版本号：01/2021

NGS Fast DNA Library Prep Set for Illumina

二代测序快速DNA建库试剂盒（Illumina）

目录号：CW2585S（24 rxns）
CW2585M（96 rxns）

保存条件：-20℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW2585S 24 rxns	CW2585M 96 rxns
End Prep Enzyme Mix	48 μl	192 μl
10×End Repair Reaction Buffer	200 μl	800 μl
T4 DNA Ligase	48 μl	192 μl
T4 DNA Ligase Buffer	400 μl	2×800 μl
2×HiFidelity PCR Mix	600 μl	2×1.2 ml

产品简介

本试剂盒提供了DNA文库构建所需要的酶预混体系及反应缓冲液，包含除接头与PCR引物外的所有成分，用于illumina二代测序平台DNA文库构建。和一般建库方法相比，该试剂盒操作简单、方便，极大地缩短了文库构建时间。另外，试剂盒采用高保真DNA聚合酶进行文库富集，无偏好的PCR扩增，扩大了序列的覆盖区域，可高效制备用于illumina二代测序平台的DNA文库。试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性。

产品特点

- 末端补平，磷酸化，加A一步完成。
- 不需纯化，直接加接头。
- 超保真扩增，最大程度上降低了扩增偏好性。
- 支持多种样本，且所得文库能够用于Illumina GAIIx，HiSacnSQ、HiSeq 2500/2000/1000和MiSeq sequencing等测序平台的测序。

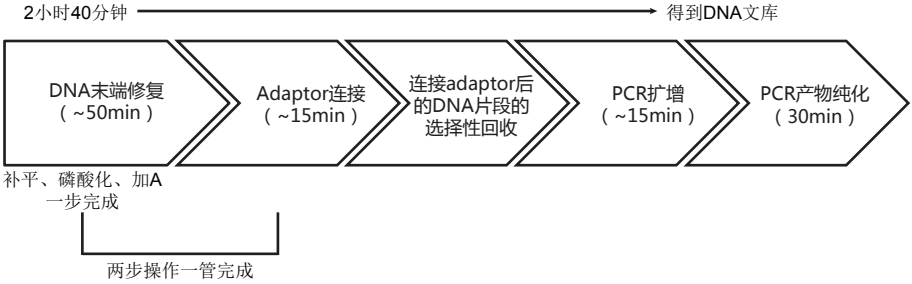
自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架：建议使用DynaMag^{TM-2} (Cat.No. 12321D)。
2. DNA纯化回收试剂盒：建议使用康为磁珠法DNA纯化回收试剂盒 (Cat.No. CW2508)。
3. 样本接头引物试剂盒：建议使用康为二代测序多样本接头引物试剂盒 I/II (Cat. No. CW2586/CW2587 ）。
4. 无水乙醇，EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)，去离子水（pH 在7.0-8.0之间）。
5. 反应管：建议使用低吸附的PCR管与1.5 ml离心管；
   枪头：建议使用高质量过滤枪头防止试剂盒、文库样本污染。

实验前准备及重要注意事项

1. 避免试剂的反复冻融，建议您首次使用试剂盒后将剩余试剂分装保存。
2. PCR产物因操作不当极易产生污染，导致实验结果不准确，建议将PCR反应体系配制区与PCR产物纯化区隔离，并使用专门的移液器，定时对各实验区域进行清洁。

DNA建库流程示意图



操作步骤

样本要求： 5 ng-1 μg打断的双链DNA，溶于EB（10 mM Tris-HCl pH 8.0)或去离子水中。

DNA纯度要求：OD_{260}/OD_{280}=1.8~2.0。

DNA末端修复反应

1．向200 μl PCR管中加入以下试剂：

试剂名称	体积
10×End Repair Reaction Buffer	6.5 μl
End Prep Enzyme Mix	2 μl
fragmented DNA	X（5 ng-1 μg）
RNase-free Water	Up to 65 μl

2．用枪头将上述溶液轻轻吹吸混匀，短暂离心, 使所有组分收集到管底。

3．将上述PCR管置于PCR仪中，热盖打开， 反应程序如下：

15 min @ 12℃

15 min @ 37℃

20 min @ 72℃

Hold on 4℃

Adaptor连接

建议使用康为adaptor进行连接，也可选择使用NEB、illumina公司的adaptor，具体连接方法可参考各公司的产品使用说明书。以下为使用康为adaptor进行连接的操作步骤：

1．向上述已完成DNA末端修复的反应液中直接加入以下试剂：

试剂名称	体积
T4 DNA ligase buffer for illumina	14 μl
T4 DNA ligase	2 μl
Adaptor	2.5 μl

此时管中溶液总体积为83.5 μl。

注意：若起始样本量少于100 ng，请将adaptor用去离子水稀释10倍至1.5 μM后使用。

2．用枪头将上述试剂吹吸混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。

3．20℃温浴15分钟。

注意：若此操作使用pcr仪，请将热盖关闭。

DNA片段的选择性回收

建议使用康为世纪磁珠法DNA纯化回收试剂盒（CW2508）进行DNA片段选择性回收。

注意：DNA片段选择性回收是可选步骤，若起始样本量低于50ng，不建议进行DNA片段选择性回收，可参考说明书第4页，直接进行DNA片段的纯化。另外构建不同大小的DNA文库时，DNA片段选择性回收的磁珠使用量不同，具体磁珠用量可参照附表1（若使用除康为以外厂家的磁珠，需自行摸索最佳磁珠用量）。

