

M5 NGS Fast DNA Library Prep Set for Illumina 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 NGS Fast DNA Library Prep Set for Illumina	24T	MF054-01
M5 NGS Fast DNA Library Prep Set for Illumina	96T	MF054-04

【储存条件】

-20°C 保存，干冰运输。

【试剂盒组分】

	MF054-01(24T)	MF054-04(96T)
10x End Repair Reaction Buffer	200µl	800µl
End Prep Enzyme Mix	48µl	192µl
T4 DNA Ligase Buffer	400µl	2x800µl
T4 DNA Ligase	48µl	192µl
HiFidelity 2xPCR Master Mix	600µl	2x1.2ml

【产品简介】

本二代测序快速 DNA 建库试剂盒 (Illumina) 提供了构建 DNA 文库需要的酶预混体系及反应缓冲液，包含除接头以外的所有成分，制备的文库可用于 illumina 二代测序平台的测序。和常规建库方法相比，该试剂盒将多个步骤进行了合并，整个建库过程只有两个纯化步骤，因此显著降低了起始模板 DNA 的最少需求量，缩短了文库构建时间。另外，试剂盒采用高保真 DNA 聚合酶进行文库富集，无偏好的 PCR 扩增，扩大了序列覆盖区域，可以高效的制备用于 illumina 二代测序平台的 DNA 文库。试剂盒中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。

【产品特点】

1. 末端补平，磷酸化，加 A 一步完成。
2. 不需纯化，直接加接头。
3. 超保真扩增，最大程度降低了扩增偏好性。
4. 支持多种样本，且所得文库能够用于 Illumina GAIIx, HiSeq 2500/2000/1000 和 MiSeq sequencing 等平台。

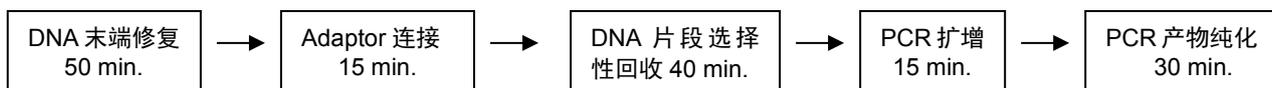
【自备仪器、试剂和耗材】

1. 磁力架：建议使用 Life 公司的磁力架 DynaMag (Cat No. 12321D)。
2. DNA 纯化回收试剂盒：建议使用聚合美磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒 (货号 MF050)
3. 样本接头引物试剂盒：建议使用聚合美二代测序多样本接头引物试剂盒 I/II (Cat No.MF056/MF057)
4. 无水乙醇，EB (10mM Tris-HCl, pH8.0)，去离子水 (pH 在 7.0-8.0)。
5. 反应管：建议使用低吸附的 PCR 管与 1.5ml 离心管。枪头：建议使用高质量过滤枪头防止试剂盒、文库样本污染。

【实验前准备及注意事项】

1. 避免试剂反复冻融，建议首次使用时将 Buffer 进行分装保存。酶在使用完尽快放回 -20°C 保存。
2. PCR 产物因操作不当极易产生污染，导致实验结果不准确，建议将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化区隔离，并使用专门的移液器，定期对各实验区进行清洁。

【DNA 建库流程示意图】



补平、磷酸化、加 A 一步完成，而且前两部可以在一管中完成

从起始材料到得到 DNA 文库只需 2 小时 40 分钟。

起始材料：5ng-1 μ g 打断的双链 DNA，溶于 EB（10mM Tris-HCl，pH8.0）或去离子水中。

DNA 纯度要求：OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8-2.0。

【DNA 末端修复反应】

1. 向 200 μ l PCR 管中加入以下成分，用枪头将上述溶液轻轻混匀，瞬时离心使所有组分收集到管底。

试剂名称	体积
10x End Repair Reaction Buffer	6.5 μ l
End Prep Enzyme Mix	2 μ l
Fragmented DNA	X (5ng-1 μ g)
RNase-Free Water	Up to 65 μ l

2. 将管子置入 PCR 仪中，热盖打开，反应程序如下：

12°C 15 min.

37°C 15 min.

72°C 20 min.

