

xLiBPreP™一步酶切建库试剂盒 操作说明书

(Cat#NC002, Version4.5)

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co., Ltd

For Research Use Only.

Not For Use in diagnostic procedures.

仅供科研使用

目录

产品概述	1
实验原理	2
产品组成	3
保存及运输条件	3
适用范围	3
注意事项	4
实验前准备	5
实验流程	7
1. 酶切打断/修复	7
2. 接头连接	9
3. 文库 PCR 富集	12
附录	15

产品概述

xLiBPreP™一步酶切建库试剂盒是一款兼容 illumina 和 MGI 高通量测序平台的通用型、快速、高效的测序文库构建试剂盒。

本产品是通过酶切法将大片段的 DNA 片段化，同时进行末端修复与 A 尾添加，中间无需纯化，可直接进行测序接头连接。本产品适用于各种样本类型，包括完整基因组 DNA（Genomic DNA）、石蜡样本 DNA（FFPE DNA）、免疫共沉淀 DNA（ChIP DNA）等，对于 DNA 不同投入量具有良好兼容性。本产品提供了简便快速的建库流程，可在 2 小时内完成建库实验，极大地缩短了操作时间，

主要实验步骤如下：

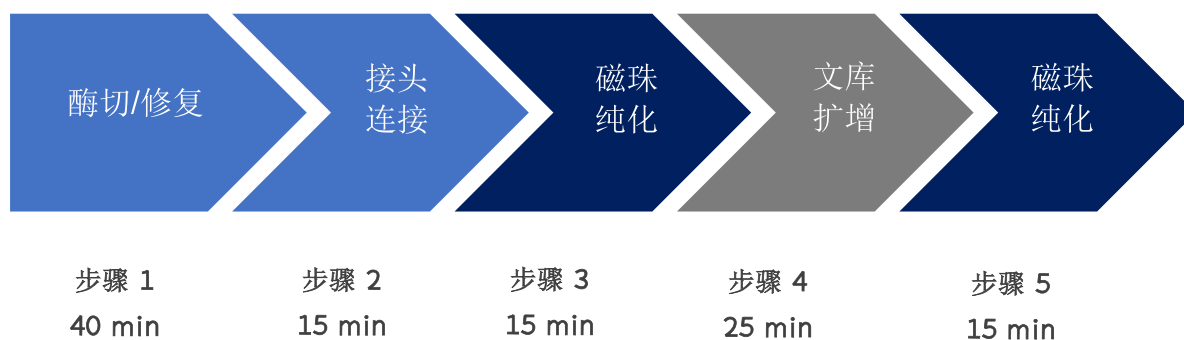


图 1. xLiBPreP™ 一步酶切建库试剂盒操作流程图

实验原理

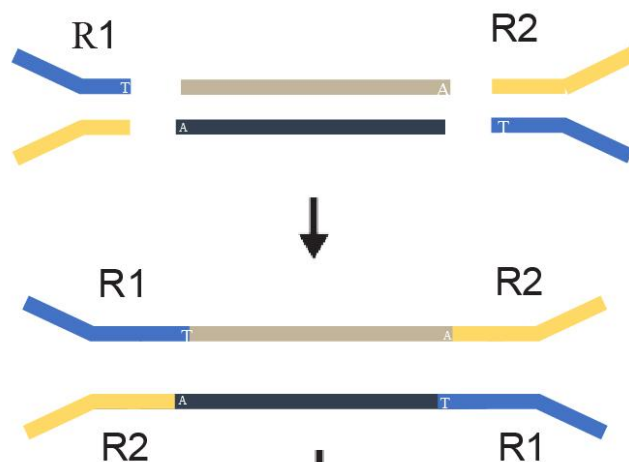
酶切法片段化 DNA



末端修复/加 A 尾



接头连接



文库扩增

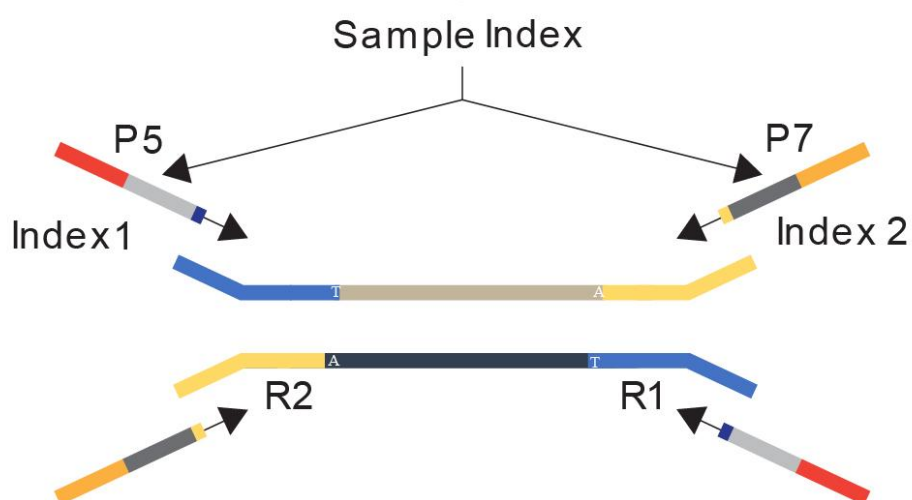


图 2. xLiBPreP™ 一步酶切建库试剂盒实验原理图

产品组成

主货号：NC002 规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns (NC002-024)	96 rxns (NC002-096)
● EFS Buffer	216 μ L	864 μ L
● EFS Enzyme Mix	240 μ L	960 μ L
● Ligation Buffer	720 μ L	2880 μ L
● Ligase Enzyme	240 μ L	960 μ L
● 2 \times HiFi Master Mix	600 μ L	2400 μ L
○ 1 \times TE Buffer	3 mL	6 mL

保存与运输条件

