



# FS Pro DNA Lib Prep Kit V2

RK20275

---



[www.abclonal.com.cn](http://www.abclonal.com.cn)

Version: N17E04v1.1

# 目录

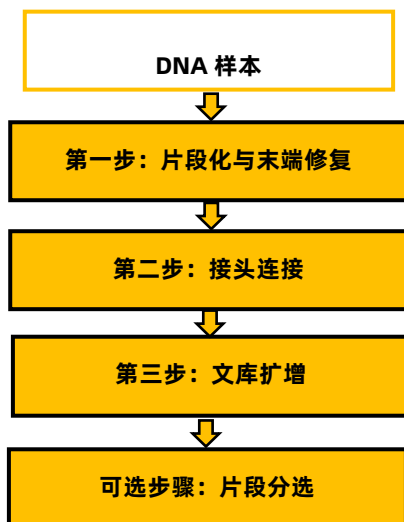
1. 产品概述 .....	2
2. 产品组分 .....	3
3. 产品保存 .....	3
4. 产品应用 .....	3
5. 其它自备材料 .....	4
6. 注意事项 .....	5
7. 操作流程 .....	8
第一步 片段化与末端修复 .....	8
第二步 接头连接 .....	9
第三步 文库扩增 .....	10
8. 附录 .....	14
附录一. 片段分选（可选） .....	14
附录二. 实验实例 .....	15
附录三. 极低投入量建库 .....	20
9. 附表 .....	22

# 1. 产品概述

FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 是一款兼容 Illumina 和 MGI 高通量测序平台开发的新一代基于酶切片段化的建库试剂盒。本试剂盒将 DNA 样本片段化、末端修复与加 dA 合并为一步，并且无需纯化，直接可以进行测序接头连接。从而大幅简化了实验流程，极大的减少了建库的时间，整个实验过程可以在 2 hr 内完成。本试剂盒对不同物种和不同投入量的 DNA 样本具有良好的兼容性。对于不同样本溶剂有良好兼容性，并能够适配自动化工作平台。通过体系优化，大幅减少了假阳性的产生，提高了测序结果的准确性。对于 FFPE 样本，该试剂盒在建库产量上展现出了卓越的性能。另外本试剂盒还可以用于 PCR-Free 文库构建（例如：高质量基因组 Input DNA 100 ng）。

试剂盒组分经过了严格的质量控制，主要包括组分污染测试、功能性试验验证、应用场景测试和产品批间次稳定性测试等工序，最大程度上降低病原菌残留，适用于病原微生物检测。

## FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 建库流程



## 2. 产品组分

表格 1. 试剂盒组分表

		组分名称	8 次	24 次	96 次
片段化 与末端 修复	●	FS Pro Buffer I	40 $\mu$ L	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L
	●	FS Pro Enzymes II	104 $\mu$ L	312 $\mu$ L	1248 $\mu$ L
	○	Nuclease-Free water	1 mL	2 mL	10 mL
	○	1X TE Buffer	1 mL	2 mL	10 mL
接头 连接	●	FS Pro Ligation Buffer II	160 $\mu$ L	480 $\mu$ L	1920 $\mu$ L
	●	Ligase Enzymes	40 $\mu$ L	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L
文库 扩增	●	2X PCR Mix	200 $\mu$ L	600 $\mu$ L	2400 $\mu$ L
	●	10X ILM PCR Primers	40 $\mu$ L	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L
	●	MGI PCR Primer Mix	40 $\mu$ L	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L

## 3. 产品保存

运输与保存: FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 建库试剂盒必须保存在-15~-25°C条件下。该试剂盒对温度比较敏感, 长途运输尽量采用干冰运输条件, 或者干冰结合冰袋方式。

## 4. 产品应用

FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 建库试剂盒适用于 DNA 二代测序文库构建, 主要功能模块包括片段化、末端修复、3'A-tailing、接头连接和 PCR 扩增。该试剂盒适用于起始量 1 ng~1000 ng 各种样本类型 (普通基因组、FFPE DNA)。对于极低