然后置于 4°C。

【Adaptor 连接】

建议使用聚合美的 adaptor 进行连接，也可以选择使用 NEB、Illumina 公司的 adaptor，具体连接方法可以参考各公司的产品说明书。

以下为使用聚合美 adaptor 进行连接的操作步骤：

1. 向上述反应液中直接加入以下试剂，用枪头将上述试剂混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。

试剂名称	体积
T4 DNA Ligase Buffer for illumia	14 μ l
T4 DNA Ligase	2 μ l
Adaptor	2.5 μ l
前面一步反应液	65 μ l
Total volume	83.5 μ l

注意：若起始样本量少于 100ng，请将 adaptor 用去离子水稀释 10 倍至 1.5 μ M 后使用。

2. 用枪头将上述试剂吹吸混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。
3. 20°C 15 min。注意：若此操作使用 PCR 仪，请将热盖关闭。

【DNA 片段的选择性回收】

建议使用聚合美磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒（MF050）进行 DNA 片段选择性回收。若起始样本量低于 50ng，不建议进行 DNA 片段选择性回收。可以参考另一种方案，直接进行 DNA 片段的纯化。若使用聚合美以外厂家的磁珠，需自行摸索最佳磁珠用量，使用聚合美试剂盒具体磁珠用量可以参照附表 1。以下操作步骤采用聚合美磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒，可以选择性回收 DNA 片段长度范围为 310-370bp（读长为 200bp），反应起始体积为 100 μ l。

1. 涡旋振荡 CMPure 20 秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 向连接反应液中加入 16.5 μ l 去离子水，使 adaptor 连接反应缓冲液体积至 100 μ l。**注意：若使用 NEB adaptor，只需加入 13.5 μ l 去离子水。**

3. 将上述 adaptor 反应缓冲液转移至一新的 1.5ml 离心管中；
4. 加入 60 μ l 混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温静置 5 分钟；
5. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心地将上清溶液转移至新的 1.5ml 离心管中，并弃去磁珠。（**注意不要弃除上清**）。
6. 向上清中加入 20 μ l 混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温放置 5 分钟；
7. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心移取上清并弃除，期间避免接触目标 DNA 的磁珠。（**注意不要弃除磁珠**）。
8. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 250 μ l 新配置的 80%乙醇室温放置 30 秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
9. 重复步骤 8：为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体；
10. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置 5 分钟，使磁珠在空气中干燥；
11. 将离心管从磁力架上取下，加入 28 μ l 10mM Tris-HCl（pH8.0）或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置 5 分钟；
12. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），将 23 μ l 洗脱液转移到一个新的 PCR 管中。
注意：一定不要转移磁珠，微量磁珠污染可影响后续 PCR 反应的正常进行。

【其他方案：DNA 片段的选择性回收】

1. 涡旋振荡 CMPure 20 秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将 adaptor 连接反应缓冲液转移至一新的 1.5ml 离心管中；
3. 加入 1 倍样品体积混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温静置 5 分钟；
4. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标 DNA 的磁珠。（**注意不要弃除磁珠**）。
5. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 250 μ l 新配置的 80%乙醇室温放置 30 秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
6. 重复步骤 5，为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体；
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置 5 分钟，使磁珠在空气中干燥；
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 28 μ l 10mM Tris-HCl（pH8.0）或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置 5 分钟；
9. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），将 23 μ l 洗脱液转移到一个新的 PCR 管中。

附表 1：不同片段选择回收时磁珠建议用量

DNA 文库大小	插入片段	150bp	200bp	250bp	300-400bp	400-500bp	500-700bp
	插入片段+adaptor	270bp	320bp	400bp	400-500bp	500-600bp	600-800bp
磁珠用量	第一次选择	65	60	45	40	35	30
	第二次选择	25	20	20	20	15	15

【PCR 扩增】

1. 在 PCR 管中加入以下试剂并混匀

试剂名称	体积
连接 adaptor 后的 DNA 片段	23 μ l
HiFidelity 2x PCR Master Mix	25 μ l
Universal primer	1 μ l
Index primer	1 μ l
Total volume	50 μ l

2. PCR 反应条件

步骤	温度	时间
预变性	98°C	30sec.
变性	98°C	10sec.
退火	65°C	30sec.
延伸	72°C	30sec.
重复以上 6-16 个循环		
终延伸	72°C	5 min.

