

DNA Methylation Library Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

DNA Methylation Library Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

KE005-A (24 rxns) ; KE005-B (96 rxns)

【产品简述】

DNA Methylation Library Prep Kit for Illumina是一款为Illumina高通量测序平台设计的甲基化DNA文库制备试剂盒，通过单链连接技术将经甲基化转化的DNA转换为NGS测序文库。兼容短至40bp的DNA样本。操作简便，适合自动化建库，可在2小时内快速完成。本品经过严格的质量检测，从而确保文库制备的质量和效率。

【储存条件】

Dilution Buffer 于2-8°C保存，其余组分于-20°C保存。

【组成成分】

组分	KE005-A (24 rxns)	KE005-B (96 rxns)
Dilution Buffer	5 ml	20 ml
3' Ligation Buffer	240 μ l	960 μ l
3' Ligation Enzyme Mix	120 μ l	480 μ l
3' Adapter	120 μ l	480 μ l
Extension Primer	120 μ l	480 μ l
Extension Enzyme Mix	840 μ l	840 μ l \times 4
5' Ligation Mix	360 μ l	720 μ l \times 2
5' Adapter	120 μ l	480 μ l
2X HIFI PCR Mix V3	600 μ l	600 μ l \times 4

【应用范围】

本品用于将甲基化转化后的DNA模板制备成适合Illumina高通量测序平台的文库，兼容10 pg-250 μ g多种类型的样本：基因组DNA，FFPE DNA，ChIP DNA，cfDNA等。

【注意事项】

1. DNA样本为ChIP DNA和cfDNA等碎片化严重的DNA，则无需进行片段化处理；如DNA样本为完整性良好的基因组DNA，推荐进行片段化处理。
2. 实验方案中不包含长度分选。如有需要，可在文库长度分布(进行双轮磁珠分选)和文库

复杂度(不进行双轮磁珠分选)之间进行选择。

3. 3' Adapter 和5' Adapter为非完整接头，Index和P5/P7序列需在后续文库扩增步骤中通过引物扩增引入至文库分子中。

4. 各组分于室温解冻，充分混匀后置于冰上待用。

5. 配制各反应液时通过移液器吹打进行混匀，避免剧烈涡旋造成文库产量下降。

【标准建库流程】

1. DNA Denaturation

将Input DNA变性为单链DNA。

1. 预热PCR仪：热盖设为105°C，反应温度设置为95°C。

提前配制步骤2 3' Adapter Ligation的预混液，用移液器轻轻吹打混匀后置于冰上待用。

2. 在新的Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
Input DNA	X μ l
Dilution Buffer	To 20 μ l

3. 放入PCR仪中95°C加热2 min，然后迅速置于冰上静置2 min。立即进行下一步。

2. Adapter Ligation

将Input DNA变性为单链DNA。

1. 室温解冻3' Ligation Buffer、3' Ligation Enzyme Mix和3' Adapter，上下颠倒混匀后备用。

2. 在Nuclease-free PCR管中配制如下3' Adapter Ligation预混液：

试剂	体积
3' Ligation Buffer	10 μ l
3' Ligation Enzyme Mix	5 μ l
3' Adapter	5 μ l
Total	20 μ l

此预混液需在DNA Denaturation前完成配制，使变性后的DNA可立即进行3' Adapter Ligation。

3. 将20 μ l 3' Adapter Ligation预混液与20 μ l已变性的DNA用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4. 将PCR管置于PCR仪中，进行反应：

温度	时间
热盖105°C	ON
37°C	15 min
95°C	2 min
4°C	∞

3. Extension

将3'末端连接了截短型接头的单链DNA通过延伸引物延伸为完整双链。

1. 室温解冻Extension Primer和Extension Enzyme Mix，上下颠倒混匀后备用。

2. 在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	40 μ l
<i>Extension Primer</i>	5 μ l
<i>Extension Enzyme Mix</i>	35 μ l
<i>Total</i>	80 μ l

3. 使用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4. 将PCR管置于PCR仪中，进行反应：

温度	时间
热盖105°C	ON
98°C	1 min
62°C	2 min
65°C	5 min
4°C	∞

5. 使用GDSPure DNA Selection Magbeads (GDSBio, #NC1011) 纯化反应产物。

如需保留短片模板时，则纯化方式参考附录三：短片模板纯化方案。

5.1 磁珠平衡至室温后，颠倒或涡旋振荡混匀GDSPure DNA Selection Magbeads；吸取96 μ l的GDSPure DNA Selection Magbeads至80 μ l的*Extension*产物中，轻微涡旋振荡或用移液器轻轻吹打10次以充分混匀；

5.2 室温孵育5 min；

5.3 将PCR管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清；

5.3 将PCR管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清；

5.4 保持PCR管始终置于磁力架上，缓慢加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇(已平衡至室温)漂洗磁珠，室温静置孵育30 sec，小心移除上清；

