

产品概述

Low input DNA Library Prep Kit For MGI 基于无偏差链置换扩增技术，仅需要经过 3 个程序反应，即可将单/多个细胞或微量 DNA 模板（低至 10pg）转换为可用于测序的高质量文库。本试剂盒经过多重优化，在 4h 内即可完成从模板到文库过程。经本试剂盒所构建的文库产物大小在 250bp - 2000bp 之间，用于 MGI 高通量测序平台。









适用范围

- 可兼容 10pg-1000pg 微量 DNA 模板。
- 可应用于单个/多个胚胎卵裂球、极体、精子等细胞样本的全基因组文库构建，如胚胎植入前染色体检测（PGS/PGD）、肿瘤细胞、干细胞基因组学研究等
- 可应用于核酸模板存量少或价值较高样本全基因组文库构建，如硬质组织、粪便或土壤等可提取核酸较少的样本。
- 此外，本试剂盒对有部分降解的 DNA 模板也有较好的兼容性。

产品信息

产品名称	货号	规格
Low input DNA Library Prep Kit For MGI (微量 DNA 建库试剂盒)	BR3D502-01	8T
	BR3D502-03	24T
	BR3D502-06	96T

产品组分

组分名称		8T	24T	96T
A 盒	Cell Lysis Buffer	 38.4μL	115.2μL	460.8μL
	Cell Lysis Enzyme	 1.6μL	4.8μL	19.2μL
	Pre-Amp Buffer	 40μL	120μL	480μL
	Pre-Amp Enzyme Mix	 8μL	24μL	96μL
	Amplification Buffer	 160μL	480μL	2×960μL
	AmpHifi TN Enzyme	 8μL	24μL	96μL
B 盒	DL Buffer	 100μL	300μL	1200μL
	Index1-X	 8×3μL	12×6μL	48×6μL

备注：8T 试剂盒自带 8 种不同 Index；24T 试剂盒自带 12 种不同 Index；96T 试剂盒自带 48 种不同 Index；Index 序列可根据需要定制单端或双端。Index 序列信息具体见附表。

保存条件

试剂盒储存于 -20±5℃，有效期为 12 个月。冰袋或干冰运输。使用前请先混匀，并避免反复冻融。

自备材料

需自备的试剂：无核酸酶水(DNase、RNase free)、DNA 纯化磁珠、无水乙醇（分析纯）

及 Qubit dsDNA HS Assay Kit。

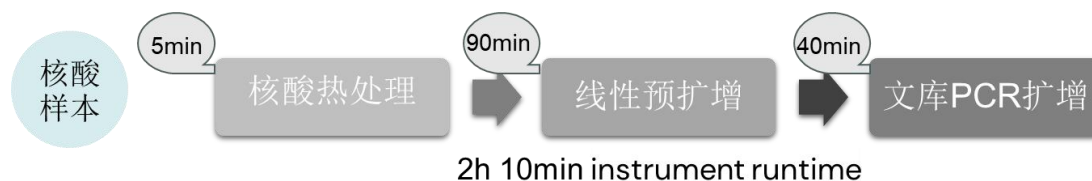
需要自备的仪器设备包括: 核酸定量仪、磁力架、移液枪、PCR 扩增仪、振荡器、掌上离心机、凝胶琼脂电泳仪。

需自备的耗材: 0.2mL PCR 管(无菌且无核酸酶)、1.5mL EP 管(无菌且无核酸酶)、0.5mL Qubit 管、枪头、50mL 离心管等。

建库流程图



细胞样本建库流程图



微量 DNA 样本建库流程图

使用方法

1. 细胞/核酸前处理:

根据样本类型选择不同前处理方式, 细胞样本按照步骤 1.1 进行裂解; DNA 模板按照步骤 1.2 进行热处理;

1.1 细胞裂解

- 1) 使用低吸附且不含核酸酶 0.5mL EP 管或 0.2mL PCR 管, 按照下表 1 配制细胞裂解反应液。如有多个样本建议将反应液配制成 Mix 再分装, 多配制 0.2 人份。

