

青岛百创智能制造技术有限公司

BMKMANU DG1000 Library Construction Kit User Guide V3



时空产品部

2023.6.14

版本历史

说明书版本：V1

试剂盒版本：V1

修订时间：2021 年 12 月

修订内容：首次发布

说明书版本：V2

试剂盒版本：V2

修订时间：2022 年 9 月

修订内容：

1. 更新试剂盒每个试剂盒的体积。
 2. 操作流程更规范。
-

说明书版本：V3

试剂盒版本：V3

修订时间：2023 年 6 月

修订内容：

1. 更新试剂盒中各个组分的体积。
2. 将“五.设备仪器”与“六.自备试剂&耗材&仪器”内容合并。
3. 将 100 μ l 80%乙醇溶液体积修改成 200 μ l。
4. 最后用 Nuclease-free H₂O 洗脱磁珠的步骤，修改成先加水到 PCR 管中，再从磁力架上取下 PCR 管。
5. 新增内容：
 - (1) 新增各操作步骤注意事项。
 - (2) 新增各个反应的热盖温度&反应体系&反应时间。
 - (3) 新增文库浓度检测注意事项，以及文库片段大小质控要求。

目录

一. 产品概述	1
二. 产品组分	1
三. 运输与保存条件	1
四. 适用范围	2
五. 自备试剂&耗材&仪器	2
六. 注意事项	2
七. 实验流程概要	3
八. 操作步骤	3
1. 片段化&末端修复&添加 A 尾	3
2. 片段筛选-SPRIselect	4
3. 接头连接	5
4. 接头产物纯化--SPRIselect	6
5. 样品 Index PCR	6
6. 片段筛选--SPRIselect	7
7. 文库定量及质控	8

一. 产品概述

BMKMANU DG1000 Library Construction Kit 是一款针对 Illumina 高通量测序平台设计的文库构建试剂盒。本试剂盒将 cDNA 片段化、末端修复及末端加 A 尾合并成一步完成，优化了实验流程，大大降低了建库的时间和流程；所得的产物纯化后，可通过试剂盒配备的接头连接试剂，实现 adapter 的连接。除此之外，试剂盒还配备了专门的 PCR 扩增试剂，保证得到的文库序列保真度较高、产量高、无明显碱基偏好；以及 72 种不同的 Index 接头，每个样品选择唯一的 Index 即可。本试剂盒所使用的酶和缓冲液已经过严格质量控制及功能验证，最大程度上保证实验结果的稳定性和可重复性。

二. 产品组分

编号	试剂名称	4 rxns
1	Fragmentation Buffer	20 μ l
2	Fragmentation Enzyme	10 μ l
3	Rapid Ligation Buffer	40 μ l
4	Rapid DNA Ligase	20 μ l
5	DNA Adaptor	40 μ l
6	Amplification Mix	100 μ l
7	Index1-X	10 μ l
8	Index2-X	10 μ l
9	Index3-X	10 μ l
10	Index4-X	10 μ l

三. 运输与保存条件

运输方式：干冰运输。

保存方式：-20~-15 $^{\circ}$ C保存。

四. 适用范围

适用于 BMKMANU DG1000 3'单细胞转录组文库。

物种：人、鼠、部分植物等物种。

五. 自备试剂&耗材&仪器

试剂：

无核酸酶水 (Nuclease-free H₂O)、无水乙醇、SPRI select (BECKMAN B23317)、Qubit dsDNA HS 分析试剂盒等。

耗材：

无酶 PCR 管、一次性无菌&低吸附枪头、低吸附 1.5ml 离心管、不同量程移液枪等。

仪器：

Qsep 400 核酸片段分析仪（或其他等效仪器）、Qubit 荧光定量仪、PCR 热循环仪等、转录组磁力分离器（或其他等效磁力架）、涡旋震荡仪、迷你离心机。

六. 注意事项

1. cDNA 样品质控

- (1) cDNA 浓度：一般要求 cDNA 浓度大于 1.5ng/μl。
- (2) cDNA 片段质控：片段长度为 200-9000bp；35-100bp 有片段不影响建库；主峰集中在 1000-2000bp。

2. 操作注意事项

- (1) 实验前请仔细阅读本说明书，确保实验顺利完成。
- (2) 操作过程中，请注意避免污染，建库请使用一次性无菌&低吸附枪头、1.5ml 离心管进行实验。
- (3) 实验所用 SPRI 磁珠使用前应保证充分混匀。
- (4) 80%乙醇溶液建议现配现用，配制时间不超过 12h。

