



版本号：05/2024

CWseq Universal DirectFast DNA Library Prep Kit (Illumina & MGI)

通用含片段化酶DNA文库快速制备试剂盒 (Illumina & MGI)

目录号：CW3048S (24 rxns)

CW3048M (96 rxns)

保存条件：Box 1 -20℃保存，干冰运输；Box 2 2-8℃，冰袋运输。

产品内容

Box 1			Box 2		
Component	CW3048S (24 rxns)	CW3048M (96 rxns)	Component	CW3048S (24 rxns)	CW3048M (96 rxns)
FER Buffer	240 μ L	960 μ L	CMPure Beads	1.5 mL×2	4 mL×3
FER Enzyme Mix	120 μ L	480 μ L			
T4 DNA Ligase	72 μ L	288 μ L			
T4 DNA Ligase Buffer	336 μ L	672 μ L×2			
2×Super HiFi PCR Mix	600 μ L	1.2 mL×2			
Neutralization Reagent	120 μ L	480 μ L			

产品简介

CWseq Universal DirectFast DNA Library Prep Kit 是针对Illumina和MGI测序平台研发的二代测序酶切法建库试剂盒。包含文库构建中DNA片段化/末端修复/加A、Adaptor连接和文库富集所需的预混酶三大模块。通过控制反应时间，可将0.1 ng-1 μ g基因组DNA、PCR扩增产物、FFPE等不同来源的样本DNA片段化成小片段，避免了繁琐的超声过程和对仪器的依赖。本试剂盒简化纯化步骤，缩短建库时间，在扩增模块采用高保真DNA聚合酶进行文库富集，无偏好的进行PCR扩增，保证了测序结果准确性。

产品特点

1. 精准酶切，片段化末端修复加A一管完成，无需纯化直接连接接头。
2. 连接接头后使用配套磁珠直接分选（可选）。
3. 高保真酶进行PCR富集扩增，最大程度上降低了扩增偏好性。
4. 适用于人、动物、植物、微生物等不同物种建库，所得文库适用于Illumina、MGI各个平台。

自备仪器、试剂和耗材

1. 接头引物试剂盒
MGI平台：单端短接头引物试剂盒I/II/III (Cat.No.CW3014/CW3015/CW3016)
Illumina平台：单端短接头引物试剂盒I/II(Cat.No.CW2586/CW2587)、双端短接头引物试剂盒 (Cat.No.CW3042)。
2. DNA质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品。
3. DNA纯化磁珠：使用试剂盒自带配套磁珠。
4. 其他材料：低吸附的PCR管，1.5 mL离心管，过滤枪头，磁力架（建议使用DynaMagTM-2 Cat.No. 12321D），无水乙醇（100%乙醇，分析纯），去离子水（pH 在7.0-8.0之间），PCR仪器等。

实验前准备及注意事项

1. 样本片段化

- 1.1 样本洗脱液：DNA样本建议用纯水进行洗脱。测定样本浓度及样本质量，建议样本A260/280=1.8-2.0，样本上样量为0.1ng-1μg之间。
- 1.2 如果样本中杂质较多会影响下游实验，需要将样本DNA经过磁珠纯化，筛掉杂质，使用纯水洗脱。
- 1.3 本试剂盒兼容不同物种，可以依据说明书推荐使用，对于FFPE样本，依据降解程度选择不同打断时间，具体条件参考附录1举例。
- 1.4 本试剂盒在一定程度上对金属螯合剂具有一定的抑制性，建议体系中EDTA终浓度控制在0.2mM以内，如果体系终浓度≥0.2mM建议添加中和Buffer。

2. 接头

- 2.1 本试剂盒不自带测序平台接头引物，需要自行匹配相应平台的接头引物，完成文库构建。本试剂盒同时兼容常规试剂盒单双端接头。
- 2.2 接头的使用量会直接影响文库的质量，投入量过高会有二聚体残留，投入过低影响接头与插入片段连接。接头使用量可根据表5进行选择。

