

版本号: NG210831

TIANSeq DirectFast Library Kit (illumina)

TIANSeq直接快速DNA文库构建试剂盒 (illumina平台)

目录号: NG101

产品内容

产品组成	NG101-01 (24 rxn)	NG101-02 (96 rxn)
5×FEA Enzyme Mix	240 μl	960 μl
10×FEA Reaction Buffer	120 μl	480 μl
FEA Enhancer	120 μl	480 μl
TIANSeq DNA Ligase	240 μl	960 μl
5×Ligation Buffer	500 μl	2×1 ml
2×HiFi PCR MasterMix	600 μl	4×600 μl
P5/P7 Primers Mix (10 μM each)	120 μl	480 μl
Nuclease-Free ddH ₂ O	1 ml	4×1 ml

储存条件

请将试剂盒置于-30~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

TIANSeq DirectFast Library Kit (illumina)是专门针对于illumina高通量测序平台所优化的DNA文库构建试剂盒。本试剂盒实现了DNA片段化、末端修复和3'端dA尾添加在一管内一步法完成，同时所得产物无需纯化，可直接用于adapter的连接。另外，本试剂盒配备的PCR扩增试剂经过专门的优化，扩增所得DNA序列产量高，保真度好、无明显碱基偏好性。本产品采用一步法的反应流程，省去了多步纯化步骤，整个建库流程仅需2.5 hr；文库转化效率更高，可对微量DNA样本进行高效的文库构建。

适用范围：适用于illumina高通量测序平台DNA文库构建。

适用样本量：1 ng~1 µg DNA。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq Single-Index Adapter (illumina) (NG214-01/02/03)
2. TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306-01/02/03)

产品特点

1. DNA片段化过程和PCR富集过程无明显碱基偏好性，测序均一度好。
2. 高文库转化效率，DNA样本起始量可低至1 ng。
3. 一管式酶促反应，操作简便，省去多步纯化步骤，整个建库流程仅需2.5 hr。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

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. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、EP管进行试验。
3. 试验开始前，请清洁操作台，并使用RNA酶及DNA酶清除试剂，如RNase Away (Molecular BioProducts, Inc) 处理台面。确保没有RNA酶和DNA的污染。
4. 进行文库扩增前，请确保PCR仪已经调试好并处于稳定的状态。
5. 试验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停试验，或者无需立即进行下游试验。可根据说明书推荐将试验产物保存于-20℃并安排后续试验。
6. 由于使用本品所进行的片段化过程为酶促反应，故片段化过程对反应温度、反应时间、体系配制以及DNA上样量等因素较为敏感。强烈推荐用户按照本说明书所述步骤及优化的反应参数（如反应时间等）进行试验。

操作步骤

一、片段化/末端修复/A尾添加

(一) 试验准备:

1. 在开始实验前, 需要明确核酸的浓度以及DNA需溶解于哪种溶剂中。

注: 确定上样DNA浓度至关重要, 尤其在上样量低于100 ng时。推荐使用Qubit、Picogreen或者其他染料法对DNA浓度进行准确定量。另外, 请确认DNA溶于哪种溶剂, 溶剂不同, 则采用的处理方式也略有不同。

2. 将各试剂置于冰上, 5×FEA enzyme Mix融化后用手指轻弹后混匀, 不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。

(二) 试验步骤

1. 当DNA溶解于去离子水、10 mM Tris、Buffer EB或0.1×TE中, 请使用如下步骤进行片段化/末端修复/A尾添加反应。

(1) 照下表设置PCR仪反应程序。开启热盖, 热盖温度设置为70℃。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	4℃	1 min
2	32℃	3-24 min*
3	65℃	30 min
4	4℃	保持

*注: 确切的片段化反应时间需要根据DNA的实际上样量进行优化。下面表1中列出了10 ng、100 ng和1000 ng上样量DNA片段化所需的时间, 用户可以参照此时间调整自己的实验。调整过程中, 我们推荐额外设置一个反应时间延长3 min以及一个缩短3 min的对照。这样有助于确定切割至所需片段大小时所需要的准确反应时间。关于片段化时长的更多建议, 请参考天根产品TIANSeq Fragment/Repair/Tailing Module (NG301) 说明书。

表1 片段化时间选择表

DNA主峰大小	片段化时间 (min) (32℃)			
	250 bp	350 bp	450 bp	550 bp
10 ng DNA上样量	24	16	14	10
100 ng DNA上样量	16	10	8	6
1000 ng DNA上样量	14	8	6	4

(2) 请按下表配制反应体系，冰上操作，各组分加入后，请轻柔吸打混匀，注意不要涡旋。

组分名称	体积 (μl)	
	DNA上样量≥10 ng	DNA上样量<10 ng
10×FEA Reaction Buffer	5	5
DNA样本	X	X
FEA Enhancer	0	2.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	(35-X)	(32.5-X)
总体积	40	40

