FS Pro DNA Lib Prep Kit V2

RK20275

www.abclonal.com.cn

Version：N17E04v1.2

目录

1. 产品概述 2

2. 产品组分 3

3. 产品保存 3

4. 产品应用 3

5. 其它自备材料 4

6. 注意事项 5

7. 操作流程 8

第一步 片段化与末端修复 8

第二步 接头连接 9

第三步 文库扩增 10

8. 附录 14

附录一. 片段分选（可选） 14

附录二. 实验实例 15

附录三. 极低投入量建库 20

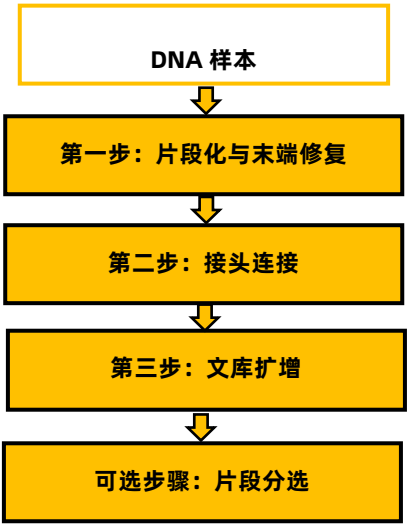
9. 附表 22

1. 产品概述

FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 是一款兼容 Illumina 和 MGI 高通量测序平台开发设计的新一代基于酶切片段化的建库试剂盒。本试剂盒将 DNA 样本片段化、末端修复与加 dA 合并为一步，并且无需纯化，直接可以进行测序接头连接。从而大幅简化了实验流程，极大的减少了建库的时间，整个实验过程可以在 2 hr 内完成。本试剂盒对不同物种和不同投入量的 DNA 样本具有良好的兼容性。对于不同样本溶剂有良好兼容性，并能够适配自动化工作平台。通过体系优化，大幅减少了假阳性的产生，提高了测序结果的准确性。对于 FFPE 样本，该试剂盒在建库产量上展现出了卓越的性能。另外本试剂盒还可以用于 PCR-Free 文库构建（例如：高质量基因组 Input DNA 100 ng）。

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。

FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 建库流程



2. 产品组分

表格 1. 试剂盒组分表

		组分名称	24 次	96 次
片段化与末端修复	●	FS Pro Buffer I	120 μL	480 μL
	●	FS Pro Enzymes II	312 μL	1248 μL
	○	Nuclease-Free water	2 mL	10 mL
	○	1X TE Buffer	2 mL	10 mL
接头连接	●	FS Pro Ligation Buffer II	480 μL	1920 μL
	●	Ligase Enzymes	120 μL	480 μL
文库扩增	●	2X PCR Mix	600 μL	2400 μL
	●	10X ILM PCR Primers	120 μL	480 μL
	●	MGI PCR Primer Mix	120 μL	480 μL

3.产品保存

运输与保存：FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 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

FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 建库试剂盒适用于 DNA 二代测序文库构建，主要功能模块包括片段化、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、FFPE DNA）。对于极低

起始量的样本，也可以尝试进行建库（0.1 ng~1ng 投入量，具体实验参数详见**附录三．极低投入量建库**）。综上，FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 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宏基因组测序；

5. 其它自备材料

磁珠：AFTMag NGS DNA Clean Beads（ABclonal， Cat. No. RK20257）或 Agencourt™AMPure XP Beads (Beckman Coulter Inc., Cat. No. A63880)。

质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效 DNA 质控产品；Qubit（ABclonal， Cat. No. RK30141）或其他等效的基于荧光法检测核酸浓度的产品。

适用于 Illumina®平台的测序接头：

双端 UDI 短接头（Cat. No.RK21622、RK21623、RK21624、RK21625）；

双端 UDI、双端 UMI 短接头（Cat. No.RK21701、RK21702、RK21703）；

双端 UDI 长接头板（Cat. No.RK21706、RK21707、RK21708、RK21709）。

适用于 MGI 平台的测序接头：

双端 UDI 短接头（Cat. No.RK21686、RK21687、RK21688、RK21689）；

双端 UDI 短接头板（Cat. No.RK21721、RK21722、RK21723、RK21724）。

其他材料：

Nuclease-Free Water、无水乙醇(80%的乙醇需现配现用)、低吸附 EP 管、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、

