

Universal DNA Library Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

Universal DNA Library Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

K014-A (24 rxns) ; K014-B (96 rxns) ; K014-C (24 rxns) ; K014-D (96 rxns)

【产品简述】

Universal DNA Library Prep Kit for Illumina是一款专为Illumina高通量测序平台设计的文库制备试剂盒。它能够将100pg至1μg的片段化双链input DNA转化为适配Illumina平台的专用文库。作为最新升级版，该试剂盒通过改进末端修复、连接和文库扩增步骤，显著提高了对低质量模板DNA的转化效率，并减少了文库中的重复序列。该试剂盒适用于多种样本类型的PCR/PCR-Free文库构建，并且与靶向捕获流程兼容。本品经过严格的质量检测，从而确保文库制备的质量和效率。

【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	50 ng-1 μg
靶向捕获测序	高质量复杂基因组	10 ng-1 μg
全基因组/靶向捕获测序	FFPE DNA	≥50 ng
全基因组/靶向捕获测序	cfDNA/ctDNA	≥100 pg
全基因组测序	微生物基因组	1 ng-1 μg
全基因组测序 (PCR-free)	高质量 DNA	≥50 ng (不分选) ≥200 ng (分选)
ChIP-Seq	ChIP DNA	≥100 pg
靶向测序	扩增子	≥100 pg

【储存条件】

-20℃。

【组成成分】

组分	K014-A (24 rxns)	K014-B (96 rxns)	K014-C (24 rxns)	K014-D (96 rxns)
End Prep Buffer 2	168 μl	672 μl	168 μl	672 μl
End Prep Enzyme 2	72 μl	288 μl	72 μl	288 μl
Fast DNA Ligase 2	240 μl	4×240 μl	240 μl	4×240 μl
Fast Ligation Buffer 5	720 μl	4×720 μl	720 μl	4×720 μl
2X HIFI PCR Mix 2	600 μl	4×600 μl	-	-
Primer Mix 3	120 μl	480 μl	-	-
Control DNA (50 ng/μl)	10 μl	10 μl	-	-

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

【注意事项】

1. 客户可以针对 Illumina 测序平台选择合适的接头，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*
1 μg	10 μM	10:1
100 ng	5-10 μM	30:1
10 ng	2 μM	100:1
1 ng	0.5 μM	200:1
100 pg	0.1 μM	300:1

* 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： $Input\ DNA\ 摩尔数(pmol) \approx Input\ DNA\ 质量(ng) / [0.66 \times Input\ DNA\ 平均长度(bp)]$

*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0.1X 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5μl，避免加样错误，并尽量避免反复冻融。

2. 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 (1μg 文库)
-----------	-------------------

1 μ g	3-5
100 ng	6-8
10 ng	10-13
1 ng	13-15
100 pg	17-19

注：1. 上表为使用 200bp 标准 DNA 测试结果，仅供参考。

2. 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】

A 末端修复/End Preparation

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. 在灭菌 200 μ l PCR 管中配制如下反应（冰上操作）：

试剂	体积
Input DNA	X μ l
End Prep Buffer 2	7 μ l
End Prep Enzyme 2	3 μ l
ddH ₂ O	To 60 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
热盖 105°C	ON
20°C	30 min
65°C	30 min
4°C	∞

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。

2. 将 Fast Ligation Buffer 5 解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

3. 在 End Preparation 步骤 PCR 管中配制如下反应（冰上操作）：

试剂	体积
末端修复产物	60 μ l
Fast Ligation Buffer 5 *	30 μ l

Fast DNA Ligase 2 *	10 μ l
Adapter X	5 μ l
ddH ₂ O	5 μ l
Total	110 μ l

* Fast Ligation Buffer 5 与 Fast DNA Ligase 2 预混后，可于 4°C 存放不超过 24 h。

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 105°C	ON
20°C	15 min
4°C	∞

注：当 Input DNA 量较低时，可尝试将连接时间延长一倍。但延长反应时间可能会导致 Adapter Dimer 增加，必要时需同时调整 Adapter 使用浓度。

6. 使用 GDSPure DNA Selection Magbeads (GDSBio, #NC1011) 纯化产物：

6.1. 取 110 μ l 连接产物加入合适的 PCR 管中。

6.2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入 88 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 PCR 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 PCR 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 PCR 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 PCR 管从磁力架上取下，进行洗脱：

如纯化产物不进行双轮磁珠分选：向管中加入 22.5 μ l 洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5），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 3-5min。将 PCR 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 EP 管中。

