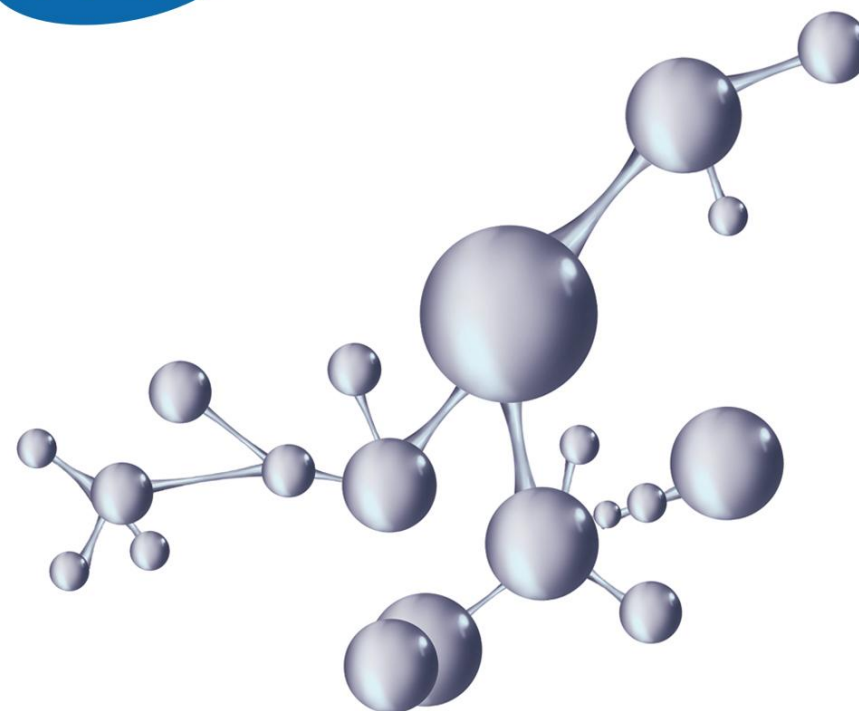




官方二维码

扫一扫 了解更多



Rapid DNA Library Prep Kit V2

使用说明书

☎ 010-69738937 400-990-8785

🌐 www.huaruikang.com.cn

📍 北京市昌平区北清路1号院珠江摩尔大厦3号楼

www.huaruikang.com.cn

目录

CONTENTS

1.目录号	01
2.产品内容	01
3.产品简介	01
4.产品特点	01
5.储存条件及有效期	01
6.适用范围	02
7.自备仪器、试剂	02
8.实验原理	02
9.注意事项	03
10.文库构建操作流程	07
11.附件：DNA片段分选	09

Rapid DNA Library Prep Kit V2

使用说明书

【目录号】

新货号：HRK-ND2401-1(24rxns)；{旧货号：HRK-CC200-24(24rxns)}

新货号：HRK-ND2401-2(96rxns)；{旧货号：HRK-CC200-96(96rxns)}

【产品内容】

试剂成分	24rxns	96rxns
End Repair & A-Tailing Buffer	168μl	672μl
End Repair & A-Tailing Enzyme	72μl	288μl
Ligation Buffer	720μl	1.44ml×2
DNA Ligase V2	120μl	480μl
2×HiFi PCR MasterMix	600μl	1.2ml×2

【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 PCR 引物的所有成分，用于 Illumina & MGI 二代测序平台 DNA 文库构建。

本试剂盒可以将 1ng-1μg gDNA 转换成 Illumina & MGI 高通量测序平台专用文库，和一般建库方法相比，该试剂盒文库构建时间最短仅需 120min，具有流程更简捷、文库转化率 更高、样本兼容性更广等诸多优势，广泛适用于多种样本的 PCR 文库构建，且兼容靶向捕获流程。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和重复性。

