

QKGEN[®]游离 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

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游离 DNA 文库制备试剂盒。本试剂盒通过预混试剂和基于磁珠纯化，简化了建库流程，减少了文库制备过程中的移液操作和耗时的步骤。本试剂盒提供游离 DNA 文库构建所需的所有酶和反应缓冲液。

二、产品组分

组分名称	QC1096
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	3.264 mL
T4 DNA 连接酶	576 μ L
2 x HiFi 文库扩增试剂	2.4 mL

三、保存方法

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

四、注意事项

1. 推荐使用 QKGEN[®]游离 DNA 提取试剂盒进行游离 DNA 的提取。
2. cfDNA 建库前应该使用 Qubit dsDNA HS 检测试剂盒来定量，如果 cfDNA 小于 5 ng，建议重新提取以满足最小投入量。质量差的 DNA 可能导致文库制备失败。
3. 本试剂盒不提供连接接头 Adapter，连接接头 Adapter 在 QKGEN[®]NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 试剂盒中提供。
4. 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。
5. 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。
6. 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，离心后置于冰上待用。
7. 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（10 mM Tris-HCL, pH 8.0）等。

第二部分 实验操作

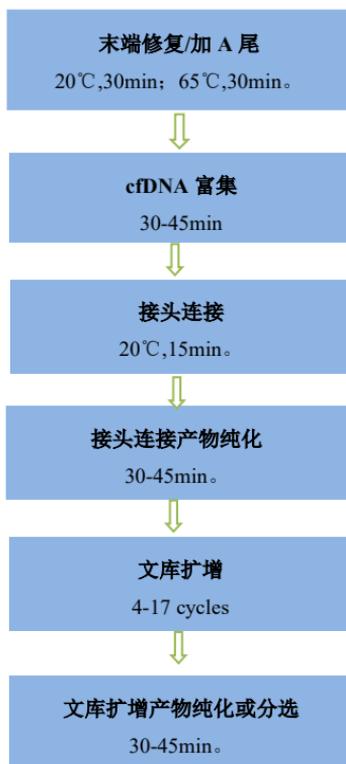


图 1. 文库构建操作流程

一、末端修复 / 加 A 尾

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管, 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
片段化 DNA	35 μ L
末修与加 A 缓冲液	10 μ L
末修与加 A 酶	5 μ L
总体积	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的 PCR 仪上进行反应。

表二 末端修复及加 A 反应程序

温度 (热盖 105 $^{\circ}$ C)	时间
20 $^{\circ}$ C	30 min
65 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

二、游离 DNA 富集

- 1) 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡。
- 2) 向样品中加入 55 μ L 磁珠, 用移液器轻柔吹打混匀, 室温孵育 10 min。
- 3) 孵育完成后, 将离心管置于磁力架上, 室温静置 2min, 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 100 μ L 磁珠, 用移液器轻柔吹打混匀, 室温孵育 5min。
- 6) 孵育完成后, 将离心管置于磁力架上, 室温静置 2min, 直至溶液完全变澄清。
- 7) 小心吸弃上清液, 保留磁珠。
- 8) 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。
- 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 51 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 50 μ L 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

三、接头连接

1. 根据表三计算通用 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 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
20ng	5.0 μ M	3	0.25 μ M
10ng	3.0 μ M	5	0.15 μ M
5ng	1.5 μ M	10	0.075 μ M
1ng	0.3 μ M	50	0.015 μ M

2. 向末端修复/加 A 的产物中，加入以下表格配制的接头连接反应体系：

表四 接头连接反应体系

试剂名称	体积
游离 DNA 富集产物	50 μ L
T4 连接缓冲液	34 μ L
T4 DNA 连接酶	6 μ L
通用 adapter*	5 μ L
无核酸酶水	5 μ L
总体积	100 μ L

注：*通用 adapter 应与 T4 DNA 连接酶分开添加，避免产生接头二聚体。建议先往末端修复/加 A 产物中加入通用 adapter，再加入其他成分或其他成分配好的 mix。

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）。

四、连接产物纯化

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 1.5 倍体积（150 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。

- 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 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。

五、文库扩增

- 根据下表五所示配制文库扩增反应体系：

表五 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
Index 引物 i5XX* (20 μ M)	2.5 μ L
Index 引物 i7XX* (20 μ M)	2.5 μ L
HiFi 文库扩增试剂	25 μ L
总体积	50 μ L

注：*每个样本加入不同的 Index 引物 i5XX 和 Index 引物 i7XX，具体引物及 index 序列及组合方案详见双端接头试剂 QKGEN^{NGS} Dual Index Primers Kit for Illumina 试剂盒的说明书中。

- 使用移液器轻轻吹打或轻柔振荡混匀，并短暂离心。
- 按下表六设置反应程序，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中反应。

表六 文库扩增反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 $^{\circ}$ C	45 sec	1
变性	98 $^{\circ}$ C	15 sec	} 9-13
退火	65 $^{\circ}$ C	30 sec	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 sec	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	1 min	1
保持	4 $^{\circ}$ C	∞	1

六、 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 μL 扩增产物中加入 1.1 倍体积（55 μL ）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 μL 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 μL 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 μL 上清液至新的 1.5mL 离心管中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

七、 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。