



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



Order: 010-59822688  
Toll-free: 800-990-6057 / 400-810-6057  
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

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°C并安排后续试验。

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°C (接头连接后的DNA产物可在-20°C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Agilent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)。

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 $\mu$ l
DNA接头*	Y $\mu$ l
总体系	50 $\mu$ 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。

- 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
- 20°C 孵育15 min。
- 使用AMPure® XP磁珠纯化末端修复产物。
- 纯化开始前将AMPure® XP磁珠平衡至室温。
- 使用前将AMPure® XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
- 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  $\mu$ l液体。

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

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

## 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

- 沿锡箔纸封口袋顶部切口位置撕开试剂包装袋。
- 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。
- 如有需要, 可瞬时离心以确保冻干粉聚集于离心管底。
- 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 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	100-X $\mu$ l
总体系	100 $\mu$ l

- 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
- 20°C 孵育30 min。
- 使用AMPure® XP磁珠纯化末端修复产物。
- 纯化开始前将AMPure® XP磁珠平衡至室温。
- 使用前将AMPure® XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
- 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  $\mu$ l液体。
- 每100  $\mu$ l末端修复反应液中加入160  $\mu$ l AMPure® XP磁珠, 吸打混匀至少5次。
- 室温放置5 min。
- 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  $\mu\text{l}$ 。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  $\mu\text{l}$  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（ $\sim 200 \mu\text{l}$ ），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  $< 20 \mu\text{l}$  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
20. 将反应管从磁力架上取下，加入52.5  $\mu\text{l}$  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 $-20^{\circ}\text{C}$ （末端补平产物可在 $-20^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu\text{l}$  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.  $30^{\circ}\text{C}$  孵育30 min。
7. 使用AMPure<sup>®</sup> XP磁珠纯化A尾添加产物。
8. 纯化开始前将AMPure<sup>®</sup> XP磁珠平衡至室温。
9. 使用前将AMPure<sup>®</sup> 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  $\mu\text{l}$  液体。

11. 每50  $\mu\text{l}$  末端修复反应液中加入90  $\mu\text{l}$  AMPure<sup>®</sup> 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  $\mu\text{l}$ 。

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  $\mu\text{l}$  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（ $\sim 200 \mu\text{l}$ ），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  $< 20 \mu\text{l}$  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 $(X+2.5) \mu\text{l}$  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。