

Hieff NGS[®] Methyl-seq ssDNA Library Prep Kit for MGI[®] 单链 DNA 甲基化建库试剂盒

12226ES

产品使用说明书

Ver. CN20250507



目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	1
储存条件	1
注意事项	1
使用说明	5

产品简介

Hieff NGS® Methyl-seq ssDNA Library Prep Kit for MGI® 是针对 MGI® 测序平台专业开发设计的新一代单链 DNA 甲基化建库试剂盒，该试剂盒改善了接头连接效率，并采用了更加新型的高保真酶，显著提高扩增均一性和保真性。适用于各种常规样本和经 Bisulfite 处理的样本类型，包括 gDNA、FFPE DNA、cell free DNA (cfDNA)、ChIP DNA 等，可以满足 10 pg~250 ng DNA 样本建库。该试剂盒可兼容短至 40 bp 的 DNA 样本，满足常规微量且短片段样本的建库。相较于传统的双链 DNA 甲基化建库，我们提供了一种基于 DNA 单链的甲基化建库方法，经过 DNA 变性、3' Adapter 连接、互补链延伸、5' Adapter 连接及文库扩增，将 DNA 片段最终转化为适用于 MGI® 平台测序的文库。本产品不仅更加经济，同时也提供了简便快速的建库流程，一般在 2 小时左右可以完成正常建库。

本试剂盒包含 3' 接头连接试剂，互补链合成试剂，5' 接头连接试剂以及后续文库扩增所需的高保真酶试剂。试剂盒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。

产品信息

货号	12226ES08 / 12226ES24 / 12226ES96
规格	8 T / 24 T / 96 T

组分信息

组分编号		组分名称	12226ES08	12226ES24	12226ES96
12226-A	●	Ligation Buffer A 2.0	32 µL	96 µL	384 µL
12226-B	●	T7 Adapter 2.0	8 µL	24 µL	96 µL
12226-C	●	Enzyme Mix 2.0	32 µL	96 µL	384 µL
12226-D	●	Extension Mix 2.0	344 µL	1032 µL	3×1376 µL
12226-E	●	Extension Reagent 2.0	24 µL	72 µL	288 µL
12226-F	●	Ligation Buffer B 2.0	160 µL	480 µL	2×960 µL
12226-G	●	T5 Adapter 2.0	24 µL	72 µL	288 µL
12226-H	●	T4 DNA ligase 2.0	40 µL	120 µL	480 µL
12226-I	○	2 × HiFi Uracil PCR Mix 2.0	200 µL	600 µL	2×1200 µL

储存条件

-25~-15℃保存，有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 请于使用前将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
3. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
4. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
5. 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。
6. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检

测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。

7. 本产品仅作科研用途！

二、关于 DNA 样本及片段化

1. 试剂盒兼容的 DNA 投入量为 10 pg - 250 ng。Input DNA 的准确定量对于后续选择文库扩增的循环数十分重要。推荐使用 ssDNA Assay Kit for Qubit® (Yeasten, Cat#A12645) 对 ssDNA 进行定量；使用 dsDNA HS Assay Kit for Qubit® (Yeasten, Cat#12640) 或 1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit® (Yeasten, Cat#A12642)对 dsDNA 进行定量。
2. 若样本为碎片化严重的 DNA，如 ChIP DNA、cfDNA 或降解严重的 FFPE DNA 等，则无需进行样本片段化。若样本为完整性良好的 DNA，则推荐进行样本片段化。片段化方式可选择超声法或酶切法。
3. 经 Bisulfite 转化的 DNA，确保洗脱液中不带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，否则可能会影响 3' Adapter 连接效率。如条件不满足，可先将产物纯化后溶于 $0.1 \times TE$ (pH 8.0)中，再进行文库构建。

三、关于磁珠纯化

1. 建库过程中有多个步骤需要使用 DNA 纯化磁珠，我们推荐使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasten Cat#12601) 或 AMPure® XP 磁珠(Beckman Cat#A63880)进行 DNA 纯化和分选。
2. 磁珠使用前应先平衡至室温（提前从冰箱拿出，室温静置约 30 min），否则会导致得率下降、分选效果不佳。
3. 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。
4. 请勿将磁珠置于 0°C 以下存放。
5. 转移上清时，请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量。
6. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
7. 磁珠使用过程中，应保证移液准确性。
8. 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，室温干燥 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。
9. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 $0.1 \times TE$ Buffer 洗脱，产物于 4°C 可保存 2 天，-20°C 可保存 1 个月。

