

GDSZyme Rapid DNA Library Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

GDSZyme Rapid DNA Library Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

K017-A (24 rxns) ; K017-B (96 rxns)

【产品简述】

GDSZyme Rapid 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，可在1.5小时内完成单个文库构建。兼容100pg至100ng的不同来源的DNA，具有文库转化率高、背景菌干扰低的优点。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	K017-A (24 rxns)	K017-B (96 rxns)
FEA Enzyme Mix	192 μ l	768 μ l
Fast DNA Ligase	60 μ l	240 μ l
Fast Ligation Buffer	480 μ l	960 μ l $\times$ 2
2X HIFI PCR Mix	600 μ l	600 μ l $\times$ 4
Primer Mix 3	120 μ l	480 μ l
PCR Activator	108 μ l	432 μ l
DNA Clean Buffer	2.4 ml	4.8 ml $\times$ 2

【适用范围】

投入量为100 pg - 100 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. 本试剂盒兼容Illumina TruSeq等常规体系中使用到的各种Non-indexed、单端Indexed及双端Indexed Adapters。DNA Adapter的质量和用量会影响建库效率和文库的质量，需根据DNA投入量使用对应合适浓度的接头。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 (15 μ M) 预稀释度	使用体积
100 ng	不稀释	2.5 μ l
10 ng	1:10	2.5 μ l
1 ng	1:100	2.5 μ l
100 pg	1:200	2.5 μ l

2. 磁珠应先平衡至室温后再使用。每次使用前应充分混匀。

3. 如Input DNA分布范围较宽，建库过程中通常需要进行长度分选以控制最终文库长度分布范围。推荐使用双轮磁珠分选方案(参考附录一)，也可通过切胶纯化的方式进行分选。

4. 2X HIFI PCR Mix适用于扩增含完整长度Adapter的Illumina高通量测序平台文库。非完整长度Adapter或者其他平台文库需自行更换扩增引物，引物的终浓度建议为5 - 20 μ M。

5. 文库扩增循环数的设置可参考下表：

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
100 ng	0-2	3-5
10 ng	4-5	6-8
1 ng	8-9	10-12
100 pg	12-13	14-16

上表为使用高质量的293 gDNA 30℃片段化5 min构建文库测得的循环数参数。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。

当Adapter Ligation步骤中使用非完整长度Adapter时，须至少扩增2个循环以补全文库末端Adapter序列。

6. 使用前请将试剂盒各组置于室温解冻，并颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。

7. 推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头，避免样品交叉污染。并注意防止气溶胶污染。

【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 42 μ l

3. 向每个样品中加入8 μ l FEA Enzyme Mix，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。

4. 在热循环仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖105°C	ON
30°C	5 min
72°C	5 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、Fast DNA Ligase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	20 μ l
Fast DNA Ligase	2.5 μ l
Adapter X	2.5 μ l
Total	75 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	5 min
4°C	∞

C PCR激活/PCR Activation

对Adapter Ligation产物进行PCR前预处理。

1. 将PCR Activator解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

2. 向每个样品中加入4.5 μ l PCR Activator，使用移液器吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

3. 在热循环仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖105°C	ON
37°C	5 min
85°C	5 min
4°C	∞

D 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。

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
上一步的产物	79.5 μ l
2X HIFI PCR Mix	25 μ l
Primer Mix 3	5 μ l
Total	109.5 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	1 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* (GDSBio, #NC1011)对反应产物进行纯化：

4.1 磁珠平衡至室温后，涡旋磁珠使其混匀。

4.2 向109.5 μ l扩增产物中加入65 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 将PCR管从磁力架上取下，加入100 μ l *DNA Clean Buffer*，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀或涡旋振荡，室温孵育5 min。

4.5 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。

若使用非完整接头，可省略4.4和4.5步骤。

4.6 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。

4.7 重复步骤 4.6 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

4.8 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。

4.9 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*, pH 8.0-8.5）或 *Nuclease-free 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上清液转移到新的离心管中。

注：此处样品长期保存置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

E 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。

文库长度分布检测：可通过*LabChip GX*、*GXII*、*GX Touch* (*PerkinElmer*)；*Bioanalyzer*、*Tapestation* (*Agilent Technologies*)；*Fragment Analyzer* (*Advanced Analytical*)等基于电泳分离原理的设备进行检测。

文库浓度检测常用方法有两种：基于双链DNA荧光染料的方法，如*PicoGreen*等；基于*qPCR*绝对定量的方法。推荐使用基于*qPCR*绝对定量的方法进行文库浓度测定。

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。

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3中选择最适分选参数。

表3 文库长度分选

磁珠轮数	预期文库大小 (bp)	
	150	200
一轮X μ l	38	33
二轮Y μ l	22	22

3. 分选方案[参考表3确定X和Y的值]

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

3.2 吸取X μ l *GDSPure DNA Selection Magbeads*至上述109.5 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。

3.3 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。

3.4 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。

3.5 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。

3.6 将PCR管从磁力架上取下，加入100 μ l *DNA Clean Buffer*，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀或涡旋振荡，室温孵育5 min。

3.7 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。

3.8 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。

3.9 重复步骤 3.8 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

3.10 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。

3.11 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*, pH 8.0-8.5）或 *Nuclease-free 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

的离心管中。

图1 K017建库流程图

