

Version 1

Code No. AG12551

AG12552

AccuNext 一步法 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina)

AccuNext DNA Library Prep Advanced 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.





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. 片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾	8
B. 接头连接	8
C. 连接产物纯化	9
D. PCR 文库扩增	10
E. 扩增产物纯化或分选	11
F. 文库质量检测	11
➤ 实验例	12
➤ 附录：DNA 片段分选	12

➤ 产品概述

本产品是针对 illumina 高通量测序平台定向开发的片段化酶法 DNA 文库构建试剂盒，可以将 100 pg ~ 1 μg 双链 DNA 样本制备成测序文库。本产品操作简单，对传统的 DNA 建库法进行了改进，将 DNA 片段化、末端修复和加 dA 尾合并为一步，产物无需纯化，可直接进行接头连接；再经过连接产物纯化、文库扩增和文库纯化等步骤，即可获得适用于 illumina 平台测序的 DNA 文库。

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) 】。

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	AG12551 (12 rxns)	AG12552 (48 rxns)
<i>AccuNext</i> TF Enzyme Mix	24 μl	96 μl
10X TF Buffer	72 μl	288 μl
T4 DNA Ligase (350 U / μl)	12 μl	48 μl
Ligation Buffer	300 μl	1.2 ml
<i>AccuNext</i> PCR Mix III	300 μl	1.2 ml
Nuclease free water	1 ml × 2 pcs	1ml × 4 pcs

