分选过的 Adapter Ligation 产物	20 µl
PCR Primer Mix 3 for Illumina	5 µl
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 µl
总计	50 µl

4.5.2 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。

4.5.3 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
98°C	20 sec	
60°C	15 sec	循环数选择参照 table1
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

Input DNA	Number of cycles required to generate	
(Into End Preparation)	100 ng	1 µg

100 pg	15 - 17	16 - 19
1 ng	9 - 11	12 - 15
5 ng	7 - 9	10 - 14
10 ng	6 - 8	8 - 12
50 ng	4 - 6	7 - 10
100 ng	2 - 4	5 - 8
250 ng	1 - 3	4 - 7
500 ng	0	2 - 5
1 µg	0	2 - 5

Table 1 100 pg - 1 µg Input DNA 扩增循环数推荐表

4.6 PCR 富集产物纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

4.7 文库质量控制

4.7.1 文库浓度测定：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit；基于 qPCR 绝对定量的方法，如 VAHTS Library Quantification Kit for Illumina。

4.7.2 文库长度分布检测：通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行长度分布检测。

附录 B

片段化酶法打断 DNA 的文库构建方法

1 适用范围

兼容基因组 DNA、石蜡切片 DNA 等。

2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯或生化试剂。

VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina V2 (ND627)试剂盒或 VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI V2 (NDM627)试剂盒、纯化磁珠、DNA Adapter、无水乙醇、灭菌超纯水、0.1 × TE、洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)、低吸附 EP 管、RNase-free PCR 管、磁力架等。

3 仪器设备

电泳系统、凝胶成像系统、超微量分光光度计、全自动核酸蛋白分析系统、荧光定量仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、制冰机。

4 建库步骤

4.1 DNA 片段化+末端修复&5'端磷酸化和 3'端加 dA 尾

4.1.1 实验开始前，请确认模板 DNA 溶解于何种溶剂（推荐使用灭菌超纯水），该溶剂是否含有 EDTA。

如不含 EDTA，直接进行步骤 2；如含有 EDTA 如含有 EDTA，可使用 2.2 ×磁珠对模板 DNA 进行纯化，灭菌超纯水洗脱；或根据片段化体系中 EDTA 的终浓度，加入相应体积的 Neutralization Buffer 将 EDTA 中和。

4.1.2 以 VAHTS® Universal Plus DNALibrary Prep Kit for Illumina V2 为例：

将此步骤所需试剂取出，解冻并充分混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。于灭菌 PCR 管中配制如下打断反应：

组分	体积
Input DNA	x μ l
FEA Buffer V2	5 μ l
ddH ₂ O	To 40 μ l

4.1.3 向每个样品中加入 10 μ l FEA Enzyme Mix V2，使用移液器吹打或振荡混匀，并短暂离

心将反应液收集至管底，立即置于 PCR 仪中进行反应！！！！

4.1.4 将 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下程序：

温度	时间
热盖 105°C	On
37°C	参照 table2
65°C	30 min
4°C	Hold

Table 2 片段化时间参考表

预期插入片段大小	片段化时间
150 bp	20 - 30 min
250 bp	15 - 20 min
350 bp	10 - 15 min
550 bp	6 - 10 min

4.2 接头连接

4.2.1 将此步骤所需试剂从-20℃取出，解冻并充分混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

4.2.2 按照下表配制反应体系：

组分	体积
上一步产物	50 μ l
Rapid Ligation Buffer V2	25 μ l
Rapid DNA Ligase V2	5 μ l
ddH ₂ O	15 μ l
DNA Adapter X	5 μ l

4.2.3 使用移液器吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

4.2.4 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

组分	体积
热盖 105℃	On
20℃	15 min
4℃	Hold

4.3 连接产物纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

4.4 PCR 文库富集

4.4.1 将对纯化或长度分选后的 Adapter Ligation 产物进行 PCR 扩增。将所需组分解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制如下反应：

组分	体积
纯化或分选过的接头连接产物	20 μ l
PCR Primer Mix 3 for Illumina	5 μ l
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 μ l
总计	50 μ l

4.4.2 使用移液器轻轻吹打混匀（请勿振荡混匀），并短暂离心将反应液收集至管底。

4.4.3 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
98°C	20 sec	
60°C	15 sec	循环数参照附录 A 的 Table1
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

4.5 PCR 富集产物纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

4.6 文库质量控制

4.6.1 文库浓度测定：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit；
基于 qPCR 绝对定量的方法，如 VAHTS Library Quantification Kit for Illumina。