-30 \sim -15 $^{\circ}$ C保存， \leq 0 $^{\circ}$ C运输。

适用范围

本产品适用于 illumina / MGI 高通量测序平台的文库构建。

1. 兼容样本类型

完整基因组 DNA (Genomic DNA)、石蜡样本 DNA (FFPE DNA)、免疫共沉淀 DNA (ChIP DNA) 等。

2. DNA 起始量

1 \sim 500 ng。

3. 应用场景

全基因组测序；全外显子或其他靶向捕获测序（推荐使用 xCapSeq™ DNA 杂交捕获系统相关产品，WisGen#HC00 系列，或其它杂交捕获系统）；免疫共沉淀测序；宏基因组测序；甲基化测序。

注意事项

! 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 操作过程请注意避免核酸样本和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含核酸酶的吸头、离心管进行实验。
3. 实验开始前，请清洁操作台，确保没有核酸酶和 DNA 的污染。
4. 进行文库扩增前，请确保 PCR 仪已经调试好并处于稳定的状态。
5. 为了防止 Adapter 发生自连，Adapter 需单独添加，不可以与 Ligation Buffer 和 Ligase Enzyme 提前预混。
6. 分选磁珠使用前，请务必置于室温下平衡 30 min 后使用。
7. 为保证酶切效果，DNA 推荐溶于 1× TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)。
8. 若 DNA 溶于 1× TE Buffer，片段化体系需使用 1× TE Buffer 补齐，如用水补齐，会导致文库片段严重偏小。
9. 若 DNA 已经溶于 Nuclease-Free Water、AE 等 Low-EDTA 溶液且 DNA 浓度较低，可添加 10× TE Buffer，使反应体系在 1× TE Buffer 中进行。
10. 80%乙醇需当天配置使用，避免乙醇挥发，造成文库建库失败。
11. 不同测序平台对应的接头及引物模块不同，需根据平台选择适合的接头模块，并根据对应的说明书进行接头模块的使用。
12. 试剂盒中所有酶制剂在使用完毕后，应立即置于 -20 °C 进行保存，以免降低酶的活性，影响建库结果。
13. 实验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停实验，或者无需立即进行下游实验，可根据说明书的推荐步骤，将实验产物保存于 -20 °C 并安排后续实验。

实验前准备

1. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#MB002	xPure™ 分选磁珠	也可使用改成 Agencourt® AMPure XP Beads 进行代
WisGen#YG00 *	YWG™ Adapter & Index Primer Set	不同测序平台请选择对应货号的接头及引物系列
WisGen#QC001	xQuant™ DNA 高灵敏定量试剂盒 (适配 Qubit 平台)	用于投入 DNA 浓度及文库浓度测定
**	Nuclease-Free Water	/
**	无水乙醇	/

⬆️ * YWG™ 接头及引物模块系列产品，提供了多种模块以满足实验需求，请根据不同测序平台对应的模块进行选择。

⬆️ ** 常规实验室供应商品品牌即可。

2. 自备材料

实验仪器及耗材

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	PCR 基因扩增仪	/
*	微型离心机	/
*	涡旋振荡混匀仪	/
*	移液器	单通道或多通道
Thermo Fisher# Q33216	Qubit® 3.0 Fluorometer	可选择基于荧光染料法 DNA 定量系统的其它同类产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
Agilent#G2939AA	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system	或其它同类产品
WisGen#MR-C-16	xMag™磁力架 (0.2 mL*16 孔)	或其它同类产品
WisGen#QC001-R	xQuant™管 (适配 Qubit 平台)	可选择适配 Qubit® 荧光计的其它同类产品
WisGen#QC002-R	xQuant™检测联管 (适配 Qubit 平台)	可选择适配 Qubit® Flex 荧光计的其它同类产品
Axygen#PCR-02-C	0.2 mL 透明平盖 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的 其它同类产品
Axygen#PCR-0208-C	0.2 mL 八连排透明 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的 其它同类产品
*	1.5 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶 的产品
*	1000 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	200 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	0.5 - 10 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品

⬆ * 常规实验室供应商品牌即可。

实验流程

1. 酶切打断/修复

1.1 试剂准备

1.1.1 在开始实验前，需要明确样本的浓度以及样本是否溶于 1× TE Buffer，并对 DNA 进行准确定量。

！ 注意：确定加样 DNA 浓度至关重要，尤其是样本量低于 100 ng 时。推荐使用染料法对 DNA 浓度进行准确定量。另外，请确认 DNA 溶于哪种溶剂，溶剂不同，则采用的处理方式也略有不同。

常见应用场景中推荐的 DNA 投入量请参考下表：

应用场景	样本类型	DNA 投入量 (ng)
全基因组测序	复杂基因组	50 ~ 500
靶向捕获测序	复杂基因组	10 ~ 500
全基因组/靶向捕获测序	FFPE DNA	≥10
宏基因组测序	微生物基因组	1 ~ 500
免疫共沉淀测序	ChIP DNA	≥1


！ 注意：以上为高质量 DNA 推荐的投入量，当 DNA 质量较差时，应适当上调 DNA 的投入量。


1.1.2 将试剂盒中各组分置于冰上融化。EFS Enzyme Mix 用手指轻弹混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。

1.2 实验步骤

1.2.1 取 0.2 mL PCR 管，并按下表配制反应体系，冰上操作，待各组全部加入后，涡旋振荡混匀。


组分	体积/质量
● EFS Enzyme Mix	10 μ L
● EFS Buffer	9 μ L
DNA sample	X (200 ng)
○ 1 \times TE Buffer *	41 - X
总体积	60 μL

 * 酶切反应体系必须加入 1 \times TE Buffer 抑制酶活，否则会导致片段严重偏小。1 \times TE Buffer 可用 10 \times TE Buffer 代替，加量为 4 μ L，剩余体积可用无核酶水补足。

 **注意：**对于多个反应，请计算所需试剂的总体积，并在此基础上增加 10%，涡旋混匀，再依次分装到 PCR 管中，避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

1.2.2 按照下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置为 75 $^{\circ}$ C。

