**Universal DNA Library Prep Kit for Illumina**

**货号：KTSM2515 - KTSM2516**

**■ 产品描述：**

该产品是针对Illumina高通量测序平台定向优化而成的文库构建试剂盒。本试剂盒可以将100pg~4μg Input DNA转换成Illumina高通量测序平台专用文库。常规DNA文库构建试剂盒通过对末端修复模块、连接模块和文库扩增模块的整体改进，使文库转化率和扩增文库产出大幅提升，广泛适用于多种样本的PCR文库构建。试剂盒中提供的所有试剂都经过了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。

**■ 产品组成：**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **组分** | **KTSM2515(24rxn)** | **KTSM2516(96rxn)** | **KTSM2515B(24rxn)** | **KTSM2516B(96rxn)** |
| 10🞨 End Repair Reaction Buffer | 156 μl | 4🞨156 μl | 156 μl | 4🞨156 μl |
| End Prep Enzyme Mix | 72 μl | 4🞨72 μl | 72 μl | 4🞨72 μl |
| dA-Tailing Enzyme | 36 μl | 4🞨36 μl | 36 μl | 4🞨36 μl |
| Ligase Master Mix | 360 μl | 4🞨360 μl | 360 μl | 4🞨360 μl |
| Ligation Enhancer | 24 μl | 4🞨24 μl | 24 μl | 4🞨24 μl |
| Adaptor for Illumina | 60 μl | 4🞨60 μl | -- | -- |
| 2🞨 Super-Fidelity Kofu PCR Master Mix | 600 μl | 4🞨600 μl | 600 μl | 4🞨600 μl |
| PCR Primer Mix for Illumina | 120 μl | 4🞨120 μl | -- | -- |

**■ 储存条件：**

-20℃保存。

**■ 自备材料：**

纯化磁珠： DNA Clean Beads (#KTSM2503 / KTSM2504 / KTSM2505)；

DNA质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品；

DNA Adapter and primer：Multiplex Oligos set1 for Illumina（#KTSM2510 / KTSM2511）；

其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、0.1×TE、洗脱液(10 mM Tris-HCl，pH 8.0~8.5)、EP管、PCR管、磁力架、PCR仪等。

**■ 注意事项：**

文库构建可受样本、方案、设备、操作等诸多因素的影响，为了获得高质量的测序文库，文库构建流程参数需要根据实际情况进行调整。

**※Input DNA和Fragmentation**

准确的DNA浓度测定对实验的成功与否有着至关重要的作用，推荐使用Qubit®或荧光染料PicoGreen®对DNA样品进行浓度测定。尽量使用OD260/OD280处于1.8-2.0之间，OD260/OD230大于2.0的高质量Input DNA，DNA量范围为100 pg - 1μg。全基因组测序推荐Input DNA量50ng-1ug。

Input DNA特指投入End Preparation步骤中的DNA。如DNA样品在Fragmentation后进行过纯化或长度分选，需再次测定其浓度，不能直接以Fragmentation之前的DNA量作为Input DNA量。否则，可能会因文库扩增循环数不足导致文库产出偏低。

**※Adapter**

Adapter的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。推荐Adapter：Input DNA摩尔比在10:1 - 200:1之间。Adapter投入量过高可能会导致Adapter或Adapter Dimer残留；投入量不足又会影响连接效率进而导致文库产出降低。试剂盒提供的接头可直接按量使用。

**※关于Adapter Ligation产物纯化**

Adapter Ligation产物需先去除过剩的Adapter，再进行后续文库扩增(PCR文库)或直接上机测序(PCR-Free文库)。默认纯化条件0.6 × (产物100 μl，磁珠60 μl)适用于绝大多数情况。如需获得Insert Size更长的文库，可通过适当降低磁珠使用量以减少小片段文库的含量，但这种调整只能粗略改变文库主峰的位置，如需要准确控制文库长度分布，可在此步进行长度分选。

数据显示纯化产物中Adapter或Adapter Dimer污染严重，可对其再进行一次磁珠纯化：使用灭菌超纯水将第一次纯化产物体积补至50 μl，加入50 μl磁珠(1 ×)进行第二次纯化。这样可以显著降低Adapter或Adapter Dimer的残留水平，尤其是当构建PCR-Free文库时。有时可能还需要配合Adapter的使用量降低才能完全消除Adapter或Adapter Dimer的残留。

