

Modular DNA Library Kit 1.0

快速DNA 建库试剂盒（模块化）1.0

Modular DNA Library Kit 是为illumina 平台设计的 DNA 文库准备试剂盒，适用于起始量 1ng-1000ng 全基因组 DNA，试剂盒经过精心设计和优化，是一款快速（2-3 小时）构库试剂盒。可用于石蜡包埋组织 DNA 样本建库。试剂盒包含了 5X 三合一预混液，集片段化、末端修复和加 A 尾于一步反应，减少反应步骤，节省操作时间。T4 DNA 快速连接酶，高浓度的连接酶，反应速度快，效率高。

- ☆适用 1ng-1000 ng DNA 样本
- ☆高效的文库转化率与扩增效率
- ☆多样本验证可获得优异的文库与测序数据

目 录

产品描述.....	1
产品目录.....	2
产品组份.....	3
使用方法.....	3
注意事项.....	6
运输和保存.....	6

产品组份

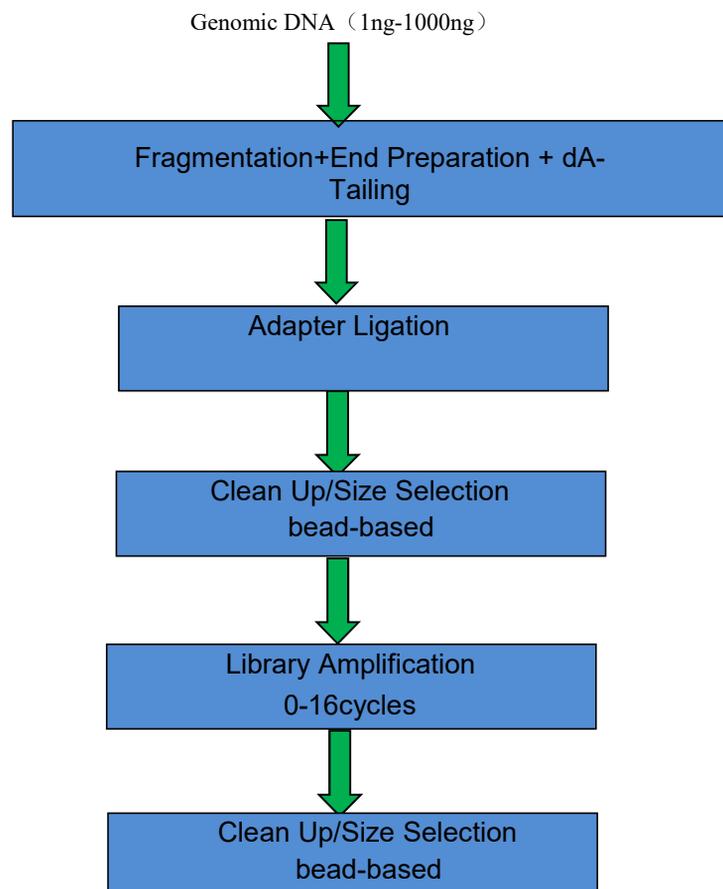
产品名称	规格
5x 三合一预混液	1 mL
10x 三合一预混缓冲液	0.5 mL
增强剂 (Enhancer)	0.25 mL
T4 DNA 连接酶	1 mL
5x 快速连接缓冲液	2 mL
2xHiFi 高保真酶预混液	2.5 mL

使用方法

一、自备试剂耗材清单

1. 接头及文库扩增引物，推荐使用齐凯基因提供的QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina
2. 磁珠，推荐 Cat#A63881, AMPure XP Beads 或其他等效产品。
3. 其他材料：灭菌超纯水、低吸附 EP 管、无水乙醇、TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0-8.5+0.1 mM EDTA)、磁力架、PCR 管、PCR 仪等。
4. DNA 质控和浓度检测：Cat#Q33238, life qubit4.0 ; Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。

二、使用流程



DNA 文库准备流程图

三、全基因组DNA文库构建步骤

1. 片段化/末端修复/A 尾添加

注意：请确保DNA溶于纯水，10mM Tris, buffer EB或者低浓度TE（0.1xTE）。如果DNA保存在1 x TE里，请按1.3步骤进行实验。若保存在其他缓冲液请按1.4进行实验。

1.1 当DNA 溶解于去离子水、10 mM Tris、Buffer EB 或0.1×TE 中，使用如下步骤进行片段化/末端修复/A 尾添加反应：

1) 使用PCR 仪进行如下反应程序（反应过程中需启动热盖，将热盖温度设置至70°C）：

步骤	温度	时间
1	4°C	1 min
2	32°C	3-24 min*
3	65°C	30 min
4	4°C	保持

选择反应时间：

平均片段大小	32°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 350 bp 左右时，推荐加入 2.5 μL Enhancer 至50 μL 反应体系并孵育10min。反应时长同 DNA 产物长度的详细关系见图 1：

