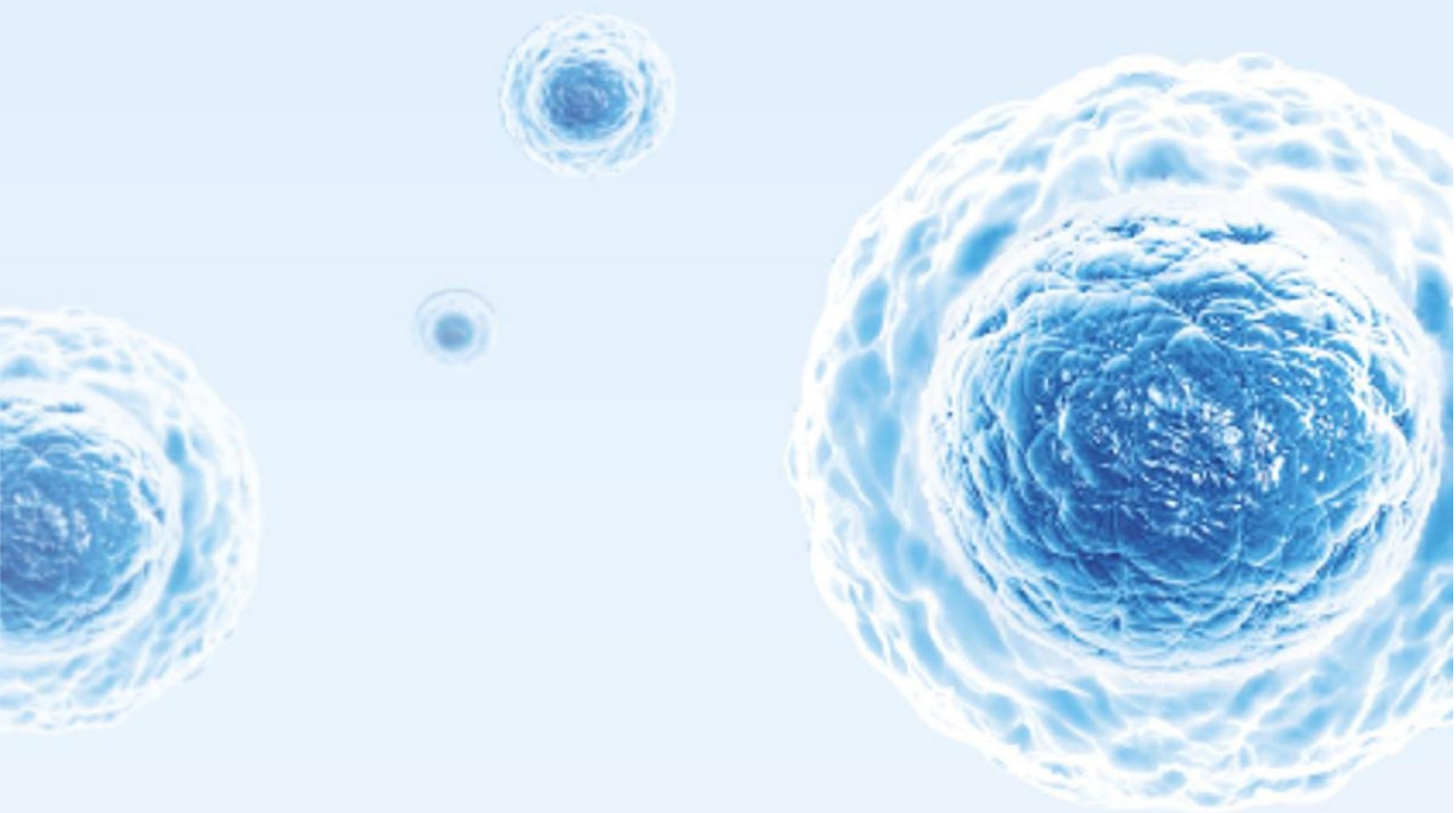




Singleron Library Prep Kit (2 RXNs/16 RXNs)