**※磁珠的使用**

本试剂盒推荐使用 DNA Clean Beads (#KTSM2503 / KTSM2504 / KTSM2505)进行磁珠纯化。

▲磁珠使用量常用乘数“×”进行标识，表示相对于原始样品体积而言使用多少倍体积的磁珠。如样品原始体积为100 μl ，1×纯化时磁珠使用体积为1×100 μl= 100 μl；0.6×/0.2×分选时第一轮磁珠用量为0.6×100 μl = 60 μl，第二轮磁珠用量0.2×100 μl=20 μl。磁珠使用量直接影响可纯化的DNA长度下限。乘数越高，可纯化的DNA长度下限越短；反之，则越长。

▲磁珠使用前应先平衡至室温(室温放置30 min)，否则会导致得率下降、分选效果不佳。使用前，请旋涡振荡或颠倒以保证充分混匀。

▲样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，吸取上清时应余留2 - 3 μl。若不慎吸到磁珠，会造成得率下降、分选效果不佳甚至影响后续的反应。此时可将磁珠混匀重新置于磁力架上再次分离即可。由于磁力架吸力不同等原因，默认分离时间有时可能需要延长，以彻底分离磁珠和液体。

▲磁珠漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇。漂洗过程中EP管应始终置于磁力架中，请勿扰动磁珠。晾干时，要避免磁珠过分干燥。如果磁珠出现龟裂，则提示磁珠过分干燥，此时DNA的洗脱效率会降低。

▲通常情况下，推荐使用洗脱液(10 mM Tris-HCl，pH 8.0 - 8.5)进行产物洗脱，这样更有利于产物的稳定保存。洗脱产物可于4℃稳定保存一周；长期保存时应置于-20℃，避免不必要的反复冻融。

**※使用注意事项**

▲使用前请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。

▲制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。

▲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。

▲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。

▲PCR产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，我们推荐将

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。

**※长度分选**

▲如Input DNA分布范围较宽，建库过程中通常需要进行长度分选以控制最终文库长度分布范围。推荐使用双轮磁珠分选方案。

▲长度分选执行位置有多种选择，可置于End Preparation之前、Adapter Ligation之后或Library Amplification之后。标准实验方案中不包含长度分选步骤。如需进行，请参考附一、双轮磁珠分选。

▲进行长度分选，DNA损失量约为60% - 95%。有时需要在文库长度分布(进行长度分选)和文库复杂度(不进行长度分选)之间进行选择。当Input DNA量较低时，应保证长度分选执行位置的唯一性，进行两次或者两次以上的长度分选会导致文库复杂度和产出严重下降！

▲过度扩增的文库进行长度分布检测时，常见高分子量位置出现拖带或尾峰。对应产物多为非互补链交叉退火产物(参考06-6/关于Library Amplification)。推荐解决方案为调整扩增循环数，避免过度扩增，不建议通过长度分选去除拖带或尾峰。

**※长度分选**

▲PCR Primer Mix for Illumina适用于扩增含非完整长度Adapter的Illumina®高通量测序平台文库。完整长度Adapter或者其他平台文库需自行更换扩增引物，推荐每条引物的扩增终浓度为5 - 20 μM。本试剂盒提供的为非完整长度的Adapter，Primer Mix浓度合适，可直接按量使用。

▲Library Amplification步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会导致过度扩增、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。Table 1列举了当使用100 pg - 1 μg高质量Input DNA时，获得100 ng或1 μg文库推荐的扩增循环数。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Table 1. 100 pg~1μg Input DNA扩增循环数推荐表** | | |
| Input DNA  (into End Preparation) | Number of cycles required generate | |
| 100 μl | 1 μg |
| 100pg | 15-17 | 16-19 |
| 1ng | 9-11 | 12-15 |
| 5ng | 7-9 | 10-14 |
| 10ng | 6-8 | 8-12 |
| 50ng | 4-6 | 7-10 |
| 100ng | 2-4 | 5-9 |
| 250ng | 1-3 | 4-7 |
| 500ng | 0 | 2-5 |
| 1μg | 0 | 2-5 |

上表为使用~ 200 bp高质量Input DNA时测得的循环数参数。当DNA质量较差、文库长度较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。若建库过程中进行过长度分选，则参照较高循环数进行Library Amplification；否则，参照较低循环数即可。当Adapter Ligation步骤中使用非完整长度Adapter (如 #KTSM2512)时，须至少扩增2个循环以补全文库末端Adapter序列。

