

产品概述

AcuGenix™ Universal DNA Library Prep Kit 是一款适配 Illumina 与 MGI 全系列高通量测序平台的通用型双链 DNA 文库构建试剂盒, 核心优势为单管集成可控 DNA 片段化、末端修复、3' -脱氧腺苷 (dA) 加尾三个关键建库前处理步骤, 三步反应完成后无需中间纯化, 可直接进行接头连接与文库富集, 大幅简化建库流程, 将手工操作时长压缩至 1 小时以内, 显著降低起始量样本的核酸损失风险。

本试剂盒兼容 100 pg~1 μg 总 DNA 的广谱起始投入量, 样本类型覆盖常规动植物基因组 DNA、微生物基因组 DNA、FFPE 来源 DNA、细胞游离 DNA (cfDNA)、染色质免疫共沉淀 DNA (ChIP-DNA) 等复杂样本。可通过调整片段化反应时长精准调控插入片段大小, 默认生成 150~350 bp 的均一片段, 适配 Illumina 与 MGI 平台的双端测序读长要求, 无需更换缓冲体系即可灵活匹配不同测序应用场景的需求。

经严格批次质控, 本试剂盒无 RNase、DNase 及外源核酸污染, 批次间片段分布均一, 所得文库可直接用于簇生成与高通量测序。**仅限科研用途。**

试剂组成

产品名称	货号	规格
AcuGenix™ Universal DNA Library Prep Kit	BR3D201-01	8 T
	BR3D201-03	24 T
	BR3D201-06	96 T

组分		BR3D201-01	BR3D201-03	BR3D201-06
10×FEA Buffer		40 μL	120 μL	480 μL
10×FEA Enzyme		40 μL	120 μL	480 μL
Ligation Buffer		320 μL	960 μL	960 μL×4
DNA Ligase		40 μL	120 μL	480 μL
AmpSeq Amplification Mix		200 μL	600 μL	600 μL×4

保存条件

-20±5℃存储。

适用范围

适用于制备 Illumina 和 MGI 高通量测序平台文库, 起始核酸量兼容 0.1 ng~1,000 ng, 样本类型兼容动物、植物、微生物基因组 DNA (gDNA)、FFPE DNA (如石蜡切片 DNA)、细胞游离 DNA (cfDNA)、染色质免疫共沉淀 DNA (ChIP DNA) 等。可应用于全基因组测序 (WGS)、靶向捕获测序 (tNGS)、宏基因组测序 (mNGS) 等。

注意事项

1. 各组分使用前请先轻柔混匀, 并避免反复冻融。文库构建过程受样本、仪器、操作、方案等影响, 需对部分参数进行调整。使用过程中如遇到任何问题, 可联系技术支持获取帮助。

2. 核酸投入量和片段化

2.1 本产品可兼容 0.1 ng~1,000 ng 核酸投入量。对于大部分应用, 100 ng DNA 足以满足测序数据需求。对于微生物等简单基因组 DNA, 可适量减少至 10~50 ng; 对于 FFPE DNA 或需进行长度筛选时, 可适量增加至 200 ng。

2.2 请尽可能使用 A260/A280=1.8~2.0 的高质量 DNA, 若比值偏低或偏高, 则可能有蛋白或有机试剂残留, 也有可能是 DNA 部分降解, 这些情况都会影响文库构建效果。

2.3 推荐使用灭菌超纯水、DEPC 水、nuclease-free ddH₂O 溶解样本 DNA。如使用 TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8.0) 溶解样本 DNA, 样本体积应小于 10 μL。如使用 0.1×TE 或 Low-EDTA TE Buffer 溶解样本 DNA, 片段化过程不会受到影响。

2.4 下表列举了使用高质量 293T 细胞 gDNA 进行片段化的推荐时间。在推荐的 0.1 ng~1,000 ng 核酸投入量下, 不同投入量在片段化相同时间时, 片段化产物分布相差不大。当片段化产物的分布与预期不符时, 推荐以 3~5 min 的幅度调整片段化时间。

表 1: 预期片段化产物平均大小与推荐的反应时间

预期片段化产物 (插入片段) 平均大小	片段化时间
1,000 bp	1~3 min
350 bp	3~5 min
150 bp	5~10 min
100 bp	10~20 min

