

# GenNext<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit

## -KODEasy<sup>™</sup>-

(Code No. LPK-201, LPK-201T, LPK-201L)

使用说明书

TOYOBO CO., LTD.

Bioproducts Sales and Marketing Department

OSAKA JAPAN

**TOYOBO**

## 目录

【1】 引言.....	2
【2】 产品组分.....	4
【3】 除本产品外需另行准备的物品.....	5
【4】 重要: 实验技巧(Tips).....	6
【5】 使用方法.....	7
A.进行末端平滑化（超声波打断/酶断DNA）.....	9
B.不进行末端平滑化（PCR片段等）.....	13
C.不进行文库扩增（PCR Free）.....	16
【6】 实验案例.....	19
【7】 常见问题及解决方案.....	24
【8】 相关产品.....	26

---

### 注意

---

本试剂盒所含试剂均为研究用试剂。请勿将其用于诊断/临床试剂、食品或化妆品。在使用本试剂盒时，请严格遵守实验室通用注意事项并参考 SDS（安全数据表），注意安全。

※本资料中提及的公司名称、商品名称及 Logo 标识等均为各公司的商号、商标或注册商标。

# [1] 引言

GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- (Code No. LPK-201, LPK-201T, LPK-201L) 旨在从片段化双链 DNA (超声破碎/酶切基因组 DNA 等) 及 PCR 产物中简便快速地制备适用于 illumina® 二代测序用的文库。通过省去连接反应 (添加接头) 后的文库扩增前纯化步骤, 大幅缩短了手工操作时间 (图 1)。

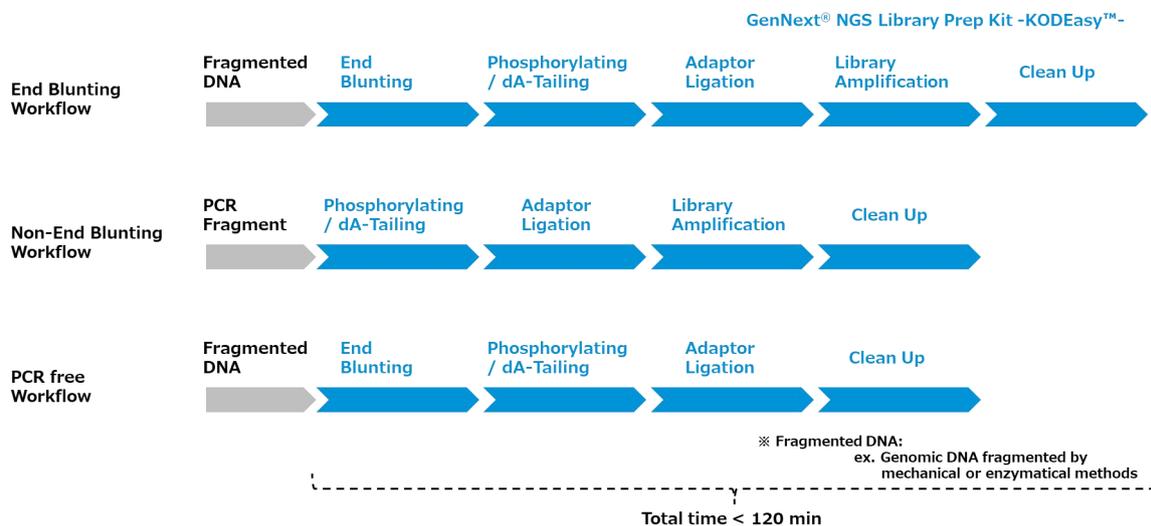
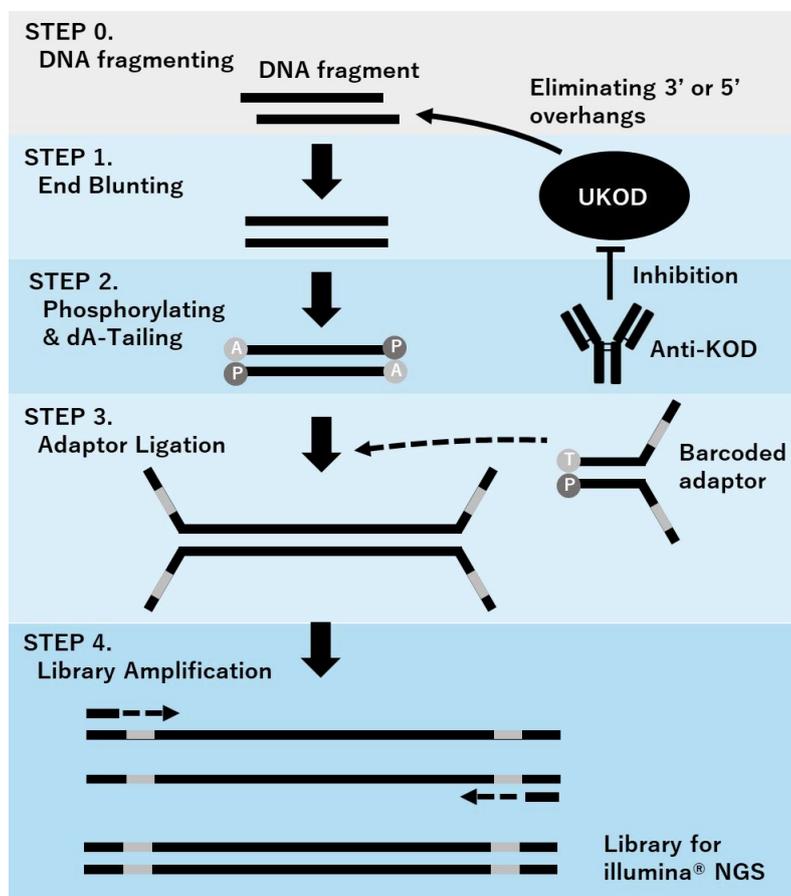


图 1. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- workflow



## 文库制备原理 (图 2)

(STEP 1.) 采用兼具高耐热性、高精度度及扩增效率的改良型 KOD DNA 聚合酶 (UKOD) 作为末端修复酶, 实现 DNA 末端平滑化。

(STEP 2.) 通过两种单克隆抗体高效抑制 UKOD 的聚合酶活性与 3'→5' 核酸外切酶活性, 同时进行 5'磷酸化/dA 加尾。

(STEP 3.) 抗体可抑制末端修复酶对含 A 突出末端的 DNA 及含 T 突出末端的接头核酸进行末端平滑化, 从而有效阻止接头二聚体形成, 实现高效接头连接。