^{*a}: 接头连接所需的接头及 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

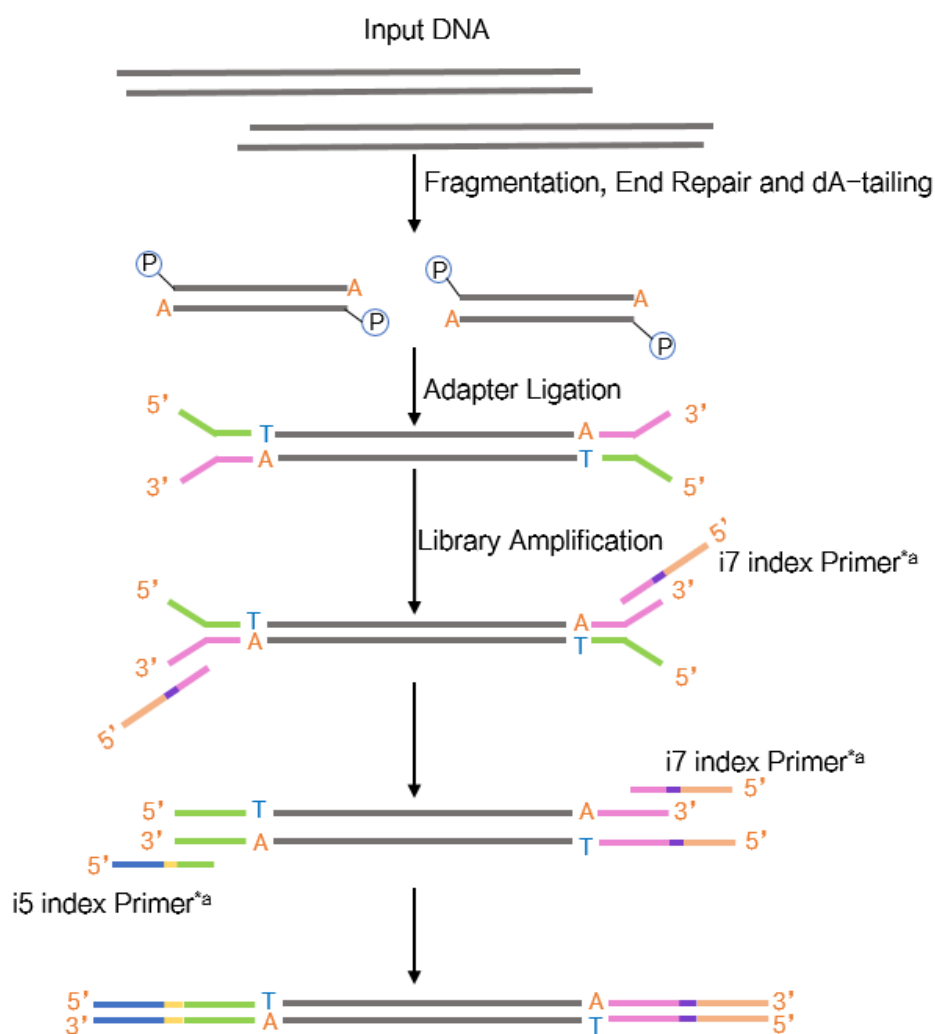
➤ 产品优势

1. 操作简单，单管式片段化、末端修复、加 dA 尾反应，显著缩短实验耗时。
2. DNA 适用范围广，灵敏度高，100 pg ~ 1 μg 的起始量均可制备高质量文库。
3. 双链 DNA 随机片段化，序列偏好性低。
4. 优化的高保真酶体系，文库产量和质量显著提高。

➤ 实验原理及流程

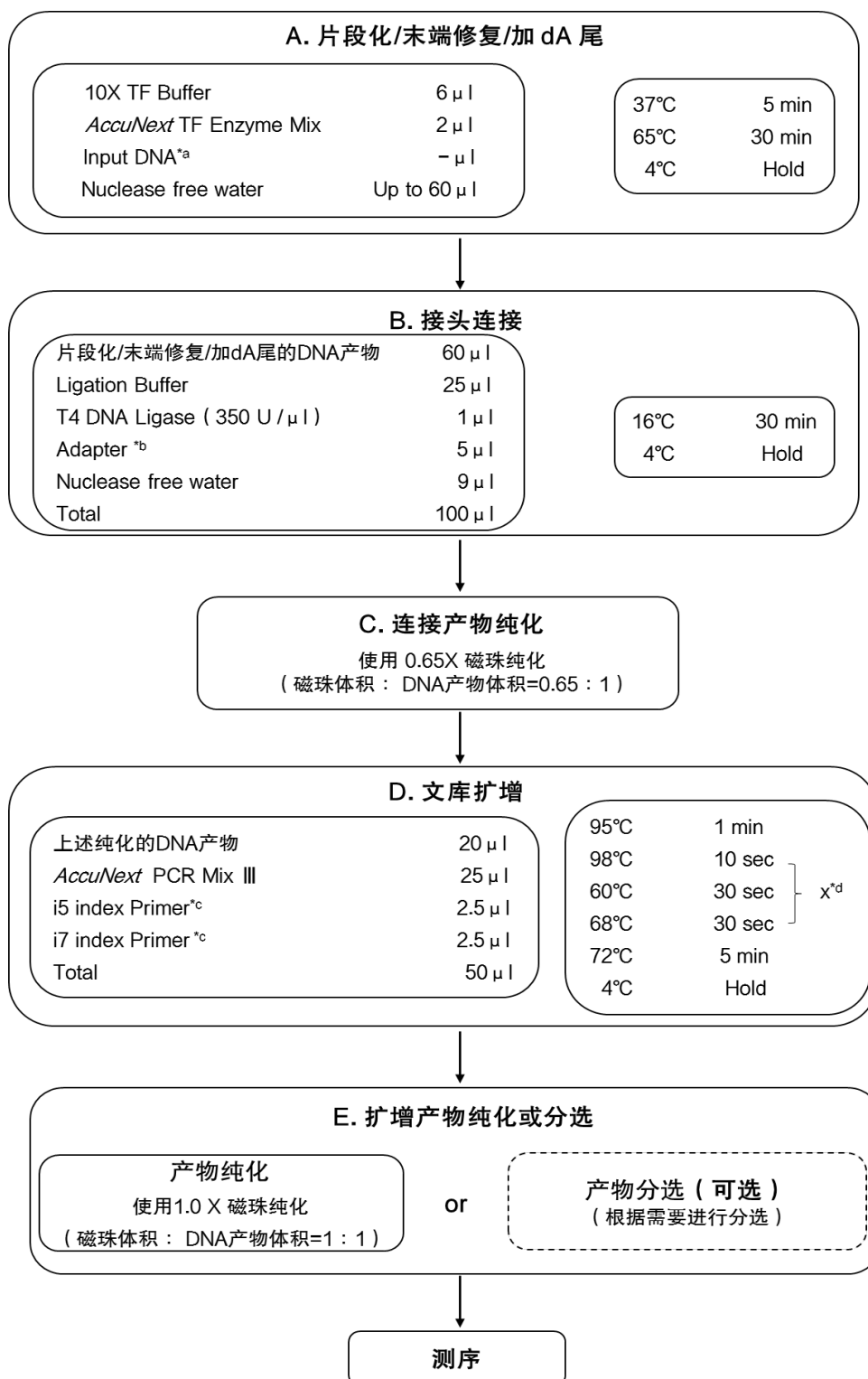
利用 *AccuNext*TF Enzyme Mix, 对 DNA 进行片段化、末端修复、加 dA 尾, 转化为 5' 端加上磷酸基团和 3' 端加上 dA 尾的 DNA 片段, 具体过程如下: 利用优化后的片段化酶将 DNA 进行片段化; 在 dNTP 存在的条件下, 利用 T4 DNA 聚合酶将片段化的 DNA 两端平滑化; 利用 T4 多聚核苷酸激酶 (T4 Polynucleotide Kinase, T4 PNK) 在 DNA 片段的 5' 端加上磷酸基团; 利用 Taq DNA 聚合酶和 dATP, 使 DNA 片段的 3' 端加上一个 dA 尾。

