



GenNext[®]

NGS Library Prep Kit

(Code No. LPK-101, LPK-101T, LPK-101L)

中文说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

[1] 简介	1
[2] 产品内容.....	2
[3] 产品之外需要准备的物品.....	2
[4] 使用方法.....	3
[5] 文库的验证.....	7
[6] 实验例	8
[7] Trouble Shooting.....	9
[8] 相关产品.....	9

—注意—

本试剂盒中所含的试剂均为科研用试剂。

请勿作为诊断、临床试剂使用。

在使用本试剂盒时，请严格遵守实验室的一般注意事项，注意安全。

—保存—

各组分请均保存于-20℃条件下。

[1] 简介

Library Preparation Kit (Code: LPK-101) 是使用片段化的双链 DNA 或 PCR 产物为模板，制备 illumina®二代测序文库的试剂盒。使用本品可快速简便地制备文库样品。

基本流程包括，对 1 ng - 1µg 的双链 DNA 片段的进行末端修复及 3'末端的加 A 反应，随后与 adapter 进行连接并使用特定引物进行 PCR 扩增。针对低起始量的 DNA 模板，借助改良型 KOD DNA polymerase 高保真 PCR 酶，也可低偏差地扩增末端带有 adapter 序列的文库。

本品中，不含有 adapter 接头与纯化用磁珠

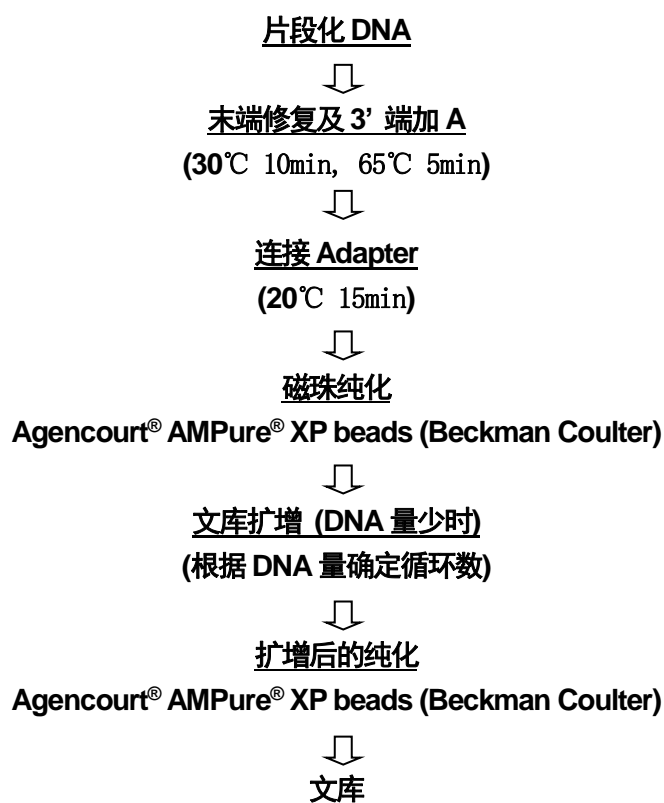


图 . 使用本品进行文库制备的流程

-特征 -

● 快速简便的操作流程

从末端修复及 3'末端加 A 到 adaptor 连接的操作都在同一个反应管中进行。末端修复及 3'末端加 A 一共进行 15 分钟，adaptor 的连接仅需 15 分钟即可完成。文库扩增时使用退火 10 秒、延伸 15 秒的快速循环条件。

● 范围较广的 input 量

对应较广范围的 input 量 (1 ng - 1µg) 进行的设计。

● 低偏差的文库扩增

文库扩增时使用的 Library Amplification Master Mix 是使用基因改良型 KOD DNA polymerase 进行开发的高保真 PCR 酶。因将 GC 不均导致的影响降到了最低、可均一地扩增各种片段。