起始量的样本，也可以尝试进行建库（0.1 ng~1ng 投入量，具体实验参数详见**附录三. 极低投入量建库**）。综上，FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 建库试剂盒的应用场景主要包括：

①全基因组测序；

②外显子测序和靶向测序，包括 Roche® NimbleGen™ SeqCap™ EZ, Agilent SureSelect, Illumina TruSeq®, IDT xGen™ Lockdown™ Probes, 或者其他探针杂交系统；

③宏基因组测序；

## 5. 其它自备材料

**磁珠：** AFTMag NGS DNA Clean Beads（ABclonal， Cat. No. RK20257）或 Agencourt™ AMPure XP Beads (Beckman Coulter Inc., Cat. No. A63880)。

**质检：** Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效 DNA 质检产品； Qubit（ABclonal， Cat. No. RK30141）或其他等效的基于荧光法检测核酸浓度的产品。

**适用于 Illumina®平台的测序接头：**

双端 UDI 短接头（Cat. No.RK21622、RK21623、RK21624、RK21625）；

双端 UDI、双端 UMI 短接头（Cat. No.RK21701、RK21702、RK21703）；

双端 UDI 长接头板（Cat. No.RK21706、RK21707、RK21708、RK21709）。

**适用于 MGI 平台的测序接头：**

双端 UDI 短接头（Cat. No.RK21686、RK21687、RK21688、RK21689）；

单端长接头（Cat. No.RK21676、RK21677、RK21678、RK21679）。

双端 UDI 短接头板（Cat. No.RK21721、RK21722、RK21723、RK21724）。

**其他材料：**

Nuclease-Free Water、无水乙醇(80%的乙醇需现配现用)、低吸附 EP 管、

PCR 管、磁力架、带滤芯移液器吸头、PCR 热循环仪、微型离心机、漩涡混匀仪、单道移液器和多道移液器等。

## 6. 注意事项

### 6.1 关于样本

6.1.1 为了得到良好的建库结果，实验开始前需要确保 DNA 样本的质量合格。并且建议实验开始前用 Qubit®或其他基于荧光法定量仪器对 Input DNA 定量。另外需要注意，样本中的杂质，如：微量残留的 RNA、核苷酸、单链 DNA 以及其它污染物都可能会对文库的构建产生影响。

6.1.2 如样本杂质较多，可以在实验前，使用 2.2X 磁珠进行纯化。

### 6.2 关于片段化

6.2.1 样本用 Nuclease-Free Water, 1X TE Buffer, EB (Elution Buffer), Low-EDTA TE Buffer 等常见溶剂溶解，对于片段化的影响较小，均可正常进行实验。如样本使用特殊溶剂进行溶解，可以尝试进行实验。如无法片段化到预期的大小，建议可以进行一次 2.2X 的磁珠纯化后，将样本溶于 Nuclease-Free Water。

6.2.2 FFPE DNA 样本或其他严重降解样本，根据其降解程度不同，推荐片段化时间为 5-10 min。

6.2.3 片段化对温度较敏感，实验时请在冰上操作。反应体系配置完成后，请立即放入 PCR 仪进行反应。

### 6.3 关于连接

6.3.1 本试剂盒不包含接头，接头需要单独购买。

6.3.2 接头的使用量会影响连接效率和文库产量。样本起始量较少时，可以用

Low-EDTA TE Buffer 稀释接头。表格 2 是不同样本起始量，推荐的接头稀释倍数。

表格 2. 接头稀释表

Input DNA	稀释倍数	浓度
1 µg~50 ng	不需稀释	15 µM
49 ng~25 ng	2 倍稀释	7.5 µM
24 ng~10 ng	5 倍稀释	3 µM
9 ng~5 ng	10 倍稀释	1.5 µM
1ng~5 ng	20 倍稀释	0.75 µM
100 pg~1 ng	60~200 倍稀释	0.075~0.25 µM