3. 磁珠

- 3.1 本试剂盒自带磁珠，文库纯化或者筛选优先选择本试剂盒自带磁珠。
- 3.2 客户匹配其他纯化磁珠时需要重新摸索磁珠分选及纯化的比例。

4. 文库扩增

- 4.1 本试剂盒不提供接头扩增引物，需要自行匹配相关的平台的接头引物进行扩增。
- 4.2 文库扩增的循环数依据投入量进行设定，过低出库浓度偏低，过高扩增偏好，扩增突变累积等问题增加，具体循环数参考表10。

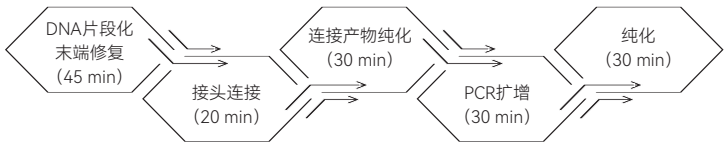
5. 文库长度分选

- 5.1 建库过程中进行长度分选，DNA损失量较大，会导致文库复杂度和产出下降。当投入DNA小于50ng时候不建议进行文库筛选或在PCR扩增后进行筛选。
- 5.2 长度分选的位置可以选择接头连接后，或者PCR扩增后进行分选，具体分选步骤可以参考操作内容。

6. 其他注意事项

- 6.1 由于使用本品所进行的片段化过程为酶促反应，故片段化过程对反应温度、反应时间、体系配制以及DNA上样量等因素较为敏感。
- 6.2 为了避免试剂反复冻融影响文库产量，建议在首次使用时进行分装保存。
- 6.3 PCR产物因操作不当极易产生污染，导致实验结果不准确，建议将PCR反应体系配制区与PCR产物纯化区隔离，并使用专门的移液器，定期对各实验区域进行清洁，推荐使用康为清溶剂CW3141。
- 6.4 取出试剂盒内对应试剂，短暂离心，酶混合液置于冰上待用；缓冲液使用前需在室温溶解后震荡离心，置于冰上待用，去离子水置于室温待用；请在冰上配制混合液。试剂盒内缓冲液冰冻溶解后可能出现沉淀，沉淀不影响试剂功能，请充分震荡混匀直至沉淀消失后使用。

DNA建库流程示意图



DNA文库构建流程

** 请在实验前仔细阅读本操作说明，根据使用测序平台类型选择操作方案。实验开始前，明确核酸浓度，本试剂盒投入量为0.1ng-1μg，推荐上样量为1ng-500ngDNA。DNA溶液中不含螯合剂，如果DNA溶解于1×TE或含EDTA的溶液中，建议使用磁珠进行纯化或添加Neutralization Reagent。

操作步骤

DNA片段化及末端修复A

- 1. FER Buffer融化后震荡混匀，FER Enzyme Mix用手指轻弹混匀，短暂离心收集置于冰上。

2. 向200 μ L PCR管中加入以下试剂：

表1 片段化及末端修复反应体系的配制

组分	体积
Double-stranded DNA	1 ng-500 ng
FER Buffer	10 μ L
FER Enzyme Mix	5 μ L
Neutralization Reagent	可选
NF Water	Up to 50 μ L

注意：实验开始前，请确认模板DNA是否含有 ≥ 0.2 mM EDTA，如果含有可根据片段化体系中EDTA的终浓度加入相应体积的 Neutralization Reagent中和EDTA，加入体积按照50 μ L体系含EDTA终浓度每0.1 mM 加入0.375 μ L Neutralization Reagent。如：DNA模板中含1 mM EDTA，加入20 μ L模板至50 μ L片段化末端修复反应体系中，则体系的EDTA终浓度为0.4 mM，加入Neutralization Reagent的量为1.5 μ L。

3. 轻弹混匀，短暂离心收集置于冰上，立即进行PCR反应。

4. 片段化、末端修复程序参见下表（PCR仪热盖温度70 $^{\circ}$ C）

表2 片段化及末端修复反应程序

步骤	温度	时间
1	4 $^{\circ}$ C	1 min
2	32 $^{\circ}$ C	20 min（可调）
3	65 $^{\circ}$ C	30 min
4	4 $^{\circ}$ C	Hold

