

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%，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℃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 $\times$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times$ 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℃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×	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×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

坚持“CUSTOMER FIRST”理念 秉承“质量为天，服务为根”宗旨！

TIANGEN为您提供从样本处理，
核酸纯化到下游检测的整体解决方案

科研试剂

- 样本保护与处理
- 磁珠法外泌体系列
- 基因组 DNA 提取
- 质粒提取
- 总 RNA 提取
- DNA 产物纯化 / 胶回收
- PCR 系列
- NGS 文库制备
- 表观遗传学
- RT-PCR 系列
- 荧光定量 PCR 系列
- 克隆和点突变
- DNA 分子量标准
- 蛋白表达和检测

科研解决方案

- 快速分子克隆整体解决方案
- 基因表达分析快速解决方案
- 环境微生物解决方案
- 复杂样本 RNA 解决方案