

Hieff NGS[®] DNA Library Prep Kit 2.0

全能型 DNA 建库试剂盒 2.0

12927ES

产品使用说明书

Ver. CN20240918

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	1
储存条件	1
注意事项	1
使用说明	4

产品简介






Hieff NGS[®] DNA Library Prep Kit 2.0 是针对 Illumina[®] 和 MGI[®] 高通量测序平台专业开发设计的新一代建库试剂盒。本产品采用高质量的酶学组成，在前一代建库试剂盒的基础上，改进了 DNA 片段末端修复和加 A 效率，同时改善了接头连接效率。本试剂盒采用新型的高保真酶，显著提高扩增均一性和保真性，可应用于常规动植物基因组、微生物基因组、FFPE、cfDNA、ChIP DNA 等样本，助力获得优异的测序数据。

- 适用 100 pg- 1 μg 的所有 DNA 样本，包含 cfDNA、FFPE 等
- 业界领先的文库转化率，最高可达 70% 以上
- 多样本验证可获得优异的文库与测序数据
- 严格的批次性能与稳定性质控。

产品信息

货号	12927ES08 / 12927ES24 / 12927ES96/12927ES97
规格	8 T / 24 T / 96 T / 96 T (自动化)

组分信息

组分编号	组分名称	12927ES08	12927ES24	12927ES96	12927ES97 (管式自动化 96 T)
12927-A	 Endprep Buffer 2.0	56 μL	168 μL	672 μL	960 μL
12927-B	 Endprep Enzyme 2.0	24 μL	72 μL	288 μL	390 μL
12927-C	 Ligation Enhancer 2.0	240 μL	720 μL	3×960 μL	3×1070 μL
12927-D	 Rapid T4 DNA Ligase 2.0	80 μL	240 μL	2×480 μL	1210 μL
12927-E	 Canace [®] Pro Amplification Mix	200 μL	600 μL	3×800 μL	3×940 μL

注：若实验时，使用推荐的短接头，则无需 Primer mix。若实验时，选择长接头，则 Primer mix 为实验必须试剂，但是该成分不包含在本试剂盒，需要额外配置。本试剂盒组分兼容 Illumina 和 MGI 双平台，但需要额外配置专属于 Illumina[®] 或者 MGI[®] 的 primer mix, (Cat# 12190 Primer Mix for Illumina[®] 以及 Cat# 12191 Primer Mix for MGI[®])。

储存条件

-25~-15°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. 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 DNA 片段化

1. 本试剂盒中兼容机械法及酶切法片段化的 DNA。
2. 本试剂盒兼容范围为 100 pg - 1 μg Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8-2.0 的高质量 Input DNA。表 1 中列举了将本试剂盒应用于常见应用中推荐的 Input DNA 量。

表 1 常见应用中推荐 Input DNA 量

应用	样本类型	推荐 Input DNA 量
全基因组测序	复杂基因组	50 ng-1000 ng
靶向捕获测序	复杂基因组	10 ng-1000 ng
全基因组测序, 靶向捕获测序	FFPE DNA	50 ng-1000 ng
全基因组测序, 靶向捕获测序	cfDNA/ctDNA	≥500 pg
全基因组测序	微生物基因组	≥1 ng
全基因组测序 PCR-free 测序	高质量 DNA	≥50 ng

【注】：上表为使用高质量 DNA 时推荐的 Input DNA 量，当 Input DNA 质量较差或需要进行片段分选时，应适当上调使用量。

3. Input DNA 特指投入末端修复/dA 尾添加步骤中的 DNA。
4. Input DNA 制备过程中带入的高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复/dA 尾添加步骤反应效率，建议 DNA 片段化后进行磁珠纯化或分选。当使用机械法进行 DNA 片段化且产物不进行纯化或长度分选而直接建库时，请将 DNA 稀释在 TE Buffer 中进行片段化，请勿在灭菌超纯水中进行。

三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 针对 Illumina® 测序平台，Yeasten 可提供如下接头：
 - a. Hieff NGS® Complete Adapter Kit for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#13519~Cat#13520)，试剂盒中的接头浓度为 15 μM；
 - b. Hieff NGS® 384 CDI Primer for Illumina® (Cat#12412~Cat#12413)，试剂盒中的接头浓度为 15 μM；
 - c. Hieff NGS® Stubby UDI Primer Kit for Illumina®, Set1~Set4 (板式) (Cat#12327~Cat#12330)，试剂盒中的接头浓度为 15 μM；
 - d. Hieff NGS® Dual UMI UDI Adapter Kit for Illumina®, Set1~Set2 (Cat#13370~Cat#13371)，试剂盒中的接头浓度为 15 μM。
 - e. Hieff NGS® Full UDI Adapter Kit for Illumina® Set1~Set4 (板式) (Cat#12333~Cat#12336)，试剂盒中的接头浓度为 10 μM；
2. 针对 MGI® 高通量测序平台，Yeasten 可提供如下接头：
 - a. Hieff NGS® Complete Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 3 (Cat#13360 ~ Cat#13362)，试剂盒中的接头浓度为 10 μM；
 - b. Hieff NGS® Unique Dual Barcode Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 4 (板式) (Cat#13350~ Cat#13353)，试剂盒中的接头浓度为 10 μM；
 - c. Hieff NGS® Dual UMI UDB Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 2 (Cat#13367~Cat#13368)双端 UMI UDB 短接头，试剂盒中的接头浓度为 10 μM。
3. Adapter 的质量和浓度直接影响连接效率及文库产量。Adapter 用量过高可能会产生较多 Adapter Dimer；用量较低可能会影响连接效率及文库产量；使用 Adapter 时根据 Input DNA 量用 TE Buffer 进行相应稀释。

