



三代纳米孔测序 DNA 多样本建库辅助试剂盒

版本号: V240501

货号: GF203
 保存: -20°C
 运输: 低温

货号	规格
GF203-12	12 rxn
GF203-24	24 rxn
GF203-96	96 rxn

【产品概述】

本试剂盒依据连接法原理, 利用 DNA 连接酶催化作用依次将样本 barcode 及接头 (适配体) 与目的 DNA 连接起来, 用于后续 Nanopore 三代测序平台的上机测序。

试剂盒适用于 Nanopore 三代测序平台连接法多样本混样建库, 搭配 Nanopore 公司的 Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109/SQK-LSK110) 和 Native Barcoding (EXP-NBD104/EXP-NBD114/EXP-NBD196) 可进行基因组 DNA 或扩增产物等双链 DNA 的多样本混样建库, 文库可在 Nanopore 三代测序仪上进行上机测序。试剂盒的使用次数与添加 barcode 后多样本混合个数有关, 建议样本混合个数 ≥ 3 个。本试剂盒可满足 3 样本 4 次辅助建库上机 (GF203-12)、3 样本 8 次辅助建库上机 (GF203-24) 或 3 样本 32 次辅助建库上机 (GF203-96)。

【产品组分】

组分货号	组分名称	GF203-12	GF203-24	GF203-96
ZGF203-101	Endprep Mix	30 μ l	60 μ l	240 μ l
ZGF203-102	Fast Ligation Buffer	84 μ l	168 μ l	672 μ l
ZGF203-103	Fast T4 DNA Ligase	12 μ l	24 μ l	96 μ l
ZGF203-104	Quick Ligation Buffer	60 μ l	120 μ l	480 μ l
ZGF203-105	Quick Ligase	6 μ l	12 μ l	48 μ l
ZA220-101	Nuclease-free Water (DEPC-treated)	1 ml	1ml	1.5 ml $\times 3$

【保存条件】

-20°C 保存, 保质期 12 个月, 避免反复冻融。

【材料准备】

本试剂盒未提供需准备:

1. 纯化磁珠 AMPure XP Beads (Beckmann 货号: A-A63880);
2. Native Barcoding (Nanopore 货号: EXP-NBD104/EXP-NBD114/EXP-NBD196);
3. Ligation Sequencing Kit (Nanopore 货号: SQK-LSK109/SQK-LSK110);
4. 其他材料: 80%乙醇、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

【注意事项】

1. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡, 剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
2. 为避免样品交叉污染, 推荐使用带滤芯的枪头, 吸取不同样品时请更换枪头。
3. 本试剂盒仅供科研使用! 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

【样本要求】

1. 样本种类: 基因组 DNA 或扩增产物等双链 DNA。
2. 保存条件: 提取的基因组 DNA 或扩增得到的产物在 24 h 内进行建库实验, 可 4°C 保存; 超过 24 h 应 -70°C 保存, 尽量避免反复冻融。



【操作步骤】

1. 末端修复

推荐建库起始量为 200 fmol DNA，如片段大小为 400 bp，采用 50 ng；如片段大小为 600bp 可采用 75 ng。

- 1) 取出试剂解冻后，轻轻振荡混匀并瞬时离心，置于冰上备用，在 0.2 ml PCR 管中按照如下体系进行配置：

组分	体积 (μl)
双链 DNA (200 fmol)	X
Endprep Mix	2.5
Nuclease-free Water (DEPC-treated)	Up to 15

