

VAHTS® Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI V2

NDM627



Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com



使用说明书

Version 21.1

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	03
06/注意事项	03
06-1/关于Input DNA和Fragmentation	03
06-2/关于DNA Adapter	04
06-3/关于Adapter Ligation产物纯化	04
06-4/关于磁珠的使用	05
06-5/关于长度分选	06
06-6/关于Library Amplification	06
06-7/关于文库的质量控制	07
06-8/其他注意事项	07
07/实验原理与流程概要	08
08/实验流程	10
附录一、双轮磁珠分选	14
附录二、实验实例	16
附录三、多样本片段化方案	17

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI V2是针对MGI高通量测序平台定向开发的片段化酶法DNA文库构建试剂盒。本试剂盒针对原有版本进行了优化升级，在保持原有高性能的基础上显著降低了FFPE样本DNA文库中的Artificial Invert Chimera Reads比例，提高了SNV等检出的可靠性。本试剂盒将DNA片段化、末端修复以及末端加dA尾合并为一步，产物无需纯化，直接进行接头连接、文库富集和分选，可将100 pg - 1 μg模板DNA转换成MGI高通量测序平台专用文库。本试剂盒可完美兼容不同来源和不同投入量的DNA，仅需根据目标插入片段大小调整片段化时间，即可得到所需片段大小文库。试剂盒中提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

02/产品组分

组分	NDM627-01 (24 rxns)	NDM627-02 (96 rxns)
■ FEA Buffer V2	120 μl	480 μl
■ FEA Enzyme Mix V2	240 μl	960 μl
■ Rapid Ligation Buffer V2	600 μl	4 × 600 μl
■ Rapid DNA Ligase V2	120 μl	480 μl
■ VAHTS HiFi Amplification Mix	600 μl	4 × 600 μl
■ PCR Primer Mix for MGI	120 μl	480 μl
□ Neutralization Buffer	120 μl	480 μl
■ Control DNA (100 ng/μl)	10 μl	10 μl

▲ Control DNA为鲑鱼基因组DNA。

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

04/适用范围

适用于制备MGI高通量测序平台专用文库。兼容起始投入量为100 pg - 1 μg，适用于动物、植物、微生物等不同物种来源基因组DNA (Genomic DNA)，石蜡切片DNA (FFPE DNA)等。可应用于：

- ◇全基因组测序
- ◇全外显子或其他靶向捕获测序
- ◇宏基因组测序

05/自备材料

纯化磁珠：VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme #N411)；

DNA质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品；

Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ121)；

DNA Adapter：VAHTS DNA Adapters for MGI (Vazyme #NM108)；

VAHTS PCR-Free DNA Adapters for MGI (Vazyme #NM10901-NM10904)；

#NM108为单端10 bp Indexed Adapters,共96种；

#NM10901-NM10904为单端10 bp PCR-Free Indexed Adapters,共96种；

其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水；

低吸附EP管、PCR管、磁力架、PCR仪等。

06/注意事项

受样本、方案、设备、操作等诸多因素影响，文库构建流程参数可能需要根据实际情况进行调整。为了能够获得高质量的测序文库，请务必仔细阅读下述注意事项。使用过程中如遇任何问题，可联系Vazyme技术支持获取帮助：400-600-9335或support@vazyme.com。

06-1/关于Input DNA和Fragmentation

1. 试剂盒兼容的Input DNA量范围为100 pg - 1 μg。应尽可能使用A260/A280 = 1.8 - 2.0的高质量Input DNA。Table 1中列举了常见应用中推荐的Input DNA量。

Table 1. 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/靶向捕获测序	FFPE DNA	≥50 ng
全基因组测序	微生物基因组	1 ng - 1 μg
全基因组测序 (PCR-Free文库)	复杂/简单基因组	≥50 ng (不进行长度分选)
		≥200 ng (进行长度分选)

▲上表为使用高质量DNA时推荐的Input DNA量，当Input DNA质量较差时，应适当上调使用量。

2. 推荐使用灭菌超纯水溶解DNA样品，FEA Enzyme Mix V2对EDTA敏感，请确认DNA样品中EDTA浓度，如打断未修反应体系中EDTA终浓度大于0.1 mM，请按照08/实验流程/步骤一(Page.10)操作说明对DNA样本进行预处理。