[2] 产品内容

本品含有以下试剂，使用 50 μ l 片段化 DNA 时，LPK-101 可使用 24 次、LPK-101T 可使用 8 次、LPK-101L 可使用 96 次。试剂请于-20 $^{\circ}$ C 保存。

试剂名称	保存 ^{*1}	LPK-101	LPK-101T	LPK-101L
End Repair and A-tailing Buffer	-20 $^{\circ}$ C ^{*2}	240 μ l \times 1	80 μ l \times 1	960 μ l \times 1
End Repair and A-tailing Enzyme	-20 $^{\circ}$ C ^{*2}	60 μ l \times 1	20 μ l \times 1	240 μ l \times 1
Ligation Solution	-20 $^{\circ}$ C	1.2ml \times 1	400 μ l \times 1	1.6ml \times 3
Library Amplification Master Mix	-20 $^{\circ}$ C	690 μ l \times 1	230 μ l \times 1	1.38ml \times 2
Library Amplification Primer Mix	-20 $^{\circ}$ C	138 μ l \times 1	46 μ l \times 1	552 μ l \times 1

*1 如果需要长期保存，请存放于-30 $^{\circ}$ C。

*2 请不要将 End Repair and A-tailing Buffer 与 End Repair and A-tailing Enzyme 混合后保存。

请务必在使用前，按需取适量的 End Repair and A-tailing Buffer，然后添加对应量的 End Repair and A-tailing Enzyme。

End Repair and A-tailing Buffer

特别为末端修复及 3'末端加 A 优化的 buffer。请配合附带的 End Repair and A-tailing Enzyme 进行使用。

End Repair and A-tailing Enzyme

末端修复及 3'末端加 A 用酶。按每 8 μ l 的 End Repair and A-tailing Buffer 添加 2 μ l 酶的比例进行添加。因为溶液具有粘性，请缓慢地用移液器进行吸取。

Ligation Solution

经过优化适用于本试剂盒的预混型连接试剂。因为具有粘性，请缓慢地用移液器进行吸取。

Library Amplification Master Mix

含有基因改良型 KOD DNA polymerase、dNTPs 及 Mg²⁺ 等的 2x 浓度的 PCR Master Mix。因将 GC 不均导致的影响降到了最低、可均一地扩增各种片段，非常适合于二代测序中扩增产物的制备。

Library Amplification Primer Mix

10x 浓度的引物 Mix。可高效扩增带有 P5、P7 接头序列的 illumina[®]二代测序文库。

[3] 产品之外需要准备的物品

除本产品之外，请准备以下仪器·试剂。

• Thermal cycler 或 incubator

请准备能够满足本产品反应温度（4 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、68 $^{\circ}$ C、94 $^{\circ}$ C及 98 $^{\circ}$ C）的仪器。使用时，请根据各仪器的操作说明书进行。

• Adapter

能够使用带有 Index 的 Illumina[®] TruSeq[™] 等文库制备方法中使用的 Adapter。例如：
 TruSeq DNA Single Indexes Set A（12 Indexes, 24 Samples）[目录号：20015960]
 TruSeq DNA Single Indexes Set B（12 Indexes, 24 Samples）[目录号：20015961]
 （除上述外，本试剂盒还可用于有同样设计的 Adapter）

• **SPRI (solid phase paramagnetic bead) 磁珠**

推荐 Agencourt® AMPure® XP 的试剂 (Beckman Coulter、目录号: A63880、A63881 等)。使用时, 请根据试剂的说明书进行。

• **10mM Tris-HCl (pH8.0 - 8.5)**

用于 Adapter Stock 的稀释及 DNA 的溶解。不可用水代替。

• **磁力架**

使用磁珠进行纯化时使用。

• **80%乙醇**

使用磁珠进行纯化时的洗涤液。

[4] 使用方法

文库制备操作 (末端修复及 3'末端加 A 以及文库扩增), 根据样品数量, 大致在 3 个小时以内完成。在连接反应结束并纯化后, 或在文库扩增后可以暂停操作。

1. 末端修复及 3'末端加 A (End Repair and A-tailing)

