



Genoscan™

www.genoscan.cn

Genoscan Genetech Co., Ltd

Order: 400-876-1157

版本号: GS181024

## Geno Super DNA Library Prep Kit (illumina)

### Geno Super DNA文库构建试剂盒 (illumina 平台)

#### 产品内容

产品组成	GS102-01 (24 rxn)	GS102-02 (96 rxn)
ER/dA Buffer	264 $\mu$ L	1056 $\mu$ L
ER/dA Enzyme	105 $\mu$ L	422 $\mu$ L
Ligation Buffer	740 $\mu$ L	1478 $\mu$ L (x 2)
DNA Ligase	53 $\mu$ L	212 $\mu$ L
2 $\times$ HiFi HotStart PCR Master Mix	660 $\mu$ L	1320 $\mu$ L (x 2)

#### 储存条件

请将试剂盒置于-15 ~ -25°C保存，避免反复冻融，保质期为一年。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床治疗、医药、食品及化妆品等用途。

---

## 产品简介

Geno Super DNA Library Prep Kit (illumina) 是专门针对illumina高通量测序平台优化的DNA文库构建试剂盒。本产品可对经超声处理、化学处理、酶处理的片段化双链DNA或小片段DNA进行一管内一步法完成末端修复和3'端dA尾添加, 所得产物无需纯化, 可直接进行接头的连接; 同时配备的PCR扩增预混液经过专门的优化, 特别适合文库富集扩增, 所得文库产量高, 保真度好、无碱基偏好性。本试剂盒采用一步法的反应流程, 省去多步纯化步骤, 整个文库构建流程仅需~2.5小时; 文库转化效率更高, 可对微量DNA样本进行高效的文库构建, 包括gDNA, cfDNA, FFPE样品DNA等。

适用范围: Illumina高通量测序平台DNA文库构建。

适用样本量: 0.5 ng ~ 1 µg DNA。

## 推荐使用试剂

1. Geno Multiplex Oligos Set1 for Illumina (GS001-01/02/03) 或其他等效产品。
2. Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠等效产品。

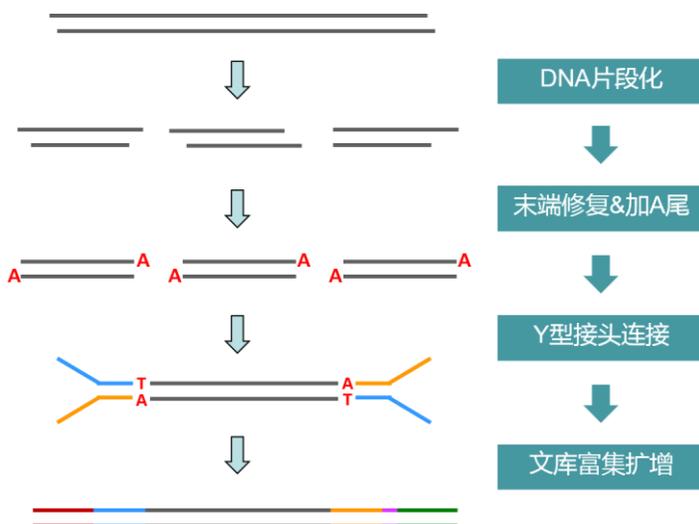
## 产品特点

1. 操作流程简单、便捷, 一步完成dsDNA片段的末端修复、dA添加反应, 无需纯化直接进行接头连接反应。
2. 文库模板转化效率高, DNA样本起始量可低至0.5 ng。
3. PCR文库富集过程碱基偏好性小, 测序数据均一度好。
4. 兼容各种样本和建库类型, 包括目标区间捕获测序文库、扩增子测序文库等。

## 注意事项

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、EP管进行实验。
3. 实验开始前, 请清洁操作台, 并使用RNA酶及DNA酶清除试剂, 如RNase Away (Molecular BioProducts, Inc) 处理台面。确保没有RNA酶和DNA酶的污染。
4. 进行文库扩增前, 请确保PCR仪已经调试好并处于稳定的状态。
5. 实验前请仔细阅读说明书, 如果需要暂停实验, 可根据说明书推荐将实验产物保存于-20℃并安排后续实验。