06-2/关于DNA Adapter

1. 针对MGI测序平台，Vazyme提供两套Indexed Adapters，可根据不同使用需要和Pooling的样本数量选择：
#NM108为单端10 bp Indexed Adapters,共96种；
#NM10901-NM10904为单端10 bp PCR-Free Indexed Adapters,共96种；
2. DNA Adapter的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。Adapter投入量过高可能会导致Adapter或Adapter Dimer残留；投入量不足又会影响连接效率进而导致文库产出降低。Table 2列举了不同Input DNA量推荐的Adapter使用量。

Table 2. 100 pg - 1 μg Input DNA推荐的Adapter使用浓度

Input DNA	Adapter: Input DNA 摩尔比	其他来源Adapter 工作浓度	Vazyme Adapter 预稀释倍数
500 ng - 1 μg	10:1 - 20:1	10 μM	不稀释
100 - 500 ng	20:1 - 100:1	10 μM	不稀释
25 - 100 ng	50:1 - 200:1	5 μM	1:2
5 - 25 ng	40:1 - 200:1	1 μM	1:30
100 pg - 5 ng	60:1 - 3,000:1	0.1 - 0.2 μM	1:400 - 1:60

▲ Input DNA摩尔数可根据下述公式粗略计算：

Input DNA摩尔数 (pmol) ≈ Input DNA质量 (ng) / [0.66 × Input DNA平均长度 (bp)]

- ▲ 推荐根据表中的浓度值或Vazyme Adapter的稀释倍数使用0.1 × TE预先稀释Adapter，保证建库过程中Adapter的使用体积为固定数值(5 μl)，避免加样体积错误。
- ▲ Adapter的质量会直接影响Adapter与Input DNA的摩尔比，进而影响连接效率和文库产出。应选用优质的Adapter；使用0.1 × TE稀释和保存Adapter溶液；尽量避免反复冻融。
- ▲ 提高Adapter的使用量可以在一定程度上提高文库产出，但需注意提高接头浓度可能会增加文库中接头残留，造成测序数据浪费。

06-3/关于Adapter Ligation产物纯化

1. Adapter Ligation产物需先去除过剩的Adapter，再进行后续文库扩增(PCR文库)或直接上机测序(PCR-Free文库)。默认纯化条件0.6 × (产物100 μl, 磁珠60 μl)适用于绝大多数情况。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文库的含量，但这种调整只能粗略改变文库主峰的位置，如需准确控制文库长度分布，可在此步纯化之后进行长度分选。
2. 如之后进行文库长度分选，推荐洗脱体积为105 μl；否则，推荐洗脱体积为22.5 μl。

3. 如数据显示纯化产物中Adapter Dimer污染严重, 可对其再进行一次磁珠纯化: 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 \times)进行第二次纯化。这样可以显著降低Adapter Dimer的残留水平, 尤其是当构建PCR-Free文库时, 有时可能还需要降低Adapter的使用量才能完全消除Adapter Dimer的残留。

06-4/关于磁珠的使用

1. 试剂盒推荐使用VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme #N411) 进行磁珠纯化。
▲如使用其他来源磁珠, 纯化条件可能需要更改!
2. 磁珠操作通用注意事项:
 - a. 磁珠使用量常用乘数“ \times ”进行标识, 表示相对于原始样品体积而言使用多少倍体积的磁珠。如样品原始体积为100 μl , 1 \times 纯化时磁珠使用体积为1 \times 100 μl = 100 μl ; 0.6 \times /0.2 \times 分选时第一轮磁珠用量为0.6 \times 100 μl = 60 μl , 第二轮磁珠用量0.2 \times 100 μl = 20 μl 。
 - b. 磁珠使用量直接影响可纯化的DNA长度下限。乘数越高, 可纯化的DNA长度下限越短; 反之, 则越长。例如: 1 \times 磁珠只能高效纯化长度大于250 bp的DNA, 更短的DNA会在纯化过程中大量丢失; 提高至1.8 \times 后, 150 bp的DNA也可进行高效纯化。
 - c. 磁珠使用前先平衡至室温(室温放置30 min), 否则会导致得率下降、分选效果不佳。
 - d. 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。
 - e. 样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 吸取上清时应余留2 - 3 μl 。若不慎吸到磁珠, 会造成得率下降、分选效果不佳甚至影响后续酶促反应。此时可将磁珠混匀重新置于磁力架上再次分离即可。由于磁力架吸力不同等原因, 默认分离时间有时可能需要延长, 以彻底分离磁珠和液体。
 - f. 磁珠漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇。漂洗过程中EP管应始终置于磁力架中, 请勿扰动磁珠。
 - g. 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5 - 10 min足以让磁珠充分干燥, 请勿加热干燥(如置于37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥)。
 - h. 通常情况下, 推荐使用洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)进行产物洗脱, 这样更有利于产物的稳定保存。然而, 当后续需对文库进行靶向捕获时, 为了利于捕获前文库干燥浓缩且避免对后续捕获反应产生影响, 应使用灭菌超纯水进行产物洗脱。

