



ABclonal[®]
Technology

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)

RK20271



www.abclonal.com

version: N18C28v1.0

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	3
5. 其它自备材料	4
6. 注意事项	5
7. 操作步骤	10
第一步 末端修复	10
第二步 接头连接	11
第三步 文库扩增	12
8. 附录	17
9. 附表	28

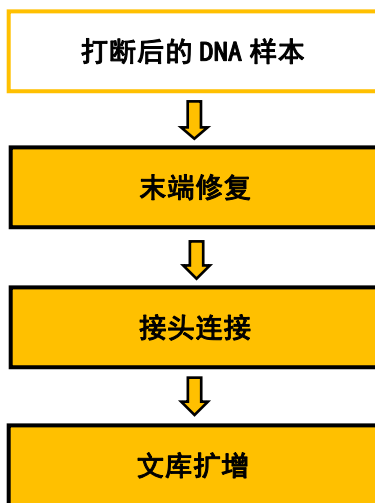
1. 产品概述

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs) (Cat.NO.RK20271) 继承了 Rapid Plus DNA Lib Prep Kit 的高性能，并在此基础上进一步提高了低投入量连接效率，是一款通用型的文库构建试剂盒。

本试剂盒可将 1 ng-1000 ng 的 DNA 样本构建成为适用于 Illumina® 和 MGI® 高通量测序平台的 DNA 测序文库。试剂盒包含了 DNA 样本末端修复、加 dA、测序接头连接和文库扩增等一系列建库实验所需的酶及反应 Buffer，便于实现文库的快速构建，整个实验过程可以在 2-3 hr 内完成，适用于各种样本类型（普通基因组、游离 DNA、FFPE DNA、CHIP DNA 等），另外本试剂盒还可以用于 PCR-Free 文库构建。

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。

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs) 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
末端修复	 End Prep Buffer II	56 µL	168 µL	672 µL
	 End Prep Enzymes	24 µL	72 µL	288 µL
接头连接	 Ligation Buffer	240 µL	720 µL	2880 µL
	 Ligase Enzymes II	80 µL	240 µL	960 µL
文库扩增	 2X PCR Mix	200 µL	600 µL	2400 µL
	 10X ILM PCR Primers	40 µL	120 µL	480 µL
	 MGI PCR Primer Mix	40 µL	120 µL	480 µL

3. 产品保存

运输与保存：Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)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

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)建库试剂盒适用于下一代 DNA 测序文库构建，主要功能模块包括末端修复、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、游离 cfDNA 与 ctDNA、FFPE DNA、CHIP DNA、PCR 产物、cDNA 产物等）。综上，Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)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，或者其他探针杂交系统；
- ③ ChIP-seq, input DNA 为 ChIP DNA；
- ④ RNA-seq, input DNA 为 cDNA 产物；
- ⑤ 扩增子测序，input DNA 为 PCR 产物；
- ⑥ 宏基因组测序；
- ⑦ cfDNA/ctDNA 测序。

5. 其它自备材料

◆ 主要试剂与仪器耗材

- ✧ 无水乙醇（80%的乙醇需现配现用）、无核酸酶水、Low-EDTA TE Buffer（ABclonal, Cat.NO. RM20206）
- ✧ 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、单道移液器和多通道移液器
- ✧ ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒（ABclonal, Cat.NO. RK30140 / RK30141）、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效 DNA 质控产品

◆ 磁珠

- ✧ AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257)

◆ 适用于 Illumina®平台的测序接头

- ✧ 短接头：Cat.NO. RK21622 - RK21627
- ✧ 长接头：Cat.NO. RK21706 - RK21709

◆ 适用于 MGI®平台的测序接头

- ✧ 短接头：Cat.NO. RK21616、RK21617、RK21687、RK21688、RK21689
- ✧ 长接头：Cat.NO. RK21677、RK21678、RK21679

具体信息可以参考附表中的 Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (No DDREs)试剂盒兼容接头类型汇总表。

6. 注意事项

6.1 关于 Input DNA 和片段化

6.1.1 本试剂盒兼容机械打断和酶切片段化的 DNA。

6.1.2 下文中所指的 Input DNA 特指投入末端修复/dA 尾添加步骤中的 DNA。

6.1.3 本试剂盒兼容范围为 1 ng-1000 ng Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8-2.0 的高质量 Input DNA。