4.6.2 文库长度分布检测：通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行长度分布检测。

附录 C

杂交捕获方法

1 文库混合与浓缩

预文库制备方法参考附录 AB。

1.1 于 1.5 ml Nuclease-free 离心管中配制如下反应体系：

组分	体积
预文库	X μl（500 ng/文库，一杂多时，文库总量不超过 5 μg）
Cot-1 DNA	5 μl
Universal Blockers	2 μl

1.2 使用真空浓缩仪（温度不高于 50°C）将上述步骤 Nuclease-free 离心管中溶液蒸干备用。

2 文库与探针杂交

2.1 将杂交捕获试剂从-20℃取出，解冻并混匀，按照下表所示，将各试剂加入上述步骤的 EP 管中。

组分	体积
2 × Hybridization Buffer	8.5 μl
Hybridization Enhancer	2.7 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	1.8 μl
探针	4 μl
Total	17 μl

2.2 室温静置 10 min 后，使用移液器吹打混匀，并转移至新的 200 μl 低吸附 PCR 管中。

2.3 将 PCR 管置于 PCR 仪中运行如下程序：

温度	时间
热盖 100℃	On
95℃	30 sec
65℃	4 - 16 h

3 试剂配制

3.1 漂洗 Buffer 准备

按照下表准备试剂，将对应的试剂稀释至 1×，下表对应的试剂量为一个捕获反应所需体积。

组分	Buffer 体积	Nuclease-free ddH ₂ O 体积	1 × 工作液体 积（每反应）	温度
2 × Beads Wash Buffer	200 μl	200 μl	400 μl	室温
10 × Wash Buffer I	30 μl	270 μl	300 μl	取 110 μl 于 65℃加热待用，其余室温待用
10 × Wash Buffer II	20 μl	180 μl	200 μl	室温
10 × Wash Buffer III	20 μl	180 μl	200 μl	室温
10 × Wash Buffer S	40 μl	360 μl	400 μl	65℃

3.2 磁珠重悬液配制

按照下表配制磁珠重悬液，涡旋混匀待用。下表为一个捕获反应所需量。

组分	体积
2 × Hybridization Buffer	8.5 μl
Hybridization Enhancer	2.7 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	5.8 μl
Total	17 μl

4 CA-28 Streptavidin Beads 清洗

一个捕获反应所需 CA-28 Streptavidin Beads 的用量为 100 μl。

- 4.1 将 CA-28 Streptavidin Beads 从冰箱中 (4°C) 取出平衡至室温 (约 30 min)。
- 4.2 取用前，涡旋振荡至少 15 sec 以充分混匀。
- 4.3 取 100 μl CA-28 Streptavidin Beads 加入到新的 200 μl 低吸附 PCR 管中。
- 4.4 将 PCR 管放到磁力架上，至溶液澄清。
- 4.5 吸弃上清，切勿扰动磁珠。
- 4.6 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 200 μl 1 × Beads Wash Buffer，涡旋振荡 10 sec。
- 4.7 将 PCR 管瞬时离心，放到磁力架上，至溶液澄清，吸弃上清，切勿扰动磁珠。
- 4.8 重复步骤 4.6 - 4.7 一次，总计漂洗磁珠两次。
- 4.9 将 PCR 管从磁力架上取下，加入步骤 3.2 的 17 μl 磁珠重悬液，重悬磁珠待用。

5 CA-28 Streptavidin Beads 捕获

5.1 保持步骤 2.3 杂交反应液始终在 PCR 仪中，将步骤 4.9 重悬好的磁珠放至杂交反应 PCR 仪 (热盖 100°C) 中预热 1 min，将预热的磁珠快速转移到步骤 2.3 的杂交反应液中，使用移液器吹打 15 次，保证充分混匀。

5.2 65°C 孵育 45 min，期间每隔 15 min 取出快速轻柔涡旋一次，使磁珠处于悬浮状态。

6 捕获后漂洗

6.1 65°C 热漂洗 (热盖温度为 65°C)

- 6.1.1 提前准备一台热盖温度和孵育温度均为 65°C 的 PCR 仪。
- 6.1.2 磁珠捕获结束后，将步骤 5.2 的 PCR 管转移至热盖温度和孵育温度均为 65°C 的 PCR 仪中。
- 6.1.3 将 100 μl 提前预热至 65°C 的 1 × Wash Buffer I 加入至步骤 b 的 PCR 管中，使用移液器吹打 10 次，使其充分混匀。
- 6.1.4 将 PCR 管置于磁力架上静置 30 sec，溶液澄清后移除上清。
- 6.1.5 迅速将 PCR 管放回至 65°C PCR 仪中，立即向 PCR 管中加入 180 μl 提前预热至 65°C 的 1 × Wash Buffer S，使用移液器吹打 10 次，使其充分混匀，盖上管盖，于 PCR 仪中 65°C

