



MagicSeq DNA Library Prep Kit

For Illumina



Magicbio # M315



产品介绍

MagicSeq DNA Library Prep Kit for Illumina是针对Illumina测序平台开发的DNA文库构建试剂盒。试剂盒通过优化的末端修复、接头连接、文库扩增等步骤，可将1ng-300ng的片段化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	M3151 (24 rxn)	M3152 (96 rxn)
EA Buffer	168 μ L	672 μ L
EA Enzyme Mix	48 μ L	192 μ L
Ligation Mix	240 μ L	960 μ L
DNA Adapters*	24管 $\times$ 5 μ L	96管 $\times$ 5 μ L
Ligation Buffer	1 mL	3 $\times$ 1.25 mL
2 $\times$ HiFi Amplification Mix	600 μ L	2 $\times$ 1.2 mL
PCR Primer Mix	120 μ L	480 μ L

*本试剂盒所提供接头为双端Index接头

保存条件 -20℃保存

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用无核酸酶的枪头、EP管进行试验。
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. DNA可采用机械方法或酶法打断成小片段；若使用酶法打断，反应后需进行产物纯化，再进行建库。
6. 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。
7. 80%乙醇需现配现用，用其清洗磁珠后，需清理干净，避免对后续反应产生影响。

需自备材料

无水乙醇；Nuclease-Free H₂O；Magic DNA Select Beads（DNA片段分选纯化磁珠）或效果相同的磁珠；200 μ L PCR管；1.5mL离心管；磁力架；PCR仪

操作步骤

1. 末端修复及加A：

1) 将试剂置于冰上融解并充分混匀、离心，在PCR管中冰上配制如下反应体系：

组份	体积
打断后的DNA样品或cfDNA样品	X μ L
EA Buffer	7 μ L
EA Enzyme Mix	2 μ L
Nuclease-Free H ₂ O	(41-X) μ L
总体积	50 μ L

- 2) 涡旋震荡混匀后离心，放入PCR仪运行程序：37°C 20 min；75°C 5 min，4°C Hold；热盖75°C；
- 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
100ng-300ng	不稀释
25ng-100ng	1:2
5ng-25ng	1:10

- 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 Mix	10 μL
Ligation Buffer	35 μL
总体积	100 μL

- 2) 充分混匀后离心，在PCR仪中进行如下反应：20°C 25 min，4°C Hold；
- 3) 反应结束后取出，立即进行下一步。

3. 纯化及片段筛选

根据是否需要片段筛选选择步骤3.1或3.2.

3.1 纯化（不筛选）

- 1) 将室温放置30min后的Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀，吸取100μL加入连接产物，吹打混匀，室温静置5min。
- 2) 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) 重复一次上一步，并弃尽上清，室温晾干。
- 5) 加入22μL Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温孵育2min。
- 6) 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

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	~280 bp	~380 bp	~480 bp
文库平均插入长度	~150 bp	~250 bp	~350 bp
文库总长度分布范围	200~350 bp	250~550 bp	300~650bp
第一轮磁珠用量	R1=13 μL	R1=10 μL	R1=5 μL
第二轮磁珠用量	R2=30 μL	R2=20 μL	R2=15 μL

- 1) 将室温放置30min后的Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀，吸取R1体积的Magic DNA Select Beads加入上步产物中，吹打10次充分混匀，室温放置5min；
- 2) 将样品管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清转移上清至干净离心管中，丢弃磁珠；
- 3) 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；
- 4) 短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体约5min，待溶液澄清移除上清；
- 5) 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；
- 6) 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；
- 7) 保持样品管始终处于磁力架上，开盖干燥磁珠；
- 8) 将样品管从磁力架中取出，加入22μL Nuclease-Free H₂O洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置2min；
- 9) 将样品管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取20μL上清至干净的0.2mL PCR管中；

4. 文库扩增

- 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

- 2) 充分混匀后在PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
98°C	2min	} 6-12Cycles*
98°C	20s	
60°C	30s	
72°C	30s	
72°C	1min	
4°C	∞	

* 注：请根据 DNA 的质量和上样量确定 PCR 循环数。一般对于 100 ng、10ng、1 ng 文库起始 DNA，在进行 PCR 富集时分别需要扩增6、10、14个循环获得约1μg产出。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。

- 3) 将室温放置30min后的Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀，吸取50 μL体积的Magic DNA Select Beads加入PCR产物中，吹打10次充分混匀，室温放置5min；
- 4) 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；
- 5) 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；
- 6) 重复步骤5，总计漂洗两次；短暂离心，用10μL移液器吸去剩余乙醇；
- 7) 保持样品管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠；
- 8) 将离心管从磁力架中取出，加入22μL Nuclease-Free H₂O或10 mM Tris-HCl (pH8.0) 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置2min；
- 9) 将离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取20μL上清至干净的PCR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。