6.1.4 表 2 列举了常见应用中推荐的 Input DNA 量，当 Input DNA 质量较差或需要进行片段分选时，应当上调使用量。

表格 2. 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 μ g
靶向捕获测序	复杂基因组	10 ng-1 μ g
全基因组测序，靶向捕获测序	FFPE DNA	$\geq$ 50 ng
全基因组测序，靶向捕获测序	cfDNA/ctDNA	$\geq$ 500 pg
全基因组测序	微生物基因组	$\geq$ 1 ng
全基因组测序 PCR-Free 测序	高质量 DNA	$\geq$ 100 ng
表观遗传研究	ChIP-DNA	$\geq$ 500 pg
靶向测序	扩增子	$\geq$ 500 pg

6.1.5 Input DNA 制备过程中如果带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复/dA 尾添加步骤反应效率，建议 DNA 片段化后进行磁珠纯化或分选。

6.1.6 当使用机械法进行 DNA 片段化时，请将 DNA 稀释在 TE Buffer 中进行片段化，请勿在灭菌超纯水中进行。

6.1.7 如 DNA 样品在机械打断后进行过纯化或分选，需再次测定其浓度，依此作为 Input DNA 量，否则可能会导致文库产出偏低。

6.1.8 当使用酶切法进行片段化且产物不进行纯化或分选而直接建库时，请确认

Stop Buffer 中不包含过量的金属离子螯合剂。如条件不满足，可先将片段化产物纯化或长度分选后溶于 TE Buffer 或灭菌超纯水中 ($\leq 50\ \mu\text{L}$)，再进行文库构建。

6.2 关于 Illumina 和 MGI 平台的试剂使用

6.2.1 由于 Illumina 和 MGI 平台的文库结构不同，所以本试剂盒提供了两种 PCR 扩增引物，分别适用于 Illumina 和 MGI 平台的文库扩增，在 PCR 扩增时请注意区分，对应关系如下表：

文库类型	搭配接头类型	PCR 扩增引物
Illumina 单端 index 文库	长接头	● RM20726_10X ILM PCR Primers
Illumina 双端 index 文库		
MGI 单端 index 文库	长接头	● RM23300_MGI PCR Primer Mix

6.3 关于 Adapter

6.3.1 ABclonal 可提供长接头试剂盒和短接头试剂盒，详见附表，客户可以根据实验需求进行选择。

6.3.2 如果构建 PCR-Free 文库，需要在接头连接步骤使用带有完整 index 的长接头，并将 Adapter Ligation 产物去除过剩的 Adapter，再上机测序。

6.3.3 本试剂盒可以兼容诸如 Illumina TruSeq、Roche NimbleGen SeqCap EZ、Agilent SureSelect 等常规应用体系中使用到的各种 Non-indexed、单端 Indexed 及双端 Indexed Adapters。

6.3.4 Adapter 的质量和使用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 3 列举了使用本试剂盒，不同 Input DNA 量推荐的接头稀释。

表格 3. 接头稀释表

Input DNA	稀释倍数	稀释后浓度
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 关于磁珠的使用

6.4.1 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。

6.4.2 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀。

6.4.3 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。

6.4.4 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。

6.4.5 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。

6.4.6 通常连接产物的纯化条件为 0.8×（连接产物 110 µL，磁珠 88 µL），适用于绝大多数情况。如果 Insert Size 偏小，可以尝试将连接产物的纯化条件更改为 1×（连接产物 110 µL，磁珠 110 µL）。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的占比，但这种调整只能粗略改变文库主峰的位置，如需要准确控制文库长度分布，可在此步纯化之后进行长度分选。片段分选操作详见附录。

6.4.7 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。当 Input DNA 质量≥50 ng，可以选择在接头连接后进行片段分选；如 Input DNA 质量<50 ng，建议在文库扩增后进行分选。

6.4.8 如果质检结果显示纯化产物中 Adapter 或 Adapter Dimer 污染严重，可

尝试第二次磁珠纯化：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 或 Adapter Dimer 的残留，尤其是当构建 PCR-Free 文库时。有时可能还需要配合 Adapter 的使用量降低才能完全消除 Adapter 或 Adapter Dimer 的残留。

6.5 关于文库产量提高推荐

6.5.1 Input DNA

Input DNA 最好能准确定量，建议使用 Qubit 定量；较高的 DNA 投入量能提高 DNA 连接效率，建议提高 Input DNA 量；若起始 DNA 含有酶抑制剂，建议使用 2.2 $\times$ 磁珠纯化后再建库。