06-5/关于长度分选

1. 如Input DNA分布范围较宽, 建库过程中通常需要进行长度分选以控制最终文库长度分布范围。推荐使用双轮磁珠分选方案, 也可通过切胶纯化的方式进行分选。
2. 长度分选执行位置有多种选择, 可置于Adapter Ligation之后或Library Amplification之后。标准实验方案中不包含长度分选步骤。如需进行, 请参考[附录一、双轮磁珠分选 \(Page.14\)](#)。
3. 进行长度分选, DNA损失量较大。有时需要在文库长度分布(进行长度分选)和文库复杂度(不进行长度分选)之间进行选择。当Input DNA量较低时, 应保证长度分选执行位置的唯一性, 进行两次或者两次以上的长度分选会导致文库复杂度和产出严重下降!
4. 过度扩增的文库进行长度分布检测时, 常见高分子量位置出现拖带或尾峰。对应产物多为非互补链交叉退火产物(参考[06-6/关于Library Amplification/Page.06](#))。推荐解决方案为调整扩增循环数, 避免过度扩增, 不建议通过长度分选去除拖带或尾峰。
5. Rapid Ligation Buffer V2中包含的高浓度PEG会对双轮磁珠分选和切胶纯化产生显著影响。因此, 如在Adapter Ligation之后进行长度分选, Adapter Ligation产物纯化步骤([08/实验流程/步骤二/6.使用VAHTS DNA Clean Beads对反应产物进行纯化/Page.12](#))不可省略, 将纯化产物洗脱至合适体积的洗脱液中, 再进行双轮磁珠分选或切胶纯化; 如确需在Adapter Ligation之后分选, 分选条件需另行摸索; 如在Library Amplification之后进行长度分选, 可将原处纯化步骤直接替换为双轮磁珠分选。

06-6/关于Library Amplification

1. PCR Primer Mix for MGI适用于扩增含完整长度Adapter的MGI高通量测序平台文库。非完整长度Adapter或者其他平台文库需自行更换扩增引物, 推荐每条引物的终浓度为5 - 20 μM 。
2. PCR反应后期, 引物通常会比dNTP先被耗尽。此时, 过多的循环会造成扩增产物解链后进行非特异性退火, 产生非互补链交叉退火产物。这些产物在依赖电泳的检测方式中迁移速率比较慢, 在高分子量区域呈现弥散分布。它们是由正确长度的单链文库构成, 在变性后能够与Flow Cell正常结合并被测序。因此, 其存在与否对测序而言并无显著影响。然而, 这种产物的存在对于文库定量方式的选择会产生决定性影响。因产物不是完整的双链结构, 当使用基于识别双链DNA的荧光染料(Equalbit 1 \times dsDNA HS Assay Kit, Vazyme #EQ121等)来进行文库定量时, 定量结果会比实际值偏低。
3. Library Amplification步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足, 会导致文库产出不足; 循环数过多, 又会导致过度扩增、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。Table 3列举了当使用100 pg - 1 μg 高质量Input DNA时, 获得100 ng或1 μg 文库推荐的扩增循环数。

Table 3. 100 pg - 1 µg Input DNA扩增循环数推荐表

Input DNA	Number of cycles required to generate	
	100 ng	1 µg
100 pg	13 - 15	16 - 18
1 ng	9 - 11	13 - 15
10 ng	4 - 6	9 - 11
50 ng	2 - 4	5 - 8
100 ng	0 - 2	4 - 6
250 ng	/	3 - 5
500 ng	/	2 - 3
1 µg	/	0 - 2

▲ 上表为使用高质量的小鼠gDNA 37°C片段化15 min构建文库使用的循环数参数。当DNA质量较差或者片段化时间不同时，需适当调整循环数以获取足量文库。

▲ 若连接接头后进行长度分选，则参照较高循环数进行Library Amplification；若不需对文库进行分选，参照较低循环数即可。

06-7/关于文库的质量控制

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。

1. 文库长度分布检测：

文库长度分布可通过LabChip GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)；Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)；Fragment Analyze (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备进行检测。

