

QKGEN[®] 游离 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

目 录

一、产品简介：	2
二、产品组分：	2
三、保存方法：	2
四、注意事项：	2
1. 适用范围	2
2. 样品准备	2
3. 自备材料	2
4. 其他注意事项	3
五、文库构建操作流程：	3
1. 末端修复	3
2. 末端修复产物纯化	4
3. 接头连接	4
4. 接头连接产物纯化	5
5. 缺刻修复和 PCR 扩增	5
6. PCR 扩增产物纯化	6
7. 文库质检	6
附录一 接头序列信息	7
1. Adapter 序列	7
2. Barcode 序列	7

一、产品简介：

本试剂盒是专为 Ion Torrent 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。

末端修复：产生平末端，5'端磷酸化。

连接和缺口修复：将双链 DNA 接头连接到平末端文库片段上，并进行缺口修复以产生两侧有接头的文库片段。

PCR 扩增：进行 PCR 扩增两端携带接头序列的文库片段。

二、产品组分：

试剂盒套装名称	组分信息	QCT096 (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 (2.5 μ M)	144 μ L
	Ion Adapter Barcode XX (2.5 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

适用于 Ion Torrent 平台游离 DNA 样品的文库构建，

2. 样品准备

游离 DNA (Cell-Free Circulating DNA, cfDNA)是指来自细胞凋亡或坏死，游离于细胞外的 DNA 片段，广泛存在于人类的血清、血浆当中。推荐使用 QKGEN[®] Circulating DNA Extraction Kit 进行游离 DNA 的提取。

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

请在试剂盒的有效期内使用

请确保移液枪校准正确，文库制备对移液造成的误差高度敏感

试剂盒配套的 Ion Adapter P1 和 Ion Adapter Barcode XX 为双链结构，请勿将其置于室温温度以上，以免发生解链，影响使用。

Ion Adapter Barcode XX 开盖前请短暂离心，使液体收集到管底，以免不同 Barcode Adapter 交叉污染。

cfDNA 建库前应该使用 Qubit dsDNA HS 检测试剂盒来定量，如果 cfDNA 小于 2ng，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。

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°C	30 min
70°C	10 min
4°C	Hold

2. 末端修复产物纯化

- 1) 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡。
- 2) 向样品中加入 65 μ L 磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
- 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 25.5 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 25 μ L 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

3. 接头连接

- 1) 末端修复反应完成后，根据下表三内容在冰上配制接头连接反应液：

表三 接头连接反应液

试剂名称	体积
末端修复产物	25 μ L
连接缓冲液	34 μ L
连接酶系	6 μ L
Ion Adapter P1 (2.5 μ M)	1.5 μ L
Ion Adapter Barcode XX (2.5 μ M)	1.5 μ L
H ₂ O	32 μ L
总体积	100 μ L

- 2) 将 PCR 管置于 PCR 仪上进行如下的连接反应：

表四 接头连接反应程序

温度（无热盖）	时间
20 °C	15 min
4°C	Hold

4. 接头连接产物纯化

- 1) 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡。
- 2) 向样品中加入 150 μ L 磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
- 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) 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。

5. 缺刻修复和 PCR 扩增

- 1) 于冰盒上，按照表五配制 PCR 扩增反应体系：

表五 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 (10 μ M)	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 管置于提前按照表六设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表六 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	13
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1
4 °C	hold	1

6. 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 1.1 倍体积（55 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 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。

7. 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