孵育 5 min。

6.1.6 孵育期间每隔 2.5 min，使用移液器吹打 10 次，使其充分混匀。

6.1.7 反应结束后，取出 PCR 管，瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，溶液澄清后移除上清。

6.1.8 重复步骤 6.1.5-6.1.7 一次，使用预热的 Wash Buffer S 总计热漂洗两次。

6.2 室温漂洗

6.2.1 向 PCR 管中加入 180 μ l 1 \times Wash Buffer I，涡旋振荡混匀，室温孵育 2 min，期间每隔 30 sec 振荡混匀一次，确保充分混匀。

6.2.2 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上静置 1 min，溶液澄清后小心移除上清。向 PCR 管中加入 180 μ l 1 \times Wash Buffer II，涡旋振荡混匀，室温孵育 2 min，期间每隔 30 sec 振荡混匀一次，确保充分混匀。

6.2.3 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上 1 min，溶液澄清后小心移除上清。向 PCR 管中加入 180 μ l 1 \times Wash Buffer III，涡旋振荡混匀，室温孵育 2 min，期间每隔 30 sec 振荡混匀一次，确保充分混匀。

6.2.4 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上 1 min，溶液澄清后小心移除上清。向 PCR 管中加入 20 μ l Nuclease-free ddH₂O，重悬磁珠。

7 Post-Capture PCR 扩增

7.1 按照下表配制反应体系：

Buffer 名称	体积
上一步的重悬磁珠	20 μ l
2 \times VAHTS HiFi Amplification Mix 2	25 μ l
Post-PCR Primer Mix	5 μ l

7.2 移液器吹打或涡旋混匀，将 PCR 管置于 PCR 仪中运行如下程序：

步骤	温度	时间	循环数
1	98°C	45 sec	1
2	98°C	15 sec	
3	60°C	30 sec	循环数选择参照 table3
4	72°C	30 sec	
5	72°C	1 min	1
6	4°C	Hold	1

Table 3 捕获后扩增循环数参考表

Panel 大小	1 杂	4 杂	8 杂	12 杂
----------	-----	-----	-----	------

Exome(≥ 30 Mb)	10	8	7	6
3 Mb	14	13	13	11
0.3 Mb	15	14	14	12

7.3 扩增产物纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

8 文库质控

8.1 文库浓度检测：

基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit；基于 qPCR 绝对定量的方法，如 VAHTS Library Quantification Kit for Illumina。

8.2 文库长度分布检测：

文库长度分布可通过 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 进行文库分布检测。

附录 D

扩增子建库方法

1 适用范围

兼容多种样本类型：细胞或组织 DNA、游离 DNA、石蜡切片 DNA 等。

2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯或生化试剂。

VAHTS AmpSeq Library Prep Kit V3 (NA210) 试剂盒、纯化磁珠、DNA Adapter、无水乙醇、灭菌超纯水、低吸附 EP 管、RNase-free PCR 管、磁力架等。

3 仪器设备

电泳系统、凝胶成像系统、超微量分光光度计、超声破碎仪、全自动核酸蛋白分析系统、荧光定量仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、制冰机

4 建库步骤

4.1 多重 PCR

此步骤目的是以 DNA 为模板，使用目标区域引物 Panel 进行多重 PCR，得到目标区域的扩增子。以下步骤以 2 × Panel 作为范例。以 VAHTS® AmpSeq Library Prep Kit V3 (NA210) 为例进行文库构建。

4.1.1 将所需组分取出，置于冰上解冻，充分融化后上下颠倒混匀并短暂离心，冰上放置。在冰上配制以下反应体系：

组分	体积
DNA 模板	x μl
2 × Panel	10 μl
4 × VAHTS Multi-PCR Mix	5 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	To 20 μl

4.1.2 使用移液器轻轻吹打混匀（请勿振荡混匀），并短暂离心将反应液收集至管底。

4.1.3 将 PCR 管置于 PCR 仪中，热盖设置为 105°C，运行如下程序：

步骤	温度	时间	循环数
1	99°C	2 min	1
2	99°C	15 sec	
3	60°C	4 min	循环数选择参照 Table4-5
4	72°C	10 min	
5	4°C	Hold	1

Table 4 多重扩增循环数引物重数参考表：

单管引物重数	正常来源 DNA	FFPE/cfDNA
10 - 50	22 - 24	25 - 27
50 - 200	20 - 22	23 - 25
200 - 1,000	17 - 20	20 - 23
≥1,000	15 - 17	18 - 20

Table5 多重扩增循环数模板投入量参考表：

起始模板量	扩增循环数
1 ng (300 Copies)	+3
10 ng (3,000 Copies)	0
100 ng (30,000 Copies)	-3

