

## Universal DNaseq Library Prep Kit

AT4106-01/02/03 使用说明书

### 产品简介

Universal DNaseq Library Prep Kit 是针对 illumina 测序平台开发的一款通用型 DNA 文库构建试剂盒。试剂盒极大的简化了 DNA 小片段文库构建过程，末端修复后直接接头连接反应，显著缩短了文库构建的时间。仅需 3.5h 即可将 1~50ng 片段化处理后的 DNA 构建成为高质量的 DNA 文库。试剂盒操作简单，极大的避免了繁杂操作带来的误差，构建的文库均一性高。

### 试剂盒组成

| 产品名称             | AT4106-03 |        |        | 保存条件 |
|------------------|-----------|--------|--------|------|
|                  | (6 次)     | (24 次) | (96 次) |      |
| DNaseq Buffer I  | 42 uL     | 168 uL | 672 uL | -20℃ |
| DNaseq Enzyme I  | 15 uL     | 60 uL  | 144 uL | -20℃ |
| DNaseq Buffer II | 170 uL    | 700 uL | 3 mL   | -20℃ |
| DNaseq Enzyme II | 6 uL      | 24 uL  | 96 uL  | -20℃ |
| DNaseq ADT       | 12 uL     | 48 uL  | 192 uL | -20℃ |
| DNaseq PCR Mix   | 150 uL    | 600 uL | 2.4 mL | -20℃ |

### 注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
4. DNA 浓度需使用 Qubit 测定，起始 DNA 量测定不准确，会影响文库得率。
5. 实验所用磁珠应提前 30 分钟自 4℃环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
6. 80%乙醇需现配现用，用其清洗磁珠后，需清除干净，避免对后续反应产生影响。

### 需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-free H<sub>2</sub>O；AMPure XP beads 或效果相同的纯化磁珠  
 200uL PCR 管；1.5mL 离心管；磁力架；

## 实验原理图

## 操作步骤

## 一，末端修复、3'端加 A：

在新的 PCR 管中配制如下反应体系：

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| 片段化 DNA 样品(1~50ng)             | X uL        |
| DNAseq Buffer I                | 7.0 uL      |
| DNAseq Enzyme I                | 2.5 uL      |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O | (40.5-X) uL |
| 总体积                            | 50.0 uL     |

注：DNAseq Buffer I 和 DNAseq Enzyme I 可配成 Mix

移液器轻轻吹打 20 次充分混匀，37°C 反应 20min，72°C 反应 20min；

|                  |         |
|------------------|---------|
| 上一步反应产物          | 50.0 uL |
| DNAseq Buffer II | 27.0 uL |
| DNAseq Enzyme II | 1.0 uL  |
| DNAseq ADT       | 2.0 uL  |
| 总体积              | 80.0 uL |

注：DNAseq Buffer II、DNAseq Enzyme II 和 DNAseq ADT 可配成 Mix

移液器轻轻吹打 20 次充分混匀，25°C 反应 15min，65°C 反应 10min；

### 三，纯化连接产物

用磁珠纯化连接产物，步骤如下：

- 1) 将室温放置 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，并吸取 80 uL 至 80 uL 连接产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，转移混和样本至新的 1.5 mL 离心管中，室温孵育 5min；
- 2) 将 1.5 mL 离心管短暂离心并置于磁力架上，放置 5min，待溶液澄清，移除上清；
- 3) 保持离心管始终处于磁力架中，加入 200 uL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；
- 4) 重复步骤 3，总计漂洗两次；
- 5) 保持离心管始终处于磁力架中，开盖干燥 5min；
- 6) 将离心管从磁力架中取出，加入 23uL Nuclease-free H<sub>2</sub>O 洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀；
- 7) 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清吸取 21uL 上清至干净的 200uL PCR 管中，待用。

### 四，PCR 扩增：

在新的 PCR 管中配制如下反应：

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 纯化产物                    | 21.0 uL |
| DNAseq PCR Mix          | 25.0 uL |
| DNAseq-i5 PCR Primer N* | 2.0 uL  |
| DNAseq-i7 PCR Primer N* | 2.0 uL  |
| 总体积                     | 50.0 uL |

\*DNAseq Library PCR Primers Kit 提供多种 Primers，可根据样本数量选购。

| 温度   | 时间   | 循环数         |
|------|------|-------------|
| 95°C | 30s  | } n* Cycles |
| 95°C | 15s  |             |
| 60°C | 15s  |             |
| 72°C | 30s  |             |
| 72°C | 5min |             |
| 4°C  | ∞    |             |

\*循环数可根据样本起始量进行调整，调整范围为 9~12。

反应结束后取出，进行产物筛选。

### 五、文库片段筛选：

**文库片段大小筛选采用两轮磁珠捕获操作，本方案实验结果的文库目的片段大小为 400~600bp。**

- 1) 使用 Nuclease-free H<sub>2</sub>O 将 PCR 产物补足至 100uL;
- 2) 将室温放置 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，吸取 65 uL 至上游产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，将混合样本转移至一个 1.5mL 的离心管，室温孵育 5 分钟；
- 3) 将 1.5mL 离心管瞬时低速离心并置于磁力架上，室温放置 10min，待溶液澄清，转移上清至一个新的 1.5mL 离心管中，丢弃磁珠；
- 4) 向上清中加入 10uL 的 AMPure XP beads，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10min；
- 5) 将 1.5mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清移除上清；
- 6) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架中，加入 200uL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；
- 7) 再次加入 200uL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，瞬时低速离心，室温孵育 30s 后移除上清；
- 8) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min；将 EP 管从磁力架中取出，加入 16uL Nuclease-free H<sub>2</sub>O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀；
- 9) 将 1.5mL 离心管瞬时低速离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取 15uL 上清至干净的 200uL PCR 管中；

### 六、文库质检

文库质检分为两方面，定性检测和定量检测

文库的定性检测，推荐使用凝胶电泳或者 Agilent 生物分析仪等方案对文库进行检测；文库的定量检测，推荐使用 Realtime PCR 对文库进行检测。

### 文库结构

Universal DNAseq Library Prep Kit 的文库结构如下：

5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-nnnnnn-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACXXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXXX 为 i5 PCR Primer 序列