



Fast DNA Library Prep Set for Illumina & MGI

DNA文库快速制备试剂盒(Illumina及MGI平台)

目录号：CW3045S (24 rxns)

CW3045M (96 rxns)

保存条件：-20℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW3045S 24 rxns	CW3045M 96 rxns
ERAT Mix	48 µl	192 µl
10×ERAT Buffer	120 µl	480 µl
T4 DNA Ligase	72 µl	288 µl
T4 DNA Ligase Buffer	336 µl	672 µl×2管
2×PCR Mix	1.2 ml	1.2 ml×4管
DNA Control (50 ng/ul, 200 bp)	20 µl	20 µl

产品简介

本试剂盒同时适用于Illumina及MGI测序平台，提供了DNA文库构建中DNA末端修复、5'端磷酸化修饰、3'端加A和Adaptor连接所需的预混酶模块，搭配不同测序平台接头引物试剂盒可以将DNA制备成Illumina或MGI测序平台专用的DNA文库。采用高保真DNA聚合酶进行文库富集，无偏好的PCR扩增，扩大了序列的覆盖区域，可制备高质量的DNA文库。试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性。

产品特点

1. 末端补平，磷酸化，加A一步完成。
2. 末端修复后无需纯化，直接加接头。
3. 超保真扩增，最大程度上降低了扩增偏好性。

4. 所得文库适用于多个测序平台：
MGI测序平台：MGISEQ-2000、MGISEQ-200、BGISEQ-500等MGI平台测序仪。
Illumina测序平台：Illumina GAIIX, HiSacrSQ、HiSeq 2500/2000/1000、MiSeq sequencing等Illumina平台测序仪。
5. 适用于物理打断后的gDNA建库及cfDNA建库。

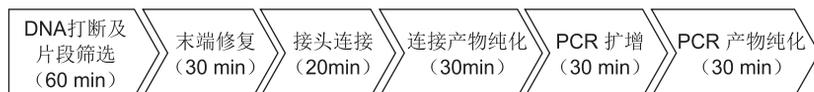
自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架：建议使用DynaMagTM-2 (Cat.No. 12321D)。
2. 无水乙醇（100%乙醇，分析纯）；去离子水（pH 在7.0-8.0之间）。
3. 接头引物试剂盒：
MGI平台：康为MGI二代测序多样本接头引物试剂盒I/II/III (Cat.No.CW3014/CW3015/CW3016)
Illumina平台：康为Illumina二代测序接头引物试剂盒I/II (Cat.No.CW2586/CW2587)
4. DNA纯化回收试剂盒：建议康为磁珠法DNA纯化回收试剂盒 (Cat.No.CW2508)。
5. 反应管：建议使用低吸附的PCR管与1.5 ml离心管；
枪头：建议使用高质量过滤枪头，防止试剂盒、文库样本污染。

实验前准备及注意事项

1. 为了避免试剂反复冻融影响文库产量，建议在首次使用时进行分装保存。
2. PCR产物因操作不当极易产生污染，导致实验结果不准确，建议将PCR反应体系配制区与PCR产物纯化区隔离，并使用专门的移液器，定期对各实验区域进行清洁。
3. 样本准备
 - DNA 样本的片段大小应范围集中；打断产物片段较为弥散时可进行磁珠双选。
 - 本试剂盒推荐建库循环数依据投入量不同进行调整，具体方案请参考各平台说明书。
 - cfDNA投入量需大于1 ng。
4. 试剂准备
 - 取出试剂盒内对应试剂，短暂离心，酶混合液置于冰上待用；缓冲液使用前需在室温溶解后震荡离心，置于冰上待用，去离子水置于室温待用；请在冰上配制混合液。
 - 试剂盒内缓冲液冰冻溶解后可能出现沉淀，沉淀不影响试剂功能，请充分震荡混匀直至沉淀消失后使用。