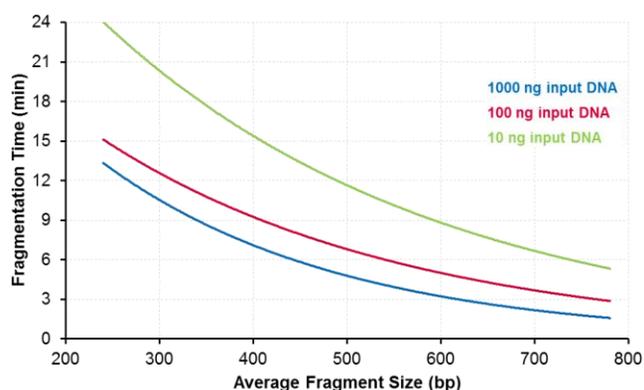


图 1. 不同上样量 DNA 反应时长与反应产物大小关系图

2) 配制反应体系（**整个配制过程请在冰上进行**）

根据不同的 DNA 上样量按下表所述在 200 μL 薄壁管中准备反应体系：

组份	DNA 上样量>10 ng	DNA 上样量 1-10 ng
10 \times 三合一缓冲液	5 μL	5 μL
Purified DNA	X μL	X μL
增强剂 (Enhancer)	/	2.5 μL
Nuclease-free H ₂ O	35-X μL	32.5-X μL
Total	40 μL	40 μL

向准备好的 40 μL 反应体系中加入 10 μL 5 \times 三合一预混液，用移液器轻柔吸打 6-8 次混匀（注意不要涡旋混匀）。

- 3) 将离心管瞬时离心后，立即放入预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PCR 仪中，进入反应程序。
- 4) 当 PCR 仪中反应程序结束，样品温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 时，将样品取出并立即置于冰上。
- 5) 即刻进入接头连接步骤。

1.2 当 DNA 溶解于 1 \times TE 溶液，使用如下步骤进行片段化/末端修复/A 尾添加反应：

- 1) 使用 PCR 仪进行如下反应程序（反应过程中需启动热盖，将热盖温度设置至 70 $^{\circ}\text{C}$ ）：

步骤	温度	时间
1	4 $^{\circ}\text{C}$	1 min
2	32 $^{\circ}\text{C}$	5-35 min*
3	65 $^{\circ}\text{C}$	30 min
4	4 $^{\circ}\text{C}$	保持

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 300-500 bp。当 DNA 上样量 \leq 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 300 bp。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。反应时长同 DNA 产物长度的详细关系见图 2：

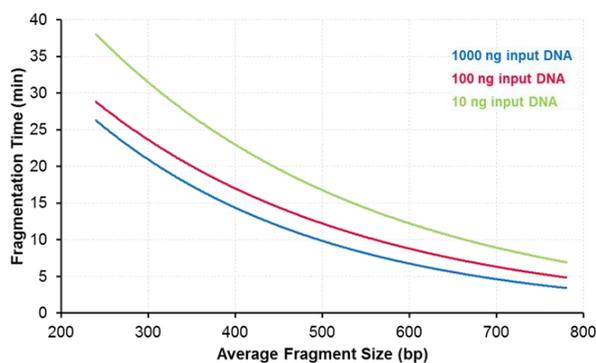


图 2. 不同上样量 DNA（溶于 1 \times TE 溶液中）反应时长与反应产物大小关系图

2) 配制反应体系（整个配制过程请在冰上进行）

根据不同的 DNA 上样量按下表所述在 200 μL 薄壁管中准备反应体系：

组份	DNA 上样量 $>10\text{ng}$	DNA 上样量 1-10 ng
10 \times 三合一缓冲液	5 μL	5 μL
Purified DNA	X μL	X μL
增强剂 (Enhancer)	2.5 μL	5 μL
Nuclease-free H ₂ O	32.5-X μL	30-X μL
Total	40 μL	40 μL

向准备好的 40 μL 反应体系中加入 10 μL 5 \times 三合一预混液，用移液器轻柔吸打 6-8 次混匀（注意不要涡旋混匀）。

- 3) 将离心管瞬时离心后，立即放入预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PCR 仪中，进入反应程序。
- 4) 当 PCR 仪中反应程序结束，样品温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 时，将样品取出并立即置于冰上。
- 5) 即刻进入接头连接步骤

1.3 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。纯化步骤如下：

- 1) 若 DNA 溶液体积小于 50 μL ，加入不含核酸酶的去离子水使其体积至 50 μL 。
- 2) 加入 90 μL 已经充分涡旋混匀的 AMPure[®] XP 磁珠（1.8 倍 DNA 溶液体积），用移液器充分吸打混匀。
- 3) 室温放置 5min 后，置磁力架上 2-4min 使磁珠贴壁。小心去除上清，勿碰磁珠。
- 4) 向离心管中加入 200 μL 80% 乙醇，使磁珠充分悬浮后置磁力架上收集磁珠，弃去上清。重复此步骤一次。
- 5) 将离心管置于磁力架上并打开管盖使磁珠晾干（约 5 min 或直到磁珠充分干燥）。
- 6) 加入 52 μL 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 至离心管中使磁珠充分悬浮后，将离心管置磁力架上 2min，待磁珠贴壁后小心吸取 50 μL 上清至新离心管中。
- 7) 使用 Quibit、Picogreen 或其他荧光定量方法确定 DNA 浓度。

