# Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)

## RK20271

**www.abclonal.com**

version: N18C28v1.1

# 目录

1. 产品概述 ..... 1

2. 产品组分 ..... 2

3. 产品保存 ..... 2

4. 产品应用 ..... 3

5. 其它自备材料 ..... 4

6. 注意事项 ..... 5

7. 操作步骤 ..... 10

第一步 末端修复 ..... 10

第二步 接头连接 ..... 11

第三步 文库扩增 ..... 12

8. 附录 ..... 17

9. 附表 ..... 28

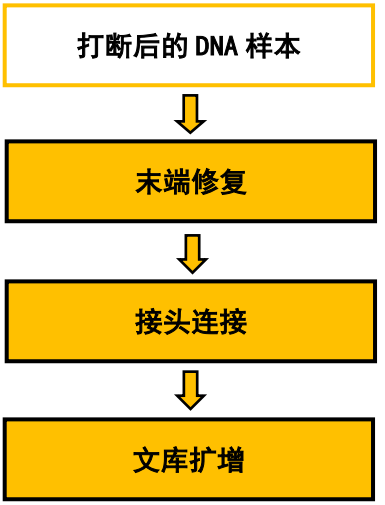
# 1.产品概述

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs) (Cat.NO.RK20271)继承了Rapid Plus DNA Lib Prep Kit 的高性能，并在此基础上进一步提高了低投入量连接效率，是一款通用型的文库构建试剂盒。

本试剂盒可将 1 ng-1000 ng 的 DNA 样本构建成适用于 Illumina®和 MGI®高通量测序平台的 DNA 测序文库。试剂盒包含了 DNA 样本末端修复、加 dA、测序接头连接和文库扩增等一系列建库实验所需的酶及反应 Buffer，便于实现文库的快速构建，整个实验过程可以在 2-3 hr 内完成，适用于各种样本类型（普通基因组、游离 DNA、FFPE DNA、CHIP DNA 等），另外本试剂盒还可以用于 PCR-Free 文库构建。

试剂盒组分经过了严格的质量控制，主要包括组分污染测试、功能性试验验证、应用场景测试和产品批间次稳定性测试等工序，最大程度上降低病原菌残留，适用于病原微生物检测。

**Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs) 建库流程**



# 2.产品组分

**表格 1. 试剂盒组分表**

| | | 组分名称 | 8 RXN | 24 RXN | 96 RXN |
|---|---|---|---|---|---|
| **末端修复** | ● | End Prep Buffer II | 56 μL | 168 μL | 672 μL |
| | ● | End Prep Enzymes | 24 μL | 72 μL | 288 μL |
| **接头连接** | ● | Ligation Buffer | 240 μL | 720 μL | 2880 μL |
| | ● | Ligase Enzymes II | 80 μL | 240 μL | 960 μL |
| **文库扩增** | ● | 2X PCR Mix | 200 μL | 600 μL | 2400 μL |
| | ● | 10X ILM PCR Primers | 40 μL | 120 μL | 480 μL |
| | ● | MGI PCR Primer Mix | 40 μL | 120 μL | 480 μL |

# 3.产品保存

**运输与保存**：Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)建库试剂盒必须保存在-15~-25℃条件下。该试剂盒对温度比较敏感，长途运输尽量采用干冰运输条件，或者干冰结合冰袋方式。

# 4.产品应用

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)建库试剂盒适用于下一代 DNA 测序文库构建，主要功能模块包括末端修复、3'A-tailing、接头连接和 PCR 扩增。该试剂盒适用于起始量 1 ng-1000 ng 各种样本类型（普通基因组、游离 cfDNA 与 ctDNA、FFPE DNA、 CHIP DNA、PCR 产物、cDNA 产物等）。综上，Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)建库试剂盒的应用场景主要包括：

① 全基因组测序；

② 外显子测序和靶向测序，包括 Roche® NimbleGen™ SeqCap™ EZ、Agilent SureSelect、Illumina TruSeq®、IDT xGen™ Lockdown™ Probes，或者其他的探针杂交系统；

③ ChIP-seq，input DNA 为 ChIP DNA；

④ RNA-seq，input DNA 为 cDNA 产物；

⑤ 扩增子测序，input DNA 为 PCR 产物；

⑥ 宏基因组测序；

⑦ cfDNA/ctDNA 测序。

# 5.其它自备材料

- 主要试剂与仪器耗材
  - 无水乙醇（80%的乙醇需现配现用）、无核酸酶水、Low-EDTA TE Buffer（ABclonal, Cat.NO. RM20206）
  - PCR 管、磁力架、带滤芯移液器吸头、PCR 热循环仪、微型离心机、漩涡混匀仪、单道移液器和多通道移液器
  - ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒（ABclonal, Cat.NO. RK30140 / RK30141）、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效 DNA 质控产品
- 磁珠
  - AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257)
- 适用于 Illumina®平台的测序接头
  - 短接头：Cat.NO. RK21622 - RK21627，RK21701 - RK21703
  - 长接头：Cat.NO. RK21706 - RK21709
- 适用于 MGI®平台的测序接头
  - 短接头：Cat.NO. RK21687 - RK21689，RK21721 - RK21724