(STEP 4.) 采用高精度度、高扩增效率的 UKOD, 以及两种抑制聚合酶活性和 3'→5' 核酸外切酶活性的单克隆抗体, 通过特异性 Hot start PCR 实施文库扩增。

图 2. Molecular mechanism of GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-

推荐使用本公司下列含 KOD DNA 聚合酶及其改良体的 PCR 试剂进行 PCR 片段制备及纯化文库的再扩增 (详见[8]相关产品)。

- KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix (Code No. KMM-101)
- KOD -Multi & Epi-<sup>®</sup> (Code No. KME-101)
- KOD FLEX<sup>™</sup> PCR Master Mix (Code No. KMX-101)

#### ◆产品特点◆

### 1. 简便且高通量的文库制备流程

GenNext<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit -KODEasy<sup>™</sup>-实现了无需连接反应后的磁珠纯化即可完成足量 NGS 文库扩增。通过减少手工操作时间 (移液步骤数), 显著提升通量。可从预片段化样本中 2 小时内完成 NGS 文库制备。

### 2. 降低样本混淆风险

从末端平滑化至文库扩增全程在单管内完成, 有效减少样本混淆风险及实验记录工作量。

### 3. 可视性强且易操作的溶液添加量

反应溶液可视化程度高, 实验操作便捷。无需微量移液 (最低溶液添加量为 3  $\mu$ L)。

### 4. 支持自动化的便捷设计

最低溶液添加量降至 3  $\mu$ L, 适配自动分液设备实现文库制备自动化流程。可减少自动分液机在文库制备中的占用时间, 并降低移液枪头等塑料耗材消耗 (图 3)。

### 5. 高 GC 区域的高覆盖度表现

本试剂盒采用具备高精度度与扩增效率的改良型 KOD DNA 聚合酶(UKOD), 并优化试剂组分, 可在高 GC 含量区域实现优异覆盖度。

### 6. 其他

- 支持 PCR free 工作流程

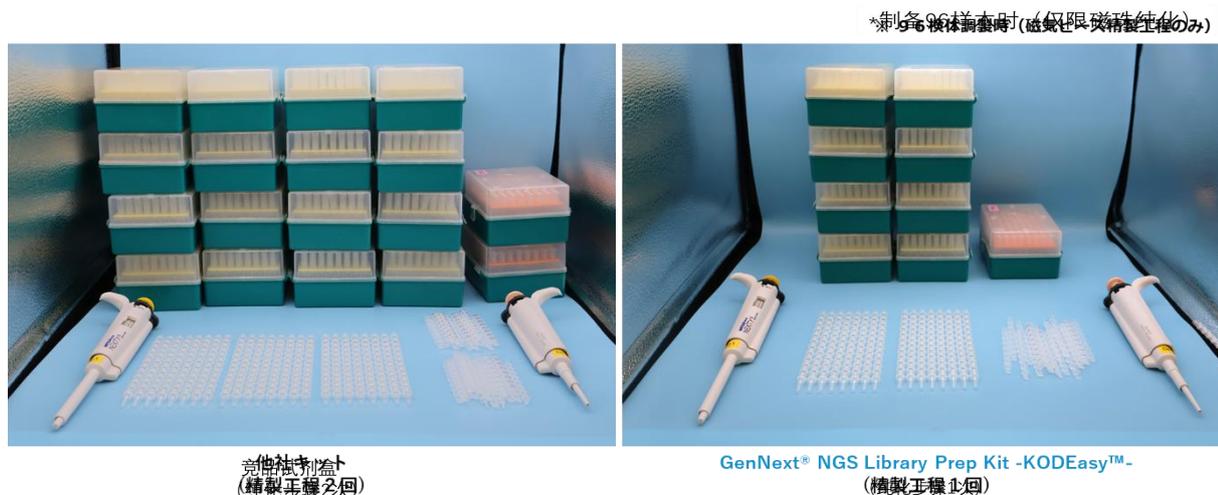


图 3. 制备文库所需的塑料消耗品示例

## [2] 产品组分

本产品内包含以下试剂。

GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- (Code No. LPK-201,LPK-201T,LPK-201L)

组分	保存	颜色	LPK-201 (24 次份)	LPK-201T (8 次份)	LPK-201L (96 次份)
KOD Blunting Solution (KB Solution)	-20°C	红	168 µL	56 µL	672 µL
Phosphorylating & A-Tailing Solution (PAT Solution)	-20°C	深蓝	72 µL	24 µL	288 µL
Ligation Solution	-20°C	黄绿	360 µL	120 µL	720 µL×2 支
Library Amplification Solution	-20°C	紫	480 µL	160 µL	960 µL×2 支
Library Amplification Primer Mix	-20°C	灰	120 µL	40 µL	480 µL

### 各试剂的特点(粘性)

组分	粘性	溶液特征
KOD Blunting Solution (KB Solution)	低	本溶液为含有高耐热性、高精度度、高扩增效率的改良型 KOD DNA 聚合酶(UKOD)的末端平滑化反应溶液。使用前请轻敲管盖或翻转混匀，离心后使液体沉降至管底再使用。 <b>本溶液中可能存在白色沉淀。此沉淀为用作稳定剂的白蛋白形成的沉淀物，不影响产品性能。请勿加热溶解，充分混匀溶液后直接使用即可。</b>
Phosphorylating & A-Tailing Solution (PAT Solution)	高	本溶液为含有可高效抑制 UKOD 聚合酶活性及 3'→5'核酸外切酶活性的两种单克隆抗体、磷酸化酶、A 加尾酶等，并经本试剂盒优化的反应溶液。 <b>为降低失活风险，请在冰上操作，且请勿剧烈 Vortex。使用前请轻敲管壁或翻转混匀，离心后使液体沉降至管底再使用。因溶液具有粘性，请缓慢吹打。</b>
Ligation Solution	高	本溶液为经本试剂盒优化的连接用反应溶液，含有作用于双链 DNA 的连接酶。 <b>为降低失活风险，请在冰上操作，且请勿剧烈 Vortex。使用前请轻敲管壁或翻转混匀，离心后使液体沉降至管底再使用。因溶液具有粘性，请缓慢吹打。</b>
Library Amplification Solution	低	本溶液为含有兼具高精度度与高扩增效率的改良型 KOD DNA 聚合酶(UKOD)，并经本试剂盒优化的文库扩增用反应溶液。其中混合了可抑制聚合酶活性及 3'→5'核酸外切酶活性的两种单克隆抗体，可实现高特异性 Hot start PCR。使用前请轻敲管壁或翻转混匀，离心后使液体沉降至管底再使用。不推荐用于常规 PCR 实验。

