Version 1

Code No. AG12535
AG12536

AccuNext DNA 文库制备试剂盒（Illumina）

AccuNext DNA Library Prep Kit for Illumina

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

目录

- 产品概述.....1
- 产品组成.....1
- 保存及运输.....1
- 产品优势.....1
- 实验原理及流程.....2
- 实验注意事项.....4
- 实验前准备.....7
- 操作方法.....8

A. 末端修复 / dA 尾添加.....8

B. 接头连接.....8

C. 连接产物纯化.....9

C-1. 产物纯化.....9

C-2. DNA 片段分选.....11

D. PCR 文库扩增.....12

E. 扩增产物纯化或分选.....13

F. 文库质量检测.....13

- 实验例.....13

➢ 产品概述

本产品是针对 illumina 高通量测序平台定向开发的 DNA 文库构建试剂盒，可以将片段化后的 100 pg ~ 1 μg 双链 DNA 样本制备成测序文库。本产品采用优化的 Buffer 体系，改进了末端修复 / dA 尾添加、接头连接和文库扩增等步骤，提升了连接效率与扩增效率；具有广泛的样本适用性，能最大程度上保证文库构建成功。本产品需搭配 illumina 测序所用的接头及 PCR 扩增时所需引物进行文库构建【例如：可使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12537 / AG12538）和 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）】，可得到适用于 illumina 平台测序的 DNA 文库。

本产品的反应体系经过了精心优化，实验中所有试剂请使用本产品中提供的，不建议改变任何反应组分的用量及浓度或用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不好的实验结果。如需替换，请先进行验证。

➢ 产品组成*a

组分名称	AG12535 （12 rxns）	AG12536 （48 rxns）
End Repair Enzyme Mix	24 μl	96 μl
10X End Repair Buffer	72 μl	288 μl
T4 DNA Ligase（350 U / μl）	12 μl	48 μl
Ligation Buffer	300 μl	1.2 ml
AccuNext DNA Polymerase（1 U / μl）	12 μl	48 μl
2X *AccuNext* PCR Buffer	300 μl	1.2 ml
Nuclease free water	1 ml × 2 pcs	1ml × 5 pcs

*a：接头连接所需的 illumina 测序所用的接头及 PCR 扩增时所需的引物是实验必须的，但本产品中未配置，需要单独购买。【例如，可使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12537 / AG12538）和 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）】。

