

SynplSeq DNA Library Prep Kit v1 plus for Illumina

产品概述

SynplSeq DNA Library Prep Kit v1 plus for illumina 是针对 illumina 高通量测序平台定向开发的 DNA 文库构建试剂盒。试剂盒可以从经过提取或纯化的基因组 DNA、片段化的 DNA、聚合酶扩增产物 DNA 等多种双链 DNA 起始，经过 DNA 片段化（可选），DNA 末端平齐化修复，DNA 加 A 尾与连接等程序处理，让 DNA 加上 illumina 测序接头并适用于 PCR 扩增，快速高效的获得适合 illumina 测序平台使用的 NGS 文库。试剂盒适用投入量范围在 0.1ng~600ng, 可用于全基因组测序、靶向捕获测序、转录组 cDNA 测序等研究项目的高效文库制备。

产品组分

组分	24rxn	96rxn
Fragmentase	200μL	750μL
End Prep Mix	200μL	750μL
End Prep Buffer 1	100μL	400μL
Enhancer	50μL	188μL
DNA Ligase	40μL	150μL
3xLigation Buffer 1	1.05mL	4 × 1.05mL
PCR Mix	780μL	4 × 780μL

自备材料

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

接头与扩增引物： 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。

实验流程概述

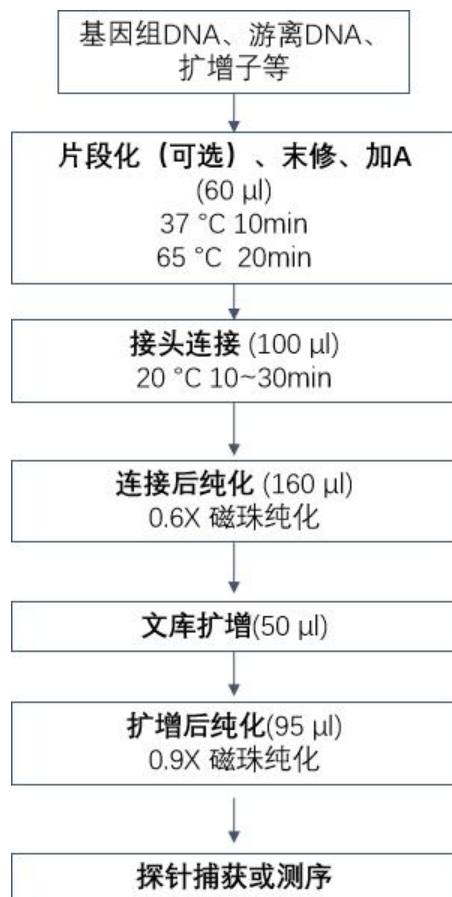


图 1. 实验流程概述

标准实验方案

1. 片段化、末端修复、加 A 尾反应

1.1 一般基因组/单细胞全长 cDNA 扩增产物按照下表在冰盒上配制 60μL 的反应体系

成份	体积/μL
DNA	X
Fragmentase*	2~4.5 (参考表 1)
End Prep Mix	6
End Prep Buffer 1	3
ddH2O	to 60

*表 1 不同文库插入片段大小的酶用量

预期插入片段大小	Fragmentase 用量
150bp	4μL
200bp	3μL
350bp	2.5μL

*在投入范围 0.1ng~600ng 内，相同酶量处理的文库片段分布基本一致，差异不显著。投入的 DNA 纯度及完整度会影响 DNA 的片段化后的分子量分布，实际使用建议在推荐的体积基础上加減 0.2~0.4μL Fragmentase 用量进行最适片段化条件摸索。

1.1 机械打断后的 DNA 按照下表在冰盒上配制 60μL 的反应体系

成份	体积/μL
DNA	X
Enhancer	1.5
End Prep Mix	6
End Prep Buffer 1	3
ddH2O	to 60

1.1 游离 DNA 按照下表在冰盒上配制 60μL 的反应体系

成份	体积/μL
DNA	X
End Prep Mix	6
End Prep Buffer 1	3
ddH2O	to 60

1.2 吹打混匀 6 次或者轻轻涡旋混匀 5s 并短暂离心，将 PCR 管放入 PCR 仪进行孵育；

1.3 反应程序：37℃,10min； 65℃,20min； 4℃, ∞；（热盖设置 105℃）

1.4 立即继续进行接头连接（步骤 2）。

2. 接头连接反应

2.1 根据建库起始量的不同，加入不同的接头使用量，接头使用量请参考表 2；

表 2. 0.1ng~600ng 起始 DNA 进行文库构建的推荐接头用量

起始 DNA 量	推荐接头使用量/ μ L
400g~600ng	5.8
10ng~400ng	5
1ng~10ng	1.5
0.1ng~1ng	0.5

2.2 按照下表在冰盒上配制 100 μ L 的反应体系

成份	体积/ μ L
上步反应产物	60
DNA Ligase	1.2
3xLigation Buffer 1	33
Universal Adapter	X（参考表 2）
ddH2O	5.8-X

