

Fast DNA Library Plus Prep Kit

使用说明书

【产品名称】

Fast DNA Library Plus Prep Kit

【货号/规格】

K004-A (24 rxns) ; K004-B (96 rxns) ; 试用装 (6 rxns)

【产品简述】

本试剂盒针对 Illumina 高通量测序平台, 提供了一管式便捷、通用的 DNA 文库构建方案, 将片段化、末端补平和末端加 A 结合到一个步骤, 大大缩短了建库的时间、减少了繁琐步骤造成的误差, 片段化和末端修复后的产物可直接进行接头连接, 不需额外纯化, 后续操作和 #K001 Fast DNA Library Prep Kit 操作相同。完整的文库定量可将文库稀释至合适浓度, 用双链 DNA 荧光染料方法 (如 Thermo Qubit Flex Fluorometer) 或 qPCR 绝对定量方法。

【样本类型】

表 1 常用 DNA 推荐投入量

| 应用 | 样本类型 | 推荐投入量 |
|-------------------|----------|----------------------------|
| 全基因组测序 | 高质量复杂基因组 | 50ng-1μg |
| 全外显子靶向捕获测序 | 高质量复杂基因组 | 10ng-1μg |
| 全基因组靶向捕获测序 | FFPE DNA | ≥50ng |
| 全基因组测序 | 微生物基因组 | 1ng-1μg |
| 全基因组测序 (PCR-free) | 高质量 DNA | ≥50ng (不分选) ≥200ng (分选) |

推荐使用 TE 或超纯水溶解 DNA 样品, 如样品中含有 EDTA, 则需磁珠纯化或加入一定体积的 Neutralization Buffer 中和。

【储存条件及有效期】

所有试剂均应保存于 -20℃, Ligation Buffer 在低温下会有晶体析出, 属正常现象, 应平衡至室温后使用, 产品有效期为 12 个月。

【组成成分】

| 组分 | 24 rxns | 96 rxns |
|--------------------------------|---------|----------|
| FEP Buffer | 120 μl | 480 μl |
| FEP Enzyme Mix | 240 μl | 2×480 μl |
| Fast DNA Ligase | 120 μl | 2×240 μl |
| Fast Ligation Buffer | 600 μl | 4×600 μl |
| 2× HIFI Library PCR Master Mix | 600 μl | 4×600 μl |
| Primer Mix* | 120 μl | 480 μl |
| Neutralization Buffer | 120 μl | 480 μl |

*FEP Buffer 为片段化、末端修复的反应 buffer, FEP Enzyme Mix 为片段化、末端修复相关酶混合物。

*若有多个样本, 则推荐使用 #K002 和 #K003 接头引物组合, 本试剂盒提供一套含 index 的引物, 引物序列如下, [] 中为 8bp index:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[TGCTTCCA] AACTCTTTCCCTACACGACGCTC-3'

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[ATCGATCG] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT-3'

备注: 分选磁珠推荐使用 #NC1011 GDSPure DNA Selection Magbeads 或 AMPure XP beads。

【注意事项】

1. 我们提供两套不完整接头引物 (GDS Adapter, #K002 和 #K003, 需另外购买), 除此之外, 客户也可以针对 Illumina 测序平台选择其他厂家或自行合成合适的接头, 接头过量将会导致接头二聚体的形成, 接头不足会导致文库产出低, 因此, 合适的接头浓度决定了文库的浓度和质量。不同的 DNA 投入量对应的推荐接头浓度见下表:

表2 Adapter 推荐的使用浓度

| DNA 投入量 | Adapter 推荐浓度 | Adapter:Insert 摩尔比* | GDS Adapter 稀释度 |
|---------|--------------|---------------------|-----------------|
| 1μg | 10μM | 10:1 | 不稀释 |
| 500ng | 10μM | 20:1 | 不稀释 |
| 250ng | 10μM | 40:1 | 不稀释 |
| 100ng | 7.5μM | 100:1 | 3:4 |
| 50ng | 5μM | 200:1 | 1:2 |

| | | | |
|------|-------|-------|------|
| 25ng | 2.5μM | 200:1 | 1:4 |
| 1ng | 1μM | 200:1 | 1:10 |

* Adapter:Insert摩尔比指的是其他来源的Adapter摩尔数和Input DNA摩尔数的比值，可参照以下公式粗略计算Input DNA摩尔数：

Input DNA摩尔数(pmol)≈Input DNA质量(ng)/[0.66×Input DNA平均长度(bp)]