DNA建库流程示意图



Illumina平台DNA文库构建操作方案

* 请在实验前仔细阅读本操作说明, 根据使用测序平台类型选择操作方案

1 样本处理

1.1 样本要求

本试剂盒适用于所有动物、植物、细菌等物种样本提取的基因组DNA进行文库制备。建议使用完整度较好, $A260/A280=1.8\sim 2.0$ 的高质量基因组DNA进行打断。如果物理打断后的样本DNA分布集中、纯度高, 可直接进行末端修复, 接头连接产物使用完全回收的方案。如果打断产物较为弥散, 需进行片段筛选, 具体方案参见2.1。

1.2 DNA打断方法和片段筛选

1.2.1 打断

请将基因组DNA打断至所需主带范围, 根据不同Covairs型号设置相应打断参数。

1.2.2 片段筛选

打断后DNA分布范围较宽, 通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。推荐使用磁珠片段筛选方案(表1), 也可通过切胶纯化的方式进行片段筛选。

表1 获取不同DNA主带时磁珠建议用量(100 μ l反应体系)

DNA片段大小		210 bp	260 bp	300 bp	360 bp	430 bp	470 bp	500 bp
磁珠用量	第一次选择	100	90	80	70	64	60	55
	第二次选择	50	25	25	25	25	25	25

建议使用康为世纪磁珠法DNA纯化回收试剂盒(CW2508)进行DNA片段选择性回收。

注意: DNA片段选择性回收是可选步骤, 进行磁珠片段筛选, DNA损失量约为60-95%。若打断产物片段较为集中, 可直接建库。起始样本量低于50ng, 不建议进行DNA片段选择性回收。另外构建不同大小的DNA文库时, DNA片段选择性回收的磁珠使用量不同, 具体磁珠用量可参照表1(若使用除康为世纪以外厂家的磁珠, 需自行摸索最佳磁珠用量)。

以下操作步骤中, 可选择回收DNA片段长度峰值为210 bp, 反应起始体积为100 μ l, 不足100 μ l用去离子水补平。

1. CMPure使用前需室温静置30 min, 涡旋振荡CMPure20 s, 使其彻底混匀为均一溶液。
2. 向打断体系中加入去离子水, 使反应体积补充至100 μ l。
3. 将上述反应体系转移至一新的1.5 ml离心管中。

- 加入100 μl 混合均匀的CMPure，涡旋震荡5 s后，室温静置5 min。
- 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 min），小心地将上清溶液转移至新的1.5 ml离心管中，并弃去磁珠。

注意：不要弃除上清。

- 向上清中加入50 μl 混合均匀的CMPure，涡旋震荡5 s后室温放置5 min。
- 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 min），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意：不要弃除磁珠。

- 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μl 新配置的80%乙醇，室温放置30 s，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。
- 重复步骤8。
- 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10 min，使磁珠在空气中干燥。
- 将离心管从磁力架上取下，加入46 μl 去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5 min。
- 短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5 min），将43 μl 洗脱液转移至一个新的PCR管中，用于下游末端修复使用。

注意：一定不要转移磁珠，微量磁珠污染可影响后续DNA文库构建的正常进行。

1.3 建库样本DNA的定量和质控

建库样本DNA指末端修复步骤中的DNA，本试剂盒兼容cfDNA及物理打断后的gDNA，样本DNA量范围为0.5-1 μg ，体积 \leq 43 μl 。

应尽可能保证建库样本DNA片段集中，片段越集中，测序质量越好；反之测序质量会有所下降。

2 文库构建流程

2.1 样本筛选方案

关于建库样本DNA: 如果物理打断后的样本DNA分布集中、纯度高，可直接进行末端修复，接头连接产物使用完全回收的方案。如果物理打断后的样本DNA分布范围较宽，通常需要进行长度分选。推荐使用磁珠双选的方案，也可通过切胶纯化的方式进行分选。