5.5 重复步骤5.4，总计漂洗两次；

5.6 保持PCR管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠3 - 5 min至无乙醇残留；

注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

5.7 将PCR管从磁力架上取出并进行洗脱步骤：

若Input DNA \geq 1 ng，加入22.5 μ l *Dilution Buffer*(已平衡至室温)至PCR管中，涡旋振荡或用移液器轻轻吹打以充分混匀。室温孵育5 min，将PCR管短暂离心后置于磁力架上静置。待溶液澄清后(约5 min)，小心移取20 μ l上清至新的*Nuclease-free PCR*管中，切勿触碰磁珠；若Input DNA < 1 ng，加入52.5 μ l *Dilution Buffer*(已平衡至室温)至PCR管中，涡旋振荡或用移液器轻轻吹打以充分混匀。室温孵育5 min，将PCR管短暂离心后置于磁力架上静置。待溶液澄清后(约5 min)，小心移取50 μ l上清至新*Nuclease-free PCR*管中。用1.2 \times GDSPure DNA Selection Magbeads(60 μ l)对上清再次进行纯化(重复步骤b - g)。最后加入22.5 μ l *Dilution Buffer*(已平衡至室温)洗脱，小心移取20 μ l上清至新的*Nuclease-free PCR*管中以进行后续步骤。

此处样品可在-20°C暂存24 h。

4. 5' Adapter Ligation

1. 室温解冻5' *Ligation Mix*和5' *Adapter*，上下颠倒混匀后备用。

2. 在*Nuclease-free PCR*管中配制如下3' *Adapter Ligation*预混液：

试剂	体积
上一步的纯化产物	20 μ l
5' <i>Ligation Mix</i>	15 μ l
5' <i>Adapter</i>	5 μ l
<i>Total</i>	40 μ l

请勿将5' *Ligation Mix*和5' *Adapter*预先配成混合液，以免出现接头自连。

3. 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4. 将PCR管置于PCR仪中，进行反应：

温度	时间
热盖105°C	ON
25°C	15 min
4°C	∞

5. 使用GDSPure DNA Selection Magbeads (GDSBio, #NC1011) 纯化反应产物。

如需保留短片模板时，则纯化方式参考附录三：短片模板纯化方案。

5.1 磁珠平衡至室温后，颠倒或涡旋振荡混匀GDSPure DNA Selection Magbeads；吸取40 μ l的GDSPure DNA Selection Magbeads至40 μ l的*Extension*产物中，轻微涡旋振荡或用移液器轻轻吹打10次以充分混匀；

5.2 室温孵育5 min；

5.3 将PCR管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清；

5.4 保持PCR管始终置于磁力架上，缓慢加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇(已平衡至室温)漂洗磁珠，室温静置孵育30 sec，小心移除上清；

5.5 重复步骤5.4，总计漂洗两次；

5.6 保持PCR管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠3 - 5 min至无乙醇残留；

注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

5.7 将PCR管从磁力架上取出并进行洗脱步骤：加入22.5 μ l *Dilution Buffer*(已平衡至室温)至PCR管中，涡旋振荡或用移液器轻轻吹打以充分混匀。室温孵育5 min，将PCR管短暂离心后置于磁力架上静置。待溶液澄清后(约5 min)，小心移取20 μ l上清至新的*Nuclease-free PCR*管中，切勿触碰磁珠。

此处样品可在-20°C暂存24 h。

5. Library Amplification

通过引物扩增得到完整文库。

1. 将2X *HIFI PCR Mix V3*解冻后颠倒混匀，于灭菌*Nuclease-free PCR*管中配制如下反应：

试剂	体积
上一步的纯化产物	20 μ l
2X <i>HIFI PCR Mix 3</i>	25 μ l

<i>Index Primers</i>	5 μ l
<i>Total</i>	50 μ l

2. 用移液枪小心吹打混匀，短暂离心将所有液体移至管底。
3. 在PCR仪中进行如下反应：

温度	时间	循环数
热盖105°C	ON	-
95°C	3 min	-
98°C	20 sec	2-23
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	-
4°C	∞	-

4. 使用GDSPure DNA Selection Magbeads对反应产物进行纯化：
 - 4.1. 取50 μ l扩增产物加入合适的PCR管中。
 - 4.2. 涡旋磁珠使磁珠混匀，加入42.5 μ l (0.85X)磁珠悬液，用移液器轻轻吹打10次混匀，室温静置5min。
 - 4.3. 将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，用移液器吸去上清，弃上清。
 - 4.4. 保持PCR管在磁力架上，加入 200 μ l 80%新鲜配制的乙醇溶液，请勿吹打磁珠。室温静置30s，用移液器吸去上清，弃上清。
 - 4.5. 重复步骤 4.4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。
 - 4.6. 保持PCR管在磁力架上，自然风干至磁珠表面无明显光泽。
注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。
 - 4.7. 将PCR管从磁力架上取下，进行洗脱：向管中加入22.5 μ l Dilution Buffer(已平衡至室温)，用移液器轻轻反复吹打，使磁珠和溶液充分混合均匀，室温静置 3-5min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，将20 μ l上清液转移到新的PCR管中。

6. 文库质控/Library Quality Control

1. 文库长度分布检测：可通过LabChip GX、GXII、GX Touch(PerkinElmer)；Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)；Fragment Analyzer (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备进行检测。
2. 文库浓度检测：推荐使用基于qPCR的方法进行绝对定量。此外，文库浓度还可以使用基于特异性识别双链DNA的荧光染料法进行测定，如Qubit法。

附录一：双轮磁珠纯化

如使用基于Patterned Flow Cell的测序仪，建议进行双轮磁珠纯化，以尽量去除扩增引物残留，降低Index hopping对数据正确拆分的影响。

Library Amplification产物双轮磁珠纯化中两轮磁珠的使用量参见下表：

纯化阶段	样品体积	磁珠体积
第一轮	50 μ l	42.5 μ l (0.85X)
第二轮	50 μ l	42.5 μ l (0.85X)

双轮磁珠纯化方案：

1. 磁珠平衡至室温后，颠倒或涡旋振荡混匀GDSPure DNA Selection Magbeads；
2. 吸取42.5 μ l (0.85 \times)的GDSPure DNA Selection Magbeads至50 μ l的Library Amplification产物中，轻微涡旋振荡或用移液器轻轻吹打10次以充分混匀；
3. 室温孵育5 min；
4. 将PCR管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清；
5. 保持PCR管始终置于磁力架上，缓慢加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇(已平衡至室温)漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清；
6. 重复步骤5，总计漂洗两次；
7. 保持PCR管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠3 - 5 min至无乙醇残留；
注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。
8. 将PCR管从磁力架中取出并进行洗脱：加入52.5 μ l Dilution Buffer(已平衡至室温)至PCR管中，涡旋振荡或用移液器轻轻吹打以充分混匀。室温孵育5 min，将PCR管短暂离心后置于磁力架上静置。待溶液澄清后(约5 min)，小心移取50 μ l上清至新的Nuclease-free PCR管中，切勿触碰磁珠；
9. 吸取42.5 μ l (0.85 \times)的GDSPure DNA Selection Magbeads至上一步纯化产物中，轻微涡旋振荡或用移液器轻轻吹打10次以充分混匀，室温孵育5 min；
10. 将PCR管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清；
11. 保持PCR管始终置于磁力架上，缓慢加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇(已平衡至室温)漂洗磁珠，室温静置孵育30 sec，小心移除上清；
12. 重复步骤11，总计漂洗两次；
13. 保持PCR管始终置于磁力架上，开盖空气干燥磁珠3 - 5 min至无乙醇残留；
注意：该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率，磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。
14. 将PCR管从磁力架中取出，进行洗脱：加入22.5 μ l Dilution Buffer(已平衡至室温)至PCR管中，涡旋振荡或用移液器轻轻吹打以充分混匀。室温孵育5 min，将PCR管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清后(约5 min)，小心移取20 μ l上清至新的Nuclease-free PCR管中，切勿触碰磁珠。

附录二：测序注意事项和下机数据预处理

由于3' Adapter Ligation步骤添加了额外的复杂度较低的Tail结构，且甲基化文库会碱基不

平衡，因此建议在测序时加入不少于25%的*PhiX*文库或和其他复杂度较高的文库同时*Pooling*上机。

对于3' *Adapter Ligation*步骤添加的额外*Tail*结构，建议在序列比对前进行*reads trim*：当插入片段大于*read*读长时，仅需对*Read 2*的起始(5'端)前10个碱基进行*Trim*；当插入片段小于*read*读长时，需要对*Read 2*的起始(5'端)前10个碱基和*Read 1*的末端(3'端)10个碱基进行*Trim*。

附录三：短片段模板纯化方案

如需保留短片段模板，需要对标准步骤中磁珠用量进行修改，在不同步骤纯化时，磁珠用量参照下表：

步骤	样品体积	磁珠体积	洗脱体积
<i>Extension</i> 后纯化	80 μ l	144 μ l (1.8X)	22.5 μ l
5' <i>Adapter Ligation</i> 后纯化	50 μ l	64 μ l (1.6X)	22.5 μ l
<i>Library Amplification</i> 后纯化	50 μ l	80 μ l (1.6X)	22.5 μ l

图1 *KE005*建库流程图

