

# Hieff NGS<sup>®</sup> OnePot Pro DNA Library Prep Kit V3 一步法 DNA 建库试剂盒 V3

12194ES

---

产品使用说明书

Ver. CN20240606



# 目录

产品简介 .....1

产品信息 .....1

组分信息 .....1

储存条件 .....1

注意事项 .....1

使用说明 .....4

## 产品简介

Hieff NGS® OnePot Pro DNA Library Prep Kit V3 是一款可用于 Illumina® 和 MGI® 高通量测序平台的新一代酶切法建库试剂盒。与传统的建库法比较，本品采用高质量的片段化酶，摆脱了繁琐的超声过程。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、连接模块的酶和 buffer 预混，简化了操作流程，极大地降低了建库的时间和成本，更加适合于自动化建库。本试剂盒具有更高的文库转化率，可应用于常规动植物基因组、微生物基因组等样本，同时能兼容 FFPE DNA 样本的建库。在前一代建库试剂盒的基础上，改进了片段化/末修/加 A 模块，降低了试剂对样本的 GC 偏好性，提高了末修和加 dA 尾的效率，提高了试剂的稳定性；本试剂盒使用了最新优化的连接酶，改善了接头连接效率。同时，本试剂盒可搭配 Illumina® 或 MGI® 的接头和 Primer，用于 Illumina® 和 MGI® 高通量测序平台测序。

-  适用 1ng - 1μg 的基因组 DNA、全长 cDNA 等样本
-  高质量片段化酶，可随机切割双链 DNA，酶切片段偏好性低
-  片段化、末端修复/加 A 一步完成
-  强扩增效率的高保真酶，显著提高文库质量及产量
-  适用于 FFPE DNA 样本
-  严格的批次性能与稳定性质控

## 产品信息

|    |                                                   |
|----|---------------------------------------------------|
| 货号 | 12194ES08 / 12194ES24 / 12194ES96/ 12194ES97 (板式) |
| 规格 | 8 T / 24 T / 96 T/ 96 T (板式)                      |

## 组分信息

| 组分编号    |                                                                                     | 组分名称                              | 12194ES08 | 12194ES24 | 12194ES96 | 12194ES97 (板式自动化 96T) * |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------|
| 12194-A |  | Smearase® Buffer 3.0              | 80 μL     | 240 μL    | 960 μL    | 8×150 μL                |
| 12194-B |  | Smearase® Enzyme 3.0              | 80 μL     | 240 μL    | 960 μL    | 8×150 μL                |
| 12194-C |  | Ligation Ready Mix                | 200 μL    | 600 μL    | 3×800 μL  | 8×350 μL                |
| 12194-D |  | 2× Ultima HF<br>Amplification Mix | 200 μL    | 600 μL    | 3×800 μL  | 8×350 μL                |

注：本试剂盒组分兼容 Illumina 和 MGI 双平台，如果适配完整接头，需要额外配置专属于 Illumina® 或者 MGI® 的 primer mix (Cat#12190 Hieff NGS® DNA Library Prep Primer Mix for Illumina® 或 Cat#12191 Hieff NGS® DNA Library Prep Primer Mix for MGI®)。

\*板式自动化试剂组分排版情况见下图：

单位:  $\mu\text{L}$

|   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | 150 | 150 | 350 | 350 |   |   |   |   |   |    |    |    |

Smearase® Buffer 3.0  
 Smearase® Enzyme 3.0  
 Ligation Ready Mix  
 2× Ultima HF Amplification Mix

左图为板式建库试剂盒试剂排版图，每个组分占一列，每孔试剂够 12 个建库反应使用。

使用板式建库试剂盒搭配自动化仪器使用时，板式建库试剂盒空余板位（6-12 列）可根据实验需求在实验前加入磁珠、接头等试剂即可。

翌圣有适配部分移液工作站进行自动化建库时的使用脚本和教程，若需要，可联系翌圣获取支持。板式试剂，建议每孔试剂一次性使用完。

## 储存条件

-25~-15°C 保存，有效期 1 年。

## 注意事项

### 一、关于操作

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 请于使用前将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
3. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
4. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
5. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
6. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5% 次氯酸钠或 10% 漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
7. 本产品仅作科研用途！