表 2 列举了使用本试剂盒的不同 Input DNA 量推荐的针对 Illumina® 测序平台常规和 UMI Adapter 的稀释方法。

表 3 列举了使用本试剂盒的不同 Input DNA 量推荐的针对 MGI® 测序平台常规和 UMI Adapter 的稀释方法。

表 2 100 pg-1 μg Input DNA 针对 Illumina® 测序平台推荐的常规和 UMI Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter 稀释倍数	浓度
0.1ng	150 倍稀释	0.1 μM
1 ng	30 倍稀释	0.5 μM
10 ng	7.5 倍稀释	2 μM
100 ng	3 倍稀释	5 μM
1000 ng	1.5 倍稀释	10 μM

表 3 100 pg-1 μg Input DNA 针对 MGI® 测序平台推荐的常规和 UMI Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter 稀释倍数	浓度
0.1ng	100 倍稀释	0.1 μM
1 ng	20 倍稀释	0.5 μM
10 ng	5 倍稀释	2 μM
100 ng	2 倍稀释	5 μM
1000 ng	不稀释	10 μM

四、关于磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection)

1. DNA 片段长度分选步骤可选择在末端修复/dA 尾添加之前，或接头连接后，或文库扩增后进行。
2. 当 Input DNA 质量 ≥ 50 ng，您可选择在接头连接后分选；如 Input DNA 质量 < 50 ng，建议您在文库扩增后进行分选。
3. Ligation Enhancer 中包含高浓度的 PEG，会对双轮分选产生显著影响。因此，如在接头连接后进行长度分选，必须先进行纯化步骤，再进行双轮分选步骤；如在末端修复/dA 尾添加之前或文库扩增后进行长度分选，可直接进行双轮磁珠分选步骤。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
8. 进行长度分选时，初始样品体积应尽量 ≥ 100 μ L，不足时请用超纯水补齐。以防因样品体积太小导致移液误差增大。
9. 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。
10. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱，产物可于 4 °C 可保存 1-2 周，-20 °C 可保存 1 个月。

五、关于文库扩增 (Library Amplification)

1. 是否需要文库扩增取决于 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，必须进行这一步骤。如使用完整长度 Adapter，当 Input DNA < 200 ng 时，推荐进行文库扩增；当 Input DNA ≥ 200 ng 或者不需要进行文库扩增时，可不进行文库扩增。
2. 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 4 列举了使用本试剂盒，获得 1 μg 文库的推荐循环数。

表 4 100 pg-1 μg Input DNA 推荐的循环数

Input DNA	1 μg 文库产量推荐 PCR 循环数
1000 ng	2 - 4
500 ng	2 - 4
250 ng	4 - 6
100 ng	5 - 7
50 ng	7 - 9
10 ng	9 - 11
5 ng	10 - 12
1 ng	12 - 15
100 pg	16 - 18

【注】：**如果使用了不完整的接头，需要扩增 1-3 个循环，形成完整的接头。建库过程中若进行片段分选，扩增时请参照较高循环数扩增。

六、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

- 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。
- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop[®]等。
- 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit[®]、PicoGreen[®]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 的产物以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 的不可测序文库干扰。
- 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。

使用说明

一、自备材料

- 纯化磁珠：Cat#12601, Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 或 Cat#A63880, AMPure XP Beads 或其他等效产品。
- DNA 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
- DNA Adapter：接头详细介绍信息参考上面注意事项中的第三部分“关于接头连接”。
4. DNA Primer Mix: Cat#12190, DNA Library Prep Primer Mix for Illumina[®] 或 Cat#12191, DNA Library Prep Primer Mix for MGI[®]
- 其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5; 0.1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

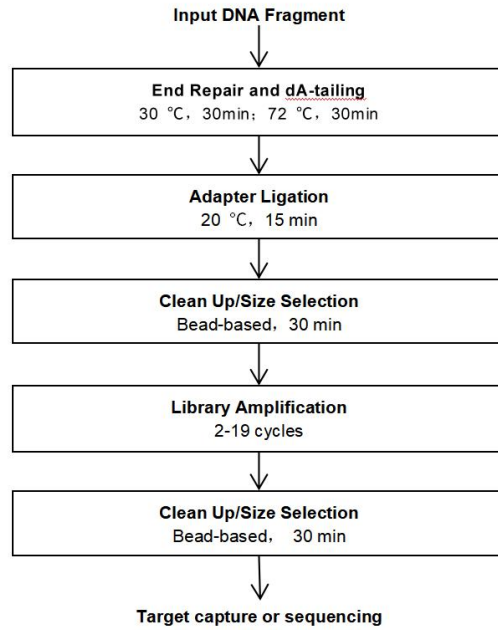


图1 HiSeq NGS[®] DNA Library Prep Kit 2.0 操作流程

三、操作步骤

3.1 末端修复/dA 尾添加 (End Repair/dA-Taling)

