VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2

ND606

Vazyme Biotech Co., Ltd

Web: www.vazyme.com
Tel: 400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com
Service: service@vazyme.com

企业已通过ISO 9001:2015
国际质量管理体系认证

www.vazyme.com
Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书
Version 7.1

www.vazyme.com

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 ····· 08
07/实验原理与流程概要 ····· 09
08/标准实验方案 ····· 11
附一、双轮磁珠分选 ····· 14
附二、cfDNA建库方案 ····· 16
附三、FFPE DNA建库方案 ····· 17
附四、靶向捕获建库方案 ····· 18

01/产品概述

VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2是针对Illumina®高通量测序平台定向优化而成的文库构建试剂盒。本试剂盒可以将100 pg - 1 μg Input DNA转换成Illumina®高通量测序平台专用文库。作为全新的升级版本，VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2通过优化末端修复模块和扩增模块性能，显著提高了文库转化率和扩增文库产出，广泛适用于多种样本的PCR或PCR-Free文库构建，且兼容靶向捕获流程。试剂盒中提供的所有试剂都经过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	ND606-01 (24 rxn)	ND606-02 (96 rxn)	ND606-03 (24 rxn)	ND606-04 (96 rxn)
End Prep Mix 3	360 μl	4 × 360 μl	360 μl	4 × 360 μl
Rapid Ligation Buffer	600 μl	4 × 600 μl	600 μl	4 × 600 μl
Rapid DNA Ligase	120 μl	480 μl	120 μl	480 μl
PCR Primer Mix 2	120 μl	480 μl	---	---
Amplification Mix 3	600 μl	4 × 600 μl	---	---
Control DNA (264 bp，50 ng/μl)	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

03/保存条件

所有组分于-20 ℃保存。

04/适用范围

适用于制备Illumina®高通量测序平台专用文库。兼容多种样本类型：基因组DNA (Genomic DNA)、游离DNA (cfDNA、ctDNA)、石蜡切片DNA (FFPE DNA)、免疫共沉淀DNA (ChIP DNA)、多重扩增子(Amplicons)等。对于简单基因组(Small Genome)、游离DNA (cfDNA、ctDNA)、免疫共沉淀DNA (ChIP DNA)、多重扩增子(Amplicons)等复杂程度较低的样本，Input DNA量最低可至100 pg。推荐应用于：

◇全基因组测序

◇全外显子或其他靶向捕获测序(配合Roche® NimbleGen™ SeqCap™ EZ、Agilent SureSelect、Illumina® TruSeq、or IDT xGen™ Lockdown™ Probes或其他杂交捕获系统)

◇扩增子测序

◇免疫共沉淀测序

◇宏基因组测序

◇甲基化测序(配合Phanta® UC Super-Fidelity DNA Polymerase for Library Amplification，Vazyme #P507)

Vazyme
www.vazyme.com

05/自备材料

纯化磁珠：VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)或其他等效产品；
DNA质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品；
DNA Adapter：
VAHTS™ DNA Adapters for Illumina®
(Vazyme #N801/N802或N805/N806/N807/N808)或其他等效产品；
#N801/N802为24种单端6 bp Indexed Adapters，各12种；
#N805/N806/N807/N808为96种单端8 bp Indexed Adapters，各24种。
其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、0.1 × TE、洗脱液 (10 mM Tris-HCl，pH 8.0 - 8.5)；
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：support@vazyme.com。

06–1/关于Input DNA和Fragmentation

◇ 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/靶向捕获测序	cfDNA/ctDNA	≥ 100 pg
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)
免疫共沉淀测序	ChIP DNA	≥ 100 pg
靶向测序	扩增子	≥ 100 pg

▲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。

◇ Input DNA特指投入End Preparation步骤中的DNA。如DNA样品在Fragmentation后进行过纯化或长度分选，需再次测定其浓度，不能直接以Fragmentation之前的DNA量作为Input DNA量。否则，可能会因文库扩增循环数不足导致文库产出偏低。