长度分选执行位置有两种选择：

I 末端修复之前：磁珠双选流程可参考1.2物理打断及磁珠双选，磁珠用量可参考表1。本方案适用于投入量充足且纯度差的样本。

II 接头连接之后：磁珠双选流程可参考1.2物理打断及磁珠双选，磁珠用量可参考表6。本方案适用于投入量充足且纯度高的样本。

注意：保证双选步骤的唯一性，进行两次双选会导致文库质量严重下降，当样本投入量低于50 ng时不建议进行磁珠双选。

2.2 末端修复

2.2.1 根据样本浓度，取适量样本（推荐100 ng）至新的PCR管中，并补充去离子水至总体积为43 μ l（见表2）。每批次建库可加入DNA Control作为建库质控品，DNA Control取样量为2 μ l，并补充41 μ l的去离子水至总体积为43 μ l，在PCR管中配制如下末端修复反应混合液：

表2 末端修复反应液的配制

组分	体积
片段化DNA	X
ERAT Mix	2 μ l
10 \times ERAT Buffer	5 μ l
去离子水	43-X
Total	50 μ l

2.2.2 震荡混匀5 s，瞬时离心将反应液收集至管底，确保反应液中没有气泡；

2.2.3 将含有上一步反应混合液的PCR管置于PCR仪上，按如下条件反应：

表3 末端修复反应条件

温度	时间
热盖（85 $^{\circ}$ C）	
37 $^{\circ}$ C	15 min
65 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

2.3 接头连接

构建Illumina测序平台的DNA文库，推荐使用康为世纪二代测序多样本接头引物试剂盒 I/II（Illumina平台）（Cat. No.CW2586/CW2587）

2.3.1 向上述已完成DNA末端修复的反应液中直接加入以下反应混合液

表4 接头连接反应混合液的配制

组分	体积
T4 DNA Ligase Buffer	14 μ l
T4 DNA Ligase	3 μ l
Adaptor for Illumina	5 μ l
去离子水	8 μ l
Total	30 μ l

注意：

1. 若建库样本投入量低于50ng，请将Adaptor for Illumina用去离子水10倍稀释后使用。
2. 震荡混匀5 s，请保证混匀充分，瞬时离心将反应液收集至管底；
3. 将含有上一步反应液的PCR管置于PCR仪上，按照下表的条件进行反应：

表5 接头连接反应程序

温度	时间
热盖（30℃）	
23℃	20 min
4℃	Hold

2.4 连接产物纯化

连接产物纯化有两种方案，选择性回收和完全回收。若起始样本量低于50 ng或使用磁珠双选后的打断产物，此步建议选择方案二（DNA片段完全回收）；若使用未经双选的打断产物，建议选择方案一（DNA片段选择回收）。

方案一、DNA片段选择回收

操作流程参考1.2.2 片段筛选，双选磁珠用量可参考表6。

表6 获取DNA主带时磁珠建议用量（100 μ l反应体系）

DNA片段大小	插入片段+Adaptor+primer	290 bp	340 bp	440 bp	460 bp	500 bp	720 bp
磁珠用量	第一次选择	85	70	55	50	45	35
	第二次选择	25	25	20	20	20	15

方案二、DNA片段完全回收

1. 提前30 min 取出 CMPure磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 吸取80 μ lCMPure至80 μ l连接产物中，震荡混匀5 s，室温孵育5 min；
3. 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置5 min至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
4. 保持离心管固定于磁力架上，加入250 μ l新鲜配制的80%乙醇，待悬起的磁珠完全吸附后彻底弃去乙醇（1 min左右）；

- 重复步骤4一次，最后一次尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干；
注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。
- 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥5~6 min，直至磁珠无反光、无开裂；
- 将离心管从磁力架上取下，加入25 μl 去离子水进行DNA洗脱，震荡混匀5 s，室温下溶解5 min；
- 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置5 min至液体澄清，将23 μl 上清液全部转移到新的PCR管中，进行PCR扩增反应或者-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5 PCR扩增