3. 接头连接

3.1 本产品可兼容 Illumina 和 MGI 高通量测序平台专用接头的连接, 接头类型包括单端 Index 接头、双端 Index 接头和通用型短接头, 可根据使用需要自行选择相应的接头试剂盒。

3.2 接头质量直接影响建库效率, 建议在操作时, 全程保持接头在冰盒上, 并避免剧烈振荡。

3.3 对于接头用量, 需根据核酸投入量和片段化后的核酸片段长度来调整, 下表列举了推荐的接头用量:

表 2: 不同核酸投入量下推荐的接头用量

核酸投入量	DNA: Adapter 摩尔比	接头工作浓度	接头稀释比例
500 ng~1,000 ng	1:20	10 μM	不稀释
250 ng~500 ng	1:20	5 μM	1:2
100 ng~250 ng	1:5	1 μM	1:10
50 ng~100 ng	1:5	0.5 μM	1:20
10 ng~50 ng	1:5	0.2 μM	1:50
0.1 ng~10 ng	1:5	0.1 μM	1:100

3.4 对于摩尔数计算, 可参考公式:

$$\text{DNA 摩尔数 (pmol)} = \frac{\text{DNA投入量 (ng)}}{0.66 \times \text{片段化后DNA平均长度 (bp)}}$$

3.5 对于接头稀释, 可用 0.1×TE 缓冲液或无核酸酶水按表二稀释, 在使用时统一取 5 μL 加入连接体系, 以保证加样准确。

3.6 不建议通过增加接头的使用量来提高文库产量, 因为过多的接头可能造成接头二聚体残留, 从而影响测序数据质量。

4. 连接产物纯化

4.1 若不进行片段筛选, 则洗脱体积为 21 μL, 取 20 μL 进行文库扩增或进行 PCR-Free 文库测序; 若在接头连接后进行片段筛选, 则洗脱体积为 102 μL, 取 100 μL 进行片段筛选。下表列举了推荐的筛选磁珠比例:

表 3: 接头连接后片段筛选磁珠比例

接头类型	纯化轮数	插入片段长度 (bp)				
		150	200	250	300	350

完整长度接头	第一轮	0.8×	0.7×	0.63×	0.6×	0.55×
	第二轮	0.2×	0.2×	0.15×	0.15×	0.15×
通用型短接头	第一轮	1.0×	0.9×	0.75×	0.65×	0.6×
	第二轮	0.2×	0.2×	0.2×	0.2×	0.2×

4.2 对于大多数情况, 建议使用 0.6×磁珠纯化。若插入片段平均长度>500 bp, 可用更小比例的磁珠进行纯化(例如 0.5×)。若磁珠比例大于 0.7×, 将增加接头污染的风险。

4.3 在接头连接后进行片段筛选时, 需在原有扩增循环数上, 再增加 2~3 个循环。

5. 文库扩增

5.1 文库扩增引物必须与连接时所用接头相匹配, 通常接头试剂盒会配套相应文库扩增引物。若使用了不相匹配的接头和扩增引物, 则会导致建库失败。推荐每条文库扩增引物的终浓度为 1 μM。

5.2 若使用完整长度接头, 则在接头连接后可不进行文库扩增, 此时的文库即为 PCR-Free 文库; 若使用通用型短接头, 则在接头连接后必须进行至少两个循环的扩增, 以使测序接头完整。

5.3 在文库扩增后进行片段筛选时, 为保证有足量文库进行测序, 需在原有扩增循环数上, 再增加 1~2 个循环。

5.4 扩增循环数需根据核酸投入量和片段化后的核酸片段长度来调整。循环数不足会导致文库产出偏少; 循环数过多会导致扩增偏倚、突变积累、大片段污染、重复度和嵌合产物增加等。下表列举了 293T 细胞 gDNA 片段化 10 min 后, 文库产出达到 1,000 ng 所需的扩增循环数:

表 4: 推荐的扩增循环数

核酸投入量	扩增循环数 (文库产出达到 1,000 ng)
1,000 ng	2~3
500 ng	3~5
100 ng	5~7
10 ng	9~11
1 ng	11~13
0.1 ng	13~15