## 实验流程



## 实验步骤

### 一、DNA片段化

本试剂盒不包含DNA片段化相关试剂。对于DNA的片段化过程，客户可在超声处理、化学处理和酶处理等常用方法中选择，具体操作请参考相关产品说明。片段化DNA大小推荐为200~500bp，具体可根据测序平台读长决定。

### 二、末端修复&A尾添加

2-1. 在开始实验前，需要明确核酸的浓度以及DNA溶解于哪种溶剂中，建议将片段化的DNA溶于Nuclease-Free H<sub>2</sub>O，如果DNA溶解于其他溶液中时，请确定溶液中的盐离子，尤其EDTA的浓度。EDTA对反应影响较大，如果不确定溶液中EDTA浓度或EDTA浓度较高，请使用AMPure XP 磁珠对DNA进行纯化。纯化步骤如下：

(1) 若DNA溶液体积小于50  $\mu$ L，请用Nuclease-Free H<sub>2</sub>O补足体积至50  $\mu$ L。

- (2) 加入90  $\mu\text{L}$  (1.8 $\times$ ) 已平衡至室温并涡旋混匀的Agencourt AMPure XP磁珠至DNA溶液中，吸打混匀。若DNA溶液体积大于50  $\mu\text{L}$ ，请根据DNA溶液的实际体积，加入1.8 $\times$ 体积已平衡至室温并涡旋混匀的Agencourt AMPure XP磁珠，吸打混匀。
- (3) 室温静置5 min后，将反应管置于磁力架上，待溶液澄清后，用移液器小心吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上，加入200  $\mu\text{L}$  80%乙醇（现配现用），静置30秒，吸弃上清。重复此洗涤步骤一次，并彻底弃上清。
- (5) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置~5 min，晾干至磁珠表面无反光即可。
- (6) 将反应管从磁力架上取出，加入40  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free  $\text{H}_2\text{O}$ 或10 mM Tris-HCl (pH8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置5 min。将反应管置于磁力架上，待溶液澄清后，小心转移上清至新的离心管。
- (7) 使用Qubit、Picogreen 或其他荧光定量方法测定纯化后的DNA浓度。**注：确定输入DNA总量十分重要，尤其在输入量 <100 ng时。推荐使用Qubit、Picogreen或者其他染料法对DNA浓度进行准确定量。**

2-2. 将各试剂置于冰上融化，ER/dA Enzyme 融化后用手指后轻弹混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀，瞬时离心收集管壁和管盖液体。

2-3. 当DNA溶解于Nuclease-Free  $\text{H}_2\text{O}$ 、10 mM Tris-HCl (PH 8.0~8.5)、Buffer EB 或 0.1 $\times$ TE 等低浓度EDTA溶液中，请使用如下步骤进行末端修复&A尾添加反应。照下表设置PCR仪反应程序，开启热盖，顶盖温度设置为70 $^{\circ}\text{C}$ 。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	37 $^{\circ}\text{C}$	30 min
2	65 $^{\circ}\text{C}$	30 min
3	4 $^{\circ}\text{C}$	保持温度

2-4. 在200  $\mu$ L PCR管中按下表配制反应体系，冰上操作加入各组分后请轻柔吸打10~15次混匀，注意不要涡旋，瞬时离心PCR管，立刻置于PCR仪中并启动反应程序。当反应程序结束后，将反应管从PCR仪中取出并置于冰上，立即进行接头连接。**注：对于多个反应，请计算所需试剂的总体积并在此基础上增加10%，避免因溶液转移过程中因挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。**

组分名称	体积 ( $\mu$ L)
ER/dA Buffer	10
ER/dA Enzyme	4
DNA sample	X
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	40-X
Total	54

### 三、接头连接

3-1. 末端修复&A尾添加反应结束后，向步骤2-4反应产物中加入5  $\mu$ L的接头 (Adapter) 溶液，轻柔吸打混匀后置于冰上（根据输入DNA样品总量，参见下表确定接头使用浓度）。**注意：本试剂盒中不含建库接头，推荐使用Geno Multiplex Oligos Set1 for Illumina (GS001-01/02/03)，并使用Nuclease-Free H<sub>2</sub>O或10 mM Tris-HCl (pH8.0) 稀释接头到使用浓度，冰上操作。为了达到较高的连接效率，我们推荐反应体系中Input DNA与Adapter的摩尔比在1:50至1:350之间，下表Input DNA : Adapter摩尔比是基于Input DNA片段为200bp估算所得，不同大小Input DNA片段可按公式估算：Input DNA摩尔数(pmol)  $\approx$  Input DNA质量(ng)/ [0.66  $\times$  Input DNA平均长度(bp)]。**