6.5.2 接头连接

延长连接反应时间可以提高接头连接效率，可以尝试适当延长连接时间到 25 min-4 hr，或者在 4 $^{\circ}\text{C}$ /16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

6.5.3 PCR

较高的引物浓度能够提高文库产出，减少 DNA 大片段，可以提高引物浓度，但是引物浓度调整控制在 5-20 μM 范围内。

如果 Input DNA 量 $\geq$ 100 ng，可以将纯化后的连接产物量等分，采用 2 个 50 μL PCR 体系扩增，从而提高文库产出，并能减少 DNA 大片段。

针对低起始量 DNA 或者困难/降解 DNA 样本，建议适当提高 PCR 循环数 1-3 个。

6.5.4 磁珠

合适的磁珠纯化比例，可以保证稳定的文库产率，可以尝试提高磁珠使用比例至 1.0 $\times$ 以上，减少 200 bp 以下短片段的损失。同时防止过高的磁珠使用比例导致接头二聚体产生。

文库含有接头二聚体或者引物残留，建议重新进行 1.0 $\times$ 磁珠纯化回收 DNA。

6.6 关于试剂准备

6.6.1 使用前, 请保证 End Prep Buffer II、Ligation Buffer、Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS 和 10X ILM PCR Primers 或 MGI PCR Primer Mix 试剂完全充分融解。

6.6.2 试剂盒内试剂组分可以在室温下进行充分融解, 混匀并瞬时离心后, 置于冰上备用。

6.6.3 该试剂盒部分组分比较粘稠, 特别是 Ligation Buffer, 在移液操作时需要格外注意, 尽量以较慢速度吸取或者吹打溶液或组分。产品组分使用完后, 请尽快放置于-15~-25℃条件下进行保存。

6.6.4 请尽量避光保存 End Prep Buffer II, 因为含有 NAD⁺辅酶因子, 缓冲液颜色偏黄, 不影响使用。

7. 操作步骤

第一步 末端修复

1.1 在无菌 PCR 管中准备如下反应体系：

表格 4. 末端修复反应体系

组分	体积
Input DNA	X μ L
 End Prep Buffer II	7 μ L
 End Prep Enzymes	3 μ L
 Nuclease-Free Water	Up to 60 μ L
总体积	60 μ L

1.2 充分混匀反应体系。

1.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 5，PCR 仪热盖设置为 75℃。

表格 5. 末端修复反应程序

温度	时间
20℃	30 min
65℃	30 min
4℃	∞

第二步 接头连接

2.1 提前将所需要的磁珠从 4℃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 6 中的反应体系，Nuclease-Free Water、Ligation Buffer、Ligase Enzymes II 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 6. 接头连接反应体系

组分	体积
End Prep Reaction Mix (步骤 1.3)	60 μ L
● Nuclease-Free Water	5 μ L
● Ligation Buffer	30 μ L
● Ligase Enzymes II	10 μ L
Working Adapter (按表 3 稀释后的接头)	5 μ L
总体积	110 μ L

2.4 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 7，PCR 仪不设热盖。

表格 7. 接头连接反应程序

温度	时间
20℃	15 min
4℃	∞

2.5 如果对文库大小有严格需求，可以在接头连接反应结束后，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 2.6 步骤。

2.6 在连接后的 110 μ L 反应体系中，每个样本中加入 88 μ L (0.8 $\times$) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。

2.7 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。

2.8 加入 200 μL 80% 的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

2.9 重复步骤 2.8。

2.10 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，打开管盖干燥至无乙醇残留。

2.11 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

2.12 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。

安全停止点：纯化后的接头连接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。

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 和 MGI 平台的接头，根据接头类型选择表格 8，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 文库扩增体系

3.1.1 Illumina 平台，配制如下 PCR 反应体系：

表格 8. Illumina 平台文库扩增体系（长接头 - UDI）

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

表格 9. Illumina 平台文库扩增体系（短接头 - UDI）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
● 2X PCR Mix	25 μ L
○ UDI Primer	5 μ L
总体积	50 μ L

3.1.2 MGI 平台，配制如下 PCR 反应体系：

表格 10. MGI 平台文库扩增体系（长接头 - 单端 index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
● 2X PCR Mix	25 μ L
● MGI PCR Primer Mix	5 μ L
总体积	50 μ L

