

Hieff NGS[®] Universal Library Convert Kit

Cat No. 13342

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® Universal Library Convert Kit	13342ES16	16 T
	13342ES96	96 T

产品描述

该试剂盒可以将 Illumina 试剂盒构建的双链线性文库转化为兼容华大智造测序平台的环状 ssDNA 文库。构建的文库可使用 BGISEQ-500RS、MGISEQ-200RS 和 MGISEQ-2000RS 进行测序。

产品组分

组分编号与名称		13342ES16	13342ES96	
13342-A	●	AC-PCR Amplification mix	400 μL	2×1200 μL
13342-B	●	AC-PCR Primer mix	16 μL	96 μL
13342-C	○	App-A Splint Buffer	240 μL	2×720 μL
13342-D	○	Ligase	80 μL	480 μL
13342-E	○	Digestion Buffer	130 μL	780 μL
13342-F	○	Digestion Enzyme	32 μL	192 μL

运输与保存方法

干冰运输。

所有组分-20°C 保存，有效期 1 年。

*当运输条件、储存条件及使用方式都正确时，所有组分在有效期内均能保持完整活性。

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. 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、样本要求及处理

2.1 样本要求

1. 样本为线性 dsDNA 文库，接头序列符合下列之一：

单 index:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-Insert-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-[i7]-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

双 index:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-insert-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-[i7]-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

2. 线性 dsDNA 文库插入片段范围为 100 ~ 500 bp，同时主带集中在 ±100 bp 以内。

2.2 样本量要求

根据文库总量选择合适的线性 dsDNA 投入量，详见表 1：

表 1 线性 dsDNA 总量与浓度要求

线性 dsDNA 文库投入量(ng)	线性 dsDNA 文库总量(ng)	线性 dsDNA 文库浓度要求(ng/μl)
10	≤25	>0.45
25	25<文库总量<50	1<文库浓度<2.1
50	>50	>2.1

2.3 转换 PCR

不同线性 dsDNA 文库投入量，所需 PCR 循环也不相同，详见表 2：

表 2 不同线性 dsDNA 投入量 PCR 循环数推荐表

线性 dsDNA 文库投入量(ng)	推荐 PCR 循环数
10	8
25	7
50	6

2.4 转换文库 pooling 要求

1. 不推荐在转换 PCR 前对线性 dsDNA 进行 pooling。
2. 需将接头转换 PCR 产物混合测序，则 Sample Barcode Pooling 应遵循碱基平衡的原则：最佳平衡状态 ATGC 4 种碱基的占比应分别为 25%，若不能达到 25%，则要保证每个 cycle 都存在 ATGC 四种碱基序列，并且最少的碱基不应低于 12.5%，最多的碱基不应高于 62.5%。
3. 不同片段长度的文库不建议 pooling 环化。
4. 若样本所需数据量相同且长度相同，则可以等量混合，每个样本所需的质量按照公式 1 进行计算：

公式 1 混合样本中单个样本所需质量的计算

单个样本所需的质量 (ng)=1 pmol Input DNA 对应的质量 (ng) /混合的样本个数 N

5. 混合后接头转换 PCR 产物总量为 1 pmol，总体积最多为 40 μL；若文库不足则用 TE buffer 补充至 40 μL

三、关于磁珠纯化 (Bead-based Clean Up)

1. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致纯化得率下降。
2. 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。
3. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
4. 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，室温干燥约 5 min。
5. 单链环产物纯化保存，可使用 TE Buffer 洗脱，产物可于 -20°C 可保存 1 个月。

四、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

1. 转换文库推荐使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 进行定量，要求最终接头转换 PCR 产物的摩尔产量至少为 1 pmol，可根据公式 2 计算或参考表 2。

公式 2 PCR 产物摩尔数与质量间的换算

1 pmol PCR 产物对应的质量 (ng)=DNA 主片段大小 (bp)×0.66

表 3 不同片段大小 PCR 产物 1 pmol 对应产量

PCR 产物主片段大小 (bp)	1 pmol 对应产量 (ng)
300	198
350	231
400	264
450	297
500	330

2. 单链环产物纯化后推荐使用 Qubit® ssDNA Assay Kit 单链 DNA 荧光染料试剂对纯化后产物进行定量。
3. 单链环状 DNA 产物纯化后产量应达到 60 fmol 以上方足够一次上机测序的量, 可根据公式 3 计算或参考表 3 。