Input DNA (ng)	Input DNA : Adapter 摩尔比	Adapter使用浓度	Adapter母液 稀释倍数
1000	1:17	25 $\mu$ M	不稀释
500	1:33	25 $\mu$ M	不稀释
250	1:67	25 $\mu$ M	不稀释
100	1:167	25 $\mu$ M	不稀释
50	1:330	25 $\mu$ M	不稀释
25	1:330	12.5 $\mu$ M	1:2
10	1:330	5 $\mu$ M	1:5
5	1:330	2.5 $\mu$ M	1:10
2.5	1:330	1.25 $\mu$ M	1:20
1	1:330	0.5 $\mu$ M	1:50

3-2. 按照下表各组分用量配制连接反应体系，将配制完成的反应体系轻轻吸打混匀后置于冰上。

组分名称	体积 ( $\mu$ L)
Ligation Buffer	28
DNA Ligase	2
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	11
Total	41

3-3. 将步骤3-2配制好的41  $\mu$ L连接反应体系加入步骤3-1准备的反应液中，轻轻吸打 >15次充分混匀，短暂离心后置于PCR仪中进行连接反应。PCR仪反应程序参照下表设置，关闭顶盖加热并预先降温到20 $^{\circ}$ C以下。\* 注：如需提高连接效率，可将连接反应时间延长到25 min.

反应步骤	反应温度	反应时间
1	20 $^{\circ}$ C	15 min *
2	4 $^{\circ}$ C	保持温度

---

3-4. (**无需进行片段分选**) 完成连接反应后, 向步骤3-3连接产物中加入0.8×体积 (80 μL)

Agencourt AMPure XP磁珠进行纯化, 具体步骤如下:

- (1) 将AMPure XP磁珠提前置于室温平衡30 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮, 加入80 μL Agencourt AMPure XP磁珠至步骤3-3连接产物中, 用移液器充分吸打混匀。
- (3) 室温静置5 min后, 将反应管置于磁力架上3 min, 待溶液澄清后, 用移液器吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上, 向反应管内加入200 μL 80%乙醇 (现配现用), 静置30秒, 小心吸弃上清。
- (5) 重复洗涤步骤(4)一次, 并彻底弃上清。
- (6) 将反应管置于磁力架上, 开盖室温放置 ~ 5 min, 晾干至磁珠表面无反光即可。**注: 不要过分干燥磁珠, 否则会造成得率降低。**
- (7) 将反应管从磁力架上取出, 加入25 μL Nuclease-Free H<sub>2</sub>O或10mM Tris-HCl (pH 8.0), 轻轻吸打混匀, 室温静置5 min。将反应管放置于磁力架上, 待溶液澄清后, 转移上清约22 μL至新的离心管中用于后续文库富集扩增。**注: 如不立即使用, 请将样品冻存于-20℃。**

3-5. (**需要进行片段分选 — 可选做**) 对于需要进行片段分选的文库, 先将反应产物按步骤3-4使用0.8×体积 (80μL) AMPure XP磁珠纯化并溶于50 μL Nuclease-Free H<sub>2</sub>O或10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中, 再参考下表中两步筛选过程中的磁珠添加比例进行连接产物片段分选。现以连接产物大小为200~350 bp的情况为例, 使用0.8×体积AMPure XP磁珠纯化连接产物并溶于50 μL Nuclease-Free H<sub>2</sub>O或10mM Tris-HCl (pH 8.0) 后按如下步骤进行片段分选。**注: 短Y型接头的连接产物长度增加 ~50bp, 全Y型接头的连接产物长度增加 ~100bp, 下表是以Geno Multiplex Oligos Set1 for Illumina (GS001-01/02/03) 中短Y型接头为例。**

