

Hieff NGS[®] DNA&RNA Library Co-Prep Kit V2
DNA&RNA 共建库试剂盒 V2

Cat No.12305

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
建库流程图	3
使用方法	4

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® DNA&RNA Library Co-Prep Kit V2	12305ES08	8 T
DNA&RNA 共建库试剂盒 V2	12305ES24	24 T
	12305ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® DNA&RNA Library Co-Prep Kit V2 是用于 Illumina®/MGI®测序平台的 DNA&RNA 共建库试剂盒，包含高效 cDNA 合成试剂，酶切建库试剂。与传统的建库法比较，本产品可以 DNA&RNA 一管式建库，一步高效完成 cDNA 合成，同时采用高质量的片段化酶，将片段化模块与末端修复模块合二为一，极大的降低了建库的时间和成本。本试剂盒具有优秀的文库转化率，可应用于常规动植物基因组、微生物基因组等样本，肿瘤样本，复杂样本，同时能兼容 FFPE 样本的建库。该试剂盒使用了最新优化的连接酶，改善了接头连接时的片段自连现象，同时替换了新型高保真酶，进一步提升了扩增的均一性和保真性。

本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。

产品组分

组分编号和名称	12305ES08	12305ES24	12305ES96
12305-A ○ Random Primer	20 μL	60 μL	240 μL
12305-B ● cDNA Reaction Buffer	64 μL	192 μL	768 μL
12305-C ● cDNA Enzyme Mix	16 μL	48 μL	192 μL
12305-D ● Smearase Buffer	80 μL	240 μL	960 μL
12305-E ● Smearase Enzyme Mix	40 μL	120 μL	480 μL
12305-F ● Ligation Enhancer	240 μL	720 μL	2×1440 μL
12305-G ● Novel T4 DNA Ligase	40 μL	120 μL	480 μL
12305-H () 2×Super Canace® II High-Fidelity Mix	200 μL	600 μL	2×1200 μL
* Primer Mix*	40 μL	120 μL	480 μL

注：*标注表示该成分不包含在本试剂盒，需要额外配置，本试剂盒组分兼容 Illumina 和 MGI 双平台，但需要额外配置专属于 Illumina®或者 MGI®的 primer mix(Cat# 13334 Primer Mix for MGI®以及 Cat# 13335 Primer Mix for Illumina®)

运输与保存方法

干冰运输。-20°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。
3. 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。
4. 请使用无RNase污染的耗材，并对实验区域定期进行清理，推荐使用ThermoFisher公司的RNAZap™高效核酸去除喷雾去除RNA酶污染。
5. 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；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁（推荐使用ThermoFisher公司的DNAZap™高效核酸去除喷雾），以保证实验环境的洁净度。
6. 本产品仅作科研用途！

二、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 本公司可提供 Illumina® 或者 MGI® 长接头(Barcoded Adapter)试剂盒和短接头试剂盒，客户可根据实验需求进行选择。
2. 我们建议选用高质量的商业化接头。如客户使用自制接头，请委托具有 NGS 引物合成经验的公司，并备注需进行严格的防污染控制。此外，进行接头退火操作时，请在超净台完成。每次只操作一种接头，防止交叉污染。
3. 使用接头时，请提前将接头取出放在 4°C 或冰盒上解冻；在室温操作时，实验室温度最好不要超过 25°C，防止接头解链。
4. 建库过程中，接头浓度过高或过低都会导致建库成功率变低。本试剂盒操作方案中，所加入的接头体积固定为 5 μL，请根据初始的 RNA 投入量，参考表 1 对接头进行稀释。接头稀释液请选择 0.1×TE buffer，稀释过的接头可在 4°C 保存 48 小时。

表 1-1 Input Total DNA&RNA 量与 Illumina® 接头使用浓度推荐表

Input Total DNA&RNA	Illumina® Adapter stock concentration
<10 ng	3 μM
≥10 ng	15 μM

表 1-2 Input Total DNA&RNA 量与 MGI® 接头使用浓度推荐表

Input Total DNA&RNA	MGI® Adapter stock concentration
<10 ng	5 μM
≥10 ng	10 μM

*可根据不同类型 total DNA&RNA 样本及投入量，按需求适当调整 Adapter 使用量。

三、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 2 列举了使用本试剂盒，获得 1 μg 文库的推荐循环数。

表 2 Input Total DNA&RNA 与扩增循环数推荐表*

Input Total DNA&RNA	Number of cycles
<1 ng	10~12
1 ng	9~10
10 ng	6~7
50 ng	4~5
100~1000 ng	4

【注】：*由于文库产量不仅与投入量和扩增循环数相关，样本质量等都会影响产量。建库过程中请根据实际情况综合考虑，选择最合适的建库条件。

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

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 (Yeasen 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，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. 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。
5. 磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
6. 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。
7. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 0.1×TE Buffer 洗脱，产物于 4°C 可保存 2 天，-20°C 可保存 1 个月。

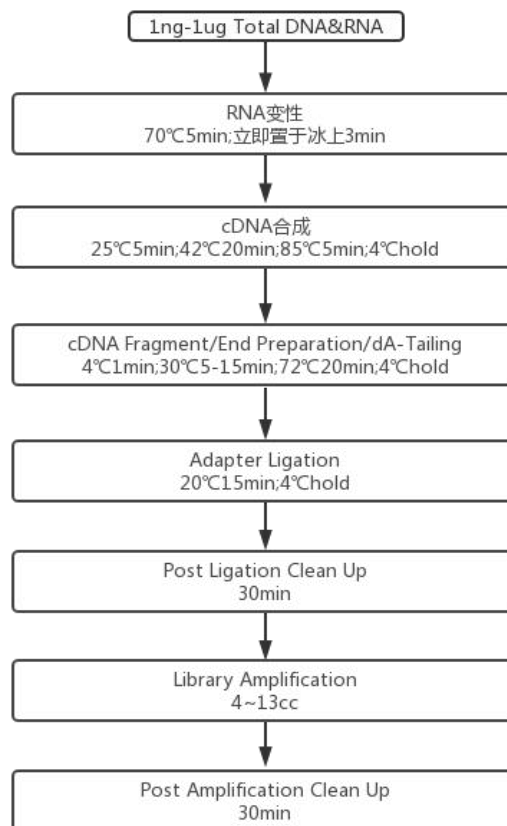
五、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

