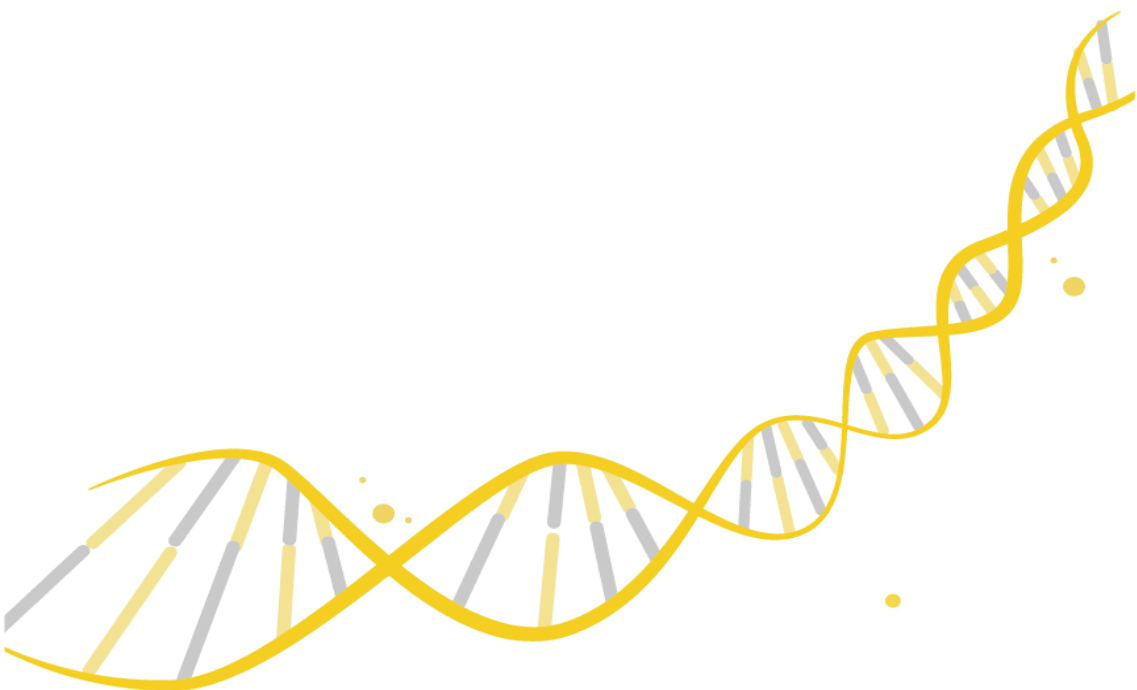




Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina (10 pg-200 ng)

RK20222



www.abclonal.com.cn
version: N14C12v1.2

目录

1. 产品介绍	1
2. 试剂盒组成	2
3. 保存方式与运输条件	2
4. 使用条件	3
5. 其他仪器试剂耗材	3
6. 工作原理	4
7. 操作步骤	5
8. 附录	13

1. 产品介绍

Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina (RK20222) 是一款通用型、快速、高效的 Illumina 测序文库构建的试剂盒。适用于片段化的单链 DNA 为模板，适用于各种应用样本类型，包括基因组 gDNA / FFPE DNA / cfDNA / ChIP DNA、古细菌、病毒 DNA 及 cDNA 等；可以满足 10 pg-200 ng 投入 DNA 样本的文库制备。

试剂盒提供了简便快速的建库流程，一般在 2h 左右可以完成正常文库制备，主要实验步骤包括：

① 预处理：通过高温孵育将 Double Stranded DNA 变为 Single Stranded DNA，以及保持单链 DNA 结构展开状态；

② T7 Tailing & Ligation：可以快速高效地将 T7 Adapter 连接到 Single Stranded DNA 的 3'端；

③ Second Strand Synthesis：使用 DNA 延伸酶完成 Single Stranded DNA 互补链的合成，对含 dUTP 的单链模板也具有高效的合成效率；