- 2.5.1 参考表7配制PCR反应混合液，建议使用康为世纪Illumina测序平台二代测序多样本接头引物试剂盒 I/II (Cat. No.CW2586/CW2587)

表7 PCR扩增反应混合液的配制

组分	体积	体积
2 \times PCR Mix	25 μl	50 μl
Universal primer	1 μl	2 μl
Index primer	1 μl	2 μl
纯化回收的接头连接产物	23 μl	23 μl
去离子水	\	25 μl
Total	50 μl	100 μl

注意：本试剂盒提供足量的2 \times PCR Mix，在控制循环数的基础上提高出库量，可选择100 μl 的PCR扩增体系。

- 2.5.2 震荡混匀5 s，瞬时离心，将反应液收集至管底。

- 2.5.3 将上述PCR管置于PCR仪上，按照下表的条件进行反应：

表8 PCR反应程序

温度	时间	循环数
热盖	On	
98 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
98 $^{\circ}\text{C}$	10 s	
60 $^{\circ}\text{C}$	15 s	参照表9
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

注意：循环数应该根据起始DNA量进行调整。具体循环数可参考表9。

表9 获取100 ng和1 µg文库推荐的扩增循环数

样本DNA	对应产量所需循环数	
	100 ng	1 µg
100 pg	14-16	19-20
1 ng	9-12	14-15
5 ng	7-10	12-14
10 ng	6-8	10-12
50 ng	4-6	8-10
100 ng	2-5	6-9
500 ng	0*/1-3	3-6
1000 ng	0*/1-3	3-4

注意：

- 1 若样本DNA于末端修复前进行的磁珠双选可参考最低循环数；若在接头连接后进行的磁珠双选，则参考最高循环数。
- 2 FFPE样本质量较差，可在推荐最高循环数的基础上增加3个循环。
- 3 *当接头连接时使用完整长度的Adaptor，且文库产出满足应用要求时，可不进行PCR扩增步骤，直接获取PCR-Free文库；若使用的是不完整接头，需进行1-3轮PCR扩增，以获取测序所需的完整接头序列。
- 4 样本类型为cfDNA时，PCR循环数大于等于12。
- 5 DNA Control 循环数设为7。

2.6 PCR产物纯化

1. 提前30 min取出CMPure置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 加入1倍体积的 CMPure至PCR 产物中，震荡混匀5 s，室温孵育5 min；
3. 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置5 min至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
4. 保持离心管固定于磁力架上，加入250 µl新鲜配制的80%乙醇，待悬起的磁珠完全吸附后彻底弃去乙醇（1 min左右）；
5. 重复步骤4一次，最后一次尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干；

注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。

6. 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥5~6 min，直至磁珠无反光、无开裂；
7. 将离心管从磁力架上取下，加入32 µl去离子水进行DNA 洗脱，震荡混匀5 s，室温下溶解5 min；
8. 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置5 min至液体澄清，将30 µl上清液转移到新的1.5 ml离心管中，进行上机测试或者-20℃保存。

