

QKGEN[®] DNA 文库构建试剂盒
(for MGI)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

第一部分 产品信息

一、产品简介

本试剂盒是专为华大 MGI 高通量测序平台设计的文库制备试剂盒。本试剂盒可用于 1-1000ng DNA 样品的文库制备，兼容血液基因组、石蜡包埋组织（FFPE）、扩增子等不同质量的样本 DNA 文库构建。试剂盒经过精心设计和优化的文库构建步骤，可在 2-3 小时内快速建库，具有高效的连接效率及扩增效率，并能得到良好的测序质量，助力高通量测序的研究。

二、产品组分

组分名称	QAM0096 (96 rxn)
末修与加 A 缓冲液	960 μ L
末修与加 A 酶	480 μ L
T4 连接缓冲液	3264 μ L
T4 DNA 连接酶	576 μ L
2 x HiFi 文库扩增试剂	2400 μ L

三、保存方法

-30 ~ -15°C 保存； \leq 0°C 运输；

四、注意事项

1. 本产品仅供科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂盒不提供 Adapter 和 index Primers，所述试剂在 QKGEN[®] NGS Index primers Kit (for MGI-SI)、QKGEN[®] NGS DNA Adapters Kit (for MGI)、QKGEN[®] NGS UDI primers Kit (for MGI-DI) 试剂盒中提供。
3. 本试剂盒推荐使用 Beckman 磁珠分选试剂 (Agencourt AMPure XP reagent) 或齐凯基因磁珠分选试剂进行产物纯化和片段分选。
4. 同时对多个样本进行建库时，建议配制各步骤反应液时，在 1.5mL 离心管中按照样本数 +0.5 人份进行配制，再分装到各样本管中，可避免由于加液误差对建库效果的影响。
5. 使用本试剂盒前，请将各组分置于冰上解冻，解冻后颠倒混匀，短暂离心后置于冰上待用。
6. 本试剂盒仅包含文库制备所需试剂，其他耗材和试剂需自备。如：1.5mL 离心管、0.2 mL PCR 管、磁力架、各规格移液器、各规格枪头、无水乙醇、无核酸酶水、low TE 或者 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 等。

第二部分 样品准备

一、 样本要求

本试剂适用于血液、石蜡包埋组织（FFPE）、唾液、拭子、粪便、尿液等提取的基因组 DNA（gDNA）以及扩增子等不同质量样本 DNA 的文库制备，适用于全基因组测序、靶向捕获测序、免疫共沉淀测序等应用。

二、 DNA 片段化

1、样本要求

建议样本起始量为 500-1500ng DNA，并尽可能使用完整度较好，A260/A280=1.8~2.0 的高质量基因组 DNA 进行打断。

2、打断条件

本试剂盒兼容机械法及酶切法片段化的 DNA 进行文库构建。推荐将基因组 DNA 打断至所需主带范围：PE100 推荐主带 150-200 bp，PE150 推荐主带 200-300bp。

机械法打断。推荐使用 Covaris 超声打断仪进行打断，根据其说明书选择合适的打断条件。

酶切法打断。应根据各自酶切试剂先进行梯度条件摸索，选择最优条件进行打断。

3、片段筛选

MGI 平台测序要求 DNA 文库片段要尽可能集中，以保证测序质量，因此在文库构建前必须要对片段化的 DNA 进行片段筛选。根据不同的测序读长要求选择片段筛选的条件，如 PE150 测序推荐主带为 200-300bp，则选择 0.8×+0.2× 的片段筛选条件。具体选择及操作流程请参考附录 1。

4、片段筛选后的样本 DNA 定量和质控

对打断并片段筛选后的 Input DNA 进行浓度测定以及片段分析检测。所述的 Input DNA 是指投入末端修复及加 A 步骤的筛选后的片段化 DNA。

第三部分 文库构建

一、末端修复 / 加 A 尾

1. 根据打断后并片段筛选后的 DNA 浓度，取适量样本（推荐 50ng）至洁净的 0.2mL PCR 管中，并用无核酸酶水（Nuclease-Free Water）补充体积至 35 μ L。
2. 在上述 PCR 管中根据表一内容，在冰上配制末端修复及加 A 反应液：

表一 末端修复及加 A 反应液

试剂名称	体积 (μ L)
Input DNA	35
末修与加 A 缓冲液	10
末修与加 A 酶	5
总体积	50

2. 轻柔震荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表二反应程序设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表二 末端修复及加 A 反应程序

温度	时间
105°C	热盖
20°C	30 min
65°C	30 min
4°C	Hold

二、接头连接

注意：本试剂盒不提供 Adapter，所述试剂在 QKGEN[®] NGS Index primers Kit (for MGI-SI)、QKGEN[®] NGS DNA Adapters Kit (for MGI)、QKGEN[®] NGS UDI primers Kit (for MGI-DI) 试剂盒中提供。

1. 根据表三计算 M-Adapter 的用量，并根据样本投入量进行相应倍数的稀释：

表三 不同 DNA 投入量的 M-Adapter 用量

Input DNA 量	Adapter 浓度	稀释倍数	反应终浓度
50ng – 1000ng	15 μ M	0	0.75 μ M
25ng	7.5 μ M	2	0.375 μ M
10ng	3.0 μ M	5	0.15 μ M
5ng	1.5 μ M	10	0.075 μ M
2.5ng	0.75 μ M	20	0.0375 μ M
1ng	0.3 μ M	50	0.015 μ M