Library Amplification Primer Mix	低	本混合物为经本试剂盒优化的文库扩增用引物混合液。其序列经特殊设计，可高效扩增含 P5、P7 流动槽序列的 illumina® 二代测序文库。使用前请轻敲管壁或翻转混匀，离心后使液体沉降至管底再使用。
----------------------------------	---	---

### [3] 除本产品外需另行准备的物品

除本产品外，请另行准备以下设备及试剂类。

- 热循环仪  
请准备可维持本产品反应所需温度（4°C ~ 98°C）的设备。使用时请遵循各设备的操作说明书。
- 打断仪或试剂  
GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-兼容 NGS 文库制备中常用的物理打断及酶促打断方法。请遵循您所使用的打断仪或打断试剂制造商的操作说明书。
- 接头  
可使用含 Index 的 Illumina® TruSeq™ 等文库制备常用接头。  
例：IDT® for Illumina® – TruSeq™ DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)  
产品编号：20040870  
(除上述外，凡具有类似设计的接头均可用于本试剂盒。)
- SPRI (Solid phase paramagnetic bead) 磁珠  
推荐使用 Agencourt® AMPure® XP 试剂 (Beckman Coulter、产品编号：A63880、A63881 等)、Sera-Mag Select (GE Healthcare、产品编号：29343045、29343052 等)。使用时请遵循试剂操作说明书。  
**※操作流程中展示的是使用 Agencourt® AMPure® XP 试剂的操作方法。**
- 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5)  
用于接头储备液的稀释及 DNA 洗脱。不可用水替代。
- 0.1×TE  
用于 DNA 洗脱。  
不可用水替代 (※ 可用 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5) 替代)。
- 磁力架  
使用磁珠纯化时需使用。
- 80%乙醇  
作为磁珠纯化时的洗涤液使用。  
(※ 请使用现用现配的溶液。长期保存会导致乙醇浓度降低，造成文库产量下降。)

## [4] 重要: 实验技巧(Tips)

### 稳定实施NGS文库制备的技巧 (Tips)

#### 重要 (关于接头连接)

- (1) 试剂使用前请通过翻转混匀等方式均质化后再添加。
- (2) 试剂溶液及反应溶液请在冰上 (或冰盒、帕尔贴模块等) 充分冷却后再添加混合。若在温度较高状态下混合, 易产生非特异性产物。
- (3) 添加接头溶液后, 请充分混匀再进入下一步连接溶液 (Ligation Solution) 的添加。  
若存在接头与目标DNA浓度局部过高的区域 (混合不充分时), 易发生非预期连接反应, 导致接头二聚体及嵌合核酸 (Chimeric Nucleic Acid) 的产生。
- (4) 请勿剧烈vortex, 可能导致酶活性下降。

# [5] 使用方法

请依据图 4 的选择流程图，选择并实施相应的制备流程（图 4）。

## 溶液混合方法

为高效实施文库制备，推荐采用以下方法进行溶液混匀（均质化）。

### · 移液混合法

将移液器刻度设定至溶液总量的约 80%，进行移液混合（约 5 ~ 10 次）

(例: 总溶液量 32  $\mu$ L (样本 25  $\mu$ L + 试剂 7  $\mu$ L) 时, 设定刻度至 25.6  $\mu$ L)

### · 板式涡旋振荡器使用法

除移液操作外，为减轻工作负荷并减少人为误差，推荐采用板式涡旋振荡器。

MPS-1, High-Speed Multi Plate Shaker-Vortex (BIOSAN, BS-010216-A17)

反应溶液混合参数: 2500 rpm, 30 sec

磁珠纯化参数: 3200 rpm, 1 min

(※磁珠凝集可能较严重，建议使用比溶液混合时更强的转速。)

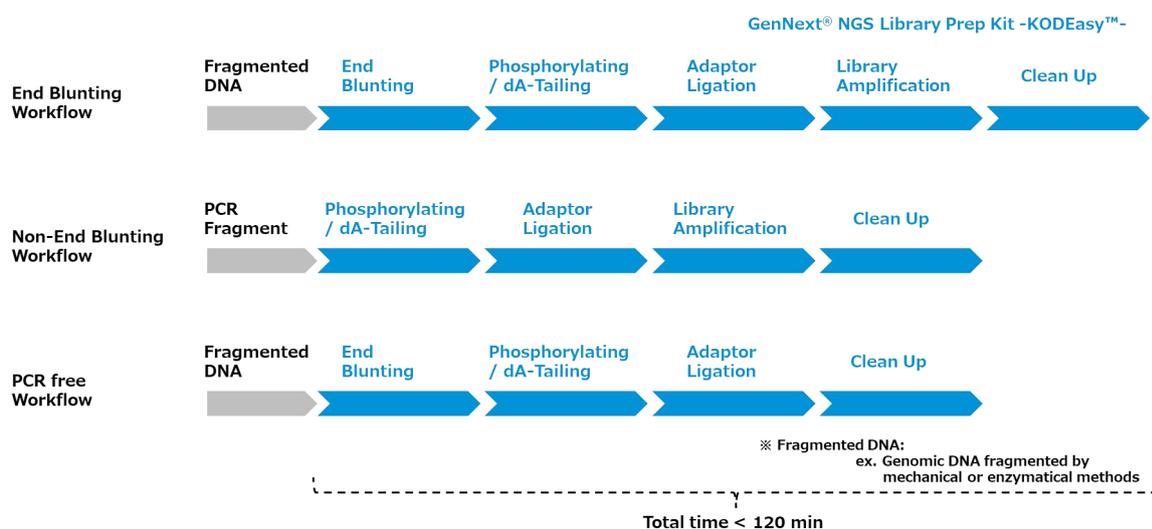


图 1. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- workflow (同上)