- 1) 制备 End Repair and A-tailing 必需的试剂。参考以下表格, 在离心管或 PCR 板的孔中进行制备。

	1 个反应 (60 µl)
片段化的 DNA	50 µl
End Repair and A-Tailing Buffer*	8 µl
End Repair and A-Tailing Enzyme Mix*	2 µl

* 请在混合后 24 小时内使用。

- 2) 轻轻地涡旋振荡 (Vortex), spin down 之后, 再放回冰上。

- 3) 按以下温度进行温育:

30 °C、 10 min

65 °C、 5 min

4 °C、 保温

- 4) 迅速进行下面的操作步骤 (Adapter 的连接)。

2. Adapter 的连接 (Adapter Ligation)

- 1) 请参考以下推荐的 Adapter (本产品中不含有) 浓度, 用 10mM Tris-HCl (pH8.0 - 8.5) 稀释, 制备 Adapter Stock 溶液。

Input 量	Adapter Stock 浓度	Adapter : Insert 的摩尔比
1µg	15µM	10:1
500ng	15µM	20:1
250ng	15µM	40:1
100ng	15µM	100:1
50ng	15µM	200:1
25ng	7.5µM	200:1
10ng	3µM	200:1
5ng	1.5µM	200:1
2.5ng	750nM	200:1
1ng	300nM	200:1

- 2) 参考下表, 向 End Repair and A-tailing 反应管或 PCR 板中添加 Ligation Solution。

1 个反应 (110 µl)	
End Repair and A-Tailing 反应液	60 µl
Adapter Stock	5 µl
Ligation Solution	45 µl

- 3) 轻轻地涡旋振荡 (Vortex), spin down。
 4) 按以下温度进行温育。
 20 °C、15 min
 4 °C、保温
 5) 迅速进行下面的操作步骤 (连接后的纯化)。

3. 连接后的纯化 (Purification after ligation)

- 1) 参考下表, 向 Adapter Ligation 反应管或平板中添加 0.8x SPRI 磁珠 (Agencourt® AMPure® XP 试剂)。

1 个反应 (198 µl)	
Adapter Ligation 反应液	110 µl
Agencourt® AMPure® XP 试剂*	88 ul

- 2) 使用涡旋振荡器 (Vortex) 或移液器上下吹打, 将混合液充分混匀。
 3) 室温孵育 5—15 分钟。
 4) 将反应管或板置于磁力架上, 静置直至溶液变透明。
 5) 去除上清液。
 6) 向静置于磁力架上的反应管或板中添加 80% 的乙醇 200µl。
 7) 温育 30 秒。
 8) 去除乙醇。
 9) 将反应管或板静置于磁力架上, 然后添加 80% 的乙醇 200µl。
 10) 温育 30 秒。

- 11) 使用移液器，将乙醇完全除去。
- 12) 将反应管或平板静置于磁力架上，室温温育 3—5 分钟，进行风干。
- 13) 从磁力架上取下反应管或平板。
- 14) 扩增文库时，添加 10mM 的 Tris-HCl (pH8.0 - 8.5) 25 μ l，室温孵育 2 分钟溶解 DNA。或者，进行文库 size selection 时，添加 10mM 的 Tris-HCl (pH8.0 - 8.5) 55 μ l 进行温育，请参考 p.10 [4] 6. Size selection (option)。
- 15) 将反应管或平板置于磁力架上，静置直至溶液变透明。
- 16) 将透明的上清液移入新的反应管或平板中。
- 17) 完成上述操作，纯化后的文库可放于-20 $^{\circ}$ C 保存。

4. 文库的扩增 (Library Amplification)

- 1) 参考下表进行反应液的制备。

	1 个反应 (50 μ l)
Library Amplification Master Mix (2x)	25 μ l
Library Amplification Primer Mix (2x)	5 μ l
添加 Adapter 后的文库	20 μ l

- 2) 轻轻地涡旋振荡 (Vortex), spin down。
- 3) 参考以下循环条件进行文库扩增。扩增后，完成操作时，可保存于-20 $^{\circ}$ C。

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 $^{\circ}$ C	2 min	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10 s	尽可能减少
退火	60 $^{\circ}$ C	10 s	(参考下表设置)
延伸	68 $^{\circ}$ C	15 s	
Hold	4 $^{\circ}$ C	∞	1

表 1. 推荐循环数

Input 量	循环数
1 μ g	0
500ng	0
250ng	0
100ng	0-2
50ng	3-5
25ng	5-6
10ng	7-9
5ng	9-11
2.5ng	11-13
1ng	13-15

* 根据样品种类、片段大小分布，最适循环数有时会差 1~3 循环数。

5. 文库扩增后的纯化 (Purification after amplification)

- 1) 参考下表，向 Adapter Ligation 反应管或平板中添加 1x SPRI 磁珠 (Agencourt® AMPure® XP 试剂)。

	1 个反应 (100 μ l)
扩增后的文库	50 μ l
Agencourt® AMPure® XP 试剂*	50 μ l

* 请确保磁珠完全呈悬浊状态

- 2) 使用涡旋振荡器 (Vortex) 或移液器上下吹打，将混合液充分混匀。
- 3) 室温孵育 5—15 分钟。
- 4) 将反应管或板置于磁力架上，静置直至溶液变透明。
- 5) 去除上清液。
- 6) 向静置于磁力架上的反应管或板中添加 80% 的乙醇 200 μ l。
- 7) 温育 30 秒。
- 8) 去除乙醇。
- 9) 将反应管或板静置于磁力架上，然后添加 80% 的乙醇 200 μ l。
- 10) 温育 30 秒。
- 11) 使用移液器，将乙醇完全除去。
- 12) 将反应管或平板静置于磁力架上，室温温育 3—5 分钟，进行风干。
- 13) 从磁力架上取下反应管或平板。
- 14) 添加必要量 (如: 20 μ l) 10mM 的 Tris-HCl (pH8.0 - 8.5) 25 μ l，室温孵育 2 分钟溶解 DNA。或者，进行文库 size selection 时，添加 10mM 的 Tris-HCl (pH8.0 - 8.5) 55 μ l 进行温育，请参考 p.10 [4] 6. Size selection (option)。
- 15) 将反应管或平板置于磁力架上，静置直至溶液变透明。
- 16) 将透明的上清液移入新的反应管或平板中。
- 17) 完成上述操作，纯化后的文库可放于 -20°C 保存。

6. 片段大小选择 (Size Selection)

通过进行 size selection，可得到目的片段长度在指定区间的文库。但另一方面会使得率及文库多样性减少，所以仅在必要时进行该步骤。以下以 250bp~450bp 的文库 selection 为例进行实验。

- 1) 参考下表，向 Adapter Ligation 反应管或平板中添加 1x SPRI 磁珠 (Agencourt® AMPure® XP 试剂)。

	1 个反应 (80 μ l)
将要进行 size selection 的文库	50 μ l
Agencourt® AMPure® XP 试剂*	30 μ l

* 请确保磁珠完全呈悬浊状态。

- 2) 使用涡旋振荡器 (Vortex) 或移液器上下吹打，将混合液充分混匀。
- 3) 室温孵育 5—15 分钟。

- 4) 将反应管或板置于磁力架上，静置直至溶液变透明。
- 5) 将透明的上清液 75 μ l 移入新的反应管或板中。将含磁珠的反应管或板丢弃。
- 6) 参考下表，向分取得到的上清中，添加 0.13x SPRI 磁珠（Agencourt[®] AMPure[®] XP 试剂）。

	1 个反应 (85 μ l)
将要进行 size selection 的文库	75 μ l
Agencourt [®] AMPure [®] XP 试剂*	10 μ l

- 7) 使用涡旋振荡器（Vortex）或移液器上下吹打，将混合液充分混匀。
- 8) 室温温育 5—15 分钟。
- 9) 将反应管或板置于磁力架上，静置直至溶液变透明。
- 10) 向静置于磁力架上的反应管或板中添加 80%的乙醇 200 μ l
- 11) 温育 30 秒。
- 12) 使用移液器，将乙醇完全除去。
- 13) 向静置于磁力架上的反应管或板中添加 80%的乙醇 200 μ l。
- 14) 使用移液器，将乙醇完全除去。
- 15) 将反应管或平板静置于磁力架上，室温温育 3—5 分钟，进行风干。
- 16) 从磁力架上取下反应管或平板。
- 17) 添加必要量（如：20 μ l）10mM 的 Tris-HCl（pH8.0 - 8.5）25 μ l，室温孵育 2 分钟溶解 DNA。
- 18) 将反应管或平板置于磁力架上，静置直至溶液变透明。
- 19) 将透明的上清液移入新的反应管或平板中。
- 20) 完成上述操作，纯化后的文库可放于-20 $^{\circ}$ C保存。

[5] 文库的验证

1. 文库的定量

使用 GenNext[™] NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101)或同类市售商品，推荐采用 qPCR 方法进行定量。GenNext[™] NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) 是 illumina[®] NGS 用文库定量试剂盒，针对 illumina[®]采用的 P5、P7 的 Adapter 序列，可以特异且准确地定量出能与 Flow cell 有效结合的文库。

2. 文库片段大小分布的确认

确认文库分布时，推荐使用 Bioanalyzer（Agilent）等电泳仪进行文库片段大小分布的确认。

[6] 实验例

1. 文库得率及分布的比较

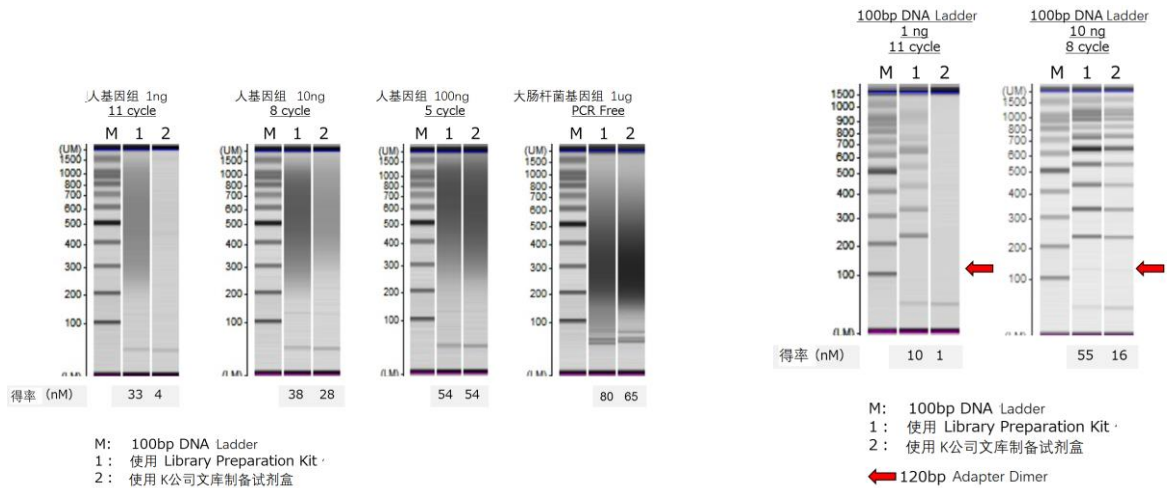
<方法>

以片段化处理过的人基因组 DNA 1、10、100ng 以及大肠杆菌基因组 DNA 1ug 为模板,使用 Library Preparation Kit (Code: LPK-101T)或 K 公司文库制备试剂盒进行文库的制备。以 100bp DNA Ladder 1、10ng 做参照进行电泳。