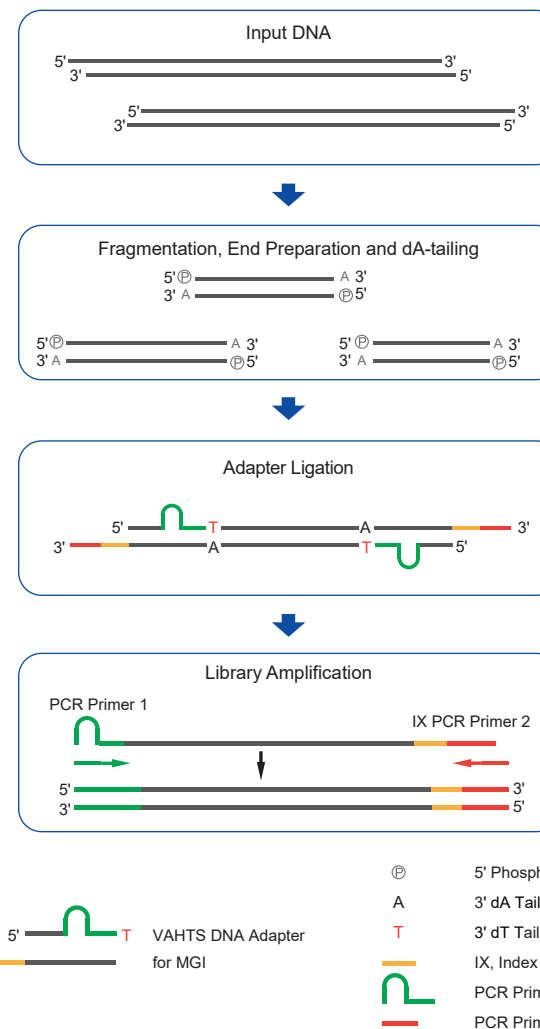
2. 文库浓度检测：

常用文库浓度检测方法有：基于双链DNA荧光染料的方法，如Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ121)、Qubit、PicoGreen等。