6. 扩增产物纯化

6.1 建议将文库扩增后的体系 (50 μL) 补充灭菌超纯水至 100 μL 再进行磁珠纯化, 以减小移液误差对文库片段分布的影响。

6.2 若核酸投入量较低 (<100 ng), 建议将片段筛选置于文库扩增后。下表列举了推荐的筛选磁珠比例:

表 5: 文库扩增后片段筛选磁珠比例

纯化轮数	文库长度 (bp)				
	300	350	400	450	500
第一轮	0.8×	0.7×	0.6×	0.55×	0.5×
第二轮	0.2×	0.2×	0.2×	0.2×	0.2×

7. 文库质检

7.1 构建好的文库需进行文库浓度和片段分布两个方面的质检。

7.2 对于文库浓度检测, 可用双链 DNA 荧光染料法 (Qubit、PicoGreen 等) 或 qPCR 法 (文库定量试剂盒)。染料法简单易操作, 但对于 PCR-Free 文库和过度扩增文库无法准确定量; qPCR 法耗时较长, 但可对所有类型的文库进行绝对定量。推荐使用 qPCR 法。

7.3 对于片段分布检测, 可用 2% 琼脂糖凝胶或生物分析仪 (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 等)。2% 琼脂糖凝胶

价格便宜, 但无法准确判断文库主峰位置, 只能作为定性手段; 生物分析仪价格昂贵, 但可以准确判断文库主峰位置。若要用于上机测序前的文库定量分析, 必须使用生物分析仪。

8. 其他注意事项

8.1 片段化酶对温度敏感, 为保证实验的重复性, 配置片段化体系时, 所有试剂都应置于冰盒上, 且尽量在最后添加 DNA 或片段化酶。片段化体系配置完成后, 迅速置于 PCR 仪中开始反应。