➢ 保存及运输

保存温度：−20℃ 保存

运输温度：−20℃ 冰袋运输

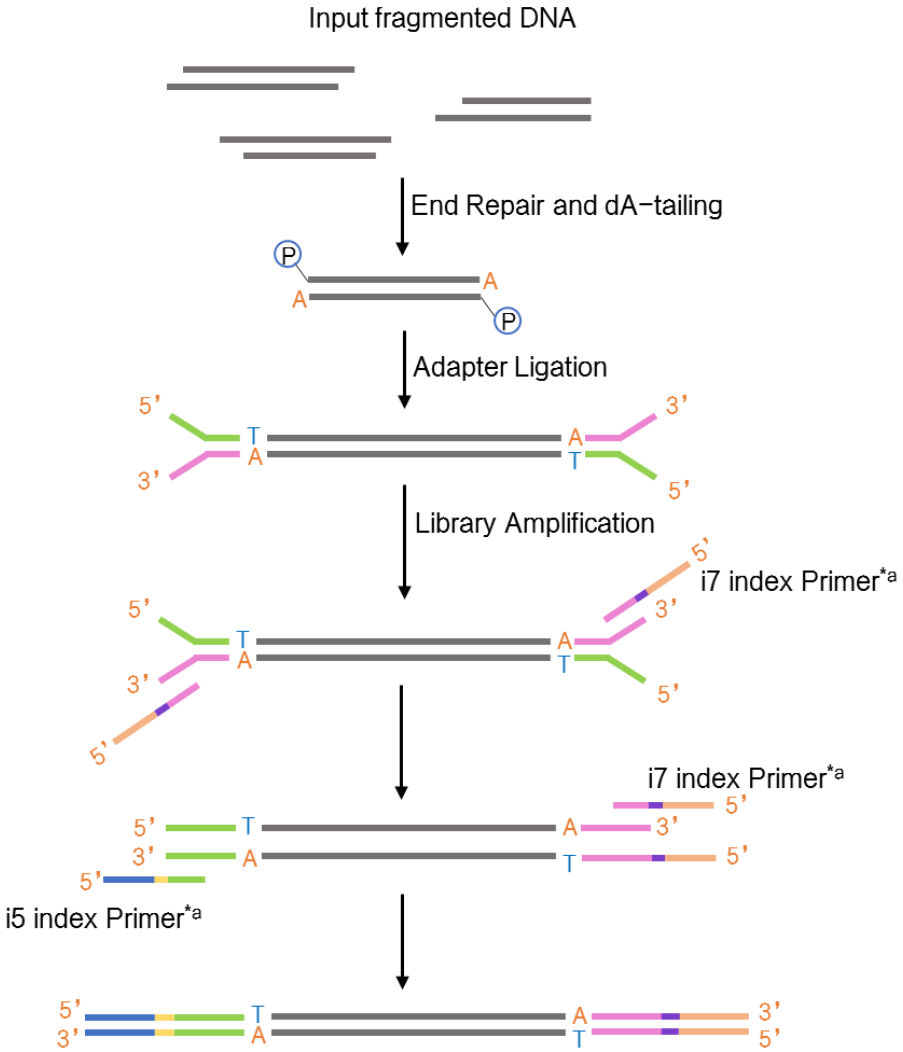
➢ 产品优势

1. 单管式末端修复、加 dA 尾反应，显著缩短实验耗时。
2. 可兼容酶切法和机械法打断的 DNA 片段。
3. 可高效修复片段化 DNA 的末端，修复产物 5’端包含磷酸基团且 3’端加上 dA 尾。
4. 适用范围广，可对片段化后的 100 pg − 1 μg 的 DNA 样本进行文库构建。

