

xLiBPreP™ 长片段酶切建库试剂盒

操作说明书

(Cat#NC012, 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

目录

产品概述	1
实验原理	2
产品组成	3
保存及运输条件	3
适用范围	3
注意事项	4
实验前准备	5
实验流程	7
1. 酶切片段化 DNA	7
2. 末端修复/加 A 尾	11
3. 接头连接	12
4. 文库 PCR 富集	15

产品概述

xLiBPreP™长片段酶切建库试剂盒是一款可应用于长读长等测序平台的快速、高效的测序文库构建试剂盒。本产品是将完整 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，酶切片段更为集中，同时无需引入外源序列，衔接传统末端修复加 A 建库试剂，通过连接模块体系优化，实现了 DNA 连接效率的最大化，不受 DNA 末端完整性、DNA 起始量、接头浓度等条件限制。本产品对于 1 ~ 500 ng 起始量的 DNA 具有良好的兼容性，适用于各种类型样本，包括完整基因组 DNA (genomic DNA)、石蜡样本 DNA (FFPE DNA)、免疫共沉淀 DNA (ChIP DNA) 等。本试剂盒适合 Illumina Complete Long Read technology, PacBio, Nanopore 等长读长测序平台。

主要实验步骤如下：



图 1. xLiBPreP™ 长片段酶切建库试剂盒操作流程

实验原理

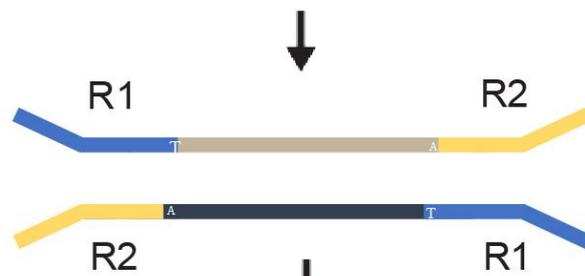
酶切法片段化 DNA



末端修复/加 A 尾



接头连接



文库扩增

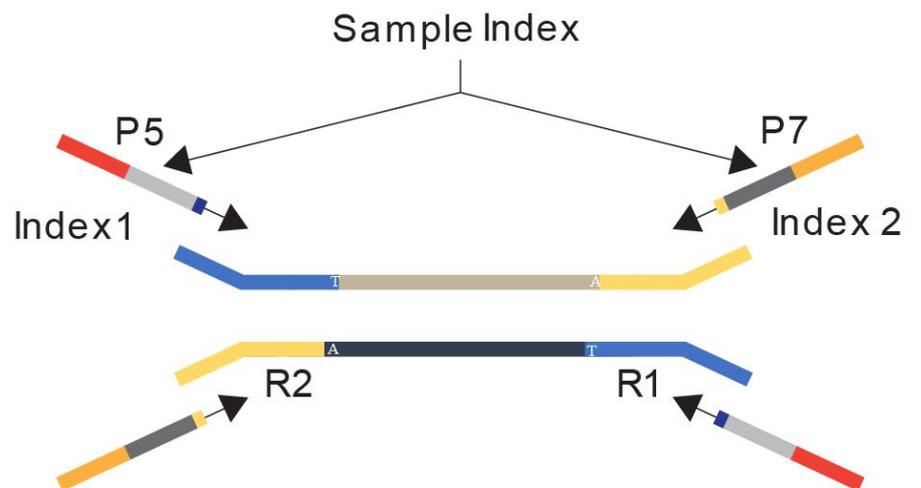


图 2. xLiBPreP™ 长片段酶切建库试剂盒操作流程

产品组成

主货号：NC012 规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns (NC012-024)	96 rxns(NC012-096)
● LA Smear Buffer	108 μL	432 μL
● LA Smear Enzyme	120 μL	480 μL
● LA ERA Buffer	168 μL	672 μL
● LA ERA Enzyme Mix	72 μL	288 μL
● LA Ligation Buffer	720 μL	2880 μL
● LA Ligase Enzyme	240 μL	960 μL
● LA 2× HiFi Master Mix	600 μL	2400 μL
○ 1× TE Buffer	3 mL	10 mL

保存与运输条件

-30 ~ -15 °C保存，≤ 0 °C运输。

适用范围

本产品适用于长读长测序平台的文库构建。

1. 兼容样本类型

完整基因组 DNA (genomic DNA)、石蜡样本 DNA (FFPE DNA)、
免疫共沉淀 DNA (ChIP DNA) 等。

2. DNA 起始量

50 ~ 500 ng。

3. 应用场景

全基因组测序；全外显子或其他靶向捕获测序（推荐使用 xCapSeq™ DNA 杂交捕获系统相关产品，WisGen#HC00 系列，或其它杂交捕获系统）；免疫共沉淀测序；宏基因组测序；甲基化测序。