## 文库制备前的准备工作

### 1. 制备接头溶液

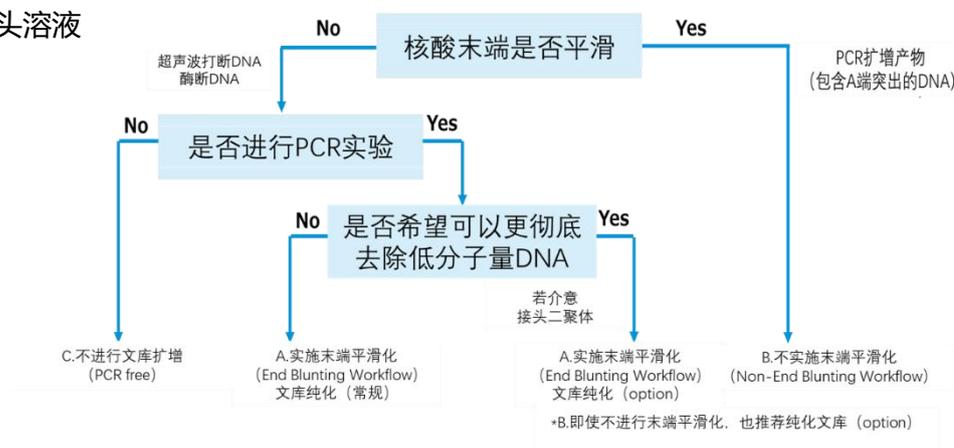


图 4. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-流程图

请参考以下推荐接头浓度，使用 10 mM Tris-HCl (pH8.0-8.5) 稀释接头 (本产品不含此组分)，配制接头溶液。

Input 量 (参考)	接头溶液浓度	接头: Insert 的摩尔比
50 ~ 500 ng	15 $\mu$ M	(200~20):1
25 ng	7.5 $\mu$ M	200:1
10 ng	3 $\mu$ M	200:1

※若使用 IDT® for Illumina® – TruSeq™ DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)(Cat No.20040870)、其原液浓度相当于 15  $\mu$ M，请按此进行稀释。

## 2. PCR 循环数的确定

请参考下述 Input DNA 量设定文库扩增中的 PCR 循环数。

### 推荐循环数

Input 量	循环数*
500 ng	0
200 ng	0-2
100 ng	0-2
50 ng	3-5
25 ng	5-6
10 ng	7-9

\* 根据样本种类及模板大小分布，最佳循环数可能存在 1~3 个 cycle 的波动。

## 3. 80 %乙醇的制备

请在使用当天完成制备。

## A. 实施末端平滑化时 (End Blunting Workflow)

(适用于通过超声波打断法或酶促打断法产生的末端不平整 DNA 片段)



图 5. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™ - End Blunting 流程图

### 1. 末端平滑化

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
片段化 DNA 溶液	25 $\mu$ L
KOD Blunting Solution <sup>※</sup>	7 $\mu$ L
总溶液量	32 $\mu$ L

※ 本溶液中可见白色沉淀。此沉淀系因作为稳定剂使用的白蛋白形成的沉淀物。性能无任何问题，请勿加热溶解，充分混匀溶液后直接使用。

(2) 混匀反应液（通过移液或轻微 Vortex 等方式）。

(3) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
68°C	10 min
4°C	$\infty$

### 2. 磷酸化 & A 加尾反应 (抗体反应)

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液（已完成末端平滑化）	32 $\mu$ L
Phosphorylating & A-Tailing Solution	3 $\mu$ L
总溶液量	35 $\mu$ L

(2) 混匀反应液（通过移液或轻微 Vortex 等方式）。

(3) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
30°C	15 min
65°C	5 min
4°C	$\infty$

### 3. 接头连接 (※最重要步骤)

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (磷酸化/ 已完成加 A 尾反应)	35 $\mu$ L
接头溶液	5 $\mu$ L
总溶液量	40 $\mu$ L

(2) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)

(3) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (已添加接头溶液)	40 $\mu$ L
Ligation Solution	15 $\mu$ L
总溶液量	55 $\mu$ L

(4) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)

(5) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
20°C	15 min
4°C	$\infty$

※尽快进行下一步操作 (4.文库扩增反应)

### 4. 文库扩增反应

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液(连接后)	55 $\mu$ L
Library Amplification Solution	20 $\mu$ L
Library Amplification Primer Mix	5 $\mu$ L
总溶液量	80 $\mu$ L

(2) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)。

(3) 按以下设定进行 PCR。

反应温度	反应时间
94°C	2 min
98°C	10 sec
60°C	15 sec
66°C	45 sec
4°C	$\infty$

参考推荐循环数  
p.8

### 5-1. 文库纯化 (标准流程)

※ 纯化操作需在 5-1 或 5-2 中选择一种执行。若需更彻底去除低分子量 DNA, 请选择 5-2。

(1) 按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (文库扩增后)	80 $\mu$ L
SPRI 磁珠(AMPure XP)	52 $\mu$ L
总溶液量	132 $\mu$ L

(2) 通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(3) 室温静置 5 分钟。

(4) 置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。

(5) 避免吸入磁珠, 弃去上清液。

(6) 加入 200  $\mu$ L 80%乙醇, 静置 30 秒。

※请勿重悬磁珠。

(7) 避免吸入磁珠, 弃去上清液 (含 80%乙醇)。

(8) 加入 200  $\mu$ L 80%乙醇, 静置 30 秒。

※请勿重悬磁珠。

(9) 避免吸入磁珠, 彻底弃去上清液 (含 80%乙醇)。

(10) 打开管盖, 风干 3~5 分钟 (※ 勿过度干燥)。

(11) 从磁力架取下, 加入 33  $\mu$ L 0.1 $\times$ TE 缓冲液。

(12) 通过移液或 Vortex 等方式充分混合。

(13) 室温静置 2 分钟。

(14) 置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。

(15) 避免吸入磁珠, 将 30  $\mu$ L 上清液转移至新 8 联管中。

(16) 所得文库于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存 (保存期约 1 个月)。

(文库制备操作完成)

## 5-2. 文库纯化 (Option)

(1) 按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (文库扩增后)	80 $\mu$ L
SPRI 磁珠(AMPure XP)	52 $\mu$ L
总溶液量	132 $\mu$ L

(2) 通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(3) 室温静置 5 分钟。

(4) 置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。

(5) **避免吸入磁珠**, 弃去上清液。

(6) 从磁力架上取下, 加入 **50  $\mu$ L 0.1 $\times$ TE**。

(7) 通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(8) 室温静置 5 分钟。

(9) 添加 **40  $\mu$ L SPRI 磁珠(AMPure XP)**。

(10)通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(11)室温静置 5 分钟。

(12)置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。

(13)**避免吸入磁珠**, 弃去上清液。

(14)加入 **200  $\mu$ L 80%乙醇**, 静置 **30 秒**。  
**※请勿重悬磁珠。**

(15)**避免吸入磁珠**, 弃去上清液 (含 80%乙醇)。

(16)加入 **200  $\mu$ L 80%乙醇**, 静置 **30 秒**。  
**※请勿重悬磁珠。**

(17)避免吸入磁珠, **彻底弃去**上清液 (含 80%乙醇)。

(18)打开管盖, 风干 **3~5 分钟** (**※ 勿过度干燥**)。

(19)从磁力架上取下, 加入 **33  $\mu$ L 0.1 $\times$ TE**。

(20)通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(21)室温静置 **2 分钟**。

(22)置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。

(23)避免吸入磁珠，将 30 μL 上清液 转移至新 8 联管中。

(24)所得文库于 -20°C 冷冻保存 (保存期约 1 个月)。

(文库制备操作完成)