单道移液器和多道移液器等。

6. 注意事项

6.1 关于样本

6.1.1 为了得到良好的建库结果，实验开始前需要确保 DNA 样本的质量合格。并且建议实验开始前用 Qubit®或其他基于荧光法定量仪器对 Input DNA 定量。另外需要注意，样本中的杂质，如：微量残留的 RNA、核苷酸、单链 DNA 以及其它污染物都可能会对文库的构建产生影响。

6.1.2 如样本杂质较多，可以在实验前，使用 2.2X 磁珠进行纯化。

6.2 关于片段化

6.2.1 样本用 Nuclease-Free Water，1X TE Buffer, EB（Elution Buffer），Low-EDTA TE Buffer 等常见溶剂溶解，对于片段化的影响较小，均可正常进行实验。如样本使用特殊溶剂进行溶解，可以尝试进行实验。如无法片段化到预期的大小，建议可以进行一次 2.2X 的磁珠纯化后，将样本溶于 Nuclease-Free Water。

6.2.2 FFPE DNA 样本或其他严重降解样本，根据其降解程度不同，推荐片段化时间为 5-10 min。

6.2.3 片段化对温度较敏感，实验时请在冰上操作。反应体系配置完成后，请立即放入 PCR 仪进行反应。

6.3 关于连接

6.3.1 本试剂盒不包含接头，接头需要单独购买。

6.3.2 接头的使用量会影响连接效率和文库产量。样本起始量较少时，可以用 Low-EDTA TE Buffer 稀释接头。表格 2 是不同样本起始量，推荐的接头稀释倍数。

表格 2. 接头稀释表

Input DNA	稀释倍数	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
1ng~5 ng	20 倍稀释	0.75 μM
100 pg~1 ng	60~200 倍稀释	0.075~0.25 μM

6.4 关于磁珠纯化与分选

6.4.1 磁珠在使用前，需室温平衡 30min。否则可能影响回收效率和分选效果。

6.4.2 磁珠在使用前，需充分震荡或移液器吹打混匀。

6.4.3 磁珠漂洗用的 80%乙醇应新鲜配制。

6.4.4 产物洗脱前应将磁珠充分干燥。干燥不充分导致乙醇残留，可能影响后续实验。干燥过度会导致磁珠开裂，降低回收效率。

6.4.5 磁珠纯化或分选产物如需保存，可使用 1X TE Buffer 溶解。

6.4.6 文库磁珠片段长度分选是可选步骤，推荐在接头连接，磁珠纯化后进行。连接体系含有高浓度 PEG，不建议直接进行分选，推荐在纯化之后进行分选。

6.4.7 文库磁珠片段长度分选会损失较多 DNA，如需要分选，建议 Input DNA 量大于 50 ng。

6.5 关于文库扩增

6.5.1 文库扩增步骤需要严格控制 PCR 循环数。循环数不足，会导致文库产量低；循环数过高，会导致偏好性增加，扩增突变累积等问题。表格 3 是使用本试剂盒，获得 1 ug 文库的推荐 PCR 循环数。

表格 3. 推荐文库扩增循环数

Input DNA（ng）	1 μg 文库产量推荐 PCR 循环数*
1000	2-3
500	3-4
250	4-5
100	5-6
50	6-7
25	7-9
10	9-11
1	13-15

*注：FFPE 样本在此基础上增加 1-3 个循环数。

6.5.2 文库扩增引物需要与接头相互匹配。如使用 Truncated Adapter 进行连接，则需要使用包含 Index 的长引物进行扩增；如使用 Full Adapter 进行连接，则需要使用对应平台的通用短引物进行扩增。

7. 操作流程

第一步 片段化与末端修复

1.1 PCR 仪预热到 32℃。

1.2 在置于冰上的无菌 PCR 管中准备如下反应体系：

表格 4. 片段化与末端修复反应体系

	试剂	体积
	Input DNA	X μL
●	FS Pro Buffer I	5 μL
●	FS Pro Enzymes II	13 μL
○	1X TE Buffer	Up to 50 μL
	总体积	50 μL

1.3 使用移液器上下吹打或震荡，保证体系充分混匀后，短暂进行离心。

1.4 立即将 PCR 管放到提前预热到 32℃的 PCR 仪上，运行表格 5 中反应程序，PCR 仪热盖设置为 82℃；在 4℃ Hold 建议不超过 1 hr。

