



# FS DNA Lib Prep Kit V6

RK20259

---



[www.abclonal.com.cn](http://www.abclonal.com.cn)

Version: N16G01v4.0

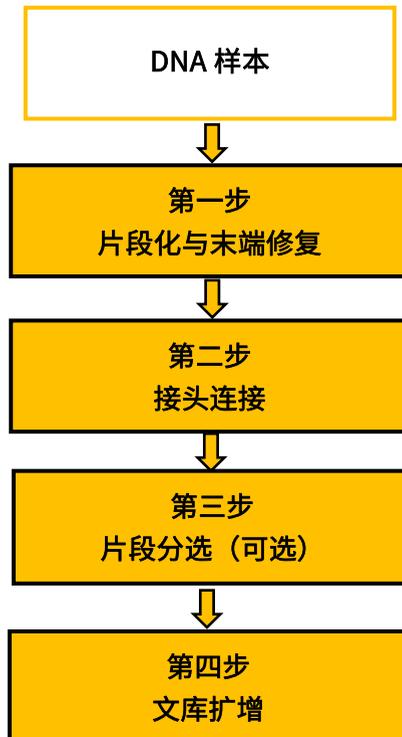
# 目录

1. 产品概述 .....	1
2. 产品组分 .....	2
3. 产品保存 .....	2
4. 产品应用 .....	2
5. 其它自备材料 .....	3
6. 注意事项 .....	4
7. 操作流程 .....	7
第一步 片段化与末端修复 .....	7
第二步 接头连接 .....	8
第三步 片段分选（可选） .....	10
第四步 文库扩增 .....	11
8. 附录 .....	14
9. 附表 .....	17

# 1. 产品概述

FS DNA Lib Prep Kit V6<sup>®</sup>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。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）。

## FS DNA Lib Prep Kit V6 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
片段化与末端修复	● FS Buffer V6	72 $\mu$ L	216 $\mu$ L	864 $\mu$ L
	● FS Enzymes V6	80 $\mu$ L	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
	● 1X TE Buffer	1 mL	2 mL	10 mL
接头连接	● Ligation Buffer	240 $\mu$ L	720 $\mu$ L	2880 $\mu$ L
	● Ligase Enzymes	80 $\mu$ L	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
文库扩增	● 2X PCR Mix	200 $\mu$ L	600 $\mu$ L	2400 $\mu$ L

建库试剂盒中的组分在适当的贮存条件下可以保存一年，所有试剂需要在-20°C保存。

## 3. 产品保存

运输与保存: FS DNA Lib Prep Kit V6 建库试剂盒必须保存在-15~-25°C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 DNA Lib Prep Kit V6 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）。综上，FS DNA

Lib Prep Kit V6 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)

**质检：** Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效 DNA 质控产品

ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒 (ABclonal, Cat.NO. RK30140)

**适用于 Illumina®平台的测序接头：**

单端短接头 (Cat. No.RK20294、RK20295、RK20297)

双端短接头 (Cat. No.RK20287、RK20296)

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

双端 UDI、双端 UMI 短接头 (Cat. No.RK21700、RK21701、RK21702、RK21703)

单端长接头 (Cat. No.RK20292、RK20293、RK20298)

双端 UDI、单端 UMI 长接头 (Cat. No.RK21600、RK21601、RK21602)

**适用于 MGI 平台的测序接头：**

单端短接头 (Cat. Co.RK21616、RK21617、RK21620、RK21621)

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

单端长接头 (Cat. No.RK21676、RK21677、RK21678、RK21679)

**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 DNA 打断结果，**推荐样本溶于 1X TE Buffer (重要!)**

6.1.2 DNA 样本建议用 Qubit® 或其他基于荧光法定量仪器对 Input DNA 定量。

6.1.3 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 DNA 的打断产生影响。可以在实验前，使用 1.8×磁珠进行纯化，纯化后的样本**推荐溶于 1X TE Buffer (重要!)**。

