

ND601-01/02

VAHTS™ Nano DNA Library Prep Kit  
for Illumina®



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

网站/Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

技术支持/Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

技术服务/Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Vazyme biotech co., ltd.

**使用说明书**

Version 5.2

- 产品概述
- 产品组分
- 贮藏条件
- 必需材料
- 适用范围
- 建库流程
- 使用方法
- 注意事项
- 质量控制

## 产品概述

VAHTS™ Nano DNA Library Prep Kit for Illumina®是针对Illumina高通量测序平台文库构建定向优化而成的试剂盒。使用本试剂盒可以将微量片段化DNA样品制备成Illumina高通量测序平台专用文库。和同类产品相比，VAHTS™ Nano DNA Library Prep Kit for Illumina®具有更高的文库转化比例、更稳定的文库构建流程以及更低的偏好性。试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

## 产品组分

组分	ND601-01 (24 rxn)	ND601-02 (96 rxn)	
End Prep Mix	960 µl	4 × 960 µl	■
dA-Tailing Mix	300 µl	2 × 600 µl	■
Ligation Mix	60 µl	240 µl	■
Stop Ligation Mix	120 µl	480 µl	■
PCR Primer Mix	120 µl	480 µl	■
Amplification Mix2	600 µl	4 × 600 µl	■

## 贮藏条件

所有组分子-20°C保存，有效期一年。

## 必需材料

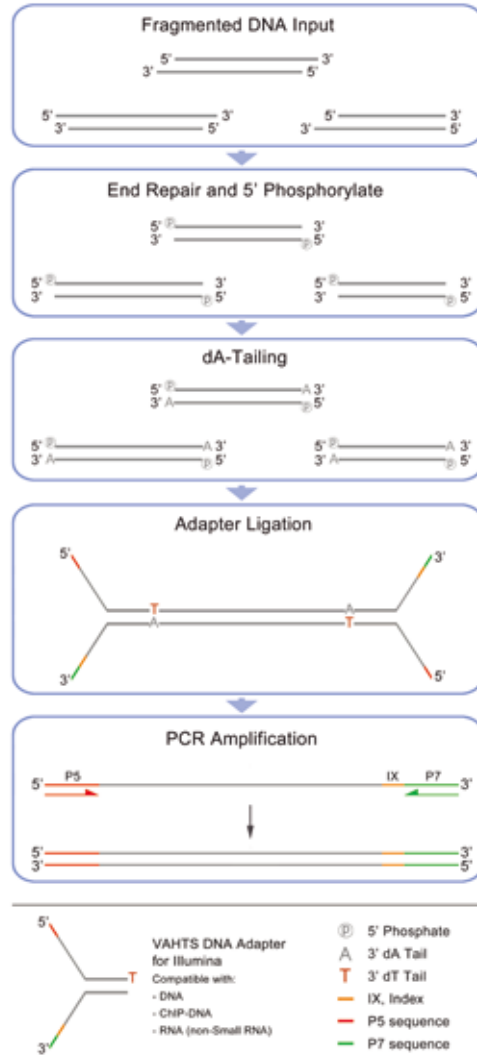
100%乙醇、灭菌超纯水  
 低吸附EP管、PCR管、磁力架、PCR仪  
 VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)或其他等效性DNA纯化产品  
 VAHTS™ DNA Adapters for Illumina® (Vazyme #N801或#N802)

## 适用范围

使用VAHTS™ Nano DNA Library Prep Kit for Illumina®可以制备以下种类文库：

文库插入长度(Insert Size)	350 bp	550 bp
初始DNA量(Input DNA)	100 ng	200 ng
推荐测序模式(Read Length)	≤ 2 × 101 bp	≤ 2 × 151 bp

## 建库流程



使用已片段化DNA做为初始模板:

1. 进行末端修复和5'磷酸化;
2. 修复产物进行dA-Tailing;
3. dA-Tailing产物末端连接接头;
4. 连接产物扩增富集。

## 使用方法

## 起始材料要求:

纯化过的片段化DNA或PCR产物, 溶于灭菌蒸馏水中。如制备插入长度为350 bp的文库, 需要初始DNA总量为100 ng (<60 μl); 如制备插入长度为550 bp的文库, 需要初始DNA总量为200 ng (<60 μl)。

## DNA浓度测定:

准确的DNA浓度测定对实验成功与否至关重要。我们推荐您使用Qubit®或荧光染料PicoGreen®进行DNA浓度测定, 请勿使用以吸光度法为基础的任何测定方法。

## DNA纯度要求:

260 nm吸光度/280 nm吸光度 = 1.8~2.0

## 步骤一: 末端修复

这一步骤将片段化DNA末端补平, 并在5'端进行磷酸化。

1. 将End Prep Mix解冻后颠倒混匀, 于灭菌PCR管中配制如下反应:

纯化后的片段化DNA或PCR产物	x	μl
End Prep Mix	40	μl
ddH <sub>2</sub> O	To 100	μl

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿震荡混匀), 并短暂离心将反应液收集至管底。

3. 将反应管置于PCR仪中, 进行下述反应:

热盖On, 105°C  
30 °C, 30 min  
Hold at 4 °C

4. 使用VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)对反应产物进行纯化和长度分选:

## 根据目标插入长度稀释磁珠:

文库插入长度	350 bp	550 bp
VAHTS DNA Clean Beads:	109.25 μl × 样品个数	92 μl × 样品个数
ddH <sub>2</sub> O:	74.75 μl × 样品个数	92 μl × 样品个数

**按照下述方案进行双轮磁珠分选：**

- 1) 将100  $\mu\text{l}$  末端修复产物转移至新EP管中备用；涡旋震荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
- 2) 吸取160  $\mu\text{l}$  稀释后的磁珠至100  $\mu\text{l}$ 末端修复产物中，使用移液器吹打10次充分混匀。
- 3) 室温孵育5分钟。
- 4) 将EP管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，转移250  $\mu\text{l}$ 上清至新EP管中。
- 5) 吸取30  $\mu\text{l}$  未稀释的VAHTS DNA Clean Beads至上清中，使用移液器吹打10次充分混匀。
- 6) 室温孵育5分钟。
- 7) 将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，移除上清。
- 8) 保持EP管处于磁力架中，加入200  $\mu\text{l}$  新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒，移除上清。
- 9) 重复步骤8，总计漂洗两次。
- 10) 保持EP管处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠10分钟。
- 11) 将EP管从磁力架中取出，加入20  $\mu\text{l}$  灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置2分钟。将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，小心吸取17.5  $\mu\text{l}$  上清至新PCR管中，切勿触碰磁珠。

注意：1. 转移上清时请勿吸取VAHTS DNA Clean Beads，即使微量残留都将影响后续文库构建步骤。  
2. 末端修复产物也可使用其他等效性产品进行纯化和分选，如AMPure XP Beads。

**步骤二：末端dA-Tailing**

这一步骤将在末端修复产物3'端进行dA-Tailing，用于后续接头连接。

1. 将dA-Tailing Mix解冻后颠倒混匀，于灭菌PCR管中配制如下反应：

纯化后的末端修复产物	17.5 $\mu\text{l}$	■
dA-Tailing Mix	12.5 $\mu\text{l}$	■
总计	30.0 $\mu\text{l}$	

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿震荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。
3. 将反应管置于PCR仪中，进行下述反应：

热盖On, 105°C  
37 °C, 30 min  
70 °C, 5 min  
4 °C, 5 min  
Hold at 4 °C

4. 立即进行步骤三。

**步骤三：接头连接**

这一步骤将在dA-Tailing产物末端连接接头。

1. 将Stop Ligation Mix解冻后颠倒混匀，置于4°C备用。于灭菌PCR管中配制如下反应：

dA-Tailing产物	30.0 $\mu\text{l}$	
Ligation Mix	2.5 $\mu\text{l}$	■
DNA Adapter X*	2.5 $\mu\text{l}$	
总计	35.0 $\mu\text{l}$	

\*VAHTS™ DNA Adapters set1 for Illumina® (Vazyme #N801)中提供DNA Adapter 1 - 12，共计12种；  
VAHTS™ DNA Adapters set2 for Illumina® (Vazyme #N802)中提供DNA Adapter 13 - 27，共计12种。

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿震荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。
3. 将反应管置于PCR仪中，进行下述反应：

热盖On, 105°C  
30 °C, 10 min  
Hold at 4 °C

4. 向反应管中加入5  $\mu\text{l}$  Stop Ligation Mix，使用移液器轻轻吹打充分混匀。
5. 使用VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)对反应产物进行纯化：
  - 1) 涡旋震荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
  - 2) 吸取40  $\mu\text{l}$  VAHTS DNA Clean Beads至40  $\mu\text{l}$  接头连接产物中，使用移液器吹打10次充分混匀。
  - 3) 室温孵育5分钟。
  - 4) 将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，移除上清。
  - 5) 保持EP管处于磁力架中，加入200  $\mu\text{l}$ 新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒，移除上清。
  - 6) 重复步骤5，总计漂洗两次。
  - 7) 保持EP管处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠10分钟。
  - 8) 将EP管从磁力架中取出，加入52.5  $\mu\text{l}$ 灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置2分钟。将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，小心吸取50  $\mu\text{l}$ 上清至新EP管中。
  - 9) 涡旋震荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
  - 10) 吸取50  $\mu\text{l}$  VAHTS DNA Clean Beads至步骤8产物中，使用移液器吹打10次充分混匀。
  - 11) 室温孵育5分钟。
  - 12) 将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，移除上清。
  - 13) 保持EP管处于磁力架中，加入200  $\mu\text{l}$ 新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒，移除上清。
  - 14) 重复步骤5，总计漂洗两次。
  - 15) 保持EP管处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠10分钟。
  - 16) 将EP管从磁力架中取出，加入22.5  $\mu\text{l}$ 灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置2分钟。将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟)，小心吸取20  $\mu\text{l}$ 上清至新PCR管中，切勿触碰VAHTS DNA Clean Beads。

