

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] A CACTCTTCCCTACACGACGCTC-3'

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[ATCGATCG] TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT-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 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

如需进行二轮长度分选，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，两次或两次以上的二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二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 二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 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 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