附表 Index 序列

Index名称	P7 index 序列	P5 index序列	Index名称	P7 index 序列	P5 index序列
index 01	CGAGATTC	GAATCTCG	index 33	TTGACCGA	TCGGTCAA
index 02	TTAGCCAG	CTGGCTAA	index 34	TGTGTATA	TATACACA
index 03	TCCAGAGT	ACTCTGGA	index 35	ACATGCGT	ACGCATGT
index 04	AGATTCCG	CGGAATCT	index 36	CTGCAGCG	CGCTGCAG
index 05	GTGCATAC	GTATGCAC	index 37	GACGTCGC	GCGACGTC
index 06	CATATACA	TGTATATG	index 38	CCTAAAAT	ATTTTAGG
index 07	TGCGCGTG	CACGCGCA	index 39	AGACCTTG	CAAGGTCT
index 08	GCGCGTGT	ACACGCGC	index 40	TTGTGGCA	TGCCACAA
index 09	GATATCAT	ATGATATC	index 41	AATATTGC	GCAATATT
index 10	CCATGGCG	CGCCATGG	index 42	GTCGGCTG	CAGCCGAC
index 11	TTGCAATA	TATTGCAA	index 43	CAACTAAT	ATTAGTTG
index 12	ATCTCGGA	TCCGAGAT	index 44	TGTACGCA	TGCGTACA
index 13	AGTGTCGT	ACGACACT	index 45	GCATGTAC	GTACATGC
index 14	GACACTAC	GTAGTGTC	index 46	ATGCACGT	ACGTGCAT
index 15	CCACAATG	CATTGTGG	index 47	CGTACATG	CATGTACG
index 16	GTTAGCCA	TGGCTAAC	index 48	TCCGAGAT	ATCTCGGA
index 17	CGATTGAC	GTCAATCG	index 49	CCGATTGA	TCAATCGG
index 18	TATGCACG	CGTGCATA	index 50	AGCTAGTC	GACTAGCT
index 19	ATGTGTAT	ATACACAT	index 51	GTTCCAGA	TCTGGAAC
index 20	CCCGAAGC	GCTTCGGG	index 52	CAAGGTCT	AGACCTTG
index 21	AGGCTCTA	TAGAGCCT	index 53	TATATGTG	CACATATA
index 22	TAAGTGGC	GCCAGTTA	index 54	ACGTATGC	GCATACGT
index 23	GTCAATCG	CGATTGAC	index 55	GTACGCAT	ATGCGTAC
index 24	TGACCGAT	ATCGGTCA	index 56	TGCATACG	CGTATGCA
index 25	GCCAGTTA	TAAGTGGC	index 57	GCCCCGAA	TTCGGGGC
index 26	AATTAACC	GGTTAATT	index 58	CAGGACCC	GGGTCCTG
index 27	CCTGGGGT	ACCCCAGG	index 59	ATTTTAGG	CCTAAAAT
index 28	GAGCCTTA	TAAGGCTC	index 60	CGGTCAAT	ATTGACCG
index 29	TGCTACAG	CTGTAGCA	index 61	ACTGGCTA	TAGCCAGT
index 30	ATGGTATT	AATACCAT	index 62	TAAAATCC	GGATTTTA
index 31	CCCAGGAC	GTCCTGGG	index 63	GTCCTGGG	CCCAGGAC
index 32	GAATCTCG	CGAGATTC	index 64	TCATGATA	TATCATGA

附表 Index 序列

Index名称	P7 index 序列	P5 index序列	Index名称	P7 index 序列	P5 index序列
index 65	AGTACTAT	ATAGTACT	index 81	TGTCACGA	TCGTGACA
index 66	CAGCCGAC	GTCGGCTG	index 82	ATAGCGTC	GACGCTAT
index 67	GCCGACCA	TGGTCGGC	index 83	GCGATACT	AGTATCGC
index 68	CGTTGCGG	CCGCAACG	index 84	TATCGCAG	CTGCGATA
index 69	TAGGATTT	AAATCCTA	index 85	CGCTATGA	TCATAGCG
index 70	GCAGTATC	GATACTGC	index 86	TTACGGTG	CACCGTAA
index 71	ATGACGCT	AGCGTCAT	index 87	GCCTTAGA	TCTAAGGC
index 72	TGCCGTGG	CCACGGCA	index 88	CGGAATCT	AGATTCCG
index 73	CATTACAA	TTGTAATG	index 89	AATGCCAC	GTGGCATT
index 74	ACAACATT	AATGTTGT	index 90	GTGACATC	GATGTCAC
index 75	TTCGGGGC	GCCCCGAA	index 91	ACAGTGCT	AGCACTGT
index 76	GAGTTCCA	TGGAATC	index 92	TACTGCGA	TCGCAGTA
index 77	CGTCATAG	CTATGACG	index 93	AGTCAGCT	AGCTGACT
index 78	GTAGCACT	AGTGCTAC	index 94	CTGACTAG	CTAGTCAG
index 79	ACGATGTC	GACATCGT	index 95	GA CTGATC	GATCAGTC
index 80	CACTGTAG	CTACAGTG	index 96	ACTCTGGA	TCCAGAGT