

QKGEN[®] DNA 文库构建试剂盒

(for Ion Torrent)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

一、产品简介

本试剂盒是专为 Ion Torrent 高通量测序平台设计的文库制备试剂盒。本试剂盒可用于 10-1000 ng 片段化 DNA 样品的文库制备。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。试剂盒中提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了样品识别的可靠性、文库构建的稳定性和重复性。

二、产品组分

试剂盒套装名称	组分信息	QAT0096 (96 rxn)
Box 1 (建库试剂)	末端修复缓冲液	960 μ L
	末端修复酶系	480 μ L
	连接缓冲液	3264 μ L
	连接酶系	576 μ L
	2xHiFi 文库扩增试剂	2400 μ L
Box 2 (接头及标签试剂)	PCR Primer Mix for Ion (10 μ M)	480 μ L
	Ion Adapter P1 (20 μ M)	480 μ L
	Ion Adapter Barcode XX (20 μ M)	48*2T

三、保存方法

-30 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存； \leq 0 $^{\circ}$ C 运输；

四、注意事项

1. 适用范围

10-1000 ng 片段化的 DNA 样品，使用于 Ion Torrent 平台。

2. 样品准备

使用机械法或酶切法得到片段化的 DNA。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，再选择最优条件正式开始打断。片段化 DNA 制备过程中可能会带入的高浓度金属离子螯合剂或其他盐，这些成分会影响末端修复步骤反应效率，建议 DNA 片段化后进行磁珠纯化。

3. 自备材料

纯化试剂盒 Beckman 的 Agencourt AMPure XP reagent 或齐凯基因磁珠分选试剂

磁力架
无水乙醇
无核酸酶水/ddH₂O
EP 管和 PCR 管 (DNase/RNase free)
各规格移液器、各规格枪头
PCR 仪
Qubit dsDNA HS 分析试剂盒

4. 其他注意事项

同时对多个样本进行建库时,建议在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,可有效避免由于加液误差对建库效果的影响。

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,切勿将试剂长时间置于室温以上的环境。

五、文库构建操作流程:

1. 末端修复

- 1) 提前将末端修复缓冲液取出,室温解冻,轻微振荡混匀并短暂离心备用。
- 2) 取出新的 200 μ l PCR 管 (DNase/RNase free) 按照表一配制反应体系 (冰盒上操作):

表一 末端修复反应液

试剂名称	体积
片段化 DNA	35 μ L
末端修复缓冲液	10 μ L
末端修复酶系	5 μ L
总体积	50 μ L

- 3) 轻柔振荡混合均匀,瞬时离心,立即将 PCR 管置于提前按照表二设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表二 末端修复反应程序

温度	时间
热盖 75 $^{\circ}$ C	on
20 $^{\circ}$ C	30 min
70 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 接头连接

1) 末端修复反应完成后, 根据下表四内容在冰上配制接头连接反应液:

表四 接头连接反应液

试剂名称	体积
末端修复产物	50 μ L
连接缓冲液	34 μ L
连接酶系	6 μ L
Ion Adapter P1*	5 μ L
Ion Adapter Barcode XX**	5 μ L
总体积	100 μ L

注: *建议 Adapter 的加入量与 DNA 片段的摩尔比为 10:1-20:1, 具体 Adapter 的使用浓度请参照下表五。

例如, DNA 量为 10-100 ng, Adapter 建议使用浓度为 2 μ M (~260 bp) 或 1 μ M (300-400 bp)。

**不同的样品, 加入不同的 Ion Adapter Barcode。

表五 不同 DNA 大小建议的 Adapter 用量

插入 DNA 量/反应	不同大小 DNA 建议 Adapter 使用浓度			
	~260bp		300-400bp	
	Adapter 浓度	反应终浓度	Adapter 浓度	反应终浓度
1000ng	20 μ M	1 μ M	10 μ M	0.5 μ M
500ng	10 μ M	0.5 μ M	5 μ M	0.25 μ M
100ng	2 μ M	0.1 μ M	1 μ M	0.05 μ M

2) 将 PCR 管置于 PCR 仪上进行如下的连接反应:

表六 接头连接反应程序

温度 (无热盖)	时间
20 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

3. 连接产物分段分选

1) 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡。

2) 根据 DNA 片段长度要求, 参考下表六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。

表六 DNA 文库不同片段大小推荐的分选磁珠用量

DNA 文库大小	230-330bp	280-380bp	380-480bp
第一轮加入磁珠体积倍数	0.78 \times	0.68 \times	0.58 \times

第二轮加入磁珠体积倍数	0.20×	0.20×	0.20×
-------------	-------	-------	-------

注意：分选磁珠体积均为 DNA 样品体积的倍数，如样品体积为 100 μ L，第一轮分选磁珠为 0.8X，即 80 μ L。

- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 小心吸弃上清液，保留磁珠。
- 7) 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。
- 8) 重复步骤 7 一次。
- 9) 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）
- 10) 加入 21 μ L 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 20 μ L 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

4. 缺刻修复和 PCR 扩增

- 1) 于冰盒上，按照表七配制 PCR 扩增反应体系：

表七 PCR 扩增反应体系

试剂名称	体积
接头连接纯化产物	20 μ L
PCR Primer Mix for Ion	5 μ L
2 x HiFi 文库扩增试剂	25 μ L
总体积	50 μ L

- 2) 轻柔振荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表八设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表八 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
105 °C	ON, 热盖	/
72 °C	10 min	1
98 °C	45 s	1
98 °C	20 s	X *
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1
4 °C	hold	1

注：* 循环数应根据模板输入量而定，输入量越低，则循环数应越高以保证文库产量，但同时测序数据中 duplication 也会增加，一般建议按照下表进行设置，也可以根据实际需要进行调整：

DNA 模板投入量 (ng)	循环数
1000 ng	4~6
500 ng	5~7
100 ng	7~9
10 ng	10~12

5. PCR 扩增产物纯化

- 1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min，恢复室温后彻底振荡混匀。
- 2) 向 50 μ L 扩增产物中加入 1 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 2 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 21 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 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 上清液至新的 1.5mL 离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

6. 文库质检

1) 文库浓度测定

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) 文库片段大小分布测定

推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或者 Qseq-100 生物片段分析仪对构建好的文库进行片段大小分布检测。

附录一 接头序列信息

注：本试剂盒使用的接头为适用于 Ion Torrent 平台的截短型接头，与 ThermoFisher 官方提供接头不同，请注意区分。

1. Adapter 序列

Ion Adapter P1:

5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-3'

Ion Adapter Barcode XX:

5'-CTGCGTGTCTCCGACTCAGXXXXXXXXXXGAT-3'

注：XXXXXXXXXX 代表 Barcode 序列，为 10-12bp

2. Barcode 序列

Barcode XX	Sequences	Barcode XX	Sequences
01	CTAAGGTAAC	25	CCTGAGATAC
02	TAAGGAGAAC	26	TTACAACCTC
03	AAGAGGATTC	27	AACCATCCGC
04	TACCAAGATC	28	ATCCGGAATC
05	CAGAAGGAAC	29	TCGACCACTC
06	CTGCAAGTTC	30	CGAGGTTATC
07	TTCGTGATTC	31	TCCAAGCTGC
08	TTCCGATAAC	32	TCTTACACAC
09	TGAGCGGAAC	33	TTCTCATTGAAC
10	CTGACCGAAC	34	TCGCATCGTTC
11	TCCTCGAATC	35	TAAGCCATTGTC
12	TAGGTGGTTC	36	AAGGAATCGTC
13	TCTAACGGAC	37	CTTGAGAATGTC
14	TTGGAGTGTC	38	TGGAGGACGGAC
15	TCTAGAGGTC	39	TAACAATCGGC

16	TCTGGATGAC	40	CTGACATAATC
17	TCTATTCGTC	41	TTCCACTTCGC
18	AGGCAATTGC	42	AGCACGAATC
19	TTAGTCGGAC	43	CTTGACACCGC
20	CAGATCCATC	44	TTGGAGGCCAGC
21	TCGCAATTAC	45	TGGAGCTTCCTC
22	TTCGAGACGC	46	TCAGTCCGAAC
23	TGCCACGAAC	47	TAAGGCAACCAC
24	AACCTCATTC	48	TTCTAAGAGAC