四、关于 lambda DNA（未甲基化）的样本文库构建

使用含有未甲基化的λDNA 进行文库构建时，需要在样本片段化前混入样品中以评估亚硫酸氢盐的转化效率。如果样本不需要进行片段化(例如 cfDNA)，未甲基化的λDNA 需要片段化为与样本中的片段长度相近的长度。我们建议未甲基化λDNA 掺入水平为 0.1-0.5% w/w。

五、应用范围

本试剂盒适用于各种常规样本和经 Bisulfite 处理的样本类型，包括 gDNA、FFPE DNA、cell free DNA (cfDNA)、ChIP DNA 等，可以满足起始量 10 pg~250 ng 及短至 40 bp 的 DNA 样本建库。

六、关于文库扩增 (Library Amplification)

文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 1 列举了使用本试剂盒进行文库扩增，不同起始量的 DNA 对应的 PCR 循环数（产量不低于 1 μg）。常规样本的扩增循环数可以对应下表中减少 1-2 个循环数。

表 1 不同起始量 DNA 对应的 PCR 循环数推荐

模板	起始量	PCR 循环数 (PCR cycle)
gDNA	250 ng	5-7
	100 ng	7-8
	50 ng	8-10
	10 ng	10-12
	1 ng	15-17
	100 pg	18-20
	10 pg	21-23
cfDNA	5 ng	12-14
FFPE DNA	250 ng	9-12

七、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

- 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。
- 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit®、PicoGreen®等；基于 qPCR 绝对定量的方法。
- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit®、PicoGreen®等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物以及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。
- 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

八、关于文库结构

Index 2 (i5)

/5Phos/CTCTCAGTACGTCAGCAGTT[Barcode2]CAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTT-NNNNNN-Pol
yC-AAGTCGGAGGGGTTCCGCCAGAATCCTTCTGTT[Barcode1]GACTATTCCAGCGGTACG

[Barcode 2]表示 10 bp 的 Barcode 2 序列，[Barcode 1]表示 10 bp 的 Barcode 1 序列。-NNNNNN-：插入序列；PolyC 是一串 3-10 bp 的 dCTP 序列

使用说明

一、自备材料

- DNA 定量：ssDNA Assay Kit for Qubit® (Yeasten, Cat#A12645)或其他等效产品。
dsDNA HS Assay Kit for Qubit® (Yeasten, Cat#12640), 1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit® (Yeasten, Cat#A12642)或其他等效产品。
- DNA 纯化磁珠：推荐使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads, Cat#12601 或 AMPure XP Beads, Cat#A63880 或其他等效产品。
- DNA 质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。

4. DNA Index Kit: 推荐使用 Yeasen 高质量 PCR Index Kit, 双端 Index Primers: Hieff NGS[®] Stubby Unique Dual Index Primer Kit for MGI[®] (Cat#12231), 该 index primer 是专门搭配 Hieff NGS[®] Methyl-seq ssDNA Library Prep Kit for MGI[®] (Cat#12226)使用。

5. 其他材料: 无水乙醇、灭菌超纯水、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5; 0.1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

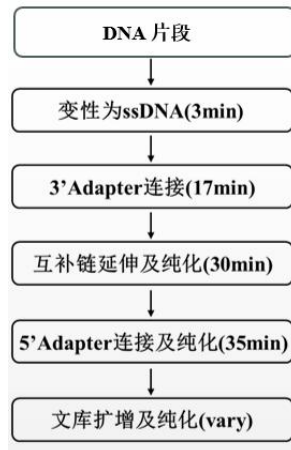


图1 Hieff NGS[®] Methyl-seq ssDNA library Prep kit for MGI[®] 操作流程

三、操作步骤

3.1 DNA 预处理

此步骤将样本中的 DNA 全部变性为单链 DNA。

1. 预热 PCR 仪: 热盖设置为 105°C, 反应温度设置为 95°C。
2. 将片段化 DNA (10 pg~250 ng)加入到 0.2 mL PCR 管中, 再加入 ddH₂O 稀释到总体积为 31 μL。
3. 将 PCR 管放入 PCR 仪中, 进行 95°C 孵育 3 min 后, 立即将 PCR 管置于冰上进行瞬间冷却, 静置 2 min。

【注】: DNA 变性后立即置于冰上, 避免变性的单链 DNA 复性。

3.2 3' 接头连接 (3' Adapter Ligation)

此步骤在 ssDNA 的 3' 末端连上截短型接头。

1. 将表 2 中试剂解冻后颠倒混匀后瞬离, 置于冰上备用。
2. 在 PCR 管中配制如下 3' Adapter Ligation 的预混液(确保在冰上进行)。

表 2 3' Adapter Ligation 预混液体系

名称	体积 (μL)
Ligation Buffer A 2.0	4
T7 Adapter 2.0	1
Enzyme Mix 2.0	4
Total	9

【注】: 此预混液需在 DNA 预处理前于冰上完成配置, 使变性后的 DNA 可立即进行 3' Adapter 连接, 防止预处理的 DNA 出现复性, 影响模板利用率。

3. 将 9 μL 的 3' Adapter Ligation 预混液加入变性好的 DNA 样本中，用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使反应液至管底。

4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 3 所示的反应程序，进行 3' Adapter 连接反应。

表 3 3' Adapter 连接反应程序

温度	时间
热盖 105 °C	On
37°C	15 min
95°C	2 min
4°C	Hold

4. 待反应结束，将 PCR 管置于冰上，进行互补链延伸反应。

3.3 互补链延伸 (Extension)

此步骤将 3' 末端连接了截短型接头的单链 DNA 通过延伸引物合成完整的双链 DNA。

1. 将表 4 中试剂解冻后颠倒混匀后瞬离，置于冰上备用。

2. 于上步 PCR 反应管中依次加入如下组分(确保在冰上操作)，使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表 4 互补链延伸体系

名称	体积 (μL)
上述连接产物 (3.2 步骤产物)	40
Extension Mix 2.0	43
Extension Reagent 2.0	3
Total	86

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 5 所示的反应程序，进行互补链延伸反应。

表 5 互补链延伸反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
98°C	1 min
60°C	2 min
68°C	5 min
4°C	Hold

3.4 产物纯化:

1. 准备工作: 将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

3. 吸取 103 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (1.2 $\times$ ，Beads : DNA=1.2:1)至上述延伸产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

【注】：如需要对短至 40 bp 的 DNA 样本建库，纯化比例参考文末附录中的表 10。

4. 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. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。

7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 3-5 min）。

【注】：1. 移除上清后，如仍有少量残留，可以将 PCR 管短暂离心后置于磁力架中静置，再使用 10 μ L 移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥（龟裂）而降低回收效率。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 24 μ L ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。

9. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 22 μ L 上清至干净的 PCR 管中。

【注】：1. 若起始 gDNA 样本投入量低于 10 ng，建议进行 2 轮纯化，在第一轮纯化后用 52 μ L ddH₂O 洗脱，取 50 μ L 上清，然后再加入 1.2 $\times$ beads (60 μ L) 进行再次纯化，24 μ L ddH₂O 洗脱，取 22 μ L 用于后续反应；

2. 此处样本可以在 -20°C 暂存 24 h。

10. 进行步骤 3.5，5' 接头连接。

3.5 5' 接头连接 (5' Adapter Ligation)：

此步骤在延伸好的双链 DNA 的原始模板链 5' 端连接上截短型接头。

1. 将表 6 中试剂解冻后颠倒混匀后瞬离，置于冰上备用。

2. 于纯化产物中依次加入如下组分(确保在冰上操作)，使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表 6 5' 接头连接反应体系

名称	体积 (μ L)
上述纯化产物	22
Ligation Buffer B 2.0	20
T5 Adapter 2.0	3
T4 DNA ligase 2.0	5
Total	50