注意事项

! 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

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 RNA 酶或 DNA 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 RNA 酶和 DNA 的污染。
4. 为保证酶切效果，DNA 推荐溶于 1× TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 为了防止 Adapter 发生自连，Adapter 需单独添加，不可以与 Ligation Buffer 和 Ligase Enzyme 提前预混。
9. 分选磁珠使用前，请务必置于室温下平衡 30 min 后使用。
10. 80 %乙醇溶液需当天配置，避免由于乙醇挥发，导致文库建库失败。
11. 不同测序平台对应的接头及引物模块不同，需根据平台选择适合的接头模块，并根据对应的说明书进行接头模块的使用。
12. 试剂盒中所有酶制剂在使用完毕后，应立即置于 -20 °C 进行保存，以免降低酶的活性，影响建库结果。
13. 实验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停实验，或者无需立即进行下游实验，可根据说明书的推荐步骤，将实验产物保存于 -20 °C 并安排后续实验。

实验前准备

1. DNA 准备

本试剂盒包含 DNA 片段化相关试剂。具体操作请参考相关产品说明。

2. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
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 浓度及文库浓度的检测
*	Nuclease-Free Water	/
*	无水乙醇	/
*	0.1× TE Buffer	/

⬆ * 常规实验室供应商品牌即可

⬆ ** 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。

3. 自备材料

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	/
*	移液器	单通道或多通道

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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
*	PCR 基因扩增仪	/
*	微型离心机	/

 * 常规实验室供应商品牌即可

实验流程

1. 酶切片段化 DNA

1.1 试剂准备

1.1.1 在开始实验前，确定 DNA 浓度和投入量。

! 注意：确定投入的 DNA 浓度至关重要，尤其在投入量低于 100 ng 时，推荐使用染料法对 DNA 浓度进行准确定量。

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	50 ~ 500
全基因组/靶向捕获测序	FFPE DNA	≥50
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。

常见基因组 DNA 片段化时间请参考下表：

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
4kb	10 s	5 - 10 s

! 注意：以上为高质量 DNA 推荐的片段化时间，当 DNA 质量较差时，应适当减少片段化时间。

1.1.2 将试剂盒中各组份置于冰上融化。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 μ L (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 2 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	∞

 * 片段化时间设在 10 s 最适中。DNA 投入量低于 50 ng，片段化时间可比正常 DNA 的片段化时间减少 1 ~ 5 s。

1.2.3 反应液完全涡旋混匀后，将 0.2 mL PCR 管瞬时离心 10 sec，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。

1.2.4 程序结束后，加入 $0.4 \times$ 体积（12 μL ）的磁珠至步骤 1.2.2 的反应液中，充分吸打混匀 30 sec。

1.2.5 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。

1.2.6 在 PCR 管中，加入 200 μL 80% 乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

1.2.7 重复步骤 1.2.6 一次。

1.2.8 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。

1.2.9 加入 50 μL 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 0.2 mL PCR 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。

1.3 二次纯化

1.3.1 加入 $0.4 \times$ 体积 ($20 \mu\text{L}$) 的磁珠至步骤 1.2.9 的一次纯化产物中，充分吸打混匀 30 sec。

1.3.2 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。

1.3.3 在 PCR 管中，加入 $200 \mu\text{L}$ 80% 乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

1.3.4 重复步骤 1.2.6 一次。

1.3.5 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。

1.3.6 加入 $21 \mu\text{L}$ 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 0.2 mL PCR 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。

2. 末端修复/加 A 尾

2.1 实验步骤

2.1.1 取 0.2 mL PCR 管，按照下表配制反应体系，将各组分加入后，涡旋振荡混匀，请务必在冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
● LA ERA Enzyme Mix	3
● LA ERA Buffer	7
酶切片段化产物 (步骤 1.3.6)	X
Nuclease-Free Water	50 - X
总体积	60

! 注意：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系，并在此基础上增加体系 10%，以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。

2.1.2 按照下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置为 85 °C。

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	20	30
2	72	30
3	4	∞

2.1.3 反应液完全涡旋混匀后，将 0.2 mL PCR 管瞬时离心，立即置于 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。

2.1.4 反应结束后，尽快进行后续实验，在 4 °C Hold 建议不宜超过 1 h。

3. 接头连接

3.1 本产品不含接头，用户可根据不同的测序平台，选择相应的接头套装试剂盒。

产品货号	产品名称	适用测序平台
YG001	YWG™ illumina 短接头套装	illumina
YG002	YWG™ illumina 分子标签接头套装	illumina
YG004	YWG™ MGI 短接头套装（双端 Barcode）	MGI
YG005	YWG™ MGI 分子标签接头套装（双端 Barcode）	MGI
YG006	YWG™ MGI 短接头套装（单端 Barcode）	MGI
YG009	YWG™ MGI 全长接头套装（单端 Barcode）	MGI

