

Hieff NGS[®] Ultima Pro DNA Library Prep Kit for Illumina[®]

全能型 DNA 建库试剂盒

Cat No. 12201

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.....	3

产品信息







产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® Ultima Pro DNA Library Prep Kit for Illumina®	12201ES08	8 T
	12201ES24	24 T
	12201ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® Ultima Pro DNA Library Prep Kit for Illumina®是针对 Illumina®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，同时改善接头连接效率。本试剂盒采用了新型的高保真酶，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 500 pg-500 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

组分编号与名称	12201ES08	12201ES24	12201ES96
12201-A  Endprep Buffer 2.0	48 µL	144 µL	576 µL
12201-B  Endprep Enzyme	32 µL	96 µL	384 µL
12201-C  Ligation Enhancer	240 µL	720 µL	3×960 µL
12201-D  Novel T4 DNA Ligase	40 µL	120 µL	480 µL
12201-E  Canace® Pro Amplification Mix	200 µL	600 µL	4×600 µL
12201-F  Primer Mix	40 µL	120 µL	480 µL

运输与保存方法

冰袋运输。所有组分-20 °C 保存，有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 本产品仅作科研用途！

二、关于 DNA 片段化

- 本试剂盒中兼容机械法及酶切法片段化的 DNA。
- 本试剂盒兼容范围为 500 pg - 500 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-500 ng
靶向捕获测序	复杂基因组	10 ng-500 ng
全基因组测序, 靶向捕获测序	FFPE DNA	50 ng-500 ng
全基因组测序, 靶向捕获测序	ctDNA/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。当使用酶切法进行片段化且产物不进行纯化或长度分选而直接建库时，请确认 Stop Buffer 中不包含过量的金属离子螯合剂。如条件不满足，可先将片段化产物纯化或长度分选后溶于 TE buffer 或灭菌超纯水中 (≤50 μL)，再进行文库构建。

三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 针对 Illumina®测序平台, Yeasen 提供 48 种 Barcoded Adapters: Hieff NGS® Complete Adapter Kit for Illumina®, Set 1~Set 4 (Cat#12615~Cat#12618); 单端 96 种 Index Primers: Hieff NGS® 96 Single Index Primers Kit for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#12611~Cat#12612); 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)。

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

表 2 500 pg-500 ng Input DNA 推荐的 Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter : Input DNA 摩尔比	Input DNA	Adapter : Input DNA 摩尔比
500 ng	20:1	25 ng	200:1
250 ng	40:1	10 ng	200:1
100 ng	100:1	1 ng	200:1
50 ng	100:1	500 pg	400:1

【注】：Input DNA 摩尔数 (pmol) = Input DNA 质量(ng) / [0.66 × Input DNA 平均长度 (bp)]。

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. 是否需要进行文库扩增取决于 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 3 列举了使用本试剂盒, 获得 1000 ng 文库的推荐循环数。

表 3 0.5 ng-500 ng Input DNA 获得 1000 ng 产物扩增循环数推荐表

Input DNA (ng)	Number of cycles required to generate(1000 ng)
500	3-5
250	4-6
100	5-7
50	7-8
10	9-11
5	10-12
1	12-14
0.5	13-15

注: 上表为使用高质量的 Human gDNA 构建文库使用的循环数参数。当 DNA 质量较差或需要进行长度分选, 则参照较高循环数进行文库扩增。

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 质检: Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
3. DNA Adapter: 可选 Yeasen 48 种 Barcoded Adapters: Hieff NGS[®] Complete Adapter Kit for Illumina[®], Set 1~Set 4 (Cat#12615~Cat#12618); 单端 96 种 Index Primers: Hieff NGS[®] 96 Single Index Primers Kit for Illumina[®], Set 1~Set 2 (Cat#12611~Cat#12612); 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)。
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

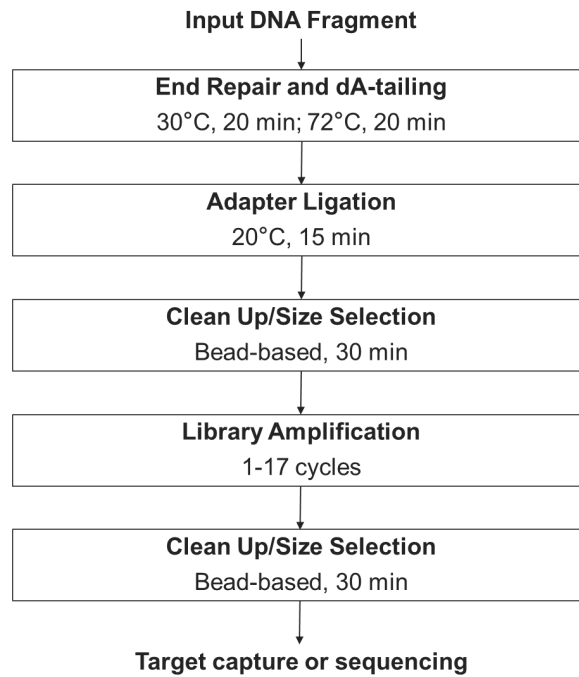


图1 Ultima Pro DNA 建库试剂盒操作流程

三、操作步骤

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

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

1. 将表 4 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 4 所示反应体系。

表 4 末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	体积 (μL)
Fragmented DNA	x
Endprep Buffer 2.0	6
Endprep Enzyme	4
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 5 所示反应程序，进行末端修复/dA 尾添加反应。

表 5 末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105 °C	On
30 °C	20 min
72 °C	20 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®接头。

1. 根据 Input DNA 量按表 2 稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 6 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 6 所示反应体系。

表 6 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**
Novel 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使用。

