SynplSeq DNA Library Prep EF Kit for illumina

产品描述

SynplSeq DNA Library Prep EF Kit for illumina 是适配 illumina 高通量测序平台的基因组 DNA（gDNA）建库试剂盒，包含酶切片段化到PCR扩增在内的建库试剂组分，可兼容 1~500 ng 起始量的高质量 gDNA 样本，构建好的文库可供下游靶向富集，或在 illumina 高通量平台进行测序；本手册详细介绍了文库构建各环节的步骤，如需靶向富集流程请参阅其他操作手册。

产品组分

货号	组份	保存条件
XS-L-024	Frag/AT Enzymes Frag/AT Buffer Ligation Master Mix Library Amp Mix (2×) P5/P7 Primers (10×)	-20℃

自备材料

磁珠纯化试剂盒：SynplSeq DNA Clean Beads（Cat # XS-L-020）

接头和引物：推荐Twist Universal Adapter System，货号参阅附录；

数字电泳分析系统：

Bioptic Qsep1全自动核酸蛋白分析系统；

Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system (Cat # G2939AA)；

或其他同类型产品；

PCR基因扩增仪：Applied Biosystems VeritiPro PCR仪（0.2mL,96孔）或其他同类型产品；

移液器：梅特勒-特勒多单道移液器L-2XLS+，L-20XLS+，L-200XLS+，L-1000XLS+或其他同类型产品；

磁力架：启研生物PCR管磁力架（Cat # QYM07B）或其他同类型磁力架；

微型离心机：不限

Vortex振荡器：不限

定量系统：Thermo Fisher Qubit™ 4 荧光计（Cat # Q33238）

其他材料：无水乙醇（分析纯）、ddH2O、洗脱液(10 mM Tris-HCl,pH 8.0)、0.2mL PCR管。

标准操作流程

1. gDNA 样本说明

gDNA 应保存在无核酸酶水、10 mM Tris-HCl（pH 8.0）或 EB 缓冲液中，以避免过多螯合剂影响酶切效果；建库纯化洗脱试剂可选用其中一种；

推荐采用 Qubit BR/HS 试剂盒精确定量，不建议使用 260 nm 波长吸光度测定；准确的起始量是获得最佳产量和文库片段长度的关键；

2. 片段化、末端修复、加 A 尾反应

2.1 按照下表在冰盒上配制 50μL 反应体系；

成分	每个反应体积/μL
gDNA 样本*	40
Frag/AT Enzymes	6
Frag/AT Buffer	4

*gDNA样本用无核酸酶水稀释至所需浓度（目标投入质量m ng / 40μL体积）；

*试剂可按下述流程配制预混液；

*请提前设置好PCR仪程序，参考2.7；

2.2 从稀释后 gDNA 样本中取 40 μL 到 PCR 管或板中，并置于冰上；

2.3 Frag/AT Buffer 涡旋混匀5 s，Frag/AT Enzymes 颠倒混匀5次，以混合均匀，瞬时离心后使用；

2.4 在冰上配制试剂预混液，用移液器轻轻吹打，混匀试剂；

2.5 取 10 μL 试剂预混液到40 μL 样本中，用移液器轻轻吹打确保混匀，封口，瞬时离心，检查液面齐平；

注意：充分混匀是获得所需片段长度的关键！

2.6 放入预冷的 PCR 仪，开始 PCR 温育反应的第 2~4 步。

2.7 根据所需片段大小设定 PCR 程序，热盖温度：105℃；

温度	时间
4°C	∞
37°C	按下表选择片段化时间*
65°C	30 min
4°C	∞

37°C时间	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
插入片段大小	330 bp	250 bp	220 bp	200 bp	180 bp	160 bp

*对于 50 ng 高质量 gDNA 而言，建议初始设置为 20 min。该推荐是对于高质量 gDNA 而言的初始设置，仍需针对不同样本类型/应用进行优化。关于获得> 250 bp 插入片段的建议请参见附录。