◇ 若Input DNA制备过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响End Preparation步骤的效率。当使用机械法进行Fragmentation且产物不进行纯化或长度分选直接建库时，请将DNA稀释在0.1 × TE中进行Fragmentation，请勿在灭菌超纯水中进行；当使用酶切法进行Fragmentation且产物不进行纯化或长度分选直接建库时，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Fragmentation产物纯化或长度分选后溶于0.1 × TE或灭菌超纯水中(≤ 50 μl)，再进行文库构建。

06–2/关于Adapter

◇ 针对Illumina®测序平台，Vazyme提供两套Indexed Adapters，可根据需Pooling的样本数量选择：
#N801/N802，提供24种单端6 bp Indexed Adapters，各12种；
#N805/N806/N807/N808，提供96种单端8 bp Indexed Adapters，各24种。

同时，VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2也可以兼容诸如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。您也可以自行合成或从别的途径购买类似的“TA-ligation” Adapters应用于Illumina®或其他测序平台。

◇ Adapter的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。推荐Adapter：Input DNA摩尔比在10:1 - 200:1之间。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 ng - 500 ng	20:1 - 100:1	10 μM	不稀释
25 ng - 100 ng	50:1 - 200:1	5 μM	1:2
5 ng - 25 ng	40:1 - 200:1	1 μM	1:10
100 pg - 5 ng	60:1 - 3000:1	0.3 μM	1:30

▲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，这样可以保证建库过程中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，尤其当Input DNA ≤ 25 ng时。当需要优化建库效率时，可在上表推荐条件下额外尝试几个更高的Adapter使用量(推荐2 - 10倍范围内)。如Adapter原液浓度限制无法提高使用量，可通过提高Adapter使用体积来尝试。如：默认Adapter使用体积为5 μl，当Input DNA为500 ng - 1 μg时可提高Vazyme Adapter使用量至10 μl以增加5 - 15%的文库产出。

06–3/关于Adapter Ligation产物纯化

◇ 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。

◇ 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。

Vazyme
www.vazyme.com

◇ 如数据显示纯化产物中Adapter或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 ×)进行第二次纯化。这样可以显著降低Adapter或Adapter Dimer的残留水平，尤其是当构建PCR-Free文库时。有时可能还需要配合Adapter的使用量降低才能完全消除Adapter或Adapter Dimer的残留。

06–4/关于磁珠的使用

◇ 试剂盒推荐使用VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)或Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter®)进行磁珠纯化。

注意：如使用其他来源磁珠，纯化条件可能需要更改！

◇ 磁珠操作通用注意事项：

▲ 磁珠使用量常用乘数“ × ”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 ×纯化时磁珠使用体积为1 × 100 μl = 100 μl；0.6 × / 0.2 ×分选时第一轮磁珠用量为0.6 × 100 μl = 60 μl，第二轮磁珠用量0.2 × 100 μl = 20 μl。

▲ 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 ×磁珠只能高效纯化长于250 bp的DNA，更短的DNA会在纯化过程中大量丢失；提高至1.8 ×后，150 bp的DNA也可进行高效纯化。

▲ 磁珠使用前应先平衡至室温(室温放置30 min)，否则会导致得率下降、分选效果不佳。

▲ 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。

▲ 样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，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。

▲ 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。

▲ 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 ℃烘箱干燥)。

▲ 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。

▲ 洗脱产物可于4℃稳定保存一周；长期保存时应置于-20℃，避免不必要的反复冻融。

06–5/关于长度分选

◇ 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。

◇ 长度分选执行位置有多种选择，可置于End Preparation之前、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，请参考附一、双轮磁珠分选。

◇ 进行长度分选，DNA损失量约为60% - 95%。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！

◇ 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)。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。

◇ Rapid Ligation Buffer中包含的高浓度PEG6000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/标准方案/步骤二/6.使用VAHTS DNA Clean Beads对反应产物进行纯化)**必须进行，不能省略！**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；如在End Preparation之前或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或切胶纯化。

06–6/关于Library Amplification

◇ PCR Primer Mix 2适用于扩增含完整长度Adapter的Illumina®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，推荐每条引物的扩增终浓度为0.5 - 4 μM 。