5. 片段化时间根据目标片段大小进行调节，具体参见表3。

表3 片段化时间与目标片段大小之间的关系

插入片段大小	32 $^{\circ}$ C温育时间（min）			
	200 bp	250 bp	350 bp	450 bp
100 ng DNA	20-30 min	15-20 min	10-15 min	5-10 min

注意：1）根据预期插入片段大小选择32 $^{\circ}$ C下温育时间，片段大小随反应时间的延长而变短。

2）如结果和预期大小有少量偏差可酌情调整反应时间，可在推荐反应时间基础上加减3-5min。

3）FFPE样本依据其质量酌情减少片段化时间

6. 反应结束后立即进行接头连接反应。

接头连接反应

1. 向上述已完成DNA片段化末端修复加A的反应液中直接加入以下试剂：

表4 接头连接反应程序

组分	体积
T4 DNA ligase buffer	14 μ L
T4 DNA ligase	3 μ L
Adaptor for Illumina/MGI	5 μ L
NF Water	8 μ L
Total	30 μ L

2. 此步骤加入匹配不同的平台的Adaptor，其adaptor浓度依据投入量的不同需要需要匹配不同的浓度，具体内容见表5

表5 1 ng-500 ng gDNA推荐的Adaptor使用浓度

gDNA	Adaptor工作浓度	康为Adaptor预稀释浓度
100 ng-500 ng	10 μ M	不稀释
25 ng-100 ng	5 μ M	1:2
5 ng-25 ng	1 μ M	1:10
1 ng-5 ng	0.1-0.2 μ M	1:10-1:100

3. 震荡混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。
4. 将PCR管放置在PCR仪器中，运行以下程序

表6 连接反应程序

步骤	温度	时间
1	热盖	25℃
2	23℃	20 min
3	4℃	Hold

注意：若此操作使用PCR仪，请将热盖设为25℃。

连接产物纯化

使用试剂盒配套磁珠进行DNA片段的纯化回收。连接产物纯化有两种方案，选择性回收和完全回收。若起始样本量低于50 ng 此步建议选择方案一（DNA片段完全回收）；若投入量大于50 ng选择方案二（DNA片段选择回收）。

方案一：DNA完全回收

1. 提前30 min取出 CMPure置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 将连接产物转移至一新的1.5 mL离心管中,将反应体系加水补至100 μ L。
3. 吸取80 μ L CMPure 至100 μ L产物中，充分震荡混匀，室温孵育5 min；
4. 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置5 min至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
5. 保持离心管固定于磁力架上，加入250 μ L 新鲜配制的80%乙醇，室温静置30s，弃去上清；

注意：一定要使用新鲜配置的乙醇，否则会影响实验结果。
6. 重复步骤5一次，最后一次尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。

注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。
7. 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥3~5 min，直至磁珠无反光、无开裂；

注意：切勿加热晾干，切勿过度干燥磁珠，否则会影响产量。
8. 将离心管从磁力架上取下，加入22 μ L NF water进行DNA 洗脱，移液器吹打或充分震荡混匀并室温下溶解5 min；
9. 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置5 min至液体澄清，将20 μ L上清液全部转移到新的PCR管中，进行下一步反应或者-20℃保存。

方案二：DNA片段选择性回收

进行DNA选择性回收时，根据需要选择不同大小的目标片段，表7是不同片段大小的筛选过程中所需要的磁珠用量。

表7 获取DNA主带时磁珠建议用量（100 μ L反应体系）

DNA片段大小	插入片段+Adaptor	300 bp	350 bp	400 bp	450 bp
	第一次选择	50 μ L	40 μ L	30 μ L	20 μ L
磁珠用量	第二次选择	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L

以下流程筛选的目的片段主峰在350 bp左右

1. 提前30 min 取出 CMPure磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 将连接产物转移至一新的1.5 mL离心管中,将反应体系补至100 μ L。
3. 吸取40 μ L CMPure 至连接产物中，涡旋震荡充分混匀后室温静置5 min。
4. 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 min），小心吸取上清，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意：不要弃除上清。
5. 向上清中加入20 μ L混合均匀的CMPure，涡旋震荡5 s后室温放置5 min。
6. 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 min），小心吸取上清，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意：不要弃除磁珠。