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。



*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: Input DNA 可直接使用未进行片段化的 DNA。

*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：片段化/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品管盖，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

- ❖ 本产品兼容 100 pg ~ 1 μg DNA，尽可能使用完整性好，纯度高（ $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ ）的 DNA。
- ❖ DNA 模板中残留蛋白质、有机溶剂和盐，可能会影响片段化 / 末端修复 / dA 尾添加步骤的反应效率。建议将 DNA 稀释在 ddH₂O 或不含 EDTA 的 10 M Tris Buffer（pH 7.5~8.0）中进行片段化或者对 Input DNA 进行纯化以减少对片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾反应的影响。

3. DNA 片段化

- ❖ 对于常规的质量高、完整性好的基因组 DNA，片段化时间 5 min，可获得片段分布在 200~700 bp 范围内的 DNA 文库。
- ❖ 若 DNA 存在降解，建议缩短片段化时间，摸索合适的条件。
- ❖ 若片段化后 DNA 大小不合适，可根据结果调整片段化时间（可以尝试按照 2 min 的幅度延长或缩短片段化时间），以达到最佳效果。
- ❖ 为保证更准确的片段化效果，片段化反应配制过程请于冰上操作。
- ❖ 在本产品推荐使用模板范围内（100 pg ~ 1 μg DNA），不同模板相同的片段化时间，文库产物大小分布差异不大（整体分布范围相当，主峰位置可能略有差异）。

4. 产物纯化与分选

- ❖ 对于完整性好的基因组 DNA，按照片段化 5 min 操作，文库大小在 200~700 bp 范围内，可直接纯化后进行文库质检，不进行分选。
- ❖ 如果文库片段分布范围较宽，一方面可重新建库，延长片段化时间，以获得大小合适的文库片段；另一方面，也可以进行片段分选。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。
- ❖ 如果文库片段分布偏小，可尝试缩短片段化时间，调整磁珠比例，以获得合适大小的文库片段。

5. 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 / μ l) 和 Nuclease free water 先配制成预混液，在 DNA 片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾的产物加入前，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 μ g 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 μ g	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) $\approx$ Input DNA 质量 (ng) / [0.66 $\times$ 片段化后 DNA 平均片段长度]。一般完整性好的 gDNA 按照 5 min 片段化，获得的 DNA 大小可以按照 300bp 计算 Adapter 用量。