## B. 若不进行末端平滑化 (Non-End Blunting Workflow)

(适用于 PCR 产物等 (※末端腺苷酸化 PCR 产物也在此流程))



图 6. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™ - Non-End Blunting 流程图

### 1. 磷酸化 & A 加尾反应 (抗体反应)

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
PCR 产物	25 μL
KOD Blunting Solution <sup>※</sup>	7 μL
Phosphorylating & A-Tailing Solution	3 μL
总溶液量	35 μL

※本溶液中可见白色沉淀。此沉淀系因作为稳定剂使用的白蛋白形成的沉淀物。性能无任何问题，请勿加热溶解，充分混匀溶液后直接使用。

(2) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)。

(3) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
30°C	15 min
65°C	5 min
4°C	∞

### 2. 接头连接 (※最重要步骤)

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (磷酸化/加 A 尾后)	35 μL
接头溶液	5 μL
总溶液量	40 μL

(2) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)

(3) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (添加接头后)	40 $\mu$ L
Ligation Solution	15 $\mu$ L
总溶液量	55 $\mu$ L

(4) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)

(5) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
20°C	15 min
4°C	$\infty$

※请尽快进行下一流程 (3. 文库扩增反应)

### 3. 文库扩增反应

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (连接后)	55 $\mu$ L
Library Amplification Solution	20 $\mu$ L
Library Amplification Primer Mix	5 $\mu$ L
总溶液量	80 $\mu$ L

(2) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)。

(3) 按以下设定进行 PCR 反应。

反应温度	反应时间
94°C	2 min
98°C	10 sec
60°C	15 sec
66°C	45 sec
4°C	$\infty$

请参考推荐循环数  
p.8

#### 4. 文库纯化

(1) 按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (文库扩增后)	80 $\mu$ L
SPRI 磁珠(AMPure XP)	52 $\mu$ L
总溶液量	132 $\mu$ L

(2) 通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(3) 室温静置 5 分钟。

(4) 置于磁力架上，静置至溶液澄清（室温）。

(5) 避免吸入磁珠，弃去上清液。

(6) 加入 200  $\mu$ L 80%乙醇，静置 30 秒。

※请勿重悬磁珠。

(7) 避免吸入磁珠，弃去上清液（含 80%乙醇）。

(8) 加入 200  $\mu$ L 80%乙醇，静置 30 秒。

※请勿重悬磁珠。

(9) 避免吸入磁珠，彻底弃去上清液（含 80%乙醇）。

(10) 打开管盖，风干 3~5 分钟(※勿过度干燥)。

(11) 从磁力架上取下，加入 33  $\mu$ L 0.1 $\times$ TE。

(12) 通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(13) 室温静置 2 分钟。

(14) 置于磁力架上，静置至溶液澄清（室温）。

(15) 避免吸入磁珠，将 30  $\mu$ L 上清液转移至新 8 联管中。

(16) 所得文库于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存（保存期约 1 个月）。

(文库制备操作完成)

## C. 若不进行文库扩增 (PCR free Workflow)

(适用于通过超声波打断法或酶促打断法产生的末端不平整 DNA 片段)



图 7. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- PCR free 流程图

### 1. 末端平滑化

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
断片化 DNA 溶液	25 $\mu$ L
KOD Blunting Solution*	7 $\mu$ L
总溶液量	32 $\mu$ L

\*本溶液中可见白色沉淀。此沉淀系因作为稳定剂使用的白蛋白形成的沉淀物。性能无任何问题，请勿加热溶解，充分混匀溶液后直接使用。

(2) 混匀反应液（通过移液或轻微 Vortex 等方式）。

(3) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
68°C	10 min
4°C	$\infty$

### 2. 磷酸化&A 尾附加（抗体反应）

(1) 冰上冷却同时，按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液（末端平滑化后）	32 $\mu$ L
Phosphorylating & A-Tailing Solution	3 $\mu$ L
总溶液量	35 $\mu$ L

(2) 混匀反应液（通过移液或轻微 Vortex 等方式）。

(3) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
30°C	15 min
65°C	5 min
4°C	$\infty$

### 3. 接头连接 (※最重要工程)

(1) 冰上冷却同时, 按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (磷酸化/已添加 A 尾)	35 $\mu\text{L}$
接头溶液	5 $\mu\text{L}$
总溶液量	40 $\mu\text{L}$

(2) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)

(3) 冰上冷却同时, 按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (添加接头后)	40 $\mu\text{L}$
Ligation Solution	15 $\mu\text{L}$
总溶液量	55 $\mu\text{L}$

(4) 混匀反应液 (通过移液或轻微 Vortex 等方式)

(5) 按以下设定进行孵育。

反应温度	反应时间
20°C	15 min
4°C	$\infty$

### 4. 文库纯化

(1) 按以下顺序自上而下添加试剂溶液。

试剂	添加量
反应溶液 (连接后)	55 $\mu\text{L}$
SPRI 磁珠(AMPure XP)	36 $\mu\text{L}$
总溶液量	91 $\mu\text{L}$

(2) 通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。

(3) 室温静置 5 分钟。

(4) 置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。

(5) 避免吸入磁珠, 弃去上清液。

(6) 加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇, 静置 30 秒。

※请勿重悬磁珠。

(7) 避免吸入磁珠, 弃去上清液 (含 80%乙醇)。

(8) 加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇, 静置 30 秒。

※请勿重悬磁珠。

(9) 避免吸入磁珠, 彻底弃去上清液 (含 80%乙醇)。

- (10)打开管盖, 风干 3~5 分钟(※勿过度干燥)。
- (11)从磁力架上取下, 加入 33  $\mu$ L 0.1 $\times$ TE。
- (12)通过移液或 Vortex 等方式充分悬浮混合。
- (13)室温静置 2 分钟。
- (14)置于磁力架上, 静置至溶液澄清 (室温)。
- (15)避免吸入磁珠 , 将 30  $\mu$ L 上清液 转移至新 8 联管中。
- (16)所得文库于 - 20 $^{\circ}$ C冷冻保存 (保存期约 1 个月 )。

(文库制备完成)