7. 保持离心管固定于磁力架上，加入250 μL 新鲜配制的80%乙醇，室温静置30 s，弃去上清；
注意：一定要使用新鲜配置的乙醇，否则会影响实验结果。
8. 重复步骤7一次，最后一次尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。
注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。
9. 保持离心管固定于磁力架上，打开不粘管管盖，室温干燥3~5 min，直至磁珠无反光、无开裂；
注意：切勿加热晾干，切勿过度干燥磁珠，否则会影响产量。
10. 将离心管从磁力架上取下，加入22 μL NF Water，涡旋振荡使磁珠完全重悬于离子水中，室温静置5 min；
11. 短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5 min），将20 μL 澄清溶液转移至一个新的PCR管中。

PCR扩增

1. 按照表8配制PCR反应混合液：

表8 PCR反应混合液的配制

组分	体积
2×Super HiFi PCR Mix	25 μL
Index primer Mix	5 μL
纯化回收的接头连接产物	20 μL
Total	50 μL

注意:Index primer Mix根据不同平台使用不同接头引物试剂盒进行选择，如选择康为试剂接头引物试剂盒，可参考相应说明书使用。

2. 震荡混匀5 s，瞬时离心将反应液收集至管底。
3. 将上述PCR管置于PCR仪上，反应程序参照表9

表9 PCR反应程序

温度	时间	循环数
98℃	3 min	
98℃	20 s	参照表10
60℃	20 s	
72℃	30 s	
72℃	5 min	
4℃	Hold	

4. 反应所需要的循环数根据DNA的投入量进行调整，具体循环数需要参照表10

表10 获取100 ng和1 μg 文库推荐的扩增循环数

样本DNA	对应产量所需循环数	
	100 ng	1 μg
0.1 ng	13-15	16-18
1 ng	9-11	11-13
10 ng	6-8	9-11
100 ng	3-5	6-8
500 ng	0*/1-3	3-5
1000 ng	0*/1-3	2-4

注意：1) FFPE 样本质量较差，可在推荐最高循环数的基础上增加3个循环。

2) 当DNA质量较差、文库较长时，可适当提高循环数以获取足量文库。

3) 当进行磁珠分选时建议按照高循环数进行文库扩增以获取足量文库。

4) *当接头连接时使用完整长度的Adaptor，且文库产出满足应用要求时，可不进行PCR扩增步骤，直接获取PCR-Free文库；若使用的是不完整接头，需进行1-3轮PCR扩增，以获取测序所需的完整接头序列。

PCR产物的纯化回收

PCR产物纯化可以进行选择性回收和完全回收两种方案进行。若起始样本量低于50 ng且对片段分布集中度要求较高, 选择方案二 (PCR产物选择回收)。若投入量大于50 ng建议接头连接后对连接产物进行分选回收 (具体参照连接产物DNA片段选择性回收)。

方案一：PCR产物完全回收

- 1. 提前30 min 取出 CMPure置于室温, 使用前充分震荡混匀;
- 2. 将PCR反应液转移至一新的1.5 mL离心管中; 吸取0.9倍体积CMPure至PCR产物中, 用移液器轻轻敲打或震荡充分混匀, 室温孵育5 min;
- 3. 短暂离心, 将离心管放于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需5 min), 小心吸取上清, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。
注意: 不要弃除磁珠。
- 4. 保持离心管固定于磁力架上, 加入250 μ L 新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30s, 弃去上清;
注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。
- 5. 重复步骤4一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程的移液器把管底液体吸干。
注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。
- 6. 保持离心管固定于磁力架上, 打开不粘管管盖, 室温干燥3~5 min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。
- 7. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L NF Water, 涡旋振荡使磁珠完全重悬于离子水中, 室温静置5 min;
- 8. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置2 min至液体澄清, 将22 μ L上清液全部转移到新的PCR管中, 进行下一步反应或者-20℃保存。