(5) 操作环境、操作台及实验工具需保持洁净，可用 70%乙醇或核酸酶清除剂喷洒清洁台面。

七. 实验流程概要

编号	步骤		时间
1	片段化&末端修复&添加 A 尾	酶切打断 末端修复 添加 A 尾	35min
2	片段筛选-SPRIselect	SPRIselect 片段筛选	40min
3	接头连接	接头连接	20min
4	接头产物纯化-SPRIselect	SPRIselect 片段纯化	30min
5	样品 Index PCR	PCR 扩增富集	~1h
6	片段筛选-SPRIselect	SPRIselect 片段筛选	40min
7	定量与质控	浓度&片段大小检测	~55min

八. 操作步骤

1. 片段化&末端修复&添加 A 尾

(1) 将 Fragmentation Buffer、Fragmentation Enzyme 试剂取出，冰上解冻并缓慢吹吸混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

(2) 按照下表配置**酶切 Mix (冰上配置)**，用枪头混匀并离心。若为多个样本，按照 1.1 倍配置 Mix。**配置好后放冰上，现配现用。**

Library Kit	组分	1 rxn
1	Fragmentation Buffer	5 μ l
2	Fragmentation Enzyme	2.5 μ l
总体积		7.5 μ l

(3) 先取 20~150ng 的 cDNA 样品（一般取 cDNA 产量的 1/4）于新的 PCR 管中，然后用

Nuclease-free H₂O 补至 22.5μl，最后加入 7.5μl 的酶切 Mix。

- (4) 在冰上用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 20μl），瞬时离心。
- (5) 立即将样品转移至 PCR 仪中进行反应（**此时的 PCR 仪温度显示为 4°C，且样本在转移过程中依然在冰上**），运行程序如下：

热盖	反应体系	所需时间
75°C	30μl	~25min
步骤	温度	时间
a	4°C	Hold
b	30°C	5min
c	65°C	20min
d	4°C	Hold

【注意】：

- a.待 PCR 仪温度降为 4°C 后，再将样品转移到仪器中进行反应，避免过度酶切。
- b.热盖温度必须设置成 75°C，否则会降低酶切效率。

(6) 反应结束后，立即将样品取出，瞬时离心，直接进入下一步操作。

2. 片段筛选-SPRIselect

(1) 充分涡旋混匀 SPRI 磁珠后，向每个样品中加入 16.5μl SPRI (0.55×) 磁珠。用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 30μl）。

(2) 室温下静置孵育 5 min。

(3) 瞬时离心后，将装有样品的 PCR 管放置于磁力架上（HIGH 面向上）~2min，直到溶液澄清，**不要丢弃上清液**。

(4) 将 **43.6μl 上清液**转移至新的 PCR 管中，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(5) 再次充分涡旋混匀 SPRI 磁珠后，向上述 **43.6μl 上清液样品**中加入 4.5μl SPRI (0.15×) 磁珠，用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 40μl）。

(6) 室温下静置孵育 5 min。

(7) 瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上（HIGH 面向上）~2min，直到溶液澄清后，**弃去上清液**，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(8) 在磁力架上，向 PCR 管中加入 125μl 80%乙醇溶液（**现配现用**），静置 30s，弃去乙

醇溶液。

(9) 重复步骤 (8)。

(10) 盖上 PCR 管管盖，瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上 (LOW 面向上)，直至溶液澄清，用 10 μ l 的枪头吸弃残留的乙醇溶液。

(11) 开盖室温干燥至磁珠表面不再光滑 (**~1min, 控制好时间, 过度干燥会降低洗脱效率**)，立即加入 26 μ l Nuclease-free H₂O (可用 EB 溶液替换)。

(12) 从磁力架上取下 PCR 管，用移液枪吹吸混匀 15 次 (移液枪设置为 25 μ l)，室温下静置孵育 2min。

(13) 瞬时离心后，将 PCR 管重新放置于磁力架上 (LOW 面向上) ~2min，直至溶液澄清。

(14) 将 25 μ l 上清液 (片筛产物) 转移到新的 PCR 管中，并直接进入下一步反应。

3. 接头连接

(1) 按照下表配置**接头连接 Mix**，用移液枪混匀并离心。若为多个样本，按照 1.1 倍配置 Mix。配置如下：

Library Kit	组分	1 rxn
3	Rapid Ligation Buffer	10 μ l
4	Rapid DNA Ligase	5 μ l
5	DNA Adaptor	10 μ l
总体积		25 μ l

(2) 向每个样品 (片筛产物) 中加入 25 μ l 的**接头连接 Mix** (反应总体积: 50 μ l)，用移液枪轻轻吹吸混匀 15 次 (移液枪设置为 40 μ l)，瞬时离心。

