

QKGEN[®] 酶切三合一 DNA 文库构建试剂盒
(for illumina)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

目 录

第一部分 产品信息.....	2
一、产品简介.....	2
二、产品组分与规格.....	2
三、保存方法：.....	2
四、适用范围及注意事项：.....	2
五、用户自备：.....	3
1. 试剂：.....	3
2. 仪器：.....	3
3. 耗材：.....	3
第二部分 实验流程.....	4
一、实验流程图：.....	4
二、操作步骤：.....	5
（一）片段化/末端修复/加 A 尾.....	5
（二）接头连接.....	7
（三）连接产物纯化/片段分选.....	8
（四）文库扩增.....	8
（五）扩增产物纯化/片段分选.....	9
（六）文库质控.....	10
第三部分 附录.....	11
附录一 片段分选操作步骤.....	11

第一部分 产品信息

一、产品简介

本试剂盒是专为 illumina 高通量测序平台设计的酶切/末修/加 A 一步法 DNA 文库快速制备试剂盒。与传统的两步法建库相比，本试剂盒利用高质量的片段化酶，无需繁琐的超声打断过程，同时将末端修复与“A”尾添加模块合三为一，使片段化/末端修复/加“A”在同一体系中进行，优化的体系使得反应后的产物无需磁珠纯化，可直接进行接头连接反应，极大的缩短了建库时间，简化了建库流程，使 DNA 文库构建更加高效简单。本试剂盒采用的片段化酶可随机切割双链 DNA，酶切片段偏好性极低，可与超声打断片段媲美。

二、产品组分与规格

组分名称	QE10096
10× Frag Buffer	0.5 mL
5× Frag-Enzyme Mix	1 mL
Enhancer	0.25 mL
5× Ligation Buffer	1 mL × 2
DNA Ligase	1 mL
2×HiFi PCR Master Mix	1 mL × 2+0.5 mL

三、保存方法：

-30 ~ -15°C保存；干冰运输；有效期 1 年。

四、适用范围及注意事项：

1. 适用于 1ng-1μg 投入量 DNA 建库。
2. 请穿实验服并戴一次性手套进行实验。
3. 使用前请将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后充分混匀，简短离心后置于冰上待用。
4. 混匀时请轻轻吹打或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
5. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的一次性枪头。
6. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
7. 请在洁净的实验环境下实验，避免污染。

五、用户自备：

1. 试剂：

illumina 平台接头及扩增引物：QKGEN® NGS UDI primers Kit (for illumina) 货号：QJI1096。

纯化磁珠：QKGEN® AT DNA Clean Beads

DNA/文库定量试剂盒：QKGEN® dsDNA HS Assay Kit for Qubit

无水乙醇

无核酸酶水

low TE (10 mM Tris-HCL, pH 8.0) 等

2. 仪器：

PCR 仪

移液器

磁力架

Qubit 荧光定量仪

Agilent Bioanalyzer

3. 耗材：

1.5mL 离心管

0.2mLPCR 管

0.5mL Axygen 透明管 (Qubit 定量用)

各种规格枪头，推荐带滤芯枪头

第二部分 实验流程

一、实验流程图：

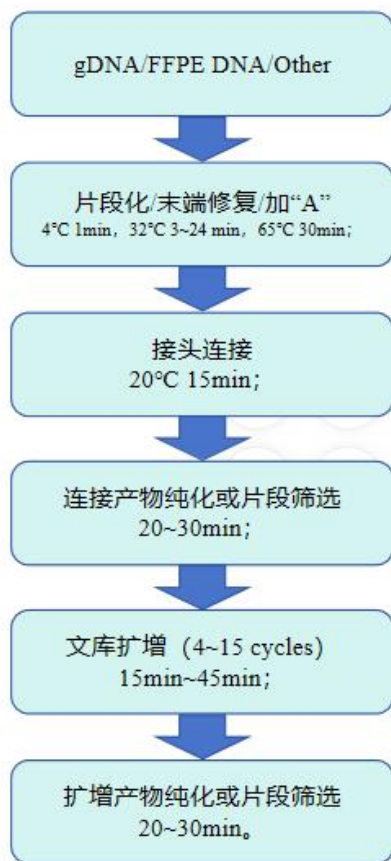


图 1. QKGEN® 酶切三合一快速 DNA 文库构建操作流程图

二、操作步骤:

(一) 片段化/末端修复 / 加 A 尾

注意: 当 DNA 溶于纯水, 10mM Tris, buffer EB 或者低浓度 TE (0.1xTE), 请按如下步骤进行实验操作:

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管, 根据表一内容, 在冰上配制片段化/末端修复/加 A 反应液:

表一 片段化/末端修复/加 A 反应液

试剂名称	体积	
	DNA 上样量 1- 10 ng	DNA 上样量>10 ng
DNA	X μ L	X μ L
10 \times Frag Buffer	5 μ L	5 μ L
5 \times Frag-Enzyme Mix	10 μ L	10 μ L
Enhancer	2.5 μ L	/
无核酸酶水	32.5-X μ L	35-X μ L
总体积	50 μ L	50 μ L

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并已降温到 4 $^{\circ}$ C 的 PCR 仪上进行反应。

表二 片段化/末端修复/加 A 反应程序

温度 (热盖 70 $^{\circ}$ C)	时间
4 $^{\circ}$ C	1 min
32 $^{\circ}$ C	3~24 min
65 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