**※文库质量控制**

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。

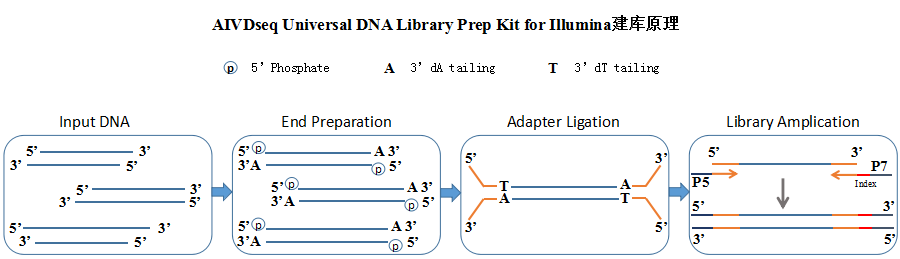
▲文库长度分布检测：

文库长度分布可通过LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)；Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)；Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备进行检测。

▲文库浓度检测：

常用文库浓度检测方法有两种：基于双链DNA荧光染料的方法，如Qubit®、Equalbit dsDNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ111)、PicoGreen®等和基于qPCR绝对定量的方法。

**实验原理图**



**实验方案**

**步骤一：将Input DNA末端补平，并在5’端进行磷酸化和3’端加dA尾。**

1. 在灭菌的0.2 ml PCR管中按如下体系配制反应：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| Fragmented dsDNA | x μl |
| End Repair Reaction Buffer (10🞨) | 6.5 μl |
| End Prep Enzyme Mix | 3.0 μl |
| dA-Tailing Enzyme | 1.5 μl |
| Total volume | Add to 65 μl |

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底，在PCR仪中运行以下程序：

|  |  |
| --- | --- |
| **温度** | **时间** |
| 热盖105℃ | On |
| 20℃ | 30 min |
| 65℃ | 30 min |
| 4℃ | Hold |

**步骤二：在End Preparation产物末端连接Adapter。**

1. 根据Input DNA量按Table 2 (Page.06)稀释Adapter至合适浓度；

2. 将Ligase Master Mix和 Ligation Enhancer解冻后颠倒混匀，置于冰上备用；

3. 在EndPreparation步骤PCR管中按如下体系配制反应：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| End Preparation产物 | 65 μl |
| Adaptor for Illumina | 2.5 μl |
| Ligase Master Mix | 15 μl |
| Ligation Enhancer | 1 μl |
| Total volume | 83.5 μl |

4. 振荡混匀后将PCR管置于PCR仪中，运行以下反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| **温度** | **时间** |
| 热盖105℃ | On |
| 20℃ | 15 min |
| 4℃ | Hold |

**步骤三：连接后分选纯化，使用 DNA Clean Beads对反应产物进行纯化。**

可根据实际情况选择是否进行片段选择。若起始量<50ng，不建议进行片段选择。对于分选不同插入片段大小的文库，请参照Table 2使用适量的 DNA Clean Beads。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Table 2 文库长度分选** | | | | | | | | | |
| **文库参数**  **（Adapter Ligation之后分选，样品体积100 μl）** | 预期文库  大小 (bp) | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 400 | 450 | 500 |
| **磁珠体积**  **(μl)** | 1st 片段选择 | 78 | 68 | 65 | 59 | 56 | 53 | 51 | 50 |
| 2nd 片段选择 | 20 | 20 | 15 | 15 | 12 | 12 | 10 | 10 |

**1. 产物片段选择（按照350bp分选）**

（1）将连接产物转至1.5 ml EP管中，并加入16.5 μl ddH2O补足体系至100 μl；

（2）取出4℃贮存的 DNA Clean Beads，振荡均匀；

（3）加入56 μl DNA Clean Beads至连接反应体系中，充分混匀（可漩涡振荡或使用吸头吹打10次以上），短暂离心后室温静置5 min；

（4）将EP管置于磁力架上静置约3 min，直至液体变澄清；

（5）小心吸取上清**（*注意：保留上清*）**并转移至新1.5 ml EP管中，向上清液中加入12 μl DNA Clean Beads，充分混匀，短暂离心后室温静置5 min；