! 注意：以上列表中产品属于配套系列产品（欣基生物），如使用其他公司产品，请联系技术支持。

3.2 为了保证接头的连接效率和文库产量，对于低起始量样本，建议用 1× TE Buffer 稀释后进行使用，具体用量请参考下表：

Input DNA (ng)	接头稀释倍数	浓度 (μM)
≥ 50	无需稀释	15
49 ~ 25	2 倍稀释	7.5
24 ~ 10	5 倍稀释	3
9 ~ 5	10 倍稀释	1.5
< 5	20 倍稀释	0.75

! 注意：配套 Adapter（WisGen）系列及产品原始浓度为 15 μmolL。

3.3 取出步骤 2.1.4 的末端修复产物，加入相应用量接头，如下表所示。

组分	体积 (μL)
末端修复 (步骤 2.1.4) 产物	60
Adapter *	2
Nuclease-Free Water	8
总体积	70

⤴ * 不同平台对应的接头模块不同，需根据平台选择合适的接头模块，按照说明书所示量添加。

⚠ **注意：避免 Adapter 发生自连，Adapter 需单独添加，不可以与 Ligation Buffer 和 Ligase Enzyme 预混。**

3.4 按照下表所示各组分用量配制反应体系，并将配制完成的反应体系涡旋混匀后置于冰上。

组分	体积 (μL)
步骤 3.3 混液	70
● LA Ligation Buffer	30
● LA Ligase Enzyme	10
总体积	110

⚠ **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。**

3.5 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序如下：

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	20	30
2	4	∞

⚠ **注意：此步骤如果使用 PCR 仪进行反应，请不要启动热盖，否则热盖温度过高，将导致 PCR 管反应温度高于设置温度。**

3.6 接头连接产物的纯化推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP

Beads，向反应产物中加入 0.4× 体积（44 μL）磁珠进行纯化，具体步骤如下：

3.6.1 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。

3.6.2 接头连接程序结束后，取出 0.2 mL PCR 管静置 5 min，平衡至室温，向步骤 3.5 的连接产物中加入 0.4× 体积（44 μL）磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

3.6.3 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。

3.6.4 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。

3.6.5 重复步骤 3.6.4 一次。

3.6.6 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。

3.6.7 加入 21 μL Nuclease-Free Water 或者 0.1× TE Buffer 至 PCR 管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 20μL 上清至新的 PCR 管中，用于后续的 PCR 富集实验。

4. 文库 PCR 富集

4.1 将 LA 2× HiFi Master Mix 和 PCR Primer Mix 置于冰上融化，短暂混匀。

4.2 按照下表配制 PCR 反应体系，注意此步骤需于冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
纯化后的连接产物 (步骤 2.6.7)	20
● LA 2× HiFi Master Mix *	25
○ PCR Primer Mix **	5
总体积	50

⤴ * LA 2× HiFi Master Mix 请在其它试剂或样本加入后再添加，避免酶活降低。

⤴ ** PCR Primer Mix 需与对应 Adapter 配套使用，不同测序平台使用接头模块不同，具体可参考不同平台对应接头模块说明书。

4.3 按步骤 4.2 中配制好的 PCR 反应液，轻柔吸打 6 ~ 8 次混匀或振荡混匀 10 sec。

⚠ **注意：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。**

4.4 瞬时离心后将 PCR 反应管置于 PCR 仪内，按照步骤 4.5 的反应程序进行扩增。

4.5 按下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置为 105 °C。

步骤	温度 (°C)	时间	循环数 (cycles)
预变性	98	1 min	1
变性	98	10 sec	
退火	60	30 sec	10 ~ 17 *
延伸	68	5 min	
完全延伸	68	5 min	1
Hold	4	∞	1

⤴ * 请根据 DNA 的质量和上样量确定 PCR 循环数。一般而言，对于 300 ng、100 ng、50 ng 文库起始 DNA，在进行 PCR 富集时分别需要扩增 11、14、17 个循环。

⤴ * 循环数具体参数可参考下表：

DNA 模板量使用量 (ng)	PCR 循环数推荐 (cycles)
50	15 ~ 17
100	12 ~ 14
300	10 ~ 11

4.6 当 PCR 样品温度降至 4 °C，从 PCR 仪中取出 PCR 产物进行纯化，推荐用

xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads 进行纯化，具体步骤如下：

4.6.1 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，务必置于室温平衡 30 min，否则影响分选片段及 DNA 回收率。

4.6.2 扩增程序结束后，加入 1× 体积（50 μL）的磁珠至步骤 4.5 的扩增产物中，充分吸打混匀 30 sec。

4.6.3 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，用移液器吸弃上清。

4.6.4 在 PCR 管中，加入 200 μL 80% 乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

4.6.5 重复步骤 4.6.4 一次。

4.6.6 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。

4.6.7 加入 30 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 PCR 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 °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