④ T5 Adapter Ligation：可以高效地将 T5 Truncated Adapter 连接到 Double Stranded DNA 的 5'端；

⑤文库扩增：提供了高保真、低偏好的 PCR mix 以及 PCR Primers。

试剂盒内组分均经过严格的质量控制，保证产品稳定性和可重复性。

2. 试剂盒组成

表格 1. 试剂盒组份模块与规格

试剂盒模块		试剂管名称与颜色	8 次	24 次	96 次
预处理	○	Low-EDTA TE	1 mL X 2	5 mL	25 mL
T7 Tailing & Ligation	●	T7 Buffer	32 μL	96 μL	384 μL
	●	T7 Adapter	20 μL	60 μL	240 μL
	●	T7 Enzyme Mix	24 μL	72 μL	288 μL
Second Strand Synthesis	●	2X Synthesis Mix	344 μL	1.032 mL	4.128 mL
	●	Synthesis Reagent	24 μL	72 μL	288 μL
T5 Adapter Ligation	●	T5 Buffer	32 μL	96 μL	384 μL
	●	T5 Adapter	80 μL	240 μL	960 μL
	●	Ligase Mix	24 μL	72 μL	288 μL
Amplification	●	2X PCR Master Mix	200 μL	600 μL	2.4 mL

3. 保存方式与运输条件

运输与保存：Scale ssDNA-seq Lib Kit 建库试剂盒必须保存在-25- -15℃条件下。如果保存条件合理的话，在有效期内试剂盒的试剂与酶组分能够保持完整活性。该试剂盒对温度比较敏感的，长途运输尽量采用干冰运输条件，或者干冰结合冰袋方式。请不要尝试采用冰袋运输条件进行长途运输。

4. 使用条件

使用前尽量保证 T7 Buffer、T7 Adapter、2X Synthesis Mix、Synthesis Reagent、T5 Buffer、T5 Adapter 和 2X PCR Master Mix 试剂溶液完全融解充分，无沉淀，瞬时离心至管底部。试剂盒溶液组分可以在室温下进行充分融解。使用时，试剂盒组分放置在冰上。产品组分使用完后，请尽快放置于-25~-15℃条件下进行保存。T7 Buffer 请避光保存。

文库 PCR 扩增需要与之配套的 index 试剂盒，具体信息如下表。

表格 2. Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit 兼容接头类型汇总表

Index 类型	产品名称	货号
96-index (8-base)	PCR Index MiniSet (8 indices)	RK21640
	PCR Index MidiSet (24 indices)	RK21641
96-index (8-base)	PCR Index Set B (48 indices)	RK21632
	PCR Index Set C (48 indices)	RK21633
Dual-index (8-base)	Dual PCR Index Kit for Illumina	RK21634