8.2 片段化酶对物理剪切敏感, 对酶本身和加了片段化酶的体系, 应避免剧烈振荡, 可上下颠倒混匀, 再瞬时离心收集液体。

8.3 为保证实验的重复性, 建议使用带热盖的 PCR 仪, 并在开始反应前, 提前预热至反应温度。

8.4 为避免交叉污染和气溶胶污染, 推荐在实验操作时使用带滤芯的吸头, 在实验结束后, 使用含氯消毒剂或 DNA 清除剂对实验区域进行清洁。

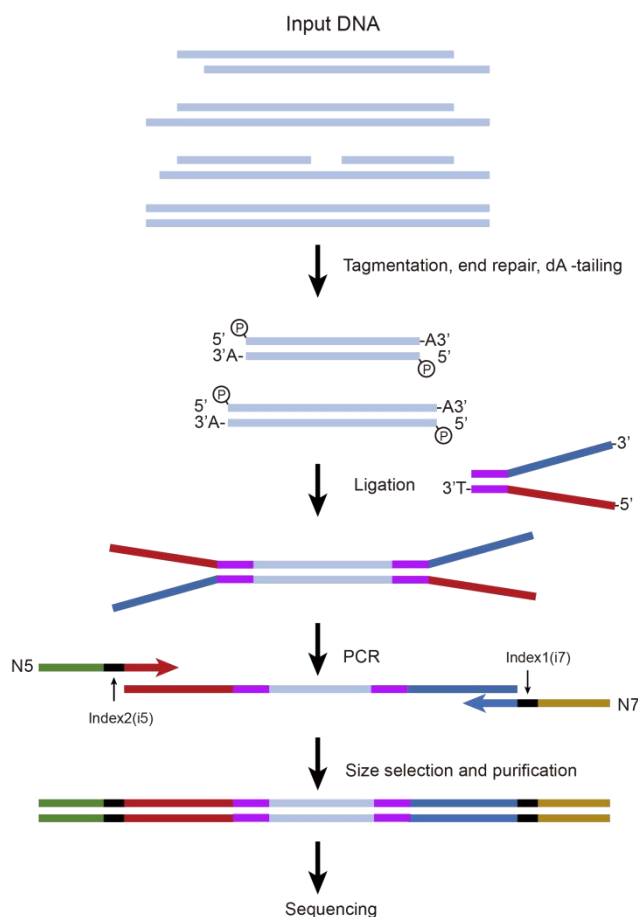
自备材料

试剂: 无水乙醇、灭菌超纯水、纯化磁珠、DNA 接头及扩增引物、Qubit dsDNA 定量试剂。

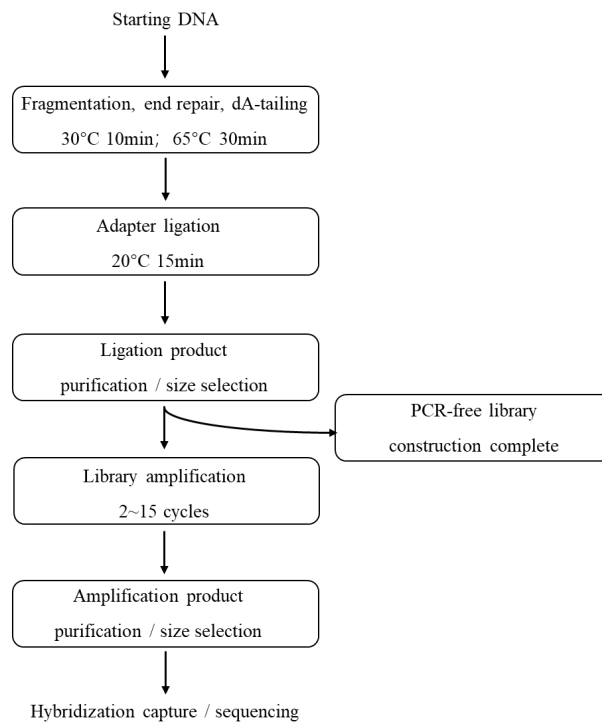
仪器: 生物分析仪、Qubit 荧光计、PCR 仪、微量离心机、多维旋转混匀仪。

耗材: 低吸附离心管、0.2 mL 薄壁管、0.5 mL 薄壁管、无菌 EP 管、磁力架等。

实验原理流



实验流程概要



实验步骤

1. 片段化、末端修复、加 dA 尾

这一步骤将起始双链 DNA 片段化，并同步进行末端修复和加 dA 尾。

1.1 按下表 6，预热 PCR 仪：

表 6：片段化、末端修复、加 dA 尾反应程序

温度	时间
热盖 75°C	/
30°C	10 min
65°C	30 min
4°C	∞

1.2 解冻 10×FEA Buffer 和 10×FEA Enzyme，冰上解冻后上下颠倒混匀，瞬时离心并置于冰上备用。

1.3 按下表 7，用无菌 0.2 mL 薄壁管配置片段化、末端修复、加 dA 尾反应体系：

表 7：片段化、末端修复、加 dA 尾反应体系

名称	体积 (μL)
DNA	X
10×FEA Buffer	5
10×FEA Enzyme	5
ddH ₂ O	Up to 50

1.4 用移液器轻轻吹打混匀，并瞬时离心将反应液收集至管底。

1.5 立即放入 1.1 步骤预热好的 PCR 仪中, 开始片段化、末端修复、加 dA 尾反应。

2. 接头连接

这一步骤将为打断的 DNA 连接上 Illumina 或 MGI 接头。

2.1 按下表 8, 预热 PCR 仪:

表 8: 接头连接反应程序

温度	时间
关闭热盖	/
20°C	15 min
4°C	∞

2.2 解冻  Ligation Buffer 和  DNA Ligase, 按表二稀释好的接头, 冰上解冻后上下颠倒混匀, 瞬时离心并置于冰上备用。

2.3 按下表 9, 在 1.5 步骤的薄壁管中配置接头连接反应体系:

表 9: 接头连接反应体系

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA	50
接头	5
Ligation Buffer	40
DNA Ligase	5
总计	100

2.4 用移液器轻轻吹打混匀或振荡混匀, 并瞬时离心将反应液收集至管底。(Ligation Buffer 非常黏稠, 请确保反应体系充分混匀, 否则可能导致连接效率下降或接头残留。)

2.5 放入 2.1 步骤预热好的 PCR 仪中, 开始接头连接反应。

3. 连接产物纯化

这一步骤将带有接头的 DNA 片段与游离接头分离。常规流程见步骤 3.1, 片段筛选流程见步骤 3.2。

3.1 常规流程:

(1) 取出纯化磁珠, 室温平衡 30 min; 期间新鲜配制 80%乙醇溶液。

(2) 磁珠平衡至室温后, 充分颠倒、振荡混匀, 用移液器吸取 60 μL 磁珠 (0.6×比例) 加入到连接产物中, 充分颠倒、振荡混匀, 多维旋转混匀仪上室温孵育 5 min。

(3) 瞬时离心, 收集磁珠至管底, 置于磁力架上分离磁珠和液体, 待液体清澈后 (大约 3 min), 小心移弃液体, 可在管底残留 5~10 μL 液体, 以免损失磁珠。

(4) 加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇溶液, 室温孵育 30 s 后, 弃尽乙醇。若有部分磁珠粘在管壁上, 可瞬时离心收集磁珠。

(5) 重复步骤 (4) 一次, 共漂洗两次。

(6) 保持薄壁管在磁力架上, 开盖使乙醇充分挥发, 此时可见磁珠表面逐渐失去光泽, 此过程大约持续 2 min。(如磁珠表面出现龟裂, 则表明磁珠过度干燥, 此时回收效率将下降。)

(7) 从磁力架上取下薄壁管。①若不进行片段筛选, 则加入 21 μL ddH₂O; ②若需要进行片段筛选, 则加入 102 μL ddH₂O。充分振荡混匀, 室温静置 2 min 洗脱连接产物。

(8) 瞬时离心, 置于磁力架上分离磁珠和液体, 待液体清澈后 (大约 30 s), 小心移取 20 μL 或 100 μL 液体至新的 0.2 mL 薄壁管中。请勿触碰磁珠。

3.2 片段筛选流程:

- (1)取出纯化磁珠，室温平衡 30 min；期间新鲜配置 80%乙醇溶液。
- (2)磁珠平衡至室温后，充分颠倒、振荡混匀，根据所需筛选的片段大小，在表三中选择合适的第一轮磁珠比例（X），用移液器吸取 X μ L 磁珠加入到洗脱的 100 μ L 连接产物中，充分颠倒、振荡混匀，多维旋转混匀仪上室温孵育 5 min。
- (3)瞬时离心，收集磁珠至管底，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 3 min），小心移取 (98+X) μ L 液体至新的 0.2 mL 薄壁管中。**请勿触碰磁珠，否则将残留大片段。**
- (4)确定与第一轮磁珠比例（X）相对应的第二轮磁珠比例（Y），用移液器吸取 Y μ L 磁珠加入到步骤 3.2.3 得到的液体中，充分颠倒、振荡混匀，多维旋转混匀仪上室温孵育 5 min。
- (5)瞬时离心，收集磁珠至管底，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 3 min），小心移弃液体，可在管底残留约 5~10 μ L 液体，以免损失磁珠。
- (6)加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇溶液，室温孵育 30 s 后，弃尽乙醇。此时若有部分磁珠粘在管壁上，可瞬时离心收集磁珠。
- (7)重复步骤（6）一次，共漂洗两次。
- (8)保持薄壁管在磁力架上，开盖使乙醇充分挥发，此时可见磁珠表面逐渐失去光泽，此过程大约持续 2 min。（如磁珠表面出现龟裂，则表明磁珠过度干燥，此时回收效率将下降。）
- (9)取下薄壁管，加入 21 μ L ddH₂O，充分振荡混匀，室温静置 2 min 洗脱连接产物。
- (10)瞬时离心，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 30 s），小心移取 20 μ L 液体至新的 0.2 mL 薄壁管中。请勿触碰磁珠。

4.文库扩增

这一步骤将富集带接头的 DNA 片段。若在接头连接步骤中使用完整长度接头，此时可不进行文库扩增，以得到 PCR-Free 文库；若使用通用型短接头，则必须经过至少 2 个循环以补全接头。

4.1 按下表 10，预热 PCR 仪：

表 10：文库扩增反应程序

程序	温度	时间	循环数
热盖	105℃	/	/
预变性	98℃	1 min	1
变性	98℃	10 sec	根据表四确定
退火	60℃	30 sec	
延伸	72℃	30 sec	
完全延伸	72℃	3 min	1
保温	4℃	∞	1