注意：1. 转移上清时请勿吸取VAHTS DNA Clean Beads，以免影响后续文库扩增。  
2. 接头连接产物也可使用其他等效性产品进行纯化，如AMPure XP Beads。

**步骤四：文库扩增**

这一步骤将接头连接产物扩增富集。

1. 将PCR Primer Mix, Amplification Mix2解冻后颠倒混匀, 于灭菌PCR管中配制如下反应:

纯化过的接头连接产物	20 $\mu$ l	
PCR Primer Mix	5 $\mu$ l	■
Amplification Mix2	25 $\mu$ l	■
总计	50 $\mu$ l	

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿震荡混匀), 并短暂离心将反应液收集至管底。

3. 将反应管置于PCR仪中, 进行下述反应:

热盖On, 105°C
95 °C, 3 min
98 °C, 20 sec
8 cycles 60 °C, 15 sec
72 °C, 30 sec
72 °C, 5 min
Hold at 4 °C

4. 使用VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)对反应产物进行纯化:

- 1) 涡旋震荡混匀VAHTS DNA Clean Beads。
- 2) 吸取50  $\mu$ l VAHTS DNA Clean Beads至50  $\mu$ l PCR产物中, 使用移液器吹打10次混匀。
- 3) 室温孵育5分钟。
- 4) 将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟), 移除上清。
- 5) 保持EP管处于磁力架中, 加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒, 移除上清。
- 6) 重复步骤5, 总计漂洗两次。
- 7) 保持EP管处于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠10分钟。
- 8) 将EP管从磁力架中取出, 加入32.5  $\mu$ l灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 于室温放置2分钟。将反应管短暂离心并置于磁力架中静置。待溶液澄清(约5分钟), 小心吸取30  $\mu$ l上清至新EP管中, -20°C保存。

注意: 1. 转移上清时请勿吸取VAHTS DNA Clean Beads, 以免影响后续文库检测和测序。

2. PCR产物也可使用其他等效性产品进行纯化, 如AMPure XP Beads。

**步骤五：文库质量控制****文库浓度测定:**

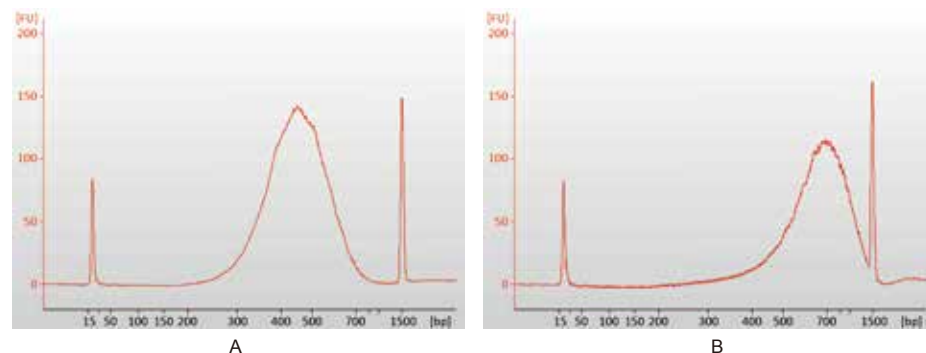
为了得到均匀的长簇效果和高质量的测序数据, 必须对构建好的文库进行准确的浓度测定。我们推荐您使用荧光染料(Qubit®或荧光染料PicoGreen®)或qPCR进行文库浓度测定。

**文库分布检测:**

使用Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer进行文库分布检测。

如果使用High Sensitivity DNA chip: 将构建好的文库稀释100倍, 取1  $\mu$ l进行检测。

如果使用DNA 1000 chip: 将构建好的文库直接取1  $\mu$ l进行检测。



使用VAHTS™ Nano DNA Library Prep Kit for Illumina®制备的插入长度350 bp文库(A, 文库总长度约470 bp)和550 bp文库(B, 文库总长度约670 bp)进行2100 Bioanalyzer检测, 使用芯片为DNA 1000 chip。