➢ 实验原理及流程

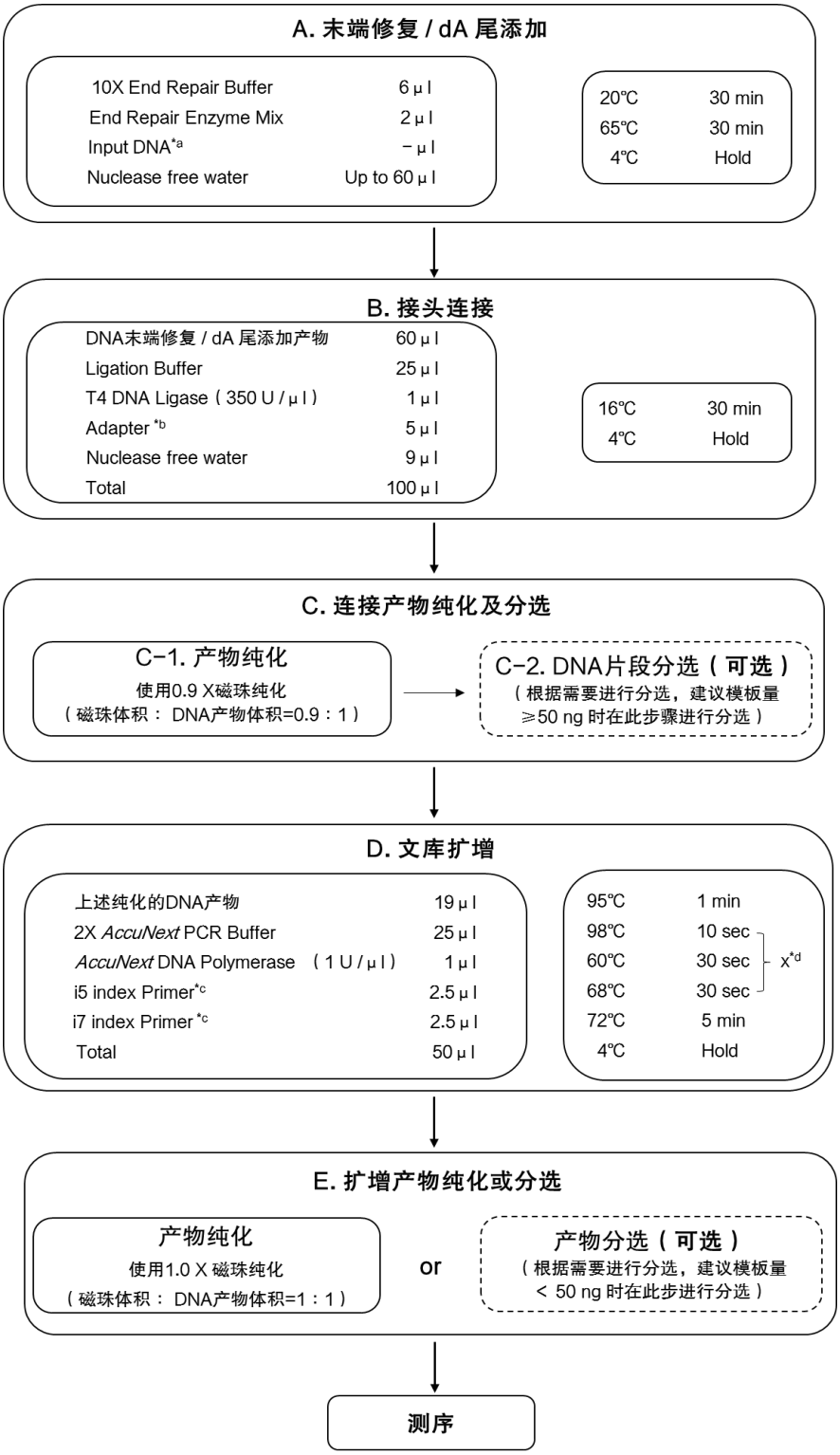
利用 End Repair Enzyme Mix，对片段化的 DNA 进行修复，转化为 5’端加上磷酸基团和 3’端加上 dA 尾的 DNA 片段，具体过程如下：在 dNTP 存在的条件下，利用 T4 DNA 聚合酶将片段化的 DNA 两端平滑化;利用 T4 多聚核苷酸激酶（T4 Polynucleotide Kinase，T4 PNK）在 DNA 片段的 5’端加上磷酸基团；利用 Taq DNA 聚合酶和 dATP，使 DNA 片段的 3’端形成一个 dA 尾。

然后在 T4 DNA Ligase 的作用下，将“Y”型接头（Adapter）连接在 DNA 两端，纯化（或分选）后，使用 illumina 文库扩增引物进行文库扩增，经纯化（或分选）后即可获得适用于 illumina 平台测序的 DNA 文库。图 1 是试剂盒原理，图 2 是试剂盒操作流程图。



*a：i5 / i7 index Primer 可使用 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit (Illumina) （Code No. AG12529/AG12530/AG12531）或其他等效产品。

图 1 试剂盒原理



*a：DNA 需使用酶切法或机械法打断的 DNA 片段。

*b：Adapter 可使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12537 / AG12538）或其他等效产品。

*c：i5 / i7 index Primer 可使用 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）或其他等效产品。

*d：X 表示扩增循环数，需要根据投入的模板量进行调整，可参考**<表 2. PCR 循环数推荐表>**。

图 2. 实验操作流程

➢ 实验注意事项

1. 操作过程

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 DNA 被污染或降解。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和无核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 耗材方面，使用无菌无酶的耗材。为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置正向气流）、模板添加区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
  1) 在试剂配制区进行以下操作：末端修复 / dA 尾添加的试剂配制、连接试剂配制及 PCR 扩增试剂配制；
  2) 在模板添加区加入模板；
  3) 在 PCR 扩增区进行扩增；
  4) 产物纯化区进行磁珠纯化；
  5) 在电泳检测区进行电泳。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（用 70%酒精）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加 DNA 模板）实验，确认实验是否有污染。

