QKGEN® 游离 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	QCM096
末修与加 A 缓冲液	960 μL
末修与加 A 酶	480 μL
T4 连接缓冲液	3264 μL
T4 DNA 连接酶	576 μL
2 x HiFi 文库扩增试剂	2400 μL

三、保存方法

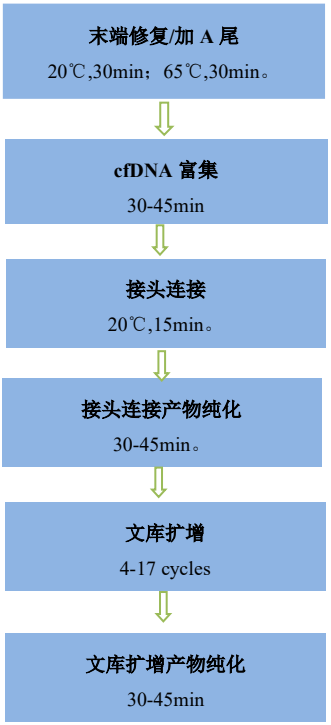
-30～-15℃保存；≤0℃运输；

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 和含 Index 的扩增引物，连接接头 Adapter 和含 Index 的扩增引物在 QKGEN®NGS UDI primers Kit（for MGI-DI）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. 文库构建操作流程图



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
游离 DNA	35μL
末修与加 A 缓冲液	10 μL
末修与加 A 酶	5μL
总体积	50 μL

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℃）	时间
20℃	30 min
65℃	30 min
4℃	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 55μL 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 100μL 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 200μL 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 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 50 μL 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 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 μM	0	0.75 μM
25ng	7.5 μM	2	0.375 μM
20ng	5.0 μM	3	0.25 μM
10ng	3.0 μM	5	0.15 μM
5ng	1.5 μM	10	0.075 μM
1ng	0.3 μM	50	0.015 μM

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 μL
T4 连接缓冲液	34 μL
T4 DNA 连接酶	6 μL
M-Adapter*	5 μL
无核酸酶水	5 μL
总体积	100μL

注：*M-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 M-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℃，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 100μL 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 1.5 倍体积（150μL）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 200μL 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 21μL 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 20μL 至新的 PCR 管中.

五、 文库扩增

1. 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 μL
MGI UDI Primer XX (20 μM)*	5 μL
HiFi 文库扩增试剂	25 μL
总体积	50 μL

*注：每个样本加入不同的 MGI UDI Primer XX (20 μM)，具体引物及 index 序列及组合方案详见 QKGEN®NGS UDI primers Kit（for MGI-DI）试剂盒的说明书中。

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℃	45 sec	1
变性	98℃	15 sec	9-13
退火	65℃	30 sec	
延伸	72℃	30 sec	
终延伸	72℃	1 min	1
保持	4℃	∞	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 200μL 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℃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。