2.7 文库的质量控制

通常情况下，构建好的文库需要进行文库浓度及长度分布检测。

文库浓度测定：推荐使用荧光染料法（Qubit或Picogreen）或qPCR绝对定量法进行文库浓度测定。

文库长度分布检测：通过Agilent 2100 Bioanalyzer；LabChip GXII Touch微流控毛细管电泳等设备进行长度分布检测。

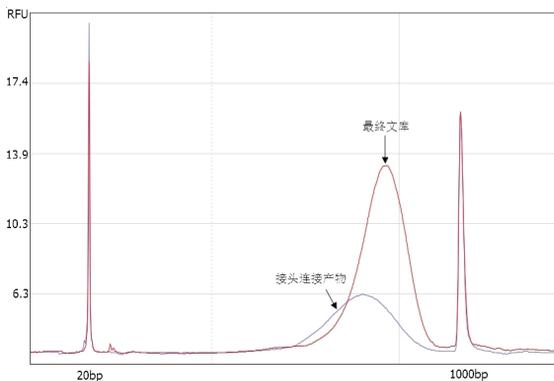


图: DNA文库快速制备试剂盒构建Illumina测序平台DNA文库，
建库过程中各步骤产物的长度分布检测。

MGI 平台DNA文库构建操作方案

* 请在实验前仔细阅读本操作说明, 根据使用测序平台类型选择操作方案

1 样本处理

1.1 样本要求

本试剂盒适用于所有动物、植物、细菌等物种样本提取的基因组DNA进行文库制备。建议使用完整度较好, $A260/A280=1.8\sim 2.0$ 的高质量基因组DNA进行打断。如果物理打断后的样本DNA分布集中、纯度高, 可直接进行末端修复, 接头连接产物使用完全回收的方案。如果打断产物较为弥散, 需进行片段筛选, 具体方案参见1.2。

1.2 DNA打断方法和片段筛选

1.2.1 打断

请将基因组DNA打断至所需主带范围, 根据不同Covairs型号设置相应打断参数。

1.2.2 片段筛选

打断后DNA分布范围较宽, 通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。推荐使用磁珠片段筛选方案(表1), 也可通过切胶纯化的方式进行片段筛选。

表1 获取不同DNA主带时磁珠建议用量(100 μ l反应体系)

DNA片段大小		210 bp	260 bp	300 bp	360 bp	430 bp	470 bp	500 bp
磁珠用量	第一次选择	100	90	80	70	64	60	55
	第二次选择	50	25	25	25	25	25	25

建议使用康为世纪磁珠法DNA纯化回收试剂盒(CW2508)进行DNA片段选择性回收。

注意: DNA片段选择性回收是可选步骤, 进行磁珠片段筛选, DNA损失量约为60-95%。若打断产物片段较为集中, 可直接建库。起始样本量低于50ng, 不建议进行DNA片段选择性回收。另外构建不同大小的DNA文库时, DNA片段选择性回收的磁珠使用量不同, 具体磁珠用量可参照表1(若使用除康为世纪以外厂家的磁珠, 需自行摸索最佳磁珠用量)。

以下操作步骤中, 可选择回收DNA片段长度峰值为210 bp, 反应起始体积为100 μ l, 不足100 μ l用去离子水补平。

1. CMPure使用前需室温静置30 min, 涡旋振荡CMPure20 s, 使其彻底混匀为均一溶液;
2. 向打断体系中加入去离子水, 使反应体积补充至100 μ l;
3. 将上述反应体系转移至一新的1.5 ml离心管中;

4. 加入100 μl 混合均匀的CMPure，涡旋震荡5 s后，室温静置5 min；
5. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 min），小心地将上清溶液转移至新的1.5 ml离心管中，并弃去磁珠；
注意：不要弃除上清。
6. 向上清中加入50 μl 混合均匀的CMPure，涡旋震荡5 s后室温放置5 min；
7. 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5 min），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标DNA的磁珠；
注意：不要弃除磁珠。
8. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μl 新配置的80%乙醇，室温放置30 s，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
9. 重复步骤8；
10. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10 min，使磁珠在空气中干燥；
11. 将离心管从磁力架上取下，加入46 μl 去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5 min；
12. 短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5 min），将43 μl 洗脱液转移至一个新的PCR管中，用于下游末端修复使用。
注意：一定不要转移磁珠，微量磁珠污染可影响后续DNA文库构建的正常进行。

