

1STEP Universal DNA Library Prep Kit

使用说明书

【产品名称】

1STEP Universal DNA Library Prep Kit

【货号/规格】

K018-A/24 rxns; K018-B/96 rxns

【产品简述】

1STEP Universal DNA Library Prep Kit是一款通用型的酶切法DNA文库制备试剂盒，产物可通过Illumina、MG/等高通量测序平台进行测序。本试剂盒可一步完成DNA片段化、末端修复和加dA尾，产物无需纯化，可直接进行接头连接，从而简化了操作流程，将建库时间缩短至2 h内。本试剂盒采用热启动型高保真DNA聚合酶进行文库扩增，兼容各种来源的1 ng至500 ng的DNA样本，文库转化成功率高。本试剂盒亦适用于PCR-free的文库构建。

【储存条件】

-20℃。

【组成成分】

组分	K018-A	K018-B
1STEP FEA Buffer	240 μ l	960 μ l
1STEP FEA Enzyme Mix	120 μ l	480 μ l
Adapter Ligation Buffer	816 μ l	816 μ l $\times$ 4
Adapter Ligation Enzyme	144 μ l	576 μ l
HIFI Hotstart PCR Mix	600 μ l	600 μ l $\times$ 4

【适用范围】

投入量为1 ng- 500 ng的各种来源的DNA制备高通量测序文库，用于全基因组测序、宏基因组测序、外显子测序、靶向测序等。

【产品特点】

- 一步集成建库：单管同步完成DNA片段化、末端修复与加dA尾，省略中间纯化。
- 全平台兼容：文库直接适配Illumina、MG/等主流高通量测序平台。
- 广谱样本支持：兼容1 ng - 500 ng不同来源不同类型方DNA样本，高转化成功率。
- 高保真防污染：采用热启动高保真酶，抑制非特异扩增，背景核酸残留低。
- 灵活PCR-free：可选无扩增建库，规避偏好性，覆盖均一。

【自备试剂】

Adapter, PCR引物、无核酸酶纯水、分选/纯化磁珠（推荐东盛#NC1011 GDSPure DNA Selection Magbeads或AMPure XP beads）、无水乙醇、文库定量试剂（推荐东盛#P6021 PicoGreen dsDNA定量试剂或Qubit试剂等）。

【标准建库流程】

A 片段化、末端修复、加dA尾/Fragmentation, End Preparation & dA-tailing

你们这一步骤将Input DNA末端补平，并在5'端进行磷酸化和3'端加dA尾。

1. 将1STEP FEA Buffer、1STEP FEA Enzyme Mix解冻并混匀，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。

2. 在灭菌200 μ l PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
Input DNA	X μ l
1STEP FEA Buffer	10 μ l
1STEP FEA Enzyme Mix	5 μ l
ddH ₂ O	To 50 μ l

3. 用移液枪小心吹打混匀，短暂离心将所有液体移至管底。立即进行下一步。

4. 在热循环仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖85℃	ON
4℃ ¹	1 min
30℃	5-25 min ²
72℃	10 min
4℃	∞

注：1. 预先设置4℃可避免过度酶切，待仪器温度降至4℃后再将反应物放入。

2. 根据目标插入片段大小调整酶切反应时间，酶切后的片段在100-400 bp之间，时间越长，小片段越多。

B 接头连接/Adapter Ligation

这一步骤将在End Preparation产物末端连接Adapter。

1. 根据Input DNA量按表1稀释Adapter至合适浓度。

表1 Adapter 推荐的使用浓度

DNA 投入量	<5 ng	5-100 ng	100-500 ng	100 pg
Adapter 终浓度	0.02-0.05 μ M	0.05-0.5 μ M	0.5-1 μ M	1:200

注：PCR-Free建库需要使用含Index的完整Adapter。

2. 将Adapter Ligation Buffer、Adapter Ligation Enzyme解冻并混匀，短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

3. 在步骤A的PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
上一步产物	50 μ l
Adapter Ligation Buffer	34 μ l
Adapter Ligation Enzyme	6 μ l
Adapter X	X μ l
ddH ₂ O	To 100 μ l

4. 用移液枪小心吹打混匀，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
热盖	OFF
20°C	15 min
4°C	∞

6. 使用GDSPure DNA Selection Magbeads纯化产物：

将磁珠平衡至室温后使用。

6.1. 取100 μ l连接产物加入1.5 ml离心管中。

6.2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入80 μ l磁珠悬液，用移液器轻轻吹打10次混匀，室温静置5 min。

6.3. 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。

6.4. 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30 sec，用移液器吸去上清，弃上清。

6.5. 重复步骤 6.4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

6.6. 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。

6.7. 将离心管从磁力架上取下，进行洗脱：向管中加入21 μ l无核酸酶的ddH₂O，用移液器轻轻反复吹打，使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置3-5 min。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PCR管中。

注：此处样品长期保存置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

C 文库扩增/Library Amplification

这一步骤将对纯化后的Adapter Ligation产物进行PCR扩增。是否需要进行这一步骤取决于Input DNA量、Adapter是否为完整长度、应用需要等因素。如使用非完整长度Adapter，必须进行这一步骤。如使用完整长度Adapter，当Input DNA < 50 ng时，推荐进行Library Amplification；当Input DNA $\geq$ 50 ng或者不需要进行文库扩增富集时，此步骤可不进行，直接进入文库质控/Library Quality Control。

1. 将HIFI Hotstart PCR Mix、PCR引物解冻并混匀，短暂离心收集至管底，于200 μ l PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
纯化后的连接产物	20 μ l
HIFI Hotstart PCR Mix	25 μ l
PCR Primer	5 μ l
Total	50 μ l

2. 用移液枪小心吹打混匀，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
98°C	45 sec	-
98°C	15 sec	根据表 2 选择适当循环数
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	-
4°C	∞	-

表2 不同样品投入量对应的推荐扩增循环数

Input DNA	1 μ g 文库产量推荐的扩增循环数
> 200 ng	3-5
100 ng	4-6
50 ng	5-7
10 ng	7-9
1 ng	13-15

注：上表仅供参考。当DNA质量较差或者片段化时间不同时，需适当调整循环数以获取足量文库。

4. 使用GDSPure DNA Selection Magbeads对反应产物进行纯化：

将磁珠平衡至室温后使用。

- 4.1. 取50 μ l扩增产物加入合适的离心管中。
 - 4.2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入50 μ l磁珠悬液，用移液器轻轻吹打10次混匀，室温静置5 min。
 - 4.3. 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。
 - 4.4. 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30 sec，用移液器吸去上清，弃上清。
 - 4.5. 重复步骤 4.4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。
 - 4.6. 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。
- 4.7. 将离心管从磁力架上取下，进行洗脱：向管中加入27 μ l无核酸酶的ddH₂O，用移液器轻轻反复吹打，使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置3-5 min。将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，将25 μ l上清液转移到新的PCR管中。

注：此处样品长期保存置于-20℃，避免不必要的反复冻融。

D 文库质控/Library Quality Control

通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

文库长度分布检测：可通过LabChip GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer); Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies); Fragment Analyzer (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备进行检测。

文库浓度检测常用方法有两种：基于双链DNA荧光染料的方法，如PicoGreen等；基于qPCR绝对定量的方法。推荐使用基于qPCR绝对定量的方法进行文库浓度测定。

图1 K018建库流程图