具体信息可以参考附表中的 Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)试剂盒兼容接头类型汇总表。

# 6.注意事项

## 6.1 关于 Input DNA 和片段化

6.1.1 本试剂盒兼容机械打断和酶切片段化的 DNA。

6.1.2 下文中所指的 Input DNA 特指投入末端修复/dA 尾添加步骤中的 DNA。

6.1.3 本试剂盒兼容范围为 1 ng-1000 ng Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 =1.8-2.0 的高质量 Input DNA。

6.1.4 表 2 列举了常见应用中推荐的 Input DNA 量，当 Input DNA 质量较差或需要进行片段分选时，应适当上调使用量。

**表格 2. 常见应用中推荐 Input DNA 量**

| 应用 | 样本类型 | 推荐 Input DNA 量 |
|---|---|---|
| 全基因组测序 | 复杂基因组 | 50 ng-1 μg |
| 靶向捕获测序 | 复杂基因组 | 10 ng-1 μg |
| 全基因组测序，靶向捕获测序 | FFPE DNA | ≥50 ng |
| 全基因组测序，靶向捕获测序 | cfDNA/ctDNA | ≥500 pg |
| 全基因组测序 | 微生物基因组 | ≥1 ng |
| 全基因组测序 PCR-Free 测序 | 高质量 DNA | ≥100 ng |
| 表观遗传研究 | ChIP-DNA | ≥500 pg |
| 靶向测序 | 扩增子 | ≥500 pg |

6.1.5 Input DNA 制备过程中如果带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复/dA 尾添加步骤反应效率，建议 DNA 片段化后进行磁珠纯化或分选。

6.1.6 当使用机械法进行 DNA 片段化时，请将 DNA 稀释在 TE Buffer 中进行片段化，请勿在灭菌超纯水中进行。

6.1.7 如 DNA 样品在机械打断后进行过纯化或分选，需再次测定其浓度，依此作为 Input DNA 量，否则可能会导致文库产出偏低。

6.1.8 当使用酶切法进行片段化且产物不进行纯化或分选而直接建库时，请确认

Stop Buffer 中不包含过量的金属离子螯合剂。如条件不满足，可先将片段化产物纯化或长度分选后溶于 TE Buffer 或灭菌超纯水中（≤50 μL），再进行文库构建。

## 6.2 关于 Illumina 和 MGI 平台的试剂使用

6.2.1 由于 Illumina 和 MGI 平台的文库结构不同,所以本试剂盒提供了两种 PCR 扩增引物，分别适用于 Illumina 和 MGI 平台的文库扩增，在 PCR 扩增时请注意区分，对应关系如下表：

| 文库类型 | 搭配接头类型 | PCR 扩增引物 |
|---|---|---|
| Illumina 单端 index 文库<br>Illumina 双端 index 文库 | 长接头 | ● RM20726_10X ILM PCR Primers |
| MGI 单端 index 文库 | 长接头 | ● RM23300_MGI PCR Primer Mix |

## 6.3 关于 Adapter

6.3.1 ABclonal 可提供长接头试剂盒和短接头试剂盒，详见附表，客户可以根据实验需求进行选择。

6.3.2 如果构建 PCR-Free 文库，需要在接头连接步骤使用带有完整 index 的长接头，并将 Adapter Ligation 产物去除过剩的 Adapter，再上机测序。

6.3.3 本试剂盒可以兼容诸如 Illumina TruSeq、Roche NimbleGen SeqCap EZ、Agilent SureSelect 等常规应用体系中使用到的各种 Non-indexed、单端 Indexed 及双端 Indexed Adapters。

6.3.4 Adapter 的质量和使用浓度直接影响连接效率及文库产量。Adapter 用量过高可能会产生较多 Adapter Dimer；用量较低可能会影响连接效率及文库产量。表 3 列举了使用本试剂盒，不同 Input DNA 量推荐的接头稀释。

**表格 3. 接头稀释表**

| Input DNA | 稀释倍数 | 稀释后浓度 |
|---|---|---|
| 1 μg-50 ng | 不需稀释 | 15 μM |
| 49 ng-25 ng | 2 倍稀释 | 7.5 μM |
| 24 ng-10 ng | 5 倍稀释 | 3 μM |
| 9 ng-5 ng | 10 倍稀释 | 1.5 μM |
| < 5 ng | 20 倍稀释 | 0.75 μM |

## 6.4 关于磁珠的使用

6.4.1 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。

6.4.2 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀。

6.4.3 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。

6.4.4 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。

6.4.5 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。

6.4.6 通常连接产物的纯化条件为 0.8×（连接产物 110 μL，磁珠 88 μL），适用于绝大多数情况。如果 Insert Size 偏小，可以尝试将连接产物的纯化条件更改为 1×（连接产物 110 μL，磁珠 110 μL）。如需获得 Insert Size 更长的文库，可通过适当降低磁珠使用量以减少小片段的占比，但这种调整只能粗略改变文库主峰的位置，如需要准确控制文库长度分布，可在此步纯化之后进行长度分选。片段分选操作详见附录。