2. 样本要求

- ❖ 本产品适用酶切法和机械法打断的 DNA 片段，兼容 100 pg ~ 1 μg 片段化 DNA。
- ❖ 使用高纯度 DNA 进行反应。DNA 模板中残留蛋白质、有机溶剂和盐，可能会影响末端修复/dA 尾添加步骤的反应效率。若 DNA 片段化过程会引入高浓度的金属离子螯合剂或其他盐类（如酶切法片段化可能会引入片段化酶及其缓冲液），建议对片段化后的 DNA 进行纯化以减少对末端修复/dA 尾添加反应的影响。
- ❖ 片段化后的 DNA 需要测定浓度，文库构建时 Input DNA 量不能以片段化前的 DNA 量计算，否则可能会由于 Input DNA 量偏低，扩增循环数不足导致文库产量偏低。

3. 接头连接

- ❖ 本试剂盒需搭配 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12537 / AG12538）或其他等效产品，才可完成接头连接。
- ❖ 在进行**< B. 接头连接 >** 时，勿将 Adapter 过早加入连接预混液中，容易造成接头自连。可将 Ligation Buffer、T4 DNA Ligase（350 U / μl）和 Nuclease free water 先配制成预混液，在 DNA 末端修复 / dA 尾添加产物加入前，再向连接预混液添中加 Adapter。
- ❖ Adapter 的质量和使用浓度直接影响连接效率及文库产量。Adapter 用量过高可能会

产生较多 Adapter Dimer；用量偏低可能会影响连接效率及文库产量。表 1 是不同 Input DNA 量推荐的 Adapter 使用量，根据 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit (Illumina) (Code No. AG12537 / AG12538) 摸索所得，如使用其他等效产品，Adapter 用量建议根据实际情况进行调整。

表 1. 100 pg ~ 1 μg Input DNA 推荐的 Adapter 使用量

Input DNA	Adapter：Input DNA 摩尔比[*a]	参考调整比例范围
1 μg	10：1	10：1 ~ 20：1
100 ng	50：1	30：1 ~ 100：1
10 ng	100：1	50：1 ~ 200：1
1 ng	200：1	100：1 ~ 500：1
100 pg	3000：1	1000：1 ~ 5000：1

*a：Input DNA 摩尔数(pmol)≈ Input DNA 质量(ng) / [0.66 × Input DNA 平均片段长度]。

【举例说明 Adapter 加入量】：

Input DNA 为 100 ng，平均长度为 300 bp 时，加入的接头量计算如下：

1) Input DNA 摩尔数 (pmol) ≈ 100 (ng) / [0.66 × 300 bp] = 0.5 pmol；
2) 根据表 1 选择 Adapter：Input DNA 摩尔比为 50：1 时，
   Adapter (pmol) = 50 ×0.5 pmol = 25 pmol；
3) 如使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit (Illumina) (Code No. AG12537 / AG12538)，Adapter 浓度为 15 μM (15 pmol / μl)，则加入
   Adapter 体积 = 25 pmol ÷ 15 pmol / μl = 1.67 μl，
   补加 3.33 μl Nuclease free water 至 5 μl。一般加入 Adapter 体积为 5 μl，当 Adapter 浓度限制无法提高使用量时，可以考虑提高 Adapter 的体积至 10 μl。提高 Adapter 用量可能会提高文库产量，但增加 Adapter 也可能会增加文库中接头残留，造成测序数据的浪费。