## 二、关于 DNA 片段化

1. 本试剂盒兼容范围为 1 ng ~ 1 µg Input DNA。应尽可能使用 A260/A280 = 1.8-2.0 的高质量 Input DNA。
2. 若 Input DNA 中引入高浓度金属离子螯合剂或其他盐,可能会影响后续实验,建议将 DNA 稀释在 ddH<sub>2</sub>O 中进行片段化。
3. 对于常规的高质量基因组 DNA,酶切时间参考表 6,本试剂盒片段化偏好性低,耐受各种 GC 含量的模板。以上为推荐时间,需客户在自己的实验体系中进行微调,以达到最佳效果。
4. 为保证优质精确的片段化效果,片段化反应配制过程请于冰上操作。

## 三、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 针对 Illumina® 测序平台, Yeasen 可提供如下接头:
  - a. Hieff NGS® Complete Adapter Kit for Illumina®, Set 1~Set 2 (Cat#13519~Cat#13520), 试剂盒中的接头浓度为 15 µM;
  - b. Hieff NGS® 384 CDI Primer for Illumina® (Cat#12412~Cat#12413), 试剂盒中的接头浓度为 15 µM;
  - c. Hieff NGS® Stubby UDI Primer Kit for Illumina®, Set1~Set4 (板式) (Cat#12312~Cat#12315), 试剂盒中的接头浓度为 15 µM;
  - d. Hieff NGS® Dual UMI UDI Adapter Kit for Illumina®, Set1~Set2 (Cat#13370~Cat#13371), 试剂盒中的接头浓度为 15 µM。
2. 针对 MGI® 高通量测序平台, Yeasen 可提供如下接头:
  - a. Hieff NGS® Complete Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 3 (Cat#13360 ~ Cat#13362), 试剂盒中的接头浓度为 10 µM;
  - b. Hieff NGS® Unique Dual Barcode Primer Kit for MGI®, Set 1~Set 4 (板式) (Cat#13536 ~ Cat#13539), 试剂盒中的接头浓度为 10 µM;
  - c. Hieff NGS® Dual UMI UDB Adapter Kit for MGI®, Set 1~Set 2 (Cat#13367~Cat#13368) 双端 UMI UDB 短接头, 试剂盒中的接头浓度为 10 µM。
3. Adapter 的质量和浓度直接影响连接效率及文库产量。Adapter 用量过高可能会产生较多 Adapter Dimer; 用量较低可能会影响连接效率及文库产量; 使用 Adapter 时根据 Input DNA 量用 TE Buffer 进行相应稀释。

表 1 和表 2 分别列举了使用本试剂盒的不同 Input DNA 量推荐的针对 Illumina® or MGI® 测序平台常规和 UMI Adapter 的稀释方法。

表 1 1 ng~1 µg Input DNA 针对 Illumina® 测序平台推荐常规和 UMI Adapter 使用浓度

| Input DNA      | 常规 Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 | UMI Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 |
|----------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| < 1 ng         | 7.5 倍稀释         | 2µM        | 15 倍稀释           | 1µM        |
| 1 ng ~ 10 ng   | 3 倍稀释           | 5µM        | 3 倍稀释            | 5µM        |
| 10 ng ~ 200 ng | 1.5 倍稀释         | 10µM       | 2 倍稀释            | 7.5µM      |
| >200 ng        | 0 倍稀释           | 15 µM      | 0 倍稀释            | 15 µM      |

表 2 1ng~1μg Input DNA 针对 MGI®测序平台推荐常规和 UMI Adapter 使用浓度

| Input DNA      | 常规 Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 | UMI Adapter 稀释倍数 | Adapter 浓度 |
|----------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| < 1 ng         | 5 倍稀释           | 2μM        | 10 倍稀释           | 1μM        |
| 1 ng ~ 10 ng   | 2 倍稀释           | 5μM        | 2 倍稀释            | 5μM        |
| 10 ng ~ 200 ng | 0 倍稀释           | 10μM       | 1.25 倍稀释         | 8μM        |
| >200 ng        | 0 倍稀释           | 10 μM      | 0 倍稀释            | 10 μM      |

