

## SynplSeq Flash DNA Library Prep Kit for Illumina

### 产品概述

SynplSeq Flash DNA Library Prep Kit for illumina 是针对 illumina 高通量测序平台开发的 DNA 文库构建试剂盒。该试剂盒可以从经过提取或纯化的基因组 DNA、长链 cDNA 等双链 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，同时加上测序接头的产物无需进行纯化可以直接扩增，快速高效的获得适合 illumina 测序平台使用的 NGS 文库，总文库制备时间大约 1.5h。试剂盒适用投入量范围在 5ng~150ng，可用于全基因组测序、mNGS 测序等研究项目的文库制备。

### 产品组份

组份	24rxn(XS-L-028)	96rxn(XS-L-029)
Fragmentase	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
End Prep Mix	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
End Prep Buffer 1	25 $\mu$ L	100 $\mu$ L
DNA Ligase	65 $\mu$ L	250 $\mu$ L
3x Ligation Buffer 1	325 $\mu$ L	1250 $\mu$ L
PCR Mix	825 $\mu$ L*2	1250 $\mu$ L*5
PCR Primer	130 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Wash Buffer 1	3.25mL	12.5mL

## 自备材料

**纯化磁珠：** SynplSeq DNA Clean Beads (Cat # XS-L-020) ；

**接头：** SynplSeq CD Adapters (Cat # XS-L-019) 或者 Twist CD Index Adapter Set (Cat # 100577) ；

**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：** 梅特勒托利多单道移液器 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)、ddH<sub>2</sub>O、洗脱液(10 mM Tris-HCl,pH 8.0)、TE Buffer(10 mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH 8.0)、0.1xTE (使用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍的 TE Buffer)、0.2mL PCR 管。

## 实验流程概述

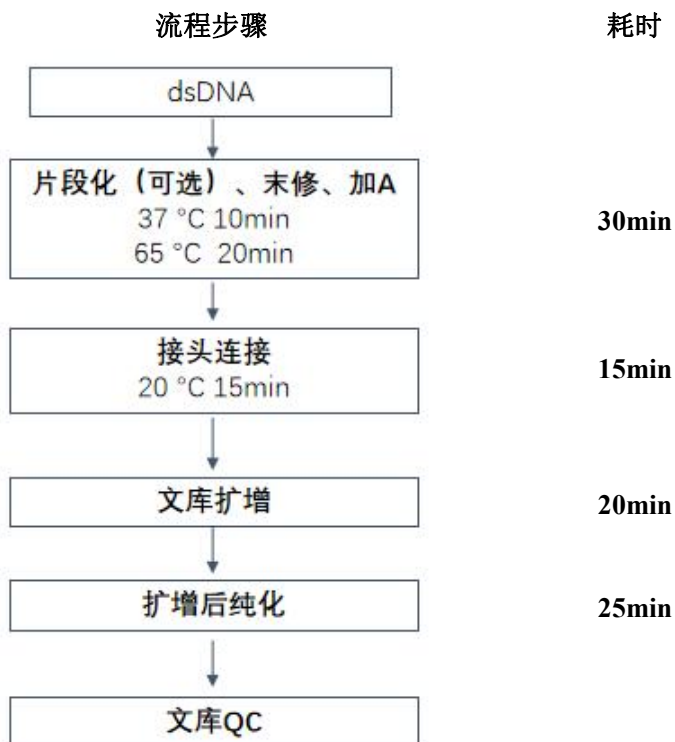


图 1. 实验流程概述

## 实验方案

### 1. 片段化、末端修复、加 A 尾反应

- 1.1 End Prep Buffer 1 室温溶解，振荡混匀离心备用；
- 1.2 Fragmentase, End Prep Mix 瞬时离心，冰上放置备用；
- 1.3 在 PCR 仪上启动反应程序：37°C,∞；37°C,10min；65°C,20min；4°C,∞；（热盖设置 105°C）
- 1.4 按照下表在冰盒上配制 15μL 反应体系：

成份	体积/μL
DNA	X
Fragmentase*	0.75
End Prep Mix	1.5
End Prep Buffer 1	0.75
ddH <sub>2</sub> O	12-X

\*0.75μL Fragmentase 用量对于完整基因组建库的文库片段分布主峰在 350bp 附近，如需降低或提高片段分布，则需要 在 0.75μL 基础上增减 0.25μL 左右摸索合适的 Fragmentase 用量。