反应步骤	反应温度 ($^{\circ}$ C)	时间 (min)
1	32	6 ~ 12 *
2	65	30
3	4	∞

 * 一般无降解 gDNA，及其他质量较好的 DNA，片段化时间设在 8 ~ 10 min 最适中。FFPE 样本根据 DNA 降解程度不同，片段化时间也不同。DNA 片段在 2 kbp 以上，推荐按 5 min 进行片段化；DNA 片段轻度降解，片段在 1 ~ 2 kbp，片段化时间推荐 4 ~ 5 min；DNA 片段中度降解，片段在 400 ~ 1000 bp，片段化时间推荐在 3 ~ 4 min。DNA 投入量低于 50 ng，片段化时间可比正常 DNA 的片段化时间减少 1 ~ 3 min。

1.2.3 针对插入片段大小不同，可以参考以下片段化时间。

插入片段 (bp)	片段化时间 (min)	优化范围 (min)
450	5	3 ~ 10
300	10	8 ~ 15
200	15	10 ~ 20
150	20	20 ~ 30

1.2.4 反应液完全涡旋混匀后，将 0.2 mL PCR 管瞬时离心 30 sec，立刻置于 PCR 仪中，并启动反应程序。

! 注意：将装有反应液的 PCR 管离心后，请注意不要产生气泡，以免影响 PCR 反应。

1.2.5 反应结束后，尽快进行后续实验，在 4 °C Hold 建议不宜超过 1 h。

2. 接头连接

2.1 本产品不含接头，用户可根据不同的测序平台，选择相应的接头套装试剂盒。

产品货号	产品名称	适用测序平台
YG001	YWG™ illumina 短接头套装	illumina/GeneMind
YG002	YWG™ illumina 分子标签接头套装	illumina/GeneMind
YG004	YWG™ MGI 短接头套装（双端 Barcode）	MGI
YG005	YWG™ MGI 分子标签接头套装（双端 Barcode）	MGI
YG006	YWG™ MGI 短接头套装（单端 Barcode）	MGI
YG009	YWG™ MGI 全长接头套装（单端 Barcode）	MGI

! 注意：以上列表中产品属于建库配套系列产品（WisGen），如使用其他公司产品，请联系技术支持。

2.2 为了保证接头的连接效率和文库产量，对于低起始量样本，建议用 1× TE Buffer 稀释后进行使用，具体用量请参考下表：

Input DNA (ng)	接头稀释倍数	浓度 (μM)
≥ 50	无需稀释	15
49 ~ 25	2 倍稀释	7.5
24 ~ 10	5 倍稀释	3
9 ~ 5	10 倍稀释	1.5
< 5	20 倍稀释	0.75

！ 注意：配套 Adapter（WisGen）系列及产品原始浓度为 15 μmol/μL。

2.3 取出步骤 1.2.5 的酶切产物，加入相应用量接头，如下表所示。

组分	体积 (μL)
酶切（步骤 1.2.5）产物	60
Adapter *	3
Nuclease-Free Water	7
总体积	70

^ * 不同平台对应的接头模块不同，需根据平台选择合适的接头模块，按照说明书所示量添加。

！ 注意：为了避免 Adapter 发生自连，Adapter 需单独添加，不可以与 Ligation Buffer 和 Ligase Enzyme 预混。

2.4 按照下表所示各组分用量配制反应体系，并将配制完成的反应体系涡旋混匀后置于冰上。

组分	体积 (μL)
步骤 2.3 混液	70
● Ligation Buffer	30
● Ligase Enzyme	10
总体积	110

！ 注意：对于多个反应，请计算所需试剂的总体积，并在此基础上增加 10%，涡旋混匀，再依次分装到 PCR 管中，避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

2.5 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序如下：

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	22	15
2	4	∞

！ 注意：此步骤如果使用 PCR 仪进行反应，请不要启动热盖，否则热盖温度过高，将导致 PCR 管反应温度高于设置温度。

2.6 接头连接产物的纯化推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads，进行纯化，（如需进行分段分选，参考附录一 片段分选部分）具体步骤如下：