1.3 建库样本DNA的定量和质控

建库样本DNA指末端修复步骤中的DNA，本试剂盒兼容样本DNA量范围为0.1-1000 ng，体积 $\leq 43 \mu\text{l}$ 。

应尽可能保证建库样本DNA片段集中，片段越集中，测序质量越好；反之测序质量会有所下降。

2 文库构建流程

关于建库样本DNA：如果物理打断后的样本DNA分布集中、纯度高，可直接进行末端修复，接头连接产物使用完全回收的方案。如果物理打断后的样本DNA分布范围较宽，通常需要进行长度分选。推荐使用磁珠双选的方案，也可通过切胶纯化的方式进行分选。磁珠双选方案参考1.2。

2.1 末端修复

- 2.1.1 根据样本浓度，取适量样本（推荐100 ng）至新的PCR管中，并补充去离子水至总体积为43 μl （见表2）。每批次建库可加入DNA Control作为建库质控品，DNA Control取样量为2 μl ，并补充41 μl 的去离子水至总体积为43 μl ，在PCR管中配制如下末端修复反应混合液：

表2 末端修复反应液的配制

组分	体积
片段化DNA	X
ERAT Mix	2 μ l
10 \times ERAT Buffer	5 μ l
去离子水	43-X
Total	50 μ l

2.1.2 震荡混匀5 s，瞬时离心将反应液收集至管底，确保反应液中没有气泡；

2.1.3 将含有上一步反应混合液的PCR管置于PCR仪上，按如下条件反应：

表3 末端修复反应条件

温度	时间
热盖（85 $^{\circ}$ C）	
37 $^{\circ}$ C	15 min
65 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

2.2 接头连接

建议使用康为世纪二代测序多样本接头引物试剂盒 I、II 或 III（MGI平台（Cat.No.CW3014/3015/3016）

2.2.1 向上述已完成DNA末端修复的反应液中直接加入以下反应混合液

表4 接头连接反应混合液的配制

组分	体积
T4 DNA Ligase Buffer	14 μ l
T4 DNA Ligase	3 μ l
Adaptor for MGI	5 μ l
去离子水	8 μ l
Total	30 μ l

注意：1. 若建库样本投入量低于50 ng，请将Adaptor for MGI用去离子水5倍稀释后使用。

2. 震荡混匀5 s，请保证混匀充分，瞬时离心将反应液收集至管底；

3. 将连接反应体系置于PCR仪上，按照下表的条件进行反应：

表5 接头连接反应程序

温度	时间
热盖（30 $^{\circ}$ C）	
23 $^{\circ}$ C	20 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

2.3 连接产物纯化

1. 提前30 min取出CMPure磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 吸取1倍体积（80 μ l）CMPure至80 μ l连接产物中，震荡混匀5 s，室温孵育5 min；
3. 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置5 min至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
4. 保持离心管固定于磁力架上，加入250 μ l新鲜配制的80%乙醇，待悬起的磁珠完全吸附后彻底弃去乙醇（1 min左右）；
5. 重复步骤4一次，最后一次尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干；

注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。

6. 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥5~6 min，直至磁珠无反光、无开裂；
7. 将离心管从磁力架上取下，加入46 μ l去离子水进行DNA洗脱，震荡混匀5 s，室温下溶解5 min；
8. 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置5 min至液体澄清，将44 μ l上清液全部转移到新的PCR管中，进行下一步反应或者-20 $^{\circ}$ C保存。

2.4 PCR扩增

- 2.4.1 配制PCR反应混合液（表6）：向上一轮的PCR管中加入6 μ l Index Primer Mix（建议使用二代测序多样本接头引物试剂盒 I、II或III（Cat.No.CW3014 /CW3015/CW3016），每个样品中加入一种Index Primer Mix或一套Index Primer Mix，然后再加入50 μ l 2 \times PCR Mix。

注意：Index Primer Mix是由Universal primer和Index primer配制而成，其中Index primer有128种。可以根据不同混合测序策略，每个样品加入不同的Index，或一个样本加入一套Index；要求最终混合后的文库保证所有Index都以套为单位凑齐。Index1-16中，4个为一套，共4套，分别为1-4，5-8，9-12，13-16。Index17-128中，8个为一套，共14套，分别为17-24，25-32，33-40，41-48，49-56，57-64，65-72，73-80，81-88，89-96，97-104，105-112，113-120及121-128。

