



FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina

RK20261



www.abclonal.com.cn

Version: N16G11v6.0

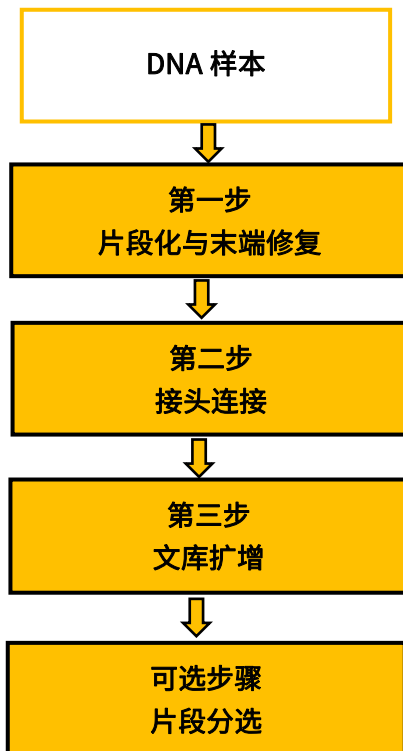
目录

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 文库扩增	9
8. 附录	13
9. 附表	17

1. 产品概述

FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina®是一款针对 Illumina 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 Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina 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 Pro Buffer I	40 μ L	120 μ L	480 μ L
	● FS Pro Enzymes I	80 μ L	240 μ L	960 μ L
	● 1X TE Buffer	280 μ L	840 μ L	1.68 mL
接头连接	● FS Pro Ligation Buffer I	160 μ L	480 μ L	1.92 mL
	● Ligase Enzymes	40 μ L	120 μ L	480 μ L
文库扩增	● 2X PCR Mix	200 μ L	600 μ L	2.4 mL
	● 10X PCR Primers	40 μ L	120 μ L	480 μ 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℃保存。

3. 产品保存

运输与保存：FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina 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 for Illumina 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 Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina 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）

具体信息可以参考附表。

其他材料：Nuclease-Free water、10X TE Buffer（ABclonal, Cat.NO. RM20728）、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 1.8X 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(不含 EDTA 溶剂溶解)	X μ L
● FS Pro Buffer I	5 μ L
● FS Pro Enzymes I	10 μ L
10X TE Buffer	3.5 μ L
Nuclease-Free Water	Up to 50 μ L
总体积	50 μ 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 2.2X 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 (FFPE1-2 级) 可以按照正常样本条件进行片段化。质量较差的 FFPE 样本 (FFPE3-5 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℃ 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 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。

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

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 μ 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 μ 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。

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 (FS Pro Enzymes I 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 μ L
● FS Pro Buffer I	5 μ L
● FS Pro Enzymes I	10 μ L
● 1X TE Buffer	Up to 50 μ L
总体积	50 μ L

注：Input DNA 推荐溶解于 1X TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8,0)。如溶解与水或其他不含 EDTA 的溶剂，请参考 6.注意事项-6.2.关于片段化的实验体系。

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 1hr。

表格 6. 片段化与末端修复反应程序

温度	时间
32°C	5-25min
65°C	30 min

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
250 bp	20 min	18-25 min
300 bp	15 min	13-17min
350 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、FS Pro Ligation Buffer I、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 1.3)	50 μL
● FS Pro Ligation Buffer I	20 μL
● Ligase Enzymes	5 μL
Working Adapter	5 μL
总体积	80 μL

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°C	15 min
4°C	∞

2.5 每个样本中加入 64 μ L (0.8X) 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 μ 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 μ 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 21 μ 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 μ 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，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°C/-20°C 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适用于 Illumina 平台的接头，请根据接头类型选择表格 10，表格 11，表格 12，表格 13 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 10. 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	2.5 μL
● Universal PCR Primer	2.5 μL
总体积	50 μL

表格 11. 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 12. 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	5 μL
总体积	50 μL

表格 13. 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 PCR Primers	5 μL
总体积	50 μL

3.2 移液器吹打混匀并瞬时离心。

3.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 14，推荐文库扩增循环数见表 4，设置 PCR 仪热盖 105°C。

表格 14. 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

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 μ 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。

3.9 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 31 μ L 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 μ L 上清液至一个新 PCR 管中。

3.11 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 保存 1 周，长期保存需置于 -20°C，避免反复冻融。

8. 附录

8.1 片段分选（可选）

表格 15. AFTMag NGS DNA Clean Beads 用量

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	0.6X (60 μ L)	0.65X (65 μ L)	0.7X (70 μ L)
第二轮磁珠比例	0.15X (15 μ L)	0.15X (15 μ L)	0.15X (15 μ L)

操作过程以 0.65X/0.15X 的分选条件进行示例 1

1.1 将需要分选的样本（步骤 2.11 连接产物）加 Nuclease-Free Water 补足 100 μ L。加入 0.65X (65 μ L) 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 μ L) 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 上清液至一个新 PCR 管中用于后续实验。

安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4 $^{\circ}$ C/-20 $^{\circ}$ C 保存 1-2 周左右。