表格 5. 片段化与末端修复反应程序

温度	时间
32℃	5-25 min
72℃	30 min
4℃	建议不超过 1 hr

表格 6. 片段化时间（32℃）：根据需要的目标插入片段大小调整

目标插入片段大小	片段化时间	时间优化范围
225 bp	20 min	18-25 min
250 bp	15 min	13-17 min
300 bp	10 min	8-12 min
500 bp	5 min	4-6 min

*注：上述推荐片段化时间，为使用 100ng NA12878 人类基因组标准品所得。其它类型的高质量 DNA 样本，相同的片段化时间，所得到的片段化产物大小基本一致。FFPE 等降解严重样本，可以适当缩短片段化时间，一般 5 min 左右即可。

第二步 接头连接

2.1 准备如下反应体系：

表格 7. 接头连接反应体系

	试剂	体积
	End Prep Reaction Mix (步骤 1.4)	50 μL
○	FS Pro Ligation Buffer II	20 μL
○	Ligase Enzymes	5 μL
	Working Adapter（按表 2 稀释后的接头）	5 μL
	总体积	80 μL

*注：所有操作均于冰上进行。FS Pro Ligation Buffer II、Ligase Enzymes 可配制预混液，但 Working Adapter 必须单独添加。若将三者直接混合，会产生大量接头二聚体，严重影响产量！**（重要！）**

2.2 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，反应程序见表 8， PCR 仪不设热盖。

表格 8. 接头连接反应程序

温度	时间
22℃	15 min
4℃	∞（降至 4℃立即进行下一步）

2.3 表格 8 反应结束后，每个样本中加入 64 μL (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads ，涡旋混匀。室温孵育 5 min。

2.4 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）。

2.5 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

2.6 重复步骤 2.5。

2.7 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，干燥至无乙醇残留。

2.8 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。（如样本投入量为 1ng 及以下，建议直接将重悬后的磁珠加入下一步的 PCR 反应，以提高文库产量。）

2.9 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。

2.10 如果对文库大小有严格需求，可以 2.9 步骤结束后，进行片段分选，分选方案参照附录。如果不需要片段分选，直接进行文库扩增步骤。

安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4℃/-20℃保存 1-2 周左右。

第三步 文库扩增

本试剂盒可使用全长或截短型的接头，请根据接头类型选择表格 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 配制如下 PCR 反应体系：

表格 9. 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
PCR Index Primer （MGI Index）	2.5 μL
Universal PCR Primer （MGI Universal PCR Primer）	2.5 μL
总体积	50 μL

表格 10. 文库扩增体系（短接头-双端 CDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
2X PCR Mix	25 μL
I5 Primer	2.5 μL
I7 Primer	2.5 μL
总体积	50 μL

表格 11. 文库扩增体系（短接头-双端 UDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
2X PCR Mix	25 μL
UDI Primer （MGI UDI Primer）	5 μL
总体积	50 μL

表格 12. 文库扩增体系（长接头）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
2X PCR Mix	25 μL
10X ILM PCR Primers（MGI PCR Primer Mix）	5 μL
总体积	50 μL

3.2 移液器吹打混匀并瞬时离心。

3.3 设置如下 PCR 扩增程序：

表格 13. 文库扩增程序

温度	时间	Cycles
98℃	1 min	1
98℃	10 s	2-15 PCR Cycles
60℃	30 s	
72℃	30 s	
72℃	1 min	1
4℃	∞	1

3.4 向扩增产物中加入 50 μL (1X) AFTMag NGS DNA Clean Beads ，混匀。室温下孵育 5 min。

3.5 将样本于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。

3.6 保持 PCR 管在磁力架上，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 管从磁力架上取出，再加入 31 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

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℃/-20℃保存 1-2 周左右。

8.附录

附录一. 片段分选（可选）

表格 14. AFTMag NGS DNA Clean Beads 用量

分选步骤	接头连接纯化后	接头连接纯化后	接头连接纯化后
插入片段大小 (bp)	350~400	300~350	280~330
文库大小 (bp)	475~525	425~475	400~450
第一轮磁珠比例	0.6X（60 μL）	0.65X（65 μL）	0.7X（70 μL）
第二轮磁珠比例	0.15X（15 μL）	0.15X（15 μL）	0.15X（15 μL）

以 0.65X / 0.15X 的分选条件进行示例：

1.1 将需要分选的样本（7. 操作流程 - 第二步 接头连接 - 步骤 2.9 连接产物）加 Nuclease-Free Water 补足 100 μL 。加入 0.65X (65 μL)第一轮分选磁珠，移液器吹打混匀。室温下孵育 5 min。