表 1 裂解反应液

组分名称	体积 (μL)	
Cell Lysis Buffer	4.8	
Cell Lysis Enzyme	0.2	
Total	5	

- 2) 以上反应体系配完后, 轻微涡旋混匀, 瞬时离心, 置于冰盒上备用。
- 3) 细胞样本需提前分装到 0.2mL PCR 管中。细胞样本解冻后先使用掌上离心机离心 2min, 确保细胞没有吸附在管壁上。如细胞样本体积小于 5μL, 使用 DL Buffer 补充至 5μL。
- 4) 取 5μL 裂解反应液贴管壁加到细胞样本管中, 避免枪头触碰到细胞, 此时体系总体积为 10 μL。
- 5) 将加完裂解反应液的 PCR 管置于掌上离心机上, 离心 30s。将裂解反应液离心至管底并去除加样过程中产生的气泡。

- 6) 将 PCR 管置于 PCR 仪中,按照下表 2 的程序进行细胞裂解反应,反应结束后进行步骤 2 (预扩增):

表 2 裂解反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105°C	/	/	10 μ L
1	65°C	10min	1cycle	
2	95°C	4min	1cycle	
3	4°C	∞	/	

注:等待 PCR 仪温度降至 4°C 后再将产物取出置于冰盒上,并及时进行预扩增。

1.2 核酸热处理

- 1) 按照下表 3 往 0.2mL PCR 管中加入相应体积的 DNA 模板和 DL Buffer (如操作时间较长建议在冰盒上操作)。

表 3 核酸热处理反应液

组分名称	体积 (μ L)	
DNA 模板 ^a	X	
DL Buffer	10-X	
Total	10	

注 a: 推荐模板投入 10pg~1000pg, 模板总体积建议不超过 8 μ L。

- 2) 将上述 0.2mL PCR 管轻微振荡混匀,瞬时离心后置于 PCR 中按下表 4 进行核酸热处理:

表 4 核酸热处理反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105°C	/	/	10 μ L
1	95°C	4min	1cycle	
2	4°C	∞	/	

注:等待 PCR 仪温度降至 4°C 后再将产物取出置于冰盒上,并及时进行步骤 2 (预扩增)。

2. 预扩增

2.1 将 Pre-Amp Buffer 从 -20°C 取出,室温或冰面上解冻后震荡混匀,瞬时离心并置于冰上备用。Pre-Amp Enzyme Mix 用手指轻弹混匀后瞬时离心,置于冰上备用。按照表 5 在冰盒上配制预扩增反应液:

表 5 预扩增反应液

组分名称	体积 (μ L)	
裂解产物 / DNA 产物	10	
Pre-Amp Buffer	5	
Pre-Amp Enzyme Mix	1	
无核酸酶水	4	
Total	20	

2.2 使用移液器轻轻吹打混匀或轻微震荡混匀, 瞬时离心将管壁反应液离心至管底。根据下表 6 在 PCR 仪上设置程序并启动反应:

表 6 预扩增反应程序

程序	温度	时间	循环	反应体积
热盖	105℃	/	/	20μL
1	95℃	3min	1cycle	
2	95℃	15s	12-15cycle (程序 2-7)	
3	15℃	50s		
4	25℃	40s		
5	35℃	30s		
6	65℃	40s		
7	75℃	40s		
8	4℃	∞	/	

注: 微量模板低于 100pg 推荐使用 15cycle (预计文库总量在 1μg 左右); 微量模板投入量大于 100pg 可适当减少 1-3 个循环。

3. 文库扩增

3.1 将 Amplification Buffer 和 Index 从 -20°C 取出, 室温或冰面上解冻后震荡混匀, 瞬时离心并置于冰上备用。AmpHifi TN Enzyme 用手指轻弹混匀后瞬时离心, 置于冰上备用。按照表 7 在冰盒上配制文库扩增反应液:

表 7 文库扩增反应液

组分名称	体积 (μL)	
预扩增产物	20	
Amplification Buffer	20	
AmpHifi TN Enzyme	1	
Index ^b	3	
无核酸酶水	16	
Total	60	

注 b: 单端接头编号为 index1-X; 双端接头编号为 B001-X。

3.2 将上述产物轻微震荡混匀, 瞬时离心后根据下表 8 在 PCR 仪上设置程序并启动反应:

表 8 文库扩增反应程序

程序	温度	时间	循环	反应体积
热盖	105℃	/	/	60μL
1	95℃	3min	1cycle	
2	95℃	20s	15cycle (程序 2-4)	
3	63℃	30s		
4	72℃	40s		
5	4℃	∞	/	