2.6.1 将磁珠置于室温平衡 30 min，使用前涡旋或者振荡混匀。

！ 注意：磁珠使用前，必须室温平衡 30 min，否则影响 DNA 的回收率及片段筛选。

2.6.2 接头连接程序结束后，取出 PCR 管静置 5 min，平衡至室温，向步骤 2.5 的连接产物中加入 0.8× 体积（88 μL）磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

2.6.3 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器小心吸弃上清，注意不要吸到磁珠。

2.6.4 将 PCR 管置于磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

2.6.5 重复步骤 2.6.4 一次。

2.6.6 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，放于磁力架上，用小量程的移液器小心将残留液去除，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

！ 注意：干燥至磁珠界面无明显水珠即可，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，DNA 回收率降低。

2.6.7 加入 21 μ L Nuclease-Free Water 或者 0.1 \times TE Buffer 至 PCR 管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 20 μ L 上清至新的 PCR 管中，用于后续的 PCR 富集实验。

3. 文库 PCR 富集

3.1 将 2 \times HiFi Master Mix 和 PCR Primer Mix 置于冰上融化，短暂混匀。

3.2 按照下表配制 PCR 体系，注意此步骤需于冰上操作。

组分	体积 (μ L)
纯化后的连接产物（步骤 2.6.7）	20
● 2 \times HiFi Master Mix	25
○ PCR Primer Mix *	5
总体积	50

^ * PCR Primer Mix 需与对应 Adapter 配套使用，不同平台使用接头模块不同，具体可参考不同平台对应接头模块说明书。

3.3 将步骤 3.2 中配制好的 PCR 反应液，轻柔吸打 6 ~ 8 次混匀或振荡混匀 10 sec。

！ 注意：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。

3.4 瞬时离心后将 PCR 反应管置于 PCR 仪内，按步骤 3.5 的反应程序进行扩增。

3.5 按下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置于 105 °C。

步骤	温度 (°C)	时间	循环数 (Cycles)
预变性	98	1 min	1
变性	98	10 sec	6 ~ 17 *
退火	60	30 sec	
延伸	72	30 sec	
完全延伸	72	1 min	1
Hold	4	∞	1

⬆️ * 请根据 DNA 的质量和上样量确定 PCR 循环数。一般而言，对于 100 ng、10 ng、1 ng 文库起始 DNA，在进行 PCR 富集时分别需要扩增 7、14、17 个循环。如果 DNA 质量较差（如 FFPE 样本），则建议在原有基础上再增加 1 ~ 4 个循环。

⬆️ * 循环数具体参数可参考下表：

DNA 模板量使用量 (ng)	PCR 循环数推荐 (Cycles)
1	15 ~ 17
10	12 ~ 14
25	10 ~ 11
50	9 ~ 10
100	7 ~ 9
200	6 ~ 8

3.6 当 PCR 样品温度降至 4 °C，从 PCR 仪中取出 PCR 产物进行纯化，推荐用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads 进行纯化（如需进行分段分选，参考附录 1），具体步骤如下：

3.6.1 将磁珠置于室温平衡 30 min，使用前涡旋或者振荡混匀。

⚠️ 注意：磁珠使用前，必须室温平衡 30 min，否则影响 DNA 的回收率及片段筛选。

3.6.2 扩增程序结束后，取出 PCR 管静置 5 min，平衡至室温，加入 1× 体积（50 μL）的磁珠至步骤 3.5 的扩增产物中，充分吸打混匀 30 sec。

3.6.3 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器吸弃上清，注意不要吸到磁珠。

3.6.4 在 PCR 管中，加入 200 μ L 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

3.6.5 重复步骤 3.6.4 一次。

3.6.6 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，放于磁力架上，用小量程的移液器小心去除残留的上清液，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

! 注意：干燥至磁珠界面无明显水珠，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，DNA 回收率降低。