#### 四、关于磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection)

1. DNA 片段长度分选步骤可选择在末端修复/dA 尾添加之前，或接头连接后，或文库扩增后进行。
2. 当 Input DNA 质量≥50 ng，您可选择在接头连接后分选；如 Input DNA 质量小于 50 ng，建议您在文库扩增后进行分选。
3. Ligation Enhancer 中包含高浓度的 PEG，会对双轮分选产生显著影响。因此，如在接头连接后进行长度分选，必须先进行纯化步骤，再进行双轮分选步骤；如在末端修复/dA 尾添加之前或文库扩增后进行长度分选，可直接进行双轮磁珠分选步骤。
4. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
5. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
6. 转移上清时，请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量。
7. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
8. 进行长度分选时，初始样品体积应尽量≥100 μL，不足时请用超纯水补齐。以防因样品体积太小导致移液误差增大。
9. 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥 3~5 min 足以让磁珠充分干燥。
10. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱，产物可于 4℃可保存 1~2 周，-20℃可保存 1 个月。

#### 五、关于文库扩增 (Library Amplification)

文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 3 列举了使用本试剂盒，获得 1μg 文库的推荐循环数。

表 3 100 pg~1 μg Input DNA 获得 1 μg 产物扩增循环数推荐表

| Input DNA    | 1 μg 文库产量推荐 PCR 循环数 |
|--------------|---------------------|
| 1000~2000 ng | 2 ~ 4               |
| 500 ng       | 2 ~ 4               |
| 250 ng       | 4 ~ 6               |
| 100 ng       | 5 ~ 7               |
| 50 ng        | 7 ~ 9               |
| 10 ng        | 9 ~ 11              |
| 5 ng         | 10 ~ 12             |
| 1 ng         | 12 ~ 15             |
| 100 pg       | 16 ~ 18             |

【注】如果使用了不完整的接头，需要扩增 1~3 个循环，形成完整的接头。建库过程中若进行片段分选，扩增时请参照较高循环数扩增。

#### 六、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

1. 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。
2. 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；基于 qPCR 绝对定量的方法。

- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit®、PicoGreen®等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物以及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库干扰。
- 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

## 使用说明

### 一、自备材料

- 纯化磁珠：Cat#12601，Hieff NGS® DNA Selection Beads 或 Cat#A63880，AMPure XP Beads 或其他等效产品。
- DNA 质检：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
- DNA Adapter：接头详细介绍信息参考上面注意事项中的第三部分“关于接头连接”。
- DNA Primer Mix：Cat#12190，DNA Library Prep Primer Mix for Illumina® 或 Cat#12191，DNA Library Prep Primer Mix for MGI®
- 其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5+1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

### 二、操作流程

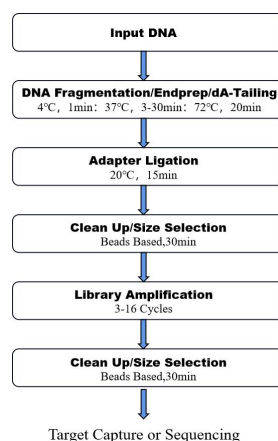


图 1 OnePot Pro DNA 建库试剂盒操作流程

### 三、操作步骤

#### 3.1 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 (DNA Fragmentation/End Repair/dA-Tailing)

该步骤将基因组 DNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

- 将表 4 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
- 于冰上配制表 4 反应体系。

表 4 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

| 名称                   | 体积 (μL)  |
|----------------------|----------|
| Input DNA            | x        |
| Smearase® Buffer 3.0 | 10       |
| Smearase® Enzyme 3.0 | 10       |
| ddH <sub>2</sub> O   | Up to 60 |

3. 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 5 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 5 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

| 温度             | 时间         |
|----------------|------------|
| 热盖 105°C       | On         |
| 4°C            | 1 min*     |
| 37°C/35°C/32°C | 3~30 min** |
| 72°C           | 20 min     |
| 4°C            | Hold       |

【注】：\*DNA 片段化过程为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4°C，待模块温度降至 4°C 时，将 PCR 管放入 PCR 仪。

\*\*对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 6。

表 6 常规基因组 DNA 片段化条件选择表

| 插入片段大小 (bp) | 5min    | 10min   | 15min   | 20min   | 30min |
|-------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 温度          |         |         |         |         |       |
| 酶切温度 32°C   | >700    | 300~400 | 250     | 200     | 180   |
| 酶切温度 35°C   | >700    | 300~400 | 200~250 | 200     | 180   |
| 酶切温度 37°C   | 500~700 | 200~300 | 200     | 180~200 | 180   |