4.2 解冻  AmpSeq Amplification Mix，以及与接头配套的扩增引物，冰上解冻后上下颠倒混匀，瞬时离心并置于冰上备用。

4.3 按下表 11，配置文库扩增反应体系：

表 11：文库扩增反应体系

名称	体积（ μ L）
接头连接产物	20
Primer mix	5
AmpSeq Amplification Mix	25

总计

50

4.4 用移液器轻轻吹打混匀或振荡混匀，并瞬时离心将反应液收集至管底。

4.5 放入 4.1 步骤预热好的 PCR 仪中，立即开始文库扩增反应。

5. 扩增产物纯化

这一步骤将纯化构建完成的文库，以便后续的测序或杂交捕获。常规流程见步骤 5.1，片段筛选流程见步骤 5.2。

5.1 常规流程：

- (1) 取出纯化磁珠，室温平衡 30 min；新鲜配制 80%乙醇溶液；向扩增产物中加入灭菌超纯水，补足体积至 100 μ L。
- (2) 磁珠平衡至室温后，充分颠倒、振荡混匀，用移液器吸取 100 μ L 磁珠（1.0 $\times$ 比例）加入到扩增产物中，充分颠倒、振荡混匀，多维旋转混匀仪上室温孵育 5 min。
- (3) 瞬时离心，收集磁珠至管底，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 3 min），小心移弃液体，可在管底残留约 5~10 μ L 液体，以免损失磁珠。
- (4) 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇溶液，室温孵育 30 s 后，弃尽乙醇。
- (5) 重复步骤（4）一次，共漂洗两次。
- (6) 保持薄壁管在磁力架上，开盖使乙醇充分挥发，此时可见磁珠表面逐渐失去光泽，此过程大约持续 2 min。（如磁珠表面出现龟裂，则表明磁珠过度干燥，此时回收效率将下降。）
- (7) 从磁力架上取下薄壁管，加入 21 μ L ddH₂O，充分振荡混匀，室温静置 2 min 洗脱扩增产物。
- (8) 瞬时离心，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（约 30 sec），小心移取 20 μ L 液体至新 EP 管。请勿触碰磁珠。

5.2 片段筛选流程：

- (1) 取出纯化磁珠，室温平衡 30 min；新鲜配制 80%乙醇溶液；向扩增产物中加入灭菌超纯水，补足体积至 100 μ L。
- (2) 磁珠平衡至室温后，充分颠倒、振荡混匀，根据所需筛选的片段大小，在表五中选择合适的第一轮磁珠比例（X），用移液器吸取 X μ L 磁珠加入到 100 μ L 扩增产物中，充分颠倒、振荡混匀，多维旋转混匀仪上室温孵育 5 min。
- (3) 瞬时离心，收集磁珠至管底，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 3 min），小心移取（98+X） μ L 液体至新的 0.2 mL 薄壁管中。**请勿触碰磁珠，否则将残留大片段。**
- (4) 确定与第一轮磁珠比例（X）相对应的第二轮磁珠比例（Y），用移液器吸取 Y μ L 磁珠加入到步骤 5.2.3 得到的液体中，充分颠倒、振荡混匀，多维旋转混匀仪上室温孵育 5 min。
- (5) 瞬时离心，收集磁珠至管底，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 3 min），小心移弃液体，可在管底残留约 5~10 μ L 液体，以免损失磁珠。
- (6) 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇溶液，室温孵育 30 s 后，弃尽乙醇。
- (7) 重复步骤（6）一次，共漂洗两次。
- (8) 保持薄壁管在磁力架上，开盖使乙醇充分挥发，此时可见磁珠表面逐渐失去光泽，此过程大约持续 2 min。（如磁珠表面出现龟裂，则表明磁珠过度干燥，此时回收效率将下降。）
- (9) 取下薄壁管，加入 21 μ L ddH₂O，充分振荡混匀，多维旋转混匀仪上室温孵育 2 min 洗脱扩增产物。
- (10) 瞬时离心，置于磁力架上分离磁珠和液体，待液体清澈后（大约 30 s），小心移取 20 μ L 液体至新 EP 管。请勿触碰磁珠。

6. 文库质检

6.1 参考注意事项 7. 文库质检。