◇ PCR反应后期，引物通常会先于dNTP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(Qubit®等)来进行文库定量时，定量结果会比实际值偏低；但基于qPCR的文库定量体系(如VAHTS™ Library Quantification Kit for Illumina®，Vazyme #NQ101 - NQ106)在定量过程中包含变性过程，仍然可以准确定量这种过度扩增的文库。

◇ 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。

Vazyme
www.vazyme.com

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

Input DNA (Into End Preparation)	Number of cycles required to generate	
	100 ng	1 μg
100 pg	15 - 17	---
1 ng	9 - 11	14 - 15
5 ng	7 - 9	12 - 14
10 ng	6 - 8	10 - 12
50 ng	4 - 6	8 - 10
100 ng	2 - 4	7 - 9
250 ng	1 - 3	5 - 7
500 ng	0	4 - 6
1 μg	0	3 - 5

▲上表为使用~ 200 bp高质量Input DNA时测得的循环数参数。当DNA质量较差、文库长度较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

▲若建库过程中进行过长度分选，则参照较高循环数进行Library Amplification；否则，参照较低循环数即可。

▲当Adapter Ligation步骤中使用其他来源的非完整长度Adapter时，须至少扩增2个循环以补全文库末端Adapter序列。

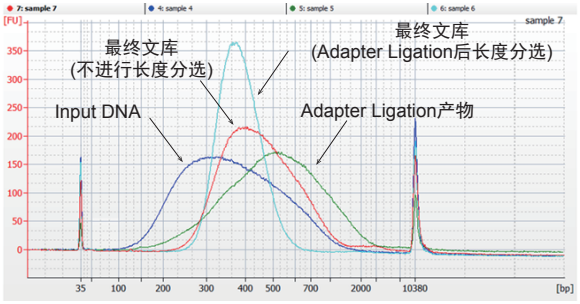
◇ 当Adapter Ligation时使用完整长度的Adapter (如Vazyme #N801/N802或#N805/N806/N807/N808)，且文库产出能够满足应用需要，可不进行Library Amplification步骤，从而获得PCR-Free文库。

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。

◇ 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 Analyzer™ (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备进行检测。VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2建库过程中各步骤产物的长度分布检测如下图所示。



VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2建库过程中各步骤产物的长度分布检测

▲常规适用于Illumina®平台的Adapter均为“Y”型Adapter，末端存在单链分叉区域。因此，Adapter Ligation之后未经扩增的PCR-Free文库两端都存在单链分叉区域。当进行文库长度分布检测时，这种单链的分叉结构会造成文库迁移速率变慢，进而导致检测结果偏长、分布范围变宽、峰型异常等问题。为了准确检测文库长度分布，可取少量PCR-Free文库进行适度PCR扩增，取扩增产物进行检测以反映PCR-Free文库的长度分布情况。也可通过检测VAHTS™ Library Quantification Kit for Illumina® (Vazyme #NQ101 - NQ106)扩增产物来反映PCR-Free文库的长度分布情况。

◇ 文库浓度检测：

常用文库浓度检测方法有两种：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，如VAHTS™ Library Quantification Kit for Illumina® (Vazyme #NQ101 - NQ106)。虽然前者简单易行， 但介于下述原因，推荐使用基于qPCR绝对定量的方法进行文库浓度测定。

▲当使用完整长度Adapter，且完成Adapter Ligation步骤之后，任何一个步骤产物都可以使用基于qPCR绝对定量的方法进行浓度测定。可以明确监控接头连接、磁珠纯化/分选、Library Amplification各步骤效率，进而能为体系优化和建库异常原因分析提供依据。

▲因PCR-Free文库缺少Library Amplification步骤，构建好的文库中包含一定比例的单端连接Adapter的产物和两端都不连接Adapter的产物。当使用Qubit®、PicoGreen®等基于双链DNA荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分这些产物。但qPCR绝对定量基于PCR扩增原理，只定量样品中两端Adapter完整的文库(即可测序文库)，可以排除单端或双端都不连接Adapter的不可测序文库的干扰。因此，PCR-Free文库只能使用基于qPCR绝对定量的方法进行浓度测定。