(3) 将装有样品的 PCR 管转移至 PCR 仪中进行反应 (**此时的 PCR 仪温度显示为 20 $^{\circ}$ C**)，运行程序如下：

热盖	反应体系	所需时间
Off	50 μ l	~20min
步骤	温度	时间
a	20 $^{\circ}$ C	15min
b	4 $^{\circ}$ C	Hold

【注意】：

a.待 PCR 仪温度降为 20 $^{\circ}$ C 后，再将样品转移到仪器中进行反应。

b.热盖温度必须处于关闭（Off）状态，否则会降低接头连接效率。

4. 接头产物纯化--SPRIselect

(1) 充分涡旋混匀 SPRI 磁珠后，向每个样品中加入 40μl SPRI (0.8×) 磁珠试剂。用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 80μl）。

(2) 室温下静置孵育 5min。

(3) 瞬时离心后，将装有样品的 PCR 管放置于磁力架上（HIGH 面向上）~2min，直到溶液澄清后，弃去上清液，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(4) 在磁力架上，向 PCR 管中加入 200 μl 80%乙醇溶液（现配现用），静置 30s，弃去乙醇溶液。

(5) 重复步骤（4）。

(6) 盖上 PCR 管管盖，瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上（LOW 面向上），直到溶液澄清，用 10μl 的枪头吸弃残留的乙醇溶液。

(7) 开盖室温干燥至磁珠表面不再光滑（~2min，过度干燥会降低洗脱效率），立即加入 16μl Nuclease-free H₂O（可用 EB 溶液替换）。

(8) 从磁力架上取下 PCR 管，用移液枪吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 15μl），室温下静置孵育 2min。

(9) 瞬时离心后，将 PCR 管重新放置于磁力架上（LOW 面向上）~2min，直至溶液澄清。

(10) 将 15μl 上清液（接头纯化产物）转移到新的 PCR 管中，并直接进入下一步反应。

5. 样品 Index PCR

(1) 按照下表配置 Index PCR 反应体系，用移液枪混匀并离心，总反应体系为 50μl。配置如下：

组分	1 rxn
接头纯化产物	15μl
Amplification Mix	25μl
Index	10μl
总体积	50μl

【注意】：

a.每个样品选择唯一的 Index，并将 Index 名称记录在实验记录表中。

b.本产品所用的 Index 信息已上传百创智造官网，详情请见：

<http://www.bmkmanu.com/portfolio/download>

(2) 瞬时离心后置于 PCR 仪中，扩增程序如下：

热盖	反应体系	所需时间	
105°C	50µl	~30 min	
步骤	温度	时间	循环
1	98°C	45s	-
2	98°C	20s	循环 2-4 步, 查表 Table 1 设置循环数
3	54°C	30s	
4	72°C	20s	
5	72°C	5min	-
6	4°C	Hold	-

PCR 循环数可根据 Table 1 进行设置：

Table 1

cDNA 总量	循环数
1~25ng	14~16
25~150ng	12~14

【注意】：

若 cDNA 投入量为 20ng，一般建议 PCR 循环数设置为 15；

若 cDNA 投入量为 50ng，一般建议 PCR 循环数设置为 13；

若 cDNA 投入量为 100ng，一般建议 PCR 循环数设置为 12。

(3) PCR 反应结束后，直接进入步骤 6，也可将 PCR 产物置于 **4°C 冰箱保存 72h**。

6. 片段筛选--SPRIselect

(1) 充分涡旋混匀 SPRI 磁珠后，向每个样品中加入 27.5µl SPRI (0.55×) 磁珠。用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 73µl）。

(2) 室温下静置孵育 5min。

(3) 瞬时离心后，将装有样品的 PCR 管放置于磁力架上（HIGH 面向上）~2min，直到溶液澄清，**不要丢弃上清液**。

(4) 将 **73µl 上清液**转移至新的 PCR 管中，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(5) 充分涡旋混匀 SPRI 磁珠后，向上述 **73µl 上清液**样品中加入 7.5µl SPRI (0.15×) 磁珠

试剂。用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 75 μ l）。

(6) 室温下静置孵育 5min。

(7) 瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上（HIGH 面向上）~2min，直到溶液澄清后，**弃去上清液**，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(8) 在磁力架上，向 PCR 管中加入 200 μ l 80%乙醇溶液（**现配现用**），静置 30s，弃去乙醇溶液。

(9) 重复步骤（8）。

(10) 盖上 PCR 管管盖，瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上（LOW 面向上），直到溶液澄清，用 10 μ l 的枪头吸弃残留的乙醇溶液。

