

# 一步法DNA快速建库试剂盒 (50-200ng)

使用说明书



# 目录

一、产品介绍 .....	1
二、产品组分 .....	1
三、保存条件 .....	1
四、样本要求 .....	1
五、自备材料 .....	1
六、注意事项 .....	2
七、实验流程概要 .....	2
八、操作步骤 .....	2
8.1 DNA酶切打断与修复 .....	2
8.2 接头连接 .....	3
8.3 连接产物纯化(0.60×纯化) .....	4
8.4 文库扩增 .....	4
8.5 扩增产物长度分选 .....	5
8.6文库质量检测 .....	7
九、实验示例 .....	7
9.1不同投入量建库实验 .....	7
9.2不同物种建库实验 .....	7
9.3不同降解程度DNA建库 .....	8

## 一、产品介绍

一步法DNA快速建库试剂盒是一款适配MGI高通量测序平台的DNA建库试剂盒,本试剂盒主要针对50-200ng常规物种DNA建库,与传统的建库法比较,采用高质量的片段化酶,简化了操作流程,将片段化模块与末端修复模块合二为一,极大的降低了建库的时间和成本,2.5h即可完成建库流程,支持适配自动化建库设备(MGI SP-960,诺唯赞VNL-96P)。试剂盒中所有试剂都经过严格的质量控制,最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

## 二、产品组分

产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色

组分名称	24T	96T
○ YZ-Frag Mix	36 $\mu$ L	144 $\mu$ L
○ 4 $\times$ Frag Buffer	360 $\mu$ L	1440 $\mu$ L
○ YZ-Re Enzyme	24 $\mu$ L	96 $\mu$ L
● YZ- Ligase	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● 5 $\times$ YZ-Ligation Buffer	144 $\mu$ L	576 $\mu$ L
● YZ-S7 Enzyme	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● 5 $\times$ YZ-S7 Buffer	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L

## 三、保存条件

-30 ~ -15 $^{\circ}$ C保存。

## 四、样本要求

推荐使用完整度较好(无明显降解或轻微降解)且纯度良好(OD260 / OD280=1.8 ~ 2.0, OD260 / OD230>2.0)的高质量基因组DNA。

DNA 储存 buffer 是水,若 DNA 提取过程中带入其他复杂成分(高盐离子/蛋白/二价阳离子/ EDTA/ EGTA),建议在酶切打断之前使用 2 倍体积磁珠进行纯化,用水洗脱,回收率约 90%。

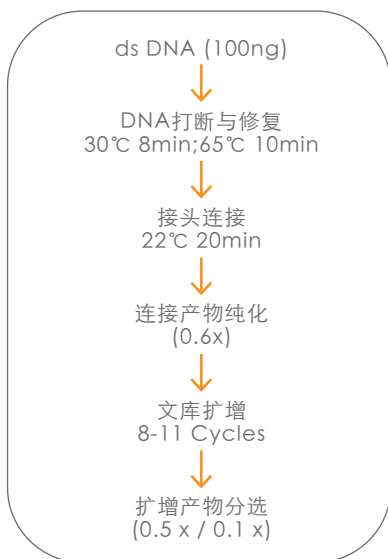
## 五、自备材料

磁力架、PCR扩增仪、DNA Clean Beads（推荐Vazyme DNA Clean Beads; N411）、低吸附 EP管、PCR管、无水乙醇、DEPC水、DNA Adapters for MGI、PCR Primer Mix。

## 六、注意事项

受样本、方案、设备、操作等诸多因素影响，文库构建流程参数可能需要根据实际情况进行调整。

## 七、实验流程概要



## 八、操作步骤 (Input DNA 100ng为例)

### 8.1 DNA酶切打断与修复

1.准备工作：将4×Frag Buffer 溶解并涡旋混匀冰上备用，YZ-Frag Mix 和 YZ-Re Enzyme 上下颠倒，用移液枪缓慢吹匀，轻弹时保证管底无试剂残留，均瞬时离心后置于冰上备用。

2.在灭菌的PCR管中配制表1反应体系：

表 1 DNA 片段化/末端修复反应体系

组分	体积( $\mu\text{L}$ )
Input DNA (100ng)	X
4×Frag Buffer	15
YZ-Frag Mix	1.5
YZ-Re Enzyme	1
ddH <sub>2</sub> O	To total 60 $\mu\text{L}$

涡旋振荡 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底置于冰上。

在 PCR 仪上运行表2反应程序:

表 2 DNA 片段化/末端修复反应程序

温度	时间
热盖80℃	On
30℃	8 min
65℃	10 min
4℃	Hold

## 8.2 接头连接

1. Adapter 推荐使用 YZ Universal Adapter for MGI, 以100ng 为例, Adapter稀释到 2-4  $\mu\text{M}$ 后加入。

2. 将DNA Adapter、5 × YZ-Ligation Buffer 溶解并涡旋混匀冰上备用, YZ- Ligase上下颠倒, 用移液枪缓慢吹匀, 轻弹时保证管底无试剂残留, 均瞬时离心后置于冰上备用。

**勿将Adapter、Ligation Buffer和Ligase预混时间超过5 min, 易造成接头自连。**

3. 在冰上配制表3反应体系:

表 3 接头连接反应体系

组分	体积( $\mu\text{L}$ )
5×YZ-Ligation Buffer	6
YZ- Ligase	2
DNA Adapter (2-4 $\mu\text{M}$ )	5
ddH <sub>2</sub> O	17

涡旋振荡 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底置于冰上。

在 PCR 仪上运行表4反应程序:

表 4 接头连接反应程序

温度	时间
热盖80℃	On
22℃	20 min
4℃	Hold

4. 反应结束后, 瞬时离心将反应液收集至PCR管底, 向产物中加入ddH<sub>2</sub>O至总体积 100 μL。

### 8.3 连接产物纯化 (0.60×纯化)

1. 将平衡至室温的DNA Clean Beads涡旋振荡充分混匀。
2. 取60 μL (0.60×) 磁珠至100 μL 连接产物中, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育5 min。
3. 将PCR管瞬时离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 小心移除上清。
4. 保持PCR管在磁力架上, 加入200 μL新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育30s, 小心移除上清。
5. 重复步骤4, 总计漂洗2次。
6. 将PCR管瞬时离心, 置于磁力架上, 用10 μL 枪头彻底移除残留液体, 保持PCR管在磁力架上, 磁珠干燥至不反光(成哑光状态)。
7. 取下PCR管, 加入35 μL ddH<sub>2</sub>O, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育5 min。
8. 将PCR管瞬时离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 转移33μL 上清至新的PCR管中, -20℃保存。

### 8.4 文库扩增

1. 提前将文库扩增所需试剂从-20℃冰箱取出, 置于冰上解冻。PCR Primer Mix推荐使用YZ PCR Primer Mix for MGI。
2. 将PCR管置于冰上, 配制表5反应体系:

表 5 PCR扩增反应体系

组分	体积 (μL)
连接产物	33
PCR Primer Mix	5
5×YZ-S7 Buffer	10
YZ-S7 Enzyme	2

3.使用移液器吹打混匀或上下颠倒混匀10次瞬时离心,将PCR管置于PCR仪中,运行表6反应程序:

表 6 PCR扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖105℃	On	—1—
95℃	3 min	—1—
98℃	30 sec	} 10 cycles
60℃	15 sec	
72℃	30 sec	
72℃	5 min	—1—
4℃	Hold	—1—

4.反应结束后,瞬时离心将反应液收集至PCR管底,向产物中加入 ddH<sub>2</sub>O至总体积100 μL。

## 8.5 扩增产物长度分选

1. 将平衡至室温的DNA Clean Beads涡旋振荡充分混匀。
2. 根据 DNA 片段长度要求,参考表7加入分选磁珠。

表7 磁珠文库分选推荐比例

DNA文库插入片段大小	200-250bp	250-300bp	300-350bp	300-450bp	450-500bp
DNA文库大小	400-450bp	450-500bp	500-550bp	550-600bp	600-650bp
第一轮体积(Beads:DNA)	0.55×	0.52×	0.50×	0.45×	0.40×
第二轮体积(Beads:DNA)	0.15×	0.10×	0.15×	0.15×	0.15×

【注】:表中“×”表示样品 DNA 体积。如文库插入片段长度为 250 bp,样品 DNA 体积为 100 μL,则第一轮分选磁珠使用体积为 0.55×100 μL=55 μL;第二轮分选磁珠使用体积为 0.15×100 μL=15 μL;

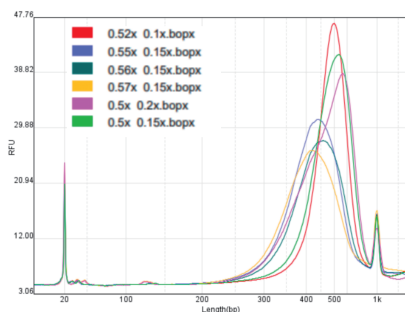


图1: 不同分选比例, 对应的DNA文库大小

以 T7测序仪器, 插入片段300bp 左右为例, 选择  $0.52 \times / 0.1 \times$  分选比例, 其余的参照表7推荐的双轮磁珠分选比例