## 6.4 关于磁珠纯化与分选

6.4.1 磁珠在使用前，需室温平衡 30min。否则可能影响回收效率和分选效果。

6.4.2 磁珠在使用前，需充分震荡或移液器吹打混匀。

6.4.3 磁珠漂洗用的 80%乙醇应新鲜配制。

6.4.4 产物洗脱前应将磁珠充分干燥。干燥不充分导致乙醇残留，可能影响后续实验。干燥过度会导致磁珠开裂，降低回收效率。

6.4.5 磁珠纯化或分选产物如需保存，可使用 1X TE Buffer 溶解。

6.4.6 文库磁珠片段长度分选是可选步骤，推荐在接头连接，磁珠纯化后进行。连接体系含有高浓度 PEG，不建议直接进行分选，推荐在纯化之后进行分选。

6.4.7 文库磁珠片段长度分选会损失较多 DNA，如需要分选，建议 Input DNA 量大于 50 ng。

## 6.5 关于文库扩增

6.5.1 文库扩增步骤需要严格控制 PCR 循环数。循环数不足，会导致文库产量低；

循环数过高，会导致偏好性增加，扩增突变累积等问题。表格 3 是使用本试剂盒，获得 1 ug 文库的推荐 PCR 循环数。

表格 3. 推荐文库扩增循环数

Input DNA (ng)	1 µg 文库产量推荐 PCR 循环数*
1000	2-3
500	3-4
250	4-5
100	5-6
50	6-7
25	7-9
10	9-11
1	13-15

\*注：FFPE 样本在此基础上增加 1-3 个循环数。

6.5.2 文库扩增引物需要与接头相互匹配。如使用 Truncated Adapter 进行连接，则需要使用包含 Index 的长引物进行扩增；如使用 Full Adapter 进行连接，则需要使用 10X PCR Primers 短引物进行扩增；如使用 MGI Full Adapter 进行连接，则需要使用 MGI PCR Primer Mix 引物进行扩增。



## 7. 操作流程

### 第一步 片段化与末端修复

1.1 PCR 仪预热到 32°C。

1.2 在置于冰上的无菌 PCR 管中准备如下反应体系：

表格 4. 片段化与末端修复反应体系

试剂	体积
Input DNA	X $\mu$ L
● FS Pro Buffer I	5 $\mu$ L
● FS Pro Enzymes II	13 $\mu$ L
○ 1X TE Buffer	Up to 50 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

1.3 使用移液器上下吹打或震荡，保证体系充分混匀后，短暂进行离心。

1.4 立即将 PCR 管放到提前预热到 32°C 的 PCR 仪上，运行表格 5 中反应程序，PCR 仪热盖设置为 82°C；在 4°C Hold 建议不超过 1 hr。

表格 5. 片段化与末端修复反应程序

温度	时间
32°C	5-25 min
72°C	30 min
4°C	建议不超过 1 hr

表格 6. 片段化时间 (32°C) : 根据需要的目标插入片段大小调整

目标插入片段大小	片段化时间	时间优化范围
225 bp	20 min	18-25 min
250 bp	15 min	13-17 min
300 bp	10 min	8-12 min
500 bp	5 min	4-6 min

\*注: 上述推荐片段化时间, 为使用 100ng NA12878 人类基因组标准品所得。其它类型的高质量 DNA 样本, 相同的片段化时间, 所得到的片段化产物大小基本一致。FFPE 等降解严重样本, 可以适当缩短片段化时间, 一般 5 min 左右即可。

## 第二步 接头连接

### 2.1 准备如下反应体系:

表格 7. 接头连接反应体系

试剂	体积
End Prep Reaction Mix (步骤 1.4)	50 $\mu$ L
● FS Pro Ligation Buffer II	20 $\mu$ L
● Ligase Enzymes	5 $\mu$ L
Working Adapter (按表 2 稀释后的接头)	5 $\mu$ L
总体积	80 $\mu$ L

\*注: 所有操作均于冰上进行。FS Pro Ligation Buffer II、Ligase Enzymes 可配制预混液, 但 Working Adapter 必须单独添加。若将三者直接混合, 会产生大量接头二聚体, 严重影响产量! (**重要!**)

2.2 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，反应程序见表 8， PCR 仪不设热盖。

表格 8. 接头连接反应程序

温度	时间
22°C	15 min
4°C	∞ (降至 4°C立即进行下一步)

2.3 表格 8 反应结束后，每个样本中加入 64  $\mu\text{L}$  (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，涡旋混匀。室温孵育 5 min。

2.4 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。

2.5 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

2.6 重复步骤 2.5。

2.7 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10  $\mu\text{L}$  移液器移除管底残留的乙醇，干燥至无乙醇残留。

2.8 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 21  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。（如样本投入量为 1ng 及以下，建议直接将重悬后的磁珠加入下一步的 PCR 反应，以提高文库产量。）

2.9 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 20  $\mu\text{L}$  上清液至一个新 PCR 管中。

2.10 如果对文库大小有严格需求，可以 2.9 步骤结束后，进行片段分选，分选方案参照附录。如果不需要片段分选，直接进行文库扩增步骤。

**安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4°C/-20°C保存 1-2 周左右。**

### 第三步 文库扩增

本试剂盒可使用全长或截短型的接头，请根据接头类型选择表格 9，表格 10，表格 11，表格 12 的文库扩增体系，接头类型及相关货号信息见附表。

### 3.1 配制如下 PCR 反应体系：

表格 9. 文库扩增体系（短接头-单端 index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
PCR Index Primer（MGI Index）	2.5 $\mu$ L
Universal PCR Primer（MGI Universal PCR Primer）	2.5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

表格 10. 文库扩增体系（短接头-双端 CDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
I5 Primer	2.5 $\mu$ L
I7 Primer	2.5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

表格 11. 文库扩增体系（短接头-双端 UDI index）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
UDI Primer（MGI UDI Primer）	5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

表格 12. 文库扩增体系（长接头）

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu\text{L}$
● 2X PCR Mix	25 $\mu\text{L}$
● 10X ILM PCR Primers (MGI PCR Primer Mix)	5 $\mu\text{L}$
总体积	50 $\mu\text{L}$

3.2 移液器吹打混匀并瞬时离心。

3.3 设置如下 PCR 扩增程序：

表格 13. 文库扩增程序

温度	时间	Cycles
98°C	1 min	1
98°C	10 s	2-15 PCR Cycles
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	$\infty$	1

3.4 向扩增产物中加入 50  $\mu\text{L}$  (1X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，混匀。室温下孵育 5 min。

3.5 将样本于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。

3.6 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  80% 的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

3.7 重复步骤 3.6。

3.8 保持 PCR 管在磁力架上，用 10  $\mu\text{L}$  移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

3.9 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 31  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

3.10 将样本于磁力架上静置 2 min，转移 30  $\mu\text{L}$  上清液至一个新 PCR 管中。

3.11 文库保存在  $-20^{\circ}\text{C}$ ，以便于进行文库质量检测和上机测序。

**安全停止点：纯化后的 PCR 产物可以暂时放置在  $4^{\circ}\text{C}/-20^{\circ}\text{C}$  保存 1-2 周左右。**

## 8. 附录

### 附录一. 片段分选（可选）

表格 14. AFTMag NGS DNA Clean Beads 用量

分选步骤	接头连接纯化后	接头连接纯化后	接头连接纯化后
插入片段大小 (bp)	350~400	300~350	280~330
文库大小 (bp)	475~525	425~475	400~450
第一轮磁珠比例	0.6X (60 $\mu$ L)	0.65X (65 $\mu$ L)	0.7X (70 $\mu$ L)
第二轮磁珠比例	0.15X (15 $\mu$ L)	0.15X (15 $\mu$ L)	0.15X (15 $\mu$ L)

以 0.65X / 0.15X 的分选条件进行示例：

1.1 将需要分选的本样 (7. 操作流程 - 第二步 接头连接 - 步骤 2.9 连接产物) 加 Nuclease-Free Water 补足 100  $\mu$ L。加入 0.65X (65  $\mu$ L) 第一轮分选磁珠，移液器吹打混匀。室温下孵育 5 min。

1.2 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移上清液至一个新 PCR 管中。

1.3 向上述上清液中加入 0.15X (15  $\mu$ L) 第二轮分选磁珠，移液器吹打混匀。室温下孵育 5 min。

1.4 将样本于磁力架上静置 2 min，溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。

1.5 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200  $\mu$ L 80% 的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

1.6 重复步骤 1.5。

1.7 保持 PCR 管在磁力架上，用 10  $\mu$ L 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至

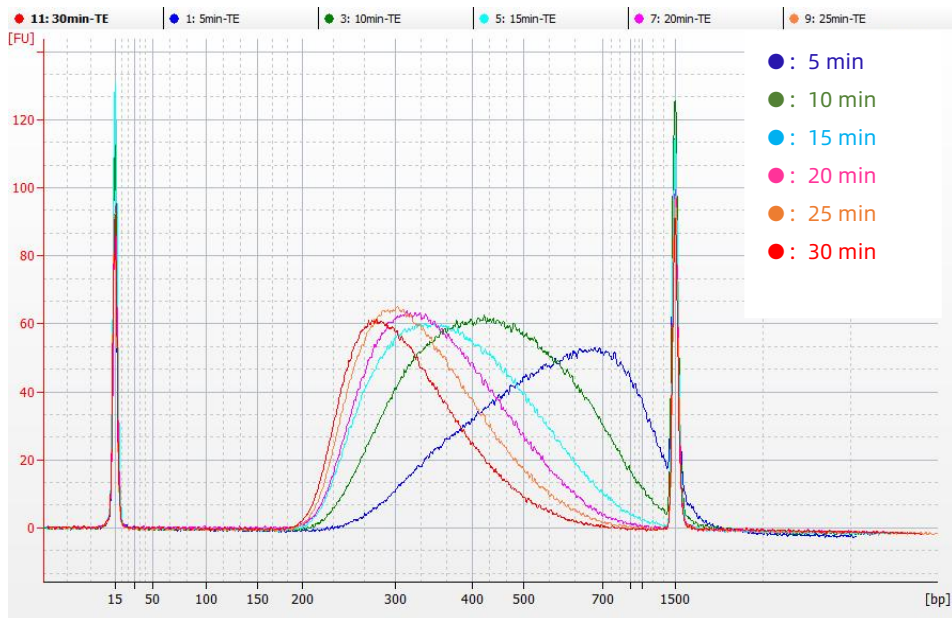
无乙醇残留。

1.8 将 PCR 管从磁力架上取出，再加入 21  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上 DNA 充分释放。