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

1.3 向上述上清液中加入 0.15X (15 μL)第二轮分选磁珠，移液器吹打混匀。室温下孵育 5 min。

1.4 将样本于磁力架上静置 2 min，溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。

1.5 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

1.6 重复步骤 1.5。

1.7 保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至

无乙醇残留。

1.8 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上 DNA 充分释放。

1.9 将样本于磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中用于后续实验。

安全停止点：纯化后的 PCR 产物可以暂时放置在 4℃/-20℃保存 1-2 周左右。

附录二. 实验实例

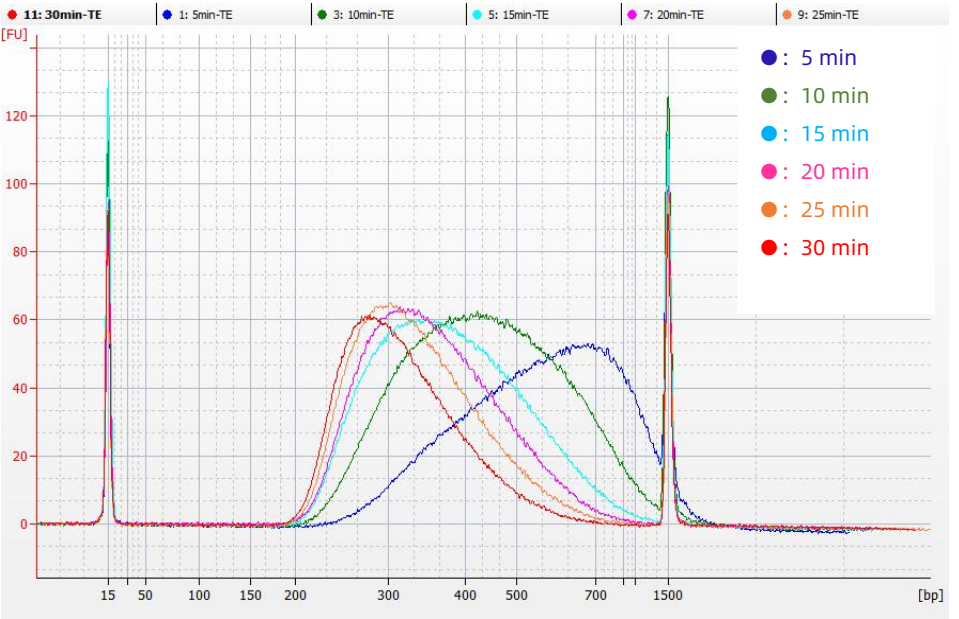


图 1. DNA 样本不同片段化时间文库大小。DNA 样本为 NA12878 人类基因组 DNA 标准品，投入量为 100 ng，32℃片段化时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