不同打断条件下片段大小分布图可见“实施例”部分的图 2~图 4。

### 3.2 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤将 3.1 步骤的产物末端，连接 Illumina® 或 MGI® 接头。

1. 根据 Input DNA 量按第三部分推荐的接头使用浓度，稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 7 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 于 3.1 步骤 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表 7 Adapter Ligation PCR 体系

| 名称                       | 体积 (μL) |
|--------------------------|---------|
| dA-tailed DNA (3.1 步骤产物) | 60      |
| Ligation Ready Mix       | 25*     |
| DNA Adapter              | 5**     |

【注】：\*LigationReady Mix 比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

\*\*本公司接头浓度与常规商业化试剂盒一致，Illumina® 平台皆为 15 μM，MGI® 平台皆为 10 μM；具体的接头使用量可以参照表 1。

4. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 8 所示反应程序，进行接头连接反应。

表 8 Adapter Ligation PCR 反应程序

| 温度   | 时间     |
|------|--------|
| 热盖   | Off    |
| 20°C | 15 min |
| 4°C  | Hold   |



【注】：当 Input DNA 量较低，实验效果不理想时，可尝试将连接时间延长一倍。

### 3.3 连接产物磁珠纯化 (Post Ligation Clean Up)

#### 3.3.1 纯化操作步骤

该步骤使用磁珠对 3.2 步骤的产物进行纯化或分选。纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。

1. 准备工作：将 Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 将 Adapter Ligation 产物充分离心，然后吸取 72  $\mu\text{L}$  Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (0.8 $\times$ ，Beads:DNA=0.8:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清；待移除大部分上清后可短暂离心再次置于磁力架中，换用 10  $\mu\text{L}$  的枪头彻底吸净残留液体。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次，最后一次漂洗结束，要彻底吸净乙醇。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出：

1) 若产物无需分选则直接加入 21  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移取 20  $\mu\text{L}$  上清至新的 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

2) 若产物需进行双轮分选，则加入 102 $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移取 100  $\mu\text{L}$  上清至新的 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

#### 3.3.2 双轮分选操作步骤

1. 准备工作：将 Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 9 向上述 100 $\mu\text{L}$  连接产物上清中加入第一轮分选磁珠，涡旋振荡或充分颠倒磁珠混匀。

表 9 磁珠文库分选推荐比例

| DNA 文库插入片段大小       | 150-250 bp    | 200-300 bp    | 300-400 bp    | 400-500 bp    | 500-600 bp    |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| DNA 文库大小           | 250-350 bp    | 350-450 bp    | 450-550 bp    | 550-650 bp    | 650-750 bp    |
| 第一轮体积比 (Beads:DNA) | 0.80 $\times$ | 0.70 $\times$ | 0.60 $\times$ | 0.55 $\times$ | 0.50 $\times$ |
| 第二轮体积比 (Beads:DNA) | 0.20 $\times$ | 0.20 $\times$ | 0.20 $\times$ | 0.15 $\times$ | 0.15 $\times$ |

【注】：表中“ $\times$ ”表示上步骤连接产物体积。如文库插入片段长度为 250 bp，连接产物体积为 100  $\mu\text{L}$ ，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.70 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ =70  $\mu\text{L}$ ；第二轮分选磁珠使用体积为 0.20 $\times$ 100  $\mu\text{L}$ =20  $\mu\text{L}$ ；表中所推荐比例是针对于 Adapter Ligated Insert DNA (Post Ligation)，如果用户在接头连接前进行分选，请采用 Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (Cat#12601)说明书中推荐的比例。

4. 室温孵育 5 min。
5. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移上清到干净的离心管中。
6. 参考表 9 向上清中加入第二轮分选磁珠。
7. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
8. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
9. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
10. 重复步骤 9，总计漂洗两次，最后一次漂洗结束，要彻底吸净乙醇。
11. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）。
12. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入适量 21  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。

13. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 5 min），小心转移 20  $\mu$ L 上清至干净的管中。

### 3.4 文库扩增 (Library Amplification)

该步骤将对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 10 中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 10 所示反应体系。

表 10 PCR 扩增反应体系

| 名称                                     | 体积 ( $\mu$ L) |
|----------------------------------------|---------------|
| Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)         | 20            |
| 2 $\times$ Ultima HF Amplification Mix | 25            |
| Primer Mix**                           | 5*            |

