

# Fast DNA Library Plus Prep Kit for MGI

## 使用说明书

### 【产品名称】

Fast DNA Library Plus Prep Kit for MGI

### 【货号/规格】

KM004-A (24 rxns) ; KM004-B (96 rxns) ; 试用装 (6 rxns)

### 【产品简述】

本试剂盒针对 MGI 高通量测序平台, 提供了一管式便捷、通用的 DNA 文库构建方案, 将片段化、末端补平和末端加 A 结合到一个步骤, 大大缩短了建库的时间、减少了繁琐步骤造成的误差, 片段化和末端修复后的产物可直接进行接头连接, 不需额外纯化, 后续操作和 #KM001 Fast DNA Library Prep Kit for MGI 操作相同。完整的文库定量可将文库稀释至合适浓度, 用双链 DNA 荧光染料方法 (如 Thermo Qubit Flex Fluorometer) 或 qPCR 绝对定量方法。

### 【样本类型】

表1 常用DNA推荐投入量

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
全外显子靶向捕获测序	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

推荐使用 TE 或超纯水溶解 DNA 样品, 如样品中含有 EDTA, 则需磁珠纯化或加入一定体积的 Neutralization Buffer 中和。

### 【储存条件及有效期】

所有试剂均应保存于 -20℃, Ligation Buffer 在低温下会有晶体析出, 属正常现象, 应平衡至室温后使用, 产品有效期为 12 个月。

### 【组成成分】

组分	24 rxns	96 rxns
FEP Buffer	120 μl	480 μl
FEP Enzyme Mix	240 μl	2×480 μl
Fast DNA Ligase	120 μl	2×240 μl
Fast Ligation Buffer	600 μl	4×600 μl
2× HIFI Library PCR Master Mix	600 μl	4×600 μl
Primer Mix for MGI *	120 μl	480 μl
Neutralization Buffer	120 μl	480 μl

\*FEP Buffer 为片段化、末端修复的反应 buffer, FEP Enzyme Mix 为片段化、末端修复相关酶混合物。

\*若有多个样本, 则推荐使用 #KM002 和 #KM003 接头引物组合, 本试剂盒提供一套引物, 引物序列如下:

5'-TGTGAGCCAAGGAGTTG-3'

5'-GAACGACATGGCTACGA-3'

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

### 【注意事项】

1. 我们提供两套不完整接头引物 (GDS Adapter, #KM002 和 #KM003, 需另外购买), 除此之外, 客户也可以针对 MGI 测序平台选择其他厂家或自行合成合适的接头, 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2 Adapter 推荐的使用浓度

DNA 投入量	Adapter 推荐浓度	Adapter:Insert 摩尔比*	GDS Adapter 稀释度
1μg	10μM	10:1	不稀释
500ng	10μM	20:1	不稀释
250ng	10μM	40:1	不稀释
100ng	7.5μM	100:1	3:4
50ng	5μM	200:1	1:2
25ng	2.5μM	200:1	1:4

1ng	1μM	200:1	1:10
-----	-----	-------	------

\* 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)≈Input DNA质量(ng)/[0.66×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0.1×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 μl，避免加样错误，并尽量避免反复冻融。

2. 2× HIFI Library PCR Master Mix 用的酶是一种 B 家族 DNA 聚合酶，具有 5'-3'聚合酶和 3'-5'核酸外切酶活性，但缺乏 5'-3'核酸外切酶活性，具有极高的保真度和均一性，持续合成能力强。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3 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	2-5
500ng	0	2-5
250ng	1-3	5-7
100ng	2-4	6-8
50ng	4-6	8-10
25ng	5-7	9-12
10ng	7-9	11-13
5ng	9-11	13-14
2.5ng	10-12	14-16
1ng	11-13	15-17

备注：1. 上表为使用 150bp 标准DNA 测试结果，仅供参考。

2. 如使用不完整接头，则应扩增最少循环数（1-3）才能得到完整文库。

3. 如投入 DNA 质量较差，或建库过程中进行过长度分选，则应适当提高扩增循环数。

#### 【标准建库流程】

#### 片段化和末端修复

1. 确定模板 DNA 的溶剂成分，如不含有 EDTA，则直接进行步骤 2；如含有 EDTA，则用 2.2×的磁珠进行纯化，或按照下表 EDTA 的含量加入对应体积的 Neutralization Buffer 进行中和：

EDTA 浓度	Neutralization Buffer 加入体积
1mM	5 μl
0.8mM	4 μl
0.6mM	3 μl
0.5mM	2.5 μl
0.4mM	2 μl
0.2mM	1 μl
0.1mM	0.5 μl
<0.1mM	0 μl

2. 在 PCR 管中配制如下反应：

试剂	体积
Input DNA	X μl
FEP Buffer	5 μl
Neutralization Buffer	Y μl
ddH <sub>2</sub> O	To 65 μl

