GNM DNA 建库试剂盒(含磁珠)

使用说明书

货　号：

CX24001-S(24 rxns)

CX24001-L(96 rxns)

一、试剂盒简介

GNM DNA 建库试剂盒(含磁珠)是针对 illumina 高通量测序平台开发的酶切法建库试剂盒，试剂盒中的片段化酶可以将不同投入量的双链 DNA 根据不同时间随机片段化成不同大小的 DNA 片段，且偏好性小。与超声法片段化 DNA 相比，酶法效率更高，操作简便，缩短了建库时间。该试剂盒兼容 1-500 ng 不同来源的 DNA，同时兼容 FFPE DNA。本试剂盒内包含 DNA 分选纯化磁珠，同时提供了文库分选方案。试剂盒提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

二、试剂盒规格及组分

	组分名称	CX24001-S (24 rxns)	CX24001-L (96 rxns)	保存温度
Box 1	片段化酶	48 μL	192 μL	-25~-15 °C
	5×片段化缓冲液	192 μL	768 μL	-25~-15 °C
Box 2	末修&加 A 酶	53 μL	212 μL	-25~-15 °C
	末修&加 A 缓冲液	188 μL	750 μL	-25~-15 °C
	连接酶	48 μL	192 μL	-25~-15 °C
	连接缓冲液	480 μL	960 μL×2	-25~-15 °C
	2×PCR 扩增混合液	600 μL	1.2 mL×2	-25~-15 °C
	截短型接头(illumina 平台)	120 μL	480 μL	-25~-15 °C
Box 3	DNA 分选纯化磁珠*	1.4 mL×2	11.2 mL	2~8℃

*注：Box 3 提供的磁珠量为纯化建库用量，如需分选建库，请自行采购 DNA 分选纯化磁珠(金诺美)或者使用或其他同等功能产品。

三、保存与运输条件

Box1：-25～-15℃保存，干冰运输。

Box2：-25～-15℃保存，干冰运输。

Box3：2～8℃保存，冰袋运输。

四、自备材料

无水乙醇、ddH_2O、Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品、DNA 分选纯化磁珠(金诺美)或其他同等功能产品、illumina 平台扩增引物(含 index)(金诺美)等。

磁力架、PCR 仪、微型离心机、涡旋振荡器、Qubit 定量仪或者其他定量仪器、Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他片段分析仪、200 μL PCR 单管或者八联排管、1.5 mL 离心管等。

五、注意事项

5.1 样本和片段化

5.1.1 实验开始前，建议使用 Qubit 试剂或者其他基于荧光法的方法对 DNA 样本进行定量。

5.1.2 样本中的杂质会对建库过程产生影响，如果样本中杂质过多，建议使用 2×磁珠进行纯化，并使用 ddH_2O 进行样本洗脱。

5.1.3 片段化酶可以兼容不同来源样本，对于 FFPE 样本，建议根据降解程度选择不同片段化时间。

5.1.4 片段化对时间敏感，建议加入片段化酶后，立即放入 PCR 仪反应。

5.1.5 多样本同时进行片段化，建议在冰上将片段化酶加入 200 μL PCR 单管管盖或者置于冰上的八联排管盖中，再统一离心、混匀体系，防止因片段化时间差异导致的片段化产物差异过大。

5.1.6 片段化反应前，请 4℃预冷 PCR 仪。

5.2 接头连接

5.2.1 试剂盒不包含扩增引物，需要单独采购。金诺美可以提供相应产品，illumina 平台扩增引物(含 index)-96 反应（包含 96 次双端 index 扩增引物）、illumina 平台扩增引物(含 index)系列 A-24 反应（包含 24 次双端 index 扩增引物）、illumina 平台扩增引物(含 index)系列 B-24 反应（包含 24 次双端 index 扩增引物）。

5.2.2 接头的质量和使用浓度直接影响连接效率及文库产量。接头用量过高可能会产生较多接头二聚体；用量较低可能会影响连接效率及文库产量。表 1 列举了使用本试剂盒，不同 DNA 投入量推荐的接头稀释倍数(稀释接头使用 TE 缓冲液)。

表 1　1-500 ng DNA 投入推荐的接头使用浓度

DNA 投入量	接头稀释倍数	接头浓度
50 ng-500 ng	不稀释	15 μM
25 ng-50 ng	3 倍稀释	5 μM
10 ng-25 ng	5 倍稀释	3 μM
5 ng-10 ng	10 倍稀释	1.5 μM
1 ng-5 ng	20 倍稀释	0.75 μM