【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 & MGI 所有测序平台的测序。

【储存条件及有效期】

- -20℃±5℃避光保存。
- 试剂盒在正确储存条件下有效期为 18 个月。

【适用范围】

适用于构建 Illumina & MGI 高通量测序平台文库。兼容多种样本类型：cfDNA/ctDNA、基因组 DNA (Genomic DNA)、石蜡切片 DNA (FFPE DNA)、微生物基因组、长片段扩增产物等。对于简单基因组 (Small Genome)、长片段 PCR 产物等复杂程度较低的样本，DNA 投入量最低可至 1ng。推荐应用于：

◇ 全基因组测序

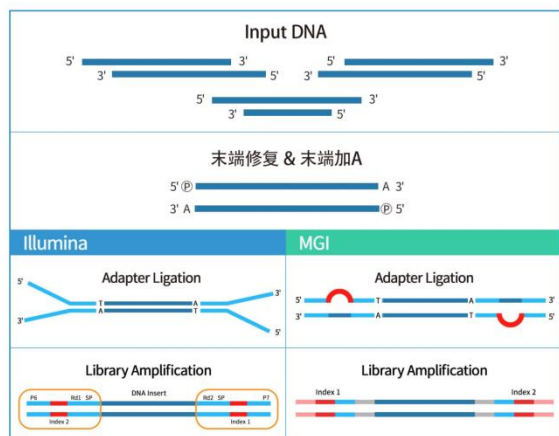
◇ 全外显子或其他靶向捕获测序 (配合 Agilent SureSelect、IDT xGen™ Lockdown™ Probes 或其他杂交捕获系统)

◇ 宏基因组测序

【自备仪器、试剂】

1. 磁力架：建议使用 DynaMag-96 (Cat.No. 12331D)。
2. 文库质控：Qubit 4.0, Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他检测仪器；
3. 纯化回收：建议使用 NGS Clean Beads Kit (Cat.No. HRK-CC105-450) 或 Ampure XP beads (Cat.No. A63882)。
4. 无水乙醇、0.1X Buffer TE、10mM Tris-HCl (pH 8.0) ；
5. DNA Adapter：本试剂盒兼容其他公司生产的“TA-ligation”的 Adapters 试剂盒。

【实验原理】



【注意事项】

受样本、耗材、设备、操作等诸多因素影响，文库构建流程参数可能需要根据实际情况进行调整。为了能够获得高质量的测序文库，请务必仔细阅读下述注意事项。

(1) DNA 样本问题：

◆ Input DNA 投入量范围为 1ng-1μg。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8~2.0 的高质量 Input DNA 溶于 10mM Tris-HCl (pH=8.0) 或去离子水中 (高浓度 EDTA 和强缓冲剂的溶液会对体系造成影响，影响试剂性能)；Table 1 中列举了常见应用中推荐的 DNA 投入量。

Table 1 常见应用中推荐 Input DNA 投入量

应用类型	样本类型	推荐 DNA 投入量
全基因组测序/靶向捕获测序	复杂基因组	1ng-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	10ng-1μg
靶向测序	长片段扩增产物	≥ 10ng
cfDNA/ctDNA	复杂基因组	≥ 1ng

◆ 上表为使用高质量 DNA 时推荐的 Input DNA 量，当 Input DNA 质量较差时，应适当上调使用量。

(2) Adapter 相关问题

本试剂盒兼容其他公司生产的类似的“TA-ligation”的 Adapters 试剂盒。

Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。推荐 Adapter：Input DNA 摩尔比在 10:1 -200:1 之间。Adapter 投入量过高可能会导致 Adapter 或 Adapter Dimer 残留；投入量不足会影响连接效率进而导致文库产出降低。Table 2 列举了不同 Input DNA 量推荐的 Adapter 使用量。

Table 2 DNA 投入量与 Adapter 使用浓度的关系

Input DNA	Adapter 工作浓度	Adapter 稀释倍数
50ng – 1μg	15μM	不稀释
25ng	7.5μM	1:2
10ng	3μM	1:5
5ng	1.5μM	1:10
2.5ng	0.75μM	1:20
1ng	0.3μM	1:50