3.6.7 加入 30 μ L Nuclease-Free Water 或者 0.1 \times TE Buffer 至 PCR 管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮。室温静置 5 min，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，将上清转移至新的 PCR 管中，用于后续实验或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

附录

1. 片段分选

1.1 DNA 文库大小为 200 bp ~ 1 kb，可参考下表所示磁珠比例用量进行分选，筛选不同片段大小的文库。

文库大小(bp)	250 bp ~350 bp	300 bp ~400 bp	400 bp ~500 bp	450 bp ~550 bp	500 bp ~600 bp	550 bp ~650 bp
第一轮磁珠比例						
(磁珠体积： DNA 体积)	0.8×	0.7×	0.6×	0.55×	0.50×	0.45×
第二轮磁珠比例						
(磁珠体积： DNA 体积)	0.2×	0.2×	0.2×	0.15×	0.15×	0.15×

！ 注意：筛选磁珠比例为磁珠体积和 DNA 体积的比值，如分选 350 bp 左右文库，DNA 体积 100 μ L，则第一轮分选磁珠使用体积 $0.7 \times 100 = 70 \mu\text{L}$ ，第二轮分选磁珠使用体积 $0.2 \times 100 = 20 \mu\text{L}$ 。

1.2 以 $0.7 \times / 0.2 \times$ 的磁珠比例为例，推荐用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads，具体步骤如下：

！ 注意：如果文库体积不足 100 μ L，需用 Nuclease-Free Water 补足，随后进行 DNA 片段筛选。

1.3 从 2 ~ 8 °C 冰箱中把磁珠取出，室温平衡至少 30 min。

！ 注意：磁珠使用前，必须在室温下放 30 min，避免影响 DNA 回收率及片段大小。

1.4 将磁珠涡旋振荡或颠倒混匀，避免因磁珠未混匀，导致纯化片段大小或者浓度出现较大误差。

1.5 按上表第一轮筛选比例加入 $0.7 \times$ 磁珠至 DNA 文库中，充分吸打混匀 30 sec 或者涡旋混匀，室温孵育 5 min。

1.6 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待液体完全澄清后，用移液器小心吸取上清，并转移至另一新的 PCR 管中。

1.7 加入第二轮 $0.2\times$ 磁珠至上清液中，用移液器吹打混匀 30 sec 或者涡旋混匀，室温孵育 5 min。

1.8 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待液体完全澄清后，用移液器小心去除上清，注意不要吸到磁珠。

1.9 加入 200 μ L 80%乙醇（现配现用），置于磁力架上 30 sec，不要吹散磁珠。

1.10 当溶液完全澄清后，用移液器小心去除上清，注意不要吸到磁珠。

1.11 重复步骤 1.9 ~ 1.10 一次。

1.12 去除上清后，可将 PCR 管放于离心机上瞬时离心 10 sec，置于磁力架上 30 sec，用移液器将上清完全去除，室温晾干 0.5 ~ 1 min，待乙醇完全挥发，磁珠界面成磨砂状，无明显水珠即可。

！ 注意：请勿过度干燥磁珠，造成磁珠龟裂，影响洗脱效率。

1.13 加入 30 μ L Nuclease-Free Water 或者 $0.1\times$ TE Buffer 至 PCR 管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min。

1.14 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器小心吸取上清，转移至新的 PCR 管中，注意不要吸到磁珠。

1.15 筛选纯化的 DNA 文库，使用 Qubit® 荧光定量仪进行定量，Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system 或其它同类产品对文库峰型进行质检，质检合格后可用于后续实验。文库于 -20°C 冰箱可保存 1 ~ 2 周。

2. 文库质检

2.1 完整基因组 DNA 样本不同酶切时间文库大小和产量。 DNA 样本类型为人外周血 DNA，投入量分别为 200 ng，32 °C 酶切时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min。使用 Qubit® 3.0 Fluorometer 对文库进行定量，及 Qsep 100 生物片段分析仪（Marker 1000 bp）进行片段大小和峰型分析结果统计如下：