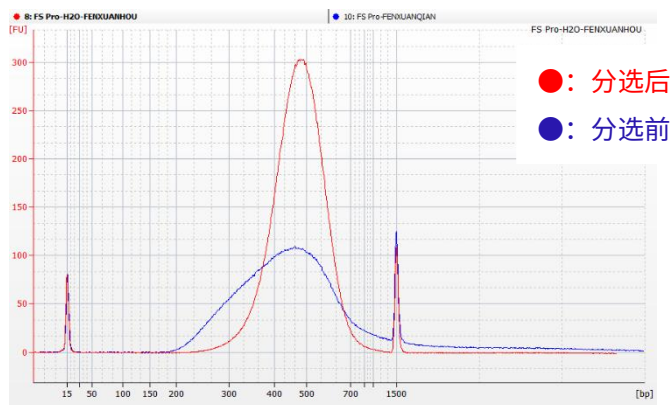


图 1 FFPE 片段分选文库大小

DNA 样本为人, 投入量为 100 ng, 32 $^{\circ}$ C 片段化时间为 15 min, 连接纯化后, 使用 0.65X/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。

8.2 实验实例

8.2.1 DNA 样本不同片段化时间文库大小

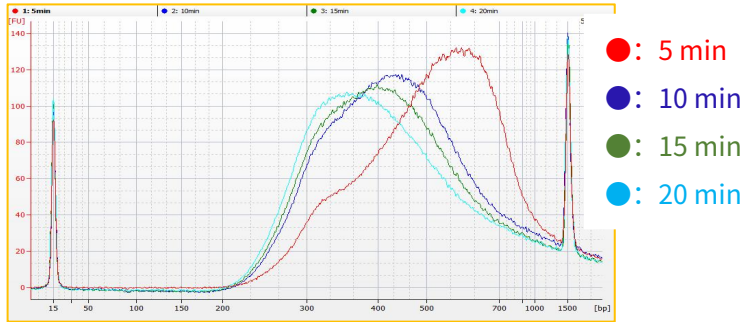


图 2 DNA 样本不同片段化时间文库大小

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。

8.2.2 不同样本类型文库大小

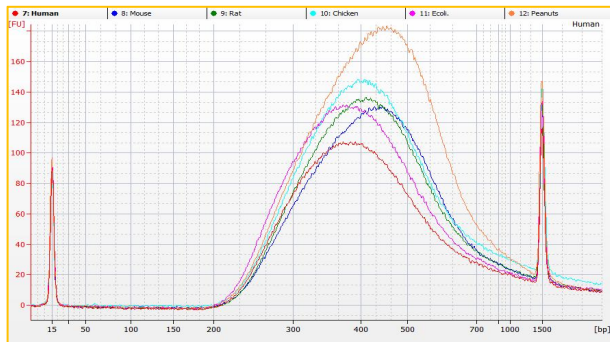


图 3 不同样本类型文库大小

DNA 样本分别为人、大鼠、小鼠、鸡、大肠杆菌、花生，投入量 100 ng，32°C 片段化时间 15 min。所建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

8.2.3 不同样本投入量文库大小

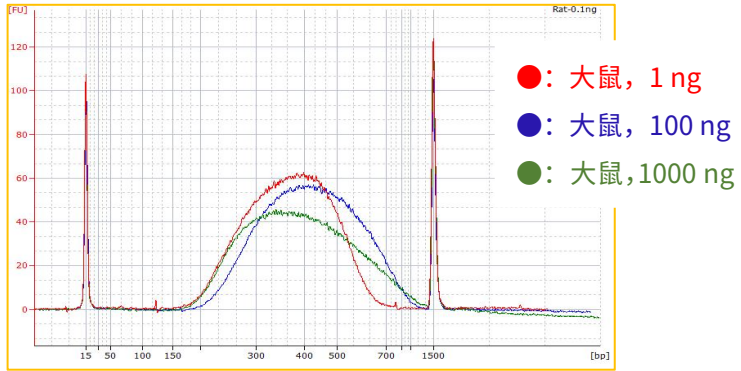


图 4 不同样本投入量文库大小

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。

8.2.4 FFPE 样本文库大小

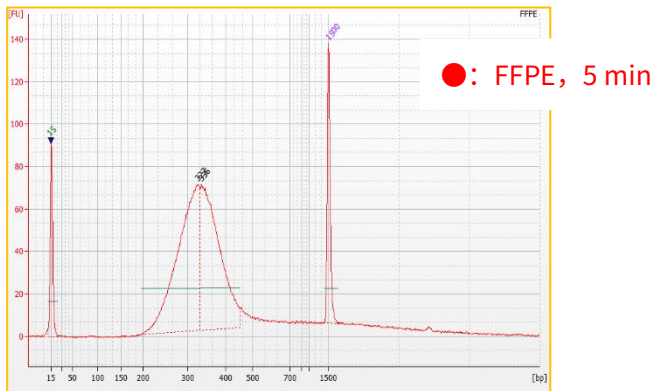


图 5 FFPE 样本文库大小

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。

9. 附表

表格 16. FS Pro DNA Lib Prep Kitfor Illumina 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	单端带 UMI 标签	RK21600- RK21602	Dual Unique UMI Adapters for Illumina
Illumina- 截短型接头	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	双端带 UMI 标签	RK21700- RK21703	Unique Dual Index (with UMI) for Illumina

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