◆ Input DNA 摩尔数可根据下述公式粗略计算：

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

◆ 推荐根据表中的浓度值或公司 Adapter 的稀释倍数使用 $0.1 \times TE$ 预先稀释 Adapter, 这样可以保证建库过程中 Adapter 的使用体积为固定数值($5\mu l$), 避免加样体积错误。

◆ Adapter 的质量会直接影响 Adapter 与 Input DNA 的摩尔比, 进而影响连接效率和文库产出。应选用优质的 Adapter; 使用 $0.1 \times TE$ 稀释和保存 Adapter 溶液; 尽量避免反复冻融。

(3) 关于 Adapter Ligation 产物纯化

◆ Adapter Ligation 产物需先去除过剩的 Adapter 和接头二聚体, 再进行后续文库扩增(PCR 文库)或直接上机测序(PCR-Free 文库)。对于平均大小在 $150-350bp$ 范围内的片段化 dsDNA 制备的文库, 默认纯化条件是 $0.8 \times$ 的纯化比例(产物 $110\mu l$, 磁珠 $88\mu l$)。

◆ 如需获得 Insert Size 更长的文库, 可通过适当降低磁珠使用量以减少小片段文库的含量, 但这种调整只能粗略改变文库主峰的位置, 如需要准确控制文库长度分布, 可在此步纯化之后进行长度分选。

◆ 如数据显示纯化产物中 Adapter 或 Adapter Dimer 污染严重, 可对其再进行一次磁珠纯化: 使用灭菌超纯水将第一次纯化产物体积补至 $50\mu l$, 加入 $50\mu l$ 磁珠($1 \times$)进行第二次纯化。这样可以显著降低 Adapter 或 Adapter Dimer 的残留水平, 尤其是当构建 PCR-Free 文库时。有时可能还需要配合 Adapter 的使用量降低才能完全消除 Adapter 或 Adapter Dimer 的残留。

(4) 磁珠的使用

◆ 试剂盒推荐使用 NGS Clean Beads Kit (Cat.No. HRK-CC105-450) 或 Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter®) 进行磁珠纯化。

注意: 如使用其他来源磁珠, 纯化条件可能需要更改!

◆ 磁珠操作通用注意事项:

▲ 磁珠使用量常用乘数“ \times ”进行标识, 表示相对于原始样品体积而言使用多少倍体积的磁珠。如样品原始体积为 $100\mu l$, $1 \times$ 纯化时磁珠使用体积为 $1 \times 100\mu l = 100\mu l$; $0.6 \times / 0.2 \times$ 分选时第一轮磁珠用量为 $0.6 \times 100\mu l = 60\mu l$, 第二轮磁珠用量 $0.2 \times 100\mu l = 20\mu l$ 。

▲ 磁珠使用量直接影响可纯化的 DNA 长度下限。乘数越高, 可纯化的 DNA 长度下限越短; 反之, 则越长。例如: $1 \times$ 磁珠只能高效纯化长于 $200bp$ 的 DNA, 更短的 DNA 会在纯化过程中大量丢失; 提高至 $1.8 \times$ 后, $150bp$ 的 DNA 也可进行高效纯化。

▲ 磁珠使用前应先平衡至室温(室温放置 $30min$), 否则会导致得率下降、分选效果不佳。

▲ 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。

▲ 样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 吸取上清时应余留 $1-3\mu l$ 。若不慎吸到磁珠, 会造成得率下降、分选效果不佳甚至影响后续酶反应。此时可将磁珠混匀重新置于磁力架上再次分离即可。由于磁力架吸力不同等原因, 默认分离时间有时可能需要延长, 以彻底分离磁珠和液体。

▲ 磁珠漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。

▲ 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应; 过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下 ($20-25^\circ C$), 室温干燥 $3-5min$ 足以让磁珠充分干燥。