注 1：根据不同 DNA 投入量，推荐使用上表中接头浓度建库，接头稀释使用 TE 缓冲液，保证接头体积统一(5 μL)，避免错加，并避免反复冻融。

注 2：提高接头投入量在一定程度上可以提高文库产出，尤其当 DNA 投入量较低时，比方 DNA 投入量低于 25 ng。如需优化建库效率，可以在上表推荐的条件下，额外尝试几个更高接头投入量(推荐 10 倍范围内)，如接头原液浓度限制无法提高投入量，可以通过提高接头投入体积来优化。但需注意提高接头浓度可能会增加文库中接头残留，造成测序数据浪费。

5.3 磁珠纯化及分选

5.3.1 磁珠应保存于 4℃条件，使用前请平衡至室温使用。

5.3.2 磁珠使用前，请充分震荡混匀或使用移液器吸吹混匀。

5.3.3 磁珠漂洗使用新鲜配置的 80%乙醇。

5.3.4 文库是否需要进行片段分选可根据需要进行，如需分选，建议接头连接后先纯化再分选，不建议直接分选，因为连接缓冲液中含有高浓度 PEG(聚乙二醇)，会对双轮分选产生影响。

5.3.5 转移或弃去上清时，注意不要吸取磁珠，否则将影响文库质量。

5.3.6 产物洗脱前，磁珠应充分干燥，但不可使磁珠干燥开裂，磁珠干燥不充分或者过度干燥都将影响建库效果。

5.4 文库扩增

文库扩增需要严格控制循环数。循环数不足，文库产量偏低；循环数过高，将导致文库偏好性增加、重复度增加、扩增突变累积等情况。

5.5 其他注意事项

5.5.1 本试剂盒仅供科研使用，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作。

5.5.2 避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。

5.5.3 反应液配置时应尽量避免产生气泡，并注意防止漏液。

5.5.4 PCR 产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，从而影响实验结果的准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。

5.5.5 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。

5.5.6 加样所用的移液器需要定期检测，保证加样的准确性。

六、操作步骤

6.1 DNA 片段化

6.1.1 将 5×片段化缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.1.2 将片段化酶置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.1.3 将 PCR 仪预冷至 4℃。

6.1.4 在置于冰上的 PCR 管中配置表 2 中的体系：

表 2　DNA 片段化体系

试剂	体积
DNA*	X μL
5×片段化缓冲液	8 μL
片段化酶	2 μL
ddH_2O	UP to 40 μL
Total	40 μL

*注：DNA 应溶解于 ddH_2O 中，如果 DNA 不是溶解于 ddH_2O 中，建议使用 2×磁珠进行纯化后溶解于 ddH_2O 中再进行片段化。

6.1.5 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.1.6 立即将 PCR 管放入预冷的 PCR 仪中，运行表 3 程序(**热盖温度 85℃**)：

表 3　DNA 片段化程序

温度	时间
4℃	1 min*
32℃	5-20 min**
75℃	15 min
4℃	∞

*注 1：DNA 片段化时，为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4℃，待模块温度降至 4℃时，将 PCR 管放入 PCR 仪。

**注 2：使用 Human Blood gDNA 测试，片段化时间为 5-10 min，接头连接后 0.8×磁珠纯化，所得文库主峰在 250-650 bp，如果需要获得其它文库片段范围，可根据具体样本类型对片段化时间进行适当调整。

注 3：反应结束后，建议立即进行末端修复/加 A 步骤。

6.2 末端修复/加 A

6.2.1 将末修&加 A 缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.2.2 将末修&加 A 酶置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.2.3 将片段化结束的 PCR 管置于冰上，配置表 4 中的体系：

表 4　末端修复/加 A 体系

试剂	体积
片段化后的 DNA	40 μL
末修&加 A 缓冲液	7.8 μL
末修&加 A 酶	2.2 μL
Total	50 μL

6.2.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.2.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 5 程序(热盖温度 105℃)：

表 5　末端修复/加 A 程序

温度	时间
37℃	20 min
65℃	20 min
4℃	∞

6.3 接头连接

6.3.1 将连接缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.2 将连接酶置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.3 将末端修复/加 A 结束的 PCR 管置于冰上，配置表 6 中的体系(不同 DNA 投入量使用接头浓度及稀释方式见第 2 页表 1)：

表 6　接头连接体系

试剂	体积
末端修复/加 A 产物	50 μL
连接缓冲液*	20 μL
连接酶	2 μL
截短型接头(illumina 平台)**	5 μL
ddH_2O	3 μL
Total	80 μL

注 1：以上试剂配置时置于冰上操作，连接缓冲液、连接酶可配置预混液，但截短型接头(illumina 平台)需要单独添加，以免接头自连。

*注 2：连接缓冲液比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并短暂离心后使用。

**注 3：截短型接头(illumina 平台)投入量保持 5 μL，避免加错体积，低投入量接头稀释体系见第 2 页表 1。

6.3.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.3.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 7 程序(热盖关闭)：

