

版本号: EP170330

TIANSeq DNA Library Prep Kit (illumina)

TIANSeq DNA文库构建试剂盒

(illumina平台)

目录号: NG103

产品内容

产品组成	NG103-01 (24 rxn)	NG103-02 (96 rxn)
End-Repair Mix	24支	1 × 96孔板
A-Tailing Mix	24支	1 × 96孔板
Ligation Mix	24支	1 × 96孔板

储存条件

试剂盒中End-Repair Mix, A-Tailing Mix和Ligation Mix可于室温下（15~25℃）保存，保质期为一年。

试剂盒中未使用完的组份（末端修复、A尾添加和接头连接等试剂冻干粉）经自封铝箔袋封装后可在室温条件下保存。铝箔袋开封后请勿丢弃其中的干燥剂，并在2个月内将所有组份用完。

产品简介

TIANSeq DNA Library Prep 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。由末端修复 (End-Repair Mix)、A尾添加 (A-Tailing Mix) 和接头连接 (Ligation Mix) 三个模块构成。与同类试剂不同的是：本产品所含有的模块均为一管式包装，且经特殊工艺加工呈冻干粉状，极大增强了试剂稳定性，可在室温条件下运输，保存和实验操作，省去了体系配制，低温保藏等繁琐操作，使得操作更加简便，文库转化效率更高。

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：10 ng~1 µg DNA。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq Single-Indexed Adapter (Illumina® Platforms) (NG214-01/02/03)。
2. TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)。
3. BECKMAN Agencourt AMPure XP磁珠。

产品特点

1. 冻干粉形式，单管酶促反应，一管完成一步反应。
2. 高文库转化效率，DNA样本起始量可低至10 ng。
3. 操作简便，省去体系配制，低温保藏等步骤。

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

1. 沿锡箔纸封口袋顶部切口位置撕开试剂包装袋。
2. 取出一支管盖呈蓝色的1.5 ml离心管用于末端修复反应。每支1.5ml离心管中所含的冻干粉试剂可供一次文库构建反应使用。
3. 如有需要，可瞬时离心以确保冻干粉聚集于离心管底。
4. 按下表建立末端修复反应体系：

组分	用量
双链DNA (ds DNA) 片段 (10 ng-1000 ng)	X μ l
ddH ₂ O	100-X μ l
总体系	100 μ l

5. 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
6. 20℃ 孵育30 min。
7. 使用AMPure® XP磁珠纯化末端修复产物。
8. 纯化开始前将AMPure® XP磁珠平衡至室温。
9. 使用前将AMPure® XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
10. 若反应管与磁力架不兼容，可将末端补平反应液转移至与磁力架兼容的离心管中。

注：此离心管须能够容纳260 μ l液体。

11. 每100 μ l末端修复反应液中加入160 μ l AMPure® XP磁珠，吸打混匀至少5次。
12. 室温放置5 min。
13. 将含磁珠的反应液置磁力架上3 min，待溶液变清澈。

-
14. 用移液器分两次吸除上清，每次128 μl 。注意在吸入上清的过程中不要扰动磁珠，除去上清后管底剩余少量液体不影响后续试验。
 15. 保持反应管置于磁力架上，向反应管管底轻柔加入200 μl 80%乙醇（注意不要扰动磁珠），室温孵育30 sec。
 16. 小心去除80%乙醇（ \sim 200 μl ），不要扰动磁珠。
 17. 用80%乙醇重复洗涤一次（步骤15-16）。
 18. 将反应管瞬时离心后置于磁力架上，使用 <20 μl 量程的移液器小心去除管底残留的乙醇。
 19. 将反应管开盖置于磁力架上，室温干燥5 min
 20. 将反应管从磁力架上取下，加入52.5 μl 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH8.0; 10mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0或者去离子水）。用移液器吸打使磁珠悬浮。
 21. 将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清。小心吸取上清至新离心管。
 22. 立刻进入A尾添加程序或将产物保存于 -20°C （末端补平产物可在 -20°C 保存7天）。

三、A尾添加

1. 沿锡箔纸封口袋顶部切口位置撕开试剂包装袋。
 2. 取出一支管盖呈黄色的1.5 ml离心管用于A尾添加反应。每支1.5 ml离心管中所含的冻干粉试剂可供一次文库构建反应使用。
 3. 如有需要，可瞬时离心以确保冻干粉聚集于离心管底。
 4. 向反应管内加入50 μl 末端修复后的DNA纯化产物（末端修复之步骤22）。
 5. 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
 6. 30°C 孵育30 min。
 7. 使用AMPure[®] XP磁珠纯化A尾添加产物。
 8. 纯化开始前将AMPure[®] XP磁珠平衡至室温。
 9. 使用前将AMPure[®] XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
 10. 若反应管与磁力架不兼容，可将A尾添加反应液转移至与磁力架兼容的离心管中。
注：此离心管须能够容纳200 μl 液体。
-