4. 产物纯化与分选

- 如果 Input DNA 分布范围较宽，为了控制最终文库长度分布范围，建议可以重新进行片段化或者在建库过程中进行长度分选。如需进行分选，推荐使用磁珠进行分选，也可以通过切胶回收的方法进行分选。
- 进行文库分选会导致 DNA 损失，需要根据实际情况在文库长度 (分选) 与复杂度 (不分选) 之间进行选择。若 DNA 投入量高，一般推荐进行文库分选，获得合适的文库长度；若 DNA 投入量低，建议根据实际情况决定是否进行分选。
- 文库分选可以在建库过程的不同位置进行，可以在**< B. 接头连接 >**后或**< D. PCR 文库扩增 >** 后进行。当 Input DNA ≥50 ng 时，建议在接头连接后分选；当 Input DNA < 50 ng，为保证文库的复杂度，建议在**< D. PCR 文库扩增 >**后进行分选。

- Ligation Buffer 会对分选结果产生影响。因此，如在接头连接后进行长度分选，必须先进行纯化步骤< C-1. 产物纯化 >，将纯化产物洗脱至合适体积的洗脱液 RNase free water 中，再进行分选步骤< C-2. DNA 片段分选 >；如在 < D. PCR 文库扩增 >后进行长度分选，可直接进行分选步骤（省略纯化步骤），注意需要将 PCR 文库扩增产物使用 RNase free water 补齐至 100 μl。

5. 磁珠使用

- 本说明书中磁珠用量用“X”标识，表示磁珠与原始 DNA 样本体积的比例关系。如 DNA 样本体积为 100 μl，0.9X 磁珠用量为 0.9X100 μl = 90 μl；使用 0.7X / 0.2X 磁珠比例进行分选时，则第一轮磁珠用量为 0.7X100 μl = 70 μl，第二轮磁珠用量为 0.2X100 μl = 20 μl。
- 磁珠使用前应先平衡至室温，否则可能会导致回收率下降、分选效果不佳。
- 磁珠使用前应当充分振荡混匀，DNA 样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀。
- 吸取上清时，应避免吸到磁珠，否则可能会影响文库质量。
- 80%乙醇溶液应现用现配，避免长时间保存导致乙醇挥发，使乙醇浓度降低而影响文库回收效率。
- 磁珠室温干燥要充分，通常室温放置 5~10 min 即可。若 80%乙醇溶液干燥不充分会影响后续反应，干燥过度可能会出现磁珠开裂，DNA 片段难以洗脱下来，而导致产物回收率降低。

6. 文库扩增

- 本产品搭配 illumina 平台的文库扩增引物【如：*AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit (Illumina) （Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）】，可进行 PCR 文库扩增，得到适用于 illumina 平台测序的 DNA 文库。
- 下表 2 为推荐的文库扩增循环数，实验前建议对循环数进行摸索，循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。在满足文库产量的前提下，尽量选用少的循环数，确保得到高质量文库。

表 2. PCR 循环数推荐表

Input DNA	推荐循环数[*a]	
	100 ng 文库产量[*b]	1 μg 文库产量[*b]
1 μg	–	3 ~ 5
100 ng	2 ~ 3	6 ~ 8
10 ng	6 ~ 8	9 ~ 11
1 ng	11 ~ 13	14 ~ 16
100 pg	14 ~ 16	17 ~ 19

*a：若整个实验过程中如需进行片段分选，建议参照较高循环数进行 PCR。

*b：此处文库产量指的是未进行分选的文库产量。

7. 文库质检

通常情况下构建好的文库，可以通过片段长度分布及浓度检测来评价文库质量：

- 常用的文库浓度检测方法有 2 种：一种是基于 qPCR 绝对定量的方法；一种是基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit、PicoGreen 等。由于连接之后的产物中可能存在单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物、以及其他不完整 Adapter 的产物，使用 Qubit 等检测时都能被检测到，无法与双端均加上完整 Adapter 的产物进行区分；qPCR 绝对定量的方法只定量样品中两端 Adapter 完整的文库(即可测序文库)，可排除其他产物的干扰，因此推荐使用 qPCR 绝对定量的方法，对文库精确定量。
- 请勿使用任何基于吸光度检测的方法检测文库浓度。
- 文库大小检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品进行文库长度分布的检测。