方案二：DNA片段选择性回收

当投入量过低且对片段分布要求较为集中, 可选择此方案进行选择回收, 磁珠双选比例参考表11

表11 获取DNA主带时磁珠建议用量 (100 μ L反应体系)

DNA片段大小	插入片段+Adaptor	300 bp	350 bp	400 bp	450 bp
	第一次选择	80 μ L	70 μ L	65 μ L	60 μ L
磁珠用量	第二次选择	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L

- 1. 提前30 min 取出 CMPure磁珠置于室温, 使用前充分震荡混匀;
- 2. 将PCR反应液转移至一新的1.5 mL离心管中, 将反应体系补至100 μ L。
- 3. 吸取70 μ L CMPure 至PCR产物中, 涡旋震荡充分混匀后室温静置5 min。
- 4. 短暂离心, 将离心管放于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需5 min), 小心吸取上清, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。
注意: 不要弃除上清。
- 5. 向上清中加入20 μ L混合均匀的CMPure, 涡旋震荡5 s后室温放置5min。
- 6. 短暂离心, 将离心管放于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需5 min), 小心吸取上清, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。
注意: 不要弃除磁珠。
- 7. 保持离心管固定于磁力架上, 加入250 μ L 新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30 s, 弃去上清;
注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。
- 8. 重复步骤7一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程的移液器把管底液体吸干。
注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。
- 9. 保持离心管固定于磁力架上, 打开不粘管管盖, 室温干燥3~5 min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。
- 10. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L NF Water, 涡旋振荡使磁珠完全重悬于离子水中, 室温静置5 min;
- 11. 短暂离心, 将离心管放于磁力架上直至溶液澄清 (约需5 min), 将20 μ L澄清溶液转移至一个新的PCR管中。

文库质控

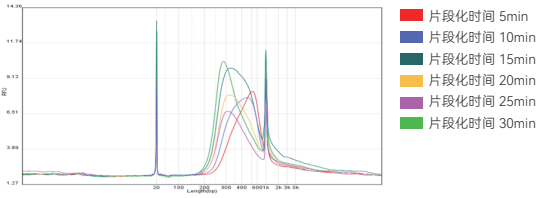
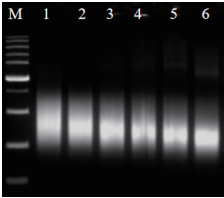
- 1. 文库浓度检测一般有两种方法：一是基于双链DNA荧光染料的方法，如Qubit、PicoGreen等，二是基于qPCR绝对定量的方法。不建议使用基于光谱检测的方法，如 NanoDrop等。
- 2. 文库长度分布检测，可通过Agilent Bioanalyzer 2100等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

附一 关于片段化打段时间

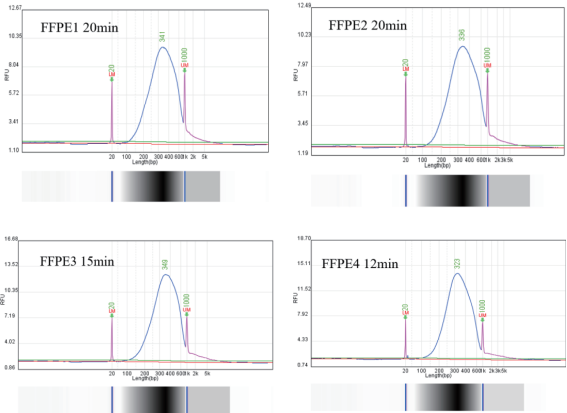
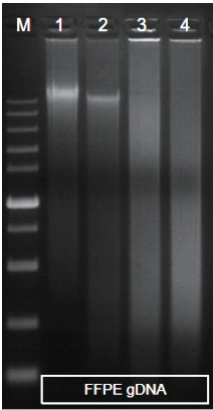
- 1. 片段化反应为时间依赖的酶促反应，片段化产物大小取决于反应时间，因此片段化时间的控制要十分精确，片段化反应建议在冰上操作，PCR仪器提前设置好程序，降温至4度预冷；
- 2. 片段化酶促反应中金属离子/EDTA等金属离子螯合剂对反应影响较大，含较高浓度EDTA（体系终浓度≥0.2 mM）的模板建议纯化处理或添加NeutralizationReagent。
- 3. 不同投入量相同打断时间片段化产物分布范围基本一致，主峰的略有差异。