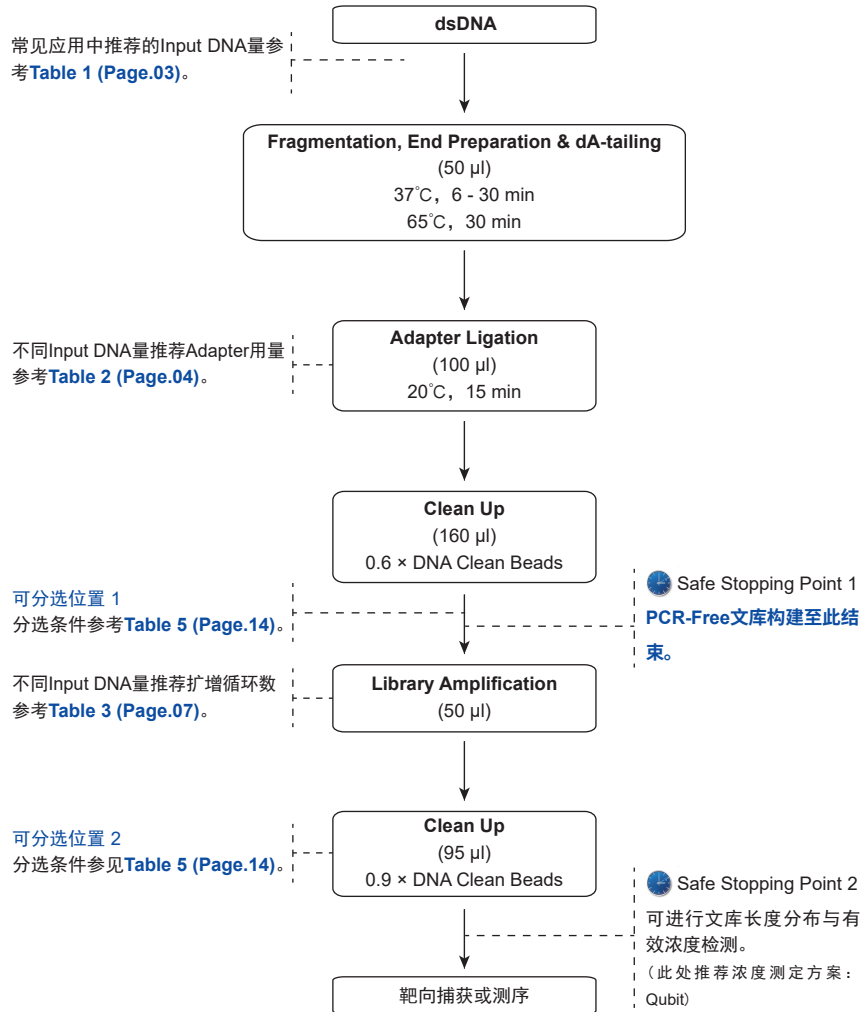
06-8/其他注意事项

- DNA片段化产物的大小和分布范围是由时间依赖的酶促反应决定的，因此配制片段化反应体系时应在冰上操作。
- 因本试剂盒使用干冰运输，Buffer和酶均会被冻住，使用前请将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次或涡旋振荡充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
- 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。
- 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。
- 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。因此，我们推荐将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。

07/实验原理与流程概要



VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI V2建库原理



VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI V2建库流程概要

08/实验流程

步骤一: Fragmentation, End Preparation & dA-tailing

这一步骤对Input DNA进行片段化的同时将片段化DNA末端补平,并在5'端进行磷酸化和3'端加dA尾。

1. 实验开始前,请确认模板DNA溶解于何种溶剂(推荐使用灭菌超纯水),该溶剂是否含有EDTA;如不含EDTA,直接进行步骤3;如含有EDTA则按照步骤2对样品进行预处理。
2. 如含有EDTA,可使用2.2 ×磁珠对模板DNA进行纯化,灭菌超纯水洗脱;或根据片段化体系中EDTA的终浓度,加入相应体积的Neutralization Buffer将EDTA中和。

▲片段化体系EDTA终浓度 = DNA溶液中EDTA浓度 × DNA使用体积/50 µl;例如DNA溶于含有1 mM EDTA的TE中,一次建库使用10 µl,则EDTA终浓度为1 mM × 10 µl/50 µl = 0.2 mM。

片段化体系EDTA终浓度	Neutralization Buffer加入体积
1 mM	5 µl
0.8 mM	4 µl
0.6 mM	3 µl
0.5 mM	2.5 µl
0.4 mM	2 µl
0.2 mM	1 µl
0.1 mM	0.5 µl
<0.1 mM	0 µl

3. 将FEA Buffer V2、FEA Enzyme Mix V2取出,解冻并充分混匀、短暂离心收集至管底,置于冰上备用,以下所有步骤均在冰上操作。
4. 于灭菌PCR管中配制如下反应:

组分	体积
Input DNA	x µl
Neutralization Buffer	y µl <input type="checkbox"/>
FEA Buffer V2	5 µl <input checked="" type="checkbox"/>
ddH ₂ O	To 40 µl

▲如溶剂中不含EDTA,则无需额外添加Neutralization Buffer, Neutralization Buffer加入过多会导致片段化反应过度。

▲当样本数量较多,且样本中含有EDTA时,需要计算加入不同体积的Neutralization Buffer,实际操作中较为复杂。可参考附录三、多样本片段化方案([Page.17](#))。

5. 向每个样品中加入10 µl FEA Enzyme Mix V2,振荡混匀或使用移液器吹打,并短暂离心将反应液收集至管底,立即置于PCR仪中进行反应!!!

▲片段化反应为时间依赖的酶促反应,片段化产物大小取决于反应时间,因此推荐最后单独向反应体系中加入FEA Enzyme Mix V2,加入后立即混匀并进行后续反应。

▲片段化反应体系对氧化敏感,因此反应体系配制结束后应尽快将FEA Buffer V2和FEA Enzyme Mix V2管盖拧紧,置于-20°C保存。

6. 将PCR管置于PCR仪中，运行如下程序：

温度	时间
热盖105°C	On
37°C	参照下表*
65°C	30 min
4°C	Hold

* 片段化时间需依据Input DNA质量及目标片段大小而定：

预期插入片段大小	片段化时间
150 bp	20 - 30 min
250 bp	15 - 20 min
350 bp	10 - 15 min
550 bp	6 - 10 min

▲ 以上推荐时间，为使用高质量的人源gDNA为模板测试所得。当使用高质量人源gDNA进行建库时，在推荐投入量范围内(100 pg - 1 µg)，不同投入量相同反应时间，片段化产物分布范围差异不大(分布范围基本一致，但主峰位置可能会略有差异)。若Input DNA质量不佳或片段化大小不在预期范围，建议以2 - 5 min的幅度上下调整片段化时间。针对FFPE DNA样本，如果对文库插入片段大小无非常严格的要求，无需依据其完整度来调整片段化时间。完整度不同的FFPE DNA样本片段化15 - 20 min，均可得到150 - 250 bp的插入片段。不同片段化时间实验可参考附录二、实验实例(Page.16)。