新格元文库构建试剂盒 用户手册 (2 RXNs/16 RXNs)

本手册适用于以下产品：

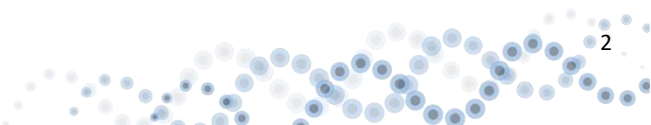
目录号	产品名称	规格
1330061	Singleron Library Prep Kit	2 RXNs
1330062	Singleron Library Prep Kit	16 RXNs

文件信息

- 文件名称：新格元文库构建试剂盒
- 版本号：2025/04
- 版本日期：2025.04

版权说明

新格元生物科技有限公司保留所有解释权利。本手册所描述的所有产品和服务仅供科学研究使用，不可用于临床诊断。



目录

1 产品组分及所需耗材	4
1.1 产品组成	4
1.2 自备仪器耗材试剂	6
2 转录组文库构建实验操作	7
2.1 片段化	7
2.2 接头连接	8
2.3 接头连接后产物纯化	9
2.4 PCR 富集	10
2.5 扩增产物片段分选	11
2.6 文库质检	13

1 产品组分及所需耗材

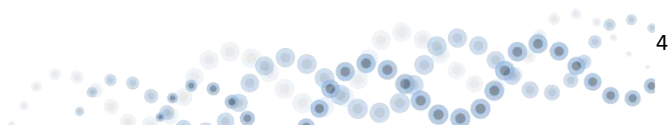
1.1 产品组成

Singleron Library Prep Kit (2 RXNs)

产品组成名称	组分	体积/SD	储存条件
Library Prep Reagents	Fragmentation Buffer V3	17μL	-25℃~-15℃
	Fragmentation Enzyme Mix V3	6μL	
	1× TE	800μL	
	Ligation Mix	72μL	
	Ligation booster	4μL	
	Adaptor	50μL	
Library Adapters	Library Amp Mix V3	60μL	
	Indexing Primer Mix1(ATCACGTT)	30μL	
	Indexing Primer Mix2(CGATGTTT)	30μL	

Singleron Library Prep Kit (16 RXNs)

产品组成名称	组分	体积/SD	储存条件
Library Prep Reagents	Fragmentation Buffer V3	135μL	-25℃~-15℃
	Fragmentation Enzyme Mix V3	40μL	



	1 × TE	800μL	
	Ligation Mix	576μL	
	Ligation booster	20μL	
	Adaptor	50μL	
	Library Amp Mix V3	480μL	
	Indexing Primer Mix1(ATCACGTT)	30μL	
	Indexing Primer Mix2(CGATGTTT)	30μL	
	Indexing Primer Mix3(TTAGGCAT)	30μL	
Library Adapters	Indexing Primer Mix4(TGACCACT)	30μL	
	Indexing Primer Mix5(ACAGTGGT)	30μL	
			−25℃~−15℃
	Indexing Primer Mix6(GCCAATGT)	30μL	
	Indexing Primer Mix7(CAGATCTG)	30μL	
	Indexing Primer Mix8(ACTTGATG)	30μL	

1.2 自备仪器耗材试剂

		名称
建库环节	设备	医用冷藏冷冻箱
	仪器	全自动核酸片段分析仪（推荐安捷伦 FA™ -12 Automated CE System）
		Qubit 4.0 荧光定量仪
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
	试剂	Ampure XP 纯化磁珠（Beckman）
		80%乙醇（用无水乙醇配制，现配现用）
		Buffer EB
		Nuclease-free Water
		Qubit dsDNA HS assay kit
		核酸片段分析仪定量试剂
	耗材	不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）
	工具	不同量程单道移液器
		DynaMag™-PCR 磁力架/492025