表格 11. MGI 平台文库扩增体系（短接头 - 单端 Index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
● 2X PCR Mix	25 μ L
○ MGI Index Pxxx	2.5 μ L
● MGI Universal PCR Primer	2.5 μ L
总体积	50 μ L

表格 12. MGI 平台文库扩增体系（短接头 - UDI）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
● 2X PCR Mix	25 μ L
○ MGI UDI Primers xxx	5 μ L
总体积	50 μ L

3.2 充分混匀并瞬时离心。

3.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见表 13，推荐文库扩增循环数见表 14，设置 PCR 仪热盖 105°C。

表格 13. 文库扩增程序

温度	时间	Cycles
98°C	1 min	1
98°C	10 s	2-19 PCR Cycles
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

表格 14. 推荐文库扩增循环数

Input DNA (ng)	1 µg 文库产出推荐 PCR 循环数* (Illumina)	1 µg 文库产出推荐 PCR 循环数* (MGI)
1000	2-3	3-4
500	3-4	4-5
250	4-5	5-6
100	5-6	6-7
50	6-7	7-8
25	7-9	8-10
10	9-11	10-12
1	13-15	14-16
0.1	17-19	18-20

*注:

1. FFPE 样本在此基础上增加 1-3 个循环数。
2. 如果在接头连接后进行片段分选，推荐在此基础上增加 2 个 PCR 循环数。
3. 搭配 MGI 长接头时，参照较高循环数进行 PCR 扩增。
- 3.4 向扩增产物中加入 50 µL (1×) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。
- 3.5 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。
- 3.6 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 管从磁力架上取下，加入 31 µL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