▲ 通常情况下, 推荐使用洗脱液($10mM$ Tris-HCl, pH $7.5-8.5$)进行产物洗脱, 这样更有利于产物的稳定保存。然而, 当后续需对文库进行靶向捕获时, 为了利于捕获前文库干燥浓缩且避免对后续捕获反应产生影响, 应使用灭菌超纯水进行产物洗脱。

▲ 洗脱产物可于 $4^\circ C$ 稳定保存一周; 长期保存时应置于 $-20^\circ C$, 避免不必要的反复冻融。

(5) 关于片段大小选择

◆ 如 Input DNA 分布范围较宽, 建库过程中可以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, 也可通过切胶纯化的方式进行分选。

◆ 对于非酶切法建库, 长度分选执行位置有多种选择, 可置于 End Preparation 之前、Adapter Ligation 之后或 Library Amplification 之后。标准实验方案中不包含长度分选步骤。如需进行, 请参考附件进行双轮磁珠分选。

◆ 进行长度分选, Input DNA 损失量约为 $50\%-95\%$ 。有时需要在文库长度分布(进行长度分选)和文库复杂度(不进行长度分选)之间进行选择。当 Input DNA 量较低时, 分选会导致文库丰富度下降!

◆ 过度扩增的文库进行长度分布检测时, 常见高分子量位置出现拖带或尾峰。对应产物多为非互补链交叉退火产物。推荐解决方案为调整扩增循环数, 避免过度扩增, 不建议通过长度分选去除拖带或尾峰。

(6) 关于 Library Amplification

◆ PCR Primer Mix 适用于扩增含完整长度 Adapter 的测序平台文库。非完整长度 Adapter 或者其他平台文库需更换扩增引物, 推荐每条引物的扩增终浓度为 $0.5-1\mu M$ 。

◆ PCR 反应后期, 引物通常会先于 dNTP 被耗尽。此时, 过多的循环会造成扩增产物解链后进行非特异性退火, 产生非互补链交叉退火产物。这些产物在依赖电泳的检测方式中迁移速率比较慢, 在高分子量区域呈现弥散分布。它们是由正确长度的单链文库构成, 在变性后能够与 Flow Cell 正常结合并被测序。因此, 其存在与否对测序而言并无显著影响。然而, 这种产物的存在对于文库定量方式的选择会产生决定性影响。因产物不是完整的双链结构, 当使用基于识别双链 DNA 的荧光染料(Qubit®等)来进行文库定量时, 定量结果

会比实际值偏低；但基于 qPCR 的文库定量体系在定量过程中包含变性过程，仍然可以准确定量这种过度扩增的文库。

◆ Library Amplification 步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。Table 3 列举了当使用 1ng - 1μg 高质量 Input DNA 时，获得 100 ng 或 1μg 文库推荐的扩增循环数，对于 FFPE 样本需要相应增加 1-2 个循环。

Table3 1ng - 1μg Input DNA 扩增循环数推荐表

Input DNA 量	扩增循环数	
	100ng	1μg
1μg	0-2	2-3
500ng	0-2	3-4
250ng	1-3	4-6
100ng	3-4	6-7
50ng	4-5	7-8
10ng	8-11	11-14
5ng	10-13	13-16
2.5ng	12-14	15-17
1ng	14-16	17-18

▲ 上表为使用~200 bp 高质量 DNA 时测得的循环数参数。当 DNA 质量较差、文库长度较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

▲ 若建库过程中进行过长度分选，则参照较高循环数进行 Library Amplification；否则，参照较低循环数即可。

▲ 当 Adapter Ligation 步骤中使用其他来源的非完整长度 Adapter 时，须至少扩增 2 个循环以补全文库末端 Adapter 序列。

◆ 当 Adapter Ligation 时使用完整长度的 Adapter，且文库产出能够满足应用需要，可不进行 Library Amplification 步骤，从而获得 PCR-Free 文库。

(7) 其他注意事项

◆ 使用前请将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。

◆ 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行试验。

◆ 试验开始前，请清洁操作台，确保没有 RNA 酶和 DNA 酶的污染。

◆ 进行文库扩增前，请确保 PCR 仪已经调试好并处于稳定的状态。

◆ 试验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停试验，或者无需立即进行下游试验。可根据说明书推荐将试验产物保存于-20℃并安排后续试验。