表 7　接头连接程序

温度	时间
23℃	15 min*
4℃	∞

*注：连接效率不佳时，可延长连接时间至 30 min。

6.4 连接产物纯化或分选

6.4.1 连接产物纯化

1) 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。

3) 向连接产物中加入 64 μL(0.8×) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

4) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

5) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6) 重复步骤 5。

7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

8) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 21 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

9) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 20 μL 上清至干净的 PCR 管中。

注 1：此步骤后可以暂停，纯化后的产物可以暂存于 4℃/-20℃，保存于-20℃避免反复冻融，尽快进行后续步骤。

注 2：如文库不需要分选，直接进行 6.5 文库扩增步骤；如果进行文库分选，则接头连接后直接进行 6.4.2 或者 6.4.3 连接产物分选步骤。

6.4.2 连接产物分选(先纯化再分选)

1) 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。

3) 向连接产物中加入 64 μL(0.8×) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

4) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

5) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6) 重复步骤 5。

7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现

哑光。

8) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 105 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

9) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 100 μL 上清至干净的 PCR 管中。

10) 向 100 μL 上清中加入 65 μL(0.65×) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

11) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 160 μL 上清到干净的 PCR 管中，注意不要吸到磁珠。

12) 向转移后的上清中加入 20 μL(0.2×) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

13) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

14) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

15) 重复步骤 14。

16) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

17) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 21 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

18) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 20 μL 上清至干净的 PCR 管中。

注：此步骤后可以暂停，分选后的产物可以暂存于 4℃/-20℃，保存于-20℃避免反复冻融，尽快进行后续步骤。

6.4.3 连接产物分选(直接分选)

1) 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。

3) 接头连接反应结束后，加入 85 μL ddH_2O，补足体系至 165 μL。

4) 向补足体积后的连接产物中加入 49.5 μL DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

5) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 210 μL 上清到干净的 1.5 mL/0.5 mL 离心管中，注意不要吸到磁珠。

6) 向转移后的上清中加入 25 μL DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

7) 将 1.5 mL/0.5 mL 离心管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

8) 保持 1.5 mL/0.5 mL 离心管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

9) 重复步骤 8。

10) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

11) 将 1.5 mL/0.5 mL 离心管从磁力架上取出，加入 21 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

12) 将 1.5 mL/0.5 mL 离心管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 20 μL 上清至干净的 PCR 管中。

注：此步骤后可以暂停，分选后的产物可以暂存于 4℃/-20℃，保存于-20℃避免反复冻融，尽快进行后续步骤。

6.5 文库扩增

6.5.1 将 illumina 平台扩增引物(含 index)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.5.2 将 2×PCR 扩增混合液置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.5.3 将纯化或分选后的连接产物置于冰上，配置表 8 中的体系：

表 8　文库扩增体系

试剂	体积
连接产物	20 μL
2×PCR 扩增混合液	25 μL
D5XX Primer	2.5 μL
D7XX Primer	2.5 μL
Total	50 μL

6.5.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.5.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 9 程序(热盖温度 105℃)：

表 9　文库扩增程序

温度	时间	循环
98℃	2 min	1
98℃	20 sec	X*
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	2 min	1
4℃	∞	1

*注：通常 PCR 循环数需要根据投入量不同进行调整，具体循环数见下表。

表 10　文库扩增推荐循环数

DNA 投入量	1 μg 文库产量推荐循环数*
500 ng	3-4

200 ng	4-5
100 ng	5-6
50 ng	6-7
25 ng	7-10
10 ng	9-11
5 ng	10-14
1 ng	12-15

*注 1：以上 PCR 循环数推荐为连接产物纯化后扩增循环数。

*注 2：连接产物分选后扩增，扩增循环相应增加 1-2 个循环。

*注 3：FFPE 降解程度严重样本建库，扩增循环相应增加 1-3 个循环。

6.6 文库扩增产物纯化

6.6.1 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

6.6.2 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。

6.6.3 向 PCR 产物中加入 50 μL(1×) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

6.6.4 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.6.5 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6.6.6 重复步骤 6.6.5。

6.6.7 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

6.6.8 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 31 μL ddH_2O 或者 TE Buffer，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

6.6.9 将 PCR 管短暂离心并放置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 30 μL 上清至干净的管中，产物保存于-20℃，避免反复冻融。

6.7 文库质检

6.7.1 使用 Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品对文库进行定量。

6.7.2 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他片段分析仪对文库进行片段分析。

七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。