6.4.7 DNA 片段长度分选步骤可选择在末端修复/dA 尾添加之前,或接头连接后，或文库扩增后进行。当 Input DNA 质量≥50 ng，可以选择在接头连接后进行片段分选；如 Input DNA 质量<50 ng，建议在文库扩增后进行分选。

6.4.8 如果质检结果显示纯化产物中 Adapter 或 Adapter Dimer 污染严重，可

尝试第二次磁珠纯化：使用灭菌超纯水将第一次纯化产物体积补至 50 μL，加入 50 μL 磁珠（1×）进行第二次纯化。这样可以显著降低 Adapter 或 Adapter Dimer 的残留，尤其是当构建 PCR-Free 文库时。有时可能还需要配合 Adapter 的使用量降低才能完全消除 Adapter 或 Adapter Dimer 的残留。

## 6.5 关于文库产量提高推荐

6.5.1 Input DNA

Input DNA 最好能准确定量，建议使用 Qubit 定量；较高的 DNA 投入量能提高 DNA 连接效率，建议提高 Input DNA 量；若起始 DNA 含有酶抑制剂，建议使用 2.2×磁珠纯化后再建库。

6.5.2 接头连接

延长连接反应时间可以提高接头连接效率，可以尝试适当延长连接时间到 25 min-4 hr，或者在 4℃/16℃连接过夜。

6.5.3 PCR

较高的引物浓度能够提高文库产出，减少 DNA 大片段，可以提高引物浓度，但是引物浓度调整控制在 5-20 μM 范围内。

如果 Input DNA 量≥ 100 ng，可以将纯化后的连接产物量等分，采用 2 个 50μL PCR 体系扩增，从而提高文库产出，并能减少 DNA 大片段。

针对低起始量 DNA 或者困难/降解 DNA 样本,建议适当提高 PCR 循环数 1-3 个。

6.5.4 磁珠

合适的磁珠纯化比例，可以保证稳定的文库产率，可以尝试提高磁珠使用比例至 1.0×以上，减少 200 bp 以下短片段的损失。同时防止过高的磁珠使用比例导致接头二聚体产生。

文库含有接头二聚体或者引物残留，建议重新进行 1.0×磁珠纯化回收 DNA。

## 6.6 关于试剂准备

6.6.1 使用前，请保证 End Prep Buffer II、Ligation Buffer、Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS 和 10X ILM PCR Primers 或 MGI PCR Primer Mix 试剂完全充分融解。

6.6.2 试剂盒内试剂组分可以在室温下进行充分融解，混匀并瞬时离心后，置于冰上备用。

6.6.3 该试剂盒部分组分比较粘稠，特别是 Ligation Buffer，在移液操作时需要格外注意，尽量以较慢速度吸取或者吹打溶液或组分。产品组分使用完后，请尽快放置于-15~-25℃条件下进行保存。

6.6.4 请尽量避光保存 End Prep Buffer II，因为含有 NAD+辅酶因子，缓冲液颜色偏黄，不影响使用。

# 7.操作步骤

## 第一步 末端修复

1.1 在无菌 PCR 管中准备如下反应体系：

**表格 4. 末端修复反应体系**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | Input DNA | X μL |
| ● | End Prep Buffer II | 7 μL |
| ● | End Prep Enzymes | 3 μL |
| ○ | Nuclease-Free Water | Up to 60 μL |
| | 总体积 | 60 μL |

1.2 充分混匀反应体系。

1.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 5，PCR 仪热盖设置为 75℃。

**表格 5. 末端修复反应程序**

| 温度 | 时间 |
|---|---|
| 20℃ | 30 min |
| 65℃ | 30 min |
| 4℃ | ∞ |

## 第二步 接头连接

2.1 提前将所需要的磁珠从 4℃冰箱拿出平衡至室温，涡旋振荡混匀，室温平衡至少 30 min。

2.2 使用 Low-EDTA TE Buffer，按表格 3 对 Working Adapter 进行稀释。

2.3 在冰上准备表格 6 中的反应体系，Nuclease-Free Water、Ligation Buffer、Ligase Enzymes II 可配制预混液，但 Working Adapter 需要单独添加。对配制好的连接反应体系，充分混匀离心。

**表格 6. 接头连接反应体系**

| 组分 | 体积 |
|---|---|
| End Prep Reaction Mix（步骤 1.3） | 60 μL |
| Nuclease-Free Water | 5 μL |
| Ligation Buffer | 30 μL |
| Ligase Enzymes II | 10 μL |
| Working Adapter（按表 3 稀释后的接头） | 5 μL |
| 总体积 | 110 μL |

2.4 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 7，PCR 仪不设热盖。

**表格 7. 接头连接反应程序**

| 温度 | 时间 |
|---|---|
| 20℃ | 15 min |
| 4℃ | ∞ |

2.5 如果对文库大小有严格需求，可以在接头连接反应结束后，进行片段分选，分选方案参照附录。如果不需要片段分选，直接进行 2.6 步骤。

2.6 在连接后的 110 μL 反应体系中，每个样本中加入 88 μL (0.8×) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