5. 其他仪器试剂耗材

纯化磁珠：推荐高质量和稳定性的 DNA 纯化磁珠，如 AMPure XP beads。

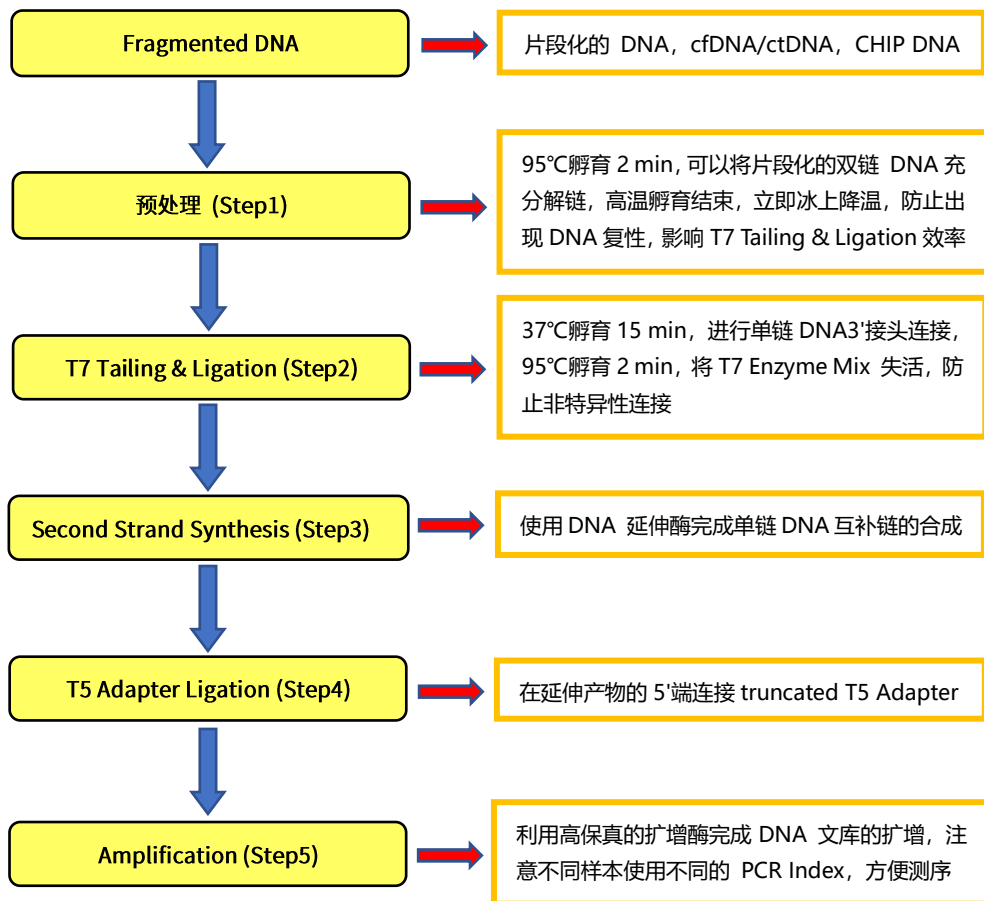
DNA 质控：Agilent 公司 2100 Bioanalyzer 等生物分子分析仪与耗材试剂进行 DNA 大小分析；Life 公司 Qubit 核酸定量仪器与试剂进行 DNA 浓度测定。

其他试剂：80%乙醇溶液（新鲜配置），超纯水等。

其他耗材：低吸附 EP 管、移液吸头，低吸附薄壁 PCR 管（200 μL），磁力架，单道或多道移液器。

其他仪器：PCR 仪器、（漩涡）振荡器、桌面微型离心机。

6. 工作原理



7. 操作步骤

试剂盒组分使用条件：T7 Buffer 、T7 Adapter、2X Synthesis Mix 、Synthesis Reagent、T5 Buffer、T5 Adapter 和 2X PCR Master Mix 试剂溶液室温完全融解充分，无沉淀，涡旋震荡混匀，瞬时离心至管底部，放置在冰上，待使用。

1. DNA 模板预处理

热循环仪（PCR 仪）提前置于 95°C，热盖温度设定为 105°C，配制 T7 Tailing & Ligation 预混液，冰上放置待用。

**,注：热循环仪（PCR 仪）提前置于 95°C，待 2 min 结束，要立即置于冰上，保证 DNA 最大程度的以 ssDNA 的形式存在；在进入 DNA 预处理之前，可以将 T7 Tailing&Ligation 预混液提前配制好，充分混匀后，冰上放置。*

1.1 取片段化 DNA (10 pg-200 ng) 放在 0.2 mL 的 PCR 管中，加入 Low-EDTA TE 稀释到总体积为 15 μ L。

1.2 待 PCR 仪器稳定到 95°C后，将 PCR 管放入 PCR 仪中，进行 95°C孵育 2 min 后，立即将 PCR 管置于冰上进行冷却，静置 2 min。

2. T7 Tailing & Ligation

热循环仪（PCR 仪）提前置于 37°C，热盖温度 105°C。

2.1 按照下面表配制 T7 Tailing & Ligation 预混液，需要在预处理前配制好，冰上放置时间最好不要超过 20 min。

表格 3. T7 Tailing & Ligation 体系

试剂	体积
T7 Buffer	4 μ L
T7 Adapter	2.5 μ L
T7 Enzyme Mix	3 μ L
Low-EDTA TE	15.5 μ L
Total	25 μ L