【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) $\approx$ 100 (ng) / [0.66 $\times$ 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 $\times$ 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 $15 \mu\text{M}$ ($15 \text{ pmol} / \mu\text{l}$), 则加入
- Adapter 体积 = $25 \text{ pmol} \div 15 \text{ pmol} / \mu\text{l} = 1.67 \mu\text{l}$,**
- 补加 $3.33 \mu\text{l}$ Nuclease free water 至 $5 \mu\text{l}$ 。一般加入 Adapter 体积为 $5 \mu\text{l}$, 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 $10 \mu\text{l}$ 。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。

6. 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 $100 \mu\text{l}$, 1.0X 磁珠用量为 $1.0 \times 100 \mu\text{l} = 100 \mu\text{l}$; 使用 $0.7\text{X} / 0.2\text{X}$ 磁珠比例进行分选时, 则第一轮磁珠用量为 $0.7 \times 100 \mu\text{l} = 70 \mu\text{l}$, 第二轮磁珠用量为 $0.2 \times 100 \mu\text{l} = 20 \mu\text{l}$ 。
- ❖ 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 $5 \sim 10 \text{ min}$ 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。

7. 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、序列偏好性增加、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	$1 \mu\text{g}$ 文库产量的循环数 ^{*a}
$1 \mu\text{g}$	3 ~ 5
100 ng	6 ~ 8
10 ng	10 ~ 12
1 ng	14 ~ 16
100 pg	17 ~ 19

*a: 此处文库产量指的是未进行分选的文库产量。

8. 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) Input DNA。
- 2) 磁珠纯化：本公司产品 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548) 或其他等效产品【如 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 】。
- 3) DNA 片段长度分布及浓度检测：Agilent DNA 7500 Kit (Agilent, Code No. 5067-1506) 及本公司产品 *AcuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit (Code No. AG12549 / AG12550) 或其他等效产品【如 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Code No. Q32854) 】。
- 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. 片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾

此步骤对 Input DNA 进行片段化、末端修复及加 dA 尾，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 *AccuNext* TF 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 TF Buffer 可能会形成沉淀，使用前请振荡混匀使沉淀充分溶解。

1. 在冰上配制片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾反应液：

组分	反应体系
10X TF Buffer	6 μ l
<i>AccuNext</i> TF Enzyme Mix	2 μ l
Input DNA ^{*a}	~ μ l
Nuclease free water	Up to 60 μ l

*a: 可直接使用未片段化的 DNA (如基因组 DNA)，推荐 DNA 加入量为 100 pg ~ 1 μ g。

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，将样品立即放于冰上，待 PCR 仪器孔温稳定在 37°C 后再放入 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
37°C	5 min ^{*a}
65°C	30 min
4°C	Hold

*a: 片段化的时间可根据需求的文库大小进行调整，若需求的文库片段偏小，可尝试延长片段化时间，若需求的文库片段偏大，可尝试缩短片段化时间。一般情况下，使用完整性好的 gDNA 片段化 5 min，获得的片段化产物约 300 bp。

3. 反应结束后，立即进行步骤 < B. 接头连接 >。

B. 接头连接

此步骤对片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾反应完成后的 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
上述片段化/末端修复/加 dA 尾的 DNA 产物	60 μ l
Ligation Buffer	25 μ l
T4 DNA Ligase (350 U / μ l)	1 μ l
Adapter ^{*a}	5 μ l
Nuclease free water	9 μ l
Total	100 μ l

*a: Adapter 可使用 *AccuNext* Short Adapter for DNA Library Kit (Illumina) (Code No. AG12537 / AG12538) 或其他等效产品，根据不同的模板量，参考表 1 添加不同的 Adapter 用量。

*b: 将这 4 个组分先配制成预混液（在片段化/末端修复/加 dA 尾的 DNA 产物加入前，添加 Adapter，避免接头自连）轻柔混匀后，取 40 μ l 预混液加入至上述 **<A. 片段化/末端修复/ 加 dA 尾>** 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°C	30 min
4°C	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°C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