3. 在上述体系中加入 10 μl FEP Enzyme Mix，吹打均匀后短暂离心，**立即放入 PCR 仪 中进行下述反应：**

温度	时间
20℃	15min
37℃	参照表4
65℃	15min
4℃	∞

表 4 得到不同长度文库所需保温时间

片段长度	时间
150bp	20-30min

250bp	15-20min
350bp	10-15min
550bp	6-10min

### 接头连接

1. 片段化和末端修复后尽快进行连接反应。
2. 根据表 2 对接头进行稀释。
3. 配制如下反应：

试剂	体积
前一步产物	50 $\mu$ l
Fast Ligation Buffer	25 $\mu$ l
Fast DNA Ligase	5 $\mu$ l
Adapter X for MGI	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	15 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

4. 用移液枪小心吹打 10 次混匀，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
20 $^{\circ}$ C	15min
4 $^{\circ}$ C	$\infty$

### 磁珠纯化/长度分选推荐方案（具体磁珠体积应根据实际样品长度调整）

1. 取100 $\mu$ l 连接产物加入合适的离心管中。
2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入 100 $\mu$ l 磁珠悬液，用移液器轻轻吹打 10 次（或涡旋 30s）室温静置 5min。
3. 将离心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。注意不要吸到磁珠。
4. 保持离心管在磁力架上，加入 200 $\mu$ 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。
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。
6. 保持离心管在磁力架上，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。

7. 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 22 $\mu$ l 洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）反复吹打至少 10 次（或涡旋 30s）使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。
8. 将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，将 20 $\mu$ l 上清液转移到新的离心管中，产物尽快进行后续实验或放在-20 $^{\circ}$ C长期保存。

### 文库扩增

1. 在 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 $\mu$ l
2 $\times$ HIFI Library PCR Master Mix	25 $\mu$ l
Primer mix for MGI	5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

2. 用移液枪小心吹打 10 次混匀，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 $^{\circ}$ C	3min	1
98 $^{\circ}$ C	20sec	根据表3选择适当循环数
60 $^{\circ}$ C	15sec	
72 $^{\circ}$ C	30sec	
72 $^{\circ}$ C	5min	1
4 $^{\circ}$ C	$\infty$	-

### 磁珠纯化/长度分选推荐方案（具体磁珠体积应根据实际样品长度调整）

1. 取50 $\mu$ l 连接产物加入合适的离心管中。
2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入 45 $\mu$ l 磁珠悬液，用移液器轻轻吹打 10 次（或涡旋 30s）室温静置 5min。
3. 将离心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。注意不要吸到磁珠。
4. 保持离心管在磁力架上，加入 200 $\mu$ 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。

- 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。
- 保持离心管在磁力架上，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。
- 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 22 $\mu$ l 洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）反复吹打至少 10 次（或涡旋 30s）使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。
- 将离心管置于磁力架上至溶液变得澄清，将 20 $\mu$ l 上清液转移到新的离心管中，产物可在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 1-2 周，于 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

**【附录】双侧磁珠分选操作及比例推荐方案**

如需进行二轮长度分选，我们提供如下磁珠分选比例方案，可根据预期文库长度来选择适当的磁珠体积，长度分选可以选择在末端修复前或扩增之后，两次或两次以上的二轮分选将会大大降低文库产出率。

下表中文库体积补全至 100 $\mu$ l，根据预期文库大小选择二轮分别加入的磁珠体积，并根据下述说明进行分选操作。

表 5 二轮磁珠分选推荐加入量

预期文库大小		150bp	200bp	250bp	300bp	400bp	500bp	600bp	700bp
磁珠体积( $\mu$ l)	一轮	100	90	80	70	60	55	50	45
	二轮	30	20	20	20	20	15	15	15

- 将文库补全至 100 $\mu$ l，加入至 200 $\mu$ l PCR 管中，标上编号 A，按表 5 加入特定体积的磁珠（一轮），用移液器吹打 30s，室温静置 5min。
- 将 PCR 管置于磁性分离器上至溶液变得澄清，用移液器将上清转移到一个新的 PCR 管中，标上编号 B，弃磁珠。
- 在管 B 中按表 5 加入特定体积的磁珠（二轮），用移液器吹打 30s，室温静置 5min，将 PCR 管置于磁性分离器上至溶液变得澄清，用移液器吸去上清。
- 保持 PCR 管在磁性分离器上，加入 200 $\mu$ l 80% 新鲜配制的乙醇溶液，室温静置 30s，用移液器吸去上清，弃上清。
- 重复步骤 4 一次，最后一次洗涤应尽量吸去干净洗涤液。
- 保持管 B 在磁性分离器上，风干至磁珠表面无明显光泽。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。
- 将管 B 从磁力架上取下，向管中加入 22 $\mu$ l 洗脱液，反复吹打至少 10 次（或涡旋 30s）使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。

备注：如不进行靶向捕获，则加洗脱缓冲液（10mM Tris-HCl, pH8.0-8.5）如进行靶向捕获，则用灭菌超纯水进行洗脱。

- 将管 B 置于磁力架上至溶液变得澄清，将 20 $\mu$ l 上清液转移到新的离心管中。

本品仅供科学研究使用

图1 标准建库流程图