1.9 将样本于磁力架上静置 2 min，吸取 20  $\mu\text{L}$  上清液至一个新 PCR 管中用于后续实验。

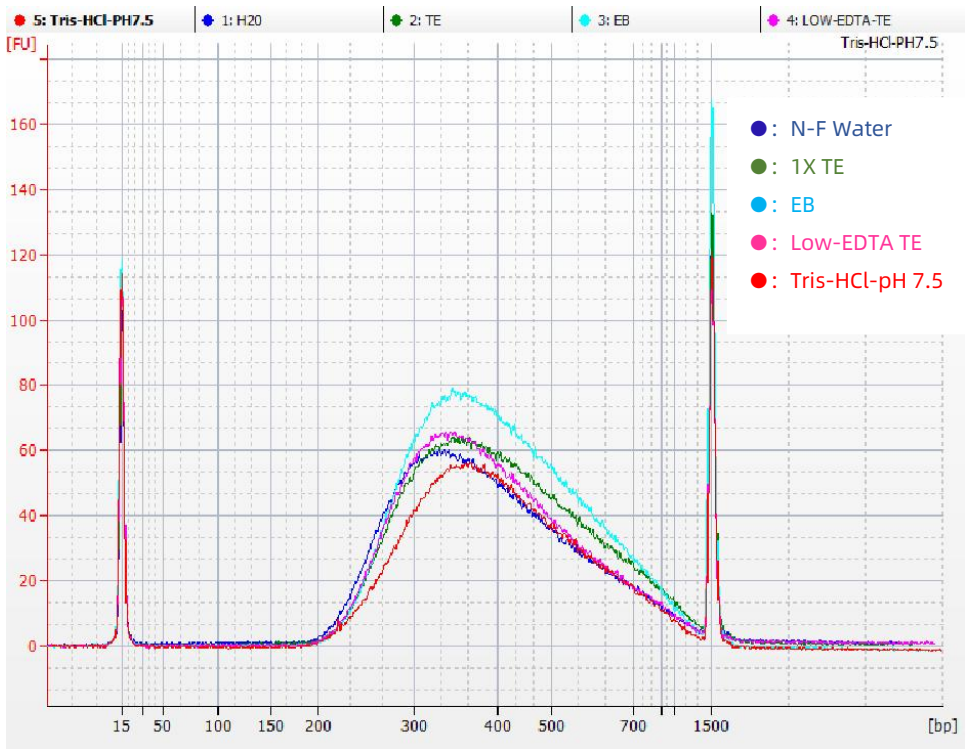
**安全停止点：**纯化后的 PCR 产物可以暂时放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ /-20 $^{\circ}\text{C}$  保存 1-2 周左右。

## 附录二. 实验实例

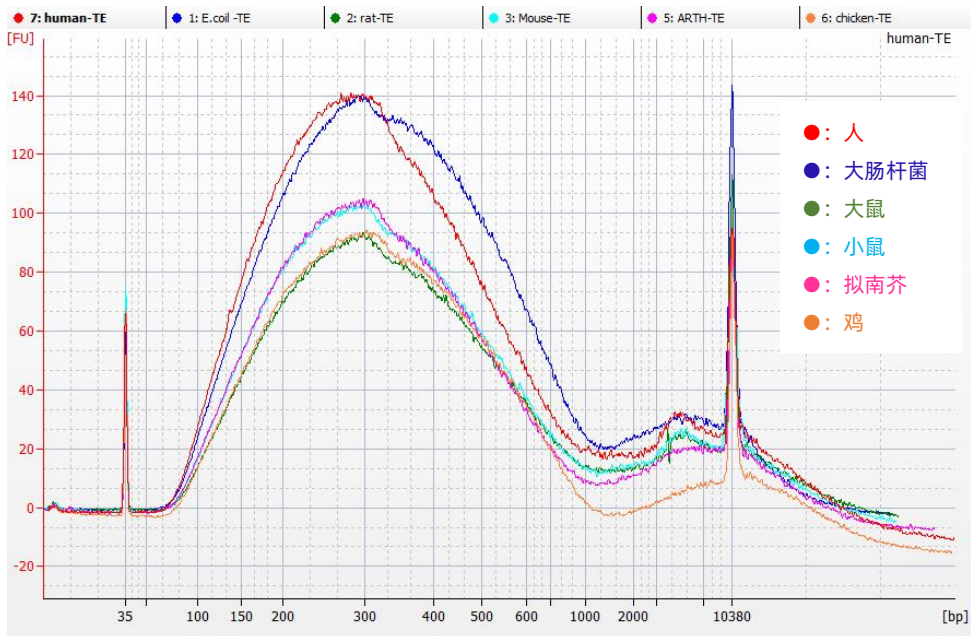


**图 1. DNA 样本不同片段化时间文库大小。**DNA 样本为 NA12878 人类基因组 DNA 标准品，投入量为 100 ng，32 $^{\circ}\text{C}$  片段化时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

