

# Hieff NGS<sup>®</sup> DNA&RNA Library Co-Prep Kit for Illumina<sup>®</sup>

## DNA&RNA 共建库试剂盒

Cat#12299

使用说明书  
Product Manual



Yeasten Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd.



## 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.....    | 4 |

## 产品信息

| 产品名称                       | 产品编号      | 规格   | 价格/元   | 促销价/元  |
|----------------------------|-----------|------|--------|--------|
| Hieff NGS® DNA&RNA Library | 12299ES05 | 5 T  | 1,915  | 958    |
| Co-Prep Kit for Illumina®  | 12299ES24 | 24 T | 7,985  | 2,995  |
| DNA&RNA 共建库试剂盒             | 12299ES96 | 96 T | 29,985 | 11,244 |

## 产品描述

Hieff NGS® DNA&RNA Library Co-Prep Kit for Illumina®是用于 Illumina®测序平台的 DNA&RNA 测序文库构建试剂盒，包含 RNA 反转录试剂，常规 dscDNA 合成试剂，DNA 片段化试剂，接头连接试剂，以及文库扩增试剂。本产品利用专业开发设计的新一代片段化酶可以完成 DNA 和 RNA 一管式建库，简化了操作流程，极大的降低了建库时间和成本。本试剂盒具有优秀的文库转化率，可应用于 mNGS 样本，肿瘤样本，复杂样本等的建库。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。提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

## 产品组分

| 组分编号    | 组分颜色 | 组分名称                                 | 产品编号/产品规格     |                |               |
|---------|------|--------------------------------------|---------------|----------------|---------------|
|         |      |                                      | 12299ES05/5 T | 12299ES24/24 T | 12299ES96/96T |
| 12299-A | ○    | dT23VN                               | 5 μL          | 24 μL          | 96 μL         |
| 12299-B | ○    | Random Primer                        | 5 μL          | 24 μL          | 96 μL         |
| 12299-C | ●    | 1st Reaction Buffer                  | 40 μL         | 192 μL         | 768 μL        |
| 12299-D | ●    | 1st Strand Enzyme Mix                | 10 μL         | 48 μL          | 192 μL        |
| 12299-E | ●    | 2nd Reaction Buffer                  | 35 μL         | 168 μL         | 672 μL        |
| 12299-F | ●    | 2nd Strand Enzyme Mix                | 15 μL         | 72 μL          | 288 μL        |
| 12299-G | ●    | Smearase Buffer                      | 50 μL         | 240 μL         | 960 μL        |
| 12299-H | ●    | Smearase Enzyme Mix                  | 25 μL         | 120 μL         | 480 μL        |
| 12299-I | ●    | Ligation Enhancer                    | 150 μL        | 720 μL         | 2×1,440 μL    |
| 12299-J | ●    | Novel T4 DNA Ligase                  | 25 μL         | 120 μL         | 480 μL        |
| 12299-K | ( )  | 2×Super Canace® II High-Fidelity Mix | 125 μL        | 600 μL         | 2×1,200 μL    |
| 12299-L | ( )  | Primer Mix                           | 25 μL         | 120 μL         | 480 μL        |

## 运输与保存方法

干冰运输。-20℃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. 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。
4. 请使用无RNase污染的耗材，并对实验区域定期进行清理，推荐使用ThermoFisher公司的RNAZap™高效核酸去除喷雾去除RNA酶污染。
5. 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；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁（推荐使用ThermoFisher公司的DNAZap™高效核酸去除喷雾），以保证实验环境的洁净度。
6. 本产品仅作科研用途！

## 二、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 本公司可提供长接头 (Indexed Adapter)试剂盒和短接头（也称为小 Y 接头、不完整接头）试剂盒，客户可根据实验需求进行选择。

目前有 48 种 Indexed 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 Index Primers: Hieff NGS® RNA 384 CDI Primer for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#12414~Cat#12415)。

2. 我们建议选用高质量的商业化接头。如客户使用自制接头，请委托具有 NGS 引物合成经验的公司，并备注需进行严格的防污染控制。此外，进行接头退火操作时，请在超净台完成。每次只操作一种接头，防止交叉污染。

