

QKGEN[®] 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文库制备试剂盒。本试剂盒可用于 1-1000ng 经片段化后的 DNA 样品的文库制备，兼容血液基因组、石蜡包埋组织（FFPE）、扩增子等不同质量的样本 DNA 文库构建。试剂盒经过精心的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，并能得到优异的测序数据，助力高通量测序的研究。

二、产品组分

组分名称	QAI0024	QAI0096
末修与加 A 缓冲液	240 μ L	960 μ L
末修与加 A 酶	120 μ L	480 μ L
T4 连接缓冲液	816 μ L	3264 μ L
T4 DNA 连接酶	144 μ L	576 μ L
2 x HiFi 文库扩增试剂	600 μ L	2400 μ L

三、保存方法

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

四、注意事项

1. 本试剂盒为文库构建试剂盒，在进行文库构建前，需对样本 DNA 进行片段化处理，本试剂盒不包含 DNA 片段化试剂，如酶切法试剂。
2. 本试剂盒不提供 Adapter 和 Pre-PCR Primers Mix，相应试剂在 QKGEN[®] NGS Dual Index Primers Kit for Illumina、QKGEN[®] NGS UDI Primers Kit for Illumina 或 QKGEN[®] Unique Dual Index Barcodes (for Illumina) 试剂盒中提供。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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 样品准备

一、适用样本类型

血液、唾液、拭子、粪便、尿液等体液中提取的基因 DNA (gDNA)；石蜡包埋组织 (FFPE)；扩增子等不同质量样本

二、适用范围

本试剂适用于所有常见的动物、植物、真菌、细菌等物种，包括人、鼠、水稻、拟南芥、酵母、大肠杆菌、海洋生物、微生物等。

适用于全基因组测序、靶向捕获测序、PCR-free 测序、免疫共沉淀测序等

本试剂盒适用于 1-1000 ng 片段化 DNA 的文库构建，所述片段化 DNA 特指末端修复及加 A 尾步骤所加的片段化 DNA。

三、DNA 片段化

1、样本要求

建议使用完整度较好，A260/A280=1.8~2.0 的高纯度高质量基因组 DNA 进行打断。

2、打断条件

本试剂盒兼容机械法及酶切法片段化的 DNA 进行文库构建。

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。

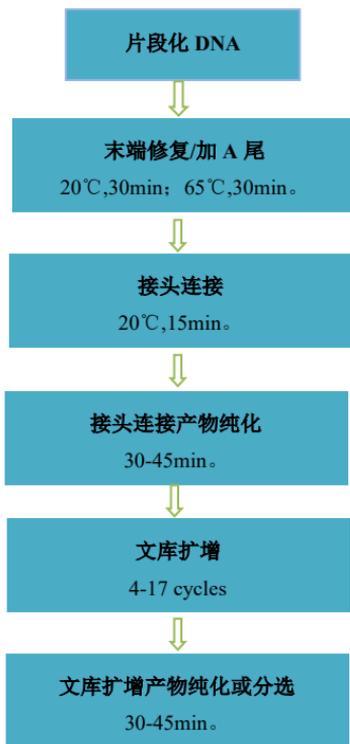
酶切法打断。应根据各自酶切试剂先进行梯度条件摸索，再选择最优条件正式开始打断。

3、磁珠纯化/片段筛选

片段化 DNA 制备 (如酶切法打断) 过程中可能会带入的高浓度的金属离子螯合剂或其他盐，这些成分会影响末端修复/dA 尾添加步骤反应效率，强烈要求 DNA 片段化后进行磁珠纯化或分选，操作方法详见附录一。

第三部分 文库构建

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
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°C)	时间
20°C	30 min
65°C	30 min
4°C	Hold

二、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
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
末端修复及加 A 反应产物	50 μ L
T4 链接缓冲液	34 μ L
T4 DNA 链接酶	6 μ L
Adapter*	5 μ L
无核酸酶水	5 μ L
总体积	100 μ L

注: *Adapter 应与 T4 DNA 链接酶分开添加, 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。

本试剂盒不提供 Adapter, 具体使用说明请参考接头试剂 QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina, QKGEN® NGS UDI Primers Kit for illumina 或 QKGEN® Unique Dual Index Barcodes (for illumina) 试剂盒的说明书。

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）。

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。
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，准备洗脱：
 - a) 如产物无需进行片段分选，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；
 - b) 如产物需进行片段分选，加入 101 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 100 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中，继续进行片段分选，具体操作则参考附录一的片段分选操作步骤进行。

四、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 μ L
Pre-PCR Primer Mix*	5 μ L
HiFi 文库扩增试剂	25 μ L
总体积	50 μ L

注：*本试剂盒不提供 Pre-PCR Primers Mix，具体使用说明请参考接头试剂 QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina、QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina 或 QKGEN® Unique Dual Index Barcodes (for Illumina) 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°C	45 sec	1
变性	98°C	15 sec	} 循环数选择参考附录二
退火	65°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	
终延伸	72°C	1 min	1
保持	4°C	∞	1

五、扩增产物纯化/片段分选

磁珠纯化操作步骤同“三、连接产物纯化”，使用 1.0 倍体积的纯化磁珠进行扩增产物纯化。如需进行片段分选请参考附录一。

六、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生物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。

第四部分 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 μL 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 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 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

附录二 文库扩增循环数推荐

1. 文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数，循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，会影响后续数据性能表现。
2. 下表列举了使用 1-1000 ng 高质量 DNA 投入量时，根据是否进行片段筛选（size-selection, SS），分别获得 100 ng 和 1000 ng 文库的推荐扩增循环数，当样本质量较差或主带较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

表 2 文库扩增循环数选择推荐表

样本 DNA 投入量	100 ng 文库所需循环数		1000 ng 文库所需循环数	
	No SS	With SS	No SS	With SS
1000 ng	4*	4*	4-5	6-7
500 ng	4*	4-5	4-6	7-8
250 ng	4*	5-6	5-7	8-10
100 ng	4*	6-8	6-8	9-11
50 ng	4-7	8-10	7-10	12-14
25 ng	5-8	9-11	8-11	13-15
10 ng	7-11	11-13	11-14	14-16
5 ng	8-12	12-14	12-15	-
1 ng	10-13	14-16	14-17	-

注：*本试剂盒配套 QKGEN[®] NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 或 QKGEN[®] NGS UDI Primers Kit for illumina 双端接头试剂盒使用时，必须在文库扩增的步骤中扩增出完整的文库接头，因此至少需要扩增 4 个循环，以保证接头能完整地扩增出来。