

版本号: NG210831

TIANSeq Fast DNA Library Kit (illumina)

TIANSeq快速DNA文库构建试剂盒 (illumina平台)

目录号: NG102

产品内容

产品组成	NG102-01 (24 rxn)	NG102-02 (96 rxn)
5×ERA Enzyme Mix	240 µl	960 µl
10×ERA Buffer	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 Fast DNA 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。本产品可将经超声处理、化学处理、酶处理的片段化双链DNA或小片段DNA的末端修复和3'端dA尾添加在一管内一步完成，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，整个文库构建流程仅需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：0.25 ng~1 µg DNA。

推荐使用的其他试剂

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

产品特点

1. 单管酶促反应，一步完成双链DNA片段的末端修复、dA添加反应。
2. PCR富集过程无明显碱基偏好性，测序均一度好。
3. 高文库转化效率，DNA样本起始量可低至0.25 ng。

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。

操作步骤

一、DNA片段化

本试剂盒不包含DNA片段化相关试剂。对于DNA的片段化过程，客户可在超声处理、化学处理和酶处理等常用方法中选择，具体操作请参考相关产品说明。

二、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×ERA 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	20℃	30 min
3	65℃	30 min
4	4℃	保持温度

- (2) 取1个新的200 μl薄壁管，并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)
10×ERA buffer	5
DNA sample	X
Nuclease-Free ddH ₂ O	35-X
Total	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挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

(3) 向步骤(2)的薄壁管中加入10 μl 5×ERA Enzyme Mix，轻柔吸打10次混匀，注意不要涡旋。

注：此步骤需要保持在冰浴中进行。

(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) 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。

三、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. 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-Indexed 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，具体可参照NG214产品说明书。

2. 按照下表所示各组分用量配制反应体系，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℃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的连接产物中，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 μ l（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 μ l 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 μ l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 μ l的10 mM Tris-HCl（pH 8.0）洗脱DNA，并转移10 μ l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℃保存

(8) 如进行DNA长度分选，加入102.5 μ l 无核酸酶去离子水进行洗脱。并转移约100 μ l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中两步分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 片段长度分选推荐磁珠用量

文库参数		磁珠添加比例	
插入片段大小	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×	0.1×
300bp	420 bp	0.55×	0.1×
350 bp	470 bp	0.53×	0.1×
400 bp	520 bp	0.5×	0.1×
450 bp	570 bp	0.47×	0.1×
500 bp	620 bp	0.45×	0.1×

以插入片段大小为250bp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×体积磁珠（60 μ l）至100 μ l纯化产物中，充分吸打混匀。

- (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富集之前经过片段长度筛选步骤（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。



- 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

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的反应程序进行扩增。

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扩增产物中，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℃。