4. 文库纯化

- 4.1 提前将 DNA 纯化磁珠从冰箱中取出, 室温平衡 20 分钟, 涡旋振荡离心备用。
- 4.2 按照无水乙醇:无核酸酶水=8:2 比例配制成 80%乙醇备用, 例如: 每 8mL 无水乙醇和 2mL 无核酸酶水混合配成 10mL 80%乙醇, 注意: 80%乙醇需现配现用。
- 4.3 振荡混匀纯化磁珠 3 次, 每次 5s, 接着取 60μL (1×) 纯化磁珠加入到 PCR 扩增产物中, 涡旋振荡混匀后瞬时离心, 置于室温静置 5 分钟。
- 4.4 将反应管置于磁力架上静置 2min, 至产物完成澄清后用移液器小心弃掉上清液。
- 4.5 往管中加入 200μL 80%乙醇, 使液面完全盖过磁珠, 将反应管继续留在磁力架上孵育 30s, 用移液器小心吸弃上清。
- 4.6 重复步骤 4.5 一次。
- 4.7 将上述反应管从磁力架取下瞬时离心 3 秒, 再置于磁力架上, 用 10μL 移液器小心吸弃全部废液。注意: 不要触碰到磁珠。
- 4.8 打开上述八联管或 PCR 管管盖, 室温晾干 2-5 分钟。注意: 如天气干燥, 则观察磁珠表面无明显反光水膜时即可, 避免磁珠过度干燥。
- 4.9 往反应管中加入 32μL 无核酸酶水, 振荡重悬磁珠 5 秒, 重复 2-3 次, 室温静置 2 分钟, 瞬时离心。
- 4.10 将上述八联管或 PCR 管置于磁力架上至溶液澄清, 小心吸取 30μL 上清到新保存管中, 即为构建好的文库, 文库于-20±5°C保存。

5. 文库质检和定量

- 5.1 文库浓度测定: 使用 Qubit 4.0 Fluorometer 及 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测文库浓度。
 - 5.2 文库片段分布检测: 将制备好的文库在 Qsep100 全自动核酸蛋白分析仪上或通过琼脂糖凝胶电泳进行片段分布检测。文库片段应分布在 250-1000bp 之间。
- 注: 纯化后的文库若不能立即上机测序, 可置于-20°C保存。

注意事项

1. 本产品提供单端 index 或双端 Brcode 选择, 测序前需根据附录单双端接头序列确认。
2. 请于使用前将试剂盒各组份置于室温或冰盒上解冻。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. PCR 产物因操作不当容易产生气溶胶污染, 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。
6. 本产品仅作科研用途!
7. 关于 Index 序列方向说明

- 经本试剂盒构建后带双端 Index 文库结构如图 1 所示（单端 Index 文库不含 I5 Index）

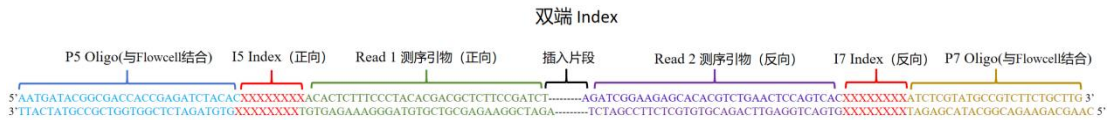


图 1 文库结构图

- 本试剂盒自带 I5 index 的合成方向如下：

5' AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCT 3'

- 本试剂盒自带 I7 index 的合成方向如下：

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3'

- 录样时按不同测序平台要求对 I5 和 I7 index 进行填写，以下为填写建议，最终以实验室使用为准。

双端 Index	测序平台	I5 端方向（以 B001 为例）	I7 端方向（以 B001 为例）
	NovaSeq、Miseq、Hiseq2000/2500	合成方向（AGCGCTAG）	反向互补（TAAGGCGA）
	iSeq、MiniSeq、NextSeq、HiSeq3000/4000	反向互补（CTAGCGCT）	反向互补（TAAGGCGA）
	真迈平台	合成方向（AGCGCTAG）	反向互补（TAAGGCGA）
	塞陆测序平台	合成方向（AGCGCTAG）	反向互补（TAAGGCGA）
单端 Index	测序平台	I5 端方向（以 Index1 为例）	I7 端方向（以 Index1 为例）
	NovaSeq、Miseq、Hiseq2000/2500	/	反向互补（TAAGGCGA）
	iSeq、MiniSeq、NextSeq、HiSeq3000/4000	/	反向互补（TAAGGCGA）
	真迈平台	/	反向互补（TAAGGCGA）
	塞陆测序平台	/	反向互补（TAAGGCGA）