(11) 开盖室温干燥至磁珠表面不再光滑（**~1min，过度干燥会降低洗脱效率**），立即加入 33 μ l Nuclease-free H₂O（可用 EB 溶液替换）。

(12) 从磁力架上取下 PCR 管，用移液枪吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 30 μ l），室温下静置孵育 2min。

(13) 瞬时离心后，将 PCR 管重新放置于磁力架上（LOW 面向上）~2min，直至溶液澄清。

(14) 将 32 μ l 上清液（PCR 纯化产物/文库）转移至 1.5ml 离心管中保存。

(15) **构建好的文库可直接进入步骤 7，或置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。**文库结构如下图 1 所示。

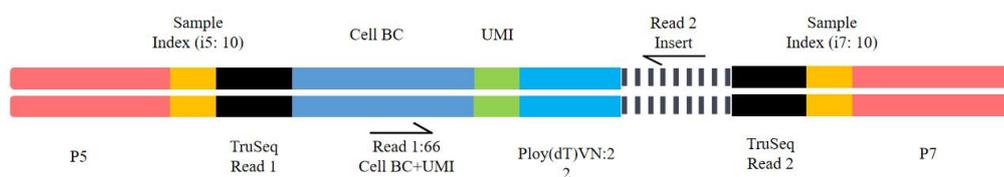


图 1：百创 DG1000 试剂盒构建好的文库结构

7. 文库定量及质控

(1) 文库定量

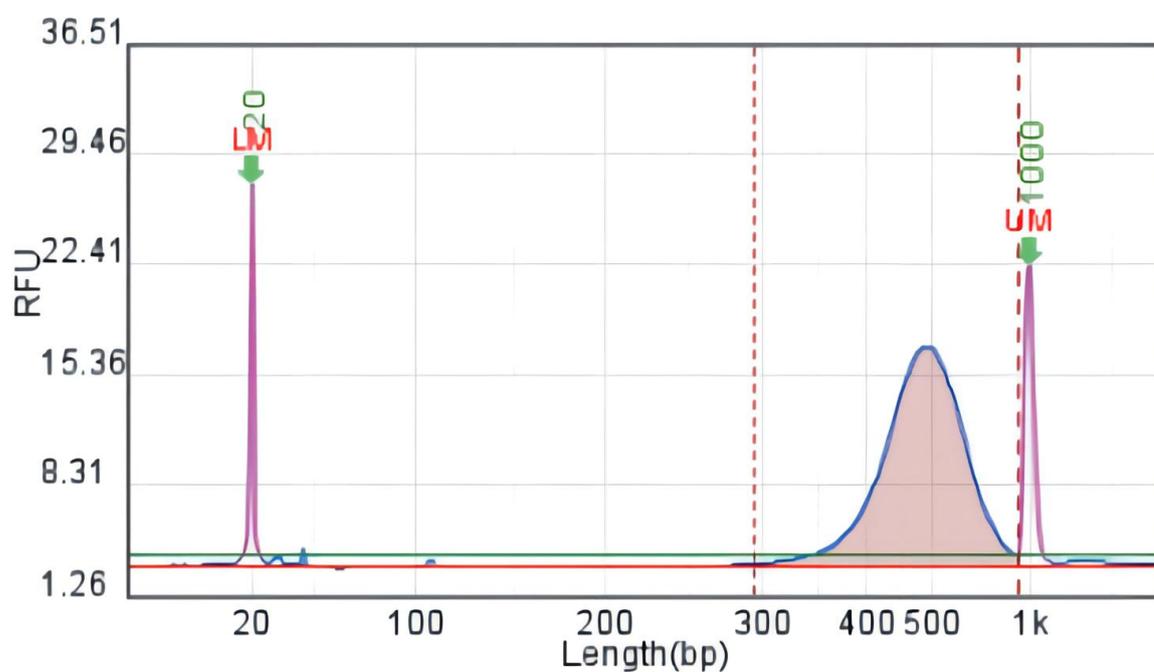
利用 Qubit 荧光定量仪和 Qubit dsDNA HS 试剂盒进行定量检测，建议每次进行定量检测前，重新进行标准曲线的标定，并在实验记录表中记录文库浓度。

【注意】：

a.文库浓度检测时，必须基于染料法（例如：Qubit 荧光定量仪）进行定量分析，不可基于吸光值法（例如：Nanodrop 仪器）来计算核酸浓度。

(2) 文库片段质控

使用 Qsep400 核酸片段分析仪/其他可替换仪器，对文库峰型进行测定。文库片段大小质检结果图例：



文库质控要求： 片段范围为 300-700bp，主峰在 450-550bp；无接头片段和大片段污染。