2.2 取 25 μ L T7 Tailing & Ligation 预混液加入到冰上放置的预处理 DNA 样本 PCR 管中（步骤 1.2），使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

2.3 将 PCR 管置于 PCR 仪（热盖 105°C）中，进行 T7 Tailing & Ligation。

表格 4. T7 Tailing & Ligation 程序

温度	时间
37°C	15 min
95°C	2 min
4°C	Hold

3. Second Strand Synthesis Reaction

热循环仪（PCR 仪）提前置于 98°C，热盖 105°C。

3.1 按照下表体系配置 Second Strand Synthesis Reaction 预混液；

表格 5. Second Strand Synthesis 体系

试剂	体积
2X Synthesis Mix	43 μ L
Synthesis Reagent	3 μ L
总体积	46 μ L

3.2 取 46 μ L Second Strand Synthesis Reaction 预混液加入到 T7 Tailing &Ligated mix（步骤 2.3）中，使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底；

3.3 将 PCR 管置于 PCR 仪（热盖 105℃）中，进行二链合成反应：

表格 6. Second Strand Synthesis 程序

温度	时间
98℃	1 min
60℃	2 min
68℃	5 min
4℃	Hold

3.4 提前将 Agencourt AMPure XP beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀。

3.5 待 Second Strand Synthesis Reaction 结束后，在产物中加入 105 μ L Agencourt AMPure XP beads (1.2X)，吹打混匀。

3.6 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

3.7 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇静置 30 s，弃除全部上清。

3.8 重复 3.7，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

3.9 干燥磁珠 2-3 min, 待酒精挥发完全后, 将 PCR 管移出磁力架, 加入 21 μ L Low-EDTA TE, 吹打混匀, 然后室温静置 2 min。

**,注:若投入普通 DNA 模板量少于 1 ng 或者 FFPE 样品 DNA 量少于 10 ng, 建议采用 50 μ L Low-EDTA TE 洗脱, 再使用 1.2X 磁珠 (60 μ L 磁珠) 进行再次纯化 (重复步骤 3.5-3.9), 最后使用 21 μ L Low-EDTA TE 洗脱进行下面步骤。此步骤可以显著减少在有效模板过低的情况下导致的文库中存在接头二聚体情况。*

3.10 将 PCR 管放置到磁力架上室温静置, 直到溶液变澄清, 小心吸取 20 μ L 上清液至另一新的 PCR 管中备用。

4. T5 Adapter Ligation

4.1 按照下面表格配制 T5 Adapter Ligation 反应体系, 依次加入如下组分, 使用移液器进行吹打混匀, 然后瞬时离心使得反应液至管底。

表格 7. T5 Adapter Ligation 体系

试剂	体积
Double Stranded DNA (步骤 3.10)	20 μ L
Low-EDTA TE	3 μ L
T5 Buffer*	4 μ L
T5 Adapter*	10 μ L
Ligase Mix*	3 μ L
Total	40 μ L

**, 注: 可以提前配制 T5 Buffer 和 T5 Adapter 的预混液, 切不可将 T5 Buffer、T5 Adapter 和 Ligase Mix 预混, 以免出现接头自连反应。*

4.2 将 PCR 管置于 PCR 仪 (热盖加热功能关闭, 或者热盖不要合上) 中, 进行连接反应。

表格 8. T5 Adapter Ligation 程序

温度	时间
25°C	15 min
4°C	Hold

4.3 提前将 Agencourt AMPure XP beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀。

4.4 连接反应结束后，加入 40 μ L Agencourt AMPure XP beads (1.0X)到连接产物中，吹打混匀。

4.5 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

4.6 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。

4.7 重复 4.6，将磁珠用 80%乙醇再次清洗一次，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

4.8 干燥磁珠 2-3 min，将 PCR 管移出磁力架，加入 21 μ L Low-EDTA TE，吹打混匀，然后室温静置 2 min。

4.9 将 PCR 管放置到磁力架上，室温静置直到溶液变澄清，小心吸取 20 μ L 上清液至另一新的 PCR 管中备用。

5. PCR 文库扩增

5.1 按照下表配制 PCR 反应体系：

表格 9. PCR 反应体系

试剂	体积
纯化后的连接产物（步骤 4.9）	20 μ L
2X PCR Master Mix	25 μ L
Universal PCR Primer	2.5 μ L
PCR Index Primer*	2.5 μ L
Total	50 μ L