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

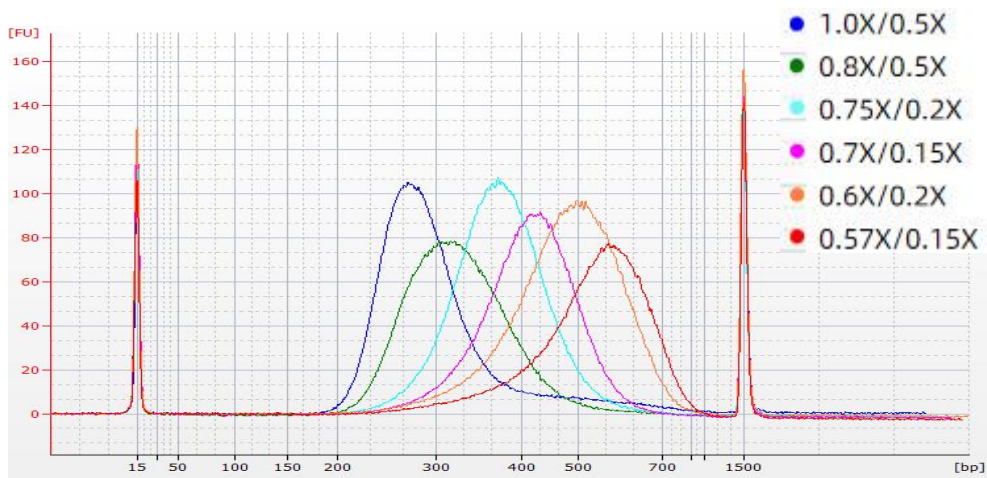
8.1 Illumina 平台水相体系片段分选

8.1.1 水相体系中的片段分选，即在接头连接后，先进行 1×磁珠纯化，然后在纯化后的 100 μL 水相体系中进行两轮磁珠分选。

8.1.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

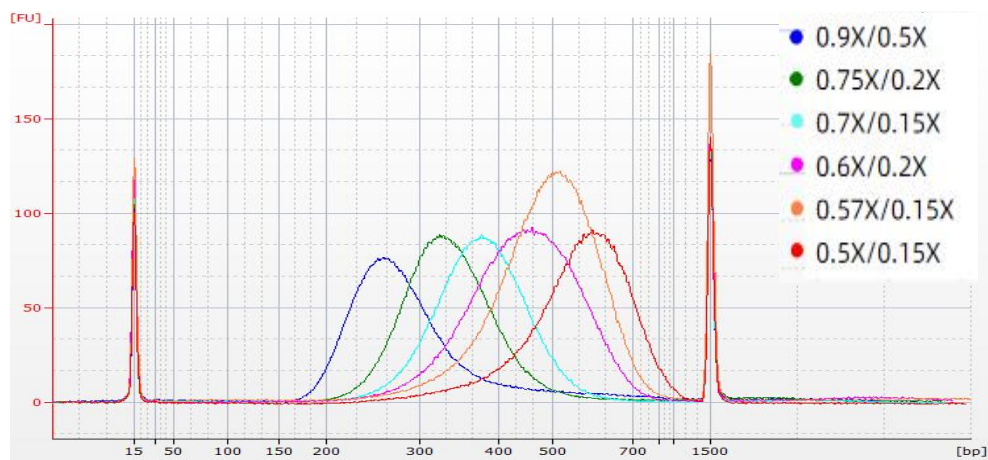
表格 15. 短接头水相体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	250	300	350	450
第一轮磁珠比例 (AX)	1 X	0.8 X	0.75 X	0.7 X	0.6 X	0.57 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.5 X	0.5 X	0.2 X	0.15 X	0.2 X	0.15 X



表格 16. 长接头水相体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	250	350	400	450
第一轮磁珠比例 (AX)	0.9 X	0.75 X	0.7 X	0.6 X	0.57 X	0.5 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.5 X	0.2 X	0.15 X	0.2 X	0.15 X	0.15 X



8.1.3 水相体系片段分选步骤如下：

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2) 在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 110 μL (1 $\times$) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 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。
- 4) 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。
- 5) 重复步骤 4)。
- 6) 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，打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 7) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。
- 8) 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 100 μL 上清至一个新 PCR 管。

