

Hieff NGS[®] OnePot cDNA&gDNA Library Prep Kit

Cat No. 13502

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
建库流程图	3
使用方法	3

产品信息







产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® OnePot cDNA & gDNA Library Prep Kit	13502ES24	24 T
	13502ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® OnePot cDNA & gDNA Library Prep Kit 是针对 Illumina® 或者 MGI® 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 cfDNA 样本的建库。该试剂盒使用了最新优化的连接酶，改善了接头连接时的片段自连现象，同时替换了新型高保真酶，进一步提升了扩增的均一性和保真性。

- 适用 500 pg-1 μg 的基因组 DNA、全长 cDNA（衔接 Hieff NGS® ds-cDNA Synthesis Kit 全长 cDNA 合成试剂盒（Yeasen Cat#13488））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 cfDNA 样本；
- 严格的批次性能与稳定性质控；

产品组分

组分编号	组分名称	13502ES24	13502ES96
13502-A	 Smearase Buffer	240 μL	960 μL
13502-B	 DNA Extra-working Buffer	240 μL	960 μL
13502-C	 Smearase Enzyme Mix	120 μL	480 μL
13502-D	 Ligation Enhancer	720 μL	2×1440 μL
13502-E	 Novel T4 DNA Ligase	120 μL	480 μL
13502-F	 2× Ultima HF Amplification Mix	600 μL	2×1200 μL

运输与保存方法

干冰运输。-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份置于室温解冻。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、关于接头连接 (Adapter Ligation)

Illumina 接头:

1. 本公司可提供短接头 (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。目前有双端 384 种 Index Primers: Hieff NGS® 384 CDI Primer for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#12412~Cat#12413)。
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 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 小时。

表 1 Input Total RNA/DNA 量与接头使用浓度推荐表

Input Total RNA (参照 Cat#13488 RNA 投入量)	Adapter stock concentration	Input Total DNA	Adapter stock concentration
≥10 ng	15 μM	1μg~200 ng	15 μM
<10 ng	3 μM	100 ng	10 μM
		50 ng	5 μM
		10 ng	3 μM
		5 ng	1μM
		≤1ng	0.5μM

三、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 1μg 文库的推荐循环数。

表 2 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
<1 ng	10~12	<1 ng	14~16
1ng	9~10	1 ng	13~14
10 ng	6~7	5 ng	10~11
50ng	4~5	10 ng	9~10
100~1000 ng	4	50 ng	7~8
		100 ng	6~7
		200 ng	5~6

【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 (Yeasen 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°C 可保存 2 天，-20°C 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），可排除单端或两端都不连接 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 (Yeasen Cat#12601) 或 AMPure® XP Beads (A63880) 或其他等效产品。
2. Adapters: 含 Index 的长接头 (Yeasen Cat#12615~12618) 或者无 Index 的短接头试剂盒 (Yeasen Cat#12611~12614)。
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