公式 3 单链环摩尔数与质量间的换算

$$60 \text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.06 \times \text{DNA 主片段大小 (bp)} \times 0.33$$

表 4 不同 PCR 产物片段大小对应 60 fmol 单链环产量

PCR 产物主片段大小 (bp)	60 fmol 对应产量 (ng)
300	5.94
350	6.93
400	7.92
450	8.91
500	9.90

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. 文库质控: Cat#12640, dsDNA HS Assay Kit for Qubit®或 Cat#12642, 1×dsDNA HS Assay kit for Qubit®或其他等效产品。
3. 单链环质控: Cat # Q10212, Thermo fisher Qubit®ssDNA Assay Kit 或其他等效产品。
3. 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

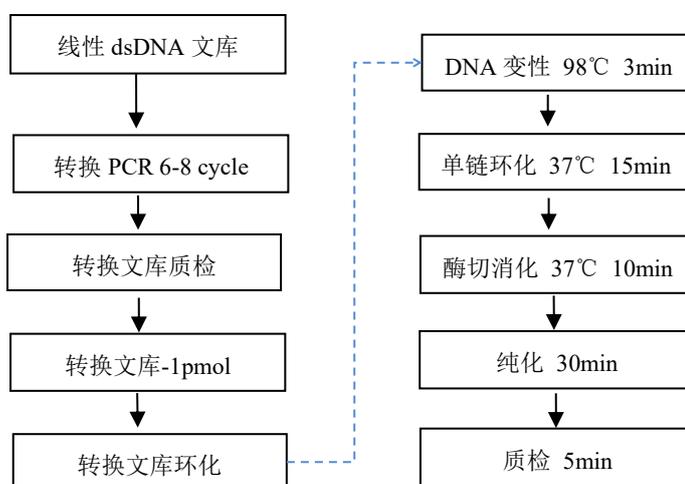


图 1 通用文库转换流程

三、操作步骤

Part A 接头转换 PCR

1、转换 PCR

该步骤对线性 dsDNA 文库进行转换-转化为可以进行后续环化的线性 dsDNA 文库。

1. 将表 5 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 5 所示反应体系。

表 5 转换 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
AC-PCR Amplification Mix	25
AC-PCR Primer Mix	1
线性 dsDNA 文库	
ddH ₂ O	
Total	50

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 6 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 6 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	-

2、转换 PCR 产物纯化

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 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.9×, Beads : DNA=0.9:1) 至 Adapter Ligation 产物中，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。
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：加入 32 μL TE buffer，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。
9. 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 30 μL 上清至干净的管中。

3、转换 PCR 产物质检

使用 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 等转换 PCR 产物进行定量，具体请参见注意事项四。

Part B 转换文库环化

1 变性

1. 根据文库长度，取 1 pmol 至 0.2 ml PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 40 μL。
4. 混匀后，在 PCR 仪上进行 98°C 变性 3 min，之后立即置于冰上，冰浴 2 min 后瞬时离心。

2 单链环化

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 单链环化体系

名称	体积 (μL)
上一步反应物	40
App-A Splint Buffer	15
Ligase	5
Total	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 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 8 所示摄制反应程序，进行单链环化反应。

表 8 单链环化反应程序

温度	时间
热盖 105°C	OFF
37°C	15 min
4°C	Hold

3 酶切消化

1. 将表 9 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。

2. 于冰上配制表 9 所示反应体系。

表 9 酶切消化体系

名称	体积 (μL)
上一步反应物	60
Digestion Buffer	8
Digestion Enzyme	2
Total	70

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 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 10 的条件进行反应：

表 10 酶切消化反应程序

温度	时间
热盖 105°C	OFF
37°C	10 min
4°C	Hold

5. 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。

4 消化产物纯化

该步骤使用磁珠对 3.3 步骤的产物进行纯化。

1. 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 或 Beckman AMPure XP Beads 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 120 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads 至消化产物中，室温孵育 10min。

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 2 min），小心移除上清。

5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 500μL 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。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22 μL TE Buffer，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 10 min。

9. 短暂离心，将 PCR 管始终置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 2min），将上清小心移至新 PCR 管中，-20°C 保存，待制备 DNB。

5 消化产物质控

使用 Qubit[®] ssDNA Assay Kit 荧光试剂对酶切消化产物进行定量，具体请参见注意事项四。

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

