

**Hieff NGS<sup>®</sup> Methyl-seq ssDNA Library Prep  
Kit for MGI<sup>®</sup>**  
**单链 DNA 甲基化建库试剂盒**

12226ES

---

产品使用说明书

Ver. CN20240902

# 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 ..... | 5 |

## 产品简介

Hieff NGS<sup>®</sup> Methyl-seq ssDNA Library Prep Kit for MGI<sup>®</sup> 是针对 MGI<sup>®</sup> 测序平台专业开发设计的新一代单链 DNA 甲基化建库试剂盒, 该试剂盒改善了接头连接效率, 并采用了更加新型的高保真酶, 显著提高扩增均一性和保真性。适用于各种常规样本和经 Bisulfite 处理的样本类型, 包括 gDNA、FFPE DNA、cell free DNA (cfDNA)、ChIP DNA 等, 可以满足 10 pg~250 ng DNA 样本建库。该试剂盒可兼容短至 40 bp 的 DNA 样本, 满足常规微量且短片段样本的建库。相较于传统的双链 DNA 甲基化建库, 我们提供了一种基于 DNA 单链的甲基化建库方法, 经过 DNA 变性、3' Adapter 连接、互补链延伸、5' Adapter 连接及文库扩增, 将 DNA 片段最终转化为适用于 MGI<sup>®</sup> 平台测序的文库。本产品不仅更加经济, 同时也提供了简便快速的建库流程, 一般在 2 小时左右可以完成正常建库。

本试剂盒包含 3' 接头连接试剂, 互补链合成试剂, 5' 接头连接试剂以及后续文库扩增所需的高保真酶试剂。试剂盒提供的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和重复性。

## 产品信息

|    |                                   |
|----|-----------------------------------|
| 货号 | 12226ES08 / 12226ES24 / 12226ES96 |
| 规格 | 8 T / 24 T / 96 T                 |

## 组分信息

| 组分编号    | 组分名称                          | 12226ES08 | 12226ES24 | 12226ES96 |
|---------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 12226-A | ● Ligation Buffer A 2.0       | 32 μL     | 96 μL     | 384 μL    |
| 12226-B | ● T7 Adapter 2.0              | 8 μL      | 24 μL     | 96 μL     |
| 12226-C | ● Enzyme Mix 2.0              | 32 μL     | 96 μL     | 384 μL    |
| 12226-D | ● Extension Mix 2.0           | 344 μL    | 1032 μL   | 3×1376 μL |
| 12226-E | ● Extension Reagent 2.0       | 24 μL     | 72 μL     | 288 μL    |
| 12226-F | ● Ligation Buffer B 2.0       | 160 μL    | 480 μL    | 2×960 μL  |
| 12226-G | ● T5 Adapter 2.0              | 24 μL     | 72 μL     | 288 μL    |
| 12226-H | ● T4 DNA ligase 2.0           | 40 μL     | 120 μL    | 480 μL    |
| 12226-I | ○ 2 × HiFi Uracil PCR Mix 2.0 | 200 μL    | 600 μL    | 2×1200 μL |

## 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 样本及片段化

1. 试剂盒兼容的 DNA 投入量为 10 pg - 250 ng。Input DNA 的准确定量对于后续选择文库扩增的循环数十分重要。推荐使用 ssDNA Assay Kit for Qubit<sup>®</sup> (Yeasten, Cat#A12645) 对 ssDNA 进行定量；使用 dsDNA HS Assay Kit for Qubit<sup>®</sup> (Yeasten, Cat#12640) 或 1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit<sup>®</sup> (Yeasten, Cat#A12642)对 dsDNA 进行定量。
2. 若样本为碎片化严重的 DNA，如 ChIP DNA、cfDNA 或降解严重的 FFPE DNA 等，则无需进行样本片段化。若样本为完整性良好的 DNA，则推荐进行样本片段化。片段化方式可选择超声法或酶切法。
3. 经 Bisulfite 转化的 DNA，确保洗脱液中不带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，否则可能会影响 3' Adapter 连接效率。如条件不满足，可先将产物纯化后溶于 0.1 × TE (pH 8.0)中，再进行文库构建。

## 三、关于磁珠纯化

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<sup>®</sup> DNA Selection Beads (Yeasten Cat#12601) 或 AMPure<sup>®</sup> 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（提前从冰箱拿出，室温静置约 30 min），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. 请勿将磁珠置于 0°C 以下存放。
5. 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。
6. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
7. 磁珠使用过程中，应保证移液准确性。
8. 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。
9. 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。

## 四、关于 lambda DNA（未甲基化）的样本文库构建

使用含有未甲基化的λDNA 进行文库构建时，需要在样本片段化前混入样品中以评估亚硫酸氢盐的转化效率。如果样本不需要进行片段化(例如 cfDNA)，未甲基化的λDNA 需要片段化为与样本中的片段长度相近的长度。我们建议未甲基化λDNA 掺入水平为 0.1-0.5% w/w。

## 五、应用范围

本试剂盒适用于各种常规样本和经 Bisulfite 处理的样本类型，包括 gDNA、FFPE DNA、cell free DNA (cfDNA)、ChIP DNA 等，可以满足起始量 10 pg~250 ng 及短至 40 bp 的 DNA 样本建库。

## 六、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 1 列举了使用本试剂盒进行文库扩增，不同起始量的 DNA 对应的 PCR 循环数（产量不低于 1 μg）。常规样本的扩增循环数可以对应下表中减少 1-2 个循环数。

表 1 不同起始量 DNA 对应的 PCR 循环数推荐

| 模板       | 起始量    | PCR 循环数 (PCR cycle) |
|----------|--------|---------------------|
| gDNA     | 250 ng | 5-7                 |
|          | 100 ng | 7-8                 |
|          | 50 ng  | 8-10                |
|          | 10 ng  | 10-12               |
|          | 1 ng   | 15-17               |
|          | 100 pg | 18-20               |
|          | 10 pg  | 21-23               |
| cfDNA    | 5 ng   | 12-14               |
| FFPE DNA | 250 ng | 9-12                |

## 七、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 的不可测序文库的干扰。
- 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。

## 八、关于文库结构

Index 2 (i5)

/5Phos/CTCTCAGTACGTCAGCAGTT[Barcode2]CAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTT-NNNNNN-Pol  
yC-AAGTCGAGGGGTTCCGCCAGAATCCTTCTGTT[Barcode1]GACTATTCCAGCGGTACG

[Barcode 2]表示 10 bp 的 Barcode 2 序列，[Barcode 1]表示 10 bp 的 Barcode 1 序列。-NNNNNN-: 插入序列;PolyC 是一串 3-10 bp 的 dCTP 序列

## 使用说明

### 一、自备材料

- DNA 定量：ssDNA Assay Kit for Qubit® (Yeasen, Cat#A12645)或其他等效产品。  
dsDNA HS Assay Kit for Qubit® (Yeasen, Cat#12640), 1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit® (Yeasen, Cat#A12642)或其他等效产品。
- DNA 纯化磁珠：推荐使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads, Cat#12601 或 AMPure XP Beads, Cat#A63880 或其他等效产品。
- DNA 质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。

4. DNA Index Kit: 推荐使用 Yeasen 高质量 PCR Index Kit, 双端 Index Primers: Hieff NGS<sup>®</sup> Stubby Unique Dual Index Primer Kit for MGI<sup>®</sup> (Cat#12231), 该 index primer 是专门搭配 Hieff NGS<sup>®</sup> Methyl-seq ssDNA Library Prep Kit for MGI<sup>®</sup> (Cat#12226)使用。

5. 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

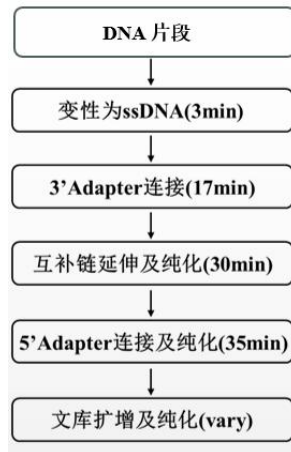


图1 Hieff NGS<sup>®</sup> Methyl-seq ssDNA library Prep kit for MGI<sup>®</sup> 操作流程

## 三、操作步骤

### 3.1 DNA 预处理

此步骤将样本中的 DNA 全部变性为单链 DNA。

1. 预热 PCR 仪: 热盖设置为 105°C, 反应温度设置为 95°C。
2. 将片段化 DNA (10 pg~250 ng)加入到 0.2 mL PCR 管中, 再加入 ddH<sub>2</sub>O 稀释到总体积为 31 μL。
3. 将 PCR 管放入 PCR 仪中, 进行 95°C 孵育 3 min 后, 立即将 PCR 管置于冰上进行瞬间冷却, 静置 2 min。

【注】: DNA 变性后立即置于冰上, 避免变性的单链 DNA 复性。

### 3.2 3' 接头连接 (3' Adapter Ligation)

此步骤在 ssDNA 的 3' 末端连上截短型接头。

1. 将表 2 中试剂解冻后颠倒混匀后瞬离, 置于冰上备用。
2. 在 PCR 管中配制如下 3' Adapter Ligation 的预混液(确保在冰上进行)。

表 2 3' Adapter Ligation 预混液体系

| 名称                    | 体积 (μL) |
|-----------------------|---------|
| Ligation Buffer A 2.0 | 4       |
| T7 Adapter 2.0        | 1       |
| Enzyme Mix 2.0        | 4       |
| Total                 | 9       |

【注】: 此预混液需在 DNA 预处理前于冰上完成配置, 使变性后的 DNA 可立即进行 3' Adapter 连接, 防止预处理的 DNA 出现复性, 影响模板利用率。

3. 将 9  $\mu\text{L}$  的 3' Adapter Ligation 预混液加入变性好的 DNA 样本中，用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使反应液至管底。

4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 3 所示的反应程序，进行 3' Adapter 连接反应。

表 3 3' Adapter 连接反应程序

| 温度        | 时间     |
|-----------|--------|
| 热盖 105 °C | On     |
| 37°C      | 15 min |
| 95°C      | 2 min  |
| 4°C       | Hold   |

4. 待反应结束，将 PCR 管置于冰上，进行互补链延伸反应。

### 3.3 互补链延伸 (Extension)

此步骤将 3' 末端连接了截短型接头的单链 DNA 通过延伸引物合成完整的双链 DNA。

1. 将表 4 中试剂解冻后颠倒混匀后瞬离，置于冰上备用。

2. 于上步 PCR 反应管中依次加入如下组分(确保在冰上操作)，使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表 4 互补链延伸体系

| 名称                    | 体积 ( $\mu\text{L}$ ) |
|-----------------------|----------------------|
| 上述连接产物 (3.2 步骤产物)     | 40                   |
| Extension Mix 2.0     | 43                   |
| Extension Reagent 2.0 | 3                    |
| Total                 | 86                   |

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 5 所示的反应程序，进行互补链延伸反应。

表 5 互补链延伸反应程序

| 温度       | 时间    |
|----------|-------|
| 热盖 105°C | On    |
| 98°C     | 1 min |
| 60°C     | 2 min |
| 68°C     | 5 min |
| 4°C      | Hold  |

### 3.4 产物纯化:

1. 准备工作: 将 Hieff NGS<sup>®</sup> 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 103  $\mu\text{L}$  Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (1.2 $\times$ ，Beads : DNA=1.2:1)至上述延伸产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。

【注】：如需要对短至 40 bp 的 DNA 样本建库，纯化比例参考文末附录中的表 10。

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  $\mu\text{L}$  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（约 3-5 min）。

【注】：1. 移除上清后，如仍有少量残留，可以将 PCR 管短暂离心后置于磁力架中静置，再使用 10  $\mu$ L 移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 24  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。

9. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 22  $\mu$ L 上清至干净的 PCR 管中。

【注】：1.若起始 gDNA 样本投入量低于 10 ng，建议进行 2 轮纯化，在第一轮纯化后用 52  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 洗脱，取 50  $\mu$ L 上清，然后再加入 1.2 $\times$ beads (60  $\mu$ L)进行再次纯化，24  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 洗脱，取 22  $\mu$ L 用于后续反应；

2.此处样本可以在-20 $^{\circ}$ C 暂存 24 h。

10. 进行步骤 3.5，5' 接头连接。

### 3.5 5' 接头连接 (5' Adapter Ligation) :

此步骤在延伸好的双链 DNA 的原始模板链 5' 端连接上截短型接头。

1. 将表 6 中试剂解冻后颠倒混匀后瞬离，置于冰上备用。

2. 于纯化产物中依次加入如下组分(确保在冰上操作)，使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表 6 5' 接头连接反应体系

| 名称                    | 体积 ( $\mu$ L) |
|-----------------------|---------------|
| 上述纯化产物                | 22            |
| Ligation Buffer B 2.0 | 20            |
| T5 Adapter 2.0        | 3             |
| T4 DNA ligase 2.0     | 5             |
| Total                 | 50            |

【注】：1.可以提前配置 Ligation Buffer B 2.0 和 T5 Adapter 2.0 的预混液，切不可将 T4 DNA ligase 2.0 直接加入到预混液中，以免发生接头自连现象。 2. Ligation Buffer B 2.0 比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 7 所示的反应程序，进行 5' 接头连接反应。

表 7 5' 接头连接反应程序

| 温度              | 时间     |
|-----------------|--------|
| 热盖              | Off    |
| 20 $^{\circ}$ C | 15 min |
| 4 $^{\circ}$ C  | Hold   |

### 3.6 产物纯化:

1. 准备工作：将 Hieff NGS<sup>®</sup> 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 30  $\mu$ L Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (0.6 $\times$ ，Beads :DNA=0.6:1)至上述延伸产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，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  $\mu$ L 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（约 3-5 min）。

【注】：1. 移除上清后，如仍有少量残留，可以将 PCR 管短暂离心后置于磁力架中静置，再使用 10  $\mu$ L 移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。

9. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 20  $\mu$ L 上清至干净的 PCR 管中。

【注】：此处样本可以在-20 $^{\circ}$ C 暂存 24 h。

10. 进行步骤 3.7，文库扩增。

### 3.7 文库扩增 (Library Amplification)

此步骤通过引物扩增，获得大量完整文库。

1. 将表 8 中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

2. 于纯化产物中依次加入如下组分，使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

表 8 文库扩增反应体系

| 名称                                 | 体积 ( $\mu$ L) |
|------------------------------------|---------------|
| 纯化后的连接产物                           | 20            |
| 2 $\times$ HiFi Uracil PCR Mix 2.0 | 25            |
| UDI Primer Mix*                    | 5             |
| Total                              | 50            |

【注】：\*请使用随试剂盒提供的 UDI Primer 进行扩增。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 9 所示反应程序，进行文库扩增反应。

表 9 文库扩增反应程序

| 温度                  | 时间     | 循环数                |
|---------------------|--------|--------------------|
| 热盖 105 $^{\circ}$ C | On     | —                  |
| 98 $^{\circ}$ C     | 1 min  | 1                  |
| 98 $^{\circ}$ C     | 10 sec | Cycle 数参考注意事项中的表 1 |
| 60 $^{\circ}$ C     | 30 sec |                    |
| 72 $^{\circ}$ C     | 30 sec |                    |
| 72 $^{\circ}$ C     | 5 min  | 1                  |
| 4 $^{\circ}$ C      | Hold   | —                  |

【注】：由于不同样本的投入量及质量不一样，实验中需根据建库起始的投入量，样本处理情况等适当调整扩增循环数。

### 3.8 扩增产物磁珠纯化(Post Amplification Clean Up)

1. 准备工作：将 Hieff NGS<sup>®</sup> 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 42.5  $\mu$ L Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (0.85 $\times$ ，Beads:DNA=0.85:1)至上述延伸产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，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  $\mu$ L 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（约 3-5 min）。

【注】：1. 移除上清后，如仍有少量残留，可以将 PCR 管短暂离心后置于磁力架中静置，再使用 10  $\mu\text{L}$  移液器将残留液体吸干净，缩短干燥时间。

2. 避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。

9. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 20  $\mu\text{L}$  上清至干净的 PCR 管中。

【注】：此处样品可置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。长期保存则置于-80 $^{\circ}\text{C}$ ，同时应避免不必要的反复冻融。

### 3.9 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七。

## 附录

### 1. 原始测序数据预处理

- a. 由于 3' Adapter Ligation 步骤额外添加了低复杂度的 Poly(C)结构，且甲基化文库存在碱基不平衡，为了提高测序的质量，建议在测序时加入不少于 25%的 PhiX 文库或和其他复杂度较高的文库同时 Pooling 上机。
- b. 由于文库 3' 端含有 polyC 结构（见注意事项中的文库序列），Reads2 序列的起始会含有 PolyG 序列，因此在序列比对前需要进行 reads trim，若 reads1 测通后，其序列的 3' 端也会存在 PolyC，同样需要进行 reads trim。

### 2. 短片段模板纯化方案

如需要对短至 40 bp 的 DNA 样本建库，则需在不同纯化步骤，采用表 10 中推荐的磁珠使用量进行纯化。

表 10 短片段各步骤纯化比例推荐

| 步骤               | 样品体积       | 磁珠体积            | 洗脱体积       |
|------------------|------------|-----------------|------------|
| Extension 后纯化    | 86 $\mu$ L | (1.8 $\times$ ) | 34 $\mu$ L |
| 5' Adapter 连接后纯化 | 50 $\mu$ L | (0.8 $\times$ ) | 22 $\mu$ L |
| 文库扩增后纯化          | 50 $\mu$ L | (1.8 $\times$ ) | 22 $\mu$ L |

### 3. 常见问题

DNA 文库产量偏低，出现接头二聚体，大片段等问题，可以考虑从如下方面进行优化：

- 1) 文库产量偏低，应考虑样本溶液中含有酶抑制剂组分，建议再次纯化；
- 2) 文库出现接头二聚体，推荐在互补链延伸之后进行 2 轮纯化，在第一轮纯化后用 50  $\mu$ L 洗脱，然后加入 1.2 $\times$  beads (60  $\mu$ L)进行再次纯化；
- 3) 对于文库大片段的出现，考虑是过度扩增引起，可以适当减少扩增循环数。



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