2.7 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

2.8 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

2.9 重复步骤 2.8。

2.10 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

2.11 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

2.12 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中。

**安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4℃保存 1 周，长期保存需置于-20℃，避免反复冻融。**

## 第三步 文库扩增

本试剂盒可使用全长或截短型的适用于 Illumina 和 MGI 平台的接头，根据接头类型选择表格 8，表格 9，表格 10，表格 11，表格 12 的文库扩增体系。接头类型及相关货号信息见附表。

3.1 文库扩增体系

3.1.1 Illumina 平台，配制如下 PCR 反应体系：

**表格 8. Illumina 平台文库扩增体系（长接头 - UDI）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | 接头连接的 DNA | 20 μL |
| ● | 2X PCR Mix | 25 μL |
| ● | 10X ILM PCR Primers | 5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

**表格 9. Illumina 平台文库扩增体系（短接头 - UDI）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | 接头连接的 DNA | 20 μL |
| ● | 2X PCR Mix | 25 μL |
| ○ | UDI Primer | 5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

3.1.2 MGI 平台，配制如下 PCR 反应体系：

**表格 10. MGI 平台文库扩增体系（长接头 - 单端 index）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | 接头连接的 DNA | 20 μL |
| ● | 2X PCR Mix | 25 μL |
| ● | MGI PCR Primer Mix | 5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

**表格 11. MGI 平台文库扩增体系（短接头 - 单端 Index）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | 接头连接的 DNA | 20 μL |
| ● | 2X PCR Mix | 25 μL |
| ○ | MGI Index Pxxx | 2.5 μL |
| ● | MGI Universal PCR Primer | 2.5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

**表格 12. MGI 平台文库扩增体系（短接头 - UDI）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | 接头连接的 DNA | 20 μL |
| ● | 2X PCR Mix | 25 μL |
| ○ | MGI UDI Primers xxx | 5 μL |
| | 总体积 | 50 μL |

3.2 充分混匀并瞬时离心。

3.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 13，推荐文库扩增循环数见表 14，设置 PCR 仪热盖 105℃。

**表格 13. 文库扩增程序**

| 温度 | 时间 | Cycles |
|---|---|---|
| 98℃ | 1 min | 1 |
| 98℃ | 10 s | |
| 60℃ | 30 s | 2-19 PCR Cycles |
| 72℃ | 30 s | |
| 72℃ | 1 min | 1 |
| 4℃ | ∞ | 1 |

**表格 14. 推荐文库扩增循环数**

| Input DNA (ng) | 1 μg 文库产出推荐 PCR 循环数*（Illumina） | 1 μg 文库产出推荐 PCR 循环数*（MGI） |
|---|---|---|
| 1000 | 2-3 | 3-4 |
| 500 | 3-4 | 4-5 |
| 250 | 4-5 | 5-6 |
| 100 | 5-6 | 6-7 |
| 50 | 6-7 | 7-8 |
| 25 | 7-9 | 8-10 |
| 10 | 9-11 | 10-12 |
| 1 | 13-15 | 14-16 |
| 0.1 | 17-19 | 18-20 |

*注：

1. FFPE 样本在此基础上增加 1-3 个循环数。
2. 如果在接头连接后进行片段分选，推荐在此基础上增加 2 个 PCR 循环数。
3. 搭配 MGI 长接头时，参照较高循环数进行 PCR 扩增。

3.4 向扩增产物中加入 50 μL (1×) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

3.5 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

3.6 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

3.7 重复步骤 3.6。

3.8 保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

3.9 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 31 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