3. 使用接头时，请提前将接头取出放在 4°C 或冰盒上解冻；在室温操作时，实验室温度最好不要超过 25°C，防止接头解链。

4. 建库过程中，接头浓度过高或过低都会导致建库成功率变低。本试剂盒操作方案中，所加入的接头体积固定为 5 µL，请根据初始的 DNA 或者 RNA 投入量，参考表 1，表 2 对接头进行稀释。本公司接头原始浓度均为 15 µM，接头稀释液请选择 0.1×TE buffer，稀释过的接头可在 4°C 保存 48 h。

表 1 Input Total RNA 量与接头使用浓度推荐表

| Input Total RNA | Adapter stock concentration |
|-----------------|-----------------------------|
| 10 ng           | 1 µM                        |
| 100 ng          | 1.5 µM                      |
| 500 ng          | 3 µM                        |
| ≥1 µg           | 5 µM                        |

表 2 Input Total DNA 量与接头使用浓度推荐表

| Input Total DNA | Adapter stock concentration |
|-----------------|-----------------------------|
| 1µg~200 ng      | 15 µM                       |
| 100 ng          | 10 µM                       |
| 50 ng           | 5 µM                        |
| 10 ng           | 3 µM                        |
| 5 ng            | 1.5 µM                      |
| 1 ng            | 1 µM                        |

## 三、关于文库扩增 (Library Amplification)

1. 本试剂盒中的文库扩增组分由本公司第二代高保真 DNA 聚合酶所组成，在第一代的基础上，大大增强了扩增的均一性，即使是低拷贝的基因，也能进行无偏好性地扩增。

2. 如果您使用 Indexed Adapter（也称为长接头、大 Y 接头），可使用本试剂盒提供的引物 Primer mix 进行扩增；如果使用的是“短接头”或者叫“小 Y 接头”，则需要使用 Index Primers 进行扩增，加上相应的 Index。

3. 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进行文库扩增，Input Total RNA 量与相应扩增循环数的推荐。

4. 表 3 中推荐的循环数可满足绝大多数建库需求，若您的样本质量较差（如降解严重的 FFPE 样本），可根据实际情况适当增加循环数。

表 3 Input Total RNA 或者 DNA 量与扩增循环数推荐表\*

| Input Total RNA | Number of cycles | Input Total DNA | Number of cycles |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| 10 ng           | 14~15            | 1 ng            | 12~15            |
| 100 ng          | 10~11            | 5 ng            | 10~14            |
| 1 µg            | 7~8              | 10 ng           | 8~12             |
|                 |                  | 50 ng           | 7~8              |
|                 |                  | 100 ng          | 6~7              |
|                 |                  | 200 ng          | 5~6              |
|                 |                  | 500 ng          | 4~5              |
|                 |                  | 1 µg            | 3~4              |

【注】：\*由于文库产量不仅与投入量和扩增循环数相关，样本质量等都会影响产量。建库过程中请根据实际情况综合考虑，选择最合适的建库条件。

#### 四、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 (Yeasten 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℃ 可保存 2 d，-20℃ 可保存 1 个月。

#### 五、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），可排除单端或双端都不连接 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。

#### 六、自备材料 (Other Material)

1. DNA 纯化磁珠：Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasten Cat#12601)或 AMPure® XP Beads (A63880)或其他等效产品。
2. Adapters：含 Index 的长接头 (Yeasten Cat#12615~12618)或者无 Index 的短接头试剂盒 (Yeasten Cat#12611~12612)。
3. 文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品；文库定量试剂。
4. 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