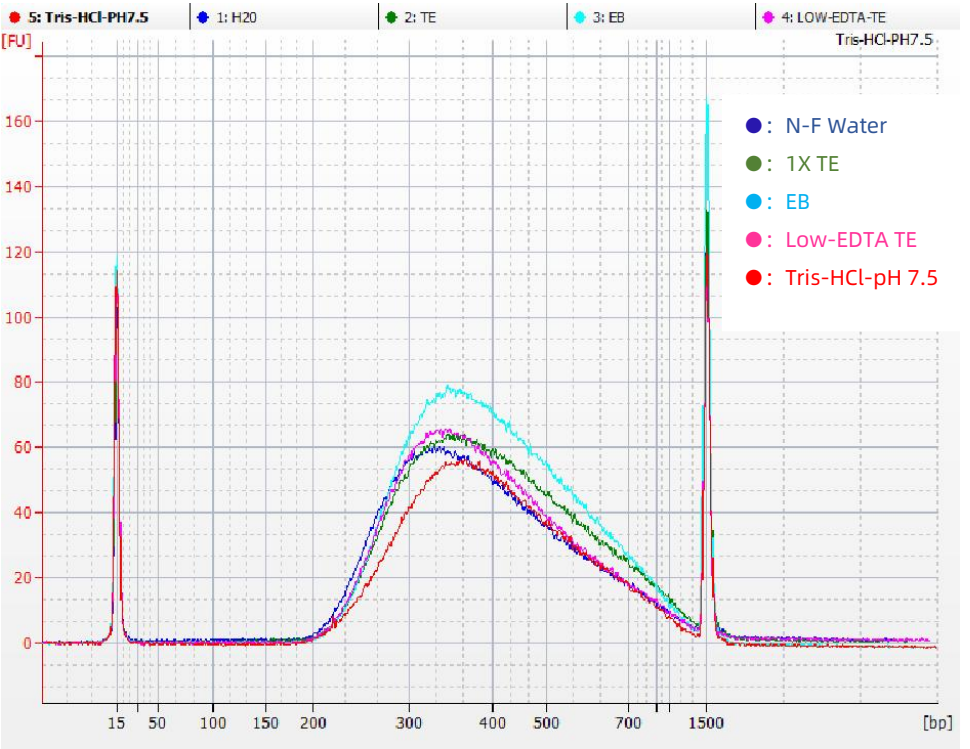


图 2. DNA 样本溶于不同溶剂的文库大小。DNA 样本为 NA12878 人类基因组 DNA 标准品，投入量为 100 ng。分别溶于 32 μL 的 Tris-HCl-pH 7.5，Nuclease-Free Water，1X TE Buffer, EB（Elution Buffer）, Low-EDTA TE Buffer，32℃片段化时间 15 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

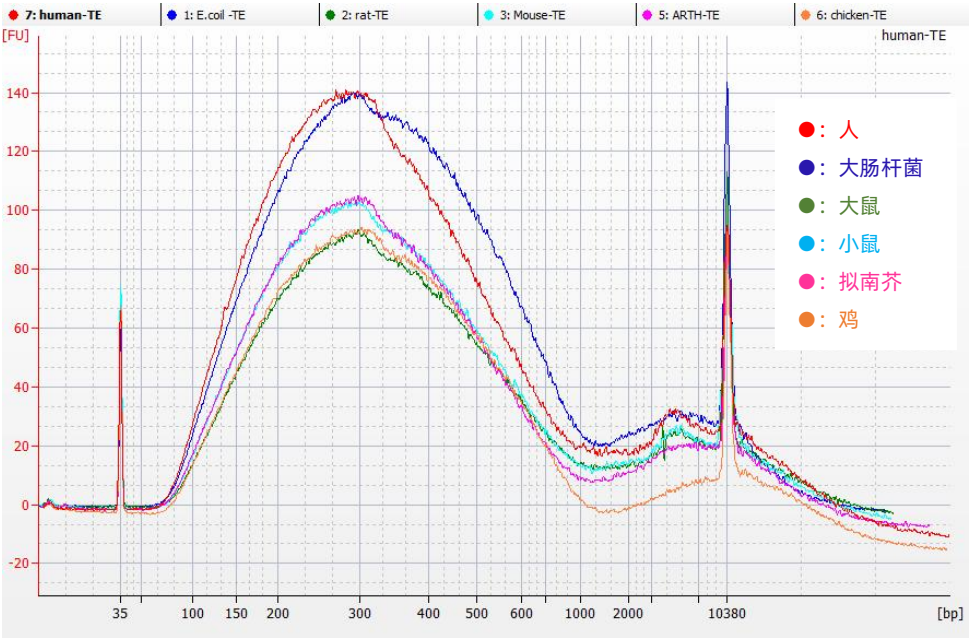


图 3. 不同样本类型文库大小。DNA 样本分别为人、大鼠、小鼠、鸡、拟南芥、大肠杆菌的 DNA，投入量为 100 ng，32℃片段化时间为 10 min。片段化产物使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