【注】：\*Primer Mix 针对不同测序平台，选用与平台对应的 Adapter 和 Primer Mix。

\*\*如果使用的是完整接头（Cat#13519~Cat#13520），使用 DNA Library Prep Primer Mix for Illumina（Cat#12190）试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用的是 MGI 接头（Cat#13360~Cat#13362），使用 DNA Library Prep Primer Mix for MGI（Cat#12191）试剂盒中的 Primer Mix 进行扩增；如果使用了不完整的接头（Cat#12412~Cat#12413、Cat#12404~Cat#12407），请参照上述试剂盒说明书，使用其中配备的 Index Primer 进行扩增。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 11 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 11 PCR 扩增反应程序

| 温度   | 时间     | 循环数        |
|------|--------|------------|
| 98°C | 1 min  | 1          |
| 98°C | 10 sec | 参照注意事项中表 3 |
| 60°C | 30 sec |            |
| 72°C | 30 sec |            |
| 72°C | 5 min  | 1          |
| 4°C  | Hold   | -          |

### 3.5 扩增产物磁珠纯化或分选 (Post Amplification Clean Up/Size Selection)

扩增后纯化步骤同 3.3.1 纯化操作步骤。使用 Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads (1.0 $\times$ , Beads:DNA=1:1) 纯化文库扩增产物。如需分选，操作方法同 3.3.2 双轮分选步骤。

### 3.6 文库质量控制(Library Quality Analysis)

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项六。

#### 四、实验实例

##### 不同片段化条件得到的插入片段大小

以 500 ng 常规 gDNA 为模板，使用本试剂盒构建文库，片段化条件为 32°C/35°C/37°C 分别酶切 5/10/ 15/20/30 min，片段化产物 1.2x 磁珠纯化，21  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 洗脱，Qubit 测定浓度后，回收的插入片段分布如下图所示。

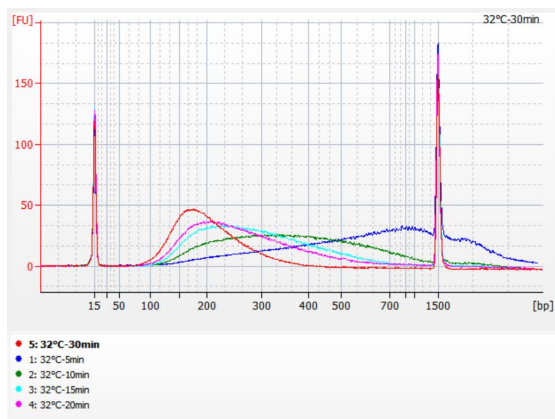


图 2 32°C不同酶切时间文库峰图

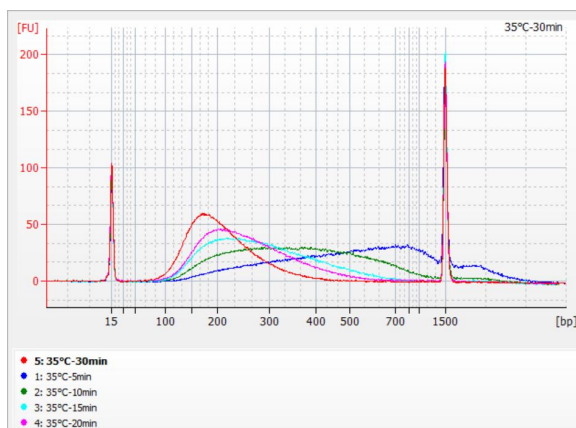


图 3 35°C不同酶切时间文库峰图

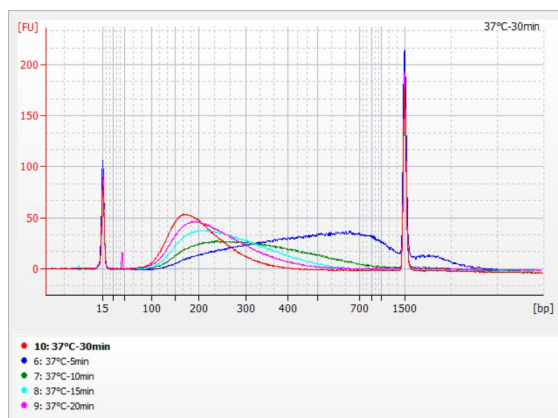


图 4 37°C不同酶切时间文库峰图



**帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐**