

Hieff NGS[®] OnePot Flash DNA Library Prep Kit 快速 DNA 建库试剂盒

12316ES

产品使用说明书

Ver. CN20240319

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	3

产品简介

Hieff NGS[®] OnePot Flash DNA Library Prep Kit 是快速版酶切法建库试剂盒，本品采用高质量的片段化酶，将片段化模块与末端修复/加 A 模块合二为一，简化了操作流程，极大的降低了建库的时间和成本。适用于 100 pg-500 ng 常规动植物基因组、微生物基因组等样本，在单管内快速实现 DNA 的片段化、末端修复和 A 尾添加反应。本试剂盒需自行搭配接头和引物，可同时兼容 Illumina[®] 和 MGI[®] 高通量测序平台。

- 适用 100 pg-500 ng 的基因组 DNA 样本
- 兼容 Illumina[®] 和 MGI[®] 高通量测序平台
- 5 min 完成片段化、末修反应
- 高效的文库转化率与扩增效率

产品信息

货号	12316ES24 / 12316ES96
规格	24 T / 96 T

组分信息

组分编号		组分名称	12316ES24	12316ES96
12316-A	●	Smearase [®] Mix	240 μL	960 μL
12316-B	●	Ligation Enhancer	720 μL	4×720 μL
12316-C	●	Fast T4 DNA Ligase	120 μL	480 μL
12316-D	○	2×Ultima HF Amplification Mix	600 μL	4×600 μL
*		Primer Mix*	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#12190 Primer Mix for Illumina[®] 以及 Cat#12191 Primer Mix for MGI[®])

储存条件

-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酶组分置于冰盒解冻，buffer 组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒充分混匀，短离后置于冰上待用。
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。
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. 本试剂盒兼容范围为 100 pg-500 ng Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8-2.0 的高质量 Input DNA。
2. 若 Input DNA 中引入高浓度金属离子螯合剂或其他盐,可能会影响后续实验,建议将 DNA 稀释在 ddH₂O 或 TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5; 0.1 mM EDTA)中进行片段化。
3. 对于常规的高质量基因组 DNA,酶切时间参考表 1。本试剂盒片段化偏好低,耐受各种 GC 含量的模板。

表 1 常规基因组 DNA 片段化时间推荐表

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
200 bp	5 min	3-8 min
150 bp	8 min	5-10 min

【注】：以上为推荐时间,需客户在自己的实验体系中进行微调,以达到最佳效果。

4. 参照片段化步骤推荐条件可将 DNA 酶切为所需大小,为保证优质稳定的片段化效果,片段化过程请于冰上操作。
5. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

三、关于接头连接

1. 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。表 2、表 3 列举了使用本试剂盒,不同 Input DNA 量推荐的 Adapter 使用量。

表 2 100 pg-500 ng Input DNA 针对 Illumina[®]测序平台推荐的 Adapter 使用浓度

Input DNA	15 μ M Adapter 稀释倍数	稀释后投入量
50 ng-500 ng	10	5 μ L
1 ng-50 ng	20	5 μ L
100 pg-1 ng	30	5 μ L

表 3 100 pg-500 ng Input DNA 针对 MGI[®]测序平台推荐的 Adapter 使用浓度

Input DNA	10 μ M Adapter 稀释倍数	稀释后投入量
50 ng-500 ng	不稀释	5 μ L
10 ng-50 ng	10	5 μ L
100 pg-10 ng	5	5 μ L

四、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 4 列举了使用本试剂盒,获得 1 μ g 文库的推荐循环数。

表 4 100 pg-500 ng Input DNA 推荐的循环数

Input DNA (ng)	Number of cycles required to generate 1 μ g
500 ng	2-4
250 ng	4-6
100 ng	5-7
50 ng	7-9
5 ng	11-13
100 pg	14-16

五、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。

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

使用说明

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 质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
3. DNA Adapter：**针对 Illumina 平台**，Yeasen 提供 96 种 Barcoded Adapters: Hieff NGS® Complete Adapter Kit for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#13519~Cat#13520)；双端 384 种 Index Primers: Hieff NGS® Stubby UDI Primer Kit for Illumina® (板式) , Set 1~Set 4 (Cat#12312~Cat#12315)。**针对 MGI 平台**，Yeasen 提供 96 种 Barcoded Adapters: Hieff NGS® Complete Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 3(Cat#13360~Cat#13362)；双端 384 种 Index Primers: Hieff NGS® Unique Dual Barcode Adapter Kit for MGI® (板式) , Set 1~Set 4 (Cat#13536~Cat#13539)其他等效产品。
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; 0.1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

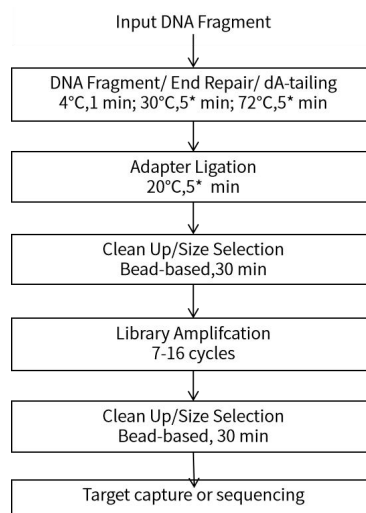


图 1 OnePot Flash DNA 建库试剂盒快速建库流程

三、操作步骤

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

该步骤将基因组 DNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

1. 将表 5 中试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 5 反应体系。

表 5 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	体积 (μL)
Input DNA	x
Smearase® Mix	10
ddH ₂ O	Up to 60 μL

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 6 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 6 DNA 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	3-10 min**
72°C	5 min
4°C	Hold

【注】：*DNA 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 1。

接头连接 (Adapter Ligation)

1. 根据 Input DNA 量按表 2、表 3 稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 7 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 于上述步骤 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表 7 Adapter Ligation 体系

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

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

**本公司接头浓度与常规商业化试剂盒一致，Illumina 平台接头浓度 15 μM，MGI 平台接头浓度 10 μM。

4. 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。
5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 8 所示反应程序，进行接头连接反应。

表 8 Adapter Ligation PCR 反应程序

温度	时间
热盖	Off
20°C	5 min
4°C	Hold

连接产物磁珠纯化 (Post Ligation Clean Up)

该步骤使用磁珠对接头连接产物进行纯化或分选。纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。

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 60 μ L Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.6 \times ，Beads:DNA=0.6:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，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，进行洗脱：
9. 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。【注：纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱】。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 μ L 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

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 9 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 9 所示反应体系。

表 9 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μ L)
2 \times Ultima HF Amplification Mix	25
Primer Mix*	5
Adapter Ligated DNA	20

【注】：*Primer Mix，搭配完整长接头时搭配通用扩增引物 (Cat#12190, Illumina 平台；Cat#12191, MGI 平台)；如搭配双 barcode 短接头，文库扩增环节使用接头试剂盒的 index Primer。

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 10 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 10 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	参照注意事项中表 4
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	-

扩增产物磁珠纯化(Post Amplification Clean Up)

同接头连接纯化操作步骤。使用 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.9×, Beads:DNA=0.9:1) 纯化文库扩增产物。

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。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