步骤二: Adapter Ligation

这一步骤将在上一步片段化未修产物的末端连接上Adapter。

1. 根据Input DNA量按Table 2 (Page.04) 稀释Adapter至合适浓度。
2. 将Rapid Ligation Buffer V2、Rapid DNA Ligase V2从-20°C取出，解冻并充分混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。
3. 按照下表配制反应体系：

组分	体积
上一步产物	50 µl
Rapid Ligation Buffer V2	25 µl
Rapid DNA Ligase V2	5 µl
ddH ₂ O	15 µl
DNA Adapter X	5 µl

4. 振荡混匀或使用移液器吹打，并短暂离心将反应液收集至管底。
5. 将PCR管置于PCR仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

▲ 当Input DNA量较低时，可尝试将连接时间延长一倍。但延长反应时间可能会导致Adapter Dimer增加，必要时需同时调整Adapter使用浓度。

6. 使用VAHTS DNA Clean Beads对反应产物进行纯化：

- a. 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
- b. 吸取60 µl VAHTS DNA Clean Beads至100 µl Adapter Ligation产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀。
- c. 室温孵育5 min。
- d. 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。
- e. 保持PCR管始终置于磁力架中，加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
- f. 重复步骤e，总计漂洗两次。
- g. 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖于空气中干燥磁珠3 - 5 min至无乙醇残留。
 - ▲ 磁珠表面由深褐色变为棕褐色，表面无反光即可进行洗脱。如磁珠过度干燥会影响洗脱步骤操作体验及洗脱效率。
- h. 将PCR管从磁力架中取出，进行洗脱：
 - ▲ 如纯化产物不进行双轮磁珠分选：加入22.5 µl洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或灭菌超纯水洗脱，涡旋振荡或使用移液器吹打混匀，于室温放置2 min，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 µl上清至新EP管中，切勿触碰磁珠。
 - ▲ 如纯化产物需进行双轮磁珠分选：加入105 µl洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或灭菌超纯水洗脱，涡旋振荡或使用移液器吹打混匀，室温放置2 min，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 µl上清至新EP管中，切勿触碰磁珠，根据附录一、双轮磁珠分选Table 5 (Page.14) 双轮磁珠分选条件进行长度分选。



此处样品可于4°C稳定保存一周。长期保存置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

步骤三: Library Amplification

这一步骤将对纯化或长度分选后的Adapter Ligation产物进行PCR扩增。


1. 将PCR Primer Mix for MGI、VAHTS HiFi Amplification Mix解冻后颠倒混匀，短暂离心收集至管底，于灭菌PCR管中配制如下反应：

组分	体积
纯化或分选过的Adapter Ligation产物	20 µl
PCR Primer Mix for MGI	5 µl
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 µl
总计	50 µl

- 振荡混匀或使用移液器吹打，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 将PCR管置于PCR仪中，进行下述反应：

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
98°C	20 sec	循环数选择参照Table 3 (Page.07)
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

- 如需进行长度分选，参考附录一、双轮磁珠分选 (Page.14) 进行；如不需要进行长度分选，使用VAHTS DNA Clean Beads对反应产物进行纯化：
 - 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
 - 吸取45 µl VAHTS DNA Clean Beads至50 µl Library Amplification产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀。
 - 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 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
 - 重复步骤e，总计漂洗两次。
 - 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖于空气中干燥磁珠5 - 10 min至无乙醇残留。
 - 将PCR管从磁力架中取出，进行洗脱：
 - ▲ 加入22.5 µl洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或灭菌超纯水洗脱(如后续需进行靶向捕获则必须使用灭菌超纯水洗脱)，涡旋振荡或使用移液器吹打混匀，于室温放置2 min，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 µl上清至新EP管中，切勿触碰磁珠。

 此处样品可于4°C稳定保存一周。长期保存置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

步骤四: 文库质量控制

参考06-7/关于文库的质量控制 (Page.07)。

附录一、双轮磁珠分选

- 为了满足不同应用的需要，建库过程中通常需要进行双轮磁珠分选以控制文库Insert Size的分布范围。分选方案执行位置的选择和优缺点参见Table 4。应保证分选方案执行位置的唯一性，进行两次或者两次以上的分选会导致文库复杂度和产出严重下降！