* Adapter的质量和浓度很大程度上影响了文库的产出，尤其是低投入量的建库。应选用优质来源的Adapter，连接前用0.1×TE提前稀释成合适浓度，现配现用，保证每次加样量为固定的5 μl，避免加样错误，并尽量避免反复冻融。

2. 2× HIFI Library PCR Master Mix 用的酶是一种 B 家族 DNA 聚合酶，具有 5'-3'聚合酶和 3'-5'核酸外切酶活性，但缺乏 5'-3'核酸外切酶活性，具有极高的保真度和均一性，持续合成能力强。严格控制扩增循环数对文库产出尤为重要，下表为不同的 DNA 投入量对应的推荐扩增循环数：

表3 不同样品投入量对应的推荐扩增循环数

| Input DNA | 推荐的扩增循环数 | |
|-----------|----------|--------|
| | 100ng 文库 | 1μg 文库 |
| 1μg | 0 | 2-5 |
| 500ng | 0 | 2-5 |
| 250ng | 1-3 | 5-7 |
| 100ng | 2-4 | 6-8 |
| 50ng | 4-6 | 8-10 |
| 25ng | 5-7 | 9-12 |
| 10ng | 7-9 | 11-13 |
| 5ng | 9-11 | 13-14 |
| 2.5ng | 10-12 | 14-16 |
| 1ng | 11-13 | 15-17 |

备注：1. 上表为使用 150bp 标准DNA 测试结果，仅供参考。

2. 如使用不完整接头，则应扩增最少循环数（1-3）才能得到完整文库。

3. 如投入 DNA 质量较差，或建库过程中进行过长度分选，则应适当提高扩增循环数。

【标准建库流程】

片段化和末端修复

1. 确定模板 DNA 的溶剂成分，如不含有 EDTA，则直接进行步骤 2；如含有 EDTA，则用 2.2×的磁珠进行纯化，或按照下表 EDTA 的含量加入对应体积的 Neutralization Buffer 进行中和：

| EDTA 浓度 | Neutralization Buffer 加入体积 |
|---------|----------------------------|
| 1mM | 5 μl |
| 0.8mM | 4 μl |
| 0.6mM | 3 μl |
| 0.5mM | 2.5 μl |
| 0.4mM | 2 μl |
| 0.2mM | 1 μl |
| 0.1mM | 0.5 μl |
| <0.1mM | 0 μl |

2. 在 PCR 管中配制如下反应：

| 试剂 | 体积 |
|-----------------------|----------|
| Input DNA | X μl |
| FEP Buffer | 5 μl |
| Neutralization Buffer | Y μl |
| ddH ₂ O | To 65 μl |

3. 在上述体系中加入 10 μl FEP Enzyme Mix，吹打均匀后短暂离心，**立即放入 PCR 仪 中进**

行下述反应：

| 温度 | 时间 |
|-----|-------|
| 20℃ | 15min |
| 37℃ | 参照表4 |
| 65℃ | 15min |
| 4℃ | ∞ |

表 4 得到不同长度文库所需保温时间

| 片段长度 | 时间 |
|-------|----------|
| 150bp | 20-30min |

| | |
|-------|----------|
| 250bp | 15-20min |
| 350bp | 10-15min |
| 550bp | 6-10min |

接头连接

1. 片段化和末端修复后尽快进行连接反应。
2. 根据表 2 对接头进行稀释。
3. 配制如下反应：

| 试剂 | 体积 |
|----------------------|-------------|
| 前一步产物 | 50 μ l |
| Fast Ligation Buffer | 25 μ l |
| Fast DNA Ligase | 5 μ l |
| Adapter X | 5 μ l |
| ddH ₂ O | 15 μ l |
| Total | 100 μ l |

4. 用移液枪小心吹打 10 次混匀，短暂离心将所有液体移至管底。
5. 在热循环仪中进行如下反应：

| 温度 | 时间 |
|------|----------|
| 20°C | 15min |
| 4°C | ∞ |

磁珠纯化/长度分选推荐方案（具体磁珠体积应根据实际样品长度调整）

1. 取100 μ l 连接产物加入合适的离心管中。
2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入 100 μ l 磁珠悬液，用移液器轻轻吹打 10 次（或涡旋 30s）室温静置 5min。
3. 将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，用移液器吸去上清，弃上清。注意不要吸到磁珠。
4. 保持离心管在磁力架上，加入 200 μ l 80%新鲜配制的乙醇溶液，请勿吹打磁珠。室温静置 30s，用移液器吸去上清，弃上清。
5. 重复步骤 4 一次，最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。
6. 保持离心管在磁力架上，自然风干至磁珠表面无明显光泽。

