

**Hieff NGS[®] OnePot Pro DNA Library
Prep Kit V3
一步法 DNA 建库试剂盒 V3**

12194ES

产品使用说明书







Ver. CN20240407

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[®] OnePot Pro DNA Library Prep Kit V3 是一款可用于 Illumina[®] 和 MGI[®] 高通量测序平台的新一代酶切法建库试剂盒。与传统的建库法比较，本品采用高质量的片段化酶，摆脱了繁琐的超声过程。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、连接模块的酶和 buffer 预混，简化了操作流程，极大地降低了建库的时间和成本，更加适合于自动化建库。本试剂盒具有更高的文库转化率，可应用于常规动植物基因组、微生物基因组等样本，同时能兼容 FFPE DNA 样本的建库。在前一代建库试剂盒的基础上，改进了片段化/末修/加 A 模块，降低了试剂对样本的 GC 偏好性，提高了末修和加 dA 尾的效率，提高了试剂的稳定性；本试剂盒使用了最新优化的连接酶，改善了接头连接效率。同时，本试剂盒可搭配 Illumina[®] 或 MGI[®] 的接头和 Primer，用于 Illumina[®] 和 MGI[®] 高通量测序平台测序。

-  适用 1ng - 1μg 的基因组 DNA、全长 cDNA 等样本
-  高质量片段化酶，可随机切割双链 DNA，酶切片段偏好性低
-  片段化、末端修复/加 A 一步完成
-  强扩增效率的高保真酶，显著提高文库质量及产量
-  适用于 FFPE DNA 样本
-  严格的批次性能与稳定性质控

产品信息

| | |
|----|-----------------------------------|
| 货号 | 12194ES08 / 12194ES24 / 12194ES96 |
| 规格 | 8 T / 24 T / 96 T |

组分信息

| 组分编号 | | 组分名称 | 12194ES08 | 12194ES24 | 12194ES96 |
|---------|---|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 12194-A |  | Smearase [®] Buffer 3.0 | 80 μL | 240 μL | 960 μL |
| 12194-B |  | Smearase [®] Enzyme 3.0 | 80 μL | 240 μL | 960 μL |
| 12194-C |  | Ligation Ready Mix | 200 μL | 600 μL | 3×800 μL |
| 12194-D |  | 2× Ultima HF Amplification Mix | 200 μL | 600 μL | 3×800 μL |

注：本试剂盒组分兼容 Illumina 和 MGI 双平台，如果适配完整接头，需要额外配置专属于 Illumina[®] 或者 MGI[®] 的 primer mix (Cat#12190 Hieff NGS[®] DNA Library Prep Primer Mix for Illumina[®] 或 Cat#12191 Hieff NGS[®] DNA Library Prep 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. 本试剂盒兼容范围为 1 ng ~ 1µg 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 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 5，本试剂盒片段化偏好性低，耐受各种 GC 含量的模板。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. 为保证优质精确的片段化效果，片段化反应配制过程请于冰上操作。

三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 针对 Illumina® 测序平台，Yeasten 可提供如下接头：

- a. 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；
- b. HiEFF NGS® 384 CDI Primer for Illumina® (Cat#12412~Cat#12413)，试剂盒中的接头浓度为 15 µM；
- c. HiEFF NGS® Stubby UDI Primer Kit for Illumina®, Set1~Set4 (板式) (Cat#12312~Cat#12315)，试剂盒中的接头浓度为 15 µM；
- d. 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，Yeasten 可提供如下接头：

- a. 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；
- b. HiEFF NGS® Unique Dual Barcode Primer Kit for MGI®, Set 1~Set 4 (板式) (Cat#13536 ~ Cat#13539)，试剂盒中的接头浓度为 10 µM；
- c. 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 1 和表 2 分别列举了使用本试剂盒的不同 Input DNA 量推荐的针对 Illumina® or MGI® 测序平台常规和 UMI Adapter 的稀释方法。

表 1 1ng~1 µg Input DNA 针对 Illumina® 测序平台推荐常规和 UMI Adapter 使用浓度

| Input DNA | 常规 Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 | UMI Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 |
|----------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| < 1 ng | 7.5 倍稀释 | 2µM | 15 倍稀释 | 1µM |
| 1 ng ~ 10 ng | 3 倍稀释 | 5µM | 3 倍稀释 | 5µM |
| 10 ng ~ 200 ng | 1.5 倍稀释 | 10µM | 2 倍稀释 | 7.5µM |
| >200 ng | 0 倍稀释 | 15 µM | 0 倍稀释 | 15 µM |

表 2 1ng~1μg Input DNA 针对 MGI[®]测序平台推荐常规和 UMI Adapter 使用浓度

| Input DNA | 常规 Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 | UMI Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 |
|----------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| < 1 ng | 5 倍稀释 | 2μM | 10 倍稀释 | 1μM |
| 1 ng ~ 10 ng | 2 倍稀释 | 5μM | 2 倍稀释 | 5μM |
| 10 ng ~ 200 ng | 0 倍稀释 | 10μM | 1.25 倍稀释 | 8μM |
| >200 ng | 0 倍稀释 | 10 μM | 0 倍稀释 | 10 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 质量小于 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)