➢ 实验前准备

1. 试剂&耗材

1) 酶切法或机械法打断的 DNA 片段。
2) 磁珠纯化：AMPure XP Reagent（Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881）或其他等效产品。
3) DNA 片段长度分布检测：High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626）及 Qubit dsDNA HS Assay Kit（Thermo Fisher Scientific, Code No. Q32854）或其他等效产品。
4) Adapter：适用于 illumina 平台的接头引物，如 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina)（Code No. AG12537 / AG12538）或其他等效产品。
5) PCR 扩增引物：适用于 illumina 平台的文库扩增引物，如 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit（Illumina)（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）或其他等效产品。
6) 其他材料：RNase free water、80%乙醇溶液（建议用 RNase free water 配制），0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管和低吸附 tube 管（如 Eppendorf，Code No. 022431021，或其他等效产品)等。

2. **仪器：**

1) PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液枪、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

➢ 操作方法

A. 末端修复 / dA 尾添加

此步骤对片段化的 Input DNA 末端进行修复及 dA 尾添加，可得到 5’端加上磷酸基团和 3’端加上 dA 尾的 DNA 片段。

- 将此步骤所用的试剂在冰上融化。融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。其中 End Repair Enzyme Mix 用移液枪轻柔吹打混匀，请勿涡旋。其余试剂可轻柔涡旋混匀。
- 10X End Repair Buffer 可能会形成沉淀，使用前请振荡混匀使沉淀充分溶解。

1. 在冰上配制末端修复 / dA 尾添加反应液：

组分	反应体系
10X End Repair Buffer	6 μl
End Repair Enzyme Mix	2 μl
Input DNA*a	– μl
Nuclease free water	Up to 60 μl

*a：需使用酶切法或机械法片段化后的 DNA，推荐 DNA 加入量为 100 pg ~1 μg。

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应。反应程序如下（**可提前设置反应程序**）：

温度	时间
20℃	30 min
65℃	30 min
4℃	Hold

3. 反应结束后，**立即**进行步骤 < B. 接头连接 >。

B. 接头连接

此步骤对末端修复 / dA 尾添加反应后的 DNA 片段加上 Adapter。

- 将此步骤所需用的试剂在冰上融化，融化后短暂离心，用移液枪轻柔吹打混匀（不建议用涡旋振荡），离心后放置于冰上备用。
- 根据 Input DNA 量，参考表 1 提前将 Adapter 稀释至合适的浓度备用。

1. 按下表在冰上配制接头连接反应体系：

组分	体积	
上述 DNA 末端修复 / dA 尾添加产物	60 μl	
Ligation Buffer	25 μl	*b
T4 DNA Ligase（350 U/μl）	1 μl	
Adapter*a	5 μl	
Nuclease free water	9 μl	
Total	100 μl	

*a：Adapter 可使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12537 / AG12538）或其他等效产品。

*b：将这 4 个组分先配制成预混液（在 DNA 末端修复 / dA 尾添加产物加入前，添加 Adapter，避免接头自连）轻柔混匀后，取 40 μl 预混液加入至上述 **< A. 末端修复 / dA 尾添加 >** 反应液中，用移液器轻柔混匀并离心。

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下（**可提前设置反应程序**）：

温度	时间
16℃	30 min
4℃	Hold

3. 反应结束后将产物放置于冰上，可立即进行纯化步骤，也可将产物-20℃过夜暂存（为避免 DNA 降解，建议尽快进行后续纯化步骤）。

C. 连接产物纯化及分选

此步骤对连接产物进行磁珠纯化，可有效去除未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。此步骤中包含 2 个步骤 **< C-1. 产物纯化 >** 和 **< C-2. DNA 片段分选 >**，请根据实际需求进行实验：

1. 如果不需要进行片段分选，则仅进行**< C-1. 产物纯化 >**。
2. 如果需要进行分选，建议 Input DNA≥50 ng 时，在此步骤进行分选，完成**< C-1. 产物纯化 >** 后进行 **< C-2. DNA 片段分选 >**；
3. 如果需要进行分选，建议 Input DNA < 50 ng 时，在**< D. PCR 文库扩增 >** 之后进行分选以保证样本的复杂性，在此步骤仅进行 **< C-1. 产物纯化 >**。