3.10 将样本于磁力架上静置 2 min，转移 30 μL 上清液至一个新 PCR 管中。

3.11 文库保存在-20℃，以便于进行文库质量检测和上机测序。

**安全停止点：纯化后的 PCR 产物可以暂时放置在 4℃保存 1 周，长期保存需置于 -20℃，避免反复冻融。**

# 8.附录

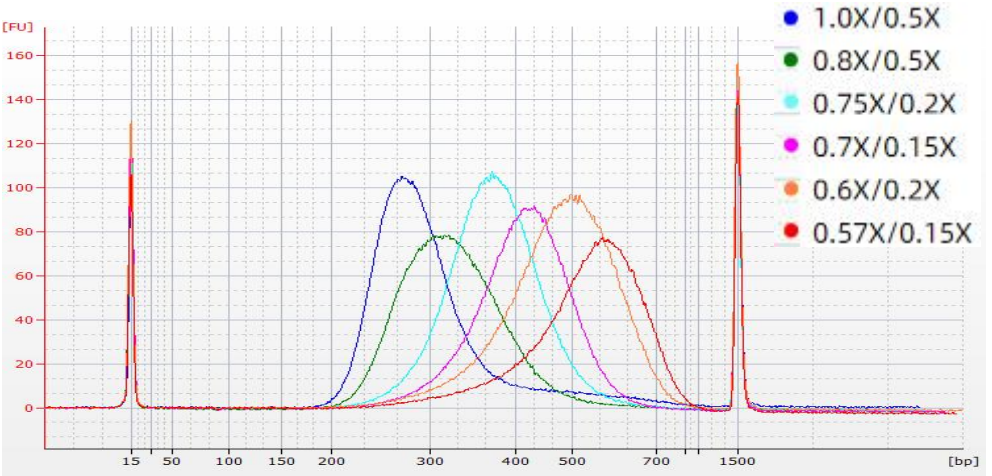
## 8.1 Illumina 平台水相体系片段分选

8.1.1 水相体系中的片段分选，即在接头连接后，先进行 1×磁珠纯化，然后在纯化后的 100 μL 水相体系中进行两轮磁珠分选。

8.1.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

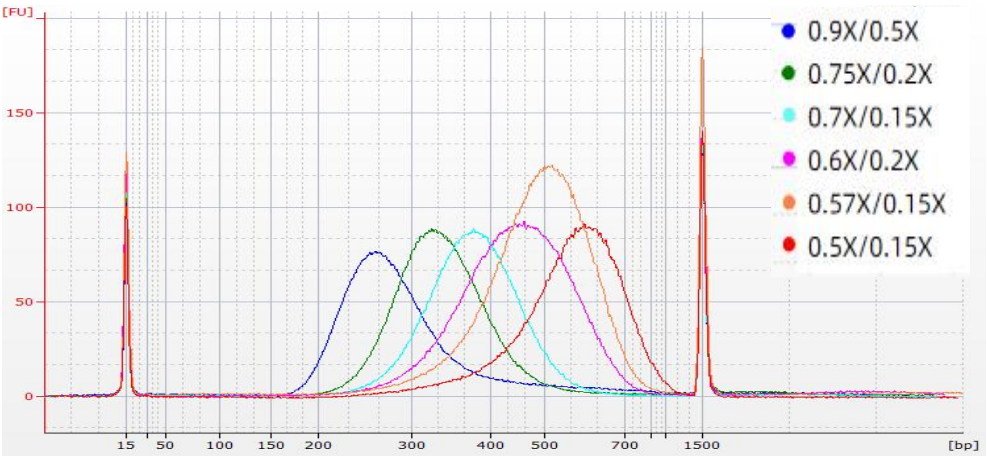
**表格 15. 短接头水相体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 250 | 300 | 350 | 450 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 第一轮磁珠比例（AX） | 1 X | 0.8 X | 0.75 X | 0.7 X | 0.6 X | 0.57 X |
| 第二轮磁珠比例（BX） | 0.5 X | 0.5 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.2 X | 0.15 X |



**表格 16. 长接头水相体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 250 | 350 | 400 | 450 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **第一轮磁珠比例（AX）** | 0.9 X | 0.75 X | 0.7 X | 0.6 X | 0.57 X | 0.5 X |
| **第二轮磁珠比例（BX）** | 0.5 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.15 X |




8.1.3 水相体系片段分选步骤如下：

1）磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。

2）在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 110 μL (1×) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