2.8 程序结束且模块降温至 4°C时，取出样本并置于冰上，立即进行接头连接反应；

注意：反应期间请提前准备接头连接步骤的试剂和纯化磁珠；

3. 接头连接反应

3.1 按下表在冰盒上配制 75 μL 连接试剂体系；

成分	每个反应体积/uL
上步反应产物	50
Universal Adapter	5*
Ligation Master Mix	20

*Adaper用量：参考下表，不足 5 μL 时用无核酸酶水补足；

起始质量	**Universal Adapter 用量/μL**
>10 ng	5
10 ng	2
1 ng	1

3.2取出表中试剂置于冰上融化，Adapter 涡旋混匀，Ligation Master Mix颠倒混匀 5 次，**禁止涡旋混匀；**

3.3 向上步反应液中加入 1~5* μL Universal Adapter，,不足5μL时用无核酸酶水补足，移液器吹打混匀；

3.4 向上步反应液中加入 20 μL Ligation Master Mix，移液器吹打混匀，封口，瞬时离心，检查液面齐平；

3.5 按下表进行温育反应，热盖温度：关闭或最低温度；

温度	时间
20℃	15 min

4. 连接后纯化

4.1 在接头连接反应后产物中加入 0.8× DNA Clean Beads（60 μL）进行纯化；

注意：磁珠在使用前请置于室温平衡 30 min，充分振荡混匀后取用；

4.2 涡旋振荡 10 s 或移液器吹打 15 次进行充分混匀；

4.3 室温下静置 5 min，使 DNA 与磁珠结合；

4.4 放置在磁力架上以捕获磁珠，直至液体澄清，小心吸出上清并丢弃；

4.5 保持管/板在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，室温静置 60 s 后小心吸出上清并丢弃；

4.6 重复 4.5 步骤一次；

4.7 使用小量程 10 μL/20 μL 移液器彻底去除残留的乙醇，室温下将磁珠干燥 2 min 或

直至所有乙醇挥发；

注意：磁珠过度干燥可能会导致产量降低；

4.8 从磁力架上取下管/板，加入 17 μL 洗脱液，吹打混匀 10 次或涡旋振荡 10 s 进行洗脱；

4.9 室温孵育 2 min ;

4.10 磁力架上静置直至液体澄清，转移 15 μL 上清至新的 PCR 管/板中，继续进行文库扩增反应；

5. 扩增反应

5.1 按下表在冰盒上配制 50 μL 连接试剂体系；

成分	每个反应体积/μL
连接后纯化产物	15
UDI Primer*	10*
Library Amp Mix (2x)	25

*UDI Primer 的各列是碱基平衡的，当进行8杂1时推荐按列使用，排布序号请参考附录；

***注意：不要使用本试剂盒内的 P5/P7 Primers (10×)，在通用接头系统中使用会导致建库失败！**

5.2 取出表中试剂置于冰上融化，UDI Primer 涡旋混匀，Library Amp Mix (2x) 颠倒混匀 5 次，**禁止涡旋混匀**；

5.3 向纯化产物中加入 10 μL UDI Primer，移液器吹打混匀；

5.4 向纯化产物中加入 25 μL Library Amp Mix (2x)，移液器吹打混匀；

5.5 按下表进行温育反应，热盖温度：105℃；

温度	时间	循环数
98°C	45 s	1
98°C 60°C 72°C	15 s 30 s 30 s	6-8*
72°C	60 s	1
4°C	∞	-

* 50 ng 高质量 gDNA 建议进行 6~8 次循环。其他起始量参考下表：

起始质量	PCR 循环数建议*
500 ng	3
100 ng	4-6
50 ng	6-8
25 ng	7-9
10 ng	8-10
1 ng	11-12

*该建议是对于高质量 gDNA 而言的初始设置，仍需针对不同样本类型/应用进行调整。

6. PCR 后纯化

6.1 在 PCR 产物中加入 1× DNA Clean Beads（50 μL）进行纯化；

注意：磁珠在使用前请置于室温平衡 30 min，充分振荡混匀后取用；

6.2 涡旋振荡 10 s 或移液器吹打 15 次进行充分混匀；

6.3 室温下静置 5 min，使 DNA 与磁珠结合；

6.4 放置在磁力架上以捕获磁珠，直至液体澄清，小心吸出上清并丢弃；

6.5 保持管/板在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，室温静置 60 s 后小心吸出上清并丢弃；