## 建库流程图

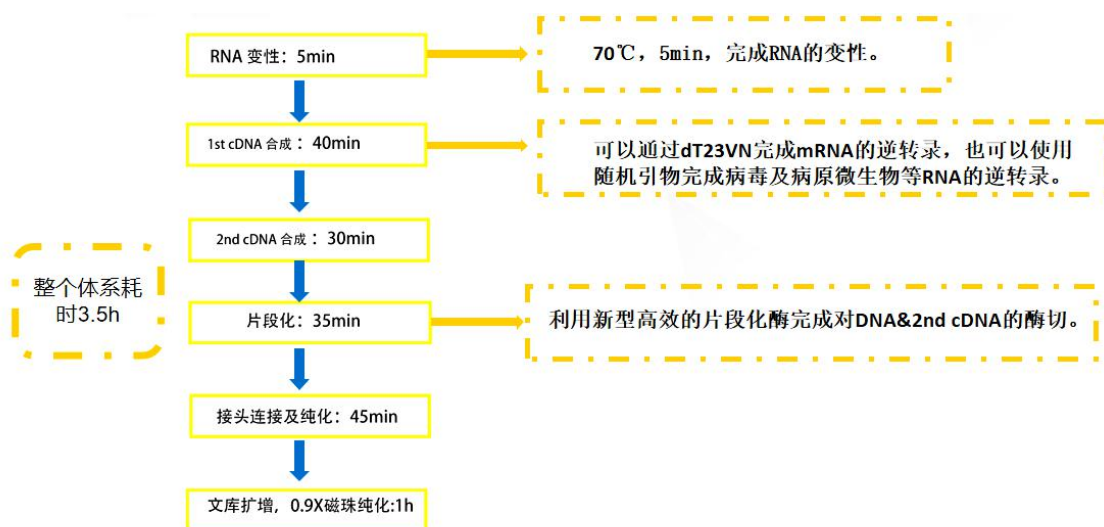


图 1 DNA &amp; RNA 共建库操作流程

## 使用方法

## Step 1 RNA 变性

1. 将 Dt23VN、Random Primer 室温解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。按照下表配置反应液：

表 4 RNA 预变性反应体系

| 名称            | 体积 (μL) |
|---------------|---------|
| Dt23VN        | 1       |
| Random Primer | 1       |
| DNA&RNA       | 13      |
| Total         | 15      |

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述PCR管置于PCR仪中，按照表5所示设置反应程序，进行RNA的预变性。

表 5 RNA 预变性反应程序

| 温度      | 时间    |
|---------|-------|
| 热盖 75°C | On    |
| 70°C    | 5 min |
| 立即置于冰上  | 3 min |

Step 2 第一链 cDNA 的合成 (1<sup>st</sup> Strand Synthesis)

1. 将第一链合成试剂从-20°C取出，室温解冻，颠倒混匀后瞬离。按表6所示，配制第一链cDNA合成的反应液。

表 6 第一链 cDNA 合成反应体系

| 名称                    | 体积 (μL) |
|-----------------------|---------|
| 变性的 RNA               | 15      |
| 1st Reaction Buffer   | 8       |
| 1st Strand Enzyme Mix | 2       |
| Total                 | 25      |

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 7 所示设置反应程序，进行第一链 cDNA 的合成。反应结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

表 7 第一链 cDNA 合成反应程序

| 温度       | 时间     |
|----------|--------|
| 热盖 105°C | On     |
| 25°C     | 5 min  |
| 42°C     | 30 min |
| 85°C     | 5 min  |
| 4°C      | Hold   |

### Step 3 第二链 cDNA 的合成 (2<sup>nd</sup> Strand Synthesis)

1. 将第二链合成试剂从-20 °C 取出，解冻后颠倒混匀；按照表 8 所示，配制第二链 cDNA 合成反应液。

表 8 第二链 cDNA 合成反应体系

| 名称                    | 体积 (μL) |
|-----------------------|---------|
| 1st Strand cDNA       | 25      |
| 2nd Reaction Buffer   | 7       |
| 2nd Strand Enzyme Mix | 3       |
| Total                 | 35      |

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 9 所示设置反应程序，进行第二链 cDNA 的合成。

表 9 第二链 cDNA 合成反应程序

| 温度   | 时间     |
|------|--------|
| 热盖   | Off    |
| 16°C | 30 min |
| 4°C  | Hold   |

### Step 4 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragment/End Preparation/dA-Tailing)

该步骤将 DNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

1. 将表 10 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 10 反应体系。

表 10 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

| 名称                  | 体积 (μL) |
|---------------------|---------|
| 2nd Strand cDNA     | 35      |
| Smearase Buffer     | 10      |
| Smearase Enzyme Mix | 5       |
| H <sub>2</sub> O    | 10      |
| 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. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 11 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 11 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    | 5-20 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 12。

表 12 片段化时间选择表

| 插入片段主峰大小   | 片段化时间     |
|------------|-----------|
| 300~500 bp | 5 min     |
| 250 bp     | 10 min    |
| 200 bp     | 15 min    |
| 150 bp     | 20~30 min |

