

# *BMKMANU S1000*

LIBRARY CONSTRUCTION KIT USER GUIDE

## 操作手册



青岛百创智能制造技术有限公司

# BMKMANU S1000 Library Construction Kit User Guide V3



时空产品部

2023. 10. 20

## 目录

一、 产品概述.....	1
二、 产品组分.....	1
三、 适用范围.....	1
四、 仪器设备.....	1
五、 自备材料.....	2
六、 注意事项.....	2
七、 实验流程概要.....	2
八、 操作步骤.....	3
1、 Fragmentation, End Preparation & dA-tailing .....	3
2、 片段筛选-SPRI select.....	3
3、 Adaptor Ligation .....	4
4、 Sample Index PCR.....	5
5、 片段筛选-SPRIselect.....	6
6、 文库质控.....	7
九、 空间全长转录组-ONT 产品建库说明.....	8

## 一、产品概述

BMKMANU S1000 Library Construction Kit 是针对基因表达生成的 cDNA 而开发的空间转录组专用建库试剂盒。本试剂将 cDNA 片段化、末端修复以及末端加 A 尾合并为一步，产物进行分选后，进行接头连接、文库富集和再次分选，可将模板 cDNA 转换成 Illumina 高通量测序平台专用文库。因无需进行机械打断，简化了建库流程、缩短了操作时间。

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，最大程度上保证了结果的稳定性和重复性。

## 二、产品组分

反应	试剂名称	4rxn	保存条件
1	Fragmentation Buffer	20μl	-20°C
2	Fragmentation Enzyme	10μl	-20°C
3	Rapid Ligation Buffer	40μl	-20°C
4	Rapid DNA Ligase	20μl	-20°C
5	DNA Adaptor	40μl	-20°C
6	Amplification Mix	100μl	-20°C
7	Index1-X	10μl	-20°C
8	Index2-X	10μl	-20°C
9	Index3-X	10μl	-20°C
10	Index4-X	10μl	-20°C

## 三、适用范围

物种：人、鼠等物种

组织类型：冷冻切片样本的基因表达 cDNA 产物。

## 四、仪器设备

深孔 PCR 热循环仪；涡旋震荡仪；迷你离心机等。

## 五、自备材料

纯化磁珠：SPRI select (BECKMAN COULTER#B23317)。

DNA 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品；Qubit dsDNA HS Assay Kit。

其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、Elution Buffer (QIAGEN)；低吸附 EP 管、低吸附枪头、不同量程移液器、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

## 六、注意事项

- ❖ cDNA 浓度 (n)：一般要求 cDNA 浓度大于 1.5ng/μl；
- ❖ 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；
- ❖ 实验前请仔细阅读本说明书，确保实验顺利完成；
- ❖ 操作过程请注意避免核酸样本和产物之间的交叉污染，建库请使用不含 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验；
- ❖ 实验所用磁珠使用前应保证充分混匀；
- ❖ 80%乙醇需现配现用，用其磁洗磁珠后，需清除干净，以免影响后续实验。
- ❖ 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

步骤	时间
打断、末端修复加 A 尾	35min
片段筛选-SPRI select	30min
接头连接	15min
接头纯化	15min
样本 Index PCR	25-40min PCR 产物 4℃ 72h
片段筛选 SPRI select	30min
文库定量	

## 八、操作步骤

### 1、Fragmentation, End Preparation & dA-tailing

(1) 将 Fragmentation Buffer、Fragmentation Enzyme 取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

(2) 根据 cDNA 投入量（一般取 cDNA 产量的 1/4），用 Nuclease-free Water 补至 22.5  $\mu$ l，用枪吹吸混匀置于冰上备用；

试剂	体积/芯片 ( $\mu$ l)
Fragmentation Buffer	5
Fragmentation Enzyme	2.5
Total	7.5

(3) 根据上表配制酶打断试剂Mix，使用移液器吹打或振荡混匀。使用移液器在步骤（2）的反应管中加入 7.5 $\mu$ l 酶打断试剂Mix，使用移液器吹打或振荡混匀并短暂离心后立即置于 PCR 仪中进行反应。

(4) 将 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下程序：热盖温度为 75 $^{\circ}$ C

	4 $^{\circ}$ C for Hold
a	30 $^{\circ}$ C for 5min
b	65 $^{\circ}$ C for 20min
c	Hold at 4 $^{\circ}$ C （勿长时间放置，以免对 PCR 仪产生不必要的损坏）

### 2、片段筛选-SPRI select

(1) 涡旋 SPRI select 试剂。向每个样品中添加 18  $\mu$ l SPRI select (0.6 $\times$ ) 试剂。用移液器缓慢吹打混匀 15 次（移液器设置为 30 $\mu$ l）；

(2) 室温下静置孵育 5min；

(3) 将PCR管放在磁力架上，直到溶液澄清；

**注：**溶液体积  $\geq$  30 $\mu$ l 时选用磁力架 HIGH 面，溶液体积 < 30 $\mu$ l 时选用磁力架 LOW 面。

(4) 不要丢弃上清液，将 45.5  $\mu$ l 上清液转移至新的管中；

(5) 涡旋 SPRI select 试剂，向每个样品中加入 6  $\mu$ l SPRI select 试剂 (0.2 $\times$ )。用移液器缓慢吹打混匀 15 次（移液器设置为 40 $\mu$ l）。

- (6) 样品室温孵育 5min 后，将PCR管放在磁力架上（HIGH 面向上），直到溶液澄清。
- (7) 去除上清液，此操作过程请勿触碰磁珠；
- (8) PCR管中加入 125μl 80%乙醇，静置 30s ，去除乙醇。
- (9) 重复步骤（8），共进行 2 次清洗；
- (10) 瞬时离心，将PCR管放在磁力架上，直到溶液澄清。除去残余的乙醇，风干 1min ，不要过度干燥，以确保最大的洗脱效率；
- (11) 从磁力架取下PCR管，添加 26 μl EB 缓冲液。用移液器缓慢吹打混匀 15 次；
- (12) 室温下静置孵育 2min ；
- (13) 将试管放在磁力架上，直到溶液澄清；
- (14) 将 25μl 上清液转移至新的管中。

### 3、Adaptor Ligation

(1) 所需试剂：

试剂	体积/芯片 (μl)
片筛产物	25
Rapid Ligation Buffer	10
Rapid DNA Ligase	5
DNA Adaptor	10
Total	50

- (2) 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底；
- (3) 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行以下反应：

	热盖 off
a	20°C for 15 min
b	Hold at 4°C (勿长时间放置，以免对 PCR 仪产生不必要的损坏)

- (4) 涡旋 SPRI select 试剂，向每个样品中添加 40μl SPRI select (0.8×) 试剂。用移液器缓慢吹打混匀 15 次（移液器设置为 80μl）；
- (5) 室温下静置孵育 5min；
- (6) 将PCR管放在磁力架上，直到溶液澄清；
- (7) 除去上清，此操作过程中请勿触碰磁珠；
- (8) 向PCR管中加入 200μl 80%乙醇，静置 30s 后，去除乙醇；

- (9) 重复步骤 (8)，共进行 2 次清洗；
- (10) 瞬时离心，放在磁力架，直到溶液澄清；
- (11) 除去残余的乙醇，风干 2 min，不要过度干燥，以确保最大的洗脱效率；
- (12) 从磁力架上取下 PCR 管，添加 16  $\mu$ l EB 缓冲液，用移液器缓慢吹打混匀 15 次；
- (13) 室温孵育 2min；
- (14) 将试管放在磁力架上，直到溶液澄清。
- (15) 将 15 $\mu$ l 样品转移至新的管中。

#### 4、Sample Index PCR

- (1) 配制反应体系，加入上一步新管中，总体积 50  $\mu$ l；

试剂	体积/芯片 ( $\mu$ l)
接头纯化产物	15
Amplification Mix	25
Index	10
Total volume	50

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) 按照下表中的程序进行 PCR：

热盖	反应体积 ( $\mu$ l)	所需时间
105°C	50	~30 min
步骤	温度 (°C)	时间
a	98	45s
b	98	20s
c	67	30s
d	72	20s
e	循环 b-d步，查表设置循环数	
f	72	5min
g	4	Hold

PCR 循环数可根据下表进行设置：

cDNA 总量	循环数
25-50 ng	14-16
50-100 ng	13-14
100-200 ng	12-13

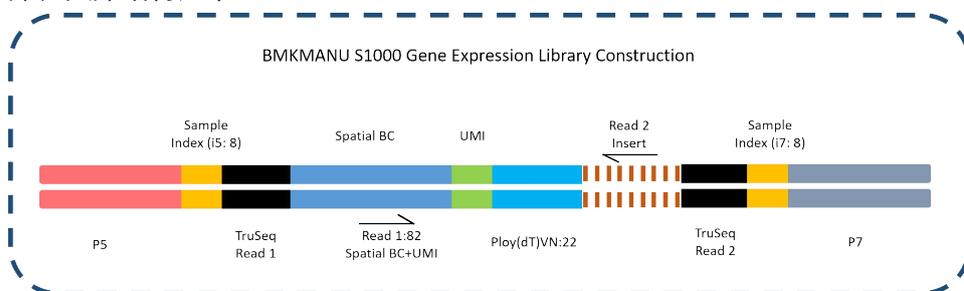
- (3) PCR 产物在 4°C 下保存 72 h 或直接继续下一步。

## 5、片段筛选-SPRIselect

- (1) 涡旋SPRI select 试剂，向每个样品中添加27.5  $\mu$ l SPRI select 试剂 (0.55 $\times$ )，用移液器缓慢吹打混匀15次（移液器设置为75  $\mu$ l）；
- (2) 室温下孵育静置5min；
- (3) 将PCR管放在磁力架上，直到溶液澄清；
- (4) 不要丢弃上清液，将75 $\mu$ l上清液转移至新的管中；
- (5) 涡旋SPRI select 试剂，向每个样品中添加7.5  $\mu$ l SPRI select 试剂 (0.15 $\times$ )。用移液器缓慢吹打混匀15次（移液器设置为75  $\mu$ l）；
- (6) 室温下静置孵育5min；
- (7) 将PCR管放在磁力架上，直到溶液澄清；
- (8) 去除上清液，此操作过程中请勿触碰磁珠；
- (9) PCR管仍放置在磁力架上，加入200  $\mu$ l 80%乙醇，静置30 s 后，去除乙醇；
- (10) 重复 (9) 步骤，共清洗2次；
- (11) 将PCR管瞬时离心，放在磁力架上，去除剩余的乙醇；
- (12) 将样品从磁力架上取下，加入21 $\mu$ l EB 缓冲液，用移液器充分混匀15次；
- (13) 室温下静置孵育2min；
- (14) 将PCR管放置在磁力架上，直到溶液澄清；
- (15) 将21  $\mu$ l上清液转移至新的管中；
- (16) 样品在4  $^{\circ}$ C下最多可以储存72 h，或-20  $^{\circ}$ C下可以长期储存。

**注：若文库质检后有接头片段，可增加一步0.8X磁珠纯化**

按此使用说明用 BMKMANU S1000 Library Counstruction Kit 建库完成后可生成双端测序文库，文库结构如下：



5'-AATGATACGGGAGCACCAGATCTC-NNNNNNNN-ALACTCTTKECTACAGAGGCCTCTCGGATCT-Spatial Barcode-UMI-Poly(dT)VN-cDNA Insert-AGATKGGAGAGCAGCAGCTCGACTCCAGTAC-NNNNNNNN-AATCTGTATGCGGCTCTCTGCTTG-3'

3'-TATCTATGCCCTGGTGGCTCTAGA-NNNNNNNN-TGAGAGAAAGGGATGTGCTGGAGAGGCTAGA-Spatial Barcode-UMI-Poly(dT)VN-cDNA Insert-TCTAGGCTCTCTGCTGTGAGACTTGAAGTLAGTG-NNNNNNNN-TAGAGCATACGGCAGAGAGCAGAC-5'

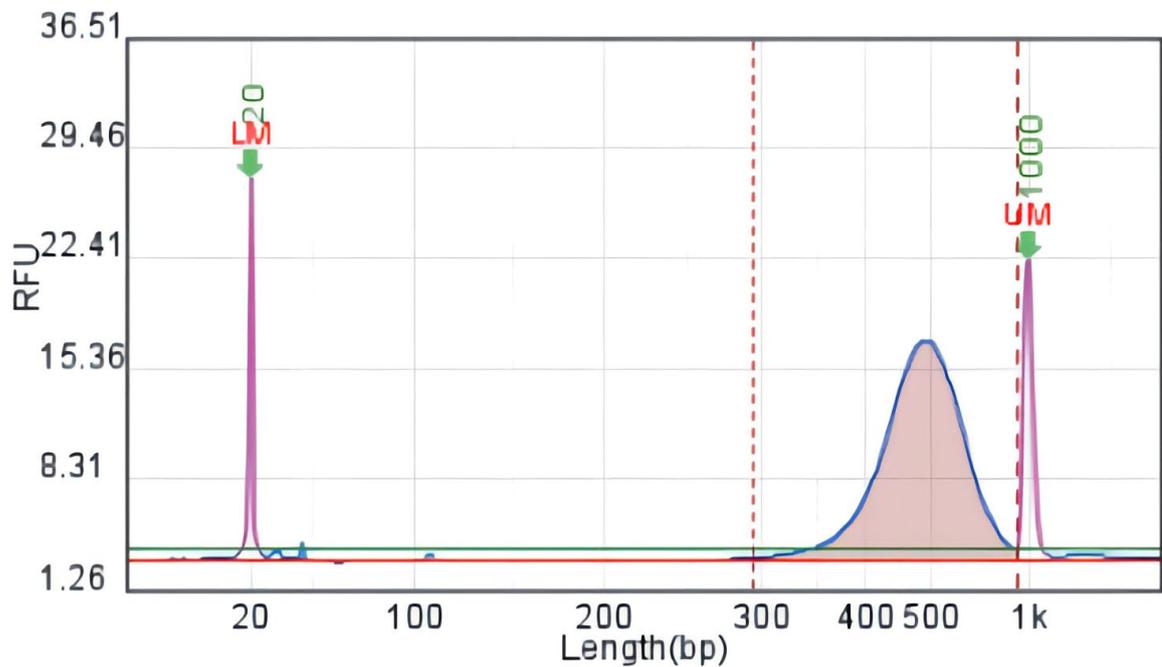
## 6、文库质控

### (1) 文库定量

使用 Qubit 4.0 和 Qubit dsDNA HS 试剂盒进行定量，每次都要做标准曲线，在实验记录表中记录文库浓度；一般要求文库浓度 > 10 ng/μl；文库浓度高于 10ng/μl，加适量体积的 EB，使浓度在 5-10 ng/μl。

### (2) 文库片段质控

使用 Qsep 400 进行质控或其他等效仪器，质控要求：片段范围为 300-700，主峰在 450-550；无接头片段和大片段污染。



## 九、空间全长转录组-ONT 产品建库说明

NGS 文库构建后，若进行三代文库构建，则根据 cDNA 剩余量进行后续操作，若 cDNA 剩余量高于 300 ng (ONT 最低建库要求)，则建议取 300 ng 直接进行建库测序；若剩余量低于300ng，则建议进行 PCR 扩增富集后进行 ONT 建库测序（建议直接取一半进行 PCR，提高容错率。）PCR 程序如下：

热盖	反应体积 (μl)	所需时间
105°C	100	~30 min
步骤	温度 (°C)	时间
1	95	30s
2	95	15s
3	62	15s
4	65	4 min
5	循环 2-4 步，查表设置循环数	
6	65	6min
7	4	Hold

PCR 循环数可根据下表进行设置

cDNA 总量	循环数
25-50ng	7
50-100ng	6
100-150ng	5

扩增完成后进行 cDNA 浓度检测，若浓度达到建库标准（总量大于 600ng），进行纯化后完成三代测序 cDNA 富集准备工作。

百创 S1000-Nanopore 空间全长转录组产品所使用的建库检测平台为 ONT 平台，建库相关操作可参考 ONT 官方相关链接：<http://store.nanoporetech.com/cdna-pcr-sequencing-kit.html>