General DNA Library Prep Kit

产品说明书 • PRODUCT DESCRIPTION

ME Instruments Inc.
铭毅智造

产品概述

本试剂盒适用于 Illumina、MGI 及铭毅智造等多款 NGS 测序平台，由 DNA 文库构建中片段 DNA 末端修复及加 A 尾，接头连接和高保真 PCR 富集所需的预混酶模块组成，搭配不同测序平台接头以及测序引物试剂盒，可将片段化 DNA、cfDNA、FFPE 等样本制备成适配多款 NGS 测序平台使用的 DNA 文库。试剂盒操作简便，文库产量稳定，可提供高质量的 DNA 文库。

产品货号

MEK0845-24T、MEK0845-96T

来源

试剂盒中单个酶组分均来自于携带基因工程酶的大肠杆菌菌株。

纯度

单个酶组分纯度≥95%

产品组成及规格

组分名称	规格			使用说明	
	MEK0845-8T（S）	MEK0845-24T	MEK0845-96T	片段化 DNA	cfDNA
末端修复加 A 反应液Mix(A管)	96 μL×1管	288 μL×1管	1152 μL×1管	12 μL/反应	12 μL/反应
末端修复加 A酶 Mix (B管)	24 μL×1管	72 μL×1管	288 μL×1管	3 μL/反应	1.5 μL/反应
快速连接反应液(C管)	240 μL×1管	720 μL×1管	720 μL×4管	30 μL/反应	30 μL/反应
快速连接酶 Mix (D管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应	1.1 μL/反应
2×PCR扩增预混液(E管)	200 μL×1管	600 μL×1管	600 μL×4管	25 μL/反应	25 μL/反应

储存条件及有效期

-20±5℃储存，有效期 18 个月。

参考建库流程

自备仪器，设备和耗材：

1．与测序平台适配的接头引物试剂盒

2．DNA纯化回收试剂盒（磁珠纯化）及配套设备耗材

实验前准备：

1．样本准备

- 本试剂盒适用的片段化 DNA 样本来自于超声物理打断或酶切打断
- 片段化 DNA 样本大小弥散时，在建库前可使用磁珠分选或切胶纯化优化样本质量
- 本试剂盒兼容 FFPE 等样本

2．试剂准备

- 所有组分和反应装置应保持在冰
- 将扩增反应液和酶 Mix 在冰上解冻并轻轻涡旋 10~15 秒以充分混合，短暂离心，备用

3．建库流程简图



文库构建：

1．末端修复加 A

- 使用无 DNA 酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

组分名称	1个反应用量（片段化 DNA）	1个反应用量（cfDNA）
末端修复加 A 反应液Mix（A管）	12 μL	12 μL
末端修复加 A 酶Mix（B管)	3 μL	1.5 μL
片段化DNA模板	X μL	X μL
无核酸酶水	Up to 60 μL	Up to 60 μL

- 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。
- 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，PCR 仪 75℃热盖，程序设置如下：

反应步骤	循环数	反应温度	反应时间
末端修复	1 cycle	20℃	30 min
加 A 尾	1 cycle	65℃	30 min
结束	1 cycle	4℃	∞

2．快速接头连接

- 使用无 DNA 酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

组分名称	1 个反应用量（片段化 DNA）	1 个反应用量（cfDNA）
快速连接反应液Mix （C管）	30 μL	30 μL
快速连接酶Mix (D管)	5 μL	1.1 μL
末端修复加A产物	60 μL	60 μL
连接接头[a]	5 μL	5 μL
无核酸酶水	Up to 100 μL	Up to 100 μL

a：接头浓度为 15 μM。请参考表 1 的连接接头建议浓度，对接头进行稀释，加无核酸酶水补齐，使接头体积为 5μL。

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，程序设置如下：

反应步骤	循环数	反应温度	反应时间
接头连接	1 cycle	20℃	15 min
结束	1 cycle	4℃	∞

表1：连接接头建议浓度

片段DNA投入量	连接接头浓度(μM)
50-1000 ng	15.0
25-49 ng	7.5
10-24 ng	3.0
5-9 ng	1.5
<5 ng	0.75

3．连接产物纯化

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；

• 建议在连接后 100 μL 体系内加入 80 μL(0.8×)磁珠，用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 重复 80% 乙醇漂洗步骤一次；

• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；

• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3-5 min，吸取 20 μL 至一个新 PCR 管中，准备下一步实验；

• 如需进行两步片段分选，请参照 PCR 产物回收试剂盒（磁珠纯化）说明书进行。

4．高保真 PCR富集

• 使用无 DNA 酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

组分名称	1 个反应用量
2×PCR扩增预混液(E管)	25 μL
纯化后连接产物	20 μL
Primer mix [b]	5 μL
Total	50 μL

b: 请选择与测序平台适配的 Primer mix

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，PCR 仪 105℃热盖，程序设置如下：

反应步骤	循环数	反应温度	反应时间
预变性	1 cycle	98℃	45 sec
退火延伸	2-19 cycles[c]	98℃	15 sec
		60℃	30 sec
		72℃	30 sec
循环外延伸	1 cycle	72℃	60 sec
结束	1 cycle	4℃	∞

c: 建议文库循环数见表 2

表 2：建议文库扩增循环数

片段化DNA 或 cfDNA投入量	1μg 文库产出量建议循环数[d]
1000 ng	2-4
500 ng	3-4
250 ng	4-6
100 ng	6-7
50 ng	7-9
10 ng	9-11
＜5 ng	11-17

d: FFPE 样本建议在此基础上增加 1~3 个循环数；如果在连接接头产物纯化时进行片段分选，建议在此基础上增加 1~2 个循环数。

5．高保真 PCR富集产物纯化

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；
• 建议 PCR 富集体系 50uL 内加入 50uL（1x）磁珠，用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；
• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；
• 加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；
• 重复 80%乙醇漂洗步骤一次；
• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；
• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 31 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；
• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3 ~ 5 min，吸取 30 μL 至一个新 PCR 管；
• 将纯化后的文库保存在-20℃。

公司地址：重庆市江北区铁山坪街道港城东环路 6 号 4 幢 8-2、9-2 网址：www.me-itech.com 邮箱：mingyi@me-itech.com