3）将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

4）加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

5）重复步骤 4）。

6）保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

7）将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

8）将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 100 μL 上清至一个新 PCR 管。

9）向接头连接纯化后的 100 μL 水相体系中加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。

10）将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。

11）向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。

12）将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

13）加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

14）重复步骤 13）。

15）保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

16）将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

17）将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，即可用于文库扩增。

**安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4℃保存 1 周，长期保存需置于-20℃，避免反复冻融。**

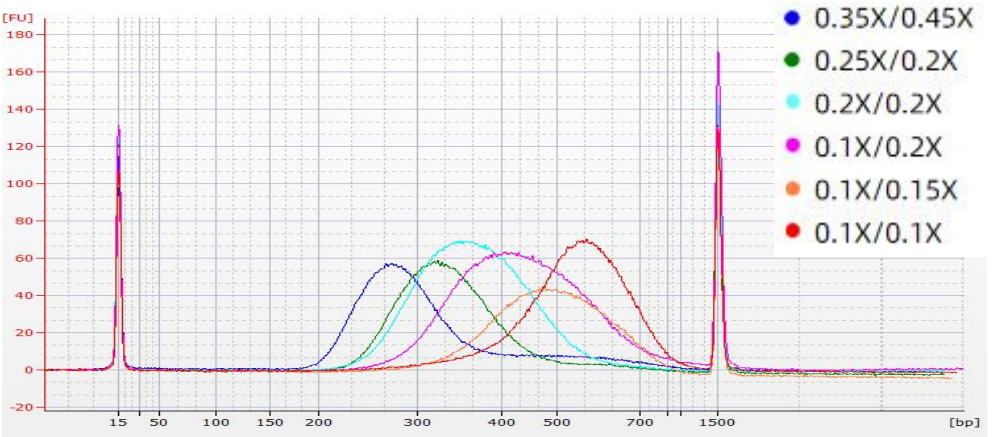
## 8.2 Illumina 平台 PEG 体系片段分选

8.2.1 PEG 体系中的片段分选，在接头连接后，无需去除连接反应体系中的 PEG，直接在 110 μL 连接体系中进行两轮磁珠分选。

8.2.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

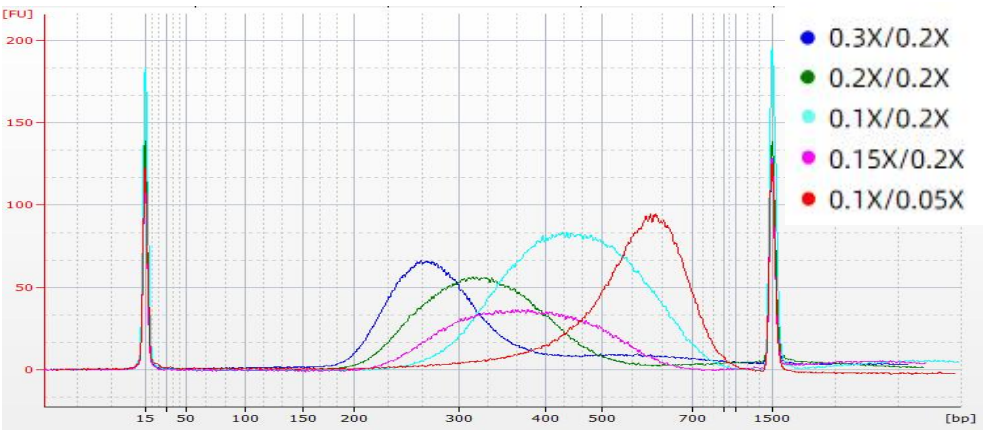
**表格 17. 短接头 PEG 体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 250 | 300 | 400 | 450 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 第一轮磁珠比例（AX） | 0.35 X | 0.25 X | 0.2 X | 0.1 X | 0.1 X | 0.1 X |
| 第二轮磁珠比例（BX） | 0.4 X | 0.2 X | 0.2 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.1 X |




**表格 18. 长接头 PEG 体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 270 | 350 | 470 |
|---|---|---|---|---|---|
| 第一轮磁珠比例（AX） | 0.3 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.1 X | 0.1 X |
| 第二轮磁珠比例（BX） | 0.2 X | 0.2 X | 0.2 X | 0.2 X | 0.05 X |



8.2.3 PEG 体系片段分选步骤如下：

1）磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。

2）在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。

3）将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。

4）向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。

5）将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

6）加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

7）重复步骤 6）。

8）保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

9）将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

10）将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，即可用于文库扩增。

**安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4°C保存 1 周，长期保存需置于-20°C，避免反复冻融。**

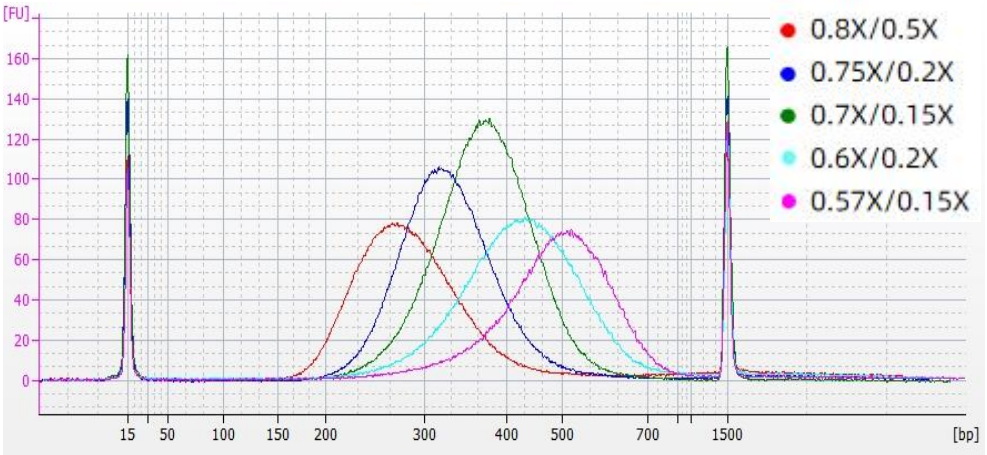
## 8.3 MGI 平台水相体系片段分选

8.3.1 水相体系中的片段分选，即在接头连接后，先进行 1×磁珠纯化，然后在纯化后的 100 μL 水相体系中进行两轮磁珠分选。

8.3.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

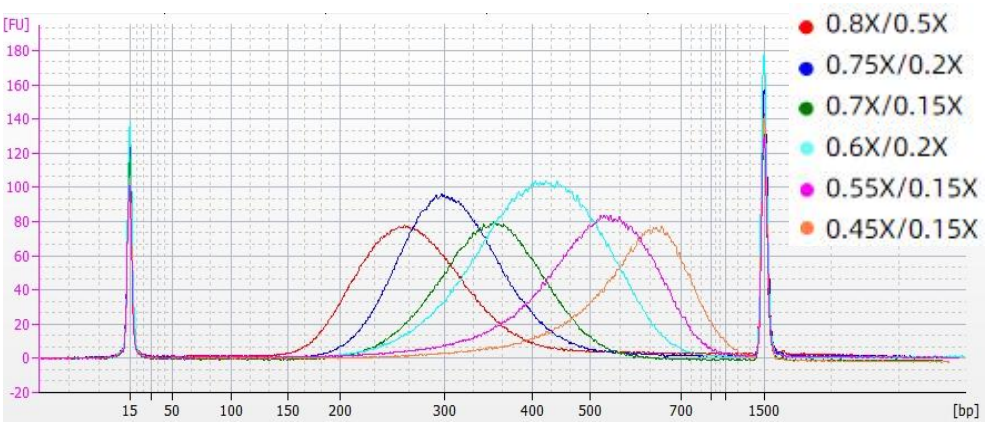
**表格 19. 短接头水相体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 250 | 300 | 400 |
|---|---|---|---|---|---|
| 第一轮磁珠比例（AX） | 0.8 X | 0.75 X | 0.7 X | 0.6 X | 0.57 X |
| 第二轮磁珠比例（BX） | 0.5 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.2 X | 0.15 X |




**表格 20. 长接头水相体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 180 | 240 | 300 | 400 | 500 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 第一轮磁珠比例（AX） | 0.8 X | 0.75 X | 0.7 X | 0.6 X | 0.55 X | 0.45 X |
| 第二轮磁珠比例（BX） | 0.5 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.15 X |



8.3.3 水相体系片段分选步骤如下：

1）磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。

2）在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 110 μL (1×) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

3）将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

4）加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

5）重复步骤 4）。

6）保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

7）将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

8）将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 100 μL 上清至一个新 PCR 管。

9）向接头连接纯化后的 100 μL 水相体系中加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。

10）将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。

11）向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。

12）将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

13）加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

14）重复步骤 13）。

15）保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

16）将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

17）将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，

即可用于文库扩增。

**安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4℃保存 1 周，长期保存需置于-20℃，避免反复冻融。**

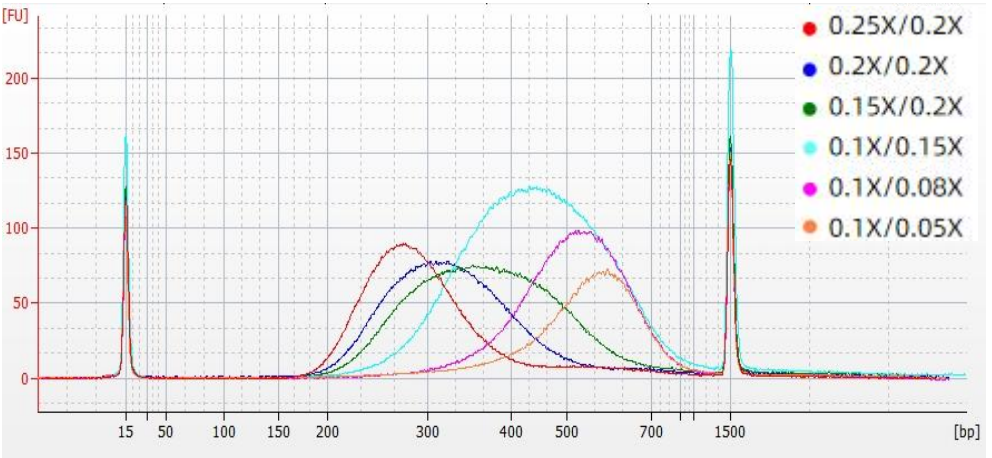
## 8.4 MGI 平台 PEG 体系片段分选

8.4.1 PEG 体系中的片段分选，在接头连接后，无需去除连接反应体系中的 PEG，直接在 110 μL 连接体系中进行两轮磁珠分选。

8.4.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

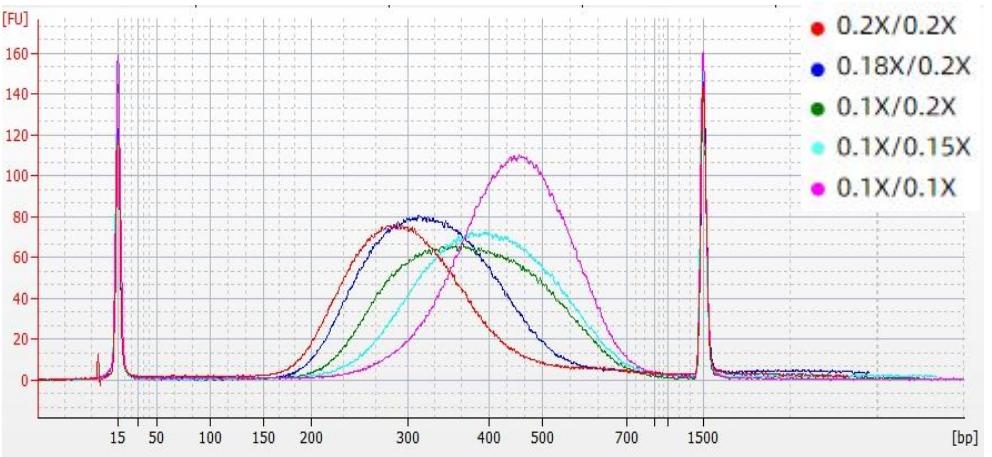
**表格 21. 短接头 PEG 体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 250 | 300 | 400 | 450 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **第一轮磁珠比例（AX）** | 0.25 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.1 X | 0.1 X | 0.1 X |
| **第二轮磁珠比例（BX）** | 0.2 X | 0.2 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.08 X | 0.05 X |