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。

推荐使用 0.65 X (磁珠 : DNA=0.65 : 1) *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548) 进行纯化，步骤如下：

【注：不同的磁珠使用比例可能不一致，建议使用前摸索合适的磁珠比例，若发现文库片段偏大，可适当提高磁珠比例至 0.8X】。

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°C。
- 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 μ l。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25°C）（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 65 μ l 已恢复至室温的磁珠至上述 100 μ l DNA 产物中（磁珠体积：样品体积 = 0.65 : 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°C）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 μ l 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°C）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，加入 21 μ l RNase free water 覆盖磁珠，使用移液枪吹打或涡旋混匀磁珠，短暂离心后室温（15 ~ 25°C）孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
8. 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 20 μ l 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 >。

D. PCR 文库扩增

此步骤对纯化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	20 μ l
<i>AccuNext</i> PCR Mix III	25 μ l
i5 index Primer ^a	2.5 μ l
i7 index Primer ^a	2.5 μ l
Total	50 μ l

^aa: 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°C	1 min	1
98°C	10 sec	} X ^a
60°C	30 sec	
68°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	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	1 μg 文库产量的循环数
1 μg	3 ~ 5
100 ng	6 ~ 8
10 ng	10 ~ 12
1 ng	14 ~ 16
100 pg	17 ~ 19

- 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°C 过夜保存或-80°C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

- 参考< C. 连接产物纯化 > 的操作步骤，使用 1X（磁珠：DNA=1：1）
MagSpherix DNA Beads（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）纯化扩增产物。如需分选，直接参考步骤< 附录：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：

- 取 2 μl 纯化后的 DNA 产物，使用 Qubit 4 Fluorometer 和本公司产品 *AcuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit（Code No. AG12549 / AG12550）搭配检测文库浓度。具体操作请参照说明书。
- 取 1 μl 纯化后的 DNA 产物，使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 和 Agilent DNA 7500 Kit（Agilent, Code No. 5067-1506）或其他等效产品检测文库的分布范围。具体操作请参照说明书。

➤ 实验例

1. 以 100 pg 的 HL60 Cell gDNA 为模板，使用本产品制备 DNA 文库，PCR 扩增时使用 19 个循环，在 PCR 扩增后，使用 1.0X 磁珠纯化，然后使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。结果如下图 3 所示：

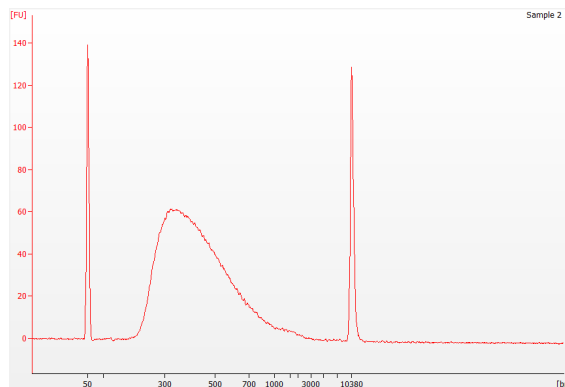


图 3. Agilent 2100 生物分析仪检测结果

➤ 附录：DNA 片段分选

DNA 片段分选推荐使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548) 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: *MagSpherix* DNA Beads 文库分选推荐比例

文库平均长度	300 bp	350 bp	400 bp
第一轮磁珠用量	90 μ l (0.9 X)	75 μ l (0.75 X)	70 μ l (0.7 X)
第二轮磁珠用量	20 μ l (0.2 X)	20 μ l (0.2 X)	20 μ l (0.2 X)

注：磁珠用量均是依据 100 μ l DNA 产物体积计算而得，如使用 “0.7 X” 进行分选，则磁珠用量：0.7 X 100 μ l = 70 μ l。

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 μ l。
- 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 μ l 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 μ l 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。
9. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μ l 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。
10. 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）。
11. 小心转移 20 μ l 上清至干净的 tube 管中（勿吸到磁珠），-20°C 保存。