-
11. 每50 μl 末端修复反应液中加入90 μl AMPure® XP磁珠，吸打混匀至少5次。
 12. 室温放置5 min。
 13. 将含磁珠的反应液置磁力架上3 min，待溶液变清澈。
 14. 用移液器吸除上清，约135 μl 。
注：吸入上清的过程中不要扰动磁珠，除去上清后管底剩余少量液体不影响后续试验。
 15. 保持反应管置于磁力架上，向反应管管底轻柔加入200 μl 80%乙醇（注意不要扰动磁珠），室温孵育30 sec。
 16. 小心去除80%乙醇（~200 μl ），不要扰动磁珠。
 17. 用80%乙醇重复洗涤一次（步骤15-16）。
 18. 将反应管瞬时离心后置于磁力架上，使用 <20 μl 量程的移液器小心去除管底残留的乙醇。
 19. 将反应管开盖置于磁力架上，室温干燥5 min。磁珠干燥期间请计算接头连接过程中所需的DNA量（X）以及接头用量（接头连接步骤中第4步）。
注：文库DNA与接头在适当的摩尔比范围内可以增加接头连接效率，进而提高文库质量和丰度。另外，使用过小体积溶液洗脱会造成DNA得率显著降低，故应使 $X \geq 20 \mu\text{l}$ 。
 20. 将反应管从磁力架上取下，加入 $(X+2.5)$ μl 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH8.0; 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0或者去离子水）。用移液器吸打使磁珠悬浮。
 21. 将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清。小心吸取上清至新离心管。
 22. 直接进入接头连接步骤或将产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ （添加A尾后的DNA产物可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存7天）。

四、接头连接

1. 沿锡箔纸封口袋顶部切口位置撕开试剂包装袋。
2. 取出一支管盖呈紫色的1.5 ml离心管用于末端修复反应。每支1.5 ml离心管中所含的冻干粉试剂可供一次文库构建反应使用。
3. 如有需要，可瞬时离心以确保冻干粉聚集于离心管底。

4. 按下表建立接头连接反应体系：

组分	用量
添加A尾后DNA纯化产物	X μ l
DNA接头*	Y μ l
总体系	50 μ l

注：本试剂盒中不含DNA接头。接头用量需根据文库DNA片段用量进行调整。推荐接头产品为TIANGEN 的TIANSeq Single-Indexed Adapter (Illumina® Platforms) (NG214-01/02/03)。该产品说明书中详细给出了不同情况下，DNA片段与接头的最佳摩尔比，客户可进行参考。若使用其他公司的接头产品，则需参考其说明书操作。

5. 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
6. 20℃ 孵育15 min。
7. 使用AMPure® XP磁珠纯化末端修复产物。
8. 纯化开始前将AMPure® XP磁珠平衡至室温。
9. 使用前将AMPure® XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
10. 若反应管与磁力架不兼容，可将末端补平反应液转移至与磁力架兼容的离心管中。

注：此离心管须能够容纳200 μ l液体。

11. 每50 μ l末端修复反应液中加入50 μ lAMPure® XP磁珠，吸打混匀至少5次。
12. 室温放置5 min。
13. 将含磁珠的反应液置磁力架上3 min，待溶液变清澈。
14. 用移液器吸除上清，约95 μ l。

注：在吸入上清的过程中不要扰动磁珠，除去上清后管底剩余少量液体不影响后续试验。

15. 保持反应管置于磁力架上，向反应管管底轻柔加入200 μ l 80%乙醇(注意不要扰动磁珠)，室温孵育30 sec。
16. 小心去除80%乙醇 (~200 μ l)，不要扰动磁珠。
17. 用80%乙醇重复洗涤一次(步骤15-16)。
18. 将反应管瞬时离心后置于磁力架上，使用 <20 μ l量程的移液器小心去除管底残留的乙醇。

19. 将反应管开盖置于磁力架上，室温干燥5 min。磁珠干燥期间请计算片段筛选过程中所需的DNA量（Z）。

注：由于不同的片段选择方法所需的上样量不同，用户可以根据后续片段筛选方法确定接头连接产物的洗脱体积（Z+2.5 μl）。其中，推荐Z的取值范围为：20≤Z≤100。如果不进行片段筛选，则推荐再次使用AMPure® XP磁珠进行纯化以降低接头污染（50 μl 接头连接产物加入50 μl磁珠，Z=50 μl）。如果不明确如何选择Z值，请参阅说明书第五部分。

20. 将反应管从磁力架上取下，加入(Z+2.5) μl洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH8.0; 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0或者去离子水）。用移液器吸打使磁珠悬浮。
21. 将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清。小心吸取上清至新离心管。
22. 小心吸取上清Z μl至新离心管，直接进入说明书第五部分或将产物保存于-20℃（接头连接后的DNA产物可在-20℃保存7天）。

五、片段筛选

若使用Illumina平台进行测序或进行基因组测序，文库DNA片段平均大小应为400 bp（包含接头）。片段筛选步骤即旨在特异性地回收得到这部分片段，而去过大或过小的双链及单链DNA片段。以下是常用的片段筛选方法，以及使用这些方法时所需要的连接产物体积（Z）。

1. 琼脂糖凝胶回收（Z=20 μl）；
2. Sage Science Pippin Prep™（Z=30 μl）；
3. Life Technologies™ E-Gel® SizeSelect™ Gels（Z=20 μl）；
4. 基于磁珠的片段筛选方法（Z=100 μl）。

注：片段筛选步骤一般在接头连接后进行，以控制文库中DNA片段大小。但用户也可以根据自身需要在末端修复完成后即进行片段筛选。

六、文库扩增

本试剂盒不含PCR试剂及引物。用户需要自行选择PCR试剂，并根据文库DNA上样量确定扩增循环数。PCR结束后，可使用AMPure® XP磁珠（Cat# A63881）对产物进行纯化，并使用凝胶电泳、Qubit®、qPCR以及Angilent生物分析仪对纯化后的DNA文库进行分析。推荐试剂为TIANGEN的TIANSeq NGS Library Amplification Module（NG304）。

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