

**Hieff NGS<sup>®</sup> OnePotII DNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup>**

**一步法 DNA 建库试剂盒**

**Cat No. 12204**

**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
	12204ES08	8 T
Hieff NGS® OnePot II DNA Library Prep Kit for Illumina®	12204ES24	24 T
	12204ES96	96 T

## 产品描述

Hieff NGS® OnePot II 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，同时简化了操作流程，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。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，同时能兼容 FFPE DNA 样本的建库。经测序验证，不同 GC 含量的样本，均可获得优异的测序结果，文库覆盖度高，均一性好，偏好性低，使建库变得更加简单高效。

- 适用 500 pg-1 μg 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，酶切片段无偏好性
- 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

## 产品组分

组分编号与名称	12204ES08	12204ES24	12204ES96
12204-A  Smearase® Mix	80 μL	240 μL	960 μL
12204-B  Ligation Enhancer	240 μL	720 μL	4×720 μL
12204-C  Fast T4 DNA Ligase	40 μL	120 μL	480 μL
12204-D  2×Ultima Amplification Mix	200 μL	600 μL	4×600 μL
12204-E  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

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 500 pg – 1 μg Input DNA。应尽可能使用  $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$  的高质量 Input DNA。

- 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 ddH<sub>2</sub>O 或不含 EDTA 的 10 mM Tris Buffer (pH 7.5-8.0) 中进行片段化。
- 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低, 耐受各种 GC 含量的模板。对于不同降解程度的 FFPE 样本, 酶切时间参考表 6。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。
- 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。
- 针对 FFPE DNA 建库, 若样本质量不佳, 客户对当前建库产量不满意, 可选购我公司的 FFPE DNA Repair Reagent (Cat#12606) 对 FFPE DNA 进行修复, 具体使用方法可参考此产品说明书。该试剂可与片段化末修加 A 过程同时进行, 无需额外的操作。

### 三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

- 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)。
- 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 1 列举了使用本试剂盒, 不同 Input DNA 量推荐的 Adapter 使用量。

表 1 500 pg-1 μg 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
1 μg	10:1	50 ng	100:1
500 ng	20:1	25 ng	200:1
250 ng	40:1	1 ng	200:1
100 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)

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 磁珠漂洗使用的 80% 乙醇应现用现配, 否则将影响回收效率。
- 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。
- 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。
- 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 2 列举了使用本试剂盒, 获得 1 μg 文库的推荐循环数。

表 2 500 pg-1 µg 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)
1000	2-4
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)

- 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。
- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 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 的不可测序文库干扰。
- 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

- 纯化磁珠：Cat#12601, Hieff NGS® DNA Selection Beads 或 Cat#A63880, AMPure XP Beads 或其他等效产品。
- DNA 质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
- DNA Adapter: 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), 或其他等效产品。
- 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

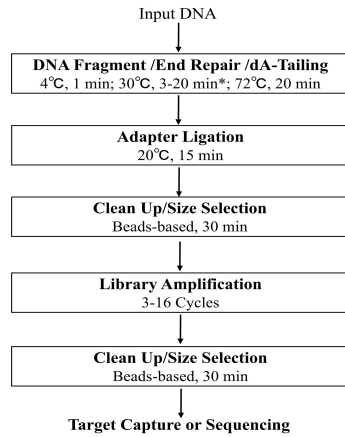


图 1 OnePot II DNA 建库试剂盒操作流程

### 三、操作步骤

#### 3.1 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragment/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 3 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 3 反应体系。

表 3 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
SmaI <sup>®</sup> Mix	10
ddH <sub>2</sub> O	Up to 60 μL

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 4 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 4 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	3-20 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 仪即可。\*\*对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 5；对于质量不一的 FFPE DNA 样本，酶切时间参考表 6。

表 5 常规基因组 DNA 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
600 bp	5 min	3-8 min
350 bp	8 min	5-12 min
250 bp	10 min	8-15 min
200 bp	13 min	10-20 min
150 bp	20 min	12-25 min

表 6 FFPE DNA 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间	DIN*
250 bp	9-13 min	> 8.0
250 bp	8-11 min	6.5-8.0
250 bp	4-8 min	4.2-6.5
250 bp	3-6 min	2.5-4.2