9) 向接头连接纯化后的 100 μL 水相体系中加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。

10) 将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。

11) 向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。

12) 将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

13) 加入 200 μL 80% 的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

14) 重复步骤 13) 。

15) 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。

16) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

17) 将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，即可用于文库扩增。

安全停止点：纯化后的接头连接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。

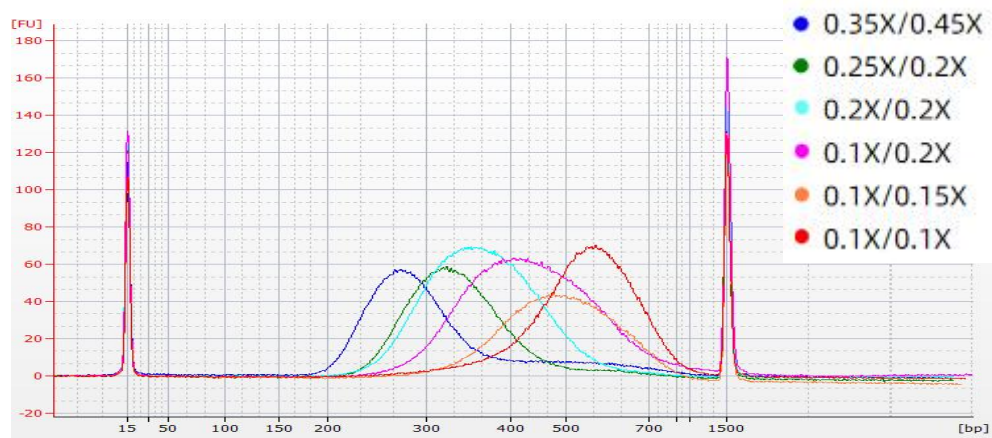
8.2 Illumina 平台 PEG 体系片段分选

8.2.1 PEG 体系中的片段分选，在接头连接后，无需去除连接反应体系中的 PEG，直接在 110 μL 连接体系中进行两轮磁珠分选。

8.2.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

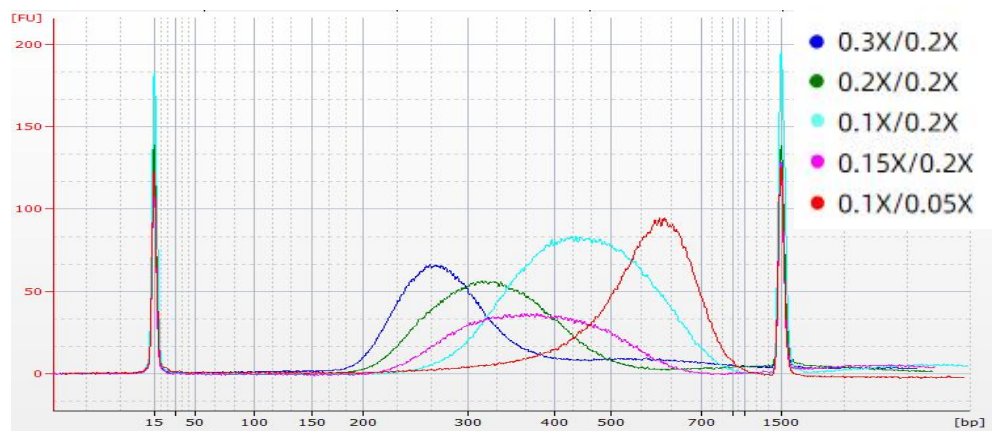
表格 17. 短接头 PEG 体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	250	300	400	450
第一轮磁珠比例 (AX)	0.35 X	0.25 X	0.2 X	0.1 X	0.1 X	0.1 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.4 X	0.2 X	0.2 X	0.2 X	0.15 X	0.1 X



表格 18. 长接头 PEG 体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	270	350	470
第一轮磁珠比例 (AX)	0.3 X	0.2 X	0.15 X	0.1 X	0.1 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.2 X	0.2 X	0.2 X	0.2 X	0.05 X



8.2.3 PEG 体系片段分选步骤如下：

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2) 在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。
- 4) 向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。
- 5) 将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。
- 6) 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。
- 7) 重复步骤 6)。
- 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。
- 9) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。
- 10) 将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，即可用于文库扩增。

安全停止点：纯化后的接头连接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。

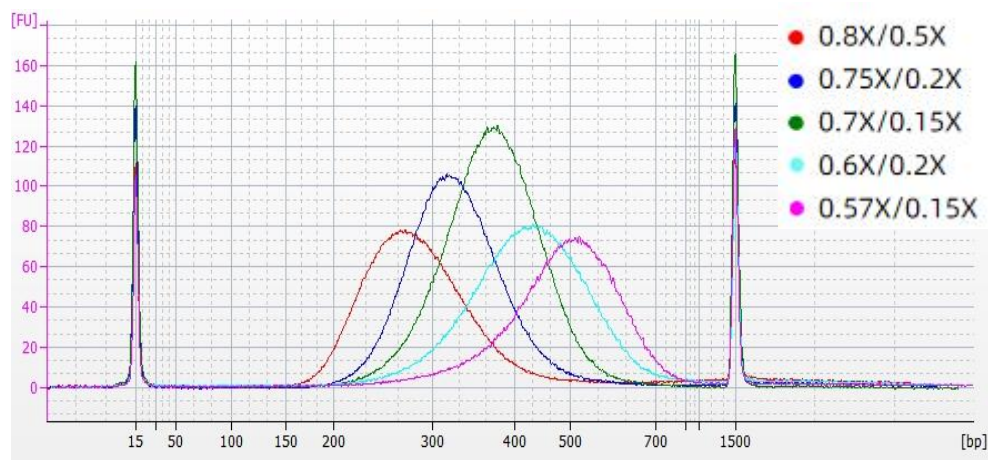
8.3 MGI 平台水相体系片段分选

8.3.1 水相体系中的片段分选，即在接头连接后，先进行 1 $\times$ 磁珠纯化，然后在纯化后的 100 μL 水相体系中进行两轮磁珠分选。

8.3.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

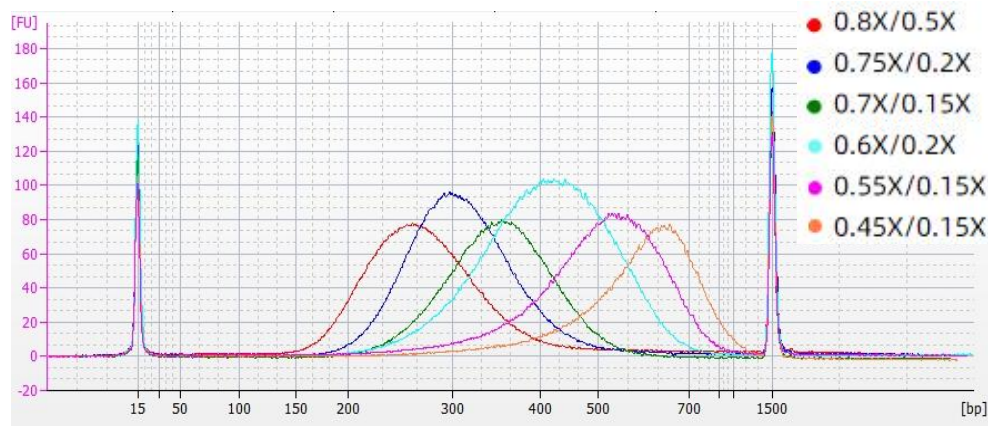
表格 19. 短接头水相体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	250	300	400
第一轮磁珠比例 (AX)	0.8 X	0.75 X	0.7 X	0.6 X	0.57 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.5 X	0.2 X	0.15 X	0.2 X	0.15 X