Adapter 是使用 illumine 公司的 Index Adapter, 文库的 cleanup 是使用 Agencourt® AMPure® XP 的试剂 (Beckman Coulter)。

1ug 没有扩增、1ng 用 11 个循环、10ng 用 8 个循环、100ng 用 5 个循环进行扩增,文库 size 的分布用 MultiNA (岛津生产公司)的产品进行确认。文库的得率用 GenNext™ NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101)进行确认。

<结果>



已确认:在 Input 100bp 的 DNA Ladder 时,因为在两端加了 Adapter, 所以要再上大约 120bp 的条带(100bp 的条带时大约 220bp 长)。

结果显示:进行文库 size 的分布时,用本公司试剂和其他公司试剂时,结果相同;低 input 量时,使用我们公司的试剂,与使用其他公司的试剂相比,可得到较高的得率。因为不管哪一种都是要提供给 MiSeq, 所以都得到了必需的 4nM 以上的得率。

2. NGS 分析结果的评价

<方法>

使用 MiSeq (illumina 公司)及 MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) (illumina 公司)进行大肠杆菌基因组 (1ug PCR Free 或 1ng 用 12 循环进行扩增)的 NGS 分析。

文库的制作使用 Library Preparation Kit (Code: LPK-101T)或 K 公司文库制备试剂盒进行。

文库数据为了与 read 数相等,进行 down sampling, 各样品收集 100 万 read 数,进行分析。分析是使用 CLC Genomics Workbench (QIAGEN 公司/CLC bio) 进行的。

<结果>

1ug PCR Free 时

	比对成功的比率	与参考基因组不一致的比率
使用本公司 Library Preparation Kit	93.14	5.65
使用 K 公司文库制备试剂盒	93.01	5.89

1ng 12 循环扩增时

	比对成功的比率	与参考基因组不一致的比率
使用本公司 Library Preparation Kit	92.31	5.77
使用 K 公司文库制备试剂盒	89.64	5.99

结果显示，使用本公司的试剂比使用其他公司的试剂，得到了更好的 mapping 效率与错误率。

[7] Trouble Shooting

现象	原因	对策
Adapter 二聚体较多	Adapter 质量不好	<ul style="list-style-type: none"> · 因 Adapter 是部分双链 DNA，为了避免双链部分分开，请尽量减少 Adapter stock 的冻融次数。或者，请尽量在室温以下的温度条件下进行 Adapter 操作。 · Adapter stock 请用 10mM 的 Tris-HCl (pH8.0 - 8.5) 进行稀释。
	Adapter 的浓度不合适	<ul style="list-style-type: none"> · 请参考 p.6 [4] 2.(1)的内容，在推荐的 Adapter stock 浓度左右，进行浓度的预先优化。 · 文库得率足够时，可再次进行纯化，请参考 p.10 [4] 6. 进行 size selection (option)。
文库得率较低	添加的磁珠试剂与文库溶液的比例不正确	· 纯化用的 SPRI 磁珠试剂文库溶液的量的比例对 size 分布、得率有很大影响。请确认液量的比例是否正确。
	吸附 DNA 的磁珠干燥过度	· DNA 吸附在磁珠上，乙醇洗涤后，磁珠过度干燥，DNA 有可能洗脱不下来。室温干燥时间请保持在 5 分钟以内。

[8] 相关产品

产品名称	包装	Code No.
Illumina 公司 NGS 用文库定量试剂盒 GenNext™ NGS Library Quantification Kit	500 次用	NLQ-101



<销售商>

东洋纺（上海）生物科技有限公司

邮编：200122

邮箱：tech@bio-toyobo.cn

网址：<http://www.bio-toyobo.cn>

联系电话：021-58794900

公司地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL 单元

<生产商>

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号