表6 PCR反应混合液的配制

组分	体积
2 \times PCR Mix	50 μ l
Index primer Mix	6 μ l
纯化回收的接头连接产物	44 μ l
Total	100 μ l

2. 震荡混匀5 s，瞬时离心将反应液收集至管底；
3. 将上述PCR管置于PCR 仪上，按照下表的条件进行反应：

表7 PCR反应程序

温度	时间	循环数
热盖	On	
98°C	3 min	
98°C	10 s	
60°C	15 s	参照表8
72°C	30 s	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

注意：循环数应该根据起始DNA量进行调整。具体循环数可参考表8。

表8 获取300 ng和1 µg文库推荐的扩增循环数

样本DNA	对应产量所需循环数	
	300 ng	1 µg
100 pg	16-18	19-20
1 ng	11-13	15-16
5 ng	9-11	13-15
10 ng	8-10	10-13
50 ng	6-7	8-10
100 ng	5-6	7-9
500 ng	0*/1-3	5-6
1000 ng	0*/1-3	4-5

注意：

- 1 FFPE 样本质量较差，可在推荐最高循环数的基础上增加3个循环。
- 2 当DNA质量较差、文库较长时，可适当提高循环数以获取足量文库。
- 3 *当接头连接时使用完整长度的Adaptor，且文库产出满足应用要求时，可不进行PCR扩增步骤，直接获取PCR-Free文库；若使用的是不完整接头，需进行1-3轮PCR扩增，以获取测序所需的完整接头序列。
- 4 样本类型为cfDNA时，PCR循环数≥12。
- 5 DNA Control 循环数设为7。

2.5 PCR产物纯化

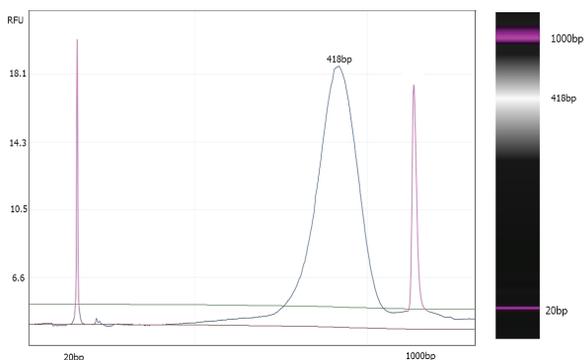
1. 提前30 min取出CMPure置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 加入1倍体积的 CMPure至PCR 产物中，震荡混匀5 s，室温孵育5 min；
3. 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置5 min至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
4. 保持离心管固定于磁力架上，加入250 μ l新鲜配制的80%乙醇，待悬起的磁珠完全吸附后彻底弃去乙醇（1 min左右）；
5. 重复步骤4一次，最后一次尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干；
注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。
6. 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥5~6 min，直至磁珠无反光、无开裂；
7. 将离心管从磁力架上取下，加入32 μ l去离子水进行DNA 洗脱，震荡混匀5 s，室温下溶解5 min；
8. 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置5 min至液体澄清，将30 μ l上清液转移到新的1.5 ml离心管中，进行上机测试或者-20 $^{\circ}$ C保存。

2.6 文库的质量控制

通常情况下，构建好的文库需要进行文库浓度及长度分布检测。

文库浓度测定：推荐使用荧光染料法（Qubit或Picogreen）或qPCR绝对定量法进行文库浓度测定。

文库长度分布检测：通过Agilent 2100 Bioanalyzer；LabChip GXII Touch微流控毛细管电泳等设备进行长度分布检测。



图：DNA文库快速制备试剂盒构建MGI测序平台DNA文库

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途