## **文库验证**

使用本产品制备的文库, 建议通过 4200 TapeStation System (Agilent Technologies)、Bioanalyzer (Agilent Technologies)、MultiNA<sup>®</sup> (岛津制作所) 等电泳设备确认其大小分布。若需通过 qPCR 进行文库定量, 推荐使用 GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit (Code: NLQ-101) 或同类产品。GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit (Code: NLQ-101) 可针对 illumina<sup>®</sup>采用的 P5、P7 接头序列进行检测, 能够特异性且准确地定量可结合至测序仪流动槽的文库。

## [6] 实验案例

### 1. 文库产量及分布的比较

以下展示了使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-进行 NGS 文库制备的实验案例。文库的纯化采用的是 Agencourt™ AMPure™ XP 试剂 (Beckman Coulter)。NGS 文库 (接头二聚体) 的分布及产量通过 4200 TapeStation System (Agilent Technologies) 进行确认。文库浓度 (180 ~ 1000 bp) 及接头二聚体浓度 (120 ~ 160 bp) 的信号通过条带分析计算得出。

#### 实验案例 1-1.

##### < 方法 >

以经超声波打断处理 (平均长度 200 bp) 的人基因组 DNA、Thermus thermophilus HB8 (Tth) 基因组 DNA 10 ng 为起始材料, 使用 GenNext™ NGS Library Prep Kit -KODEasy™-、A 公司文库制备试剂盒及 B 公司文库制备试剂盒进行文库制备。PCR 循环数为 8 个循环进行了扩增。

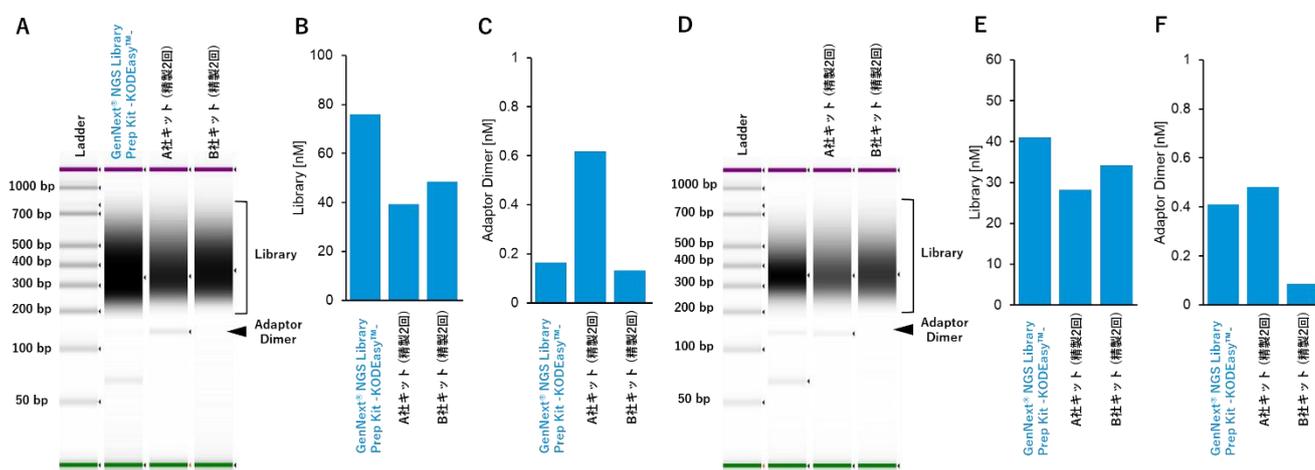


图 8. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-可实现多种生物物种的文库制备

结果表明, 无论以人基因组 DNA (图 8-A、B、C) 还是高 GC 含量的 Tth 基因组 DNA (图 8-D、E、F) 作为 input DNA 时, 文库大小分布 (图 8-A、D) 与其他公司竞品 (纯化 2 次) 相当; 文库产量 (图 8-B、E) 达到同等以上水平; 接头二聚体浓度 (图 8-C、F) 也是同样。所有情况下, 均获得了 Illumina 测序仪所需 4 nM 以上的产量。

### 实验案例 1-2.

#### <方法>

以经超声波打断处理(平均链长 300 bp 及约 500 bp)的人基因组 DNA 10 ng 为模板,使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-进行文库制备。PCR 循环数为 8 个循环进行扩增。并对文库的大小分布 (图 9-A)、文库产量 (图 9-B) 及接头二聚体量 (图 9-C) 进行了评估。

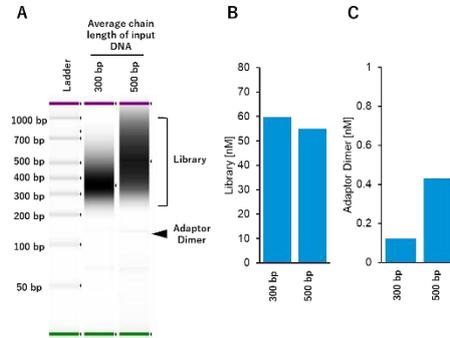


图 9. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-可从各种尺寸范围的 DNA 中进行文库制备

结果表明, 无论以不同大小的基因组 DNA 作为 Input DNA 时, 均能获得 Illumina 测序仪所需的 4 nM 以上的产量。

### 实验案例 1-3.

#### <方法>

经超声波打断处理 (平均链长约 200 bp) 的人基因组 DNA 10 ng、100 ng 及 200 ng 为模板, 使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-进行文库制备。PCR 循环数为 5 个循环进行了扩增。并对文库的大小分布 (图 10-A)、文库产量 (图 10-B)、接头二聚体量 (图 10-C) 及电泳图 (图 10-D) 进行了评估

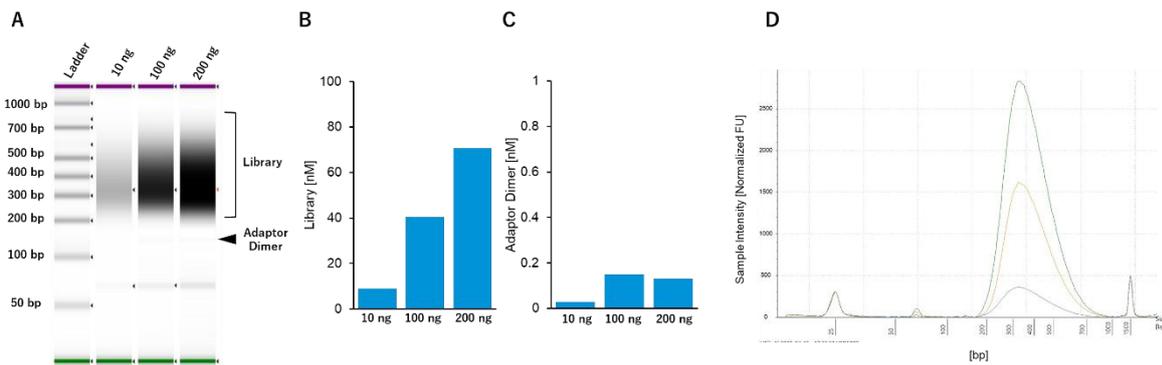


图 10. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-可对应各种添加量的 DNA

结果表明, 无论以不同添加量的基因组 DNA 为模板时, 均能获得 Illumina 测序仪所需的 4 nM 以上的产量。

### 实验案例 1-4.(option 实验案例)

#### <方法>

经超声波打断处理（平均链长约 200 bp）的人基因组 DNA 10 ng 为模板，使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-进行文库制备。分别采用常规流程（Normal）和可选流程（Option）对各 n=2 进行 NGS 前纯化处理。PCR 循环数为 8 个循环进行扩增。