【注】：1. 可以提前配置 Ligation Buffer B 2.0 和 T5 Adapter 2.0 的预混液，切不可将 T4 DNA ligase 2.0 直接加入到预混液中，以免发生接头自连现象。 2. Ligation Buffer B 2.0 比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 7 所示的反应程序，进行 5' 接头连接反应。

表 7 5' 接头连接反应程序

温度	时间
热盖	Off
20°C	15 min
4°C	Hold

3.6 产物纯化：

1. 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

3. 吸取 30 μ L Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.6 $\times$ ，Beads:DNA=0.6:1) 至上述延伸产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

4. 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. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。

7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 3-5 min）。

【注】：1. 移除上清后，如仍有少量残留，可以将 PCR 管短暂离心后置于磁力架中静置，再使用 10 μ L 移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22 μ L ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。

9. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 20 μ L 上清至干净的 PCR 管中。

【注】：此处样本可以在 -20°C 暂存 24 h。

10. 进行步骤 3.7，文库扩增。

3.7 文库扩增 (Library Amplification)

此步骤通过引物扩增，获得大量完整文库。

1. 将表 8 中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

2. 于纯化产物中依次加入如下组分，使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表 8 文库扩增反应体系

名称	体积 (μ L)
纯化后的连接产物	20
2 $\times$ HiFi Uracil PCR Mix 2.0	25
UDI Primer Mix*	5
Total	50

【注】：*请使用试剂盒搭配的双端 Index Primers: Hieff NGS® Stubby Unique Dual Index Primer Kit for MGI®(Cat#12231)进行扩增。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 9 所示反应程序，进行文库扩增反应。

表 9 文库扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	On	—
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	Cycle 数参考注意事项中的表 1
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	—

【注】：由于不同样本的投入量及质量不一样，实验中需根据建库起始的投入量，样本处理情况等适当调整扩增循环数。

3.8 扩增产物磁珠纯化(Post Amplification Clean Up)

1. 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

3. 吸取 42.5 μ L Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.85 $\times$ ，Beads:DNA=0.85:1)至上述延伸产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

4. 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. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。

7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 3-5 min）。

【注】：1. 移除上清后，如仍有少量残留，可以将 PCR 管短暂离心后置于磁力架中静置，再使用 10 μ L 移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22 μ L ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。

9. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 20 μ L 上清至干净的 PCR 管中。

【注】：此处样品可置于-20℃保存。长期保存则置于-80℃，同时应避免不必要的反复冻融。

3.9 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项七。

附录

1. 原始测序数据预处理

- 由于 3' Adapter Ligation 步骤额外添加了低复杂度的 Poly(C)结构，且甲基化文库存在碱基不平衡，为了提高测序的质量，建议在测序时加入不少于 25%的 PhiX 文库或和其他复杂度较高的文库同时 Pooling 上机。
- 由于文库 3' 端含有 polyC 结构（见注意事项中的文库序列），Reads2 序列的起始会含有 PolyG 序列，因此在序列比对前需要进行 reads trim，若 reads1 测通后，其序列的 3' 端也会存在 PolyC，同样需要进行 reads trim。

2. 短片段模板纯化方案

如需要对短至 40 bp 的 DNA 样本建库，则需在不同纯化步骤，采用表 10 中推荐的磁珠使用量进行纯化。

表 10 短片段各步骤纯化比例推荐

步骤	样品体积	磁珠体积	洗脱体积
Extension 后纯化	86 μ L	(1.8 $\times$)	34 μ L
5' Adapter 连接后纯化	50 μ L	(0.8 $\times$)	22 μ L
文库扩增后纯化	50 μ L	(1.8 $\times$)	22 μ L

3. 常见问题

DNA 文库产量偏低，出现接头二聚体，大片段等问题，可以考虑从如下方面进行优化：

- 文库产量偏低，应考虑样本溶液中含有酶抑制剂组分，建议再次纯化；
- 文库出现接头二聚体，推荐在互补链延伸之后进行 2 轮纯化，在第一轮纯化后用 50 μ L 洗脱，然后加入 1.2 $\times$ beads (60 μ L)进行再次纯化；
- 对于文库大片段的出现，考虑是过度扩增引起，可以适当减少扩增循环数。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