▲过度扩增的文库因包含大量不完整双链结构，不能使用Qubit®、PicoGreen®等基于双链DNA荧光染料的浓度测定方法。但基于qPCR绝对定量的方法不受过度扩增影响(参考06-6/关于Library Amplification)。

06–8/其他注意事项

◇ 使用前请将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。

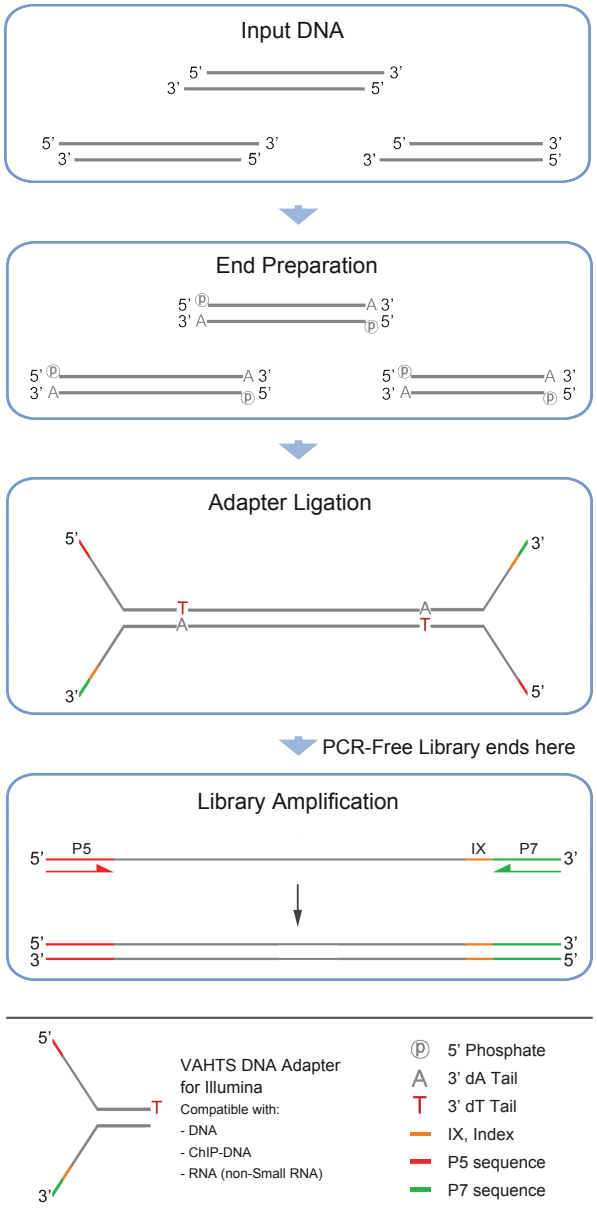
◇ 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。