2. 接头连接

2.1 向上一步得到的反应产物中加入 5 μL 通用 Adapter，通用 Adapter 的用量请参考以下表格：

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
10ng	3.0 μM	5	0.15 μM
5ng	1.5 μM	10	0.075 μM
2.5ng	0.75 μM	20	0.0375 μM
1ng	0.3 μM	50	0.015 μM

2.2 配制连接反应体系：

组份	单次反应用量 (μL)
5X连接缓冲液	20
T4 DNA 连接酶	10
Nuclease-free Water	15
Total	45

2.3 将上述配制好的50 μL 连接反应体系加入到含通用Adapter的样品溶液（步骤2.1）中，用移液器吸打混匀后瞬时离心。置PCR仪中20°C反应15min（**注意不要启动热盖**）。

2.4 使用 AMPure® XP 磁珠进行纯化片段范围在 150-350 bp 长度的文库时，最佳的磁珠与DNA 样本比例为0.8 \times （80 μL ）。应用不同磁珠时此条件可能需调整。具体步骤如下：

- a) 将AMPure® XP 磁珠置于室温平衡至少 30 min。
- b) 涡旋并使磁珠充分悬浮后，加入 80 μL AMPure® XP 磁珠至连接产物中，充分吸打混匀。
- c) 室温孵育 5 min 后，将反应管置于磁力架上。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心去除上清。
- d) 向反应管内加入 200 μL 80%乙醇洗涤磁珠，并用磁力架回收磁珠，弃上清。完成后重复此洗涤步骤一次。
- e) 将含有磁珠的反应管置磁力架上，室温开盖晾干 5-10 min 或直到其干燥为止。注意不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。
- f) 加入 22 μL Nuclease-Free Water（无核酸酶水）至离心管内并使用移液器吸打使磁珠充分悬浮。使用磁力架使磁珠贴壁后，转移 20 μL 上清至新的 PCR 管中，继续进行文库扩增。如果不立即进入下一步，请将 DNA 样本保存于-20°C。

如需进行片段筛选，请根据相应的方案来选择最适方法。如果不立即进行下一步，请将所得 DNA 样品保存于-20°C。

3. 文库扩增

- 1) 将2 \times HiFi 高保真酶预混液和文库扩增引物组份置冰上融化。待其融化后短暂涡旋混匀。
- 2) 配制 PCR 反应体系（请于冰上进行）：

组份	体积 (μL)
接头连接纯化产物	20
2 \times HiFi 高保真酶预混液	25
Index引物 i5XX* (20 μM)	2.5
Index引物 i7XX* (20 μM)	2.5
Total	50

注：*每个样本加入不同的Index引物i5XX和Index引物i7XX。QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 提供 8 种Index引物i5XX和 12种Index引物i7XX，可根据样本数量和Index选择策略自行选择，具体使用方法请参考QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 试剂盒说明书。

- 3) 按下表设置PCR 扩增程序（请确认启动热盖）：

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	1 min	1
Hold	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：

样本 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	5-6
250 ng	3-4	7-8
100 ng	4-5	9-10
50 ng	5-6	11-12
25 ng	7-8	13-14
10 ng	9-10	15-16
5 ng	11-12	17-18
1 ng	13-14	18-19

- 4) 将PCR 样品体系瞬时离心后置于 PCR 仪内，进入扩增程序。
- 5) PCR 程序结束后（样品温度降至4°C），立即使用1× (50 μL) AMPure® XP 磁珠对扩增得到的DNA 文库进行纯化。步骤如下：
 - 1) 将AMPure® XP磁珠 置室温平衡至少 30min。
 - 2) 加入 50 μL充分涡旋悬浮的AMPure® XP 磁珠至PCR 产物中，用移液器吸打混匀。
 - 3) 室温孵育 5 min 后使用磁力架收集磁珠，小心弃去上清。
 - 4) 使用 200 μL 80%乙醇洗涤磁珠。用磁力架收集磁珠，弃去上清。重复此步骤一次。
 - 5) 将离心管置磁力架上开盖干燥 5min 或至磁珠干燥即止，注意过分干燥会导致 DNA 洗脱效率降低。
 - 6) 用32μL 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 重悬磁珠后，用磁力架使磁珠贴壁。转移 30 μL上清至新离心管。

上机测序前可通过qPCR 或安捷伦2100生物分析仪对文库进行浓度检测及文库片段大小分布检测。纯化得到的 DNA 文库可保存于-20°C。

注意事项

一、关于操作

1. 请穿实验服并戴一次性手套进行实验。
2. 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。
3. 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。
4. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的一次性枪头。
5. 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。
6. 请在洁净的实验环境下实验，避免污染。

运输与保存方法

-20°C运输。

所有组分-20°C 保存，有效期 1 年。