

illumina 平台 50 ng 转座酶法文库构建试剂盒 使用说明书

货 号:

NGS24006-S(24 rxns)

NGS24006-L(96 rxns)

一、试剂盒简介

illumina 平台 50 ng 转座酶法文库构建试剂盒是针对 illumina 高通量测序平台开发的转座酶法建库试剂盒，适用于起始模板 DNA 投入量为 50 ng 的各类纯化的 DNA 样品，包括人、动物、植物、微生物基因组及纯化的 PCR 产物，但 PCR 产物片段长度应大于 500 bp。因为转座酶无法作用于 DNA 末端，为了防止 PCR 文库末端覆盖度的降低，建议将 PCR 产物两末端各延长 50-100 bp。与传统文库构建试剂盒相比，该试剂盒采用新型转座酶法进行文库构建，将 DNA 片段化、末端修复及接头连接反应通过一步简单的酶促反应完成，显著降低了模板的使用量，减少了实验操作步骤，缩短了文库构建时间；采用高保真 DNA 聚合酶进行文库富集，无偏好的 PCR 扩增，可高效制备用于 illumina 二代测序平台的 DNA 文库。试剂盒提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

二、试剂盒规格及组分

	组分名称	NGS24006-S (24 rxns)	NGS24006-L (96 rxns)	保存温度
Box 1	转座酶-50 ng	120 μ L	480 μ L	-25~-15 $^{\circ}$ C
	5 $\times$ 转座酶缓冲液	144 μ L	576 μ L	-25~-15 $^{\circ}$ C
	终止缓冲液*	72 μ L	288 μ L	-25~-15 $^{\circ}$ C
	2 $\times$ 转座扩增混合液	600 μ L	1.2 mL $\times$ 2	-25~-15 $^{\circ}$ C
Box 2	DNA 纯化磁珠**	1.05 mL $\times$ 2	8.1 mL	2~8 $^{\circ}$ C

*注 1：终止缓冲液使用前室温解冻，该组分出现沉淀属于正常现象，如果溶解不完全，可以将该组分置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅，溶解后混匀使用。

**注 2：Box 2 提供的磁珠量为纯化建库用量，如需分选建库，请自行采购 DNA 分选纯化磁珠(环球基因)、DNA 纯化磁珠(环球基因)或者使用其他同等功能产品。

三、保存与运输条件

Box1：-25 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存，干冰运输。

Box2：2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存，冰袋运输。

四、自备材料

无水乙醇、ddH₂O、QubitTM 1 $\times$ dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品、DNA 分选纯化磁珠(环球基因)、DNA 纯化磁珠(环球基因)或其他同等功能产品、illumina 平台转座酶法扩增引物(含 index)等。

磁力架、PCR 仪、微型离心机、涡旋振荡器、Qubit 定量仪或者其他定量仪器、Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他片段分析仪、200 μ L PCR 单管或者八联排管、1.5 mL 离心管等。

五、注意事项

5.1 样本和片段化

5.1.1 样本 DNA 应溶解于 ddH₂O 中，且 A260/A280 = 1.8-2.0。

5.1.2 试剂盒对投入的 DNA 量敏感，所以准确的 DNA 浓度测定对实验成功与否至关重要。推荐使用 Qubit 或荧光染料 PicoGreen 对 DNA 样品进行浓度测定，请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法。

5.1.3 本试剂盒适用于 50 ng DNA 投入，其他投入量不适用于本试剂盒。

5.2 磁珠纯化及分选

5.2.1 磁珠应保存于 4℃ 条件，使用前请平衡至室温使用。

5.2.2 磁珠使用前，请充分震荡混匀或使用移液器吸吹混匀。

5.2.3 磁珠漂洗使用新鲜配置的 80%乙醇。

5.2.3 转移或弃去上清时，注意不要吸取磁珠，否则将影响文库质量。

5.2.5 产物洗脱前，磁珠应充分干燥，但不可使磁珠干燥开裂，磁珠干燥不充分或者过度干燥都将影响建库效果。

5.3 文库扩增

使用本试剂盒进行文库构建必须进行文库扩增步骤。因为转座反应产物并非完整的双链 DNA 文库，必须通过 PCR 反应生成完整的 DNA 文库。

5.4 其他注意事项

5.4.1 本试剂盒仅供科研使用，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作。

5.4.2 避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。

5.4.3 反应液配置时应尽量避免产生气泡，并注意防止漏液。

5.4.4 PCR 产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，从而影响实验结果的准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。