如纯化产物进行双轮磁珠分选：向管中加入 105 μ l 洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5），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 3-5min。将 PCR 管置于磁力架上至溶液变得澄清，将 100 μ l 上清液转移到新的 EP 管中，根据表 3 双轮磁珠分选条件进行长度分选。

注：此处样品可于4℃稳定保存一周。长期保存置于-20℃，避免不必要的反复冻融。

C 文库扩增/Library Amplification

这一步骤将对纯化或长度分选后的Adapter Ligation产物进行PCR扩增。是否需要这一步骤取决于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 ≥ 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Primer Mix 3、2X HIFI PCR Mix 2解冻后颠倒混匀，于灭菌200μl PCR管中配制如下反应(冰上操作)：

试剂	体积
纯化或分选后的连接产物	20 μl
2X HIFI PCR Mix 2	25 μl
Primer Mix 3	5 μl
Total	50 μl

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℃	45 sec	-
98℃	15 sec	根据表 2 选择适当循环数
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	1 min	-
4℃	∞	-

4. 如需进行长度分选，参考附一：双轮磁珠分选进行；如不需要进行长度分选，使用GDSPure DNA Selection Magbeads对反应产物进行纯化：

4.1. 取50 μl扩增产物加入合适的PCR管中。

4.2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入50 μl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PCR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PCR管在磁力架上，加入 200 μl 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PCR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PCR管从磁力架上取下，进行洗脱：

如纯化产物不进行靶向捕获：向管中加入22.5 μl洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5），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3-5min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，将20 μl上清液转移到新的EP管中。

如纯化产物进行靶向捕获：向管中加入22.5 μl 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3-5min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，将20 μl上清液转移到新的EP管中。

注：此处样品可于4℃稳定保存一周。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。

附一：双轮磁珠分选

1. 为了满足不同应用的需要，建库过程中通常需要进行双轮磁珠分选以控制文库Insert Size的分布范围。分选方案执行位置的选择和优缺点参见表3。应保证分选方案执行位置的唯一性，进行两次或者两次以上的分选会导致文库复杂度和产出严重下降。

表3 分选方案执行位置选择

分选方案执行位置	适用情况	优点	缺点	适用样本列举
End Preparation 之前	Input DNA量充足，但分布范围宽或主峰与预期文库Insert Size不一致；Input DNA纯度较差	分选产物长度分布集中；能准确控制Input DNA量；能进一步提高Input DNA纯度，提高建库成功率	DNA损失大；文库分布范围略宽 ^a	Fragmentation不充分或过度的基因组DNA
Adapter Ligation 之后（推荐方案）	Input DNA分布范围适合且量充足 ^b	减少短片段DNA丢失；绝大多数情况下通用	文库分布范围略宽 ^a	Fragmentation适度的基因组DNA或分布范围较宽的FFPE DNA
Library Amplification 之后	Input DNA量少 ^b	减少建库过程中Input DNA的损失，提高文库复杂度	文库分布范围宽 ^c	cfDNA
建库过程中不进行分选	Input DNA分布范围已满足建库要求；Input DNA量少	减少建库过程中Input DNA的损失，提高文库复杂度	无法控制文库Insert Size	多重PCR产物、断裂程度较高的FFPE DNA

a. 双轮磁珠分选效果受DNA末端情况影响, *Input DNA*末端的单链部分以及“Y”型Adapter的单链非互补区域会导致分选产物长度分布范围变宽。

b. 推荐当*Input DNA*量 ≥ 50 ng时, 选择在Adapter Ligation之后进行分选; 当*Input DNA*量 < 50 ng或样品拷贝数有限时, 将分选置于Library Amplification之后。

c. 相对于其他位置分选而言。其他位置分选产物进行Library Amplification之后, 文库分布会进一步集中。

2. 双轮磁珠分选是通过控制磁珠的使用量来进行DNA长度选择的。其基本原理为: 第一轮磁珠结合分子量较大的DNA, 通过丢弃磁珠去除这部分产物; 第二轮磁珠结合剩余产物中分子量较大的DNA, 通过丢弃上清去除分子量较小的DNA。初始样品中的很多组分都会干扰双轮磁珠分选效果。因此, 当分选方案执行位置不同时, 双轮磁珠使用量也不尽相同。可根据预期文库Insert Size和分选方案执行位置在表4中选择最适分选参数。