*, 注：不同的样本应使用不同的 PCR Index Primer 进行样本标记，在操作 PCR Index Primer 时，一定要小心操作，避免样本与 primer 之间的交叉污染。

5.2 使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底，放置到 PCR 仪中。

5.3 按照如下程序进行 PCR 反应：

表格 10. PCR 反应程序

温度	时间	Cycles
98°C	45 s	1
98°C	15 s	5-20*
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	1

*, 注：PCR cycles, 根据样本不同，PCR cycles 按照下表推荐使用。

表格 11. 不同起始量 DNA 对应的 PCR 循环数推荐

Fragmented gDNA	PCR Cycles	Fragmented FFPE DNA	PCR Cycles	Fragmented cfDNA	PCR Cycles
100 ng	6-7	100 ng	7-8	5 ng	10
50 ng	7-8	50 ng	8-9	1 ng	13
25 ng	8-9	25 ng	9-10		
5 ng	11-12	5 ng	14		
1 ng	13-14	1 ng	15-16		
0.1 ng	17				
0.01 ng	20				

5.4 提前将 Agencourt AMPure XP beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀。

5.5 反应结束后，加入 50 µL Agencourt AMPure XP beads (1.0X) 到 PCR 反应产物，吹打混匀。

5.6 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

5.7 将离心管保持在磁力架上，加入 200 µL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。

5.8 重复 5.7，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 µL 枪头将残留液体彻底吸干。

5.9 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入 21 µL Low-EDTA TE，吹打混匀。

**,注：针对困难样本或者超低量建库若后期检测发现存在接头二聚体存在，建议采用 50 µL Low-EDTA TE 洗脱,再使用 1X Agencourt AMPure XP磁珠(50 µL 磁珠) 进行再次纯化（重复步骤 5.5-5.9），最后使用 21 µL Low-EDTA TE 洗脱进行下面步骤。此步骤可以有效去除文库中存在接头二聚体情况。*

5.10 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μ L 文库至另一新的离心管中，-20°C保存或用于后续测序分析。

8. 附录

1. PCR Index primer 序列信息

Universal PCR Primer

5-AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA
TCT-3'

Index Primer:

5-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG
CTCTTCCGATCT-3'

注: XXXXXXXX: 是 8bp Index 序列

2. 文库结构

文库示意图结构:

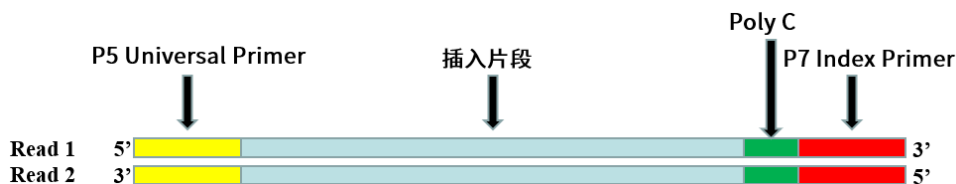


图 1. 文库的序列结构图

文库序列展示:

5' -AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC
CGATCT-NNNNNNNNNNNN-Ploy C-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCA
GTCACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注: NNNNNNNNNNN: 是插入的 DNA 序列;

Poly C: 是~4-10bp 的 dCTP;

XXXXXXXX: 是 8bp Index 序列

3. 文库测序说明

由于文库 3'端含有低复杂度的 Poly C 结构，为了提高测序的质量，建议测序时加入不少于 25%的 PhiX 或者其他复杂度高的 Pooling 文库。

4. 原始测序数据预处理

Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina (RK20222) 通过对样本 ssDNA 的 3'末端添加碱基 dCTP，然后与 T7 Adapter 进行连接，通过延伸合成 dsDNA，接着在双链的另一末端连接 T5 Adapter，通过 PCR 富集后获得最终的 DNA 文库，文库结构如图 2 所示。