Table 4. 分选方案执行位置选择

分选方案执行位置	适用情况	优点	缺点	适用样本举例
Adapter Ligation之后	Input DNA分布范围适合且量充足 ^a	减少短片段DNA丢失	不能准确评价文库分布范围 ^a	Fragmentation适度的基因组DNA或分布范围较宽的FFPE DNA
Library Amplification之后	Input DNA量少 ^b	减少建库过程中Input DNA的损失，提高文库复杂度	文库分布范围略宽	
建库过程中不进行分选	Input DNA分布范围已满足建库要求；Input DNA量少	减少建库过程中Input DNA的损失，提高文库复杂度	无法控制文库Insert Size	Fragmentation适合的基因组DNA

- 双轮磁珠分选效果受DNA末端情况影响，Input DNA末端的单链部分以及“Ω”型Adapter的单链非互补区域会导致分选产物长度分布范围变宽或变大。
 - 推荐当Input DNA量≥100 ng时，选择在Adapter Ligation之后进行分选；当Input DNA量<100 ng或样品拷贝数有限时，将分选置于Library Amplification之后。
- 双轮磁珠分选是通过控制磁珠的使用量来进行DNA长度选择的。其基本原理为：第一轮磁珠结合分子量较大的DNA，通过丢弃磁珠去除这部分产物；第二轮磁珠结合剩余产物中分子量较大的DNA，通过丢弃上清去除分子量较小的DNA。初始样品中的很多组分都会干扰双轮磁珠分选效果。因此，当分选方案执行位置不同时，双轮磁珠使用量也不尽相同。可根据预期文库Insert Size和分选方案执行位置在Table 5中选择最适分选参数。

Table 5. 文库长度分选

分选方案执行位置与条件	磁珠轮数	预期文库Insert Size (bp)							
		150	200	250	300	350	400	450	500
Adapter Ligation之后	一轮X (µl)	78	68	65	59	56	53	51	50
分选(样品体积100 µl)	二轮Y (µl)	20	20	15	15	12	12	10	10
Library Amplification之后	一轮X (µl)	78	70	63	55	50	46	45	44
分选(样品体积补至100 µl)	二轮Y (µl)	20	20	20	20	20	20	20	15

- ▲ 使用磁珠进行长度分选时，Insert Size越大最终产物分布越宽。当Insert Size>700 bp时，双轮磁珠几乎不具有分选效果。此时建议通过切胶纯化的方案进行长度分选。
- ▲ 样品和磁珠的体积比对于分选效果至关重要，应尽可能保持样本初始体积和移液体积的准确性。

4. 样品预处理(重要!)

- ▲ 如在Adapter Ligation产物纯化之后进行长度分选，样品体积应为100 μ l，不足时使用灭菌超纯水补齐；
- ▲ 如在Library Amplification之后进行长度分选，样品体积应为100 μ l，不足时使用灭菌超纯水补齐；
- ▲ 如不对样品进行体积预处理，也可按样品实际体积等比例调整磁珠用量。但样品体积太小会导致移液误差增大，进而影响分选的准确性。因此，不推荐对体积<50 μ l的样品直接进行分选。

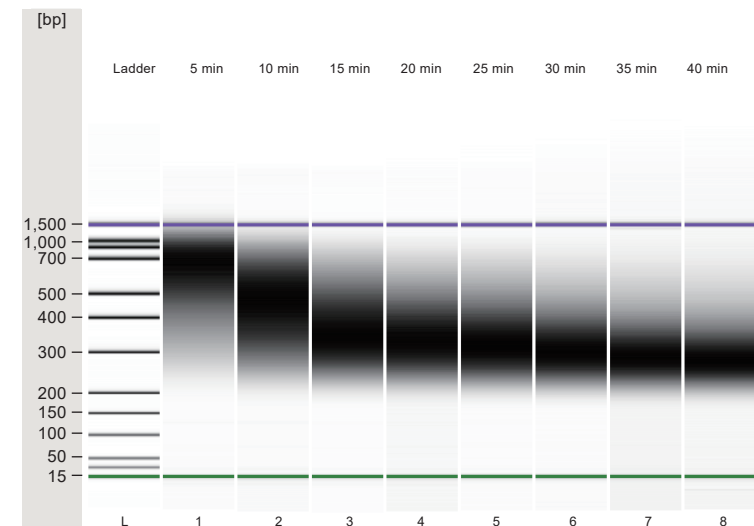
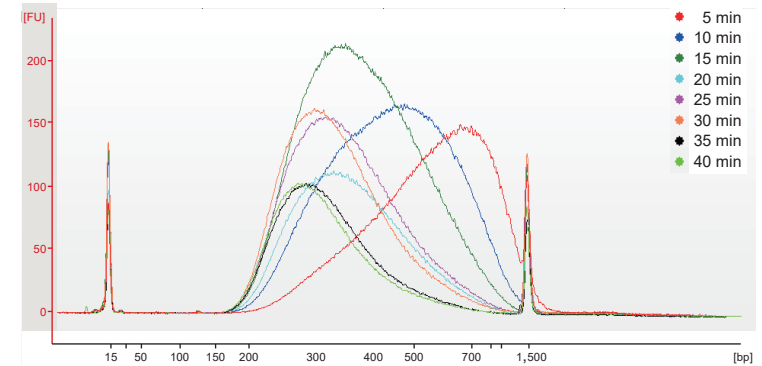
5. 分选方案[参考Table 5(Page.14)确定X和Y的值]

