

Universal DNA Library Plus Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

Universal DNA Library Plus Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

K015-A (24 rxns) ; K015-B (96 rxns)

【产品简述】

Universal DNA Library Plus Prep Kit for Illumina是一款专为Illumina高通量测序平台设计的片段化酶法文库制备试剂盒，在#K014试剂盒的基础上将DNA片段化、末端修复以及末端加dA尾合并为一步，产物无需纯化，直接进行接头连接、文库富集和分选。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，根据目标插入片段大小调整片段化时间，即可得到所需片段大小文库。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	50ng-1μg
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)

【储存条件】

-20℃。

【组成成分】

组分	K015-A (24 rxns)	K015-B (96 rxns)
FEA Enzyme Mix V2	240 μl	960 μl
FEA Buffer V2	120 μl	480 μl

Fast DNA Ligase V2	120 μl	480 μl
Fast Ligation Buffer V2	600 μl	4×600 μl
2X HIFI PCR Mix	600 μl	4×600 μl
Primer Mix 3	120 μl	480 μl
Neutralization Buffer	120 μl	480 μl
Control DNA (100 ng/μl)	10 μl	10 μl

备注：分选磁珠推荐使用#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	
	100ng 文库	1μg 文库
1μg	/	0-2
500ng	/	2-3

250ng	/	3-5
100ng	0-2	4-6
50ng	2-4	5-8
10ng	4-6	9-11
1ng	9-11	13-15
100pg	13-15	16-18

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。

【标准建库流程】

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

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. 实验开始前，请确认模板DNA溶解于何种溶剂(推荐使用灭菌超纯水)，该溶剂是否含有EDTA；如不含EDTA，直接进行步骤3；如含有EDTA则按照步骤2对样品进行预处理。

2. 如含有EDTA，可使用2.2X磁珠对模板DNA进行纯化，灭菌超纯水洗脱；或根据片段化体系中EDTA的终浓度，加入相应体积的Neutralization Buffer将EDTA中和。

片段化体系EDTA终浓度 = DNA溶液中EDTA浓度 × DNA使用体积/50 μ l；例如DNA溶于含有1 mM EDTA的TE中，一次建库使用10 μ l，则EDTA终浓度为1 mM × 10 μ l/50 μ l = 0.2 mM。

片段化体系EDTA终浓度	Neutralization Buffer体积
1 mM	5 μ l
0.8 mM	4 μ l
0.6 mM	3 μ l
0.5 mM	2.5 μ l
0.4 mM	2 μ l
0.2 mM	1 μ l
0.1 mM	0.5 μ l
<0.1 mM	0 μ l

3. 将FEA Buffer V2、FEA Enzyme Mix V2取出，解冻并充分混匀、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。

4. 在灭菌200 μ l PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
Input DNA	X μ l

Neutralization Buffer	X μ l
FEA Buffer V2	5 μ l
ddH ₂ O	To 40 μ l

注：当样本数量较多，且样本中含有EDTA时，需要计算加入不同体积的Neutralization Buffer。可参考附录二，多样本片段化方案。

5. 向每个样品中加入10 μ l FEA Enzyme Mix V2，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。

6. 在热循环仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖105℃	ON
37℃	参照下表
65℃	30min
4℃	∞

注：片段化时间需依据Input DNA质量及目标片段大小而定：

预期插入片段大小	片段化时间
150 bp	20-30 min
250 bp	15-20 min
350 bp	10-15 min
550 bp	6-10 min

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 V2、Fast DNA Ligase V2从-20℃取出，解冻并充分混匀、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
Fast Ligation Buffer V2	25 μ l
Fast DNA Ligase V2	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	15min
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纯化产物：

6.1. 取100 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60 μ l磁珠悬液，用移液器轻轻吹打10次混匀，室温静置5min。

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30s，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°C稳定保存一周。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 $\geq$ 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Primer Mix 3、2X HIFI PCR Mix 解冻后颠倒混匀，于灭菌200 μ l 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
2X HIFI PCR Mix	25 μ l
Primer Mix 3	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
95°C	3 min	-
98°C	20 sec	根据表 2 选择适当循环数
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	-
4°C	∞	-

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 μ l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45 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 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 μ l洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）

或 ddH_2O ，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 ddH_2O ，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。

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
Adapter Ligation之后	Input DNA分布范围适合且量充足 ^a	减少短片段DNA丢失	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	-
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	片段化适合的基因组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 ≥ 100 ng时，选择在Adapter Ligation之后进行分选；当Input DNA量 < 100 ng或样品拷贝数有限时，将分选置于Library Amplification之后。

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)							
		150	200	250	300	350	400	450	500
接头连接之后分选 (样品体积100 μ l)	一轮X μ l	78	68	65	59	56	53	51	50
	二轮Y μ l	20	20	15	15	12	12	10	10
文库扩增之后分选 (样品体积补至100 μ l)	一轮X μ l	78	70	63	55	50	46	45	44
	二轮Y μ l	20	20	20	20	20	20	20	15

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)							
		150	200	250	300	350	400	450	500
接头连接之后分选 (样品体积100 μ l)	一轮X μ l	100	90	75	65	60	55	53	50
	二轮Y μ l	20	20	20	20	20	20	20	18

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Adapter Ligation产物纯化之后进行长度分选，样品体积应为100 μ l，不足时使用 ddH_2O 补齐；如在Library Amplification之后进行长度分选，样品体积应为100 μ l，不足时使用 ddH_2O 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100 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30 sec，用移液器吸去上清，弃上清。

5.7. 重复步骤 5.6 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）或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 3-5 min。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：多样本片段化方案

当样本数量较多，且样本中含有EDTA时，可尝试将样本使用同样的溶剂稀释到相同的浓度，保证多个样本加入的体积相同，即可加入等体积的Neutralization Buffer。以下表为例，配制反应体系混合液，混匀分装合适体积到各管中后，使用排枪或自动化工作站在尽量短的短时间内完成DNA加样，然后立即置于PCR仪中进行反应，防止由于加样时间过长导致不同样本之间片段范围差异过大。

1. 例如：通过计算和稀释，每个DNA样品均需加入10 μ l，Neutralization Buffer均需加入2.5 μ l。按照计算所得结果稀释DNA样品，并在8连管或96孔板中按顺序排布。

2. 将FEA Buffer V2、FEA Enzyme Mix V2、Neutralization Buffer 取出，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。

试剂	单个反应体积	96次反应体积
Neutralization Buffer	2.5 μ l	250 μ l
FEA Buffer V2	5 μ l	500 μ l
FEA Enzyme Mix V2	10 μ l	1000 μ l
ddH ₂ O	22.5 μ l	2250 μ l

片段化反应混合液应现用现配，不宜长时间存放。

3. 使用移液器吹打或振荡混匀反应混合液，并短暂离心将反应液收集至管底。

4. 将反应混合液分装到反应管或96孔板中，每孔40 μ l。

5. 使用排枪或自动化工作站，将DNA样品各10 μ l在尽量短的时间内加入到各个反应孔中，吹打混匀数次；短暂离心将反应液收集至管底，立即置于PCR仪中进行反应。

片段化反应为时间依赖的酶促反应，片段化产物大小取决于反应时间，因此多个样本操作时，应尽量缩短样本间的操作时间差异，加入后立即混匀并进行后续反应。

图1 K015建库流程图