◇ 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。

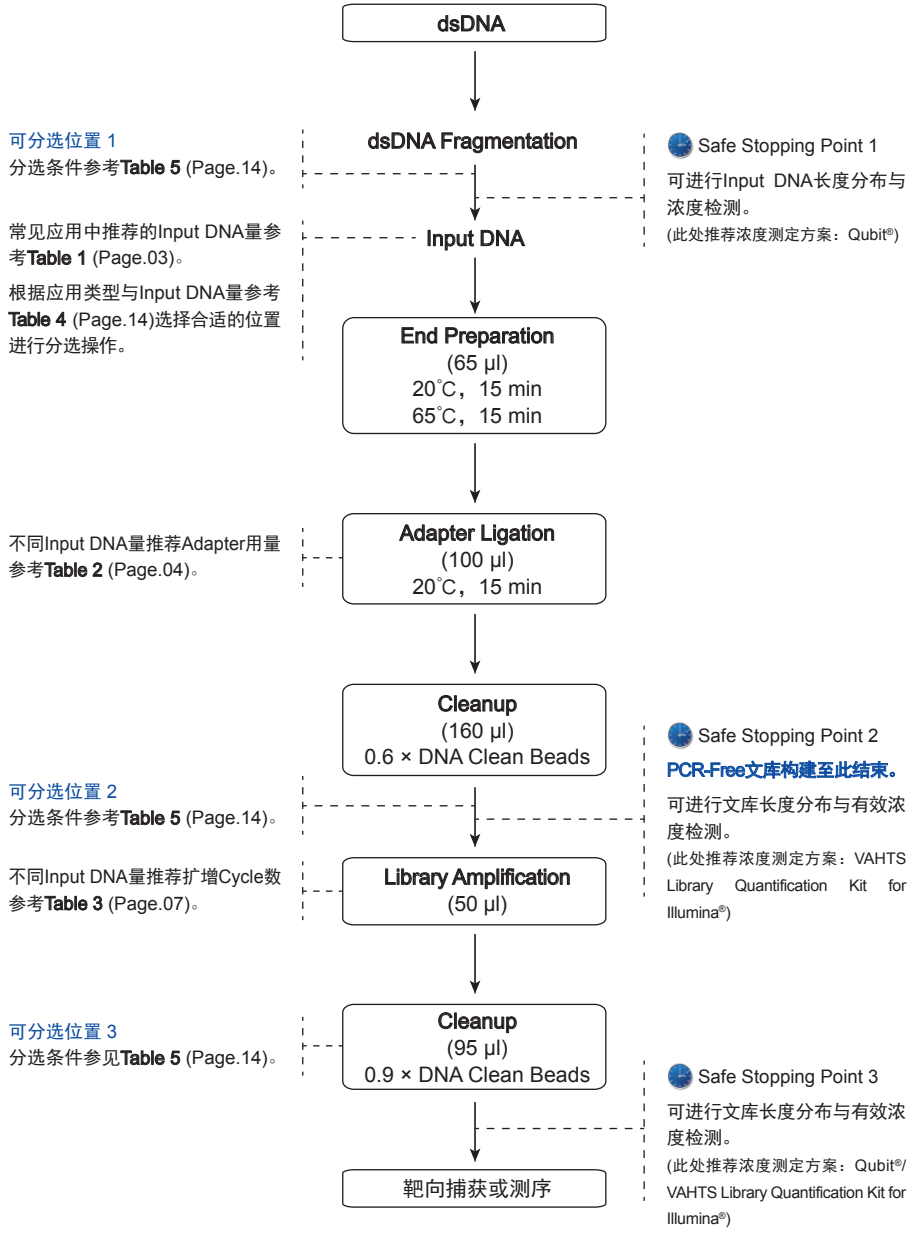
◇ 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应，使用前应预热PCR仪至反应温度附近。

◇ PCR产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，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。

Vazyme
www.vazyme.com



VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2建库原理



VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2建库流程概要

www.vazyme.com

步骤一：End Preparation

这一步骤将Input DNA末端补平，并在5'端进行磷酸化和3'端加dA尾。

1.将End Prep Mix 3解冻后颠倒混匀，于灭菌PCR管中配制如下反应：

组分	体积	
Input DNA	x μl	
End Prep Mix 3	15 μl	■
ddH_2O	To 65 μl	

2.使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。

3.将PCR管置于PCR仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖105 ℃	On
20℃	15 min
65℃	15 min
4℃	Hold

步骤二：Adapter Ligation

这一步骤将在End Preparation产物末端连接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解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

3.在End Preparation步骤PCR管中配制如下反应：

组分	体积	
End Preparation产物	65 μl	
Rapid Ligation buffer	25 μl	■
Rapid DNA ligase	5 ul	■
DNA Adapter X	5 μl	
总计	100 μl	

▲ Rapid Ligation buffer与Rapid DNA ligase预混后，可于4℃存放不超过24 hrs。

4.使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，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 ℃	On
20℃	15 min
4℃	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：

1/ 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。

2/ 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轻轻吹打10次充分混匀。

3/ 室温孵育5 min。

4/ 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**。

5/ 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**。

6/ 重复步骤5，总计漂洗两次。

7/ 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5 - 10 min至无乙醇残留。

8/ 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 - pH 8.5)洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，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 - pH 8.5)洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，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100 μl上清至新EP管中，切勿触碰磁珠，根据**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℃稳定保存一周。长期保存置于-20℃，避免不必要的反复冻融。

步骤三：Library Amplification (选做)