C-1. 产物纯化

使用磁珠纯化 DNA 产物，以 AMPure XP Reagent（Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881）为例，步骤如下：

实验前准备：

- 首次使用，建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4℃。
- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。

- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤：

1. 添加 90 µl 已恢复至室温的磁珠至上述 100 µl DNA 产物中（磁珠体积：样品体积 = 0.9：1），涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液枪轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心。
2. 将磁珠 / DNA 产物在室温（15 ~ 25℃）下孵育 5 min，让 DNA 与磁珠结合。
3. 将 PCR 管放在磁力架上至少 5 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心地去除上清液，注意不要吹散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终处在磁力架上，加入 200 µl 80%乙醇溶液（注意加入乙醇溶液时不要影响干扰磁珠），室温（15~25℃）孵育 30 sec，小心移除上清。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
   - 无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
7. 将 PCR 管从磁力架中取出，进行洗脱：
   - **如果 DNA 产物不需要进行磁珠分选：**
     1) 加入 **21 µl** RNase free water 覆盖磁珠，使用移液枪吹打混匀磁珠，短暂离心后室温（15 ~ 25℃）孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
     2) 将 PCR 管置于磁力架上，分离磁珠和溶液直到溶液澄清（约 5 min)。小心吸取 19 µl 上清转移到新的 tube 管中（**勿吸到磁珠**），直接进行步骤 **< D. PCR 文库扩增 >**。
   - **如果 DNA 产物需进行磁珠分选：**
     1) 加入 **105 µl** RNase free water 覆盖磁珠，使用移液枪吹打混匀磁珠，短暂离心后室温（15 ~ 25℃）孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
     2) 将 PCR 管置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 5 min)。小心吸取 100 µl 上清转移到新的 tube 管中（**勿吸到磁珠**），直接进行步骤 **< C-2. DNA 片段分选 >**。

C-2. DNA 片段分选

DNA 片段分选推荐使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 进行。下表 3 为推荐分选使用的磁珠比例，如使用其他来源磁珠，可能需要根据实际情况调整磁珠比例。

表 3：磁珠文库分选推荐比例

文库平均长度	300 bp	400 bp	500 bp
第一轮磁珠用量	80 μl (0.8 X)	70 μl (0.7 X)	60 μl (0.6 X)
第二轮磁珠用量	20 μl (0.2 X)	20 μl (0.2 X)	20 μl (0.2 X)

注：磁珠用量均是依据 100 μl DNA 产物体积计算而得，如使用“0.8 X”进行分选，则磁珠用量：0.8 X 100 μl = 80 μl。

实验前准备：

- 首次使用，建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4℃。
- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（ 15 ~ 25℃ ）（ 放置约 30 min ），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤：

1. 根据 DNA 片段长度需求，参考**表 3** 推荐比例向 100 μl 文库上清中加入第一轮分选磁珠量，涡旋混匀或移液枪吹打 10 次混匀，室温（ 15 ~ 25℃ ）孵育 5 min。
2. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（ 约 5 min ），小心转移上清到干净的离心管中（ **勿吸到磁珠** ）。
3. 参考**表 3** 向上清中加入第二轮分选磁珠量。
4. 涡旋混匀或移液枪吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
5. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（ 约 5 min ），小心移除上清（ **勿吸到磁珠** ）。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μl 80%乙醇溶液（ 注意加入乙醇溶液时不要影响干扰磁珠 ），室温孵育 30 sec，小心移除上清。
7. 重复步骤 6 一次。
8. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
   - 无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μl RNase free water，涡旋振荡或使用移液枪轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。

9. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 5 min）。
10. 小心转移 19 μl 上清至干净的 tube 管中（**勿吸到磁珠**），-20℃保存（为避免 DNA 降解，建议尽快进行后续操作）。