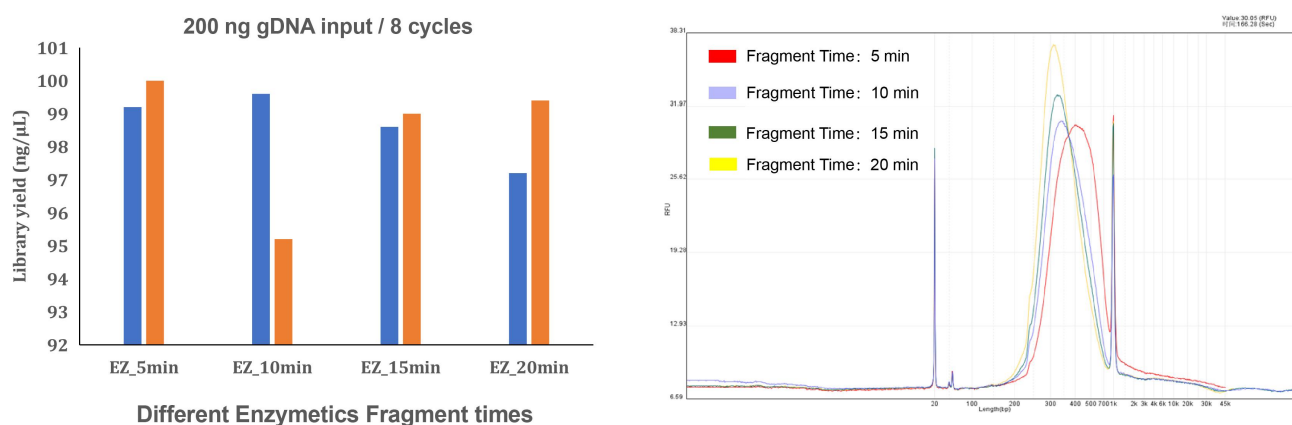


图 3. 完整基因组 DNA 样本不同酶切时间文库大小和产量

2.2 完整基因组 DNA 样本不同投入量文库大小和产量。DNA 样本类型为人外周血

DNA，投入量分别为 10 ng、50 ng、200 ng，32 °C酶切时间为 8 min。

使用 Qubit® 3.0 Fluorometer 对文库进行定量，及 Qsep100 生物片段分析仪 (marker 1000 bp) 进行片段大小和峰型分析结果统计如下：

