



Genoscan™

www.genoscan.cn

Genoscan Genetech Co., Ltd

Order: 400-876-1157

版本号: GS181020

Geno Methyl-Seq DNA Library Prep Kit (illumina)

Geno 甲基化测序 DNA 文库构建试剂盒 (illumina 平台)

产品内容

产品组成	GS201-01 (20 rxn)	GS201-02 (50 rxn)
ER/dA Buffer	220 μ L	550 μ L
ER/dA Enzyme	88 μ L	220 μ L
Ligation Buffer	616 μ L	1540 μ L
DNA Ligase	44 μ L	110 μ L
2 \times HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix	550 μ L	1375 μ L
λ DNA (Unmethylated)	330 ng	1000 ng
*Zymo Bisulfite Treatment Kit	20 rxn	50 rxn

储存条件

*Zymo Kit置于室温保存，其他试剂置于-15 ~ -25°C保存，保质期为一年。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床治疗、医药、食品及化妆品等用途。

产品简介

Geno Methyl-Seq DNA Library Prep Kit (illumina) 是专门针对于 illumina 高通量测序平台优化的甲基化测序 DNA 文库构建试剂盒。本产品可对经超声处理、化学处理、酶处理的片段化双链 DNA 或小片段 DNA 进行一管内一步法完成末端修复和 3'端 dA 尾添加, 所得产物无需纯化, 可直接进行接头的连接; 同时配备经优化和验证亚硫酸氢盐处理试剂盒及相应文库扩增预混液, 保证所得文库产量高, 保真度好、碱基偏好性小。本试剂盒采用一步法的反应流程, 省去多步纯化步骤, 整个文库构建流程仅需 ~ 4 小时, 高效的文库转化率可对微量 DNA 样本进行甲基化测序文库构建, 包括 gDNA, cfDNA, FFPE 样品 DNA 等。

适用范围: Illumina 高通量测序平台 DNA 甲基化测序文库构建。

适用样本量: 1 ng ~ 1 µg DNA。

推荐使用试剂

1. Geno Methyl-Seq Multiplex Oligos Set1 for Illumina (GS011-01/02/03) 或其他等效产品。
2. Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠等效产品。

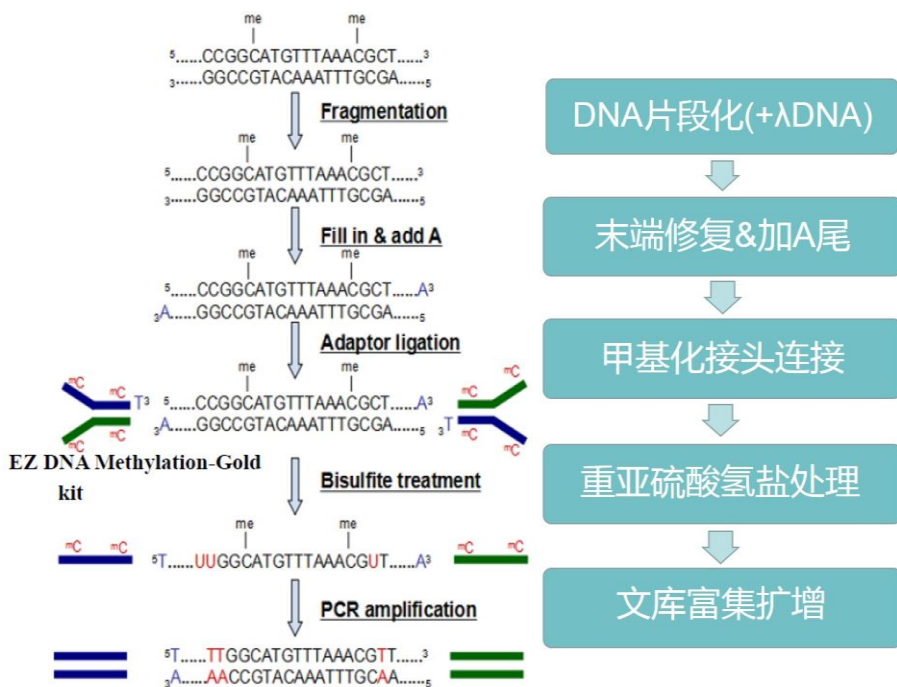
产品特点

1. 操作流程便捷, 一步完成 dsDNA 片段的末端修复和 A 添加反应, 无需纯化直接进行接头连接反应。
2. 文库模板转化效率高, DNA 样本起始量可低至 1 ng。
3. 经测试验证的高效、快速的亚硫酸氢盐处理试剂盒, 保证 DNA 转化率高, 损失少。
4. 经定向优化的尿嘧啶兼容高保真文库扩增预混液, 保证文库扩增效率高、碱基偏好小。