【注】：\*DIN 为 DNA Integrity Number，是用 Agilent 2200 来定义 FFPE DNA 降解程度的一种方法，详见图 2。

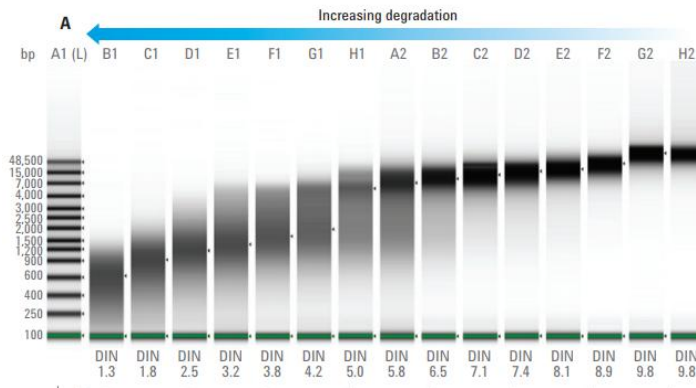


图 2 Agilent 2200 定义不同降解程度样本的 DIN 值

### 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 1 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 Enhancer	30*
Fast T4 DNA Ligase	5
DNA Adapter	5**

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

\*\*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 1 查询接头添加比例；

根据表 1，查得 Input DNA 100 ng 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）；

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

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）。

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

### 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:

1. 准备工作: 将 Hieff NGS<sup>®</sup> 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 μL Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (0.6×, 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 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。
6. 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。
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:

1) 如产物无需进行片段分选, 直接加入 21 μL ddH<sub>2</sub>O, 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 ddH<sub>2</sub>O, 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:

1. 准备工作: 将 Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出, 室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。
2. 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
3. 根据 DNA 片段长度要求, 参考表 9 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 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×	0.70×	0.60×	0.55×	0.50×
第二轮体积比 (Beads:DNA)	0.20×	0.20×	0.20×	0.15×	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<sup>®</sup> 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 7 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  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，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  $\mu$ L 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 ( $\mu$ L)
2×Ultima Amplification Mix	25
Primer mix*	5
Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)	20

【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 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)

同 3.3.1 步骤中纯化操作步骤。使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.9 $\times$ ，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。

### 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

使用 Hieff NGS® OnePot II DNA Library Prep Kit for Illumina® 对小牛胸腺 gDNA 样本进行酶切建库检测，片段化结果见图 3，建库结果见图 3。

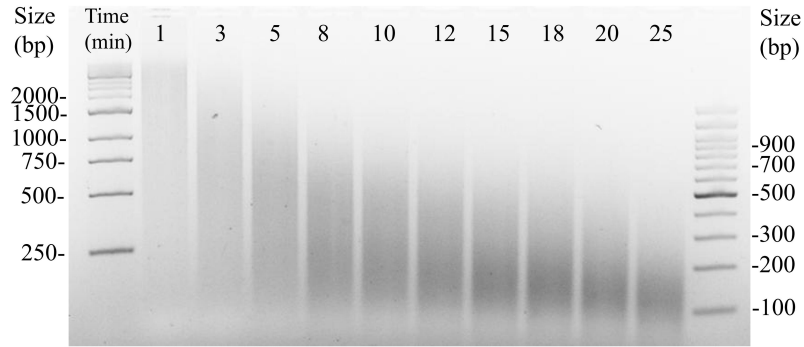


图3 OnePot II DNA 建库试剂盒酶切 800 ng 小牛胸腺 gDNA 样本 (不同酶切时间片段化效果检测)

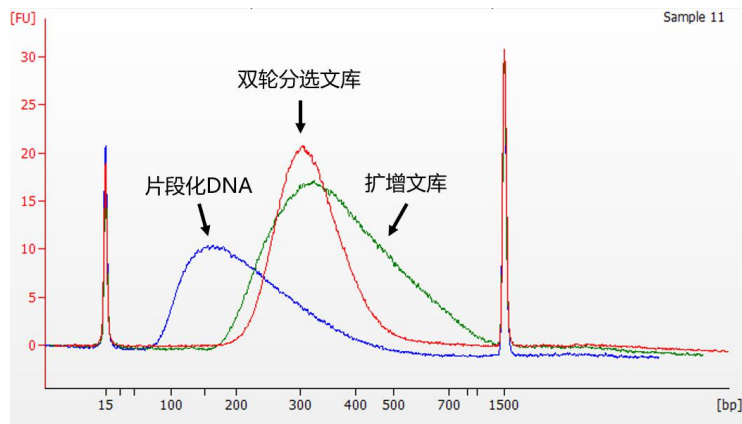


图4 使用本试剂盒进行 human gDNA 样本建库, 文库进行电泳检测 (Input DNA 为 500 ng, 酶切 20 min, 扩增 5 cycles)

---

---

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