- 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。
- 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit®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。
- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 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。

六、自备材料 (Other Material)

- DNA 纯化磁珠：Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601) 或 AMPure® XP Beads (A63880) 或其他等效产品。
- Adapter: Complete Adapter for Illumina®使用 (Cat#13519-13520 或其他等效产品) 或 Complete Adapter for MGI®使用 (Cat#13360-13362 或其他等效产品)。
- 文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品；文库定量试剂。
- 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

建库流程图



使用方法

Step 1 RNA 变性

1. 将 Random Primer 室温解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。按照表3配置反应液：

表 3 RNA 预变性反应体系

名称	体积 (μL)
Random Primer	2.5
DNA&RNA (1 ng-1 ug)	32.5
Total	35

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述PCR管置于PCR仪中，按照表4所示设置反应程序，进行RNA的预变性。

表 4 RNA 预变性反应程序

温度	时间
热盖 75°C	On
70°C	5 min
立即置于冰上	3 min

Step 2 cDNA 的合成 (cDNA Synthesis)

1. 将cDNA合成试剂从-20°C取出，室温解冻，颠倒混匀后瞬离。按表5所示，配制cDNA合成的反应液。

表 5 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
变性的 DNA&RNA	35
cDNA Reaction Buffer	8
cDNA Enzyme Mix	2
Total	45

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 6 所示设置反应程序，进行 cDNA 的合成。

表 6 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
25°C	5 min
42°C	20 min
85°C	5 min
4°C	Hold

Step 3 cDNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (cDNA Fragment/End Preparation/dA-Tailing)

该步骤将 cDNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

1. 将表 7 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 7 反应体系。

表 7 cDNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	体积 (μL)
cDNA	45
Smearase Buffer	10
Smearase Enzyme Mix	5
Total	60

- 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
- 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 8 所示反应程序，进行 cDNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 8 cDNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105°C	on
4°C	1 min*
30°C	5-15 min**
72°C	20 min
4°C	Hold

【注】：*cDNA 片段化过程为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4°C，待模块温度降至 4°C 时，将 PCR 管放入 PCR 仪即可。**对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 9。

表 9 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间
150~200 bp	5~15 min

Step 4 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤可在末端修复和 dA 尾添加的产物末端，连接特定的 Illumina® 或者 MGI® 接头。

- 参考注意事项二中的表 1，根据 Input DNA&RNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
- 将表 10 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
- 于 Step 3 步骤结束后的 PCR 管中继续配制表 10 所示反应体系。

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA	60
Ligation Enhancer	30*
Novel T4 DNA Ligase	5
DNA Adapter	5**
Total	100

表 10 Adapter Ligation 体系

【注】：*Ligation Enhancer 使用前请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

**本公司 illumina 接头原始浓度为 15 μM，请根据注意事项二表 1-1 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL。

**本公司 MGI 接头原始浓度为 10 μM，请根据注意事项二表 1-2 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL。

- 使用移液器轻轻吹打混匀，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 11 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 11 Adapter Ligation 反应程序

温度	时间
热盖 Off	-
20°C	15 min
4°C	Hold

Step 5 连接产物纯化 (Post Ligation 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 45 μ L Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.45 \times , Beads:DNA=0.45:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，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（不超过 5 min）。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μ L 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 3 min），小心移取 20 μ L 上清至新 PCR 管中，进行 PCR 扩增。

Step 6 文库扩增 (Library Amplification)

该步骤将对纯化后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 12 中的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-A illumina 短接头连接产物 PCR 反应体系

表 12-B illumina 长接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μ L)	组分名称	体积 (μ L)
2 \times Super Canace [®] II High-Fidelity Mix	25	2 \times Super Canace [®] II High-Fidelity Mix	25
Universal Primer/ i5 Primer*	2.5	Primer Mix**	5
Index Primer/ i7 Primer*	2.5	Adapter Ligated DNA	20
Adapter Ligated DNA	20	Total	50
Total	50		

【注】：*如果使用的是无 Index 的接头，俗称短接头（小 Y 接头），请使用短接头试剂 (Cat#12414-12415)中配备的 Index primer 进行扩增。**如果您使用的是 Indexed Adapter (Cat#13519-13520)，俗称长接头（大 Y 接头），可用 Cat#13335 中的 Hieff NGS[®] Primer Mix for Illumina[®]进行扩增。

表 12-C MGI 接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μ L)
2 \times Super Canace [®] II High-Fidelity Mix	25
Primer Mix for MGI [®] *	5
Adapter Ligated DNA	20

【注】：*该 primer mix for MGI 不含在本试剂盒中，可用 Cat#13334 中的 Hieff NGS[®] Primer Mix for MGI[®]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 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	1 min	1
98°C	10 sec	
60°C	30 sec	参照注意事项三，文库扩增
72°C	30 sec	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	-

Step 7 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 45 μ L Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.9 \times , Beads:DNA=0.9:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，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 (不超过 5 min)。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 32 μ L 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 3 min)，小心移取 30 μ L 上清至新 PCR 管中，进行文库定量、质检。

Step 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五。

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