- 1.5 吹打混匀 6 次或者轻轻涡旋混匀 5s 并短暂离心，使全部反应液置于 PCR 管底部；待 PCR 仪温度达到 37°C 时，将 PCR 管放入 PCR 仪中并盖上热盖，点击 PCR 仪的下一步进行 37°C,10min；65°C,20min 孵育；
- 1.6 孵育结束后（PCR 仪处于 4°C）时取下反应管冰上放置并立即继续进行接头连接（步骤 2）。

## 2. 接头连接反应

- 2.1 3x Ligation Buffer 1 室温融解，振荡混匀离心后备用；
- 2.2 DNA Ligase 瞬时离心，冰上放置备用；
- 2.3 根据建库起始量的不同，加入不同的 CD 接头使用量，使用 0.1xTE 将 CD 接头稀释至相应的浓度，推荐的稀释浓度可参考下表：

建库起始量/ng	接头浓度	稀释至浓度	加样体积 $\mu\text{L}$
5	10 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	1
25	10 $\mu\text{M}$	7.5 $\mu\text{M}$	1
50~100	10 $\mu\text{M}$	不稀释	1.5
150	10 $\mu\text{M}$	不稀释	2

- 2.4 按照下表在冰盒上配制连接反应：

成份	体积/ $\mu\text{L}$
3x Ligation Buffer 1	10
DNA Ligase	2
CD Adapter	X(参考上表)
ddH2O	3-X

- 2.5 3x Ligation Buffer 1 与 DNA Ligase 可以预先配制成 Ligation Master Mix，配制完成后在上步片段化末修加 A 反应产物中每孔加入 12 $\mu\text{L}$ ；
- 2.6 在上述孔中分别单独加入推荐体积 X 的稀释后接头，然后补充 ddH2O 至总连接体积 15 $\mu\text{L}$ ；
- 2.7 移液器吹打 15 次或涡旋振荡 10s 充分混匀并短暂离心；
- 2.8 在 PCR 仪上启动反应程序 20 $^{\circ}\text{C}$ ,15min; 4 $^{\circ}\text{C}$ , $\infty$ ; （热盖关闭），待温度达到 20 $^{\circ}\text{C}$ 时将 PCR 管放入 PCR 仪进行孵育；

### 3. 扩增反应

3.1 PCR Primer 室温融解，振荡混匀瞬时离心备用；

3.2 PCR Mix 室温溶解，振荡混匀瞬时离心，冰上放置备用；

3.3 按照下表配制 Pre-PCR Mix 反应体系：

成份	体积/ $\mu\text{L}$
PCR Mix	50
PCR Primer	4
ddH <sub>2</sub> O	16

3.4 待连接反应结束，在连接产物中每孔加入 70 $\mu\text{L}$  Pre-PCR Mix，涡旋振荡 5s 或移液器吹打 5 次混匀并短暂离心；

3.5 将 PCR 管置于 PCR 仪中，使用以下扩增程序进行扩增：

温度	时间	循环数
98 $^{\circ}\text{C}$	45s	1
98 $^{\circ}\text{C}$	15s	最佳扩增循环数 见下表**
60 $^{\circ}\text{C}$	30s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30s	
72 $^{\circ}\text{C}$	1min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$	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
5ng	10~11	~1 $\mu\text{g}$
25ng	8~9	
100ng	7~8	
150ng	6~7	

### 4. 扩增后纯化

4.1 扩增产物使用 80 $\mu$ L DNA Clean Beads 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；

4.2 移液器 200 $\mu$ L 吹打 15 次进行充分混匀；

4.3 室温下静置 5min，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；小心吸出全部上清并丢弃，并用使用小量程 10 $\mu$ L/20 $\mu$ L 移液器彻底去除残留的上清；

4.5 保持管在磁力架上，加入 200 $\mu$ L 80%乙醇，200 $\mu$ L 移液器吹打 3~5 次后小心吸出上清并丢弃；

4.6 重复 4.5 步骤一次；

4.6 使用小量程 10 $\mu$ L/20 $\mu$ 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。