- 往末端修复及加 A 反应产物中加入 5 μ L 准备好的 M-Adapter，使用枪头轻柔吹打混匀。
- 根据表四内容，在冰上配制接头连接反应液，轻柔震荡混匀，短暂离心。

表四 接头连接反应液

试剂名称	体积 (μ L)
T4 连接缓冲液	34
T4 DNA 连接酶	6
Nuclease-Free Water	5
总体积	45

- 吸取 45 μ L 接头连接反应液到已加入 M-Adapter 的末端修复及加 A 反应产物中，轻柔震荡混合均匀，瞬时离心，立即将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表五反应条件进行连接反应。

表五 接头连接反应程序

温度	时间
热盖	off
20 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

三、连接产物纯化

- 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
- 将 100 μ L 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 0.8 倍体积 (80 μ L) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
- 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 5 min，直至溶液完全变澄清。
- 小心吸弃上清液，保留磁珠。
- 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
- 重复步骤 5 一次。
- 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
- 将离心管从磁力架上取下，加入 21 μ L Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μ L 至新的 PCR 管中。

四、文库扩增

- 在上述 PCR 管中根据下表六内容，在冰上配制文库扩增反应体系：

表六 文库扩增反应体系

试剂名称	体积
接头连接纯化产物	20 μ L
MGI UDI primer XX*	5 μ L
HiFi 文库扩增试剂	25 μ L
总体积	50 μ L

注：* 具体引物 index 序列及使用规则详见各自说明书，当接头连接步骤使用的是完整的长接头时，将 index 引物替换为通用引物 Post-primer Mix 即可。

2. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心。
3. 按下表七设置反应程序，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中反应。

表七 文库扩增反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 sec	1
变性	98°C	15 sec	} X*
退火	65°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	
终延伸	72°C	1 min	
Hold	4°C	∞	1

注意：*文库扩增循环数与 Input DNA 的投入量有关，参考附录 2 选择合适的文库扩增循环数。

五、扩增产物纯化

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
2. 将 50 μ L 扩增产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 1.0 倍体积（50 μ L）的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
3. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 5 min，直至溶液完全变澄清。
4. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
5. 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）

-
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 31 μL Nuclease-Free Water 重悬磁珠，室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 30 μL 至新的 1.5mL 离心管中， -20°C 保存备用。

六、文库质控

1. 浓度检测：推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测。
2. 片段分布检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段长度分布检测，片段长度应在符合实验设计的插入片段大小+84bp 范围内，条带集中，无其他杂峰。

第三部分 附 录

附录 1 片段分选操作步骤

1. 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡。
2. 先确保样品体积 $\geq 100 \mu\text{L}$ ，不足 $100 \mu\text{L}$ ，应加无核酸酶水补足。
3. 根据 DNA 片段长度要求，参考以下表格向样品中加入第一轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。

表 1 打断产物不同 DNA 片段大小的推荐磁珠用量

DNA 插入片段	200-300bp	300-400bp	400-500bp
第一轮加入磁珠体积倍数	0.8×	0.7×	0.6×
第二轮加入磁珠体积倍数	0.2×	0.2×	0.2×

注意：分选磁珠体积均为 DNA 样品体积的倍数。

4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 5min，直至溶液完全变澄清。
5. 小心将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中（注意不要吸取到磁珠），丢弃磁珠。
6. 向上清液中加入第二轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
7. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
8. 加入 $200 \mu\text{L}$ 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
11. 加入 $31 \mu\text{L}$ （或根据实验需要加入一定量的洗脱溶液）无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 $30 \mu\text{L}$ 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

附录 2 文库扩增循环数推荐

1. 文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数，循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，会影响后续数据性能表现。
2. 下表列举了使用 1-1000 ng 高质量 DNA 投入量时，根据是否进行片段筛选(size-selection, SS)，分别获得 100 ng 和 1000 ng 文库的推荐扩增循环数，当样本质量较差或主带较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

表 2 文库扩增循环数选择推荐表

样本 DNA 投入量	100 ng 文库所需循环数		1000 ng 文库所需循环数	
	No SS	With SS	No SS	With SS
1000 ng	4*	4*	4-5	6-7
500 ng	4*	4-5	4-6	7-8
250 ng	4*	5-6	5-7	8-10
100 ng	4*	6-8	6-8	9-11
50 ng	4-7	8-10	7-10	12-14
25 ng	5-8	9-11	8-11	13-15
10 ng	7-11	11-13	11-14	14-16
5 ng	8-12	12-14	12-15	-
1 ng	10-13	14-16	14-17	-

注： *当本试剂盒配套 QKGEN[®] NGS DNA MGI Index Primers Kit(for MGI-SI)或 QKGEN[®] NGS UDI primers Kit (for MGI-DI)等短接头试剂盒使用时，由于所提供的接头为短接头，不是完整的长接头，必须在文库扩增的步骤中扩增出完整的文库接头，因此至少需要扩增 4 个循环，以保证接头能完整地扩增出来。

当本试剂盒搭配 QKGEN[®] NGS DNA Adapters Kit (for MGI)一类的长接头试剂盒使用时，可根据投入量进行 PCR Free 建库或者非 PCR Free 建库。