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 3 列举了使用本试剂盒, 获得 1μg 文库的推荐循环数。

表 3 100 pg~1 μg 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 |
|--------------|---------------------|
| 1000~2000 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 |
| 100 pg | 16 ~ 18 |

【注】如果使用了不完整的接头, 需要扩增 1~3 个循环, 形成完整的接头。建库过程中若进行片段分选, 扩增时请参照较高循环数扩增。

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），可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库干扰。
 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 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
3. DNA Adapter：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”。
4. DNA Primer Mix：Cat#12190, DNA Library Prep Primer Mix for Illumina[®] 或 Cat#12191, DNA Library Prep Primer Mix for MGI[®]
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+1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

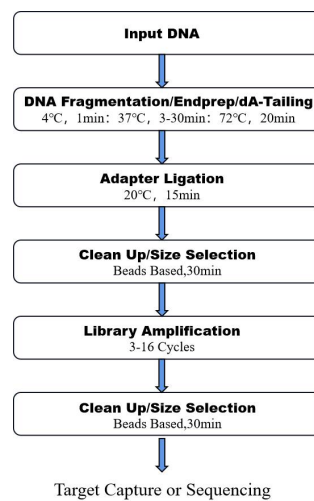


图 1 OnePot Pro DNA 建库试剂盒操作流程

三、操作步骤

3.1 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragmentation/End Repair/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 4 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 4 反应体系。

表 4 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 [®] Buffer 3.0 | 10 |
| Smearase [®] Enzyme 3.0 | 10 |
| ddH ₂ O | Up to 60 |

3. 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。
4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 5 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 5 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* |
| 37°C/35°C/32°C | 3~30 min** |
| 72°C | 20 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。

**对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 6。

表 6 常规基因组 DNA 片段化条件选择表

| 插入片段大小 (bp) | 时 间 | | | | |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | 5min | 10min | 15min | 20min | 30min |
| 温 度 | | | | | |
| 酶切温度 32°C | >700 | 300~400 | 250 | 200 | 180 |
| 酶切温度 35°C | >700 | 300~400 | 200~250 | 200 | 180 |
| 酶切温度 37°C | 500~700 | 200~300 | 200 | 180~200 | 180 |

不同打断条件下片段大小分布图可见“实施例”部分的图 2~图 4。

3.2 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤将 3.1 步骤的产物末端，连接 Illumina® 或 MGI® 接头。

1. 根据 Input DNA 量按第三部分推荐的接头使用浓度，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 3.1 步骤 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表 7 Adapter Ligation PCR 体系

| 名称 | 体积 (μL) |
|--------------------------|---------|
| dA-tailed DNA (3.1 步骤产物) | 60 |
| Ligation Ready Mix | 25* |
| DNA Adapter | 5** |

【注】：*LigationReady Mix 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® 平台皆为 15 μM，MGI® 平台皆为 10 μM；具体的接头使用量可以参照表 1。

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 | 15 min |
| 4°C | Hold |

【注】：当 Input DNA 量较低，实验效果不理想时，可尝试将连接时间延长一倍。

3.3 连接产物磁珠纯化 (Post Ligation Clean Up)

3.3.1 纯化操作步骤

该步骤使用磁珠对 3.2 步骤的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. 将 Adapter Ligation 产物充分离心，然后吸取 72 μ L Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.8 \times ，Beads:DNA=0.8:1)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；待移除大部分上清后可短暂离心再次置于磁力架中，换用 10 μ L 的枪头彻底吸净残留液体。
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，最后一次漂洗结束，要彻底吸净乙醇。
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：

1) 若产物无需分选则直接加入 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。置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移取 20 μ L 上清至新的 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

2) 若产物需进行双轮分选，则加入 102 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。置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移取 100 μ L 上清至新的 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

3.3.2 双轮分选操作步骤

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. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 9 向上述 100 μ L 连接产物上清中加入第一轮分选磁珠，涡旋振荡或充分颠倒磁珠混匀。

表 9 磁珠文库分选推荐比例

| DNA 文库插入片段大小 | 150-250 bp | 200-300 bp | 300-400 bp | 400-500 bp | 500-600 bp |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| DNA 文库大小 | 250-350 bp | 350-450 bp | 450-550 bp | 550-650 bp | 650-750 bp |
| 第一轮体积比 (Beads:DNA) | 0.80 \times | 0.70 \times | 0.60 \times | 0.55 \times | 0.50 \times |
| 第二轮体积比 (Beads:DNA) | 0.20 \times | 0.20 \times | 0.20 \times | 0.15 \times | 0.15 \times |