2 转录组文库构建实验操作

2.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3 (橙色);
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (橙色);
- 1×TE (橙色);
- cDNA 产物 (已纯化)

自备材料：

- PCR 仪
- 不同量程单通道移液器
- 灭菌的 PCR 管

1. 提前按照下表设置 PCR 程序，反应体积 35μL，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

步骤	温度	运行时间
1	37℃	0:10:00
2	65℃	0:30:00
3	4℃	Hold

注：第一步程序设置的目的是预冷 PCR，为孵育做准备。

2. 室温解冻 1×TE 和 Fragmentation Buffer V3，确保完全融化，涡旋混匀并短暂离心后冰上备用；使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡并瞬离，置于冰上备用。

3. 将灭菌的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

组分	体积 (μL)
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
cDNA (质检合格的产物)	Variable (10ng/50ng)
1×TE	Variable

Total	35
-------	----

注：① cDNA 总量不足 10ng 时，将全部 cDNA 投入进行建库。

② cDNA 总量在 10–60ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。

③ cDNA 总量在 60ng 以上时，选择 50ng 投入量进行建库。

注意：cDNA 要预留二次建库的量。

4. 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬离后将 PCR 管置于 PCR 仪中，跳过 PCR 程序第一步。

5. 完成反应后立即进行下一步接头连接。

2.2 接头连接

准备材料：

- Ligation Mix (蓝色)；
- Ligation booster (蓝色)；
- Adaptor (蓝色)；
- 片段化产物 (来自 2.1)。

自备材料：

- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器。

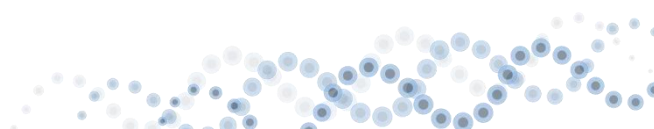
1. 提前按照下表设置 PCR 程序，反应体系 70μL，并关闭 PCR 仪热盖加热功能。

步骤	温度	运行时间
1	20℃	0:15:00
2	4℃	Hold

2. 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积（多反应体系时建议 Adaptor 单独加入）。

3. 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

组分	体积 (μL)
----	---------



片段化产物 (Step2.1 产物)	35
Ligation Mix	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

4. 涡旋混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中。

2.3 接头连接后产物纯化

准备材料：

- 0.1×TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1×TE)；
- 接头连接产物 (来自 2.2)。

自备材料：

- AMPure XP 纯化磁珠；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 不同量程单通道移液器；
- 无菌 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

注意：

- 1) AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2) AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

1. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.2x 产物总体积。例如：片段化产物体积为 68.5μL，则应使用 0.2 x 68.5=13.7μL AMPure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。

2. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无菌 PCR 管中，暂时留存。
3. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
4. 重复步骤 3，总计漂洗 2 次。
5. 从磁力架上取下纯化磁珠所在 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。
6. 将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 $\times$ TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
7. 将纯化磁珠所在 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 2.4 PCR 富集。

注：此步骤结束后可以将样品于 4℃保存 72 小时，-20℃保存一周。

2.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3（白色）；
- Indexing Primer Mix（白色）；
- 接头连接后纯化产物（来自 2.3）。

自备材料：

- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器。

1. 将 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系，涡旋混匀并短暂离心，将反应管置于 PCR 仪中。

组分	体积（ μ L）
接头连接纯化后产物 (Step2.3 产物)	15



Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix	10
Total	50

注：*Indexing Primer Mix* 包括多种，任意选择一种即可，一个样本对应一个 *Indexing Primer Mix*。

2. 提前按照下表设置 PCR 程序，并使 PCR 仪热盖保持在 105℃，反应体积 50μL。

步骤	温度	运行时间
1	98℃	0:00:30
2（循环数参见下表）	98℃	0:00:10
	65℃	0:01:15
3	65℃	0:05:00
4	4℃	Hold

扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

2.5 扩增产物片段分选

准备材料：

- PCR 富集产物（来自 2.4）。

自备材料：

- Elution Buffer;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- 不同量程单通道移液器;
- 无菌 PCR 管;
- 1.5mL 离心管;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

注意：

- 1) AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2) AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

1. 纯化磁珠提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。将 2.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，Ampure XP 纯化磁珠体积为 0.5x 产物总体积。例如，产物体积为 50mL，则使用 $0.5 \times 50 = 25 \mu\text{L}$ Ampure XP 纯化磁珠，涡旋振荡 15s 充分混匀，室温孵育 5min。

注：纯化磁珠比较粘稠，需充分涡旋振荡混匀后准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

2. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（DynaMag™-PCR 磁力架/492025，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心回收上清液（70 μL ）至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。

3. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5 μL 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。

4. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。

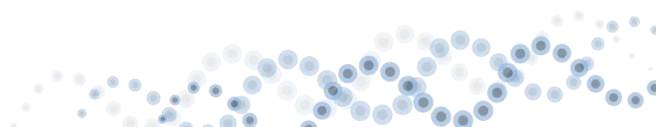
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗 2 次。

7. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。

8. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μL Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。

9. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取上清（18 μL ）至新的灭菌 1.5mL 离心管中，-20℃ 或 -80℃ 可以保存三个月。



2.6 文库质检

准备材料：

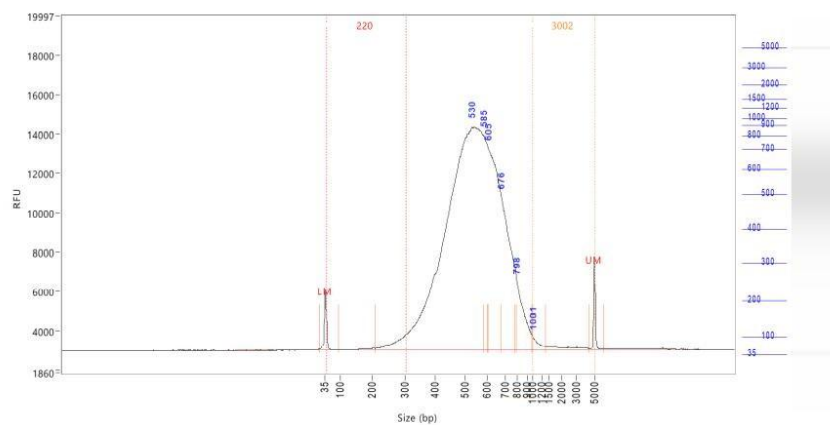
- 片段分选产物（来自 2.5）

自备材料：

- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂;
 - Qubit 4.0 荧光定量仪及配套试剂;
 - 单通道移液器
1. 取适量（建议 1 μ L）样品进行产物浓度和片段大小检测。
 2. 主峰片段范围须在 400bp–700bp 之间，900bp–5000bp 占比<10%。若存在 200bp 左右小尖峰凸起，可 0.8 $\times$ 纯化后送测。

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng，主峰 400bp–700bp 之间，900bp–5000bp 占比<10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng，主峰 400b–700bp 之间，900bp–5000bp 占比 10%–20%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 值<50ng，主峰<400bp，225bp–500bp 占比<30%	不建议上机测序

3. 质检合格的文库，可直接送测序，也可置于–20℃或–80℃冰箱保存 3 个月，如文库没有直接送测，送测前需再进行一次质检。



文库质检图



新格元生物科技有限公司

电 话：025-58862675

电子邮件：product-service-support@singleronbio.com

网 址：www.singleronbio.com

地 址：苏州市工业园区新泽路 1 号 1 栋 401（苏州）

南京市江北新区药谷大道 11 号加速器二期 06 栋 3-4 层（南京）