◆ 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。

【文库构建操作流程】

1、末端修复&末端加 A

1) 向 200μl PCR 管中加入以下试剂（冰上操作）：

成分	体积
End Repair & A-Tailing Buffer	7μl
End Repair & A-Tailing Enzyme	3μl
Input DNA	Xμl
H ₂ O	50-Xμl
总体积	60μl

注：End Repair & A-Tailing Buffer 和 End Repair & A-Tailing Enzyme 可以预先混合。预混液在 4℃条件下稳定≤2 天，-20℃条件下稳定≤1 个月。

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，热盖温度设置 75℃，反应程序如下：

温度控制	时间	循环数
30℃	20min	1
65℃	20min	1
4℃	<1h	

4) 立即进行下一步操作。

2、Adapter 的连接（Adapter Ligation）

1) 如果需要,按照《注意事项》中 Table 2 进行 Adapter 稀释。

2) 向上述反应液中直接加入以下试剂：

成分	体积
末端修复&末端加 A 产物	60μl
PCR-grade water	10μl
Ligation Buffer	30μl
DNA Ligase V2	5μl
Adapter (15μM)	5μl
总体积	110μl

注：可以将 PCR-grade water、Ligation Buffer 和 DNA Ligase 预先混合。预混液在 4℃ 下稳定 ≤2 天，在 -20℃ 下稳定 ≤1 个月。

3) 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。

4) 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，热盖加热模块关闭或，反应程序如下：

温度控制	时间	循环数
22℃	15min	1
4℃	HOLD	

5) 立即进行下一步操作。

3、Ligation 产物纯化

注：本操作为非片段分选，如需分选见附件

- 1) 磁珠室温平衡半小时后，涡旋振荡混匀 Beads；
- 2) 向反应结束的体系中加入 0.6× 的 beads (66μl)，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀；
- 3) 将混合液放在室温下静置 5 分钟；
- 4) 5min 后，将 PCR 管置于磁力架上室温放置；
- 5) 待溶液变得清澈后，用移液器将澄清的液体移弃；
- 6) 保持离心管在磁力架上不动，加入 200μl 80% 酒精，室温放置 30 秒后移弃澄清液；
- 7) 重复步骤 6 一次，并将管底的残留液体彻底吸干；
- 8) 将 PCR 管从磁力架上移开，室温放置 3-5 分钟，直至磁珠干燥；
- 9) 加入 22μl H₂O，枪头吹打充分混匀，室温放置 3 分钟；
- 10) 将反应管置于磁力架上，室温放置 5 分钟；
- 11) 转移步骤 9 反应管中 20μl 澄清液进行后续实验。

4、PCR 反应 (Library Amplification)

1) 准备反应体系

成分	体积
连接产物	20μl
2×HiFi PCR MasterMix	25μl
PCR Primer Mix	5μl
总体积	50μl

2) 设置 PCR 扩增仪程序：

温度控制	时间	循环数
98℃	2min	1
98℃	30s	0-18×
60℃	30s	
72℃	30s	
72℃	5min	1
4℃	HOLD	

5、PCR 产物纯化

注：本操作为非片段分选，如需分选见附件

- 1) 磁珠室温平衡半小时后，涡旋振荡混匀 Beads；
- 2) 向反应结束的体系中加入 1× 的 beads (50μl)，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀；
- 3) 将混合液放在室温下静置 5 分钟；
- 4) 5min 后，将 PCR 管置于磁力架上室温放置；
- 5) 待溶液变得清澈后，用移液器将澄清的液体移弃；
- 6) 保持离心管在磁力架上不动，加入 200μl 80% 酒精，室温放置 30 秒后移弃澄清液；
- 7) 重复步骤 6 一次，并将管底的残留液体彻底吸干；
- 8) 将 PCR 管从磁力架上移开，室温放置 3-5 分钟，直至磁珠干燥；
- 9) 加入 33μl H₂O (RNase water)，枪头吹打充分混匀，室温放置 3 分钟；
- 10) 将反应管置于磁力架上，室温放置 5 分钟；
- 11) 转移步骤 9 反应管中 30μl 澄清液进行后续实验。