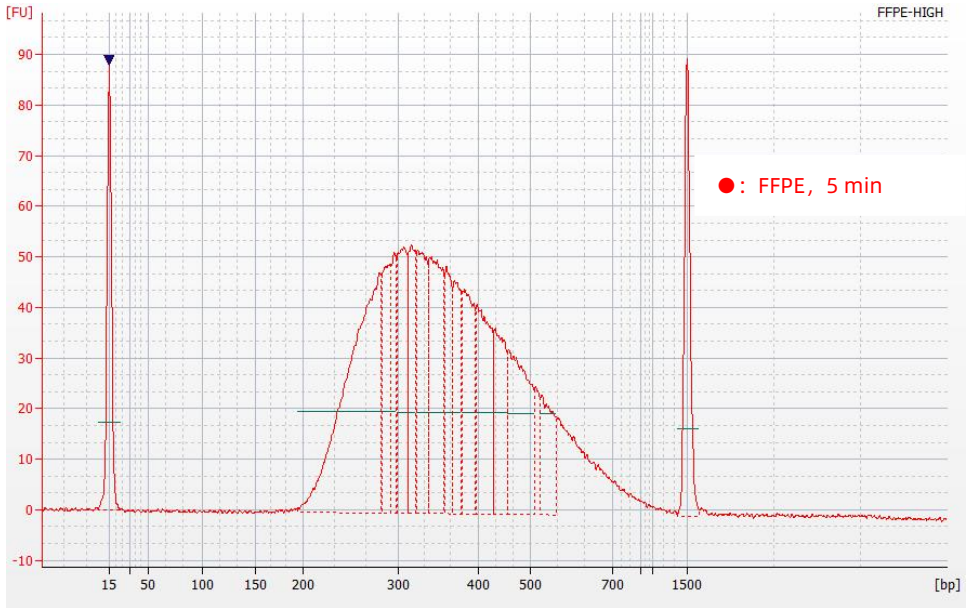




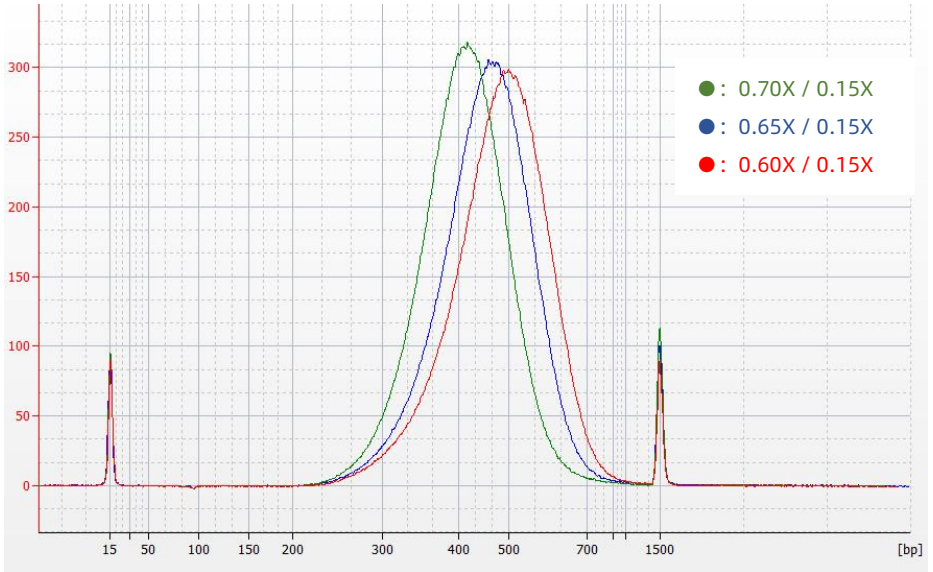
**图 2. DNA 样本溶于不同溶剂的文库大小。** DNA 样本为 NA12878 人类基因组 DNA 标准品，投入量为 100 ng。分别溶于 32  $\mu$ L 的 Tris-HCl-pH 7.5, Nuclease-Free Water, 1X TE Buffer, EB (Elution Buffer), Low-EDTA TE Buffer, 32 $^{\circ}$ C 片段化时间 15 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。