### 6.2 关于片段化

6.2.1 必须使用 1X TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8,0) 补齐片段化体系，如使用水补齐，会导致文库长度严重偏短。

6.2.2 如果 DNA 溶液已经溶于不含 EDTA 溶剂，可以使用 10X TE Buffer (ABclonal, Cat. No.RM20728) 将 DNA 及补充体系调整至 1X TE Buffer 体系，具体体系如下表所示。

表格 2. 片段化与末端修复反应体系（样本溶于不含 EDTA 溶剂）

试剂	体积
Input DNA(溶于水中)	X $\mu$ L
● FS Buffer V6	9 $\mu$ L
● FS Enzymes V6	10 $\mu$ L
10X TE Buffer	4.1 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	Up to 60 $\mu$ L
总体积	60 $\mu$ L

6.2.3 如样本中 EDTA 浓度 > 1 mM 等金属螯合剂，片段化结果可能会较理论值偏长，建议可以进行一次 2.2×的磁珠纯化后，纯化后的样本溶于 1X TE Buffer。

6.2.4 FFPE 样本推荐使用 FFPE DNA QC Kit (ABclonal, Cat. No. RK20229) 进行质检评级。质量较好的 FFPE 样本 (FFPE 1-2 级) 可以按照正常样本条件进行片段化。质量较差的 FFPE 样本 (FFPE 3-5 级), 根据其降解程度不同, 推荐片段化时间为 5-10 min。

6.2.5 片段化酶对温度较敏感, 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。产品组分使用完后, 请尽快放置于 -15~-25°C 条件下进行保存。

### 6.3 关于接头连接

6.3.1 本试剂盒包含建库组分和扩增长接头文库的 PCR 通用引物, 其它接头试剂盒需要单独购买。

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 3 是不同样本起始量, 推荐的接头稀释倍数。

表格 3. 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
< 5 ng	20 倍稀释	0.75 µM

### 6.4 关于磁珠使用

6.4.1 磁珠在使用前, 室温平衡 30 min。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。
- 6.4.7 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。
- 6.4.8 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 4 是使用本试剂盒，获得 1 $\mu$ g 文库的推荐 PCR 循环数。

**表格 4. 推荐文库扩增循环数**

Input DNA (ng)	1 $\mu$ g 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。以 Illumina 平台为例，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 10X PCR Primers 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 °C。
- 1.2 在置于冰上的无菌 PCR 管中准备如下反应体系(配置体系时,FS Enzymes V6 最后加入)：

表格 5. 片段化与末端修复反应体系

试剂	体积
Input DNA(溶于 1X TE Buffer 中)*	X $\mu$ L
● FS Buffer V6	9 $\mu$ L
● FS Enzymes V6	10 $\mu$ L
● 1X TE Buffer	Up to 60 $\mu$ L
总体积	60 $\mu$ L

\*，注： Input DNA 溶解于 1X TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8,0) 。如溶解于水或其他不含 EDTA 的溶剂，请参考注意事项-6.2。

- 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 °C 的 PCR 仪上，运行表格 6 中反应程序，PCR 仪热盖设置为 75 °C；在 4 °C Hold 建议不超过 1 hr。

表格 6. 片段化与末端修复反应程序

温度	时间
32 °C	5-25 min
65 °C	30 min
4 °C	建议不超过 1 hr

表格 7. 片段化时间 (32 °C) 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
200 bp	20 min	18-25 min
250 bp	15 min	13-17 min
300 bp	10 min	8-12 min
550 bp	5 min	4-6 min

注：上述推荐片段化时间，为使用高质量人血液 gDNA 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。

## 第二步 接头连接

2.1 提前将所需要的磁珠从 4 °C 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 8 中的反应体系，Nuclease-Free Water、Ligation Buffer、Ligase Enzymes 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 8. 接头连接反应体系