文库参数		磁珠加入比例	
插入片段	连接产物	第一次筛选	第二次筛选
150 ~ 300 bp	200 ~ 350 bp	0.7×	0.2×
200 ~ 400 bp	250 ~ 450 bp	0.6×	0.2×
250 ~ 600 bp	300 ~ 650 bp	0.55×	0.2×

- (1) 将AMPure XP磁珠置于室温平衡30 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入35  $\mu\text{L}$  ( $50 \mu\text{L} \times 0.7 = 35 \mu\text{L}$ ) Agencourt AMPure XP磁珠至50  $\mu\text{L}$  已纯化的连接产物中，充分吸打混匀。
- (3) 室温静置5 min后，将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清后，用移液器小心吸取上清并转移至另一新的离心管中。
- (4) 向上清中加入10  $\mu\text{L}$  ( $50 \mu\text{L} \times 0.2 = 10 \mu\text{L}$ ) AMPure XP磁珠，用移液器轻轻吸打混匀。
- (5) 室温静置5 min后，将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清后，小心吸弃上清。
- (6) 在磁力架上向反应管内加入200  $\mu\text{L}$  80%乙醇（现配现用），静置30秒，吸弃上清。重复此洗涤步骤一次，并彻底弃上清。
- (7) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置~5 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**
- (8) 将反应管从磁力架上取出，加入25  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free  $\text{H}_2\text{O}$ 或10 mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置5 min。将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清后，转移上清约22  $\mu\text{L}$ 至新的离心管中，用于文库富集扩增。**注：如不立即使用，请将样品冻存于 $-20^\circ\text{C}$ 。**

## 四、文库富集扩增

4-1. 将2× HiFi HotStart PCR Master Mix 和 Index Primer Mix (Geno Multiplex Oligos Set1 for Illumina, GS001-01/02/03) 置于冰上融化, 短暂混匀。按下表设置PCR仪反应程序, 开启热盖, 温度设置于105°C。\*注: 请根据DNA的质量确定PCR循环数。建议对于500ng、100 ng、10 ng、1 ng文库起始DNA, PCR富集时分别需要扩增4、6、10、14个循环。如果在PCR富集之前经过片段大小筛选步骤, 则建议在原有基础上增加2~4个循环, 如果DNA质量较差 (比如提取于FFPE样品), 则建议在原有基础上增加1~3个循环。

步骤	温度	时间	循环数
1	98°C	45 sec	1
2	98°C	15 sec	4 ~ 14*
3	65°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	1 min	1
6	4°C	保持温度	1

4-2. 按照下表配制PCR反应体系, 用移液器吸取纯化后的连接产物22 μL于PCR管中, 按下表所示体积加入PCR反应液和引物, 轻柔吸打10~12次充分混匀。瞬时离心后将PCR反应管置于PCR仪内, 按步骤4-1反应程序进行PCR富集扩增。

组分名称	体积 (μL)
DNA Library	22
2× HiFi HotStart PCR Master Mix	25
Index Primer Mix (10 μM)	3
Total	50

4-3. 当PCR样品温度降至4°C, 将PCR产物取出并使用1.0×体积 (50 μL) Agencourt AMPure

---

XP磁珠进行纯化。

- (1) 将AMPure XP磁珠置于室温平衡30 min。
  - (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入50  $\mu$ L AMPure XP磁珠至PCR扩增产物中，充分吸打混匀。
  - (3) 室温静置5 min后，将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清后，用移液器吸弃上清。
  - (4) 在磁力架上向反应管内加入200  $\mu$ L 80%乙醇（现配现用），静置30秒，吸弃上清。
  - (5) 重复洗涤步骤(4)一次，并彻底弃上清。
  - (6) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置~5 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**
  - (7) 将反应管从磁力架上取出，加入33  $\mu$ L Nuclease-Free H<sub>2</sub>O或10mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置5 min。将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清后转移上清30  $\mu$ L至新的离心管中。**注：纯化后得到的DNA文库可保存于-20℃。**
- 4-4. 上机测序前可使用Qubit (Geno dsDNA HS Assay Kit for Qubit, GS911-01/02) 和Agilent Bioanalyzer对DNA文库的浓度及大小进行鉴定。