附录：【接头引物序列信息表】

单端 Index 序列信息表

单端接头编号	序列 (5'to3')	单端接头编号	序列 (5'to3')
Index1	TCGCCTTA	Index25	CTATCGCT
Index2	CTAGTACG	Index26	TTAATCGC
Index3	TTCTGCCT	Index27	TTCTGAAT
Index4	GCTCAGGA	Index28	GATTATTC
Index5	AGGAGTCC	Index29	CTGATTAA
Index6	CATGCCTA	Index30	AATGAGCG
Index7	GTAGAGAG	Index31	TTCGCGGA
Index8	CCTCTCTG	Index32	CGAGTAAT
Index9	AGCGTAGC	Index33	TAAGCAGT
Index10	CAGCCTCG	Index34	AGCCGCAT
Index11	TGCCTCTT	Index35	AGAGAGGC
Index12	TCCTCTAC	Index36	CCTACGGC
Index13	TAGATCGC	Index37	CCGCGGTT
Index14	CTCTCTAT	Index38	TTATAACC
Index15	TATCCTCT	Index39	GGACTIONG
Index16	AGAGTAGA	Index40	AAGTCCAA
Index17	GTAAGGAG	Index41	ATCCACTG
Index18	ACTGCATA	Index42	GCTTGTCA
Index19	AAGGAGTA	Index43	CAAGCTAG
Index20	CTAAGCCT	Index44	TGGATCGA
Index21	TCTCCGGA	Index45	AGTTCAGG
Index22	AGCTTCAG	Index46	GACCTGAA
Index23	GAGCTACG	Index47	TCTCTACT
Index24	ACGAATTC	Index48	CTCTCGTC

注：Index 序列方向为引物合成方向。

双端 Index 序列信息表

双端 index 引物编号	I5index 序列 (5'to3')	I7index 序列 (5'to3')	双端 index 引物编号	I5index 序列 (5'to3')	I7index 序列 (5'to3')
B001	AGCGCTAG	TCGCCTTA	B025	AGCGCTAG	CTATCGCT
B002	GATATCGA	CTAGTACG	B026	GATATCGA	TTAATCGC
B003	CGCAGACG	TTCTGCCT	B027	CGCAGACG	TTCTGAAT
B004	TATGAGTA	GCTCAGGA	B028	TATGAGTA	GATTATTC
B005	AGGTGCGT	AGGAGTCC	B029	AGGTGCGT	CTGATTAA
B006	GAACATAC	CATGCCTA	B030	GAACATAC	AATGAGCG
B007	ACATAGCG	GTAGAGAG	B031	ACATAGCG	TTCGCGGA
B008	GTGCGATA	CCTCTCTG	B032	GTGCGATA	CGAGTAAT
B009	TGCTTATC	AGCGTAGC	B033	TGCTTATC	TAAGCAGT
B010	CCTAATAG	CAGCCTCG	B034	CCTAATAG	AGCCGCAT
B011	GTACGCCA	TGCCTCTT	B035	GTACGCCA	AGAGAGGC
B012	AAGGCGGT	TCCTCTAC	B036	AAGGCGGT	CCTACGGC
B013	AGCGCTAG	TAGATCGC	B037	AGCGCTAG	CCGCGGTT
B014	GATATCGA	CTCTCTAT	B038	GATATCGA	TTATAACC
B015	CGCAGACG	TATCCTCT	B039	CGCAGACG	GGACTTGG
B016	TATGAGTA	AGAGTAGA	B040	TATGAGTA	AAGTCCAA
B017	AGGTGCGT	GTAAGGAG	B041	AGGTGCGT	ATCCACTG
B018	GAACATAC	ACTGCATA	B042	GAACATAC	GCTTGTCA
B019	ACATAGCG	AAGGAGTA	B043	ACATAGCG	CAAGCTAG
B020	GTGCGATA	CTAAGCCT	B044	GTGCGATA	TGGATCGA
B021	TGCTTATC	TCTCCGGA	B045	TGCTTATC	AGTTCAGG
B022	CCTAATAG	AGCTTCAG	B046	CCTAATAG	GACCTGAA
B023	GTACGCCA	GAGCTACG	B047	GTACGCCA	TCTCTACT
B024	AAGGCGGT	ACGAATTC	B048	AAGGCGGT	CTCTCGTC

注：Index 序列方向为引物合成方向。