- 2) 轻混后瞬时离心，将反应液收集至管底。

- 3) 将上述配置好的体系置于 PCR 仪，按下表设置反应程序。

温度	时间
热盖 (80°C)	—
30°C	20 min
72°C	20 min
4°C	Hold

2. Barcode 连接反应

- 1) 取出短片段缓冲液 SFB (Ligation Sequencing Kit) 管，融化后混匀置于冰上备用。

- 2) 将每个样本的末端修复产物分别添加唯一对应 barcode 并记录对应编号，反应体系如下表所示：

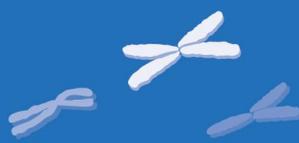
组分	体积 (μl)
末端修复产物	15
Native Barcode (Native Barcoding)	2
Fast Ligation Buffer	7
Fast T4 DNA Ligase	1
总体积	25

- 3) 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。将上述配置好的体系置于 PCR 仪，按下表设置反应程序：

温度	时间
热盖 (105°C)	—
20°C	20 min
4°C	Hold

- 4) 混合所有已添加 barcode 的样本 (个数 ≥ 3)，进行磁珠纯化和乙醇清洗，具体步骤如下：

- ① 准备：将 AMPure XP Beads 磁珠室温平衡至少 30 min；
- ② 将所有接头连接产物 (个数 ≥ 3) 放入 1.5 ml 离心管中混合，加入 0.6×体积的 AMPure XP Beads，涡旋混匀，室温孵育 5 min。
- ③ 将上述混合液短暂离心后置于磁力架，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移除上清 (注意不要接触磁珠)。
- ④ 保持磁力吸附状态，向原管中沿对侧管壁加入 200 μl 80% 无水乙醇 (不要直接吹打磁珠)，片刻后小心弃上清 (注意不要接触磁珠)。
- ⑤ 重复步骤④，进行二次清洗。
- ⑥ 保持磁力吸附状态，吸取残留的乙醇，开盖干燥约 30 s (切忌过度干燥)。
- ⑦ 加入 15 μl Nuclease-free Water (DEPC-treated) 洗脱核酸，用手指轻轻弹混合，室温孵育 5 min；将 EP 管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心转移 13 μl 上清至干净的管中，取上述液体 1 μl 进行 Qubit 定量。



3. 接头连接

1) 取混合的 barcode 连接产物 30-50 ng 进行接头连接，反应体系如下：

组分	体积 (μl)
混样样本 (30-50 ng)	X
Adapter Mix II (AMII) (Ligation Sequencing Kit)	5
Quick Ligation Buffer	15
Quick Ligase	1.5
Nuclease-free Water (DEPC-treated)	Up to 30

2) 将上述配置好的体系置于 PCR 仪，按下表设置反应程序：

温度	时间
热盖 (105°C)	—
20°C	20 min
4°C	Hold

3) 磁珠纯化：使用 0.5×磁珠 (35 μl)，Short Fragment Buffer (SFB) 清洗，15 μl Elution Buffer (EB) 洗脱，具体步骤如下：

- ① 将反应体系转移到 1.5 ml EP 管中，加入 20 μl AMPure XP Beads 磁珠，轻轻混合后室温孵育 5 min。
- ② 将 EP 管置于磁力架上，静置 2 -5 min，待液体变澄清，弃上清液（注意不要接触磁珠）。
- ③ 加入 125 μl 短片段缓冲液 (SFB)，轻弹混匀，然后把 EP 管放回磁力架上，待液体变澄清后弃上清（注意不要接触磁珠）。
- ④ 重复步骤③，SFB 二次清洗。
- ⑤ 取下 EP 管瞬时离心，弃去残留的液体，开盖风干 30 s（切忌过度干燥）。
- ⑥ 加入 15 μl Elution Buffer (EB) 洗脱核酸，轻弹混合，37°C 孵育 10 min（每两分钟轻弹一次）。
- ⑦ 将 EP 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 5 min），吸取 13 μl 上清液转移到干净的 PCR 管中。取上述液体 1 μl 进行 Qubit 定量，其余液体 (DNA library) 进行上机实验。
- ⑧ 最终 DNA library 上机上样量建议：基因组 DNA 100-400 ng，PCR 产物 10-50 ng。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。