注：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系并在此基础上增加体系10%，以避免因溶液转移过程中因挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

(3) 取1个新的200 μl薄壁管置于冰上，向管中加入10 μl 5×FEA Enzyme Mix，随后将步骤(2)中反应体系转移40 μl至同一薄壁管中，轻柔吸打混匀10次。

(4) 瞬时离心薄壁管，立刻置于已预冷至4℃的PCR仪中，并启动反应程序。

(5) 当反应程序结束后，将薄壁管从PCR仪中取出并置于冰上。

(6) 立即进入接头连接步骤。

2. 当DNA溶解于1×TE溶液中时，请参照以下步骤进行DNA的片段化/末端修复/A尾添加反应。

(1) 照下表设置PCR仪反应程序。开启热盖，热盖温度设置为70℃。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	4℃	1 min [Ⓞ]
2	32℃	5-35 min*
3	65℃	30 min
4	4℃	保持

*注：反应时间需根据DNA的实际上样量进行优化。若DNA上样量≥10 ng，反应体系中加入2.5 μl FEA Enhancer，推荐使用25 min作为起始反应时间，此时产生的片段主要集中于300-500 bp；若DNA上样量<10 ng，反应体系中加入5 μl FEA Enhancer，则推荐使用15 min作为起始时间，此时片段集中于300 bp。若需要进行调整，则请以3 min为单位，在原反应时间基础上进行增减，直至得到所需要的片段大小。

(2) 请按下表配制反应体系，冰上操作，各组分加入后，请轻柔吸打混匀，注意不要涡旋。

组分名称	体积 (μl)	
	DNA上样量≥10 ng	DNA上样量<10 ng
10×FEA Reaction Buffer	5	5
DNA样本	X	X
FEA Enhancer	2.5	5
Nuclease-Free ddH ₂ O	(32.5-X)	(30-X)
总体积	40	40

注：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系并在此基础上增加体系10%，避免因溶液转移过程中因挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

(3) 取1个新的200 μl薄壁管置于冰上，向管中加入10 μl 5×FEA Enzyme Mix，随后将步骤(2)中反应体系转移40 μl至同一薄壁管中，轻柔吸打混匀10次。

(4) 瞬时离心薄壁管，立刻置于已预冷至4°C的PCR仪中，并启动反应程序。

(5) 当反应程序结束后，将薄壁管从PCR仪中取出并置于冰上。

(6) 立即进入接头连接步骤。

3. 当DNA溶解于其他溶液中时，请确定溶液中的盐离子，尤其EDTA的浓度。EDTA对反应影响较大，如果不确定溶液中EDTA浓度或EDTA浓度较高，推荐使用TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306) 磁珠对DNA进行纯化。纯化步骤如下：

(1) 将磁珠置于室温平衡20 min。

(2) 若DNA溶液体积小于50 μl，请用无核酸酶的去离子水补足体积至50 μl。

(3) 加入1.8×体积（90 μl）完全涡旋混匀的磁珠至DNA溶液中，吸打混匀10次。若DNA溶液体积大于50 μl，请根据DNA溶液的实际体积，加入1.8×体积完全涡旋混匀的磁珠。

(4) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。

(5) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。

(6) 重复此洗涤步骤一次。

(7) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

(8) 将PCR管从磁力架中取出，加入32.5 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打充分混匀10次。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移约30 μl 上清至新的离心管中。

(9) 使用Quibit、Picogreen或其他荧光定量方法测定纯化后的DNA浓度。

二、接头连接

试验准备

将各试剂置于冰上，TIANSeq DNA Ligase 融化后用手指轻弹混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。

1. 片段化/末端修复/A尾添加反应结束以后，向此50 μl 反应体系中加入Y μl 的adapter溶液，轻柔吸打混匀后置于冰上。

注：本试剂盒中不含测序DNA adapter，请参考接头供应商提供的使用条件。推荐使用TIANSeq Single-Index Adapter (illumina) (NG214-01/02/03)，为了达到较高的连接效率，我们推荐反应体系中DNA片段与adapter的摩尔比在1:200至1:10之间。

2. 按照下表所示各组分量配制反应体系，并将配制完成的反应体系轻柔混匀后置于冰上。

组分名称	体积 (μl)
5×Ligation Buffer	20
TIANSeq DNA Ligase	10
Nuclease-Free ddH ₂ O	(20-Y)
总体积	(50-Y)

3. 将此配制好的 (50-Y) μl 连接反应液加入至第1步准备的反应液中，轻柔吸打混匀10次后置于预设温度为20°C的金属浴或PCR仪中反应15 min。

注：此步骤如果使用PCR仪进行反应，PCR仪热盖温度设定为 $\leq 40^\circ\text{C}$ 。

4. 接头连接产物的纯化推荐使用TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306)，向反应产物中加入1×体积 (100 μl) 磁珠进行纯化，具体步骤如下：