6.6 重复 6.5 步骤一次；

6.7 使用小量程 10 μL/20 μL 移液器彻底去除残留的乙醇，室温下将磁珠干燥 2 min 或直至所有乙醇挥发；

注意：磁珠过度干燥可能会导致产量降低；

6.8 从磁力架上取下管/板，加入 22 μL 洗脱液，吹打混匀 10 次或涡旋振荡 10 s 进行洗脱；

6.9 室温孵育 2 min；

6.10 磁力架上静置直至液体澄清，转移 20 μL 上清至新的 PCR 管/板中；

7. 文库 QC

7.1 使用 Qubit HS 试剂检测文库的质量浓度，使用 Agilent 2100 或 Qsep 等毛细管电泳仪检测文库的片段分布；

7.2 以 50 ng 高质量 gDNA 在 37°C 下进行 20 min 片段化，然后进行 6 次 PCR 循环为基准，所获得产物的最终浓度预期＞50 ng/μL；文库的片段分布范围为 150-1000 bp，平均片段分布位于 350-425 bp。

注1：浓度低于 50 ng/μl 可能反映出样本制备效率低，并且可能导致杂交后的文库多样性低；

注2：如果平均片段长度不在所需范围内，需考虑：

- **起始 DNA 浓度可能不准确。**
- **样本中存在阳离子和螯合剂也可能会影响平均片段长度。**

如果上述两个因素均不适用，则可以 5 min为梯度来变更时间，从而优化酶切步骤中的片段化时间（增加时间以生成更短的片段，减少时间以生成更长的片段）。

附录1：大片段的温度选择设置

将片段化温度37℃调整到30℃，并按下表时间进行片段化反应：

温度	时间
4℃	∞
30℃	按下表选择片段化时间*
65℃	30min
4℃	∞

*建议的片段化时间/大小只是对于 50 ng 高质量 gDNA 而言的初始设置，应针对各个样本类型/应用进行调整；

30℃时间*	**5 min**	**10 min**	**15 min**
插入片段大小	475 bp	300 bp	250 bp

附录2： UDI primer 排布信息

16 Samples Kit (Cat # 101307)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9										
B	2	10										
C	3	11										
D	4	12										
E	5	13										
F	6	14										
G	7	15										
H	8	16										

96 Samples Kit A (Cat # 101308)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

96 Samples Kit B (Cat # 101309)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

96 Samples Kit C (Cat # 101310)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	193	201	209	217	225	233	241	249	257	265	273	281
B	194	202	210	218	226	234	242	250	258	266	274	282
C	195	203	211	219	227	235	243	251	259	267	275	283
D	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284
E	197	205	213	221	229	237	245	253	261	269	277	285
F	198	206	214	222	230	238	246	254	262	270	278	286
G	199	207	215	223	231	239	247	255	263	271	279	287
H	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288

96 Samples Kit D (Cat # 101311)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	289	297	305	313	321	329	337	345	353	361	369	377
B	290	298	306	314	322	330	338	346	354	362	370	378
C	291	299	307	315	323	331	339	347	355	363	371	379
D	292	300	308	316	324	332	340	348	356	364	372	380
E	293	301	309	317	325	333	341	349	357	365	373	381
F	294	302	310	318	326	334	342	350	358	366	374	382
G	295	303	311	319	327	335	343	351	359	367	375	383
H	296	304	312	320	328	336	344	352	360	368	376	384

*序列信息请参阅 Protocol_NGS_ReferenceDoc_UDISequences_Spreadsheet_23MAR21_Rev2.0