4.2 消化部分引物序列

4.2.1 将 VAHTS Digest Mix 2 轻弹混匀，短暂离心，置于冰上，并于冰上配制如下反应体系。

组分	体积
上述反应产物	20 μ l
VAHTS Digest Mix 2	2.5 μ l

4.2.2 将 PCR 管置于 PCR 仪中，热盖设置为 105°C，运行如下程序：

温度	时间	
	Panel<1000 重	Panel \geq 1000 重
50°C	10 min	20 min
55°C	10 min	20 min
60°C	20 min	20 min
4°C	Hold	Hold

4.3 扩增子接头连接与文库纯化

4.3.1 将此步骤所需试剂取出，置于冰上解冻，充分融化后上下颠倒混匀、短暂离心，冰上放置。于冰上将如下各反应组分依次加入上述反应产物中：

组分	体积
上述反应产物	22.5 μ l
VAHTS Ligation Enhancera	6 μ l
VAHTS Ampseq Adaptersb	1 μ l
VAHTS Ligation Enzyme Mix 2	1 μ l

4.3.2 将 PCR 管置于 PCR 仪中，热盖设置为 105°C，运行如下程序：

温度	时间
22°C	30 min
72°C	10 min
4°C	Hold

4.3.3 连接产物纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

4.4 文库扩增与纯化

4.4.1 将所需组分取出，置于冰上解冻，充分融化后上下颠倒混匀并短暂离心，冰上放置。在冰上配制以下反应体系：

组分	体积
纯化文库	20 μ l
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 μ l
PCR Primer Mix	5 μ l

4.4.2 将 PCR 管置于 PCR 仪中，热盖设置为 105°C，运行如下程序：

步骤	温度	时间	循环数
1	95°C	3 min	1
2	98°C	20 sec	
3	60°C	15 sec	5 cycles
4	72°C	30 sec	
5	72°C	10 min	1
6	4°C	Hold	1

4.4.3 文库纯化

使用 VAHTS DNA Clean Beads 对反应产物进行磁珠纯化，具体纯化流程见附录 E。

4.5 文库质控

4.5.1 文库浓度检测：

基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Equalbit 1 \times dsDNA HS Assay Kit；基于 qPCR 绝对定量的方法，如 VAHTS Library Quantification Kit for Illumina。

4.5.2 文库长度分布检测：

文库长度分布可通过 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 进行文库分布检测。

附录 E

连接/扩增产物纯化方法

- 1 使用前请将 VAHTS DNA Clean Beads 振荡混匀并平衡至室温。配制足量新鲜的 80%乙醇，每个样品约需要 400 μ l。
- 2 涡旋 VAHTS DNA Clean Beads 使其充分混匀，加 X μ l VAHTS DNA Clean Beads 到 PCR/其它反应体系中，使用移液器轻轻吹打 10 次以保证整个体系均匀。室温孵育 8 min，使 DNA 分子结合到磁珠上。
- 3 将反应管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体。
- 4 保持 PCR 管在磁力架上，待溶液澄清（约 5 min）后，小心弃去上清，注意不要扰动磁珠。
- 5 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μ l 新鲜配制的 80%乙醇，注意加入乙醇时不要扰动磁珠，孵育 30 sec 后小心移除上清。
- 6 重复步骤 5，共漂洗两次。
- 7 短暂离心将样品收集至 PCR 管底，并置于磁力架上 30 sec，用移液器吸走所有残留乙醇。
- 8 开盖空气干燥 3 - 5 min。
- 9 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μ l Elution Buffer（或 ddH₂O）覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠。室温孵育 2 min。
- 10 将 PCR 管短暂离心收集后置于磁力架中，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 5 min）。
- 11 小心吸取 20 μ l 上清转移至新的 EP 管中，-20℃保存。

参考文献

- [1] NY/T 674-2003 转基因植物及其产品检测 DNA 提取和纯化
- [2] SF/T 0070-2020 染色体遗传标记高通量测序与法医学应用规范
- [3] GA/T 1693-2020 法庭科学 DNA 二代测序检验规范
- [4] YY/T 1717-2020 核酸提取试剂盒(磁珠法)
- [5] GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则
- [6] 江媛, 沈寒婕, 李巧玲,等. 一种 DNA 末端修复与加 A 的方法:, CN109689872A[P]. 2019.
- [7] 刘鹏飞, 杨希寅, 韩雪,等. 利用射线实现供二代测序使用的 DNA 片段化的方法及装置:, CN106282159A[P].
- [8] 邵华武, 邵阳. 杂交富集捕获 DNA 测序文库洗涤溶液及洗涤方法:, CN104178817A[P]. 2014.