- (1) 将磁珠置于室温平衡20 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入100 μl 磁珠至步骤3连接产物中，充分吸打混匀10次。
- (3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器吸弃上清。

(4) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl （没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。

(5) 重复此洗涤步骤一次。

(6) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

(7) 将PCR管从磁力架中取出，加入22.5 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打充分混匀10次。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移约20 μl 上清至新的离心管中，用于后续的PCR富集实验。

注：如果连接产物无需进行PCR富集，可在步骤(7)中加入12.5 μl 的10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 洗脱DNA，并转移10 μl 纯化后的DNA用于后续的试验反应。如不立即使用，请将样品冻存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(8) 如进行DNA长度分选，加入102.5 μl 无核酸酶去离子水进行洗脱。并转移约100 μl 上清至新的离心管中，用于后续的DNA片段长度分选。

5. **DNA长度片段分选操作步骤：** DNA长度片段分选操作步骤：DNA片段长度的分选推荐使用TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306)，请参考表2中两步筛选过程中的磁珠添加比例进行操作。如果使用其它磁珠，请按照磁珠说明书推荐的分选比例进行操作。

表2 片段分选推荐磁珠用量

文库参数		磁珠添加比例	
初始片段大小	连接接头后片段大小	第一次筛选比例	第二次筛选比例
250 bp	370 bp	0.6 \times	0.1 \times
300bp	420 bp	0.55 \times	0.1 \times
350 bp	470 bp	0.53 \times	0.1 \times
400 bp	520 bp	0.5 \times	0.1 \times
450 bp	570 bp	0.47 \times	0.1 \times
500 bp	620 bp	0.45 \times	0.1 \times

以插入片段大小为250 bp的情况为例，使用磁珠进行纯化，具体步骤如下：

(1) 将磁珠置于室温平衡20 min。

(2) 涡旋使磁珠充分悬浮，按表2第一次筛选比例加入0.6 \times 体积（60 μl ）磁珠至100 μl 纯化体系中，充分吸打混匀10次。

- (3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心转移上清液至一个新的含有0.1×体积（10μl）磁珠的离心管中并立即吹打混匀至少10次。转移上清时注意不要吸到磁珠。
- (4) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器吸弃上清。
- (5) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30sec后，用移液器小心吸弃上清。
- (6) 重复此洗涤步骤一次。
- (7) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

- (8) 将PCR管从磁力架中取出，加入22.5 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打充分混匀10次。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移约20 μl上清至新的离心管中，用于后续的PCR富集实验。

三、文库PCR富集

1. 将2×HiFi PCR MasterMix和P5/P7 Primers Mix (10 μM each)置于冰上融化，2×HiFi PCR MasterMix轻弹颠倒混匀，P5/P7 Primers Mix (10 μM each)可短暂涡旋混匀。
2. 按下表设置PCR仪反应程序，开启热盖，温度设置于105℃。

步骤	温度	时间	循环数
1	98℃	2 min	1
2	98℃	20 sec	6-12*
3	60℃	30 sec	
4	72℃	30 sec	
5	72℃	1 min	1
6	4℃	保持温度	1

*注：请根据DNA的质量和上样量确定PCR循环数。一般而言，对于100 ng、10 ng、1 ng 文库起始DNA，在进行PCR富集时分别需要扩增6、10、12个循环。如果在PCR富集之前经过片段大小分选步骤(size-selection)，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. 按照下表配制PCR体系，注意此步骤需于冰浴中操作。

组分名称	体积 (μl)
2×HiFi PCR MasterMix	25
P5/P7 Primers Mix(10 μM each)	5
总体积	30

4. 将纯化后的带有adapter的文库连接产物20 μl转移至PCR管中，加入30 μl步骤3中配制好的PCR反应液，轻柔吸打10次混匀。

注：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。

5. 瞬时离心后将PCR反应管置于PCR仪内，按步骤2反应程序进行扩增。

6. 当PCR样品温度降至4℃，将PCR产物取出并使用1×体积（50 μl）TIANSeq Size Selection DNA Beads（NG306）磁珠进行纯化。

(1) 将磁珠置于室温平衡20 min。

(2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入50 μl磁珠至PCR产物中，充分吸打混匀10次。

(3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。

(4) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。

(5) 重复此洗涤步骤一次。

(6) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

(7) 将PCR管从磁力架中取出，加入22.5 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打充分混匀10次。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移约20 μl上清至新的离心管中。

7. 上机测序前可使用凝胶电泳、qPCR定量或者Agilent生物分析仪对DNA文库质量进行鉴定。纯化后得到的DNA文库可保存于-20℃。







TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品