（6）将EP管置于磁力架上静置约3 min，直至液体变澄清；

（7）弃上清并避免碰触磁珠**（*注意：保留磁珠*）**，沿磁珠对侧加入200 μl新配80%乙醇，于磁力架上将EP管水平旋转180°充分洗涤磁珠后复位，待溶液澄清后，弃上清；

（8）重复步骤（7）1次；

（9）尽量去除残留乙醇，保持EP管开盖状态，在室温风干磁珠（或置于37℃恒温加热装置）至出现干裂；

（10）加入22 μl ddH2O洗脱磁珠，充分混匀后静置5 min；

（11）将EP管置于磁力架上，液体变澄清后，转移20 μl上清至新的0.2 ml PCR管中，进行下一步反应。

**2. 产物纯化（不作片段选择）**

（1）取出4℃贮存的 DNA Clean Beads，振荡均匀；

（2）加入86.5 μl DNA Clean Beads至连接反应体系中，充分混匀（可漩涡振荡或使用吸头吹打10次以上），短暂离心后室温静置5 min；

（3）将EP管置于磁力架上静置约3 min，直至液体变澄清；

（4）弃上清并避免碰触磁珠**（*注意：保留磁珠*）**，沿磁珠对侧加入200 μl新配80%乙醇，于磁力架上将EP管水平旋转180°充分洗涤磁珠后复位，待溶液澄清后，弃上清；

（5）重复步骤（4）1次；

（6）尽量去除残留乙醇，保持EP管开盖状态，在室温风干磁珠（或置于37℃恒温加热装置）至出现干裂；

（7）加入22 μl 45℃预热的ddH2O洗脱磁珠，充分混匀后静置5 min；

（8）将EP管置于磁力架上，液体变澄清后，转移20 μl上清至新的0.2 ml PCR管中，进行下一步反应。

**步骤四：Library Amplification，文库富集。**

这一步骤将对纯化或长度分选后的Adapter Ligation产物进行PCR扩增。是否需要进行这一步骤取决于Input DNA量、Adapter是否为完整长度、应用需要等因素。如使用非完整长度Adapter (如 #KTSM2510 / KTSM2511)，必须进行这一步骤。如使用完整长度Adapter，当Input DNA＜50 ng时，推荐进行Library Amplification；当Input DNA≥50 ng或者不需要进行文库扩增富集时，此步骤可不进行，直接进入文库质控。

1. 在0.2 ml PCR管中配制PCR反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| Adaptor Ligated DNA | 20 μl |
| 2🞨 Kofu HiFi Amplification Mix | 25 μl |
| Universal PCR Primer for Illumina | 2.5 μl |
| Index (X) Primer for Illumina | 2.5 μl |
| Total volume | 50 μl |

2. 吹打混匀后将PCR管放置预热的PCR仪中，按以下程序运行：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **温度** | **时间** | **循环数** |
| 95℃ | 3 min | 1 |
| 98℃ | 20s | 4~12\* |
| 60℃ | 15s |
| 72℃ | 30s |
| 72℃ | 5 min | 1 |
| 4℃ | ~ | 1 |

\*推荐起始量为1μg时使用4个循环，50ng时7~8个循环，5ng时12个循环，可根据实际进行优化。

**步骤五：PCR产物纯化。**

（1）取出4℃贮存的 DNA Clean Beads，振荡均匀；

（2）加入50 μl DNA Clean Beads至连接反应体系中，充分混匀（可漩涡振荡或使用吸头吹打10次以上），短暂离心后室温静置5 min；

（3）将EP管置于磁力架上静置约3 min，直至液体变澄清；

（4）弃上清并避免碰触磁珠**（*注意：保留磁珠*）**，沿磁珠对侧加入200 μl新配80%乙醇，于磁力架上将EP管水平旋转180°充分洗涤磁珠后复位，待溶液澄清后，弃上清；

（5）重复步骤（4）1次；

（6）尽量去除残留乙醇，保持EP管开盖状态，在室温风干磁珠（或置于37℃恒温加热装置）至出现干裂；

（7）加入25 μl 45℃预热的ddH2O洗脱磁珠，充分混匀后静置5 min；

（8）将EP管置于磁力架上，液体变澄清后，回收25 μl上清至1.5 ml EP管中，并于管盖上标注index、文库类型、样本名称与建库日期，-20℃贮存待上机。