4.7 从磁力架上取下管/板，进行洗脱：

4.8 加入 10 $\mu$ L~100 $\mu$ L 的洗脱液\*\*\*，涡旋振荡 10s 或移液器吹打 15 次彻底重悬磁珠；

4.9 室温孵育 2min 从磁珠上洗脱 DNA；

4.10 磁力架上静置直至液体澄清，转移上清至新的管/板中，并根据需要进行片段选择、文库 QC 或测序；文库请放置 -15 $^{\circ}$ C~-25 $^{\circ}$ C 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 1: PCR 扩增后纯化可选方案

如果文库出现 <150bp 的片段残留时可选择以下流程进行 PCR 后纯化，流程如下：

1. 扩增产物使用 80 $\mu$ L DNA Clean Beads 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；
2. 移液器 200 $\mu$ L 吹打 15 次进行充分混匀；
3. 室温下静置 5min，使 DNA 与磁珠结合；
4. 放置在磁力架上以捕获磁珠，直至液体澄清；小心吸出全部上清并丢弃；
5. 从磁力架上取下管/板，加入 100 $\mu$ L Wash Buffer 1，移液器 120 $\mu$ L 吹打 15 次充分混匀；
6. 放置在磁力架上以捕获磁珠，直至液体澄清；小心吸出全部上清并丢弃；
7. 保持管/板在磁力架上，加入 200 $\mu$ L 80%乙醇，200 $\mu$ L 移液器吹打 3~5 次后小心吸出上清并丢弃；
8. 重复步骤 7 一次；
9. 使用小量程 10 $\mu$ L/20 $\mu$ 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。
10. 从磁力架上取下管/板，进行洗脱；
11. 加入 10 $\mu$ L~100 $\mu$ L 的洗脱液，涡旋振荡 10s 或移液器吹打 15 次彻底重悬磁珠；室温孵育 2min 从磁珠上洗脱 DNA；
12. 磁力架上静置直至液体澄清，转移上清至新的管/板中，并根据需要进行片段选择、文库 QC 或测序；文库请放置 -15 $^{\circ}$ C~-25 $^{\circ}$ C 保存。



## 附录 2: 接头序列及 Pooling 建议

Table1. CD Index 序列

D50X SERIES	i5 BASES FOR SAMPLE SHEET ENTRY (NOVASEQ,MISEQ, HISEQ 2000/2500)	i5 BASES FOR SAMPLE SHEET ENTRY (MINISEQ,NEXTSEQ, HISEQ 3000/4000)	D70X SERIES	i7 BASES FOR SAMPLE SHEET ENTRY
D501	TATAGCCT	AGGCTATA	D701	ATTACTCG
D502	ATAGAGGC	GCCTCTAT	D702	TCCGGAGA
D503	CCTATCCT	AGGATAGG	D703	CGCTCATT
D504	GGCTCTGA	TCAGAGCC	D704	GAGATTCC
D505	AGGCGAAG	CTTCGCCT	D705	ATTCAGAA
D506	TAATCTTA	TAAGATTA	D706	GAATTCGT
D507	CAGGACGT	ACGTCCTG	D707	CTGAAGCT
D508	GTACTGAC	GTCAGTAC	D708	TAATGCGC
			D709	CGGCTATG
			D710	TCCGCGAA
			D711	TCTCGCGC
			D712	AGCGATAG

Table2. 接头版面排布示意图

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	501/701	501/702	501/703	501/704	501/705	501/706	501/707	501/708	501/709	501/710	501/711	501/712
B	502/701	502/702	502/703	502/704	502/705	502/706	502/707	502/708	502/709	502/710	502/711	502/712
C	503/701	503/702	503/703	503/704	503/705	503/706	503/707	503/708	503/709	503/710	503/711	503/712
D	504/701	504/702	504/703	504/704	504/705	504/706	504/707	504/708	504/709	504/710	504/711	504/712
E	505/701	505/702	505/703	505/704	505/705	505/706	505/707	505/708	505/709	505/710	505/711	505/712
F	506/701	506/702	506/703	506/704	506/705	506/706	506/707	506/708	506/709	506/710	506/711	506/712
G	507/701	507/702	507/703	507/704	507/705	507/706	507/707	507/708	507/709	507/710	507/711	507/712
H	508/701	508/702	508/703	508/704	508/705	508/706	508/707	508/708	508/709	508/710	508/711	508/712

Table3. 8 混 1 的 pooling 建议方案 1

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Table3. 8 混 1 的 pooling 建议方案 2

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												