## 注意事项

### 文库制备试剂分装冻存:

为了避免反复冻融或长期使用后活性下降,我们推荐您在首次使用后将剩余试剂进行小份分装冻存。

### 磁珠操作注意事项:

应将磁珠孵育至室温后再使用

每次吸取磁珠前都应将其充分混匀

DNA样品加入磁珠后应将其充分混匀

所有磁珠操作都应于室温进行

移取上清操作应在磁珠被彻底吸附后小心进行,切勿吸取到磁珠

80%乙醇应现用现配,用完丢弃

80%乙醇漂洗磁珠后应尽量吸干

磁珠在洗脱之前应充分干燥,避免乙醇残留影响后续实验

### 避免样品交叉污染:

吸取不同样品时更换枪头

使用带滤芯的枪头

### 防止PCR产物污染:

PCR产物因操作不当容易产生污染,进而导致实验结果不准确、可信度不高等问题。因此,我们推荐您将PCR反应体系配制区和PCR产物纯化区进行强制性的物理隔离、使用专用的移液器等设备、并定时对各实验区域进行清洁(使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理)以保证实验结果的可信度。

## 质量控制

### End Prep Mix

SDS-PAGE纯度:所有酶组分纯度>95%。

核酸内切酶残留:100 µl反应体系中加入40 µl本品和1 µg φX174 RF I DNA, 37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,RF II转化比率<10%。

磷酸酶活性检测:在磷酸酶活性检测缓冲液中加入40 µl本品和2.5 mM对硝基苯磷酸,37°C下孵育4小时。经光谱测定法检测,405 nm处无对硝基苯阴离子特征吸收峰。

功能性活性检测:在末端修复反应体系中加入500 ng含5'和3'突出末端的片段化DNA,30°C下反应30分钟。经毛细管电泳检测,末端修复并磷酸化的DNA比率>95%。

### dA-Tailing Mix

SDS-PAGE纯度:所有酶组分纯度>95%。

核酸内切酶残留:30 µl反应体系中加入12.5 µl本品和1 µg φX174 RF I DNA, 37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,RF II转化比率<10%。

磷酸酶活性检测:在磷酸酶活性检测缓冲液中加入12.5 µl本品和2.5 mM对硝基苯磷酸,37°C下孵育4小时。经光谱测定法检测,405 nm处无对硝基苯阴离子特征吸收峰。

功能性活性检测:在加尾反应体系中加入500 ng平末端片段化DNA,37°C下反应30分钟。经接头连接检测,末端加dA尾的DNA比率>80%。

### Ligation Mix

SDS-PAGE纯度:所有酶组分纯度>95%。

16小时孵育检测:50 µl反应体系中包含10 µl本品和1 µg HindIII-λDNA, 37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带无降解;50 µl反应体系中包含10 µl本品和1 µg T3 DNA, 37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带无降解。

核酸内切酶残留:50 µl反应体系中加入10 µl本品和1 µg φX174 RF I DNA, 37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,RF II转化比率<10%。

RNase活性残留:50 µl反应体系中加入10 µl本品和40 ng FAM-RNA, 37°C下孵育16小时。经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,条带无降解。

连接效率检测:35 µl连接反应体系中加入2.5 µl本品、双端包含dA突出的300 bp DNA片段1.5 pmol和30 bp末端包含dT突出的双链接头DNA片段15 pmol, 30°C下反应10分钟。经琼脂糖凝胶电泳检测,双端连接接头DNA的比率>90%。

### Stop Ligation Mix

16小时孵育检测:35 µl反应体系中包含5 µl本品和1 µg HindIII-λDNA, 37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带无降解;35 µl反应体系中包含5 µl本品和1 µg T3 DNA, 37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带无降解。

核酸内切酶残留:35 µl反应体系中加入5 µl本品和1 µg φX174 RF I DNA, 37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,RF II转化比率<10%。

### PCR Primer Mix

16小时孵育检测:50 µl反应体系中包含5 µl本品和1 µg HindIII-λDNA, 37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带无降解;50 µl反应体系中包含5 µl本品和1 µg T3 DNA, 37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带无降解。

核酸内切酶残留:50 µl反应体系中加入5 µl本品和1 µg φX174 RF I DNA, 37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,RF II转化比率<10%。

引物完整性检测:经变性PAGE电泳检测,条带单一。

引物浓度检测:测定A260 mM吸光值,测定值与计算值差异<10%。

### Amplification Mix2

SDS-PAGE纯度:所有酶组分纯度>95%。

核酸内切酶残留:50 µl反应体系中加入25 µl本品和1 µg φX174 RF I DNA, 37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测,RF II转化比率<10%。

扩增性能检测:50 µl反应体系中加入25 µl本品,10 ng人基因组DNA以及0.5 µM扩增引物扩增1 kb片段。30个循环后经琼脂糖凝胶电泳检测,有特异性1 kb扩增产物可见。