



# CWseq® RNA & DNA Library Co-Prep Kit for Illumina & MGI

Cat. No. CW3095

## 产品简介

CWseq® RNA & DNA Library Co-Prep Kit for Illumina & MGI是针对Illumina 及 MGI测序平台研发的RNA & DNA文库构建试剂盒。包括逆转录、双链cDNA合成、DNA片段化/末端修复、接头连接和文库扩增试剂。

本试剂盒采用优化升级片段化酶法，将DNA片段化、末端修复以及加A尾合并为一步，可直接对该步产物进行接头连接、文库富集，缩短建库时间，同时兼容DNA、RNA和混合样本建库，极大降低建库成本。优化的反应体系，提高文库转化效率，能兼容更低起始投入量至1ng。可应用于mNGS样本等。

本试剂盒在文库扩增阶段采用高保真DNA聚合酶，无偏好的进行PCR扩增实现文库富集，保证了测序结果准确性。

## 保存条件

-20 ± 5°C保存，干冰运输，如需长期保存，可将组分置于-85 ~ -65°C。

## 产品内容

Component	CW3095S 24 rxns	CW3095M 96 rxns
Oligo dT VN	24 µL	96 µL
Random hexamers	24 µL	96 µL
1st Co-reaction Buffer	120 µL	480 µL
1st Co-reaction Enzyme	48 µL	192 µL
2nd Co-reaction Buffer	120 µL	480 µL
2nd Co-reaction Enzyme	120 µL	480 µL
Co-reaction FER Buffer	240 µL	960 µL
Co-reaction FER Enzyme Mix	120 µL	480 µL
DNA Ligase Buffer	600 µL	3×800 µL
DNA Ligase Enzyme	120 µL	480 µL
2×Super HiFi Amplification Mix	600 µL	3×800 µL

## 产品特点

1. 精准酶切，片段化、末端修复加A一次反应完成，且无需片段化产物纯化，直接连接接头，极大节省了实验时间。
2. 兼容DNA投入量1-100 ng，RNA投入量10-100 ng以及混合样本建库，适用于mNGS样本等。
3. 适用于制备Illumina及MGI测序平台专用文库。可用于：传染病分析和微生物组分析。

## 自备仪器、试剂和耗材 接头引物试剂盒

1. Adapter & primer: NGS Combinatorial Dual Index Primers Kit for Illumina (Set I/Set II) (CW3042/CW3079)、NGS Multiplex Oligos for Illumina (Index Primers Set I/Set II) (CW2586/CW2587)、CWseq UDB Primer Kit for MGI (Plates) (CW3082)、CWseq® Unique Dual Index Primer Kit for Illumina (Plates) (CW3084)、NGS Multiplex Oligos for MGI (Index primer mix Set I-III) (CW3014/CW3015/CW3016) 等。
2. DNA质控: Qubit、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
3. DNA纯化磁珠: CW3171 DNA Purification Magbeads (for NGS Size Selection) 或其他等效产品
4. 其他材料: 低吸附Nuclease-free的PCR管、1.5 mL离心管及过滤枪头，磁力架，无水乙醇(100%乙醇, 分析纯), Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O, PCR仪器等。

## 实验原理与流程

CWseq® RNA & DNA Library Co-Prep Kit for Illumina & MGI建库流程图



注意: 文库扩增阶段可根据需求进行调节。

## 实验流程

### RNA & DNA变性

1. 配制RNA & DNA变性反应体系:

组分	体积
RNA & DNA	X $\mu$ L
Oligo dT VN	1 $\mu$ L
Random hexamers	1 $\mu$ L
Nuclease-free ddH <sub>2</sub> O	To 18 $\mu$ L

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。
3. 在PCR仪中进行如下反应:

温度	时间
70°C	5 min
4°C	Hold
立即置于冰上	3 min

注意: 可提前将双链cDNA合成需要的组分从-20±5°C取出, 冰上放置解冻。

### 第一链cDNA合成

1. 配制第一链cDNA合成反应体系:

组分	体积
上一步产物	18 μL
1st Co-reaction Buffer	5 μL
1st Co-reaction Enzyme	2 μL
Total	25 μL

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。
3. 在PCR仪中进行如下反应:

温度	时间
热盖105°C	On
25°C	5 min
42°C	15 min
85°C	5 min
4°C	Hold

注意: 反应结束后产物立即冰上放置, 进行第二链cDNA合成。

### 第二链cDNA合成

1. 配制第二链cDNA合成反应体系:

组分	体积
上一步产物	25 μL
2nd Co-reaction Buffer	5 μL
2nd Co-reaction Enzyme	5 μL
Total	35 μL

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。
3. 在PCR仪中进行如下反应:

温度	时间
热盖105°C	On
16°C	30 min
4°C	Hold

注意: 二链合成产物可在-85 ~ -65°C暂存12 h。可提前将片段化/末端修复需要的组分从-20 ± 5°C取出, 冰上放置解冻。

### 片段化和末端修复

1. 配制片段化和末端修复反应体系:

组分	体积
上一步产物	35 μL
Co-reaction FER Buffer	10 μL
Co-reaction FER Enzyme Mix	5 μL
Total	50 μL

注意: 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, 因此推荐最后单独向反应体系中加入Co-reaction FER Enzyme Mix, 加入后立即混匀并进行后续反应。

片段化反应体系对氧化敏感, 因此反应体系配制结束后应尽快将组分置于-20 ± 5°C保存。

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。
3. 在PCR仪中进行如下反应:

温度	时间
热盖105°C	On
4°C	1 min
32°C	5-30 min
65°C	30 min
4°C	Hold

注意: 片段化时间可以根据需求进行调整。片段化反应结束后, 立即进行接头连接反应。可提前将接头连接需要的组分从-20 ± 5°C取出, 冰上放置解冻。

## 接头连接

### 1. 配制接头连接反应体系:

组分	体积
上一步产物	50 $\mu\text{L}$
DNA Ligase Buffer	25 $\mu\text{L}$
DNA Ligase Enzyme	5 $\mu\text{L}$
Adapter*	5 $\mu\text{L}$
Nuclease-free ddH <sub>2</sub> O	15 $\mu\text{L}$
Total	100 $\mu\text{L}$

\* 此步骤加入的Adapter浓度依据样本类型和投入量的不同, 需要匹配不同的浓度。详情见Table 1-3。

Table 1. 纯DNA投入Adapter使用浓度推荐表

Input DNA	Adapter工作浓度
100 ng	5 $\mu\text{M}$
10 - 99 ng	1 $\mu\text{M}$
1 - 9 ng	0.5 $\mu\text{M}$

Table 2. 纯RNA投入Adapter使用浓度推荐表

Input RNA	Adapter工作浓度
100 ng	10 $\mu\text{M}$
10 - 99 ng	2 $\mu\text{M}$

Table 3. RNA & DNA投入Adapter使用浓度推荐表

Input DNA	Input RNA	Adapter工作浓度
100 ng	100 ng	10 $\mu\text{M}$
	10 - 99 ng	10 $\mu\text{M}$
10 - 99 ng	100 ng	10 $\mu\text{M}$
	10 - 99 ng	5 $\mu\text{M}$
1 - 9 ng	100 ng	10 $\mu\text{M}$
	10 - 99 ng	2 $\mu\text{M}$

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。
3. 在PCR仪中进行如下反应:

温度	体积
热盖105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

注意: 连接产物可在2~8°C暂存1 h, 或-85 ~ -65°C暂存12 h。可提前将产物纯化需要的磁珠从2~8°C取出, 室温放置备用。

## 产物纯化

1. 将磁珠提前30 min从2 ~ 8°C取出, 静置使其平衡至室温。
2. 颠倒或旋涡振荡使磁珠充分混匀。吸取80  $\mu\text{L}$  (0.8  $\times$ )加入到连接产物中, 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
3. 室温孵育5 min, 使DNA与磁珠充分结合。
4. 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
5. 保持样品处于磁力架上, 加入没过磁珠的80%乙醇(新鲜配制)漂洗磁珠, 室温孵育10 sec, 小心移除上清。
6. 重复上述步骤一次。
7. 保持样品处于磁力架上, 在室温下开盖干燥, 至磁珠表面呈现哑光。
  - 7.1 加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - 7.2 最后移除上清时需要使用10  $\mu\text{L}$ 移液器将残留液体吸干净。
  - 7.3 磁珠表面由深褐色变为棕褐色, 表面无反光即可进行洗脱。如磁珠过度干燥会影响洗脱步骤的洗脱效率。
8. 将样品从磁力架上取出, 加入22  $\mu\text{L}$  Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置2 min后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min)。小心吸取20  $\mu\text{L}$ 上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
  - 8.1 转移上清时切勿吸取磁珠, 即使微量残留都将影响后续文库产量。

## 文库PCR扩增

1. 配制PCR扩增反应体系:

组分	体积
连接纯化产物	20 $\mu\text{L}$
2 $\times$ Super HiFi Amplification Mix	25 $\mu\text{L}$
Universal Primer*/i5 Primer **	2.5 $\mu\text{L}$
Index Primer*/i7 Primer **	2.5 $\mu\text{L}$
Total	50 $\mu\text{L}$

注意：根据实验需求选择的不同短接头类型配制PCR扩增反应引物体系。

\*上述PCR扩增反应引物体系适用于illumina单端短接头引物试剂盒 (Cat.No.CW2586/CW2587)。

\*\*上述PCR扩增反应引物体系适用于双端短接头引物试剂盒 (Cat.No.CW3042/CW3079)。

其他类型引物 (CW3082/CW3084/CW3014/CW3015/CW3016) 为混合型引物, 可直接投入5  $\mu$ L。

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。

3. 在PCR仪中进行如下反应:

温度	时间	循环数
热盖105°C	On	1
98°C	3 min	
98°C	20 sec	X cycles*
60°C	20 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

\* 此步骤依据样本类型和投入量的不同, 需要匹配不同的循环数, 详情见Table 4-6。

Table 4. 纯DNA投入扩增循环数推荐表

Input DNA	循环数
100 ng	3-4
10 - 99 ng	7-9
1 - 9 ng	12-14

Table 5. 纯RNA投入扩增循环数推荐表

Input RNA	循环数
100 ng	3-4
10 - 99 ng	7-9

Table 6. RNA & DNA投入扩增循环数推荐表

Input DNA	Input RNA	循环数
100 ng	100 ng	3-4
	10 - 99 ng	3-4
10 - 99 ng	100 ng	3-4
	10 - 99 ng	7-9
1 - 9 ng	100 ng	3-4
	10 - 99 ng	7-9

## 扩增产物纯化

1. 将磁珠提前30 min从2 ~ 8°C取出，静置使其平衡至室温。
2. 颠倒或旋涡振荡使磁珠充分混匀。吸取45  $\mu$ L 加入到扩增产物中，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
3. 室温孵育5 min，使DNA与磁珠充分结合。
4. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约5 min），小心移除上清。
5. 保持样品处于磁力架上，加入没过磁珠的80%乙醇（新鲜配制）漂洗磁珠，室温孵育10 sec，小心移除上清。
6. 重复上述步骤一次。
7. 保持样品处于磁力架上，在室温下开盖干燥，至磁珠表面呈现哑光。
  - 7.1 加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - 7.2 最后移除上清时需要使用10  $\mu$ L移液器将残留液体吸干净。
  - 7.3 磁珠表面由深褐色变为棕褐色，表面无反光即可进行洗脱。如磁珠过度干燥会影响洗脱步骤的洗脱效率。
8. 将样品从磁力架上取出，加入22  $\mu$ L Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打10次充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后（约5 min）。小心吸取20  $\mu$ L上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
  - 8.1 转移上清时切勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库产量。

## 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。