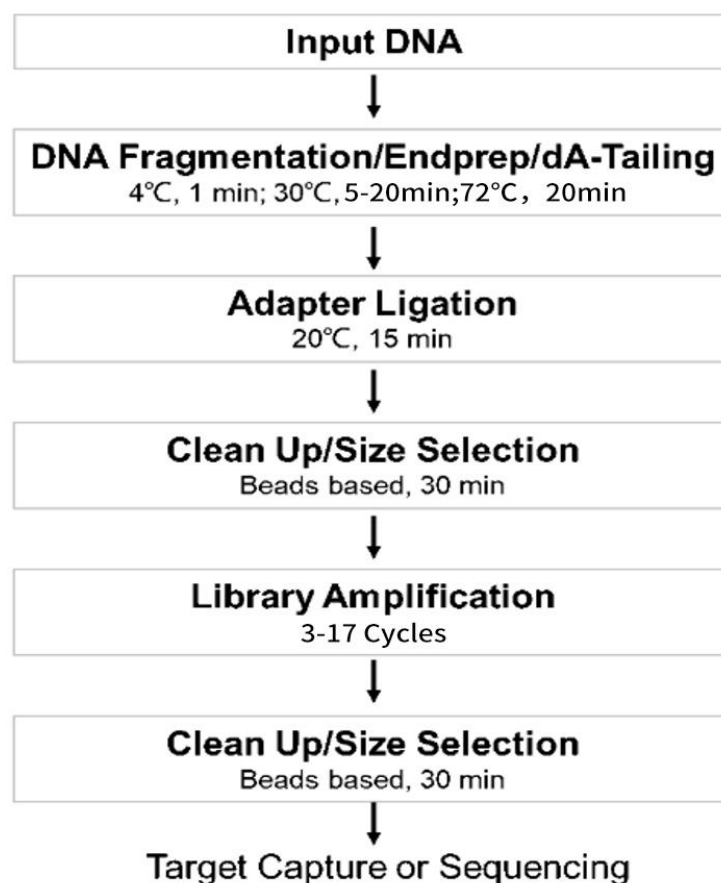


图 1 DNA 建库操作流程

使用方法

Step 1 cDNA & gDNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragment/End Preparation/dA-Tailing)

该步骤将 cDNA & gDNA 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)	名称	体积 (μL)
2nd Strand cDNA	35	gDNA	35
Smearase Buffer	10	Smearase Buffer	10
Smearase Enzyme Mix	5	Smearase Enzyme Mix	5
RNase-free H ₂ O	10	DNA Extra-working Buffer	10
Total	60	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 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	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 5。

表 5 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

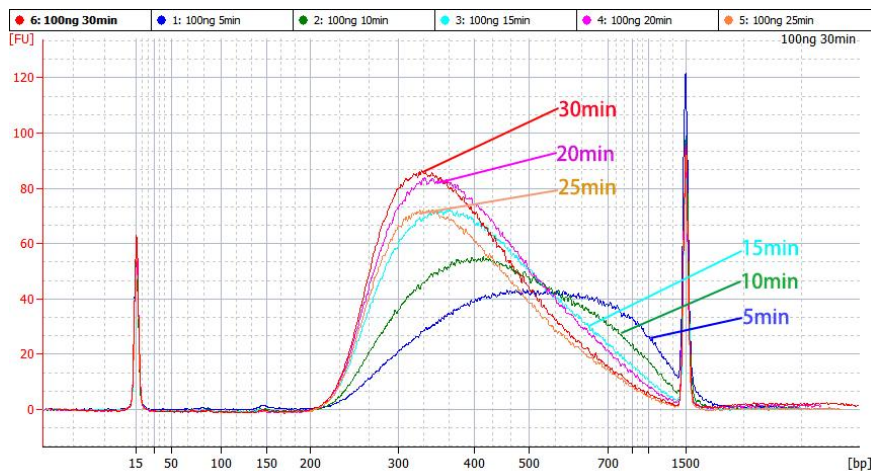


图 2 不同片段化条件下的文库峰形参考

Step 2 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® 或者 MGI® 接头。

1. 参考注意事项二中的表 1，根据 Input DNA，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 Step 1 步骤结束后的 PCR 管中继续配制表 6 所示反应体系。

表 6 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 Illumina 接头原始浓度为 15 μM，请根据注意事项二表 1 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。

4. 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。
5. 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 反应程序

温度	时间
热盖	Off
20°C	15 min
4°C	Hold

Step 3 连接产物纯化 (Post Ligation 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 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.45×, Beads:DNA=0.45:1) 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 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，用 10 μL 移液器吸干净残留液体，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 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。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），小心移除 20 μL 上清至新 PCR 管中，进行 PCR 扩增。

Step 4 文库扩增 (Library Amplification)

该步骤将对纯化后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 8 中的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 8 所示反应体系。

表 8 短接头连接产物 PCR 反应体系 (Illumina 扩增体系)

组分名称	体积 (μL)
2× Ultima HF Amplification Mix	25
Universal Primer/ i5 Primer*	2.5
Index Primer/ i7 Primer*	2.5
Adapter Ligated DNA	20
Total	50

【注】：*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#12412~Cat#12413）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 9 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 9 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	参照注意事项三，文库扩增
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	-

Step 5 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 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.9×, 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 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，用 10 μL 移液器吸干净残留液体，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 32 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。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 30 μL 上清至新 PCR 管中，进行文库定量、质检。

Step 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

