



DNA Ligation Aid-based Library Prep Kit for Nanopore Sequencing

三代纳米孔测序DNA连接法辅助建库试剂盒

目录号：CW3601S（6 rxns）

CW3601M（24rxns）

保存条件：-30~-15℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW3601S	CW3601M
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	500 μL	1.5 mL
10×ERTA Buffer	35 μL	150 μL
ERAT Mix	15 μL	60 μL
4×T4 DNA ligase Buffer	100 μL	400 μL
T4 DNA ligase	20 μL	80 μL

产品简介

本试剂盒适用于Nanopore三代测序平台连接法多样本混样建库，搭配SQK-NBD114.24或SQK-NBD114.96可进行基因组DNA以及扩增产物等双链DNA的多样本建库测序。

需-30~-15℃储存，主要组成为无核酸酶水（非DEPC处理），末端修复酶混合液、用于连接barcode及接头的快速连接酶体系。

多样本建库辅助试剂盒中的试剂可提供3样本2次辅助建库上机（货号：CW3601S）或3样本8次辅助建库上机（货号：CW3601M）。

试剂盒仅限研究使用。

操作步骤

1: 末端修复

注：建议起始量使用1000 ng-1500 ng基因组DNA或者200 ng PCR产物。

1.1 配制混合体系于0.2 mL PCR管中，轻柔混合，然后短暂离心，将反应液收集至管底，确保反应液中**没有气泡**。反应体系如下：

表1 末端修复反应液的配制

组分	体积 (μL)
10×ERAT Buffer	5
ERAT Mix	2
1500 ng基因组DNA/200 ng PCR产物	X
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	up to 50

1.2 将含有上一步反应混合液的PCR管置于PCR仪上，按如下条件反应：

表2 末端修复反应条件

温度	时间
热盖 (80℃)	
37℃	15 min
65℃	15 min
4℃	Hold

1.3 磁珠纯化：使用50 μL磁珠，75%无水乙醇清洗，15 μL Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) 洗脱。详细步骤如下：

- 1) 提前将磁珠平衡到室温，将反应体系添加到等体积的磁珠中（1.5 mL离心管），并通过轻弹或移液器轻轻混合，室温孵育5 min；
- 2) 将试管转移到磁力架上，静置2-5 min，待液体变澄清，小心弃上清液（注意不要接触磁珠）；
- 3) 保持磁力吸附状态，向管中加入200 μL 75%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）；
- 4) 重复上一步骤（使用75%无水乙醇二次清洗除杂）；
- 5) 取下EP管使用迷你离心机瞬离，用移液器小心弃去残留的液体；打开试管盖，风干30秒(不可干燥破裂)；
- 6) 加入15 μL Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) 洗脱核酸，用手指轻弹混合，室温孵育5min；
- 7) 将管重新放回磁力架，至磁珠被吸引到磁力架一侧或混合液变澄清；吸取14 μL上清液转移到干净的PCR管中；
- 8) 取1 μL 末端修复的DNA 进行 Qubit定量。

2: barcode连接

- 2.1 根据实际情况取对应质量样本分别添加对应barcode并记录（NBD01~NBD24），配制混合体系于0.2 mL PCR管中，轻柔混合，然后短暂离心，将反应液收集至管底，确保反应液中**没有气泡**。**注意：建议所有样本总量需大于1500 ng（基因组DNA）或300 ng（PCR产物）**。反应体系如下：

表3 barcode连接反应液的配制

组分	体积 (μL)
末端修复后的 DNA	X
Native Barcode	2.5
4×T4 DNA ligase Buffer	7.5
T4 DNA ligase , 15 U/μL	1.5
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	up to 30

- 2.2 将含有上一步反应混合液的PCR管置于PCR仪上，按如下条件反应：

表4 barcode连接反应条件

温度	时间
热盖（无需设置）	
23°C	20 min

- 2.3 反应结束后每30 μL需加3 μL EDTA，充分混匀后室温放置2 min。
- 2.4 磁珠纯化：混合所有已添加barcode的样本，使用0.5×磁珠纯化，75%无水乙醇清洗（磁珠纯化步骤参考可参考1.3）。

注意：最后润洗磁珠时需用50 μL Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) 洗脱核酸，轻弹混匀后37°C孵育10 min（每两分钟轻弹一次），最后吸取48 μL上清液转移至新的PCR管中。

3: 接头连接

- 3.1 配制混合体系于0.2 mL PCR管中，轻柔混合，然后短暂离心，将反应液收集至管底，确保反应液中**没有气泡**。反应体系如下：

表5 接头连接反应液的配制

组分	体积 (μL)
混样样本	44
测序接头（NA或AMII）	5
4×T4 DNA ligase Buffer	17.5
T4 DNA ligase , 15 U/μL	3.5
总体积	70

3.2 将含有上一步反应混合液的PCR管置于PCR仪上，按如下条件反应：

表6 接头连接反应液条件

温度	时间
热盖（无需设置）	
23℃	20 min
4℃	Hold

3.3 磁珠纯化：使用0.5×磁珠（35 μ L），Short Fragment Buffer(SFB) 清洗，15 μ L Elution Buffer (EB) 洗脱。详细步骤如下：

- 1) 提前将磁珠平衡到室温，将反应体系添加到35 μ L的磁珠中（1.5mL离心管），并通过轻弹或移液轻轻混合；室温孵育10 min；
- 2) 将试管转移到磁力架上，静置2-5 min，待液体变澄清，小心弃上清液（注意不要接触磁珠）；
- 3) 将 EP 管从磁力架上取下，沿磁珠被吸附的一侧缓慢加入 125 μ L SFB (Short Fragment Buffer)，转动 EP 管轻柔重悬磁珠后放回磁力架上（磁珠无贴壁成聚集块即可），待液体变澄清后吸去清液（注意不要接触磁珠）；
- 4) 重复上一步骤（使用SFB二次清洗除杂）；
- 5) 取下EP管使用迷你离心机分离，用移液器小心弃去残留的液体，打开试管盖，风干30秒（不可干燥破裂）；
- 6) 加入15 μ L Elution Buffer (EB) 洗脱核酸，用手指轻弹混合，37℃孵育10 min（每两分钟轻弹一次）；
- 7) 将EP管重新放回磁力架，至磁珠被吸引到磁力架一侧或混合液变澄清，吸取13 μ L 上清液转移到干净的PCR管中。

3.4 取1 μ L DNA library进行 Qubit fluorometer 定量，其余12 μ L DNA library进行上机实验。

提示：最终DNA library上机上样量建议：基因组DNA 100-400ng，PCR产物10-50ng。