不同样本片段化建库示例：

- 1. 100 ng细胞基因组DNA模板投入，不同打断时间（5min/10min/15min/20min/25min/30min）,连接产物直接回收，PCR扩增7Cycles，建库产物。



- 2. 不同降解程度的FFPE样本，投入100 ng，不同打断时间，建库产物直接回收，PCR扩增7Cycles，建库产物。



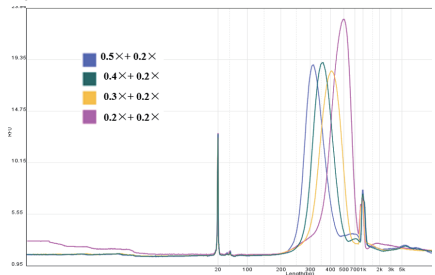
样本类型	质量等级	起始量	片段化时间	扩增循环	产物浓度	产物体积
FFPE DNA	A	100 ng	20	6	65.2 ng/μL	30 μL
FFPE DNA	A	100 ng	20	7	60.7 ng/μL	30 μL
FFPE DNA	B	100 ng	15	7	64.1 ng/μL	30 μL
FFPE DNA	C	100 ng	12	7	55.6 ng/μL	30 μL

附二 关于磁珠筛选

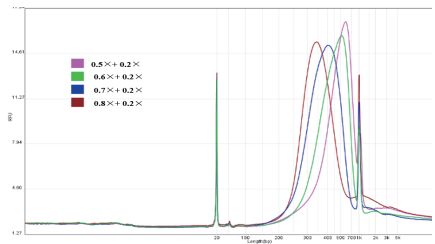
- 1. 不同厂家磁珠差异较大, 本试剂盒推荐使用自带磁珠进行双选。
- 2. 磁珠使用量常用乘数“×”进行标识, 表示相对于原始样品体积而言使用多少倍体积的磁珠。如样品原始体积为100 μL, $0.7 \times / 0.2 \times$ 分选时第一轮磁珠用量为 $0.7 \times 100 \mu\text{L} = 70 \mu\text{L}$, 第二轮磁珠用量 $0.2 \times 100 \mu\text{L} = 20 \mu\text{L}$ 。
- 3. 磁珠使用量直接影响可纯化的DNA长度下限, ×数越高, 可纯化的DNA长度下限越短, 反之, 则越长。磁珠分选原理是通过调整两步不同比例的磁珠量决定最终筛选目的DNA的片段大小。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。
- 4. 进行磁珠双选的体积需 $\geq 50 \mu\text{L}$, 过小的体积进行磁珠筛选, 效果不稳定。

连接产物/PCR产物不同磁珠比例筛选示例:

200ng细胞基因组DNA模板投入, 打断时间12 min, 连接产物进行不同磁珠比例回收 ($0.5 \times + 0.2 \times / 0.4 \times + 0.2 \times / 0.3 \times + 0.2 \times / 0.2 \times + 0.2 \times$), PCR扩增7Cycles, 建库产物。



50 ng细胞基因组DNA模板投入, 打断时间12 min, 连接产物全回收, PCR扩增9 Cycles, PCR产物进行不同磁珠比例回收 ($0.5 \times + 0.2 \times / 0.6 \times + 0.2 \times / 0.7 \times + 0.2 \times / 0.8 \times + 0.2 \times$)。



附三 关于文库扩增

- 1. 文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足, 将导致文库产量低; 循环数过多, 又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加等多种不良后果, 建议按照推荐循环数进行扩增。
- 2. 关于文库扩增使用引物, 需要根据使用接头的类型进行选择, 如使用完整接头可以不进行扩增或者使用通用引物进行扩增; 如使用非完整接头则必须选用配套的引物进行至少3个以上循环数的扩增。
- 3. Illumina与MGI 接头结构存在差异会导致连接效率略有差异, 连接产物及PCR产物的浓度会略有差异。