【附件：DNA 片段分选】

◆ 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。一般情况下，推荐将分选置于 Adapter Ligation 之后。也可根据 Input DNA 量与分布情况，将分选置于 End Preparation 之前或者 Library Amplification 之后。分选方案执行位置的选择和优缺点参见 Table 4。

Table 4 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
末端修复&末端加 A 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	Fragmentation 不充分或过度的基因组 DNA
Adapter Ligation 之后 (推荐方案)	DNA 质量差且样本量充足	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	酶切片段较大或分布范围较宽的 FFPE DNA, cfDNA
Library Amplification 之后	Input DNA 量少	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	cfDNA 或微量 DNA 样本
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	文库分布范围略宽	多重 PCR 产物、断裂程度较高的 FFPE DNA, cfDNA 或微量 DNA 样本

注: 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。

◆ 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 Table 5 中选择最适分选参数。

Table 5 分选方案执行位置选择

分选方案执行位置与条件	磁珠轮数	预期文库 Insert Size (bp)				
		150	200	300	400	500
末端修复&末端加 A 之前	一轮 X(μ l)	100	90	70	55	50
分选(样品体积补至 100 μ l)	二轮 Y(μ l)	30	20	20	20	15
Adapter Ligation 之后	一轮 X(μ l)	109	95	83	74	70
分选(样品体积 140 μ l)	二轮 Y(μ l)	28	28	21	17	14
Library Amplification 之后	一轮 X(μ l)	78	70	55	46	44
分选(样品体积补至 100 μ l)	二轮 Y(μ l)	20	20	20	20	15

▲ 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。

▲ 样品和磁珠的比例对于分选效果非常重要, 应尽可能保持样本体积和移液体积的准确性。

◆ 样品预处理(重要!)

▲ 如在 End Preparation 之前进行长度分选, 样品体积需补足至 100 μ l, 可使用灭菌超纯水补齐;

▲ 如在 Adapter Ligation 产物纯化之后进行长度分选, 样品体积需补足至 140 μ l, 可使用灭菌超纯水补齐;

▲ 如在 Library Amplification 之后进行长度分选, 样品体积需补足至 100 μ l, 可使用灭菌超纯水补齐;

▲ 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。

◆ 分选方案[参考 Table 5 确定 X 和 Y 的值]

- 1) 磁珠室温平衡半小时后, 涡旋振荡混匀 Beads。
- 2) 向反应结束的体系中加入 X μ l beads, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀;
- 3) 将混合液放在室温下静置 5 分钟;
- 4) 5min 后, 将 PCR 管置于磁力架上室温放置;
- 5) 待溶液变得清澈后, 用移液器将澄清的液体转移至新的 PCR 管中;
- 6) 吸取 Y μ l Beads 至上清中, 用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀;
- 7) 室温静置 5 min;
- 8) 5min 后, 将 PCR 管置于磁力架上室温放置。
- 9) 待溶液变得清澈后, 用移液器将澄清的液体移弃;
- 10) 保持离心管在磁力架上不动, 加入 200 μ l 80% 酒精, 室温放置 30 秒后移弃澄清液;
- 11) 重复步骤 10 一次, 并将管底的残留液体彻底吸干;
- 12) 将 PCR 管从磁力架上移开, 室温放置 3-5 分钟, 直至磁珠干燥;
- 13) 加入 23 μ l H₂O (RNase water), 枪头吹打充分混匀, 室温放置 3 分钟;
- 14) 将反应管置于磁力架上, 室温放置 5 分钟;
- 15) 转移步骤 9 反应管中 20 μ l 澄清液进行后续实验。