【注】：表中“ \times ”表示上步骤连接产物体积。如文库插入片段长度为 250 bp，连接产物体积为 100 μ L，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.70 \times 100 μ L=70 μ L；第二轮分选磁珠使用体积为 0.20 \times 100 μ L=20 μ L；表中所推荐比例是针对 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 9 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 μ L 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，总计漂洗两次，最后一次漂洗结束，要彻底吸净乙醇。
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 μ L 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 10 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 10 所示反应体系。

表 10 PCR 扩增反应体系

| 名称 | 体积 (μL) |
|--|----------------------|
| Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物) | 20 |
| 2 \times Ultima HF Amplification Mix | 25 |
| Primer Mix** | 5* |

【注】：*Primer Mix 针对不同测序平台，选用与平台对应的 Adapter 和 Primer Mix。

**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 11 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 11 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 2 |
| 60°C | 30 sec | |
| 72°C | 30 sec | |
| 72°C | 5 min | 1 |
| 4°C | Hold | - |

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

扩增后纯化步骤同 3.3.1 纯化操作步骤。使用 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (1.0 \times , Beads:DNA=1:1) 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。

3.6 文库质量控制(Library Quality Analysis)

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。

四、实验实例

不同片段化条件得到的插入片段大小

以 500 ng 常规 gDNA 为模板，使用本试剂盒构建文库，片段化条件为 32°C/35°C/37°C 分别酶切 5/10/15/20/30 min，片段化产物 1.2 \times 磁珠纯化，21 μL ddH₂O 洗脱，Qubit 测定浓度后，回收的插入片段分布如下图所示。

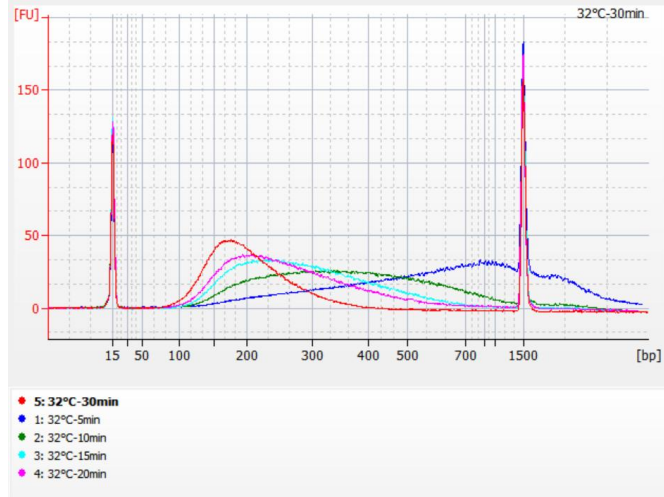


图 2 32°C不同酶切时间文库峰图

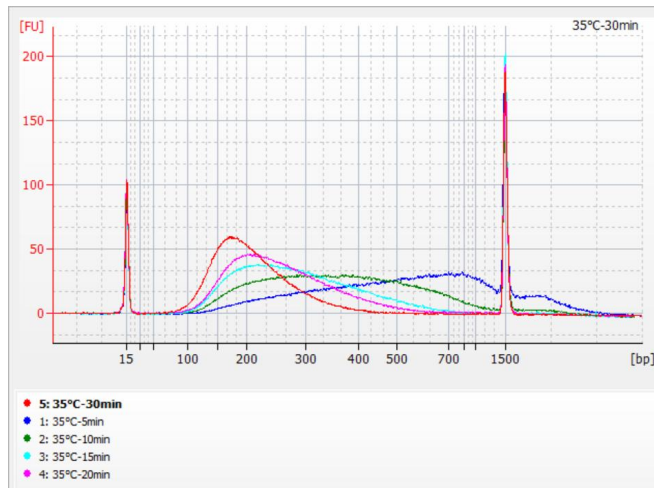


图 3 35°C不同酶切时间文库峰图

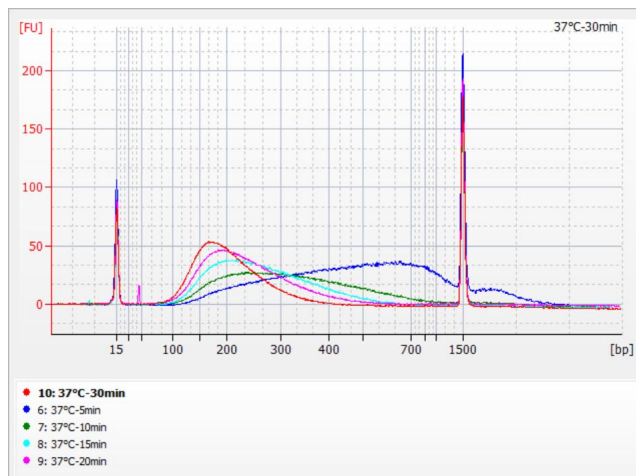


图 4 37°C不同酶切时间文库峰图



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