

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 $^{\circ}$ C保存， \leq 0 $^{\circ}$ 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 将试剂盒中各组分子置于冰上融化。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

