

Hieff NGS[®] DNA Library Prep Kit

全能型 DNA 建库试剂盒

Cat No.13577

使用说明书

Product Manual



目 录





产品信息	1
产品描述	1
产品组分	1
运输与保存方法	1
注意事项	1
使用方法	4

产品信息






产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® DNA Library Prep Kit 全能型 DNA 建库试剂盒	13577ES08	8 T
	13577ES24	24 T
	13577ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® DNA Library Prep Kit 是针对 Illumina® 和 MGI® 高通量测序平台专业开发设计的新一代建库试剂盒。本产品采用高质量的酶学组成，在前一代建库试剂盒的基础上，改进了 DNA 片段末端修复和加 A 效率，同时改善了接头连接效率。本试剂盒采用新型的高保真酶，显著提高扩增均一性和保真性，可应用于常规动植物基因组、微生物基因组、FFPE、cfDNA、ChIP DNA 等样本，助力获得优异的测序数据。

-  适用 100 pg-1000 ng 所有 DNA 样本，包含 cfDNA、FFPE 等
-  业界领先的文库转化率，最高可达 70% 以上
-  多样本验证可获得优异的文库与测序数据
-  严格的批次性能与稳定性质控

产品组分

组分编号	组分名称	13577ES08	13577ES24	13577ES96
13577-A	 Endprep Buffer	56 µL	168 µL	672 µL
13577-B	 Endprep Enzyme	24 µL	72 µL	288 µL
13577-C	 Ligation Enhancer	240 µL	720 µL	3×960 µL
13577-D	 Rapid T4 DNA Ligase	80 µL	240 µL	2×480 µL
13577-E	 Canace® Pro Amplification Mix	200 µL	600 µL	3×800 µL

运输与保存方法

干冰运输。-25~-15 °C 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 片段化

1. 本试剂盒中兼容机械法及酶切法片段化的 DNA。
2. 本试剂盒兼容范围为 100 pg - 1000 ng Input DNA。应尽可能使用 $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$ 的高质量 Input DNA。表 1 中列举了将本试剂盒应用于常见应用中推荐的 Input DNA 量。

表 1 常见应用中推荐 Input DNA 量

应用	样本类型	推荐 Input DNA 量
全基因组测序	复杂基因组	50 ng-1000 ng
靶向捕获测序	复杂基因组	10 ng-1000 ng
全基因组测序, 靶向捕获测序	FFPE DNA	50 ng-1000 ng
全基因组测序, 靶向捕获测序	cfDNA/ctDNA	≥500 pg
全基因组测序	微生物基因组	≥1 ng
全基因组测序 PCR-free 测序	高质量 DNA	≥50 ng

【注】：上表为使用高质量 DNA 时推荐的 Input DNA 量，当 Input DNA 质量较差或需要进行片段分选时，应适当上调使用量。

3. Input DNA 特指投入末端修复/dA 尾添加步骤中的 DNA。

4. Input DNA 制备过程中带入的高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复/dA 尾添加步骤反应效率，建议 DNA 片段化后进行磁珠纯化或分选。当使用机械法进行 DNA 片段化且产物不进行纯化或长度分选而直接建库时，请将 DNA 稀释在 TE Buffer 中进行片段化，请勿在灭菌超纯水中进行。

三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 针对 Illumina®测序平台, Yeasen 提供 Hieff NGS® Complete Adapter Kit for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#13519~Cat#13520), 试剂盒中的接头浓度为 15 μM; Hieff NGS® 384 CDI Primer for Illumina®(Cat#12412~Cat#12413), 试剂盒中的接头浓度为 15 μM; Hieff NGS® Stubby UDI Primer Kit for Illumina® (Cat#12404~Cat#12407), 试剂盒中的接头浓度为 15 μM; Hieff NGS® Dual UMI UDI Adapter Kit for Illumina®, Set1~Set2 (Cat#13370~Cat#13371), 试剂盒中的接头浓度为 15 μM。

2. 针对 MGI®高通量测序平台, Yeasen 提供了 Hieff NGS® Complete Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 3 (Cat#13360 ~ Cat#13362), 试剂盒中的接头浓度为 10 μM; Hieff NGS® 384 CDI Primer for MGI®, Set 1~Set 2 (Cat#13363 ~ Cat#13364), 试剂盒中的接头浓度为 10 μM; 也可搭配 Hieff NGS® Dual UMI UDB Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 2 (Cat#13367~Cat#13368)双端 UMI UDB 短接头, 试剂盒中的接头浓度为 10 μM。

3. Adapter 的质量和浓度直接影响连接效率及文库产量。Adapter 用量过高可能会产生较多 Adapter Dimer; 用量较低可能会影响连接效率及文库产量; 使用 Adapter 时根据 Input DNA 量用 TE Buffer 进行相应稀释。

表 2 列举了使用本试剂盒的不同 Input DNA 量推荐的针对 Illumina®测序平台的 Adapter 稀释方法。

表 3 列举了使用本试剂盒的不同 Input DNA 量推荐的针对 MGI®测序平台的 Adapter 稀释方法。

表 4 列举了使用本公司 Hieff NGS® Dual UMI UDI Adapter Kit for Illumina®, Set1~Set2 (Cat#13370~Cat#13371) 的不同 Input DNA 量推荐的 UMI Adapter 稀释方法。

表 5 列举了使用本公司 Hieff NGS® Dual UMI UDB Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 2 (Cat#13367~Cat#13368)的不同 Input DNA 量推荐的 UMI Adapter 稀释方法。

表 2 100 pg-1 μg Input DNA 针对 Illumina®测序平台推荐的 Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter 稀释倍数	浓度
0.1ng ~ 1 ng	150 倍稀释	0.1 μM
1 ng ~ 10 ng	75 倍稀释	0.2 μM
10 ng ~ 25 ng	15 倍稀释	1 μM
25 ng ~ 100 ng	7.5 倍稀释	2 μM
100 ng ~ 1000 ng	3 倍稀释	5 μM

表 3 100 pg-1 μg Input DNA 针对 MGI®测序平台推荐的 Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter 稀释倍数	浓度
0.1ng ~ 1 ng	100 倍稀释	0.1 μM
1 ng ~ 10 ng	50 倍稀释	0.2 μM
10 ng ~ 25 ng	10 倍稀释	1 μM
25 ng ~ 100 ng	5 倍稀释	2 μM
100 ng ~ 1000 ng	2 倍稀释	5 μM

表 4 100 pg-1ug Input DNA 针对 Illumina®测序平台推荐的 UMI Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter 稀释倍数	浓度
0.1ng ~ 1 ng	150 倍稀释	0.1 μM
1 ng ~ 10 ng	75 倍稀释	0.2 μM
10 ng ~ 25 ng	15 倍稀释	1 μM
25 ng ~ 100 ng	7.5 倍稀释	2 μM
100 ng ~ 1000 ng	3 倍稀释	5 μM

表 5 5 ng-1ug Input DNA 针对 MGI®测序平台推荐的 UMI Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter 稀释倍数	浓度
5 ng ~ 25 ng	50 倍稀释	0.2 μM
25 ng ~ 100 ng	10 倍稀释	1 μM
100 ng ~ 1000 ng	4 倍稀释	2.5 μM

四、关于磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection)

1. DNA 片段长度分选步骤可选择在末端修复/dA 尾添加之前，或接头连接后，或文库扩增后进行。
2. 当 Input DNA 质量≥50 ng，您可选择在接头连接后分选；如 Input DNA 质量<50 ng，建议您在文库扩增后进行分选。
3. Ligation Enhancer 中包含高浓度的 PEG，会对双轮磁珠分选产生显著影响。因此，如在接头连接后进行长度分选，必须先进行纯化步骤，再进行双轮分选步骤；如在末端修复/dA 尾添加之前或文库扩增后进行长度分选，可直接进行双轮磁珠分选步骤。
4. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
5. 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。
6. 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。
7. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
8. 进行长度分选时，初始样品体积应尽量≥100 μL，不足时请用超纯水补齐。以防因样品体积太小导致移液误差增大。
9. 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。
10. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱，产物可于 4 °C 可保存 1-2 周，-20 °C 可保存 1 个月。

五、关于文库扩增 (Library Amplification)

1. 是否需要文库扩增取决于 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。如使用完整长度 Adapter，当 Input DNA<200 ng 时，推荐进行文库扩增；当 Input DNA≥200 ng 或者不需要进行文库扩增时，可不进行文库扩增。
2. 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 6 列举了使用本试剂盒，获得 1 μg 文库的推荐循环数。

表 6 100 pg-1000 ng Input DNA 获得 1 μg 产物扩增循环数推荐表

Input DNA	1 μg 文库产量推荐 PCR 循环数
1000 ng	2 - 4
500 ng	2 - 4
250 ng	4 - 6
100 ng	5 - 7
50 ng	7 - 9
10 ng	9 - 11
5 ng	10 - 12
1 ng	12 - 15