注意：样本量为 1 μ g 时，6 个循环，样本量 50ng 时 10 个循环，样本量为 5ng 时 14-15 个循环。
PCR 循环数可以根据实验进行优化。

【PCR 产物的纯化】

1. 涡旋振荡 CMPure 20 秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将 PCR 反应液转移至一新的 1.5ml 离心管中；
3. 加入 1 倍样品体积混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温静置 5 分钟；
4. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标 DNA 的磁珠。（**注意不要弃除磁珠**）。
5. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 250 μ l 新配置的 80%乙醇室温放置 30 秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
6. 重复步骤 5，为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体；
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置 10 分钟，使磁珠在空气中干燥；
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 30 μ l 10mM Tris-HCl (pH8.0) 或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置 5 分钟；
9. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），将 25 μ l 洗脱液转移到一个新的 PCR 管中。DNA 文库在 -20°C 保存。

【文库质量检测---文库浓度】

为了得到高质量的测序结果，需要对 DNA 文库进行精确定量，首先推荐使用 Real-time PCR 方法对 DNA 文库进行绝对定量。此外，还可使用荧光染料法，如 Qubit 法或荧光染料 picogreen 法，此处请勿使用基于吸光度测量的定量方法。最终可以使用以下近似公式换算 DNA 文库的摩尔浓度。

文库平均总长度	近似转换公式	成簇反应 DNA 文库浓度
200bp	1 ng/ μ l=7.5 nM	6-12 pM
300bp	1 ng/ μ l=5.0 nM	6-12 pM
400bp	1 ng/ μ l=3.8 nM	6-12 pM
500bp	1 ng/ μ l=3.0 nM	6-12 pM

【文库质量检测---文库长度分布】

制备好的 DNA 文库可用琼脂糖凝胶电泳或 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 DNA 文库中的片段长度分布范围。

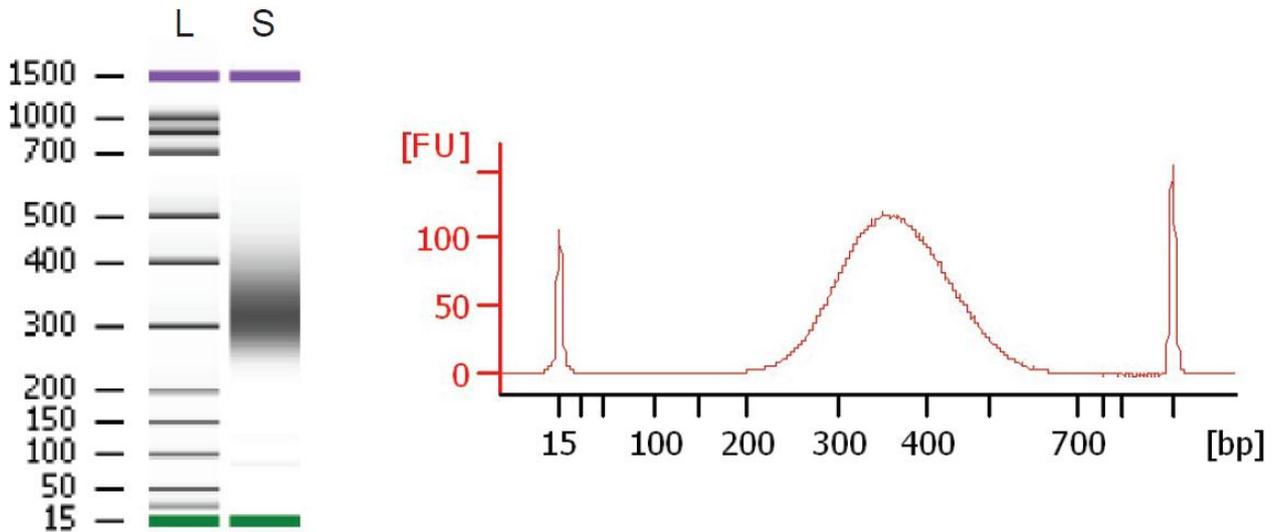


图 1: Agilent 2100 Bioanalyzer 文库分析结果

L: DNA Ladder;

S: 使用 200ng 人基因组 DNA 构建文库，磁珠进行选择回收后结果。

【文库结构】

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

[Target Sequence]

TGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

NNNNNN:index, 6bases

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。