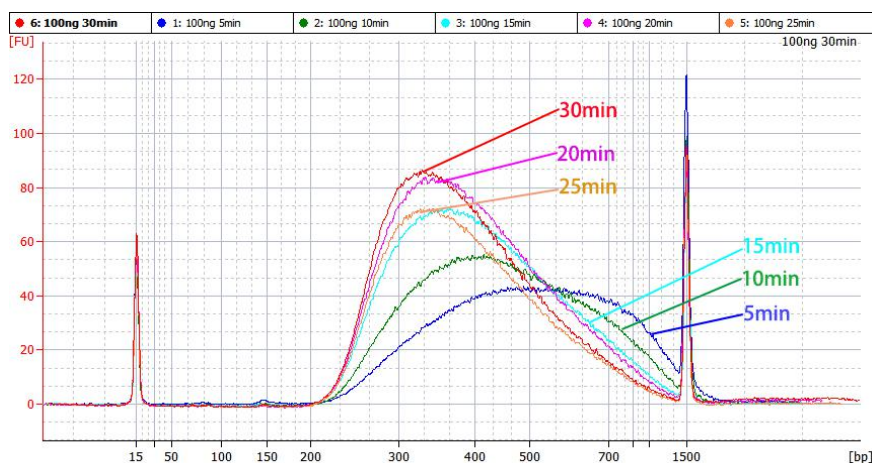


图 2 不同片段化条件下的文库峰形

### Step 5 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤可在末端修复和 dA 尾添加的产物末端，连接特定的 Illumina® 接头。

1. 参考注意事项二中的表 1 或表 2，根据 Input DNA 或 RNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 13 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 于 3.3 步骤结束后的 PCR 管中继续配制表 13 所示反应体系。

表 13 Adapter Ligation 体系

| 名称                  | 体积 (μL) |
|---------------------|---------|
| dA-tailed DNA       | 60      |
| Ligation Enhancer   | 30*     |
| Novel T4 DNA Ligase | 5       |
| DNA Adapter         | 5**     |
| Total               | 100     |

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

\*\*本公司接头原始浓度为 15 μM，请根据注意事项二表 1 或表 2 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL。

- 使用移液器轻轻吹打混匀，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 14 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 14 Adapter Ligation 反应程序

| 温度   | 时间     |
|------|--------|
| 热盖   | Off    |
| 20°C | 15 min |
| 4°C  | Hold   |

#### Step 6 连接产物纯化 (Post Ligation Clean Up)

- 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  $\mu$ L Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.6 $\times$ , Beads:DNA=0.6:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，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  $\mu$ 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。
- 重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 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，加入 21  $\mu$ L 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。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 20  $\mu$ L 上清至新 PCR 管中，进行 PCR 扩增。

#### Step 7 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。

- 将表 15 中的试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
- 于无菌 PCR 管中配制表 15 所示反应体系。

表 15 短接头连接产物 PCR 反应体系

| 组分名称                                          | 体积 ( $\mu$ L) |
|-----------------------------------------------|---------------|
| 2 $\times$ Super Canace® II High-Fidelity Mix | 25            |
| Universal Primer/ i5 Primer*                  | 2.5           |
| Index Primer/ i7 Primer*                      | 2.5           |
| Adapter Ligated DNA                           | 20            |
| Total                                         | 50            |

【注】：\*如果使用的是无 Index 的接头，俗称短接头（小 Y 接头），请使用短接头试剂 (Cat#12611~ Cat#12612, Cat#12414~ Cat#12415)中配备的 Index primer 进行扩增。

\*\*如果您使用的是 Indexed Adapter (Cat#12615~ Cat#12618)，俗称长接头（大 Y 接头），可用试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增

- 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 16 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 16 PCR 扩增反应程序

| 温度   | 时间     | 循环数          |
|------|--------|--------------|
| 98°C | 1 min  | 1            |
| 98°C | 10 sec | 3~15 cycles* |
| 60°C | 30 sec |              |
| 72°C | 30 sec |              |
| 72°C | 1 min  | 1            |
| 4°C  | Hold   | -            |

【注】：\*参照表 3 进行

#### Step 8 扩增产物磁珠纯化 (Post Amplification Clean Up)

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  $\mu$ L Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.9 $\times$ , Beads:DNA=0.9:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，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  $\mu$ 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，加入 21  $\mu$ L 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。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 20  $\mu$ L 上清至新 PCR 管中，进行文库定量、质检。

#### Step 9 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五。

---

---

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