表格 20. 长接头水相体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	180	240	300	400	500
第一轮磁珠比例 (AX)	0.8 X	0.75 X	0.7 X	0.6 X	0.55 X	0.45 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.5 X	0.2 X	0.15 X	0.2 X	0.15 X	0.15 X



8.3.3 水相体系片段分选步骤如下：

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2) 在接头连接后的 110 μL 体系中，每个样本加入 110 μL (1 $\times$) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 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。
- 4) 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。
- 5) 重复步骤 4) 。
- 6) 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，打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 7) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。
- 8) 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 100 μL 上清至一个新 PCR 管。
- 9) 向接头连接纯化后的 100 μL 水相体系中加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。
- 10) 将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。
- 11) 向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温孵育 5 min。
- 12) 将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。
- 13) 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。
- 14) 重复步骤 13) 。
- 15) 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。
- 16) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。
- 17) 将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，

即可用于文库扩增。

安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4℃保存 1 周，长期保存需置于-20℃，避免反复冻融。

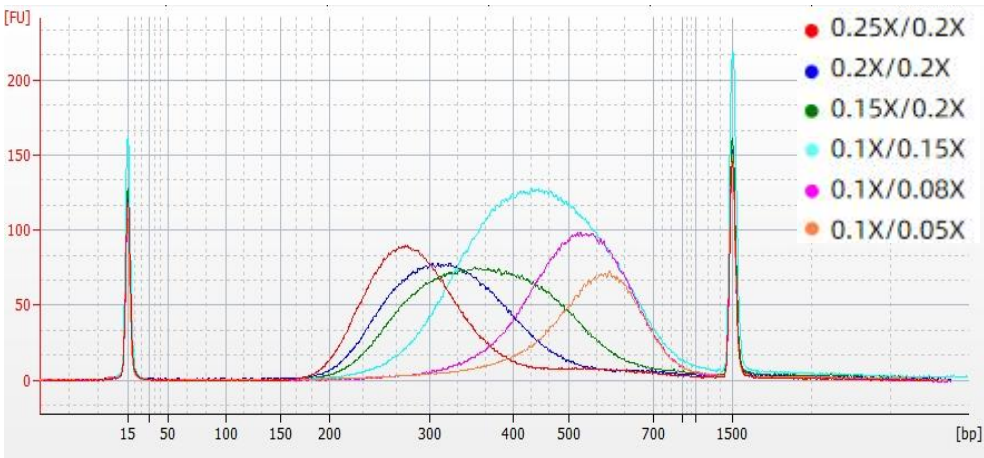
8.4 MGI 平台 PEG 体系片段分选

8.4.1 PEG 体系中的片段分选, 在接头连接后, 无需去除连接反应体系中的 PEG, 直接在 110 μL 连接体系中进行两轮磁珠分选。

8.4.2 由于磁珠分选会造成一定的样本量减少，推荐在 PCR 扩增时增加 2 个循环数。

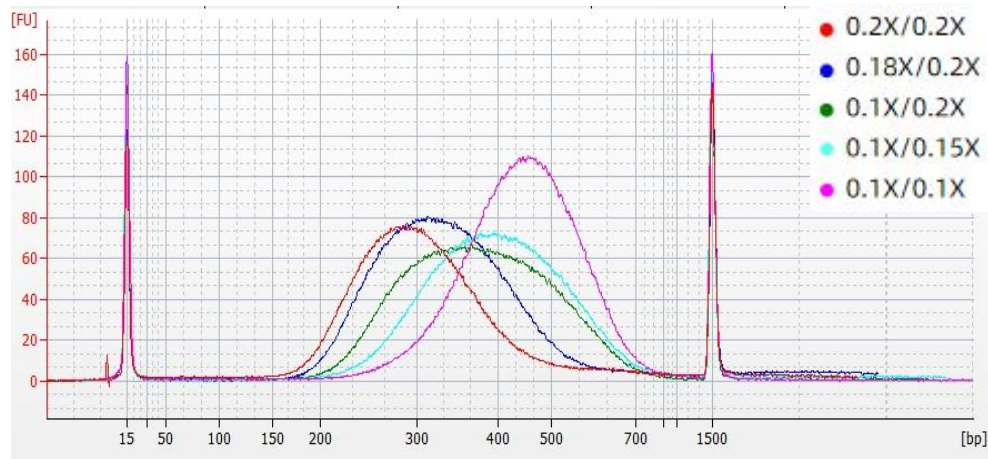
表格 21. 短接头 PEG 体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	250	300	400	450
第一轮磁珠比例 (AX)	0.25 X	0.2 X	0.15 X	0.1 X	0.1 X	0.1 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.2 X	0.2 X	0.2 X	0.15 X	0.08 X	0.05 X



表格 22. 长接头 PEG 体系，片段分选比例推荐

文库 Insert Size (bp)	150	200	240	280	330
第一轮磁珠比例 (AX)	0.2 X	0.18 X	0.1 X	0.1 X	0.1 X
第二轮磁珠比例 (BX)	0.2 X	0.2 X	0.2 X	0.15 X	0.1 X



8.4.3 PEG 体系片段分选步骤如下：

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2) 在接头连接后的 110 μ L 体系中，每个样本加入 A X 第一次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管放入磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中，注意本步骤中不要吸到磁珠。