试剂	体积
End Prep Reaction Mix (步骤 1.4 产物)	60 $\mu$ L
● Ligation Buffer	30 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	5 $\mu$ L
● Ligase Enzymes	10 $\mu$ L
Working Adapter	5 $\mu$ L
总体积	110 $\mu$ L

2.4 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，反应程序见表 9，PCR 仪不设热盖。

**表格 9. 接头连接反应程序**

温度	时间
22 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	$\infty$

2.5 每个样本中加入 88  $\mu$ L (0.8 $\times$ ) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀。室温孵育 5 min。

2.6 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）。

2.7 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200  $\mu$ L 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

2.8 重复步骤 2.7。

2.9 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10  $\mu$ L 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至无乙醇残留。

2.10 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 22  $\mu$ L Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

2.11 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min, 转移 20  $\mu\text{L}$  上清液至一个新 PCR 管中。

2.12 如果对文库大小有严格需求, 可以 2.11 步骤结束后, 进行片段分选。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  $^{\circ}\text{C}$  / -20  $^{\circ}\text{C}$  保存 1-2 周左右。**

### 第三步 片段分选 (可选)

表格 10. AFTMag NGS DNA Clean Beads 用量

打断时间	5-10 min	8-12 min	8-12 min
插入片段大小 (bp)	380~430	330~380	280~330
文库大小 (bp)	500~550	450~500	400~450
第一轮磁珠比例	0.6 $\times$ (60 $\mu\text{L}$ )	0.65 $\times$ (65 $\mu\text{L}$ )	0.7 $\times$ (70 $\mu\text{L}$ )
第二轮磁珠比例	0.15 $\times$ (15 $\mu\text{L}$ )	0.15 $\times$ (15 $\mu\text{L}$ )	0.15 $\times$ (15 $\mu\text{L}$ )

以 0.65 $\times$  / 0.15 $\times$  的分选条件进行示例:

3.1 将需要分选的样本(步骤 2.11 产物)加水补足 100  $\mu\text{L}$ 。加入 0.65 $\times$  (65  $\mu\text{L}$ ) 第一轮分选磁珠, 移液器吹打混匀, 室温下孵育 5 min。

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

3.3 向上述上清液中加入 0.15 $\times$  (15  $\mu\text{L}$ ) 第二轮分选磁珠, 移液器吹打混匀, 室温下孵育 5 min。

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

3.5 加入 200  $\mu\text{L}$  80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

3.6 重复步骤 3.5。

3.7 保持 PCR 管在磁力架上，用 10  $\mu\text{L}$  移液器移除管底残留的乙醇，干燥至无乙醇残留。

3.8 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 22  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free Water 中重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上 DNA 充分释放。

3.9 将样本于磁力架上静置 2 min，吸取 20  $\mu\text{L}$  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°C/-20°C 保存 1-2 周左右。**

## 第四步 文库扩增

4.1 配制如下 PCR 反应体系：

表格 11. 文库扩增体系（短接头-单端 index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu\text{L}$
● 2X PCR Mix	25 $\mu\text{L}$
○ PCR Index Primer (MGI Index)	2.5 $\mu\text{L}$
● Universal PCR Primer (MGI Universal PCR Primer)	2.5 $\mu\text{L}$
总体积	50 $\mu\text{L}$

表格 12. 文库扩增体系（短接头-双端 CDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
● 15 Primer	2.5 $\mu$ L
● 17 Primer	2.5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

表格 13. 文库扩增体系（短接头-双端 UDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
○ UDI Primer (MGI UDI Primer)	5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

表格 14. 文库扩增体系（长接头）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
● 10X ILM PCR Primers (MGI PCR Primer Mix)	5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

4.2 移液器吹打混匀并瞬时离心。

4.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 15，推荐文库扩增循环数见表 4，设置 PCR 仪热盖 105  $^{\circ}$ C。

表格 15. 文库扩增程序

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

4.4 向扩增产物中加入 50  $\mu$ L (1 $\times$ ) AFTMag NGS DNA Clean Beads ，混匀，室温下孵育 5 min。

