

Wano Universal DNA Library Prep Kit for Illumina







A1220524/A1220596

Version21.1

产品概述

Wano Universal DNA Library Prep Kit for Illumina是针对 Illumina高通量测序平台专门开发设计的新一代酶切法建库试剂盒。与传统的建库法相比，本品采用高质量的片段化酶，摆脱了繁琐的超声过程，同时简化了操作流程，将片段化模块与末端修复模块合二为一，极大的降低了建库的时间和成本。本试剂盒具有优秀的文库转化率，可应用于常规动植物基因组、微生物基因组等样本，同时能兼容 FFPE DNA 样本的建库。经测序验证，不同 GC 含量的样本，均可获得优异的测序结果，文库覆盖度高，均一性好，偏好性低，使建库变得更加简单高效。

产品组分

组分编号与名称	组分	A1220524 (24T)	A1220596 (96T)
12205-A 	Smearase [®] Buffer	240 μL	960 μL
12205-B 	Smearase [®] Enzyme	120 μL	480 μL
12203-C 	Ligation Enhancer	720 μL	3×960 μL
12203-D 	Novel T4 DNA Ligase	120 μL	480 μL
12203-E 	Canace [®] Pro Amplification Mix	600 μL	4×600 μL
12203-F 	Primer Mix	120 μL	480 μL

保存条件

冰袋运输。所有组分-20 °C 保存，有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 各组分试剂在使用前应充分溶解并混匀，短暂离心后置于冰上待用。
3. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
4. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
5. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
6. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
7. 本产品仅作科研用途！

二、关于 DNA 片段化

1. 本试剂盒兼容范围为 500 pg – 1 μg Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8-2.0 的高质量 Input DNA。
2. 若 Input DNA 中引入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响后续实验，建议将 DNA 稀释在纯水中进行片段化。
3. 对于常规的高质量基因组 DNA，酶切时间参考表 5，本试剂盒片段化偏好低，耐受各种 GC 含量的模板。对于不同降解程度的 FFPE 样本，酶切时间参考表 6。以上为推荐时间，需客户在自己的实验体系中进行微调，以达到最佳效果。
4. 为保证优质精确的片段化效果，片段化反应配制过程请于冰上操作。

三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 针对 Illumina 测序平台，Wano 提供 4 组共计 96 种 Barcoded Adapters，可根据需求采购：NGS UDI Adapter Kit for Illumina Group A、Group B、Group C、Group D (A010196A、A010196B、A010196C、A010196D)
2. Adapter 的质量和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 1 列举了使用本试剂盒，不同 Input DNA 量推荐的 Adapter 使用量。

表1 500pg-1 μg Input DNA 推荐的 Adapter 使用浓度

Input DNA	Adapter : Input DNA 摩尔比	Input DNA	Adapter : Input DNA 摩尔比
1 μg	10:1	50 ng	100:1
500 ng	20:1	25 ng	200:1
250 ng	40:1	1 ng	200:1
100 ng	100:1	500 pg	400:1

【注】：Input DNA 摩尔数 (pmol) ≈ Input DNA 质量 (ng) / [0.66 × Input DNA 平均长度 (bp)]。

四、关于磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection)

1. 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。
2. 当 Input DNA 质量 ≥ 50 ng，您可选择在接头连接后分选；如 Input DNA 质量 < 50 ng，建议在文库扩增后进行分选。
3. Ligation Enhancer 中包含高浓度的 PEG，会对双轮分选产生显著影响。因此，如在接头连接后进行长度分选，须先进行纯化、再进行双轮分选步骤；如在末端修复/dA 尾添加之前或文库扩增后进行长度分选，可直接进行双轮磁珠分选步骤。
4. 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。
5. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
6. 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。
7. 磁珠漂洗使用的 80% 乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
8. 进行长度分选时，初始样品体积应尽量 ≥ 100 μL，不足时请用超纯水补齐。以防因样品体积太小导致移液误差增大。
9. 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。
10. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱，产物可于 4°C 可保存 1-2 周，-20°C 可保存 1 个月。

五、关于文库扩增 (Library Amplification)

文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 2 列举了使用本试剂盒，获得 1 μg 文库的推荐循环数。

