

GDSZyme DNA Library Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

GDSZyme DNA Library Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

K016-A (24 rxns) ; K016-B (96 rxns)

【产品简述】

GDSZyme DNA Library Prep Kit for Illumina是一款专为Illumina高通量测序平台设计的超快速酶切法DNA文库制备试剂盒，操作流程简单，建库时间更短。它能够处理100pg至500ng的不同来源的DNA，适用于PCR或PCR-free的文库构建，具有很高的文库转化率。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。

【储存条件】

-20℃。

【组成成分】

组分	K016-A (24 rxns)	K016-B (96 rxns)
FEA Enzyme Mix V3	240 μ l	960 μ l
Fast DNA Ligase V3	120 μ l	480 μ l
Fast Ligation Buffer V3	720 μ l	4 $\times$ 720 μ l
2X HIFI PCR Mix	600 μ l	4 $\times$ 600 μ l
Primer Mix 3	120 μ l	480 μ l
Enhancer Buffer	240 μ l	960 μ l

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

【适用范围】

投入量为100 pg - 500 ng的泡灌洗液、血细胞、血清、血浆、脑脊液等不同样本类型的DNA制备Illumina高通量测序平台专用文库。

【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	UDI Adapter 预稀释度	使用体积
500 ng	不稀释	5 μ l
100 ng	1:2	5 μ l
1 ng	1:100	5 μ l
100 pg	1:200	5 μ l

*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5 μ l，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	
	100 ng 文库	1 μ g 文库
500 ng	/	2-3
200 ng	/	3-5
100 ng	0-2	4-6
50 ng	2-3	5-7
10 ng	4-6	7-9
1 ng	9-11	13-15
100 pg	13-15	15-17

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. 将FEA Enzyme Mix V3解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有操作步骤均在冰上操作。

2. 在灭菌200 μ l PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
Input DNA	$X \mu l$
ddH ₂ O	To 50 μl

3. 向每个样品中加入10 μl FEA Enzyme Mix V3, 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。

当模板中含有盐离子或其他杂质抑制打断时, 推荐在打断反应体系中加入Enhancer Buffer来增强打断能力, 具体加入量, 可以以1 μl 为幅度进行调整。

4. 在热循环仪中进行如下反应:

温度	时间
热盖105℃	ON
30℃	5 min
72℃	5 min
4℃	∞

B 接头连接/Adapter Ligation

这一步骤将在End Preparation产物末端连接Adapter。

- 根据Input DNA量按表1稀释Adapter至合适浓度。
- 将Fast Ligation Buffer V3、Fast DNA Ligase V3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。
- 在步骤A的PCR管中配制如下反应:

试剂	体积
上一步产物	60 μl
Fast Ligation Buffer V3	30 μl
Fast DNA Ligase V3	5 μl
Adapter X	5 μl

- 用移液枪小心吹打混匀, 短暂离心将所有液体移至管底。
- 在热循环仪中进行如下反应:

温度	时间
热盖105℃	ON
20℃	5 min
4℃	∞

注: 适当延长反应时间至15 min, 可提高接头连接效率。

6. 使用GDSPure DNA Selection Magbeads纯化产物:

- 取100 μl 连接产物加入合适的PCR管中。
- 涡旋磁珠使磁珠混匀, 加入80 μl 磁珠悬液, 用移液器轻轻吹打10次混匀, 室温静置5 min。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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 μl 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 μl 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 μl 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100 μl 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 ≥ 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。

- 将Primer Mix 3、2X HIFI PCR Mix 解冻后颠倒混匀, 于200 μl 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
2X HIFI PCR Mix	25 μl
Primer Mix 3	5 μl
Total	50 μl

- 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℃	3 min	-
98℃	20 sec	根据表 2 选择适当循环数
60℃	15 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 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 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：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。

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。

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
Adapter Ligation 之后	Input DNA 分布范围适合且量充足 ^b	减少短片段 DNA 丢失	不能准确评价文库分布范围 ^a
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	文库分布范围略宽

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
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
	二轮 Y μ l	20	20	15	15	12
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
	二轮 Y μ l	20	20	20	20	20

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
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
	二轮 Y μ l	20	20	20	20	20

使用磁珠进行长度分选时，Insert Size 越大最终产物分布越宽。

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 ddH₂O 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

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：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。

图1 K016建库流程图