并对文库的大小分布（图 11-A）、文库产量（图 11-B）及接头二聚体量（图 11-C）进行了评估。

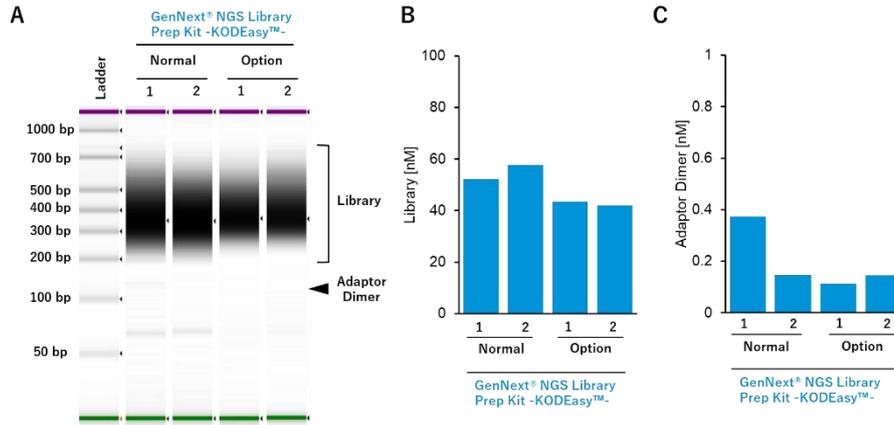


图 11. 使用 (option) 纯化方案时的文库大小分布、文库产量及接头二聚体量

结果表明，采用可选流程进行 NGS 前纯化处理时，短链长侧 DNA 分布得到有效抑制。

## 2. 评估 NGS 检测结果

使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-制备的 NGS 文库，通过 MiSeq™ (Illumina®公司) 及 MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) (Illumina®公司) 进行了分析。为统一读长数，先用 sektk v1.4 对各样本进行下采样至 50 万条读长，随后用 cutadapt v3.5 实施接头修剪。比对分析采用 bowtie2 v2.5.2 将读长与参考基因组进行比对后完成。

### 实验案例 2-1

#### <方法>

在超声打断人类基因组 DNA (10 ng, 循环数: 8) 的条件下进行分析。文库制备采用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- 或 A 公司文库制备试剂盒、B 公司文库制备试剂盒进行。以人类基因组 DNA (GRCh38) 作为参考基因组，进行比对分析。比对上的读长百分比 (% of Mapped Reads) 的计算方式为：统计 50 万条读长中比对到参考基因组的读长数量 (图 12-A)。插入片段大小通过 Picard (CollectInsertSizeMetrics) 计算 (图 12-B)。

此外，从混合微生物基因组 DNA (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard II (Log Distribution), Zymo Research 公司) 出发，使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- 进行下一代测序分析 (循环数: 8)。以构建的复合参考基因组作为参考，进行比对分析。基于比对后的数据，统计每个物种比对上的读长数量。随后，评估理论组成与检测到的组成之间的相关性 (图 12-C)。

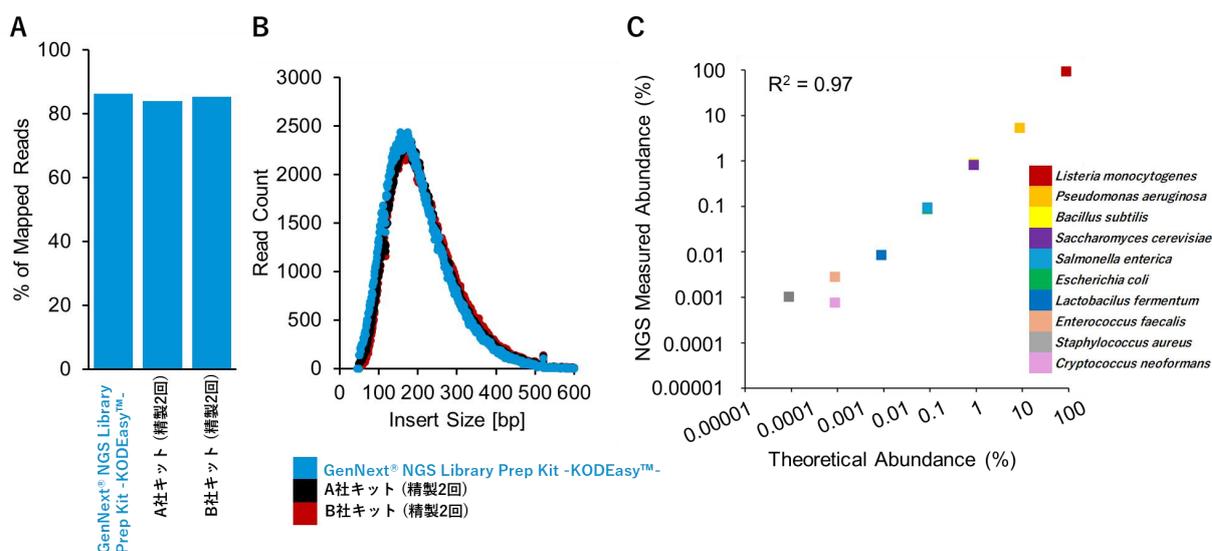


图 12. 使用 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-制备的 NGS 文库的分析结果

结果显示，GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-的比对率和插入片段大小均与其他公司产品 (经两次纯化) 处于同等水平。此外，对于混合微生物基因组 DNA，检测到的组成与理论值表现出高度相关性 (决定系数( $R^2$ )=0.97)。