在测序完成后 Read 2 序列的起始会有多聚碱基 dGTP，如图 2 所示；我们建议在序列比对前进行 reads trim 工作，以免影响 reads mapping 效果；当测序读长较长，或者插入片段较短 (<150 bp) 时，Read 1 序列的 3'端也可能会含有连续的 dCTP，建议将这部分序列也进行一次 trim 工作。一般地，针对 Read 1 的末端 (3') 和 Read 2 的起始端 (5') 使用 Trimmomatic 等工具进行 10 碱基的 trim。

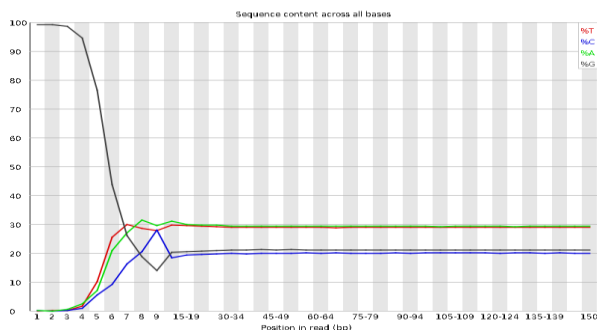


图 2. Fast QC per base sequence content for Read2

5. 常见问题

问题 1. 当 DNA 模板浓度很低,预变性反应体积不足时,可以考虑如下操作:

1. 可以将 T7 Tailing & Ligation 反应体系的 15.5 μL 的 Low-EDTA TE 转移至预处理体系中,将预变性体系由 15 μL 增大到 30.5 μL ,然后预变性条件改为下表所示,然后再进行 T7 Tailing & Ligation 反应。

表格 12. 预变性反应程序

温度	时间
95°C	3 min
立即置于冰上	Hold

2. 若样本 DNA 体积大于 30.5 μL ,可以进行 1.8X 磁珠纯化处理,然后用 16 μL 的 Low-EDTA TE 洗脱,然后按照说明书进行单链 DNA 的建库。

问题 2. DNA 建库效果不理想,文库产出偏低,出现接头二聚体,大片段等问题,可以考虑优化的方面如下所示:

1. 投入的模板 DNA:

- (1) 起始 DNA 定量可能不准确,建议 Qubit 试剂重新进行定量;
- (2) 起始 DNA 可能损伤较严重,比如 FFPE DNA,建议适当增加 PCR 循环数。
- (3) 起始 DNA 可能含有酶抑制剂,建议使用 2.2X 磁珠进行纯化再回收;

2. T7 adapter 使用量:

建库若出现接头二聚体,或者是大片段,除了可以在二链延伸时进行二次纯化外,也可以进行稀释 T7 接头用量测试,不同模板投入量建议的稀释倍数如下表所示。

表格 13. 不同起始量 DNA 对应的 T7 Adapter 用量推荐

	DNA	T7 Adapter Dilution	T7 Adapter Concentration
gDNA	≥5 ng	No dilution	10 μM
	1-5 ng	10-fold	1 μM
	<1 ng	50-fold	0.2 μM
FFPE DNA	≥10 ng	No dilution	10 μM
	1-10 ng	10-fold	1 μM
cfDNA	≥1 ng	No dilution	10 μM
	<1 ng	10-fold	1 μM

