

xLiBPreP™ 酶切片段化/末端修复/加 A 尾模块 操作说明书

(Cat#NC006, Version1.4)

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

产品组成

主货号：NC006 规格：24 rxns / 96 rxns

组分	24 rxns (NC006-024)	96 rxns (NC006-096)
● EFS Buffer	216 μ L	864 μ L
● EFS Enzyme Mix	240 μ L	960 μ L
○ 1 \times TE Buffer	3 mL	6 mL

⚠ 注意：请严格按照推荐的储存条件，避免反复冻融。

保存与运输条件

-30 ~ -15 °C保存， \leq 0 °C运输。

产品概述

xLiBPreP™ 酶切片段化/末端修复/加 A 尾模块是一款针对 illumina 和 MGI 高通量测序平台设计的片段化及修复建库模块。本产品是通过片段化酶的内切酶活性，靶向切割邻近嘧啶的磷酸二酯键，产生 5' 端为磷酸基团，3' 端为羟基的多聚核苷酸，从而将基因组 DNA 片段化。同时利用末端修复酶对 DNA 缺口及凸出的末端进行修复与 A 尾添加，快速地解决酶切修复问题，无需纯化，即可进行接头连接，极大地缩短了建库时间，简化了实验操作流程。

适用范围

本产品可对 1 ~ 500 ng 的 DNA 样本进行酶切片段化、末端修复及加 A 尾添加，适用于 illumina / MGI 高通量测序平台的文库构建。


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。为保证酶切效果，DNA 推荐溶于 1× TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)。
5. 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。
6. 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。

实验前准备

1. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#NC007	xLiBPre™快速连接模块	推荐与本产品配套使用，如使用其它产品需联系技术支持
WisGen#NC004	xLiBPreP™通用高保真文库扩增试剂盒（适配 illumina）	推荐与本产品配套使用，如使用其它产品需联系技术支持
WisGen#MB002	xPure™分选磁珠	也可使用 Agencourt® AMPure XP Beads 进行代替
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	/
/	10× TE Buffer	/

 * 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。

2. 仪器设备及耗材

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	/

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	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的 DNA 定量系统的其它同 类产品
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 将试剂盒中各组份置于冰上融化。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 *	Up to 60 μ L
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 6 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 照下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置为 90 $^{\circ}$ C。

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

⬆ * 片段化时间，可根据样本提取质量进行调整，一般无降解 gDNA，及其它质量较好的 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，片段在 2 kb 以上，推荐按 5 min 进行片段化；提取片段轻度降解，片段在 1 ~ 2 kb，片段化时间推荐 4 ~ 5 min；提取片段中度降解，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。

! 注意：不可直接将产物置于 -20 °C 保存，需要尽快进行接头连接与纯化步骤。

2. 接头连接与纯化

2.1 可使用 xLiBPreP™ 快速连接模块（WisGen#NC007）与 xPure™ 分选磁珠（WisGen#MB002）直接进行后续接头连接与纯化实验。

2.2 纯化后的连接产物可直接用于后续实验或 -20 °C 保存。

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