- 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
- 吸取X μ l VAHTS DNA Clean Beads至上述100 μ l产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀。
 - ▲ 如产物不足100 μ l，则需使用灭菌超纯水补足至100 μ l。
- 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)，小心转移上清至新PCR管中，丢弃磁珠。
- 吸取Y μ l VAHTS DNA Clean Beads至上清中，用移液器吹打10次充分混匀。
- 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)，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，小心移除上清。
- 重复步骤h，总计漂洗两次。
- 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖于空气中干燥磁珠3 - 5 min至无乙醇残留。
- 将PCR管从磁力架中取出，进行洗脱：
 - ▲ 加入22.5 μ l洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)或灭菌超纯水洗脱(如后续需进行靶向捕获则必须使用灭菌超纯水洗脱)，使用移液器吹打混匀，于室温放置2 min，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EP管中，切勿触碰磁珠。

附录二、实验实例

不同片段化时间实验实例

以100 ng人源基因组DNA为模板，使用本试剂盒构建文库，片段化条件分别为37°C 5/10/15/20/25/30/35/40 min，PCR扩增4个循环，最终文库分布如下图所示：



▲ 上图为使用Illumina平台单端Index标记的接头构建的DNA文库。

附录三、多样本片段化方案

当样本数量较多，且样本中含有EDTA时，需要通过计算加入不同体积的Neutralization Buffer，实际操作中较为复杂。此时可尝试将样本使用同样的溶剂稀释到相同的浓度，保证多个样本加入的体积相同，即可加入等体积的Neutralization Buffer。以下表为例，配制反应体系混合液，混匀分装合适体积到各管中后，使用排枪或自动化工作站在尽量短的时间内完成DNA加样，然后立即置于PCR仪中进行反应，防止由于加样时间过长导致不同样本之间片段范围差异过大。

1. 例如：通过计算和稀释，每个DNA样品均需加入10 μl ，Neutralization Buffer均需加入2.5 μl 。按照计算所得结果稀释DNA样品，并在8连管或96孔板中按顺序排布。
2. 将FEA Buffer V2、FEA Enzyme Mix V2、Neutralization Buffer取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

组分	单个反应体积	96次反应混合液体积
Neutralization Buffer	2.5 μl	250 μl <input type="checkbox"/>
FEA Buffer V2	5 μl	500 μl <input checked="" type="checkbox"/>
FEA Enzyme Mix V2	10 μl	1,000 μl <input checked="" type="checkbox"/>
ddH ₂ O	22.5 μl	2,250 μl

▲配制多个反应混合液时，建议以实际反应数的1.1倍体积配制，以保证足够的体积用于后续分装；

▲片段化反应混合液应现用现配，不宜长时间存放。

3. 振荡混匀或使用移液器吹打反应混合液，并短暂离心将反应液收集至管底。
4. 将反应混合液分装到反应管或96孔板中，每孔40 μl 。
5. 使用排枪或自动化工作站，将DNA样品各10 μl 在尽量短的时间内加入到各个反应孔中，吹打混匀数次；短暂离心将反应液收集至管底，**立即置于PCR仪中进行反应!!!**

▲片段化反应为时间依赖的酶促反应，片段化产物大小取决于反应时间，因此多个样本操作时，应尽量缩短样本间的操作时间差异，加入后立即混匀并进行后续反应。