这一步骤将对纯化或长度分选后的Adapter Ligation产物进行PCR扩增。是否需要进行这一步骤取决于Input DNA量、Adapter是否为完整长度、应用需要等因素。如使用非完整长度Adapter，必须进行这一步骤。如使用完整长度Adapter，当Input DNA < 50 ng时，推荐进行Library Amplification；当Input DNA ≥ 50 ng或者不需要进行文库扩增富集时，此步骤可不进行，直接进入步骤四。

1. 将PCR Primer Mix 2、Amplification Mix 3解冻后颠倒混匀，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 2	5 μl	■
Amplification Mix 3	25 μl	■
总计	50 μl	

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。

Vazyme
www.vazyme.com

3. 将PCR管置于PCR仪中，进行下述反应：

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

4. 如需进行长度分选，参考附一、双轮磁珠分选进行；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：

1/ 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。

2/ 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轻轻吹打10次充分混匀。

3/ 室温孵育5 min。

4/ 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**。

5/ 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**。

6/ 重复步骤5，总计漂洗两次。

7/ 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5 - 10 min至无乙醇残留。

8/ 将PCR管从磁力架中取出，进行洗脱：

▲如后续不进行靶向捕获：加入22.5 μl洗脱液(10 mM Tris-HCl，pH 8.0 - pH 8.5)洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，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。

▲如后续需进行靶向捕获：加入22.5 μl灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，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℃稳定保存一周。长期保存置于-20℃，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。

附一、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。一般情况下，推荐将分选置于Adapter Ligation之后。也可根据Input DNA量与分布范围情况，将分选置于End Preparation之前或者Library Amplification之后。**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！**分选方案执行位置的选择和优缺点参见Table 4。

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	适用样本列举
End Preparation之前	Input DNA量充足，但分布范围宽或主峰与预期文库Insert Size不一致；Input DNA纯度较差	分选产物长度分布集中；能准确控制Input DNA量；能进一步提高Input DNA纯度，提高建库成功率	DNA损失大；文库分布范围略宽*	Fragmentation不充分或过度的基因组DNA
Adapter Ligation之后 **(推荐方案)**	Input DNA分布范围适合且量充足***	减少短片段DNA丢失；绝大多数情况下通用	文库分布范围略宽*	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***	减少建库过程中Input DNA的损失，提高文库复杂度	文库分布范围宽**	cfDNA
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	多重PCR产物、断裂程度较高的FFPE 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"Y"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。

**相对于其他位置分选而言。因其他位置分选产物进行Library Amplification之后，文库分布会进一步集中。

***推荐当Input DNA量≥ 50 ng时，选择在Adapter Ligation之后进行分选；当Input DNA量＜ 50 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

		预期文库Insert Size (bp)									
分选方案执行位置与条件	磁珠轮数	150	200	250	300	350	400	450	500	550	700
End Preparation之前	一轮**X** (μl)	100	90	80	70	60	55	52	50	48	43
分选(样品体积补至100 μl)	二轮**Y** (μl)	30	20	20	20	20	20	15	15	15	12
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	/	/

Vazyme
www.vazyme.com

▲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。

◇ 样品预处理(重要！)

▲如在End Preparation之前进行长度分选，样品体积应为100 µl，不足时使用灭菌超纯水补齐；

▲如在Adapter Ligation产物纯化之后进行长度分选，样品体积应为100 µl，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 µl，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 µl的样品直接进行分选。

◇ 分选方案[参考Table 5 (Page.14)确定**X**和**Y**的值]

1/ 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。

2/ 吸取**X** µl VAHTS DNA Clean Beads至上述100 µl产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。

3/ 室温孵育5 min。

4/ 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**。

5/ 吸取**Y** µl VAHTS DNA Clean Beads至上清中，用移液器轻轻吹打10次充分混匀。

6/ 室温孵育5 min。

7/ 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**。

8/ 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**。

9/ 重复步骤8，总计漂洗两次。

10/ 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5 - 10 min至无乙醇残留。

11/ 将PCR管从磁力架中取出，进行洗脱：

▲如后续不进行靶向捕获：加入22.5 µl洗脱液(10 mM Tris-HCl，pH 8.0 - 8.5)洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，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。