注意事项

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
3. 实验开始前, 请清洁操作台, 并使用 RNA 酶及 DNA 酶清除试剂, 如 RNase Away (Molecular BioProducts, Inc) 处理台面。确保没有 RNA 酶和 DNA 酶的污染。
4. 进行文库扩增前, 请确保 PCR 仪已经调试好并处于稳定的状态。
5. 实验前请仔细阅读说明书, 如果需要暂停实验, 可根据说明书推荐将实验产物保存于 -20°C 并安排后续实验。

实验流程



实验步骤

一、DNA片段化

- 1-1. 小片段测序文库构建一般需要对于基因组 DNA 进行片段化处理，推荐目的 DNA 片段大小为 200~500bp，具体可根据测序平台读长作为选择依据。常用片段化方式有超声处理、化学处理和酶处理，推荐使用超声处理进行片段化。
- 1-2. 甲基化测序文库构建需要在片段化前加入无甲基化 DNA 做为对照来验证重亚硫酸氢盐处理对非甲基化胞嘧啶的转化效率，这里推荐使用无甲基化 λDNA，加入比例为 0.5% (w/w)，重亚硫酸氢盐处理转化率要求为 > 95%。

二、末端修复&A尾添加

2-1. 在开始实验前，需要明确核酸的浓度以及 DNA 溶解于哪种溶剂中，建议将片段化的 DNA 溶于 Nuclease-Free H₂O，如果 DNA 溶解于其他溶液中时请确定溶液中的盐离子，尤其 EDTA 的浓度。EDTA 对反应影响较大，如果不确定溶液中 EDTA 浓度或 EDTA 浓度较高，请使用 AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠对 DNA 进行纯化。推荐磁珠纯化加入体积比例为 1.8×，纯化后 DNA 溶于 40 μL Nuclease-Free H₂O 或 10 mM Tris-HCl (pH8.0)，使用 Qubit (Geno dsDNA HS Assay Kit for Qubit, GS911-01/02) 和 Agilent Bioanalyzer 测定纯化后的 DNA 浓度及片段大小。

2-2. 将各试剂置于冰上融化，ER/dA Enzyme 融化后用手指后轻弹混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀，瞬时离心收集管壁和管盖液体。确定 DNA 溶解于 Nuclease-Free H₂O、10 mM Tris-HCl (PH 8.0~8.5)、Buffer EB 或 0.1× TE 等低浓度 EDTA 溶液中，请使用如下步骤进行末端修复&A 尾添加反应。照下表设置 PCR 仪反应程序，开启热盖，顶盖温度设置为 70°C。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	37°C	30 min
2	65°C	30 min
3	4°C	保持温度

2-3. 在 200 μL PCR 管中按下表配制反应体系，冰上操作加入各组分后请轻柔吸打 10~15 次混匀，注意不要涡旋，瞬时离心反应管，立刻置于 PCR 仪中并启动反应程序。当反应程序结束后，将反应管从 PCR 仪中取出并置于冰上，立即进行接头连接。

组分名称	体积 (μL)
ER/dA Buffer	10
ER/dA Enzyme	4

DNA sample	X
Nuclease-Free H ₂ O	40-X
Total	54

三、甲基化接头连接

3-1. 片段化、末端修复&A 尾添加反应结束以后，向步骤 2-3 反应产物中加入 5 μ L 的甲基化 Adapter 溶液 (Geno Methyl-Seq Multiplex Oligos Set1 for Illumina, GS011-01/02/03, 参见下表根据输入 DNA 样品总量确定 Adapter 使用浓度)，轻柔吸打混匀后置于冰上。**注：为了达到较高的连接效率，我们推荐反应体系中 Input DNA 与 Adapter 的摩尔比在 1:50 至 1:300 之间，下表 Input DNA : Adapter 摩尔比是基于 Input DNA 片段为 200bp 估算所得，不同大小 Input DNA 片段可按公式估算：Input DNA 摩尔数(pmol) \approx Input DNA 质量(ng)/ [0.66 \times Input DNA 平均长度(bp)]。**

Input DNA (ng)	Input DNA : Adapter 摩尔比	Adapter 使用浓度	Adapter 母液 稀释倍数
1000	1:17	25 μ M	不稀释
500	1:33	25 μ M	不稀释
250	1:67	25 μ M	不稀释
100	1:167	25 μ M	不稀释
50	1:330	25 μ M	不稀释
25	1:330	12.5 μ M	1:2
10	1:330	5 μ M	1:5
5	1:330	2.5 μ M	1:10
2.5	1:330	1.25 μ M	1:20
1	1:330	0.5 μ M	1:50

