

Fast DNA Library Prep Kit V2

使用说明书

【产品名称】

Fast DNA Library Prep Kit V2

【货号/规格】

K001S-A (24 rxns) ; K001S-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, 可在约 2h 内对片段化后的双链 DNA 进行末端修复、接头连接、扩增、纯化。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】

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
全基因组靶向捕获测序	cfDNA/ctDNA	≥100pg
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)
ChIP-Seq	ChIP DNA	≥100pg
靶向测序	扩增子	≥100pg

【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
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	120 μl	2×240 μl
End Repair & A-Tailing Buffer	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

*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]ACACTCTTCCCTACACGACGCTC-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1 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2 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】

末端修复

注意：此步前若片段化 DNA 超过 45μl，或缓冲液与末端修复缓冲液不兼容，应先进行一次磁珠纯化。

1. 在200μl PCR 管中配制如下反应：

试剂	体积
Fragmented DNA	适量
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	5 μl
End Repair & A-Tailing Buffer	10 μl
ddH ₂ O	To 65 μl

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
20℃	15min
65℃	15min
4℃	∞

接头连接

1. 末端修复后尽快进行连接反应。

2. 根据表 1 对接头进行稀释。

3. 配制如下反应：

试剂	体积
末端修复产物	65 μl
Fast Ligation Buffer	25 μl
Fast DNA Ligase	5 μl
Adapter X	5 μl
Total	100 μl

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℃	15min
4℃	∞

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100μl 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 100μl 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 200μl 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 22μl 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 20ul 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℃长期保存。

文库扩增

1. 在200μl 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 μl
2× HIFI Library PCR Master Mix	25 μl
Primer mix	5 μl
Total	50 μl

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℃	3min	1
98℃	20sec	

60℃	15sec	根据表 2 选择适当循环数
72℃	30sec	
72℃	5min	1
4℃	∞	

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50μl 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 45μl 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 200μl 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 22μl 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 20μl 上清液转移到新的离心管中，产物可在 2-8℃保存 1-2 周，于-20℃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 100μl，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 3 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(μl)	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 100μl，加入至 200μl PCR 管中，标上编号 A，按表 3 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 3 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 200μl 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 22μl 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 20μl 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

