

xLiBPreP™ 长片段酶切模块

操作说明书

(Cat#NC013, Version1.1)

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：NC013 规格：24 rxns / 96 rxns

组分	24 rxns (NC013-024)	96 rxns (NC013-096)
● LA Smear Buffer	108 μ L	432 μ L
● LA Smear Enzyme	120 μ L	480 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™ 长片段酶切模块是一款专门针对长片段测序的酶切试剂盒模块，可对完整DNA 定向进行长片段的酶切片段化，不同于机械打断以及转座酶酶切方式，xLiBPreP长片段酶切试剂盒，酶切片段更为集中，同时无需引入外源序列，可以直接衔接传统修复加 A 建库试剂盒，无需做其他更改。

适用范围

本产品可对 50 ~ 500 ng 的 DNA 样本进行酶切片段化，可应用于长读长等测序平台。


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. 为保证酶切效果，DNA 推荐溶于 1× TE Buffer（10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0）。
6. 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。
7. 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#NC001	xLiBPre™快速建库试剂盒	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#HC011	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. DNA 片段化

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。LA Smear Enzyme 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
● LA Smear Enzyme	5 μ L
● LA Smear Buffer	4.5 μ L
DNA sample	X (300 ng)
○ 1 \times TE Buffer *	Up to 30 μ L
总体积	30 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 85 $^{\circ}$ C。

反应步骤	反应温度 ($^{\circ}$ C)	时间
1	32	10 s *
2	72	10 min
3	4	∞

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	片段化时间	优化范围
4 kb	10 s	5 ~ 10 s

 * 以上推荐片段化时间为高质量人血液基因组 DNA 所得。其他类型的高质量 DNA 样本，相同的片段化时间，所得到的片段化产物片段大小基本一致。

1.2.4 反应液完全涡旋混匀后，将 0.2 mL PCR 管瞬时离心，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。

1.3 反应结束后，推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads 进行纯化，具体步骤如下：

1.3.1 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。

1.3.2 DNA 片段化程序结束后，向步骤 1.2 的产物中加入 0.4× 体积（12 μL）磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

1.3.3 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。

1.3.4 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），弃除上清。

1.3.5 重复步骤 2.6.4 一次。

1.3.6 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，置于磁力架上，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。

1.3.7 加入 50 μL Nuclease-Free Water 或者 0.1× TE Buffer 至 0.2 mL 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 后，将反应管放置于磁力架上 2 min，使磁珠完全贴壁后，将上清转移至新的 0.2 mL PCR 管中。

2.1 二次纯化

2.1.1 加入 $0.4 \times$ 体积 (20 μ L) 的磁珠至步骤 1.3.7 的反应液中，充分吸打混匀 30 sec。

2.1.2 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。

2.1.3 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。

2.1.4 重复步骤 2.1.3 一次。

2.1.5 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。

2.1.6 加入 21 μ L Nuclease-Free Water 或者 $0.1 \times$ TE Buffer 至 0.2 mL 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 后，将反应管放置于磁力架上 2 min，使磁珠完全贴壁后，将上清转移至新的 0.2 mL PCR 管中，直接用于后续实验或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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