**图 3. 不同样本类型文库大小。** DNA 样本分别为人、大鼠、小鼠、鸡、拟南芥、大肠杆菌的 DNA，投入量为 100 ng，32°C 片段化时间为 10 min。片段化产物使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。



**图 4. FFPE 样本文库大小。** DNA 样本为 FFPE 样本，投入量为 100 ng，32°C 片段化时间为 5 min。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。



**图 5. 片段分选结果展示。** DNA 样本为 NA12878 人类基因组 DNA 标准品，投入量为 100 ng，32℃片段化时间为 10 min，连接纯化后，分别使用 0.6X/0.15X、0.65X/0.15X、0.7X/0.15X 的条件进行分选。所构建文库使用 Agilent DNA 1000 Chips 进行片段大小分析。

## 附录三. 极低投入量建库

3.1 对于 100 pg - 1 ng 投入量的建库实验, 请参考以下实验条件进行片段化和接头稀释:

表格 15. 极低投入量实验条件

样本投入量	片段化时间	接头稀释倍数
100pg	5 min	120-200
200pg	5 min	120-200
500pg	5 min	120
1000pg	5 min	60

3.2 文库扩增体系的配制请参考表格 16, 扩增循环数请参考表格 17。其他实验条件参考常规投入量建库。

表格 16. 文库扩增体系 (短接头-双端 UDI index)

组分	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
UDI Primer (MGI UDI Primer)	3 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	2 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

表格 17. 100 pg - 1 ng 投入量循环数建议

样本投入量	PCR 循环数*
100pg	19
200pg	18
500pg	17
1000pg	15

\*注：上述推荐循环数，为使用 NA12878 人类基因组标准品所得。FFPE 等降解严重样本，可以适当增加循环数 1-2 个。

## 9. 附表

表格 18. FS Pro DNA Lib Prep Kit V2 试剂盒兼容接头及 Index 类型汇总

Index 类型	产品名称	货号
UDI (8-base)	Unique Dual Index for Illumina MiniSet (8 indices)	RK21622
	Unique Dual Index for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21623
	Unique Dual Index for Illumina Set_A (48 indices)	RK21624
	Unique Dual Index for Illumina Set_B (48 indices)	RK21625
	Unique Dual Index for Illumina Set_C (48 indices)	RK21626
	Unique Dual Index for Illumina Set_D (48 indices)	RK21627
UDI (8-base)-UMI	Unique Dual Index (with UMI) for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21701
	Unique Dual Index (with UMI) for Illumina Set_A (48 indices)	RK21702
	Unique Dual Index (with UMI) for Illumina Set_B (48 indices)	RK21703
UDI (10-base)	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI MiniSet	RK21686
	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI MidiSet	RK21687
	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI Set A	RK21688
	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI Set B	RK21689
Single Index (10-base)	Full DNA Adapters Kit for MGI MiniSet	RK21676
	Full DNA Adapters Kit for MGI MidiSet	RK21677
	Full DNA Adapters Kit for MGI Set A	RK21678
	Full DNA Adapters Kit for MGI Set B	RK21679

## **中国**

[www.abclonal.com.cn](http://www.abclonal.com.cn)

中国总部：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期  
5 号楼

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院 2 号楼 4  
楼

美国研发中心：86 Cummings Park Dr ,Woburn,MA 01801, United States

电话： 400-999-6126

邮箱： [cn.market@abclonal.com](mailto:cn.market@abclonal.com)