该步骤将片段化后的 Input DNA 末端补平，并进行 5' 端磷酸化和 3' 端加 dA 尾。

1. 将表 5 中试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 5 反应体系。

表 5 末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	体积 (μL)
Fragmented DNA	x
Endprep Buffer 2.0	7
Endprep Enzyme 2.0	3
ddH ₂ O	Up to 60

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，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 6 所示反应程序，进行末端修复/dA 尾添加反应。

表 6 末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105 °C	On
30 °C	30 min
72 °C	30 min
4 °C	Hold

3.2 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤将 3.1 步骤的产物末端，连接 Illumina[®] 或 MGI[®] 接头。

1. 根据 Input DNA 量按第三部分推荐的接头使用浓度，稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 7 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

3. 于 3.1 步骤 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表 7 Adapter Ligation PCR 体系

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA (3.1 步骤产物)	60
Ligation Enhancer 2.0	30*
DNA Adapter	5**
Rapid T4 DNA Ligase 2.0	10
ddH ₂ O	5
总计	110

【注】：*Ligation Enhancer 比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时尚后离心使用。

**本公司接头浓度与常规商业化试剂盒一致 Illumina[®]平台皆为 15 μM，MGI[®]平台皆为 10 μM。请根据注意事项三中的提示，对接头进行稀释，加水补齐，使接头体积为 5 μL。

4. 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。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 8 所示反应程序，进行接头连接反应。

表 8 Adapter Ligation PCR 反应程序

温度	时间
热盖	Off
20 °C	15 min
4 °C	Hold

3.3 连接产物磁珠纯化 (Post Ligation Clean Up)

该步骤使用磁珠对 3.2 步骤的产物进行纯化或分选。纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。

3.3.1 纯化操作步骤

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 88 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.8×, Beads: DNA=0.8: 1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，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，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，进行洗脱：
 - 1) 如产物无需进行片段分选，直接加入 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。
【注：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱】。
 - 2) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 5 min），小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。
 - 3) 如产物需进行双轮分选，加入 102 μL ddH₂O，加入适量的磁珠进行分选操作。
【注：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱】。

3.3.2 双轮分选操作步骤

1. 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

2. 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
3. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 9 向上述 100 μL DNA 上清中加入第一轮分选磁珠，涡旋或移液器吹打 10 次混匀。

表 9 磁珠文库分选推荐比例

DNA 文库大小 (插入片段)	150 - 250 bp	200-300 bp	300-400 bp	400-500 bp
DNA 文库大小	250-350 bp	350-450 bp	450-550 bp	550-650 bp
第一轮体积比 (Beads: DNA)	0.80 \times	0.70 \times	0.60 \times	0.55 \times
第二轮体积比 (Beads: DNA)	0.20 \times	0.20 \times	0.20 \times	0.15 \times

【注】：表中“ \times ”表示样品 DNA 体积。如文库插入片段长度为 250 bp，样品 DNA 体积为 100 μL ，则第一轮分选磁珠使用体积为 $0.70 \times 100 \mu\text{L} = 70 \mu\text{L}$ ；第二轮分选磁珠使用体积为 $0.20 \times 100 \mu\text{L} = 20 \mu\text{L}$ ；表中所推荐比例是针对 Adapter Ligated Insert DNA (Post Ligation)，如果用户在接头连接前进行分选，请采用 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (Cat#12601)说明书中推荐的比例。

4. 室温孵育 5 min。
5. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移上清到干净的离心管中。
6. 参考表 9 向上清中加入第二轮分选磁珠。
7. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
8. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
9. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
10. 重复步骤 9。
11. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）。
12. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入适量 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
13. 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），小心转移 20 μL 上清至干净的管中。

3.4 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。

1. 将表 10 中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 10 所示反应体系。

表 10 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)	20
Canace [®] Pro Amplification Mix	25
Primer mix**	5*
总计	50

【注】：*Primer Mix 针对不同测序平台，选用与平台对应的 Adapter 和 Primer Mix。

**如果使用的是 Illumina 完整长接头，请使用 DNA Library Prep Primer Mix for Illumina (Cat#12190) 试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用的是 MGI 单端长接头，请使用 DNA Library Prep Primer Mix for MGI (Cat#12191) 试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用了两个平台不完整的接头，请参照各自接头试剂盒说明书，使用其中配备的 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 11 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 11 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98 °C	45 sec	1
98 °C	15 sec	参照注意事项中表 4
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	1 min	1
4 °C	Hold	-

3.5 扩增产物磁珠纯化或分选 (Post Amplification Clean Up/Size Selection)

同接头连接纯化操作步骤。使用 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (1×, Beads: DNA=1: 1) 纯化文库扩增产物。

3.6 文库质量控制 (Library Quality Analysis)

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。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