- 4) 向上述上清液中加入 B X 第二次分选磁珠，混匀，室温下孵育 5 min。
- 5) 将样本放入磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。
- 6) 加入 200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。
- 7) 重复步骤 6)。

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。

9) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min。

10) 将样本放入磁力架上静置 2 min，吸取 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，即可用于文库扩增。

安全停止点：纯化后的接头连接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。

8.5 减量体系推荐

减量体系是指起始 Input DNA 总量保持不变，末端修复与 3'A-tailing 体系减量，接头连接体系减量，但 PCR 体系不减量，反应程序保持不变。

本说明书推出供参考的减量体系，简要如下所示：

8.5.1 末端修复与 3'A-tailing 体系减量参照表格 23，反应程序保持不变。

表格 23. 末端修复反应体系（减量体系）

组分	体积
Input DNA	X μL
● End Prep Buffer II	3.5 μL
● End Prep Enzymes	1.5 μL
● Nuclease-Free Water	Up to 30 μL
总体积	30 μL

8.5.2 接头连接体系减量参照表格 24，反应程序保持不变。

表格 24. 接头连接反应体系（减量体系）

组分	体积
末端修复与 3'A-tailing 反应产物	30 μL
● Nuclease-Free Water	2.5 μL
● Ligation Buffer	15 μL
● Ligase Enzymes II	5 μL
Working Adapter（按表 3 稀释后的接头）	2.5 μL
总体积	55 μL

8.5.3 文库扩增体系和反应程序保持不变，参考表格 8-表格 14。

9.附表

表格 25. Illumina 平台试剂盒兼容接头及 Index 类型汇总

接头类型	Index 单端/双端	UMI/UDI	货号	试剂
全长型	双端 (384 种板装 接头)	UDI	RK21706	Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_A (UDI 1-96)
		UDI	RK21707	Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_B (UDI 97-192)
		UDI	RK21708	Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_C (UDI 193-288)
		UDI	RK21709	Unique Dual Index Adapter Plate for Illumina Set_D (UDI 289-384)
截短型	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

表格 26. MGI 平台试剂盒兼容接头及 Index 类型汇总

接头类型	Index 单端/双端	UMI/UDI	货号	试剂
全长型	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)
截短型	单端	×	RK21616	Truncated DNA Adapter Kit for MGI Set_A (48 indices)
	单端	×	RK21617	Truncated DNA Adapter Kit for MGI Set_B (48 indices)
	双端 index	UDI	RK21686- RK21689	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit

	双端 (384 种板装 接头)	UDI	RK21721	Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set A (UDI Primers 1-96)
		UDI	RK21722	Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set B (UDI Primers 97-192)
		UDI	RK21723	Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set C (UDI Primers 193-288)
		UDI	RK21724	Truncated DNA Adapter (UDI) Plate for MGI Set D (UDI Primers 289-384)

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