3. 二次纯化：

建库若出现接头二聚体，可以在 PCR 纯化后，根据洗脱样品的体积，再次使用 1X 磁珠进行二次纯化，可以显著减少文库接头二聚体。

6. 案例展示

1) 微量 DNA 样本建库示例

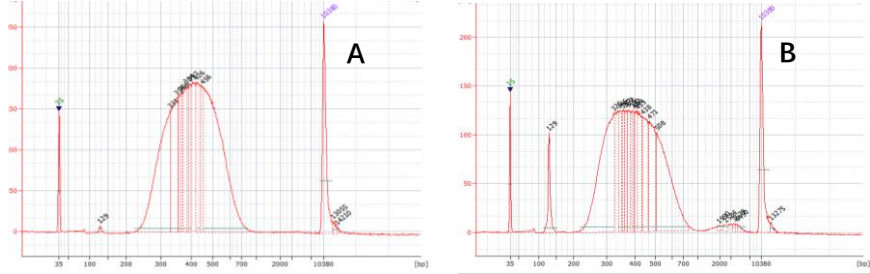


图 3. Human gDNA 微量建库 Agilent 2100 分析图

A: Human blood DNA 样本，片段化的 gDNA，0.1 ng 建库，PCR 扩增 17 个循环得到文库（33.2 ng/μL x 20 μL）；

B: Human blood DNA 样本，片段化的 gDNA，0.01 ng 建库，PCR 扩增 20 个循环得到文库（19.0 ng/μL x 20 μL），对于存在的接头二聚体，可以采用 1X beads 二次纯化去除。

2) 超微量样本文库二聚体去除示例

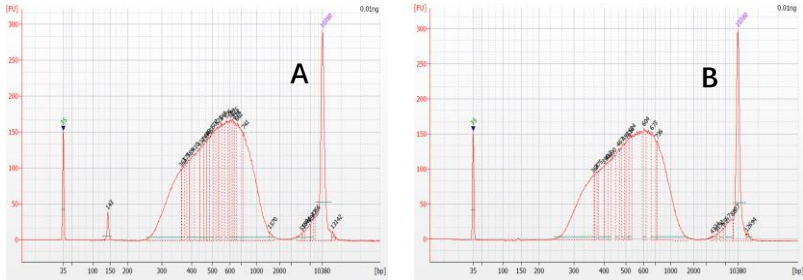


图 4. E.coli gDNA 微量建库 Agilent 2100 分析图

A: E.coli gDNA 样本，片段化的 gDNA，0.01 ng 建库，PCR 扩增 20 个循环得到文库，1X beads 一次纯化得到的文库效果图（46.8 ng/μL x 20 μL）；

B: E.coli gDNA 样本，片段化的 gDNA，0.01 ng 建库，PCR 扩增 20 个循环得到文库，1X beads 两次次纯化得到的文库效果图（45.2 ng/μL x 20 μL）

3) FFPE / cfDNA 样本建库示例

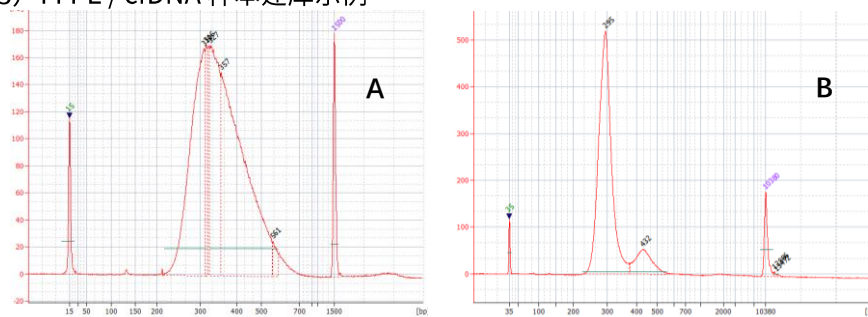


图 5. FFPE / cfDNA 样本建库 Agilent 2100 分析图

A: FFPE DNA 样本 20 ng 建库, PCR 扩增 11cycles 文库产量 ($30.3 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 20 \mu\text{L}$);

B: 5 ng cfDNA 样本建库, PCR 扩增 11cycles 得到文库 ($81.5 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 20 \mu\text{L}$)。

中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷国际生物医药
企业加速器三期 7 栋 4 层

上海分部：上海市浦东新区张江高科技园区哥白尼路 150 号 1 号楼三楼

北京分部：北京市西城区西直门外大街 18 号金贸大厦 A1127 室

南京分部：南京市白下区石鼓路 98 号阳光大厦 20 楼 C 座

成都分部：成都市金牛区一环路北三段 1 号金牛万达广场 SOHO D 座 3210 室

杭州分部：杭州市西湖区古墩路 671 号申悦国际 B 座 1530

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com