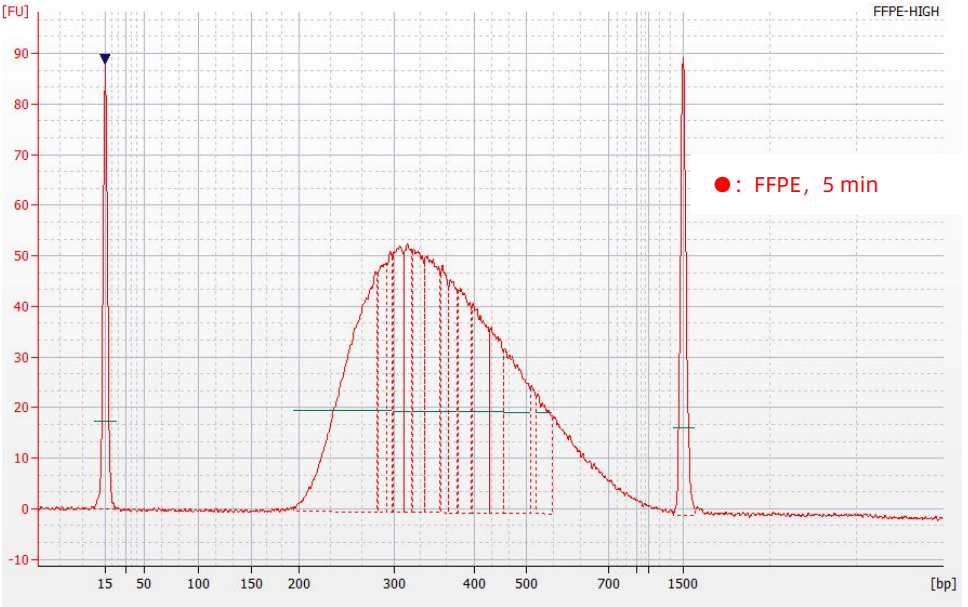


图 4. FFPE 样本文库大小。DNA 样本为 FFPE 样本，投入量为 100 ng，32℃片段化时间为 5 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

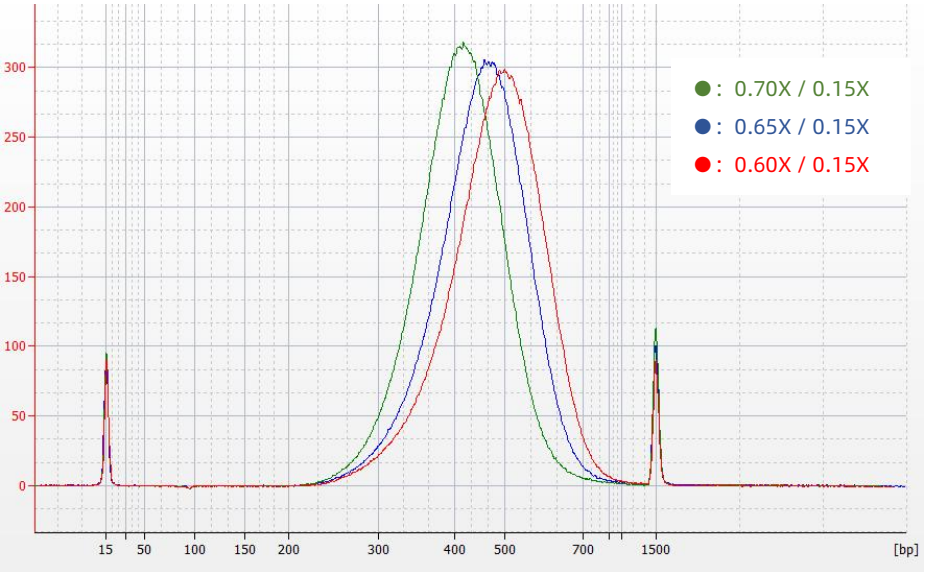


图 5. 片段分选结果展示。DNA 样本为 NA12878 人类基因组 DNA 标准品，投入量为 100 ng，32℃片段化时间为 10 min，连接纯化后，分别使用 0.6X/0.15X 、0.65X/0.15X 、0.7X/0.15X 的条件进行分选。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

附录三. 极低投入量建库

3.1　对于 100 pg - 1 ng 投入量的建库实验，请参考以下实验条件进行片段化和接头稀释：

表格 15.极低投入量实验条件

样本投入量	片段化时间	接头稀释倍数
100pg	5 min	120-200
200pg	5 min	120-200
500pg	5 min	120
1000pg	5 min	60

3.2　文库扩增体系的配制请参考表格 16，扩增循环数请参考表格 17。其他实验条件参考常规投入量建库。

表格 16. 文库扩增体系（短接头-双端 UDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
2X PCR Mix	25 μL
UDI Primer （MGI UDI Primer）	3 μL
Nuclease-Free Water	2 μL
总体积	50 μL

表格 17. 100 pg - 1 ng 投入量循环数建议

样本投入量	PCR 循环数*
100pg	19
200pg	18
500pg	17
1000pg	15

*注：上述推荐循环数，为使用 NA12878 人类基因组标准品所得。FFPE 等降解严重样本，可以适当增加循环数 1-2 个。

9. 附表

表格 18. FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 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