表2 500pg-1 μg Input DNA 获得 1000ng 产物扩增循环数推荐表

Input DNA (ng)	Number of cycles required to generate (1000 ng)
1000	2-4
500	3-5
250	4-6
100	5-7
50	7-8
10	9-11
5	10-12
1	12-14
0.5	13-15

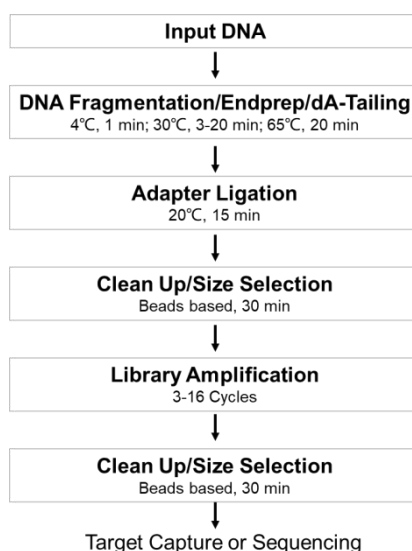
六、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

- 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。
- 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit®、PicoGreen®等；基于 qPCR 绝对定量的方法。
- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 推荐使用qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit®、PicoGreen®等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物以及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或两端都不连接Adapter 的不可测序文库干扰。
- 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

使用说明

- 纯化磁珠：Wano Normal DNA Clean Beads (A020101/A020102) 或其他等效产品。
- DNA 质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
- DNA Adapter：针对针对Illumina®测序平台，可选用Wano提供的 96 种 Barcoded Adapters。
- 其他材料：无水乙醇、超纯水、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程



三、操作步骤

3.1 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragmentation/End-repair/dA-Tailing)

该步骤将基因组 DNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

- 将表 3 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
- 于冰上配制表 3 反应体系。

表3 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	体积 (μL)
Input DNA	x
Smearase Buffer	10
Smearase Enzyme	5
ddH2O	Up to 60

- 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 4 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表4 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105℃	On
4℃	1 min*
30℃	3-20 min**
72℃	20 min
4℃	Hold

【注】：*DNA 片段化过程为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4℃，待模块温度降至 4℃ 时，将 PCR 管放入 PCR 仪即可。**对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 5；对于质量不一的 FFPE DNA 样本，酶切时间参考表 6。

表5 常规基因组DNA 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
热盖 105℃	On	
600 bp	8 min	6-12 min
350 bp	10 min	8-14 min
250 bp	12 min	10-15 min
200 bp	15 min	13-18 min
150 bp	20 min	15-25 min

表6 FFPE DNA 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间	DIN*
热盖 105℃	On	
250 bp	9-13 min	> 8.0
250 bp	8-11 min	6.5-8.0
250 bp	4-8 min	4.2-6.5
250 bp	3-6 min	2.5-4.2

【注】：*DIN 为 DNA Integrity Number，是用 Agilent 2200 来定义 FFPE DNA 降解程度的一种方法，详见图 2。

3.2 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤将 3.1 步骤的产物末端，连接特定的 Illumina® 接头。

1. 根据 Input DNA 量按表 1 稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 7 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 于 3.1 步骤 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表7 Adapter Ligation PCR 体系

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA (3.1 步骤产物)	60
Ligation Enhancer	30*
Novel T4 DNA Ligase	5**
Adapter	5

【注】：*Ligation Enhancer 比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

**本公司接头浓度与常规商业化试剂盒一致，皆为 15 μM。请根据注意事项三中的提示，对接头进行稀释，加水补齐，使接头体积为 5 μL。

【接头添加计算举例】：

当 Input DNA 为 100 ng，Input DNA 长度为 300 bp 时，接头应该添加多少？

第一步：计算 Input DNA 摩尔数。公式：Input DNA 摩尔数 (pmol) = Input DNA 质量 (ng) / [0.66 × Input DNA 平均长度 (bp)]；

Input DNA 摩尔数 (pmol) = 100 ÷ (0.66 × 300) = 0.5 pmol；

第二步：计算接头添加摩尔数。根据注意事项三表 1 查询接头添加比例；

根据表 1，查得 Input DNA 100 ng 时接头添加比例 100:1，则接头添加摩尔数 = 100 × 0.5 pmol = 50 pmol；

第三步：计算接头添加体积。接头浓度 = 15 μmol/L (如使用其他接头，浓度需要依据其他接头浓度参数)；

接头添加体积 = 接头添加摩尔数 (50 pmol) ÷ 接头浓度 (15 μmol/L) = 3.34 μL (注：15 μmol/L = 15 pmol/μL)