## 实验案例 2-2

### <方法>

针对以高 GC 含量著称的嗜热栖热菌 HB8 (*Thermus thermophilus* HB8, 简称 Tth) 基因组 DNA, 评估了 GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™-对高 GC 含量区域的文库制备能力。从经超声波打断处理 (平均链长 200 bp) 的 10 ng Tth 基因组 DNA 出发, 在循环数为 8 的条件下进行分析。以 Tth 基因组 DNA 作为参考基因组, 进行比对分析。相对于 GC 含量的相对覆盖度通过 Picard (CollectGcBiasMetrics) 计算得出 (图 13)。

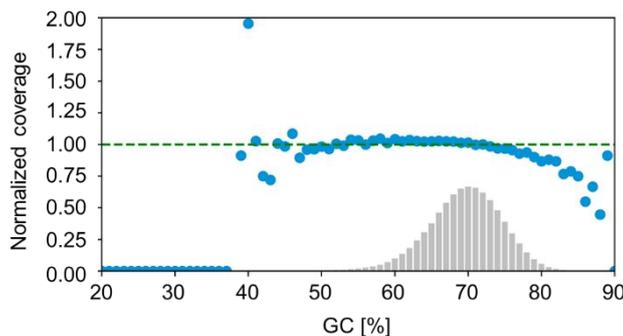


图 13. GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- 可从高 GC 含量 DNA 中进行 NGS 分析

结果显示, GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy™- 对于 GC 含量 70%以上的区域也表现出较高的检测率 (蓝色圆圈: 标准化覆盖度; 灰色直方图: 显示参考基因组 100 bp 窗口中 GC 含量分布的直方图; 绿色点线: 以参考基因组预期检测读长数标准化的检测读长数相对值)。

## [7] 常见问题及解决方案

现象	原因	方案
文库产量低	DNA 低纯度	DNA 制备时残留的杂质有可能抑制反应。请重新纯化模板 DNA。
	DNA 降解	DNA 可能因反复冻融、非预期的 DNase 或其他分解酶混入、过度片段化而发生降解。请重新制备片段化 DNA。此外，若片段化 DNA 低浓度保存，除易受 DNase 降解外，还可能因吸附于反应容器导致实际 DNA 量减少。建议：稀释后的 DNA 使用后避免冷冻保存再复用，每次使用时从高浓度保存液中现配现用。
	DNA 量过多或过少	在本产品中，已确认使用约 10 ~ 500 ng 的片段化 DNA (25 $\mu$ L 反应体系) 时可稳定制备文库，但根据 DNA 的种类或质量，反应可处理的 DNA 量可能存在波动。请适当调整模板 DNA 的添加量。
	溶液混合不充分	本产品使用高粘度试剂溶液。因此，若溶液混合不充分，反应将无法进行。推荐按本说明书记载的方法，切实执行溶液混合。
	接头核酸降解	本产品采用 TA 连接技术进行文库制备。接头因冻融等原因发生末端降解时，会降低针对目标 DNA 的连接效率。请对接头溶液进行重新制备（更换）。
	80%乙醇失效	若 80%乙醇失效，洗涤时损失的文库量会增加，导致产量降低。80%乙醇请当日配制。
	DNA 溶出前，残留 80%乙醇。	风干后的离心管中若 80%乙醇残留量较多（例如目视可见管内有溶液残留），会导致文库溶出量降低。风干前，请用少量的移液器等尽可能去除 80%乙醇。
	DNA 溶出前磁珠过于干燥	溶出文库前的磁珠若过度干燥，会导致文库溶出量降低。请勿过度风干。
接头二聚体比例高	DNA 降解	DNA 可能因反复冻融、非预期的 DNase 或其他分解酶混入、过度片段化而发生降解。请重新制备片段化 DNA。若 DNA 溶液中 4 ~ 5 bp 左右链长的 DNA 存在比率上升，可能导致表观接头二聚体比率升高。文库制备前，请通过磁珠或电泳等进行大小选择，以降低短链 DNA 的比率。

DNA 量过少	在本产品中，已确认使用约 10 ~ 500 ng 的片段化 DNA (25 $\mu$ L 反应体系) 时可稳定制备文库，但根据 DNA 的种类或质量 (链长)，反应可处理的 DNA 量可能存在波动。请增加模板 DNA 的添加量。
连接时溶液混合 (接头添加后, Ligation Solution 添加前) 不充分	连接反应前添加接头时，混合可能不充分。本产品通过本公司技术降低了接头二聚体生成反应。然而，在高浓度接头分子存在的区域，接头分子间结合概率上升，可能导致接头二聚体比率升高。请在添加 Ligation Solution 前、添加接头溶液后切实执行混合。此外，为抑制上述非特异性反应，对反应溶液及接头溶液进行冰浴冷却有效。
连接时溶液混合 (Ligation Solution 添加后) 不充分	添加 Ligation Solution 后，混合可能不充分。本产品通过本公司技术降低了接头二聚体生成反应。然而，高浓度试剂溶液成分会提高接头分子间结合概率，可能导致接头二聚体比率升高。为确保反应在适当成分浓度下进行，请切实执行添加 Ligation Solution 后的混合。此外，为抑制上述非特异性反应，对反应溶液及接头溶液进行冰浴冷却有效。
接头核酸的降解	本产品采用 TA 连接技术进行文库制备。接头因冻融等原因发生末端降解时，会提高接头分子间结合的概率，可能导致接头二聚体比率升高。请对接头溶液进行重新制备 (更换)。
SPRI 磁珠添加量过多	本产品通过在 PCR 后使用磁珠进行纯化，以去除含接头二聚体的短链 DNA。若 SPRI 磁珠溶液添加量过多，短链 DNA 与磁珠表面的结合力会上升，导致含接头二聚体的短链 DNA 增多。请按制造商推荐的方法，使用磁珠进行重新纯化。

## [8] 相关产品

### PCR 试剂

品名	规格	Code No.
高速·高保真·高成功率 PCR Master Mix <b>KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix</b>	1 mL×5 支 (200 次份 /50 μL 反应体系)	KMM-101
用于多重 PCR·亚硫酸氢盐 DNA 高保真 PCR 酶 <b>KOD -Multi &amp; Epi-<sup>®</sup></b>	200 U×1 支 (200 次份)	KME-101
高效率·高成功率 PCR Master Mix <b>KOD FLEX<sup>™</sup> PCR Master Mix</b>	1 mL×5 支 (200 次份 /50 μL 反应体系)	KMX-101

# TOYOBO

[制造 · 销售商]

## 东洋纺（上海）生物科技有限公司

交货期限 · 订货 · 产品内容 · 技术相关咨询

[Tel:021-5879-4900](tel:021-5879-4900) Fax:021-5879-4901

E-Mail:[tech@bio-toyobo.cn](mailto:tech@bio-toyobo.cn)

<http://www.bio-toyobo.cn>