3. 取52  $\mu\text{L}$  ( $0.52 \times$ ) 磁珠至100  $\mu\text{L}$  扩增产物, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育5 min。
4. 取新的PCR管, 加入10  $\mu\text{L}$  ( $0.1 \times$ ) 磁珠待用。
5. 将PCR管瞬时离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 小心转移上清至分好磁珠的离心管中, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育5 min。
6. 将PCR管瞬时离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 小心移除上清。
7. 保持PCR管在磁力架上, 加入200  $\mu\text{L}$  新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育30 s, 小心移除上清。
8. 重复步骤7, 总计漂洗2次。
9. 将PCR管瞬时离心, 置于磁力架上, 用10  $\mu\text{L}$  枪头彻底移除残留液体, 保持PCR管在磁力架上, 磁珠干燥至不反光(成哑光状态)。
10. 取下PCR管, 加入21  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育5 min。
11. 将PCR管简短离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 转移20  $\mu\text{L}$  上清至新的PCR管中,  $-20^\circ\text{C}$  保存。文库大小如图2所示。

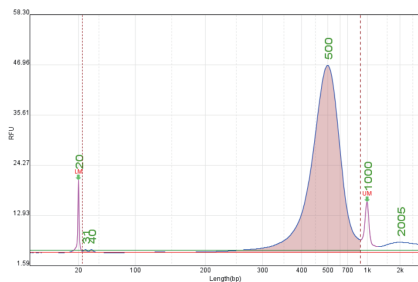


图2: Qsep100文库质量分析

## 8.6文库质量检测

1. 文库浓度检测可使用:基于双链DNA荧光染料的方法,如Qubit®、PicoGreen®等。
2. 文库长度分布检测:可通过 Agilent Bioanalyzer 5300、Qsep100等设备进行检测。
3. 文库产出参照表8(Input DNA 100 ng)。

表8文库产出

扩增循环数	8-11
文库产出量 (分选后, ng)	500-1000

## 九、实验示例

### 9.1不同投入量建库实验

以常规 gDNA 为模板,投入量从 50-200 ng,使用本试剂盒构建文库,以相同的实验条件,统一酶切 8 min,循环数10个,100 ng 投入量的 gDNA 建库产量可达到 1000ng,且文库大小均一如图3:

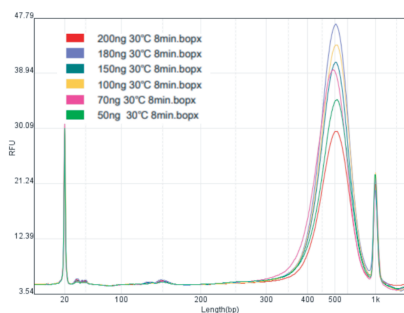


图3: 不同投入量, DNA文库分布

### 9.2不同物种建库实验

以常见动植物样本 gDNA 为模板,统一100 ng 投入量,使用本试剂盒构建文库,酶切8 min,10个循环数,在相同的建库条件下得到的文库大小均一如图4,产量均能得到800ng:

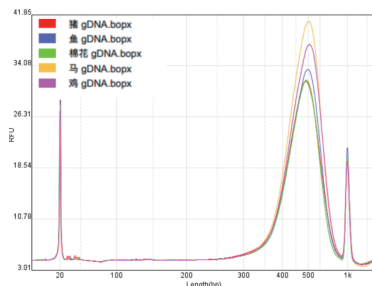


图4: 不同物种建库结果

### 9.3 不同降解程度DNA建库

本试剂盒能做到不同降解程度的DNA, 在相同的实验条件下建库, 得到的文库大小一致。以不同降解程度的DNA为模板, 100 ng投入量使用本试剂盒构建文库, 酶切8 min, 10个循环数, 分选比例为  $0.5 \times / 0.1 \times$ , 可以得到主峰在 450 bp 左右的文库, 文库大小均一, 如图5:

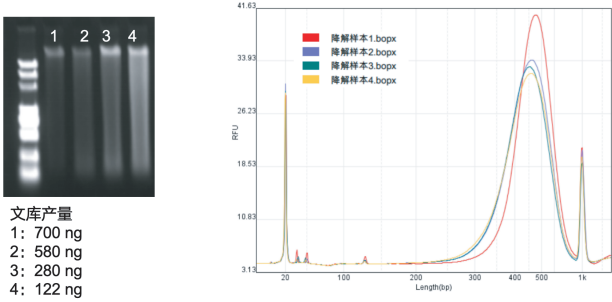


图5: 不同降解程度DNA建库结果

# 基因科技 影领未来

武汉影子基因科技有限公司  
Wuhan Yingzi Gene Technology Co., Ltd

官网：[www.yingzogene.com](http://www.yingzogene.com)

电话：027-5921-6838

邮箱：[market@yingzogene.com](mailto:market@yingzogene.com)

地址：湖北省武汉市武汉软件新城3期D5栋4楼