**表格 22. 长接头 PEG 体系，片段分选比例推荐**

| 文库 Insert Size (bp) | 150 | 200 | 240 | 280 | 330 |
|---|---|---|---|---|---|
| 第一轮磁珠比例（AX） | 0.2 X | 0.18 X | 0.1 X | 0.1 X | 0.1 X |
| 第二轮磁珠比例（BX） | 0.2 X | 0.2 X | 0.2 X | 0.15 X | 0.1 X |




8.4.3 PEG 体系片段分选步骤如下：

1）磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。

2）在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。

3）将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。

4）向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。

5）将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

6）加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

7）重复步骤 6）。

8）保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

9）将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

10）将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，即可用于文库扩增。

**安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4°C保存 1 周，长期保存需置于-20°C，避免反复冻融。**

## 8.5 减量体系推荐

减量体系是指起始 Input DNA 总量保持不变，末端修复与 3'A-tailing 体系减量，接头连接体系减量，但 PCR 体系不减量，反应程序保持不变。

本说明书推出供参考的减量体系，简要如下所示：

8.5.1 末端修复与 3'A-tailing 体系减量参照表格 23，反应程序保持不变。

**表格 23. 末端修复反应体系（减量体系）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | Input DNA | X μL |
| ● | End Prep Buffer II | 3.5 μL |
| ● | End Prep Enzymes | 1.5 μL |
| ○ | Nuclease-Free Water | Up to 30 μL |
| | 总体积 | 30 μL |

8.5.2 接头连接体系减量参照表格 24，反应程序保持不变。

**表格 24. 接头连接反应体系（减量体系）**

| | 组分 | 体积 |
|---|---|---|
| | 末端修复与 3’A-tailing 反应产物 | 30 μL |
| | Nuclease-Free Water | 2.5 μL |
| | Ligation Buffer | 15 μL |
| | Ligase Enzymes II | 5 μL |
| | Working Adapter（按表 3 稀释后的接头） | 2.5 μL |
| | 总体积 | 55 μL |

8.5.3 文库扩增体系和反应程序保持不变，参考表格 8-表格 14。

# 9. 附表

**表格 25. 试剂盒兼容接头及 Index 类型汇总**

| Index 类型 | 产品名称 | 货号 |
|---|---|---|
| Illumina UDI (8-base) | Unique Dual Index for Illumina MiniSet (8 indices) | RK21622 |
| | Unique Dual Index for Illumina MidiSet (24 indices) | RK21623 |
| | Unique Dual Index for Illumina Set_A (48 indices) | RK21624 |
| | Unique Dual Index for Illumina Set_B (48 indices) | RK21625 |
| | Unique Dual Index for Illumina Set_C (48 indices) | RK21626 |
| | Unique Dual Index for Illumina Set_D (48 indices) | RK21627 |
| Illumina UDI/UMI(8-base) | Unique Dual Index (with UMI) for Illumina MidiSet (24 indices) | RK21701 |
| | Unique Dual Index (with UMI) for Illumina Set_A (48 indices) | RK21702 |
| | Unique Dual Index (with UMI) for Illumina Set_B (48 indices) | RK21703 |
| Illumina UDI (8-base) | Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_A (UDI 1-96) | RK21706 |
| | Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_B (UDI 97-192) | RK21707 |
| | Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_C (UDI 193-288) | RK21708 |
| | Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_D (UDI 289-384) | RK21709 |
| Illumina UDI (10-base) | Truncated DNA Adapter Plate for Illumina Set A/B/C/D/E/F/G/H (10 nt, UDI Primers 1-768) | RK21731 - RK21738 |
| Illumina UDI (10-base) | Truncated DNA Adapter Plate for Illumina Set I/J/K/L/M/N/O/P (10 nt, UDI Primers 769-1536) | RK21739 - RK21746 |
| MGI UDI (10-base) | Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI MidiSet | RK21687 |
| | Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI Set A | RK21688 |
| | Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI Set B | RK21689 |
| MGI UDI (10-base) | Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set A (UDI Primers | RK21721 |
| | Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set B (UDI Primers | RK21722 |
| | Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set C (UDI Primers | RK21723 |
| | Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set D (UDI Primers | RK21724 |

## 中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地

项目一期 5 号楼

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院

2 号楼 4 楼

美国研发中心：86 Cummings Park Dr ,Woburn, MA 01801, United States

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com