

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 (dsDNA) 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 Fragment Enzyme	48 μL	192 μL	-25~15 °C
	5×片段化缓冲液 5×Fragment Buffer	192 μL	768 μL	-25~15 °C
Box 2	末端修&加A酶 End Rep&A-Tail Enzyme	53 μL	212 μL	-25~15 °C
	末端修&加A缓冲液 End Rep&A-Tail Buffer	188 μL	750 μL	-25~15 °C
	连接酶 Ligation Enzyme	48 μL	192 μL	-25~15 °C
	连接缓冲液 Ligation Buffer	480 μL	960 μL×2	-25~15 °C
	2×PCR扩增混合液 2×PCR Amplification Mix	600 μL	1.2 mL×2	-25~15 °C
	截短型接头(Illumina平台) Stubby Adapter(for Illumina)	120 μL	480 μL	-25~15 °C
Box 3	DNA分选纯化磁珠* DNA Selection Beads*	1.4 mL×2	11.2 mL	2~8°C

*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 Selection Beads(GNM)或者使用或其他同等产品。

三、保存与运输条件

Box1: -25 ~ -15°C保存，干冰运输。

Box2: -25 ~ -15°C保存，干冰运输。

Box3: 2 ~ 8°C保存，4°C冰袋运输。

四、自备材料

无水乙醇、ddH₂O、QubitTM 1 × dsDNA HS Assay Kit 或其他同等产品、DNA Selection Beads(GNM)或其他同等产品、Primer(GNM)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 \times 磁珠进行纯化，并使用 ddH₂O 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。

1.6 片段化反应前，请 4°C 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°C 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 Ligation Buffer 中含有高浓度 PEG，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×Fragment Buffer 室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。
- 6.1.2 将 Fragment Enzyme 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°C。
- 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 ×Fragment Buffer	8 μL
Fragment Enzyme	5 μL
ddH ₂ O	UP to 40 μL
Total	40 μL

*注：DNA 应溶解于 ddH₂O 中，如果 DNA 不是溶解于 ddH₂O 中，建议使用2×磁珠进行纯化后溶解于 ddH₂O 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°C)：

表3 DNA 片段化程序

温度	时间
4°C	1 min*
32°C	5-30 min**
75°C	15 min
4°C	∞

*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°C，待模块温度降至 4°C 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 0.5×磁珠纯化，所得文库主峰在 250-650bp，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 End Rep&A-Tail Buffer 室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。
- 6.2.2 将 End Rep&A-Tail Enzyme 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 DNA	40 μL
End Rep&A-Tail Buffer	7.8 μL
End Rep&A-Tail Enzyme	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°C):

表5 末端修复/加 A 程序

温度	时间
37°C	20 min
65°C	20 min
4°C	∞

6.3 接头连接

6.3.1 将 Ligation Buffer 室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.2 将 Ligation Enzyme 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表1)：

表6 接头连接体系

试剂	体积
末端修复/加 A 产物	50 μL
Ligation Buffer*	20 μL
Ligation Enzyme	2 μL
Stubby Adapter**	5 μL
ddH ₂ O	3 μL
Total	80 μL

注1：以上试剂配置时置于冰上操作，Ligation Buffer、Ligation Enzyme 可配置预混液，但 Stubby Adapter 需要单独添加，以免接头自连。

*注2：Ligation Buffer 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：本试剂盒适用于 50-500 ng 基因组建库，使用时 Stubby Adapter 不需要稀释。

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°C	15 min*
4°C	∞

*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 Selection Beads 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 Selection Beads 混匀。
- 3) 向连接产物中加入 40 μL(0.5×) DNA Selection Beads，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 ddH2O，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°C/-20°C，保存于-20°C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 连接产物分选步骤。

6.4.2 连接产物分选

- 1) 将 DNA Selection Beads 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 Selection Beads 混匀。
- 3) 向连接产物中加入 40 μL(0.5×) DNA Selection Beads，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 μ L 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 μ L ddH₂O，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 5min)，小心转移 100 μ L 上清至干净的 PCR 管中。
- 10) 向 100 μ L 上清中加入 70 μ L(0.7 \times) DNA Selection Beads，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 165 μ L 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 μ L(0.2 \times) DNA Selection Beads，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 μ L 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 μ L 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 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2min。
- 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 μ L 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°C/-20°C，保存于-20°C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 μ L ddH₂O，补足体系至 165 μ L。
- 4) 向补足体积后的连接产物中加入 49.5 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

光。

11) 将 1.5 mL/0.5 mL 离心管从磁力架上取出，加入 21 μL ddH₂O，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°C/-20°C，保存于-20°C避免反复冻融，尽快进行后续步骤。

6.5 文库扩增

6.5.1 将 GNM Primer 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 Amplification Mix 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 Amplification Mix	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°C)：

表9 文库扩增程序

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

*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 Selection Beads 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 Selection Beads 混匀。

6.6.3 向 PCR 产物中加入 50 μL(1×) DNA Selection Beads，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 ddH₂O 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°C，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。