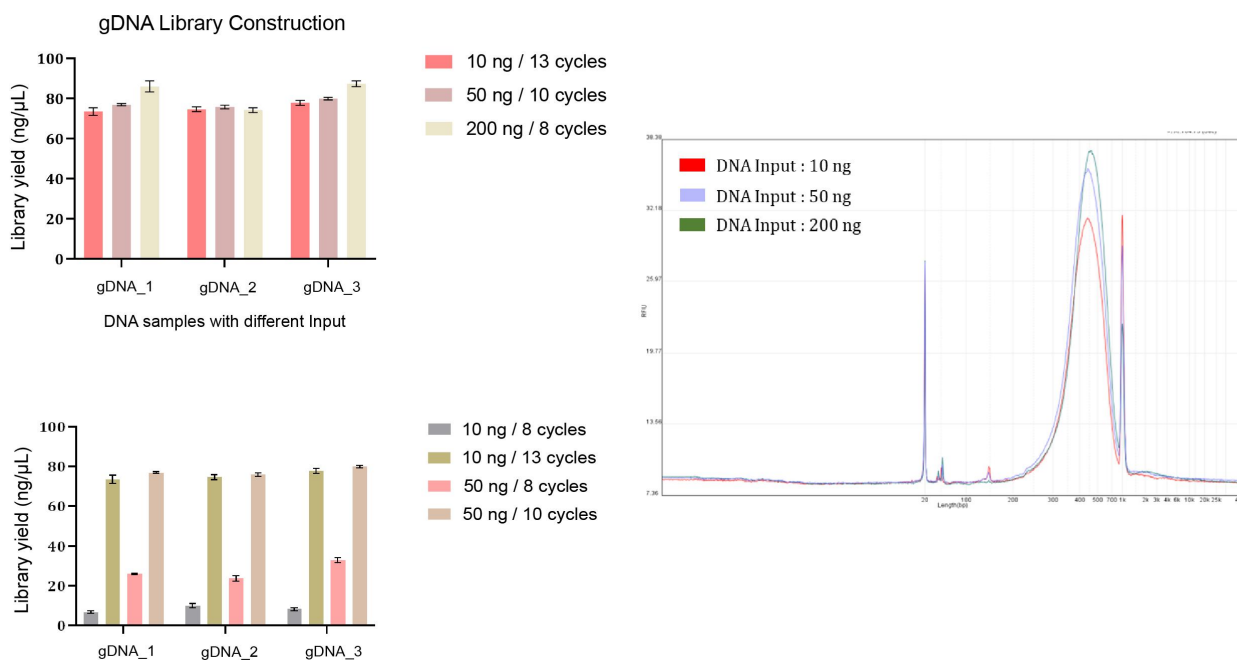


图 4. 完整基因组 DNA 样本不同投入量文库大小和产量

2.3 不同降解程度 FFPE DNA 样本文库大小和产量。 DNA 样本类型为 FFPE DNA，3 个不同程度降解样本。FFPE A 样本投入量分别为 10 ng、50 ng、200 ng，32 °C 酶切时间为 5 min。使用 Qubit® 3.0 Fluorometer 对文库进行定量，及 Qsep 100 生物片段分析仪（Marker 1000 bp）进行片段大小和峰型分析结果统计如下：

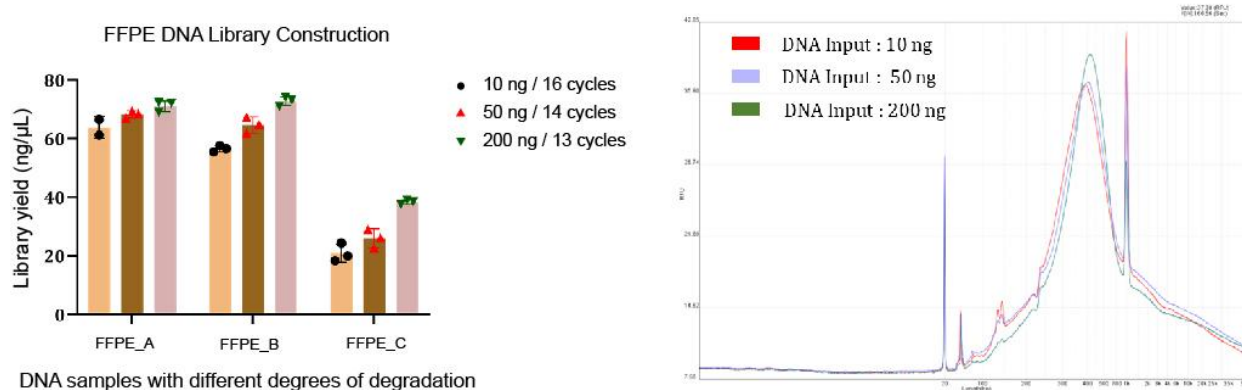


图 5. 不同降解程度 FFPE DNA 样本文库大小和产量

样本分级标准 FFPE A：DNA 主带 > 2 kbp 有明亮带不拖尾条带；FFPE B：DNA 主带低于 2 kbp，呈现中度弥散；FFPE C：DNA 主带分布在 200 ~ 500 bp，呈弥散状。

2.4 文库质检标准

2.4.1 使用 Qubit® 3.0 Fluorometer 对文库进行定量质检，文库洗脱体积为 30 μL，浓度大于 10 ng/μL。

2.4.2 推荐文库片段大小分布为 250 ~ 500 bp 之间。

欣基（杭州）生物科技有限公司

WisGen BioSciences Co., Ltd

Add：浙江省杭州市钱塘区福城路 400 号 6 幢 8 层

Service：order@wisgen.cn Web：www.wisgen.cn