表4 文库长度分选

分选方案执行位置与条件	磁珠轮数	预期文库大小 (bp)								
		200	250	300	350	400	450	500	550	700
末端修复之前分选 (样品体积补至110 μ l)	一轮X μ l	98	88	77	66	60	57	55	53	47
	二轮Y μ l	22	22	22	22	22	17	17	17	13
接头连接之后分选 (样品体积110 μ l)	一轮X μ l	75	72	65	62	58	56	55	/	/
	二轮Y μ l	22	17	17	13	13	11	11	/	/
文库扩增之后分选 (样品体积补至110 μ l)	一轮X μ l	77	69	61	55	51	50	48	/	/
	二轮Y μ l	22	22	22	22	22	22	17	/	/

3. 当使用非完整长度Adapter时, 连接之后的分选方案执行条件与完整Adapter不同, 此时可根据下表选择最适分选参数。

分选方案执行位置与条件	磁珠轮数	预期文库大小 (bp)						
		200	250	300	350	400	450	500
接头连接之后分选 (样品体积110 μ l)	一轮X μ l	99	83	72	66	60	58	55
	二轮Y μ l	22	22	22	22	22	22	20

使用磁珠进行长度分选时, Insert Size越大最终产物分布越宽。当Insert Size > 700 bp时, 双轮磁珠几乎不具有分选效果。此时建议通过切胶纯化的方案进行长度分选。

样品和磁珠的体积比对于分选效果至关重要, 应尽可能保持样本初始体积和移液体积的准确性。

4. 样品预处理

如在End Preparation之前进行长度分选, 样品体积应为110 μ l, 不足时使用ddH₂O补齐;

如在Adapter Ligation产物纯化之后进行长度分选, 样品体积应为110 μ l, 不足时使用ddH₂O

补齐; 如在Library Amplification之后进行长度分选, 样品体积应为110 μ l, 不足时使用ddH₂O补齐; 如不对样品进行体积预处理, 也可按样品实际体积等比例调整磁珠用量。但样品体积太小会导致移液误差增大, 进而影响分选的准确性。因此, 不推荐对体积 < 50 μ l的样品直接进行分选。

5. 分选方案[参考表4确定X和Y的值]

5.1. 磁珠平衡至室温后, 涡旋振荡混匀GDSPure DNA Selection Magbeads。

5.2. 吸取X μ l GDSPure DNA Selection Magbeads至上述110 μ l产物中, 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 室温静置5min。

5.3. 将PCR管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后(约5 min), 小心转移上清至新PCR管中, 丢弃磁珠。

5.4. 吸取Y μ l GDSPure DNA Selection Magbeads至上清中, 用移液器轻轻吹打10次充分混匀。室温孵育5 min。

5.5. 将PCR管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。

5.6. 保持PCR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。

5.7. 重复步骤 5.4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

5.8. 保持PCR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。

5.9. 将PCR管从磁力架上取下, 进行洗脱:

如纯化产物不进行靶向捕获: 向管中加入22.5 μ l洗脱缓冲液(10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5), 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 3-5min。将PCR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EP管中。

如纯化产物进行靶向捕获: 向管中加入22.5 μ l 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 3-5min。将PCR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EP管中。

附二: cfDNA建库方案

cfDNA (游离DNA)是一种来源于血液的碎片化DNA, 具有高度片段化(约180 bp)、含量低等显著特点, 在无创产前诊断(NIPT)以及液体活检(ctDNA检测)等领域具有极高的检测价值。

注意事项:

1. Input DNA特指投入到End Preparation的DNA, 体积 ≤ 50 μ l。

2. cfDNA本身高度片段化，不需要进行Fragmentation。

3. 为保证建库质量，推荐对cfDNA模板进行长度分布(2100 Bioanalyzer)和浓度检测(Qubit)。

建库流程：

步骤一：End Preparation (参照A/End Preparation)

Input DNA量：100 pg - 100 ng。

步骤二：Adapter Ligation (参照B/Adapter Ligation)

Adapter：根据表1预先稀释。

Clean up：采用0.8X磁珠纯化，22.5 μ l洗脱液洗脱DNA，移取20 μ l上清进行下一步骤。

步骤三：Library Amplification (参照C/Library Amplification)