3-2. 按照下表各组分用量配制反应体系，将配制完成的反应体系轻轻吸打混匀后置于冰上。

组分名称	体积 (μL)
Ligation Buffer	28
DNA Ligase	2
Nuclease-Free H ₂ O	11
Total	41

3-3. 将步骤 3-2 配制好的 41 μL 连接反应体系加入步骤 3-1 准备的反应液中，轻轻吸打 >15 次充分混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中进行连接反应。PCR 仪反应程序参照下表设置，关闭顶盖加热并预先降温到 20°C 以下。* 注：如需提高连接效率，可将连接反应时间延长到 25 min.

反应步骤	反应温度	反应时间
1	20°C	15 min *
2	4°C	保持温度

3-4. **(无需进行片段分选)** 连接反应结束后，向步骤 3-3 反应产物中加入 0.8× 体积 (80 μL) Agencourt AMPure XP 磁珠进行纯化。具体步骤如下：

- (1) 将 Agencourt AMPure XP 磁珠置于室温平衡 30 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入 80 μL Agencourt AMPure XP 磁珠至步骤 3-3 溶液中，用移液器充分吸打混匀。
- (3) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上，向反应管内加入 200 μL 80%乙醇（现配现用），静置 30 秒，吸弃上清。
- (5) 重复洗涤步骤(4)一次，并彻底弃上清。
- (6) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置 5 ~ 10 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**

(7) 将反应管从磁力架上取出，加入 25 μL Nuclease-Free H_2O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后转移 22 μL 上清至新的离心管中用于重亚硫酸氢盐处理。**注：如不立即使用，请将样品冻存于 -20°C 。**

3-5. (**需要进行片段分选—可选做**) 对于需要进行片段分选的文库，先将反应产物按步骤 3-4 使用 0.8 \times 体积 (80 μL) Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠纯化并溶于 50 μL Nuclease-Free H_2O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 中，再参考下表中两步筛选过程中的磁珠添加比例进行连接产物片段分选。**注：短 Y 型接头的连接产物长度增加 $\sim 50\text{bp}$ ，全 Y 型接头的连接产物长度增加 $\sim 100\text{bp}$ ，下表是以 Geno 短 Y 型接头为例。**

文库参数		磁珠加入比例	
插入片段	连接产物	第一次筛选	第二次筛选
150 ~ 300 bp	200 ~ 350 bp	0.7 \times	0.2 \times
200 ~ 400 bp	250 ~ 450 bp	0.6 \times	0.2 \times
250 ~ 600 bp	300 ~ 650 bp	0.55 \times	0.2 \times

现以连接产物大小为 200~350 bp 的情况为例，使用 0.8 \times 体积 Agencourt AMPure XP 磁珠纯化连接产物并溶于 50 μL Nuclease-Free H_2O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 后进行片段分选。

- (1) 将 AMPure XP 磁珠置于室温平衡 30 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入 35 μL ($50 \mu\text{L} \times 0.7 = 35 \mu\text{L}$) Agencourt AMPure XP 磁珠至 50 μL 已纯化的连接产物中，充分吸打混匀。
- (3) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器小心吸取上清并转移至另一新的离心管中。
- (4) 向上清中加入 10 μL ($50 \mu\text{L} \times 0.2 = 10 \mu\text{L}$) AMPure XP 磁珠，用移液器吹打混匀。
- (5) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器吸弃上清。
- (6) 在磁力架上向反应管内加入 200 μL 80% 乙醇 (现配现用)，静置 30 秒，用移液器吸弃上清。

重复此洗涤步骤一次，并彻底弃上清。

- (7) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置 5 ~ 10 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**
- (8) 将反应管从磁力架上取出，加入 25 μ L Nuclease-Free H₂O 或 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后转移 22 μ L 上清至新的离心管中用于重亚硫酸氢盐处理。**注：如不立即使用，请将样品冻存于-20 $^{\circ}$ C。**

四、重亚硫酸氢盐处理

将前一步获得的连接产物进行重亚硫酸氢盐处理，使用的处理试剂盒是 EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research Corp., Cat. #D5030T/D5030)，本方案是通过 EZ DNA Kit 充分验证的、其他重亚硫酸氢盐转化试剂盒可能同样适用。使用前需要向 D5030 的 6 mL M-Wash Buffer 浓缩液中加入 24 mL 无水乙醇并混匀，D5030T 的 M-Wash Buffer 不需要加入无水乙醇可直接使用。

