



# CWseq® 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

Cat. No. CW3601

### 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-20±5℃储存，主要组成为无核酸酶水（非DEPC处理），末端修复酶体系、快速连接酶体系。

多样本建库辅助试剂盒中的试剂可提供至少24 样本辅助建库上机。本试剂盒仅限研究使用。

### 保存条件：

-20±5℃保存，干冰运输。

### 产品内容

| Component                              | CW3601S<br>(24 rxns) |
|--|----------------------|
| Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) | 1.5 mL               |
| ERAT Buffer                            | 150 μL               |
| ERAT Mix                               | 60 μL                |
| 4×T4 DNA ligase Buffer                 | 400 μL               |
| T4 DNA ligase, 15 U/μL                 | 80 μL                |
| EDTA                                   | 200 μL               |

## 操作步骤

### 1. 末端修复

注意: 建议每个样本起始量: 200 ng-1000 ng基因组DNA或者200 fmol PCR产物。

- 1.1 ERAT Buffer提前室温解冻, 如有沉淀需充分混匀至沉淀消失后放置冰上。
- 1.2 配置混合体系于0.2 mL的PCR管中(冰或冰盒上操作), 上下颠倒充分混匀后瞬离, 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)  |
|--|----------|
| ERAT Buffer                            | 3        |
| ERAT Mix                               | 1        |
| Input DNA                              | X        |
| Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) | up to 20 |

- 1.3 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°C) |       |
| 20°C      | 5 min |
| 65°C      | 5 min |
| 4°C       | Hold  |

### 2. Barcode 连接

- 2.1 提前取出Native Barcode、4×T4 DNA ligase Buffer解冻后混匀离心, 放置冰上。待末修反应结束后, 从PCR仪中取出, 放置冰上。
- 2.2 向末修反应体系中依次加入以下试剂, 上下颠倒充分混匀后瞬离, 将反应液收集至管底, 确保反应液中没有气泡。

表3 连接反应液的配制

| 组分                      | 体积 (μL) |
|-------------------------|---------|
| 上一步末修体系                 | 20      |
| Native Barcode          | 2.5     |
| 4×T4 DNA ligase Buffer  | 8       |
| T4 DNA ligase , 15 U/μL | 1.5     |
| Total                   | 32      |

注意: 最后加入T4 DNA ligase

2.3 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 (无需设置) |        |
| 23°C      | 10 min |

2.4 反应结束后立即放冰或冰盒上, 每管加4 μL EDTA, 上下颠倒充分混匀后瞬离, 终止连接反应。

2.5 磁珠纯化: 提前半小时室温平衡磁珠 (**推荐使用康为世纪CW2508-CMPure磁珠**), 使用0.5X磁珠纯化, 80%酒精清洗 (当天配置), 35μL Nuclease-Free Water 洗脱。详细步骤如下:

- 1) 提前将磁珠平衡到室温, 将所有连接不同barcode后的样本体系混合在1.5mL EP管中, 向管中加入0.5倍混合后体积的磁珠 (如10个样本混合后体系加入180μL的磁珠), 轻弹或上下颠倒轻轻混合, 瞬时离心, 室温孵育5 min;
- 2) 将EP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, 向管中加入不少于样本和磁珠总体积的80%酒精 (如10个样本混合后体系加入540 μL的80%酒精), 确保酒精液面没过磁珠。30S后, 小心弃上清 (注意不要接触磁珠);
- 4) 重复上一步骤;
- 5) 取下EP管瞬离, 放回磁力架上, 用移液器小心弃去残留的液体; 打开试管盖, 风干1-3 min至磁珠表面无光泽 (不可干燥破裂);
- 6) 加入35 μL Nuclease-Free Water洗脱核酸, 将EP管从磁力架上取出, 用手指轻弹或缓慢吹打重悬磁珠, 37°C孵育5 min;
- 7) 将管重新放回磁力架, 至混合液变澄清; 吸取33 μL上清液转移到一个新的EP管中;
- 8) 取1 μL 进行Qubit定量。

### 3. 接头连接

3.1 配制接头连接体系于0.2 mL PCR管中, 用移液器缓慢吹打混匀 (**严禁涡旋振荡**), 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                    | 30      |
| 测序接头 (NA或AMII)          | 5       |
| 4×T4 DNA ligase Buffer  | 12.5    |
| T4 DNA ligase , 15 U/μL | 2.5     |
| Total                   | 50      |

注意: 最后加入T4 DNA ligase

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°C      | 10 min |
| 4°C       | Hold   |

3.3 磁珠纯化: 使用0.5×磁珠 (25 $\mu$ L), 选择Short Fragment Buffer(SFB)或Long Fragment Buffer(LFB) 清洗, 16 $\mu$ L Elution Buffer (EB) 或Nuclease-Free Water洗脱。详细步骤如下:

- 1) 提前将磁珠、SFB或LFB、Elution Buffer平衡到室温半小时, 将反应体系添加到25  $\mu$ L的磁珠中 (1.5 mL离心管), 轻弹或上下颠倒轻轻混合, 瞬时离心, 室温孵育10 min;
  - 2) 将EP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  $\mu$ L的SFB或LFB, 轻弹或上下颠倒重悬磁珠, 瞬时离心, 放回磁力架上, 待液体变澄清后吸去上清液 (注意不要接触磁珠);
  - 4) 重复上一步骤;
  - 5) 取下EP管瞬离, 放回磁力架上, 用移液器小心弃去残留的液体, 风干30秒 (不可干燥破裂);
  - 6) 加入16  $\mu$ L Elution Buffer或Nuclease-Free Water洗脱核酸, 将EP管从磁力架上取下, 用手指轻弹或缓慢吹打重悬磁珠, 37°C孵育10 min后瞬时离心。
  - 7) 将EP管重新放回磁力架, 至混合液变澄清, 吸取15  $\mu$ L上清液转移到干净的PCR管中。
- 3.4 取1  $\mu$ L DNA library进行 Qubit定量, 其余14  $\mu$ L DNA library进行上机实验。

**注意: 最终DNA library上机上样量建议: 35-50 fmol。**