2.3 移液器吹打 15 次或涡旋振荡 10s 充分混匀并短暂离心；

2.4 PCR 仪中反应 20 $^{\circ}$ C,10~30min; 4 $^{\circ}$ C, ∞ ；（热盖关闭）

3 . 连接后纯化

3.1 在接头连接反应后产物中加入 0.6 $\times$ DNA Clean Beads（60 μ L）进行纯化；注意：磁珠在使用前请置于室温平衡 30min，充分振荡混匀后取用；

3.2 涡旋振荡 10s 或移液器吹打 15 次进行充分混匀；

3.3 室温下静置 5min，使 DNA 与磁珠结合；

- 3.4 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；
- 3.5 保持管/板在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，室温静置 30s 后小心吸出上清并丢弃；
- 3.6 重复 3.5 步骤一次；
- 3.7 使用小量程 10 μ L/20 μ L 移液器彻底去除残留的乙醇，室温下将磁珠干燥 2min，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；
- 3.8 从磁力架上取下管/板，加入 17 μ L 洗脱液（10 mM Tris-HCl,pH 8.0），吹打混匀 10 次或涡旋振荡 10s 进行洗脱；
- 3.9 室温孵育 2min 从磁珠上洗脱 DNA；
- 3.10 磁力架上静置直至液体澄清，转移 15 μ L 上清至新的 PCR 管/板中，继续进行文库扩增；

注意：如果连接后或扩增后的分析显示，在第一次纯化后存在接头二聚体残留，则可以进行第二次纯化（使用 1 $\times$ DNA Clean Beads 纯化），能有效去除接头二聚体的残留。在起始投入 DNA 量低于 1ng 建库时，我们推荐接头连接后使用 2 次纯化流程，可以有效去除接头二聚体残留。

4 . 扩增反应

- 4.1 按照下表配制 50 μ L 的反应体系

成份	体积/ μ L
接头连接文库	15
UDI Primer*	10
PCR Mix	25

*确保每个样本使用 UDI Primer 不尽相同，UDI Primer 的各列是碱基平衡的，当进行 8 混 1 时推荐按列使用，UDI 排布序号请参考附录。

4.2 涡旋振荡 5s 或移液器吹打 5 次混匀并短暂离心；

4.3 使用以下扩增程序进行扩增，热盖温度：105℃；

温度	时间	循环数
98℃	45s	1
98℃	15s	最佳扩增循环数 见下表**
60℃	30s	
72℃	30s	
72℃	1min	1
4℃	∞	1

**循环数与模板投入量有关，具体建议可参考如下表建议：

建库起始量	循环数	参考产量
0.1ng	15~17	1μg
1ng	11~13	
10ng	7~9	
50ng	5~7	
200ng	4~6	
400ng	3~5	
600ng	2~3	

5. 扩增后纯化

5.1 在扩增产物中加入 0.9×DNA Clean Beads (45μL) 进行纯化；注意：磁珠在使用前请置于室温平衡 30min，充分振荡混匀后取用；

5.2 涡旋振荡 10s 或移液器吹打 15 次进行充分混匀；

5.5 室温下静置 5min，使 DNA 与磁珠结合；

5.4 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；

5.5 保持管/板在磁力架上，加入 200μL 80%乙醇，室温静置 30s 后小心吸出上清并丢弃；

5.6 重复 5.5 步骤一次；

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

5.7 从磁力架上取下单/板，进行洗脱：

5.8 加入 10μL~100μL 的洗脱液***，涡旋振荡 10s 或移液器吹打 15 次彻底重悬磁珠；

5.9 室温孵育 2min 从磁珠上洗脱 DNA；

5.10 磁力架上静置直至液体澄清，转移上清至新的管/板中，并需要进行片段选择、文库 QC、靶向捕获或测序；文库请放置-15℃~-25℃保存。

***洗脱液可用 10 mM Tris-HCl (pH 8.0~8.5) 或根据下游应用使用所推荐的缓冲液。

附录：Twist Universal Adapter System 的 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 -Plate 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-Plate 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-Plate 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-Plate 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

*序列信息请联系供应商获取。