

cfDNAseq Library Prep Kit

AT4109-01/ 02/03 使用说明书

产品简介

cfDNAseq Library Prep Kit 是针对 illumina 测序平台开发的循环游离 DNA (cfDNA) 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 1~10ng cfDNA 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	AT4109-01			保存条件
	(6 次)	(24 次)	(96 次)	
DNAseq Buffer I	42 uL	168 uL	672 uL	-20°C
cfDNAseq Enzyme I	9 uL	36 uL	144 uL	-20°C
DNAseq Buffer II	170 uL	700 uL	3 mL	-20°C
cfDNAseq Enzyme II	6 uL	24 uL	96 uL	-20°C
DNAseq cf-ADT	12 uL	48 uL	192 uL	-20°C
DNAseq PCR Buffer	60 uL	240 uL	960 uL	-20°C
dNTP(2.5 mM)	24 uL	96 uL	384 uL	-20°C
DNAseq -PCR Enzyme	3 uL	12 uL	48 uL	-20°C

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°C 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 H₂O； 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，末端修复加 A：

在新的 PCR 管中配制如下反应体系：

cfDNA 样品(1~10ng)	X uL
DNAseq Buffer I	7.0 uL
cfDNAseq Enzyme I	1.5 uL
Nuclease-free H ₂ O	(41.5-X) uL
总体积	50.0 uL

注：DNAseq Buffer I 和 cfDNAseq 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
cfDNAseq Enzyme II	1.0 uL
DNAseq cf-ADT	2.0 uL
总体积	80.0 uL

注：DNAseq Buffer II、cfDNAseq 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 64 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 5 分钟；
- 2) 将反应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 33uL Nuclease-free H₂O 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 31.5uL 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：

纯化后的连接产物	31.5 uL
DNAseq PCR Buffer	10.0 uL
dNTP(2.5 mM)	4.0 uL
DNAseq-i5 PCR Primer N*	2.0 uL
DNAseq-i7 PCR Primer N*	2.0 uL
DNAseq -PCR Enzyme	0.5 uL
总体积	50.0 uL

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

95°C	15s	} n* Cycles
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 9~11

反应结束后取出，进行产物纯化。

五、PCR 产物纯化：

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 50 uL 至 50 uL PCR 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) 将反应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 16uL Nuclease-free H₂O 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 15uL 上清至干净的 200uL PCR 管中，待用。

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

cfDNAseq Library Prep Kit 的文库结构如下：

5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCT-nnn
 nnnn-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 i5 PCR Primer 序列

XXXXXXXX 为 i7 PCR Primer 序列