▲如后续需进行靶向捕获：加入22.5 µl灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，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。

附二、cfDNA建库方案

cfDNA (游离DNA)是一种来源于血液的碎片化DNA，具有高度片段化(~180 bp)、含量低等显著特点，在无创产前诊断(NIPT)以及液体活检(ctDNA检测)等领域具有极高的检测价值。针对这类样品，VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2提供高度简化和优化的建库方案。

注意事项

◇Input DNA特指投入到End Preparation的DNA，体积≤ 50 µl。

◇cfDNA本身高度片段化，不需要进行Fragmentation。

◇为保证建库质量，推荐对cfDNA模板进行长度分布(2100 Bioanalyzer)和浓度(Qubit®) 检测。

建库流程

步骤一：End Preparation (参照08/标准实验方案/步骤一)

Input DNA量：100 pg - 100 ng。

步骤二：Adapter Ligation (参照08/标准实验方案/步骤二)

Adapter：根据**Table 2** (Page.04)预先稀释。

Cleanup：采用0.6 ×磁珠纯化，22.5 µl洗脱液洗脱DNA，移取20 µl上清进行下一步骤。

步骤三： Library Amplification (参照08/标准实验方案/步骤三)

循环数：推荐12 - 17，根据文库产出需求自行调整。

Cleanup：cfDNA文库是否进行长度分选由样本情况与数据分析需要决定。

▲如不进行双轮磁珠分选：采用0.9 ×磁珠纯化，22.5 µl洗脱液洗脱DNA，移取20 µl上清至新EP管中，-20℃ 保存。

▲如进行双轮磁珠分选：采用0.73 × / 0.25 ×双轮磁珠分选，22.5 µl洗脱液洗脱DNA，移取20 µl上清至新EP管中，-20℃ 保存。

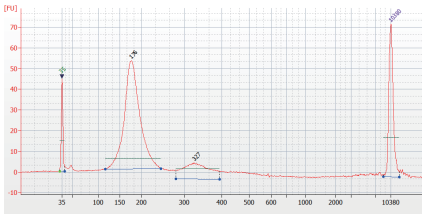
步骤四：文库质量控制

文库浓度测定：

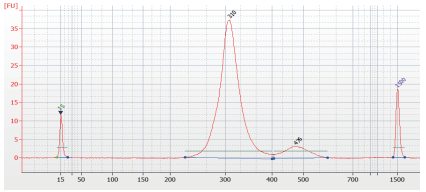
推荐使用荧光染料法(Qubit®或Picogreen®)或qPCR绝对定量法进行文库浓度测定。

文库长度分布检测：

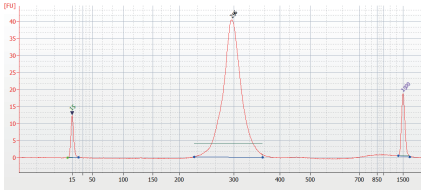
通过Agilent 2100 Bioanalyzer进行长度分布检测。



磁珠法提取的cfDNA



cfDNA文库(不进行长度分选)



cfDNA文库(进行长度分选)

Vazyme
www.vazyme.com

附三、FFPE DNA建库方案

FFPE DNA是从福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-Fixed and Parrffin-Embedded，FFPE)的切片中获得的DNA，具有提取困难(与组蛋白紧密交联)、质量较低(降解严重)等特点。FFPE样本易于保存且来源广泛，在医学领域具有极高的应用价值。针对这类样品，VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2提供高度简化和优化的建库方案。

注意事项

◇Input DNA特指投入到End Preparation的DNA，体积≤ 50 µl。

◇因组织差异、包埋质量、保存时间等因素影响，提取到的FFPE DNA质量不尽相同。使用低质量的FFPE DNA建库时应适当提高Input DNA量或增加扩增循环数。

◇为了保证建库质量，推荐对FFPE DNA模板进行长度分布(Agilent 2100 Bioanalyzer)和浓度(Qubit®)检测。也可使用基于qPCR法的FFPE DNA质量评价体系预先对模板进行检测。