注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

7. 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 22 μ l 洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）反复吹打至少 10 次（或涡旋 30s）使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。
8. 将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，将 20 μ l 上清液转移到新的离心管中，产物尽快进行后续实验或放在-20°C长期保存。

文库扩增

1. 在 PCR 管中配制如下反应：

| 试剂 | 体积 |
|--|------------|
| 纯化或分选后的连接产物 | 20 μ l |
| 2 \times HIFI Library PCR Master Mix | 25 μ l |
| Primer mix | 5 μ l |
| Total | 50 μ l |

2. 用移液枪小心吹打 10 次混匀，短暂离心将所有液体移至管底。
3. 在热循环仪中进行如下反应：

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|----------|-------------|
| 95°C | 3min | 1 |
| 98°C | 20sec | 根据表3选择适当循环数 |
| 60°C | 15sec | |
| 72°C | 30sec | |
| 72°C | 5min | 1 |
| 4°C | ∞ | - |

磁珠纯化/长度分选推荐方案（具体磁珠体积应根据实际样品长度调整）

1. 取50 μ l 连接产物加入合适的离心管中。
2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入 45 μ l 磁珠悬液，用移液器轻轻吹打 10 次（或涡旋 30s）室温静置 5min。
3. 将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，用移液器吸去上清，弃上清。注意不要吸到磁珠。
4. 保持离心管在磁力架上，加入 200 μ l 80%新鲜配制的乙醇溶液，请勿吹打磁珠。室温静置 30s，用移液器吸去上清，弃上清。
5. 重复步骤 4 一次，最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

6. 保持离心管在磁力架上，自然风干至磁珠表面无明显光泽。

注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

7. 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 22 μ l 洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）反复吹打至少 10 次（或涡旋 30s）使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。

8. 将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，将 20 μ l 上清液转移到新的离心管中，产物可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 1-2 周，于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

【附录】双侧磁珠分选操作及比例推荐方案

如需进行双轮长度分选，我们提供如下磁珠分选比例方案，可根据预期文库长度来选择适当的磁珠体积，长度分选可以选择在末端修复前或扩增之后，两次或两次以上的双轮分选将会大大降低文库产出率。

下表中文库体积补全至 100 μ l，根据预期文库大小选择两轮分别加入的磁珠体积，并根据下述说明进行分选操作。

表 5 双轮磁珠分选推荐加入量

| 预期文库大小 | | 150bp | 200bp | 250bp | 300bp | 400bp | 500bp | 600bp | 700bp |
|----------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 磁珠体积(μ l) | 一轮 | 100 | 90 | 80 | 70 | 60 | 55 | 50 | 45 |
| | 二轮 | 30 | 20 | 20 | 20 | 20 | 15 | 15 | 15 |

1. 将文库补全至 100 μ l，加入至 200 μ l PCR 管中，标上编号 A，按表 5 加入特定体积的磁珠（一轮），用移液器吹打 30s，室温静置 5min。

2. 将 PCR 管置于磁性分离器上至溶液变得澄清，用移液器将上清转移到一个新的 PCR 管中，标上编号 B，弃磁珠。

3. 在管 B 中按表 5 加入特定体积的磁珠（二轮），用移液器吹打 30s，室温静置 5min，将 PCR 管置于磁性分离器上至溶液变得澄清，用移液器吸去上清。

4. 保持 PCR 管在磁性分离器上，加入 200 μ l 80% 新鲜配制的乙醇溶液，室温静置 30s，用移液器吸去上清，弃上清。

5. 重复步骤 4 一次，最后一次洗涤应尽量吸去干净洗涤液。

6. 保持管 B 在磁性分离器上，风干至磁珠表面无明显光泽。应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

7. 将管 B 从磁力架上取下，向管中加入 22 μ l 洗脱液，反复吹打至少 10 次（或涡旋 30s）使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。

备注：如不进行靶向捕获，则加洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）如进行靶向捕获，则用灭菌超纯水进行洗脱。

8. 将管 B 置于磁力架上至溶液变得澄清，将 20 μ l 上清液转移到新的离心管中。

本品仅供科学研究使用

图1 标准建库流程图

