

版本号: NG210831

TIANSeq NGS Library Amplification Module

TIANSeq NGS文库富集模块

目录号: NG304

产品内容

产品组成	NG304-01 24 rxn	NG304-02 96 rxn
2×HiFi PCR MasterMix	600 μ l	4×600 μ l
P5/P7 Primers Mix (10 μ M each)	120 μ l	480 μ l

储存条件

请将试剂盒置于-30~-15 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

TIANSeq NGS Library Amplification Module是专为illumina高通量测序平台DNA文库扩增优化的PCR反应试剂，扩增所得DNA序列高度保真、无明显碱基偏好性。试剂中所包含有的P5/P7 Primers Mix是正向和反向引物的混合液，适用于两侧含有P5及P7序列的文库DNA片段的扩增。如果选用其他引物，请参照相应的供应商说明书。若使用TIANSeq Fragment/Repair/Tailing Module(NG301-01/02)或TIANSeq End Repair/dA-Tailing Module (NG302-01/02)进行文库构建，当DNA样本起始量低于100 ng时需要对外文库进行扩增。

适用范围：适用于illumina高通量测序平台DNA文库的富集。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq Fragment/Repair/Tailing Module (NG301-01/02)
2. TIANSeq End Repair/dA-Tailing Module (NG302-01/02)
3. TIANSeq Fast Ligation Module (NG303-01/02)
4. TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306-01/02/03)

产品特点

1. 扩增保真性高，无明显碱基偏好性。
2. 高扩增效率，可对低至1 ng起始文库DNA进行富集。
3. 包含P5/P7引物，直接用于illumina平台DNA文库的富集。

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

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°C。

步骤	温度	时间	循环数
1	98°C	2 min	1
2	98°C	20 sec	6-12* [®]
3	60°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	1 min	1
6	4°C	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。

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

注: 对于多个样品, 请计算所需试剂的总体积并在此基础上额外添加10%, 以避免分装过程中枪头挂壁损失而导致试剂体积不足。

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°C, 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。



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

- 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) 重复步骤4) 1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 $^{\circ}\text{C}$ 。