



MagicSeq DNA Library Prep Plus Kit for Illumina



Magicbio # M316



产品简介

MagicSeq DNA Library Prep Plus Kit for Illumina是针对Illumina测序平台开发的DNA文库构建试剂盒。试剂盒包含片段化模块，利用时间依赖型酶促反应的原理将双链DNA随机切割成200~500 bp的片段，并通过优化的末端修复、接头连接、文库扩增等步骤，可将10ng-1μg的dsDNA转化为DNA文库，具有较高的文库转化率和扩增文库产出。适用于各种样本类型和物种来源，包括各原核真核基因组、动植物基因组、人基因组等。

试剂盒组成

产品成分	M3161（24 rxn）	M3162（96 rxn）
FEA buffer	240 μL	960 μL
FEA Enzyme Mix	120 μL	480 μL
Ligation Enzyme Mix	144 μL	576 μL
Ligation Buffer	816 μL	3×1.2 mL
2×HiFi Amplification Mix	600 μL	2×1.2 mL
PCR Primer Mix	120 μL	480 μL

保存条件 -20℃保存

注意事项

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用无核酸酶的枪头、低吸附EP管进行试验。
3. 样本DNA总量最低不可低于10ng，最高不可高于1μg。推荐DNA上样量100ng。
4. DNA浓度需使用Qubit等染料法测定，起始DNA量测定不准确，会影响文库得率；
5. 实验所用磁珠应提前30分钟自4℃环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
6. 80%乙醇需现配现用，避免残留乙醇对后续反应产生影响。

需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-Free H₂O；Magic DNA Select Beads（M302）或效果相同的磁珠；200μL PCR管；1.5mL低吸附离心管；磁力架；PCR仪

操作步骤

- 1、片段化、末端修复及加A：
 - 1.1 将试剂置于冰上融解并充分混匀、离心，在冰上配制如下反应体系：

组份	体积
gDNA样品	X μL
FEA buffer	10 μL
FEA Enzyme Mix	5 μL
Nuclease-Free H ₂ O	(35-X) μL
总体积	50 μL

- 1.2 涡旋震荡混匀后离心，放入PCR仪运行程序：4℃ 1min；37℃ 6min*；65℃ 30 min，4℃Hold；热盖80℃；
*注：按照该时间片段化所得片段主峰在300bp，如Input DNA质量不佳或片段化大小不在预期范围，建议上下调整片段化时间。

1.3 反应结束后立即进行下一步；

2、接头连接

根据原始DNA样本投入量参考下表准备DNA Adapter。

DNA Adapter稀释参考：

Input DNA	Adapter稀释倍数	接头浓度 (μM)
100ng-1μg	不稀释	10
25ng-100ng	1:2	5
10ng-25ng	1:10	1

2.1 将试剂于冰上融解，配制以下反应体系：

组份	体积
上步反应产物	50μL
DNA Adapter	5 μL
Ligation Enzyme Mix	6 μL
Ligation Buffer	34 μL
Nuclease-Free H ₂ O	5 μL
总体积	100 μL

2.2 充分混匀后离心，在PCR仪中进行如下反应：20℃ 15 min， 4℃Hold；热盖 off。

2.3 反应结束后取出，立即进行下一步。

3、纯化及片段筛选

3.1 纯化

- 1) 将Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀，吸取100μL磁珠加入连接产物，吹打混匀，室温静置5min。
- 2)将PCR管放到磁力架上直至液体澄清，吸弃上清。
- 3) 加入200μL新鲜配制的80%乙醇，静置30s，吸弃上清。
- 4) 重复上一步骤，并弃尽上清，室温晾干。
- 5) 加入22μL Nuclease-Free H₂O，吹打混匀，室温孵育2min。
- 6) 将PCR管放到磁力架上直至液体澄清，吸取20μL上清至一个新的PCR管。

3.2片段大小筛选（可选）

磁珠用量需根据目标文库片段大小调整，具体用量参照下表：

文库平均总长度	~350 bp	~425 bp	~500 bp
文库平均插入长度	~210 bp	~285 bp	~360 bp
文库总长度分布范围	250~550 bp	300~650bp	400~900 bp
第一轮磁珠用量	R1=75μL	R1=70μL	R1=65μL
第二轮磁珠用量	R2=15μL	R2=10μL	R2=10μL

- 1) 向3.1纯化后的样本中加入80μL Nuclease-Free H₂O，补足体积到100μL。
- 2) 将Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀，吸取R1体积磁珠加入上步产物中，吹打混匀，室温放置5min；
- 3) 将样品管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清转移上清至干净离心管中，丢弃磁珠；

- 4) 向上清中加入R2体积的Magic DNA Select Beads，吹打10次充分混匀，室温孵育5min；
- 5) 短暂离心并置于磁力架中约5min，待溶液澄清移除上清；
- 6) 保持样品管始终处于磁力架上，加入200μL 80% 乙醇漂洗磁珠，室温静置30s后移除上清；
- 7) 重复上一步骤，总计漂洗两次；短暂离心，用10μL移液器吸去剩余乙醇；
- 8) 保持样品管始终处于磁力架上，开盖干燥磁珠；
- 9) 将样品管从磁力架中取出，加入22μL Nuclease-Free H₂O洗脱，涡旋振荡充分混匀，室温静置2min；
- 10) 将样品管短暂离心并置于磁力架中待溶液澄清后吸取20μL上清至新PCR管中；

4、文库扩增

4.1 将试剂于冰上融解，配制以下反应体系：

组份	体积
上步反应产物	20 μL
2×HiFi Amplification Mix	25 μL
PCR Primer Mix	5 μL
总体积	50 μL

4.2 充分混匀后在PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数	DNA起始量	PCR循环数
98℃	45s	} 2-12Cycles*	10ng	10
98℃	15s		50ng	7
60℃	30s		100ng	6
72℃	30s		500ng	4
72℃	5min		1μg	2
4℃	∞			

* 注：请根据 DNA 的质量和上样量确定 PCR 循环数，具体可参考右表。

* 如果在PCR 富集之前经过片段长度筛选步骤，则建议在原有基础上再增加2~4 个循环；如果 DNA 质量较差（比如提取于 FFPE 样品），则建议在原有基础上再增加1~3个循环。

- 1) 将Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀，吸取50 μL磁珠加入PCR产物中，吹打混匀，室温放置5min；
- 2) 短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体约5min，待溶液澄清后移除上清；
- 3) 保持样品管始终处于磁力架上，加入200μL 80% 乙醇漂洗磁珠，室温静置30s后移除上清；
- 4) 重复上一步骤，总计漂洗两次；短暂离心，用10μL移液器吸去剩余乙醇；
- 5) 保持样品管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠；
- 6) 将离心管从磁力架中取出，加入22μL Nuclease-Free H₂O，涡旋振荡充分混匀，室温静置2min；
- 7) 将离心管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后吸取20μL上清至1.5mL低吸附离心管中；

5、文库质检

推荐使用凝胶电泳或者Agilent生物分析仪等检测文库片段分布、使用Qubit或qPCR进行浓度检测。