D. PCR 文库扩增

此步骤对纯化或分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增。

- 将此步骤所需用的试剂在冰上融化，融化后短暂离心，用移液枪轻柔吹打混匀，离心后放置于冰上备用。

1. 按下表在冰上配制 PCR 反应体系：

组分	体积
上述纯化的 DNA 产物	19 μl
2X *AccuNext* PCR Buffer	25 μl
AccuNext DNA Polymerase（1 U/μl）	1 μl
i5 index Primer*a	2.5 μl
i7 index Primer*a	2.5 μl
Total	50 μl

*a：i5 / i7 index Primer 可使用 *AccuNext* CDI Oligos for DNA Library Kit（Illumina）（Code No. AG12529 / AG12530 / AG12531）或其他等效产品。

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下（**可提前设置反应程序**）：

温度	时间	循环数
95℃	1 min	1
98℃	10 sec	X*a
60℃	30 sec	
68℃	30 sec	
72℃	5 min	1
4℃	Hold	-

*a：下表为推荐的文库扩增循环数，实验前建议对循环数进行摸索，在满足文库产量的前提下，尽量选用少的循环数，确保得到高质量文库。

Input DNA	推荐循环数*1	
	100 ng 文库产量*2	1 μg 文库产量*2
1 μg	-	3 ~ 5
100 ng	2 ~ 3	6 ~ 8
10 ng	6 ~ 8	9 ~ 11
1 ng	11 ~ 13	14 ~ 16
100 pg	14 ~ 16	17 ~ 19

*1：若整个实验过程中如需进行片段分选，建议参照较高循环数进行 PCR。

*2：此处文库产量指的是未进行分选的文库产量。

3. 反应结束后将产物放置于冰上，可立即进行后续纯化步骤，也可将扩增产物-20℃过夜保存或-80℃保存一个月（为避免 DNA 降解，建议尽快进行纯化步骤）。

E. 扩增产物纯化或分选

1. 参考< C-1. 产物纯化 > 的操作步骤，使用 1.0 X（磁珠：DNA=1：1）AMPure XP Reagent（Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881）纯化扩增产物。如需分选，直接参考步骤< C-2. DNA 片段分选 > 操作步骤进行（纯化步骤可省略），分选前将 PCR 扩增产物使用 RNase free water 补齐至 100 μl。

F. 文库质量检测

通常情况下可以通过检测文库长度分布及浓度来评价文库质量：

1. 取 2 μl 纯化后的 DNA 产物，使用 Qubit 4 Fluorometer 和 Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit（Thermo Fisher，Code No. Q33231）检测文库浓度。具体操作请参照说明书。
2. 取 1 μl 纯化后的 DNA 产物，使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 和 Agilent High Sensitivity DNA Kit（Agilent，Code No. 5067-4626）检测文库的分布范围。具体操作请参照说明书。

➢ 实验例

1. 以 10 ng 片段化后的 HL60 Cell gDNA 为模板，使用本产品制备 DNA 文库（连接之后仅进行纯化），PCR 扩增时使用 11 个循环，在 PCR 扩增后，分别使用 1.0X 磁珠纯化和用 0.7X / 0.2X 磁珠比例进行长度分选，然后使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。结果如下图 3 所示：

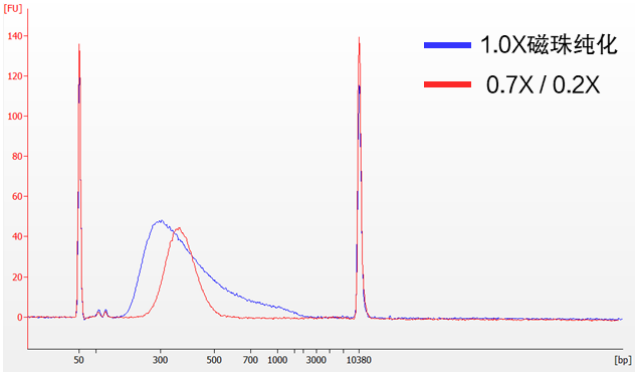


图 3. Agilent 2100 生物分析仪检测结果