**本公司接头浓度与常规商业化试剂盒一致，皆为 15 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。

【接头添加计算举例】：当 Input DNA 为 100 ng，Input DNA 长度为 300 bp 时，接头应该添加多少？

第一步，计算 Input DNA 摩尔数。公式：Input DNA 摩尔数 (pmol)≈ Input DNA 质量(ng)/ [0.66 × Input DNA 平均长度 (bp)]；

$$\text{Input DNA 摩尔数 (pmol)}=100 \div (0.66 \times 300)=0.5 \text{ pmol};$$

第二步，计算接头添加摩尔数。根据注意事项三表 2 查询接头添加比例；

根据表 2，查得 Input DNA 100ng 时接头添加比例 100:1，则接头添加摩尔数=100×0.5 pmol=50 pmol；

第三步，计算接头添加体积。接头浓度=15 μmol/L（如使用其他接头，浓度需要依据其他接头浓度参数）；

$$\text{接头添加体积}=\text{接头添加摩尔数 (50 pmol)} \div \text{接头浓度 (15 } \mu\text{mol/L)}=3.34 \mu\text{L (注：15 } \mu\text{mol/L}=15 \text{ pmol}/\mu\text{L)}$$

综上，接头可添加 3.4 μL，加 1.6 μL 水补齐至 5 μL。（注：接头最大加入体积不超过 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 7 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 7 Adapter Ligation PCR 反应程序

温度	时间
热盖	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 步骤的产物进行纯化或分选。纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。

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 60 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.6×, Beads:DNA=0.6:1)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。最后使用 10 μL 小枪头吸去残余液体。
- 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。

【注：如纯化产物如需保存，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 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

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。【注：如纯化产物如需保存，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 100 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

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 8 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 8 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 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，总计漂洗两次。最后使用 10 μL 小枪头吸去残余液体。
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 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 (μL)
Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)	20
Canace® Pro Amplification Mix	25
Primer mix*	5

【注】：*如果使用的是完整接头 (Cat#12615~ Cat#12618)，使用试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用了不完整的接头 (Cat#12611~Cat#12612、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 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 3
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)

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。

3.7 参考实例

1. 使用 Hieff NGS® Ultima Pro DNA Library Prep Kit for Illumina®对 100 ng FFPE 样本建库(未分选), 结果使用 Agilent 2100 DNA 1000 Chip 进行检测。

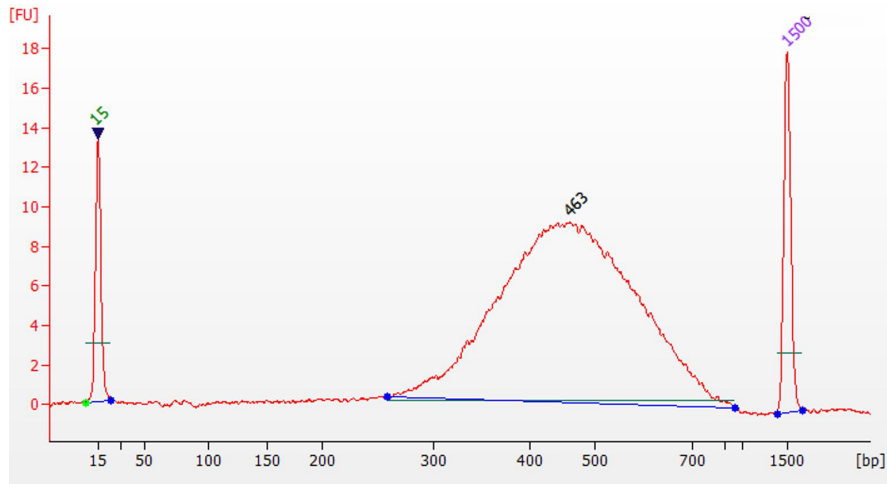


图2 Ultima Pro DNA 建库试剂盒用于 FFPE 样本建库(未分选)

2. 使用 Hieff NGS® Ultima Pro DNA Library Prep Kit for Illumina®对 10 ng cfDNA 样本建库, 结果使用 Agilent 2100 DNA 高灵敏芯片检测。

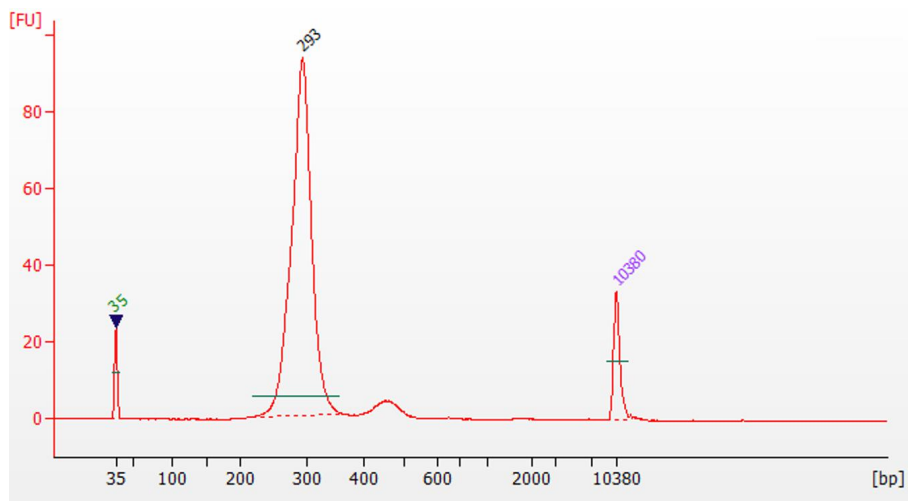


图3 Ultima Pro DNA 建库试剂盒用于 cfDNA 样本建库

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