【注】：

1. 表 6 为使用 200 bp 左右的高质量 Input DNA 测试的循环数参数。FFPE DNA 质量差异较大，当 DNA 质量较差或文库长度较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。
2. 如果建库过程中需要进行过片段分选，推荐较高循环数进行 Library Amplification；反之则参照较低循环数即可。
3. 如果使用了不完整的接头，需要扩增至少 2 个循环，形成完整的接头。

六、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

1. 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。
2. 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。
3. 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop[®]等。
4. 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），可排除单端或两端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。
5. 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。

使用方法**一、自备材料**

1. 纯化磁珠：Cat#12601, Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 或 Cat#A63880, AMPure XP Beads 或其他等效产品。
2. DNA 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
3. DNA Adapter: 可选 Yeasen 官网的 illumina 平台接头 Hieff NGS[®] Complete Adapter Kit for Illumina[®], Set 1~Set 2 (Cat#13519~Cat#13520)；双端 384 种 CDI Primers：Hieff NGS[®] 384 CDI Primer for Illumina[®], Set 1~Set 2 (Cat#12412~Cat#12413)；双端 384 种 UDI Primers: Hieff NGS[®] Stubby UDI Primer Kit for Illumina[®] (Cat#12404~Cat#12407)，Hieff NGS[®] Dual UMI UDI Adapter Kit for Illumina[®], Set1~Set2 (Cat#13370~Cat#13371) DNA 文库构建专用配套试剂盒，或者可选匹配 MGI 平台的接头：Hieff NGS[®] Complete Adapter Kit for MGI[®], Set 1~Set 3 (Cat#13360 ~ Cat#13362)；Hieff NGS[®] 384 CDI Primer for MGI[®], Set 1~Set 2 (Cat#13363 ~ Cat#13364)；Hieff NGS[®] Dual UMI UDB Adapter Kit for MGI[®], Set 1~Set 2 (Cat#13367~Cat#13368)；接头详细介绍信息参考上面注意事项中的第三部分“关于接头连接”。
- DNA Primer Mix: Cat#12190, DNA Library Prep Primer Mix for Illumina[®] 或 Cat#12191, DNA Library Prep Primer Mix for MGI[®]。
4. 其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5+1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

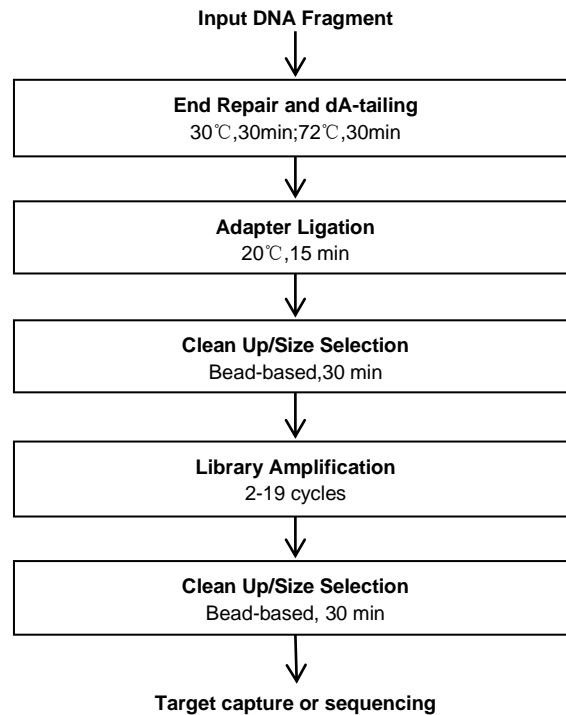


图1 HiSeq NGS[®] DNA Library Prep Kit 操作流程

三、操作步骤

3.1 末端修复/dA 尾添加 (End Repair/dA-Tailing)

该步骤将片段化后的 Input DNA 末端补平，并进行 5'端磷酸化和 3'端加 dA 尾。

1. 将表 6 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表 7 末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	体积 (μL)
Fragmented DNA	x
Endprep Buffer	7
Endprep Enzyme	3
ddH ₂ O	Up to 60

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 8 所示反应程序，进行末端修复/dA 尾添加反应。

表 8 末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105 °C	On
30 °C	30 min
72 °C	30 min
4 °C	Hold

3.2 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤将 3.1 步骤的产物末端，连接特定的 Illumina[®]或 MGI[®]接头。