循环数：参照表2，根据文库产出需求自行调整。

Clean up：cfDNA文库是否进行长度分选由样本情况与数据分析需要决定。

▲如不进行双轮磁珠分选：采用1X磁珠纯化，22.5 μ l洗脱液洗脱DNA，移取20 μ l上清至新EP管中，-20℃保存。

▲如进行双轮磁珠分选：采用0.73X/0.25X双轮磁珠分选，22.5 μ l洗脱液洗脱DNA，移取20 μ l上清至新EP管中，-20℃保存。

步骤四：Library Quality Control

文库浓度测定：

推荐使用荧光染料法(Qubit或PicoGreen)或qPCR绝对定量法进行文库浓度测定。

文库长度分布检测：

通过Agilent 2100 Bioanalyzer进行长度分布检测。

附三：FFPE DNA建库方案

FFPE DNA是从福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE)的切片中获得的DNA。

注意事项：

1. Input DNA特指投入到End Preparation的DNA，体积 $\leq 50 \mu$ l。

2. 因组织差异、包埋质量、保存时间等因素影响，提取到的FFPE DNA质量不尽相同。使用低质量的FFPE DNA建库时应适当提高Input DNA量或增加扩增循环数。

3. 为了保证建库质量，推荐对FFPE DNA模板进行长度分布(Agilent 2100 Bioanalyzer)和浓度检测(Qubit)。也可使用基于qPCR法的FFPE DNA质量评价体系预先对模板进行检测。

4. 当FFPE DNA片段化程度不足，平均分子量偏大时，建库前需要先进行Fragmentation。

建库流程：

步骤一：End Preparation (参照A/End Preparation)

Input DNA量： $\geq 50 \text{ ng}$ 。

步骤二：Adapter Ligation (参照B/Adapter Ligation)

Adapter：根据表1预先稀释。

Clean up：采用0.8X磁珠纯化。

▲如纯化产物不进行双轮磁珠分选：用22.5 μ l洗脱液洗脱DNA，移取20 μ l上清。

▲如纯化产物需进行双轮磁珠分选：用105 μ l洗脱液洗脱DNA，移取100 μ l上清，后根据表4双轮磁珠分选条件进行文库长度分选。

步骤三：Library Amplification (参照C/Library Amplification)

循环数：参照表2，根据样本质量调整。

Clean up：

▲如扩增产物不进行双轮磁珠分选：采用1X磁珠纯化，22.5 μ l洗脱液洗脱DNA，移取20 μ l上清至新EP管中，-20℃保存。

▲如扩增产物需进行双轮磁珠分选：用ddH₂O补至110 μ l，后根据表4双轮磁珠分选条件进行文库长度分选。

步骤四：Library Quality Control

文库浓度测定：

推荐使用荧光染料法(Qubit或PicoGreen)或qPCR绝对定量法进行文库浓度测定。

文库长度分布检测：

通过Agilent 2100 Bioanalyzer进行长度分布检测。

附四：靶向捕获建库方案

以NimbleGen SeqCap EZ捕获流程为例构建预捕获文库。

注意事项：

1. Input DNA特指投入到End Preparation的DNA，体积 $\leq 50 \mu$ l。

2. Input DNA范围应介于180 - 220 bp范围内，具体打断条件参照Covaris或其他DNA片段化设备的使用说明书。

3. 为保证建库质量，推荐对Input DNA进行长度分布(Agilent 2100 Bioanalyzer)和浓度检测(Qubit)。

建库流程：

步骤一：End Preparation (参照A/End Preparation)

*Input DNA*量：根据样本类型选择。

步骤二: Adapter Ligation (参照B/Adapter Ligation)

Adapter: 根据表1预先稀释。Adapter的选择需要参考捕获试剂中的Blocking试剂。

Clean up: 采用0.8X磁珠纯化, 105 μ l洗脱液洗脱DNA, 移取100 μ l上清; 后进行0.68X/0.2X双轮磁珠分选, 22.5 μ l洗脱液洗脱DNA, 移取20 μ l上清进行下一步骤。

步骤三: Library Amplification (参照 C/Library Amplification)

循环数：参照表2，推荐按上限循环数扩增。按推荐上限循环数扩增可获得 $\geq 1 \mu\text{g}$ 的文库产出；若捕获前先进行样本Pooling，应确保每个样本的文库产出 $\geq 1 \mu\text{g}/n$ (n = 样品数量)。此时，可降低各样品扩增循环数，以提高文库复杂度、降低Duplication rates。

Clean up: 采用1X磁珠纯化, 22.5 μ l ddH₂O洗脱DNA, 移取20 μ l上清至新EP管中。

步骤四: *Library Quality Control*

参照SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1 (Chapter 4, Step 5) (Roche document number 06588786001, 09/15)进行文库质量控制。

步骤五：靶向富集

參照SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1第5 - 8章完成靶向捕獲流程。

本品仅供科学研究使用

图1 K014建库流程图

