

# **GNM DNA 建库试剂盒（不含磁珠）**

## **使用说明书**

货 号:

**CX24002-S(24 rxns)**

**CX24002-L(96 rxns)**

## 一、试剂盒简介

GNM DNA 建库试剂盒(不含磁珠) 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 50-500 ng 不同来源的 DNA, 同时兼容 FFPE DNA。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	CX24002-S (24 rxns)	CX24002-L (96 rxns)	保存温度
Box 1	Fragment Enzyme	120μL	480μL	-25~-15 °C
	5×Fragment Buffer	192μL	768μL	-25~-15 °C
Box 2	End Rep&A-Tail Enzyme	53μL	212μL	-25~-15 °C
	End Rep&A-Tail Buffer	188μL	750μL	-25~-15 °C
	Ligation Enzyme	48μL	192μL	-25~-15 °C
	Ligation Buffer	480μL	960μL×2	-25~-15 °C
	2×PCR Amplification Mix	600μL	1.2mL×2	-25~-15 °C
	Stubby Adapter(for Illumina)	120μL	480μL	-25~-15 °C

## 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。

## 四、自备材料

无水乙醇、ddH<sub>2</sub>O、Qubit™ 1 × dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品、DNA Selection Beads(GNM) 或其他同等功能产品、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×磁珠进行纯化, 并使用 ddH<sub>2</sub>O 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  $\mu$ L 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

试剂盒不包含扩增引物，需要单独采购。GNM 可以提供相应产品，GNM Primer-96(for Illumina)（包含 96 次双端 Index 扩增引物）、GNM Primer-24A(for Illumina)（包含 24 次双端 Index 扩增引物）、GNM Primer-24B(for Illumina)（包含 24 次双端 Index 扩增引物）。

## 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℃。

6.1.4 在置于冰上的 PCR 管中配置表 1 中的体系：

表 1 DNA 片段化体系

试剂	体积
Input DNA*	X μL
5 × Fragment Buffer	8 μL
Fragment Enzyme	5 μL
ddH <sub>2</sub> O	UP to 40 μL
Total	40 μL

\*注：Input DNA 应溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中，如果 DNA 不是溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中，建议使用 2×磁珠进行纯化后溶解于 ddH<sub>2</sub>O 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 2 程序(热盖温度 85℃)：

表 2 DNA 片段化程序

温度	时间
4℃	1 min*
32℃	5-30 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 0.5×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 3 中的体系：

表 3 末端修复/加 A 体系

试剂	体积
片段化后 DNA	40 $\mu$ L
End Rep&A-Tail Buffer	7.8 $\mu$ L
End Rep&A-Tail Enzyme	2.2 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

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 4 程序(热盖温度 105℃)：

表 4 末端修复/加 A 程序

温度	时间
37℃	20 min
65℃	20 min
4℃	$\infty$

## 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 5 中的体系：

表 5 接头连接体系

试剂	体积
末端修复/加 A 产物	50 $\mu$ L
Ligation Buffer*	20 $\mu$ L
Ligation Enzyme	2 $\mu$ L
Stubby Adapter**	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L
Total	80 $\mu$ L

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 6 程序(热盖关闭)：

表 6 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 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  $\mu\text{L}$  (0.5 $\times$ ) 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。
- 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  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5。
- 7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10  $\mu\text{L}$  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 21  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，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  $\mu\text{L}$  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 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  $\mu\text{L}$  (0.5 $\times$ ) 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。
- 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  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5。

- 7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，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  $\mu\text{L}$  上清至干净的 PCR 管中。
  - 10) 向 100  $\mu\text{L}$  上清中加入 70  $\mu\text{L}$ (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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ (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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，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  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$ /–20 $^{\circ}\text{C}$ ，保存于–20 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times$ 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 7 中的体系：

表 7 文库扩增体系

试剂	体积
连接产物	20 $\mu\text{L}$
2 $\times$ PCR Amplification Mix	25 $\mu\text{L}$
D5XX Primer	2.5 $\mu\text{L}$
D7XX Primer	2.5 $\mu\text{L}$
Total	50 $\mu\text{L}$

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 8 程序(热盖温度 105℃)：

表 8 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 9 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 ddH<sub>2</sub>O 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  $\mu$ L 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  $\times$  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。