◇当FFPE DNA片段化程度不足，平均分子量偏大时，建库前需要先进行Fragmentation。

建库流程

步骤一：End Preparation (参照08/标准实验方案/步骤一)

Input DNA量：≥ 50 ng。

步骤二：Adapter Ligation (参照08/标准实验方案/步骤二)

Adapter：根据**Table 2** (Page.04)预先稀释。

Cleanup：采用0.6 ×磁珠纯化。

▲如纯化产物不进行双轮磁珠分选：用22.5 µl洗脱液洗脱DNA，移取20 µl上清。

▲如纯化产物需进行双轮磁珠分选：用105 µl洗脱液洗脱DNA，移取100 µl上清，后根据**Table5** (Page.14)双轮磁珠分选条件进行文库长度分选。

步骤三： Library Amplification (参照08/标准实验方案/步骤三)

循环数：参照**Table 3** (Page.07)，根据样本质量调整。

Cleanup：

▲如扩增产物不进行双轮磁珠分选：采用0.9 ×磁珠纯化，22.5 µl洗脱液洗脱DNA，移取20 µl上清至新EP管中，-20˚C 保存。

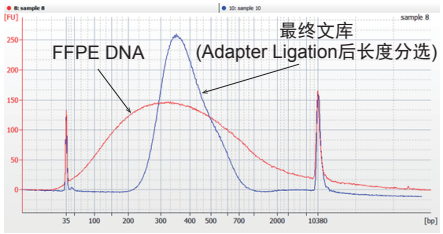
▲如扩增产物需进行双轮磁珠分选：用灭菌超纯水补至100 µl，后根据**Table5** (Page.14)双轮磁珠分选条件进行文库长度分选。

文库浓度测定：

推荐使用荧光染料法(Qubit®或Picogreen®)或qPCR绝对定量法进行文库浓度测定。

文库长度分布检测：

通过Agilent 2100 Bioanalyzer进行长度分布检测。



FFPE DNA文库(进行长度分选)

附四、靶向捕获建库方案

以NimbleGen® SeqCap EZ捕获流程为例，VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina® V2可以用于构建预捕获文库。

注意事项

◇Input DNA特指投入到End Preparation的DNA，体积≤ 50 µl。

◇Input DNA范围应介于180 - 220 bp范围内，具体打断条件参照Covaris或其他DNA片段化设备的使用说明书。

◇为保证建库质量，推荐对Input DNA进行长度分布(Agilent 2100 Bioanalyzer)和浓度(Qubit®)检测。

建库流程

步骤一：End Preparation (参照08/标准实验方案/步骤一)

Input DNA量：根据样本类型参照**Table 1** (Page.03)选择。

步骤二：Adapter Ligation (参照08/标准实验方案/步骤二)

Adapter： 根据**Table 2** (Page.04)预先稀释。VAHTS™ DNA Adapters for Illumina® (Vazyme #N801/N802)可完美兼容NimbleGen® SeqCap EZ。使用其他来源的Adapter或者捕获试剂时，Adapter的选择需要参考捕获试剂中的Blocking试剂。

Cleanup：采用0.6×磁珠纯化，105 µl洗脱液洗脱DNA，移取100 µl上清；后进行0.68 × / 0.2 ×双轮磁珠分选，22.5 µl洗脱液洗脱DNA，移取20 µl上清进行下一步骤。

步骤三： Library Amplification (参照08/标准实验方案/步骤三)

循环数：参照**Table 3** (Page.07)，推荐按上限循环数扩增。按推荐上限循环数扩增可获得≥ 1 µg的文库产出；若捕获前先进行样本Pooling，应确保每个样本的文库产出≥ 1 µg/n (n = 样品数量)。此时，可降低各样品扩增循环数，以提高文库复杂度、降低Duplication rates。

Cleanup：采用0.9 ×磁珠纯化，22.5 µl**灭菌超纯水**洗脱DNA，移取20 µl上清至新EP管中。

步骤四：文库质量控制

参照SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1 (Chapter 4，Step 5) (Roche document number 06588786001，09/15)进行文库质量控制。

步骤五：靶向富集

参照SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1第5 - 8章完成靶向捕获流程。

Vazyme
www.vazyme.com