- 4-1. 取一支 200 μ L PCR 管，加入 130 μ L Lightning Conversion Reagent 和 20 μ L DNA 样本（纯化后的连接产物）。混匀，然后简短离心确保 PCR 管内壁和顶盖没有液滴残留。
- 4-2. 把 PCR 管置于 PCR 仪中并运行如下程序，开启热盖并设置温度为 105 $^{\circ}$ C：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	98 $^{\circ}$ C	8 min
2	54 $^{\circ}$ C	60 min
3	4 $^{\circ}$ C	保持温度

- 4-3. 将 IC Column 置于 Collection Tube 中，向 IC Column 中加入 600 μ L M-Binding Buffer。
- 4-4. 向含有 M-Binding Buffer 的 IC Column 中加入样品（步骤 4-2 反应产物），关闭管盖并颠倒多次 (>12 次) 充分混匀。

- 4-5. 最大转速 ($> 10,000 \times g$) 离心 30 秒, 弃滤液, 将 IC Column 放回 Collection Tube 中。
- 4-6. 向 IC Column 中加入 100 μL M-Wash Buffer, 关闭管盖, 最大转速离心 30 秒。
- 4-7. 向 IC Column 中加入 200 μL L-Desulphonation Buffer, 立即关闭 IC Column 管盖及 L-Desulphonation Buffer 瓶盖 (溶液易吸收空气中 CO_2 而改变 PH), 室温 (20-30 $^\circ\text{C}$) 放置 18 分钟。完成温育后, 最大转速离心 30 秒。
- 4-8. 向 IC Column 中加入 200 μL M-Wash Buffer, 关闭管盖, 最大转速离心 30 秒。重复此步一次。
- 4-9. 将 IC Column 置于新的 1.5 mL 离心管中, 向滤膜上直接滴加 25 μL M-Elution Buffer。关闭管盖, 室温静置 3min, 最大转速离心 30 秒获得处理后的 DNA 用于后续文库富集扩增。

五、文库富集扩增

- 5-1. 将 2 \times HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix 和 Index Primer Mix (Geno Methyl-Seq Multiplex Oligos Set1 for Illumina, GS011-01/02/03) 置于冰上融化, 短暂混匀后按下表设置 PCR 仪反应程序, 开启热盖并将温度设置于 105 $^\circ\text{C}$ 。* **注: 请根据 DNA 的质量确定 PCR 循环数。建议对于 1000ng、100 ng、10 ng、1 ng 文库起始 DNA, PCR 富集时分别需要扩增 4、8、12、16 个循环。如果在 PCR 富集之前经过片段大小筛选, 则建议在原有基础上增加 2~4 个循环, 如果 DNA 质量较差 (比如提取于 FFPE 样品), 则建议在原有基础上增加 1~3 个循环。**

步骤	温度	时间	循环数
1	98 $^\circ\text{C}$	45 sec	1
2	98 $^\circ\text{C}$	15 sec	4 ~ 16*
3	65 $^\circ\text{C}$	30 sec	
4	72 $^\circ\text{C}$	30 sec	
5	72 $^\circ\text{C}$	1 min	1
6	4 $^\circ\text{C}$	保持温度	1

5-2. 按照下表配制 PCR 反应体系，用移液器吸取步骤 4-9 反应产物 22 μL 于 PCR 管中，按下表所示体积加入 PCR 反应液和引物，轻柔吸打 10~12 次混匀。瞬时离心后将 PCR 反应管置于 PCR 仪内，按步骤 5-1 反应程序进行 PCR 富集扩增。

组分名称	体积 (μL)
DNA Library	22
2 \times HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix	25
Index Primer Mix (10 μM)	3
Total	50

5-3. 当 PCR 样品温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ ，将 PCR 产物取出并使用 1.0 \times 体积 (50 μL) Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠进行纯化。具体操作如下：

- (1) 将 AMPure XP 磁珠置于室温平衡 30 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入 50 μL Agencourt AMPure XP 磁珠至 PCR 扩增产物中，充分吸打混匀。
- (3) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器吸弃上清。
- (4) 在磁力架上向反应管内加入 200 μL 80%乙醇 (现配现用)，静置 30 秒，吸弃上清。
- (5) 重复洗涤步骤(4)一次，并彻底弃上清。
- (6) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置 5~10 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**
- (7) 将反应管从磁力架上取出，加入 33 μL Nuclease-Free H₂O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后转移 30 μL 上清至新的离心管中。**注：纯化后得到的 DNA 文库可保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。**

5-4. 上机测序前可使用 Qubit (Geno dsDNA HS Assay Kit for Qubit, GS911-01/02) 和 Agilent Bioanalyzer 对 DNA 文库的浓度及大小进行鉴定。