



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

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

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 μg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DynaMag™-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-1 μ g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抗抑制性，建议体系中EDTA终浓度控制在0.2mM以内，如果体系终浓度 \geq 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。

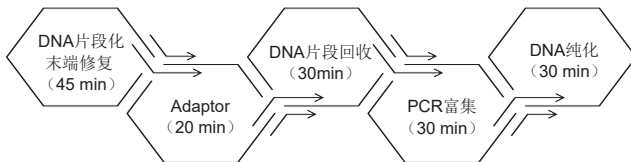
5. 文库长度分选

- 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-1 μ g，推荐上样量为1ng-500ngDNA。DNA溶液中不含螯合剂，如果DNA溶解于1 \times 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片段化及末端修复加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 μL 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 μL
FER Enzyme Mix	5 μL
Neutralization Reagent	可选
NF Water	Up to 50 μL

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 μL 体系含EDTA终浓度每0.1 mM 加入0.375 μL Neutralization Reagent。如: DNA模板中含1 mM EDTA, 加入20 μL 模板至50 μL 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 μL 。

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 $^{\circ}\text{C}$)

表2 片段化及末端修复反应程序

步骤	温度	时间
1	4 $^{\circ}\text{C}$	1 min
2	32 $^{\circ}\text{C}$	20 min (可调)
3	65 $^{\circ}\text{C}$	30 min
4	4 $^{\circ}\text{C}$	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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL
T4 DNA ligase	3 μL
Adaptor for Illumina/MGI	5 μL
NF Water	8 μL
Total	30 μL

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 μM	不稀释
25 ng-100 ng	5 μM	1:2
5 ng-25 ng	1 μM	1:10
1 ng-5 ng	0.1-0.2 μM	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°C
2	23°C	20 min
3	4°C	Hold

注意：若此操作使用PCR仪，请将热盖设为25°C。

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

- 提前30 min取出 CMPure置于室温，使用前充分震荡混匀；
- 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。
- 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；
- 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；
- 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。
- 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。
- 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。
- 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；
- 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°C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
磁珠用量	第一次选择	50 μ L	40 μ L	30 μ L	20 μ L
	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350bp左右

- 提前30 min 取出 CMPure磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；
- 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。
- 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。
- 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。
- 向上清中加入20 μ L混合均匀的CMPure，涡旋震荡5s后室温放置5min。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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；
- 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

- 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 \times 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。

- 震荡混匀5 s，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 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 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
98 $^{\circ}\text{C}$	20 s	
60 $^{\circ}\text{C}$	20 s	参照表10
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

- 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，用移液器轻轻吹打或震荡充分混匀，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
磁珠用量	第一次选择	80 μ L	70 μ L	65 μ L	60 μ L
	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

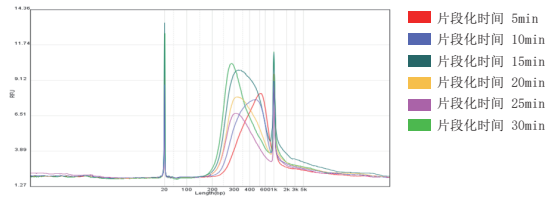
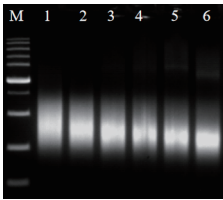
1. 文库浓度检测一般有两种方法：一是基于双链DNA荧光染料的方法，如Qubit、PicoGreen等，二是基于qPCR绝对定量的方法。不建议使用基于光谱检测的方法，如NanoDrop等。
2. 文库长度分布检测，可通过Agilent Bioanalyzer 2100等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

附一 关于片段化打段时间

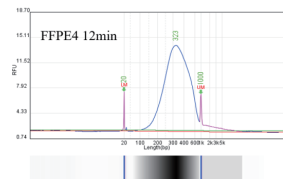
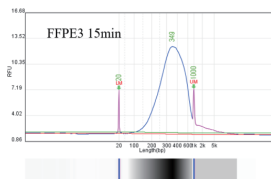
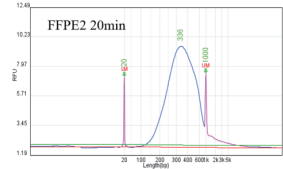
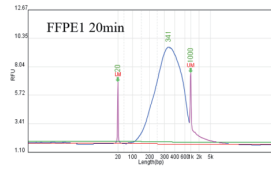
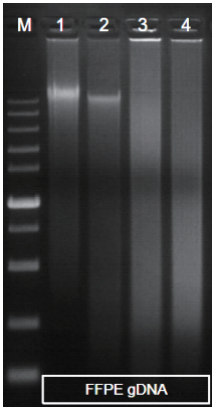
1. 片段化反应为时间依赖的酶促反应，片段化产物大小取决于反应时间，因此片段化时间的控制要十分精确，片段化反应建议在冰上操作，PCR仪器提前设置好程序，降温至4度预冷；
2. 片段化酶促反应中金属离子/EDTA等金属离子螯合剂对反应影响较大，含较高浓度EDTA（体系终浓度 ≥ 0.2 mM）的模板建议纯化处理或添加Neutralization Reagent。
3. 不同投入量相同打断时间片段化产物分布范围基本一致，主峰的略有差异。

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。



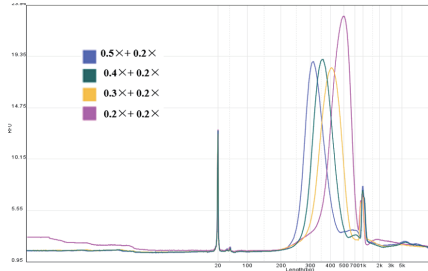
样本类型	质量等级	起始量	片段化时间	扩增循环	产物浓度	产物体积
FFPE DNA	A	100 ng	20	6	65.2 ng/ μ L	30 μ L
FFPE DNA	A	100 ng	20	7	60.7 ng/ μ L	30 μ L
FFPE DNA	B	100 ng	15	7	64.1 ng/ μ L	30 μ L
FFPE DNA	C	100 ng	12	7	55.6 ng/ μ L	30 μ L

附二 关于磁珠筛选

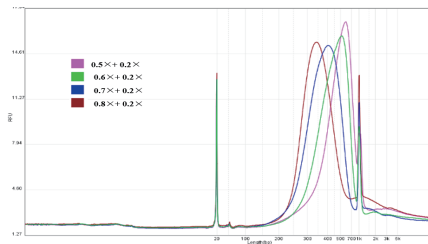
1. 不同厂家磁珠差异较大，本试剂盒推荐使用自带磁珠进行双选。
2. 磁珠使用量常用乘数“ \times ”进行标识，表示相对于原始样品体积而言使用多少倍体积的磁珠。如样品原始体积为100 μL ， $0.7 \times / 0.2 \times$ 分选时第一轮磁珠用量为 $0.7 \times 100 \mu\text{L} = 70 \mu\text{L}$ ，第二轮磁珠用量 $0.2 \times 100 \mu\text{L} = 20 \mu\text{L}$ 。
3. 磁珠使用量直接影响可纯化的DNA长度下限， \times 数越高，可纯化的DNA长度下限越短，反之，则越长。磁珠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，通过丢弃上去去除分子量较小的DNA。
4. 进行磁珠双选的总体积需 $\geq 50 \mu\text{L}$ ，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12min，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9Cycles，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，如使用完整全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。