表三 不同 DNA 起始量, 不同片段分布的酶切时间推荐表*

平均片段大小	32 $^{\circ}$ C 孵育时间 (min)			
	250 bp	350 bp	450 bp	550 bp
10 ng DNA 上样量	24	16	14	10
100 ng DNA 上样量	16	10	8	6
1000 ng DNA 上样量	14	8	6	4

注：*表格内针对不同 DNA 上样量列出的反应时长为基本参考值，客户仍然需要根据自己的实际 DNA 样本量 (1- 1000 ng) 对反应时间进行优化。可以在上表列出的时长基础上增加或减少 3min 进行片段化效果对比以确定最佳反应时间。若 DNA 上样量 ≤ 10 ng，且反应后片段大小要求在 350bp 左右时，推荐加入 2.5 μ L Enhancer 至 50 μ L 反应体系并孵育 10min。

注意：当 DNA 保存在 1 x TE 里，请按如下步骤进行实验操作：

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管，根据表四内容，在冰上配制片段化/末端修复/加 A 反应液：

表四 片段化/末端修复/加 A 反应液

试剂名称	体积	
	DNA 上样量 1- 10 ng	DNA 上样量>10 ng
DNA	X μ L	X μ L
10 \times Frag Buffer	5 μ L	5 μ L
5 \times Frag-Enzyme Mix	10 μ L	10 μ L
Enhancer	5 μ L	2.5 μ L
无核酸酶水	30-X μ L	32.5-X μ L
总体积	50 μ L	50 μ L

2. 轻柔震荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表五反应程序设置好程序并已降温到 4 $^{\circ}$ C 的 PCR 仪上进行反应。

表五 片段化/末端修复/加 A 反应程序

温度 (热盖 70 $^{\circ}$ C)	时间
4 $^{\circ}$ C	1 min
32 $^{\circ}$ C	5~35 min*
65 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

注：*反应时间需根据 DNA 上样量 (1- 1000 ng) 进行优化。当 DNA 上样量>10 ng 时，推荐以 25 min 作为起始反应时长进行优化，此时得到的 DNA 片段平均大小为 300-500bp。当 DNA 上样量 ≤ 10 ng 时，推荐以 15 min 为起始反应时长进行优化，此时得到的 DNA 片段平均大小为 300bp。用户可以根据 DNA 上样量，在既定反应时间基础上增加或减少 3 min，通过对比试验结果确定最佳反应时长。

注意：当 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。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 磁珠对 DNA 进行纯化后再进行片段化/末端修复/加 A 尾操作。

(二) 接头连接

1. 根据表六计算 I-Adapter 的用量，并根据样本投入量进行相应倍数的稀释：

表六 不同 DNA 投入量的 I-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

2. 向片段化/末端修复/加 A 的产物中，根据表七所示的接头连接反应体系加入各组分：

表七 接头连接反应体系

试剂名称	体积
片段化/末端修复/加 A 反应产物	50 μ L
5 \times Ligation Buffer	20 μ L
DNA Ligase	10 μ L
M-Adapter*	5 μ L
无核酸酶水	15 μ L
总体积	100 μ L

注：* 为避免接头自连，I-Adapter 应先加至片段化/末端修复/加 A 反应产物的 PCR 管管底，

**多样本操作时，为避免因操作缓慢而容易产生接头二聚体，应先将 5 \times Ligation Buffer、DNA Ligase 与无核酸酶水按比例配制预混液，再进行分装，

3. 使用移液器轻轻吹打或轻柔振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中 20 $^{\circ}$ C，**孵育 15 min**（无热盖）。

(三) 连接产物纯化/片段分选

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
2. 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。(注：如要进行片段分选，详细操作步骤请参考附录一)
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 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 管中。

(四) 文库扩增

1. 根据下表八所示配制文库扩增反应体系：

表八 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
UDI Primers XX* (20 μ M)	5 μ L
2 \times HiFi PCR Master Mix	25 μ L
总体积	50 μ L

注：* 每个样本加入不同的 index 引物，具体引物及 index 序列及使用规则详见 QKGEN® NGS UDI primers Kit (for illumina) 货号：QJ11096 试剂盒的说明书。

2. 使用移液器轻轻吹打或轻柔振荡混匀，并短暂离心。
3. 按下表九设置反应程序，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中反应。

表九 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	2 min	1
保持	4°C	∞	1

注：PCR 循环数根据 DNA 投入量、DNA 质量及所期望文库产量而定，具体循环数选择可参考下表：

DNA 投入量	对应产量所需循环数	
	100 ng	1000 ng
1000 ng	0	3-4
500 ng	0	3-4
250 ng	3-4	5-6
100 ng	4-5	6-7
50 ng	5-6	7-8
10 ng	6-7	10-11
1ng	12-13	14-15

（五）扩增产物纯化/片段分选

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。（注：如要进行片段分选，详细操作步骤请参考附录一）
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 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 管中，即为构建好的测序文库，可直接用于测序或进行目标区域捕获后测序。

（六）文库质检

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。

第三部分 附 录

附录一 片段分选操作步骤

1. 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡，配制 80% 乙醇。
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 DNA 文库不同片段大小的推荐磁珠用量

DNA 插入片段大小	150-250bp	200-300bp	300-400bp	400-500bp
DNA 文库大小	250-350bp	350-450bp	450-550bp	550-650bp
第一轮加入磁珠体积倍数	0.8×	0.7×	0.6×	0.55×
第二轮加入磁珠体积倍数	0.2×	0.2×	0.2×	0.15×

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 $21\mu\text{L}$ 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 $20\mu\text{L}$ 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。