综上，接头可添加 3.4 μL，加 1.6 μL 水补齐至 5 μL。(注：接头最大加入体积不超过 5 μL)。

- 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 8 所示反应程序，进行接头连接反应。

表8 Adapter Ligation PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105°C	Off
20°C	15min*
4°C	Hold

3.3 连接产物磁珠纯化 (Post Ligation Clean Up)

该步骤使用磁珠对 3.2 步骤的产物进行纯化或分选。纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。

3.3.1 纯化操作步骤

- 准备工作：将 Normal DNA Clean Beads (A020101/A020102) 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
- 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- 吸取 60 μ L Normal DNA Clean Beads (A020101/A020102) (0.6 \times , Beads:DNA=0.6:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋混匀或移液器吹打10次混匀，室温孵育 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
- 重复步骤 5，总计漂洗两次。最后使用 10 μ L 小枪头吸去残余液体。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。
- 将 PCR 管从磁力架中取出，进行洗脱：
 - 如产物无需进行片段分选，直接加入 21 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。
【注：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱】。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 5 min），小心移取 20 μ L 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。
 - 如产物需进行双轮分选，加入 102 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。【注：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱】。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 5 min），小心移取 100 μ L 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

3.3.2 双轮分选操作步骤

- 准备工作：将 Normal DNA Clean Beads (A020101/A020102) 磁珠由冰箱中取出，室温平衡 30 min。配制80%乙醇。
- 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
- 根据 DNA 片段长度要求，参考表9向上述 100 μ L DNA 上清中加入第一轮分选磁珠，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀。

表9 磁珠文库分选推荐比例

DNA 文库插入片段大小	150-250bp	200-300bp	300-400bp	400-500bp	500-600bp
DNA 文库大小	250-350bp	350-450bp	450-550bp	550-650bp	650-750bp
第一轮体积比 (Beads:DNA)	0.80 \times	0.70 \times	0.60 \times	0.55 \times	0.50 \times
第二轮体积比 (Beads:DNA)	0.20 \times	0.20 \times	0.20 \times	0.15 \times	0.15 \times

【注】：表中“ \times ”表示样品 DNA 体积。如文库插入片段长度为 250 bp，样品 DNA 体积为 100 μ L，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.70 \times 100 μ L=70 μ L；第二轮分选磁珠使用体积为 0.20 \times 100 μ L=20 μ L；表中所推荐比例是针对于 Adapter Ligated Insert DNA (Post Ligation)，如果用户在接头连接前进行分选，请采用磁珠说明书中推荐的比例。

- 室温孵育 5 min。
- 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移上清到干净的离心管中。
- 参考表 9 向上清中加入第二轮分选磁珠。
- 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。

8. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
9. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
10. 重复步骤 9，总计漂洗两次。最后使用 10 μ L 小枪头吸去残余液体。
11. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）。
12. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入适量 21 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
13. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 5 min），小心转移 20 μ L 上清至干净的管中。

3.4 文库扩增 (Library Amplification)

该步骤将对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 10 中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 10 所示反应体系。

表10 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μ L)
2 \times Canace® Pro Amplification Mix	25
Primer mix*	5
Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)	20

【注】：*如果使用的是完整接头，使用试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用了不完整的接头请参照上述试剂盒说明书，使用其中配备的 Index Primer 进行扩增。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 11 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 11 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98° C	1 min	1
98° C	10 sec	
60° C	30 sec	参照表 2
72° C	30 sec	
72° C	5 min	1
4° C	Hold	-

3.5 扩增产物磁珠纯化或分选 (Clean Up Post Amplification /Size Selection)

同 3.3.1 步骤中纯化操作步骤。使用 Wano Normal DNA Clean Beads (A020101/A020102) (0.9 \times ，Beads:DNA=0.9:1) 纯化文库扩增产物。如需分选，操作方法同 3.3.2 双轮分选步骤。

3.6 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项六。