以下操作步骤中，可选择回收DNA片段长度峰值为320bp（插入片段长度200bp），反应起始体积为100 μl。

1．涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液。

2．向连接反应液中加入16.5 μl去离子水，使adaptor连接反应缓冲液体积至100μl。

注意：若使用NEB adaptor，只需要加入13.5μl去离子水。

3．将上述adaptor反应缓冲液转移至一新的1.5ml离心管中。

4．加入70 μl混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后, 室温静置5分钟。

5．短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟），小心地将上清溶液转移至新的1.5 ml离心管中,并弃去磁珠。

注意：不要弃除上清。

6．向上清中加入25 μl混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温放置5分钟。

7．短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意：不要弃除磁珠。

8．继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μl新配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。

9．重复步骤8。

10. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10分钟，使磁珠在空气中干燥。

11. 将离心管从磁力架上取下，加入28 μl 10 mM Tris-HCl（pH 8.0）或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5分钟。

12. 短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将23 μl洗脱液转移至一个新的PCR管中；

注意：一定不要转移磁珠，微量磁珠污染可影响后续PCR反应的正常进行。

另一种方案： DNA片段的纯化

1．涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液。

2．将adaptor连接反应液转移至一新的1.5 ml离心管中。

3．加入1倍样品体积的CMPure，涡旋震荡5秒钟后，室温静置5分钟。

4．短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意：不要弃除磁珠。

5．继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μl新鲜配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。

6．重复步骤5。

7．保持离心管固定于磁力架上，室温静置10分钟，使磁珠在空气中干燥。

8．将离心管从磁力架上取下，加入28 μl EB（自备）或去离子水，涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5分钟。

9．短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将23 μl洗脱液转移至一个新的PCR管中。

附表1：不同片段选择回收时磁珠建议用量

DNA文库大小	插入片段	150 bp	200 bp	250 bp	300-400 bp	400-500 bp	500-700 bp
	（插入片段+adaptor+primer）	270 bp	320 bp	400 bp	400-500 bp	500-600 bp	600-800 bp
磁珠用量	第一次选择	85	70	55	50	45	35
	第二次选择	25	25	20	20	20	15

PCR扩增

1．在PCR管中加入以下试剂并混匀。

试剂名称	体积
连接adaptor后的DNA片段	23 μl
2×HiFidelity PCR Mix	25 μl
Univesial primer	1 μl
Index primer	1 μl
总体积	50 μl

2．PCR反应条件。

步骤	温度	时间	
预变性	98℃	30 s	
变性	98℃	10 s	6-16个循环
退火	65℃	30 s	
延伸	72℃	30 s	
终延伸	72℃	5 min	

注意：建议1 μg样本起始量时PCR循环数为6个循环，50 ng时10个循环，5 ng时14-15个循环，PCR循环数也可根据实验需要进行优化。

PCR产物的纯化

1．涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液。

2．将PCR反应液转移至一新的1.5 ml离心管中。

3．加入1倍样品体积的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温静置5分钟。

4．短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟）。小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意：不要弃除磁珠。

5．继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μl新鲜配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。

6．重复步骤5。

7．保持离心管固定于磁力架上，室温静置10分钟，使磁珠在空气中干燥。

8．将离心管从磁力架上取下，加入30 μl EB（自备）或去离子水，涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5分钟。

9．短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将洗脱液转移至一个新的PCR管中约25 μl，DNA文库在-20℃保存。

文库质量检测

文库浓度

为了得到高质量的测序结果，需要对DNA文库进行精确定量，首先推荐使用Real-time PCR方法对DNA文库进行绝对定量。此外，还可使用荧光染料法，如Qubit法或荧光染料picogreen法，此处请勿使用基于吸光度测量的定量方法。最终可使用以下近似公式换算DNA文库的摩尔浓度。

文库平均总长度	近似转换公式	成簇反应 DNA 文库浓度
200 bp	1 ng/μl=7.5 nM	6-12 pM
300 bp	1 ng/μl=5.0 nM	6-12 pM
400 bp	1 ng/μl=3.8 nM	6-12 pM
500 bp	1 ng/μl=3.0 nM	6-12 pM

文库长度分布

制备好的DNA文库可用琼脂糖凝胶电泳或Agilent 2100 Bioanalyzer检测DNA文库中的片段长度分布范围。

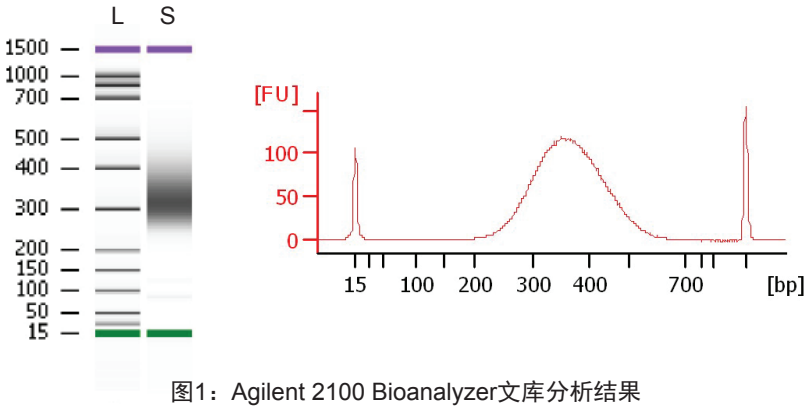


图1：Agilent 2100 Bioanalyzer文库分析结果

L：DNA Ladder；

S：使用200ng人基因组DNA构建文库，磁珠进行选择回收后结果。

文库结构

5’-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCC GATCT [Target Sequence] AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNN NNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3’

NNNNNN：index, 6bases

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途