4.5 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）。

4.6 加入 200  $\mu$ L 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

4.7 重复步骤 4.6。

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

4.9 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 32  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

4.10 将样本于磁力架上静置 2 min，转移 30  $\mu$ L 上清液至一个新 PCR 管中。

4.11 文库保存在 -20°C，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 °C/-20 °C保存 1-2 周左右。**

## 8. 附录

### 8.1. DNA 样本不同片段化时间文库大小

DNA 样本为血液 gDNA，投入量为 100 ng，32 °C 片段化时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

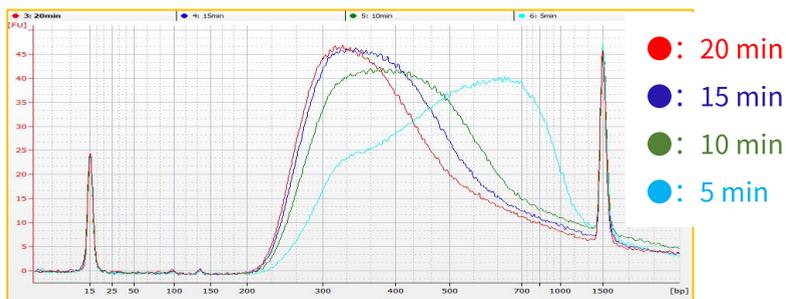


图 1 DNA 样本不同片段化时间文库大小

### 8.2. 不同样本类型文库大小

DNA 样本分别为人、大鼠、小鼠、鸡、大肠杆菌、花生，投入量为 100 ng，32 °C 片段化时间为 10 min。所建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

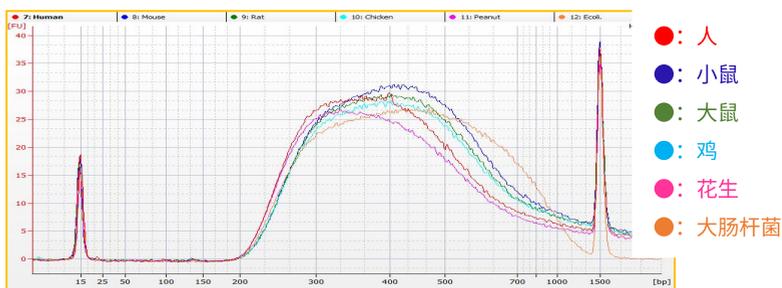


图 2 不同样本类型文库大小

### 8.3. 不同样本投入量文库大小

DNA 样本为大鼠，投入量分别为 1 ng、100 ng、1000 ng，32 °C 片段化时间为 15 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

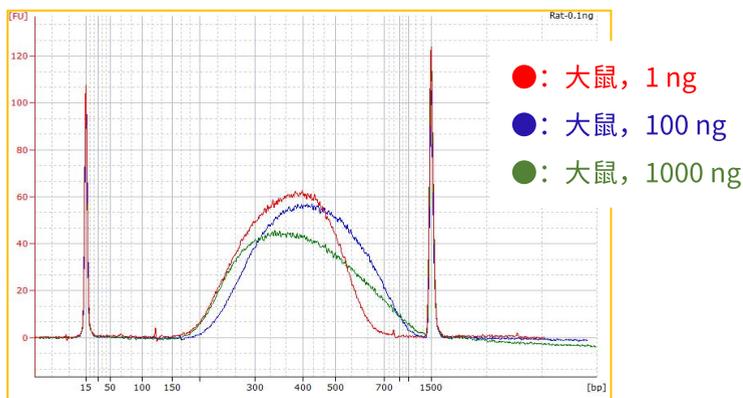


图 3 不同样本投入量文库大小

### 8.4. FFPE 样本文库大小

DNA 样本为 FFPE，投入量为 100 ng，32 °C 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。