1. 根据 Input DNA 量按表 2 稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 8 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

3. 于 3.1 步骤 PCR 管中配制表 9 所示反应体系。

表 9 Adapter Ligation PCR 体系

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA (3.1 步骤产物)	60
Ligation Enhancer	30*
DNA Adapter	5**
Rapid T4 DNA Ligase	10
ddH ₂ O	5
总计	110

【注】：*Ligation Enhancer 比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心使用。

**本公司接头浓度与常规商业化试剂盒一致 Illumina®平台皆为 15 μM，MGI®平台皆为 10 μM。请根据注意事项三中的提示，对接头进行稀释，加水补齐，使接头体积为 5 μL。

- 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 10 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 10 Adapter Ligation PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105°C	Off
20 °C	15 min
4 °C	Hold

3.3 连接产物磁珠纯化 (Post-Ligation Clean Up)

该步骤使用磁珠对 3.2 步骤的产物进行直接纯化或分选。纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。直接纯化步骤参考 3.3.1，分选步骤参考 3.3.2。

3.3.1 纯化操作步骤：

- 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。
- 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- 吸取 88 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.8×, Beads:DNA=0.8:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。
- 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。
- 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。
- 重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 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（不超过 5 min）。
- 将 PCR 管从磁力架中取出，进行洗脱：

1)如产物无需进行片段分选，直接加入 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 5 min），小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

【注】：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱。

2)如产物需进行双轮分选，加入 102 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 5 min），小心移取 100 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

【注】：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱。

3.3.2 双轮分选操作步骤：

- 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80% 乙醇。
- 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
- 根据 DNA 片段长度要求，参考表 11 向上述 100 μL DNA 上清中加入第一轮分选磁珠，涡旋或移液器吹打 10 次混匀。

表 11 磁珠文库分选推荐比例

DNA 文库大小 (插入片段)	150 - 250 bp	200-300 bp	300-400 bp	400-500 bp
DNA 文库大小	250-350 bp	350-450 bp	450-550 bp	550-650 bp
第一轮体积比 (Beads:DNA)	0.80×	0.70×	0.60×	0.55×
第二轮体积比 (Beads:DNA)	0.20×	0.20×	0.20×	0.15×

【注】：表中“×”表示样品 DNA 体积。如文库插入片段长度为 250 bp，样品 DNA 体积为 100 μL，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.70×100 μL=70 μL；第二轮分选磁珠使用体积为 0.20×100 μL=20 μL；表中所推荐比例是针对于 Adapter Ligated Insert DNA (Post Ligation)，如果用户在接头连接前进行分选，请采用 HiEff NGS® DNA Selection Beads (Cat#12601)说明书中推荐的比例。

4. 室温孵育 5 min。
5. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移上清到干净的离心管中。
6. 参考表 8 向上清中加入第二轮分选磁珠。
7. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
8. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
9. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
10. 重复步骤 9。
11. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）。
12. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入适量 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
13. 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 20 μL 上清至干净的管中。

3.4 文库扩增 (Library Amplification)

该步骤将对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 11 中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 12 所示反应体系。

表 12 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)	20
Canace® Pro Amplification Mix	25
Primer mix	5
总计	50

【注】：*如果使用的是完整接头 (Cat#13519~Cat#13520)，使用 DNA Library Prep Primer Mix for Illumina (Cat#12190) 试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用的是 MGI 接头 (Cat#13360~Cat#13362)，使用 DNA Library Prep Primer Mix for MGI (Cat#12191) 试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用了不完整的接头 (Cat#12412~Cat#12413、Cat#12404~Cat#12407)，请参照上述试剂盒说明书，使用其中配备的 Index Primer 进行扩增。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 13 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 13 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98 °C	45 s	1
98 °C	15 sec	参照注意事项中表 3
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	1 min	1
4 °C	Hold	-

3.5 扩增产物磁珠纯化或分选 (Post Amplification Clean Up/Size Selection)

同 3.3.1 步骤中纯化操作步骤。使用 HiEff NGS® DNA Selection Beads (0.9×, Beads:DNA=0.9:1)纯化文库扩增产物。

如需分选，操作方法同 3.3.2 双轮分选步骤（纯化步骤可省略）。

3.6 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六。

Good science

Good products

翌圣生物科技（上海）股份有限公司

服务电话:400-6111-883

咨询邮箱:marketing@yeasen.com

网 址:www.yeasen.com

地 址:上海市浦东新区国际医学园区天雄路166号1号楼402室