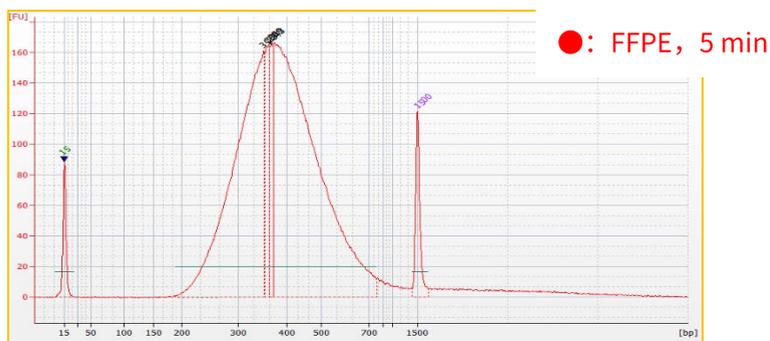


图 4 FFPE 样本文库大小

### 8.5. 片段分选结果展示

DNA 样本为人，投入量为 100 ng，32 °C 片段化时间为 10 min，连接纯化后，使用 0.7×/0.15× 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。

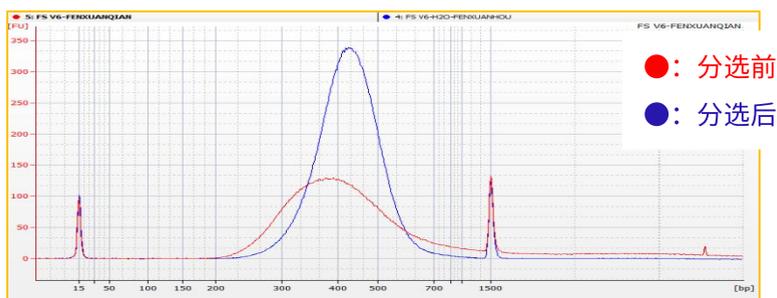


图 5 片段分选文库大小

## 9. 附表

表格 16. FS DNA Lib Prep Kit V6 试剂盒兼容接头及 Index 类型汇总

接头类型	Index 单端/双端	UMI/UDI	货号	试剂
Illumina-完整接头	单端	×	RK20292	Full DNA Adapter Kit for Illumina Set_C (48 indices)
	单端	×	RK20293	Full DNA Adapter Kit for Illumina Set_D (48 indices)
	单端	×	RK20298	Full DNA Adapter Kit for Illumina MidiSet (24 indices)
	双端	UMI	RK21600- RK21602	Dual Unique UMI Adapters for Illumina
Illumina-截短接头	单端	×	RK20294	Truncated DNA Adapter Kit for Illumina Set_C (48 indices)
	单端	×	RK20295	Truncated DNA Adapter Kit for Illumina Set_D (48 indices)
	单端	×	RK20297	Truncated DNA Adapter Kit for Illumina MidiSet (24 indices)
	双端	×	RK20287	Dual DNA Adapter 96 Kit for Illumina
	双端	×	RK20296	Dual DNA Adapter 96 Kit Extended for Illumina
	双端	UDI	RK21622- RK21625	Unique Dual Index for Illumina
	双端	UMI	RK21700-	Unique Dual Index (with UMI) for

			RK21703	Illumina
MGI-完整接头	单端	×	RK21676	Full DNA Adapters Kit for MGI MiniSet (8 indices)
	单端	×	RK21677	Full DNA Adapters Kit for MGI MidiSet (24 indices)
	单端	×	RK21678	Full DNA Adapters Kit for MGI Set A (48 indices)
	单端	×	RK21679	Full DNA Adapters Kit for MGI Set B (48 indices)
MGI-截短接头	单端	×	RK21620-R K21621	Truncated DNA Adapter Kit for MGI MidiSet V2
	单端	×	RK21616	Truncated DNA Adapter Kit for MGI Set_A
	单端	×	RK21617	Truncated DNA Adapter Kit for MGI Set_B
	双端	UDI	RK21686- RK21689	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit

## 中国

[www.abclonal.com.cn](http://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](mailto:cn.market@abclonal.com)