5.4.5 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。

5.4.6 加样所用的移液器需要定期检测，保证加样的准确性。

六、操作步骤

6.1 DNA 片段化

6.1.1 将 5×转座酶缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.1.2 将转座酶-50 ng 置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.1.3 在置于冰上的 PCR 管中配置表 1 中的体系：

表 1 DNA 片段化体系

试剂	体积
50 ng DNA	X μ L
5×转座酶缓冲液	6 μ L
转座酶-50 ng	5 μ L
ddH ₂ O	UP to 30 μ L
Total	30 μ L

6.1.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.1.5 立即将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 2 程序(热盖温度 105℃)：

表 2 DNA 片段化程序

温度	时间
55℃	15 min
4℃	∞

6.1.6 反应结束，立即取出 PCR 管，加入 3 μ L 终止缓冲液，涡旋混匀或使用移液枪上下吹打混匀，室温孵育 10 min。

6.2 片段化产物纯化

6.2.1 将 DNA 纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

6.2.2 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 纯化磁珠混匀。

6.2.3 向片段化产物中加入 33 μ L(1×) DNA 纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

6.2.4 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.2.5 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6.2.6 重复步骤 6.2.5。

6.2.7 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μ L 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

6.2.8 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 23 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

6.2.9 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 21 μL 上清至干净的 PCR 管中。

6.3 文库扩增

6.3.1 将 illumina 平台转座酶法扩增引物(含 index)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.2 将 2 $\times$ 转座扩增混合液置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.3 将纯化后的片段化产物置于冰上，配置表 3 中的体系：

表 3 文库扩增体系

试剂	体积
片段化产物	21 μL
2 $\times$ 转座扩增混合液	25 μL
N5XX Primer	2 μL
N7XX Primer	2 μL
Total	50 μL

6.3.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.3.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 4 程序(热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$)：

表 4 文库扩增程序

温度	时间	循环
72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	1 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec	5-10
62 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	1

6.4 文库扩增产物纯化

如对文库长度分布无特殊要求，可直接使用 1 $\times$ 磁珠纯化扩增产物，而不进行片段分选。如需进行片段分选，为防止接头或大片段残留，可进行两次片段分选，或先使用 1 $\times$ 磁珠纯化扩增产物后再进行分选。

6.4.1 文库纯化

- 1) 将 DNA 纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。
- 2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 纯化磁珠混匀。
- 3) 向 PCR 产物中加入 50 μL (1 $\times$) DNA 纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵

育 5 min。

- 4) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。
- 5) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5。
- 7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 42 μL ddH₂O 或者 TE Buffer，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。
- 9) 将 PCR 管短暂离心并放置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 40 μL 上清至干净的管中，产物保存于-20℃，避免反复冻融。

6.4.2 文库分选(先纯化再分选)

- 1) 将 DNA 纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。
- 2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 纯化磁珠混匀。
- 3) 向连接产物中加入 50 μL (1 $\times$) DNA 纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。
- 4) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。
- 5) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5。
- 7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 105 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。
- 9) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 100 μL 上清至干净的 PCR 管中。
- 10) 向 100 μL 上清中加入 55 μL (0.55 $\times$) DNA 纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。
- 11) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 150 μL 上清到干净的 PCR 管中，注意不要吸到磁珠。
- 12) 向转移后的上清中加入 15 μL (0.15 $\times$) DNA 纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。
- 13) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

14) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

15) 重复步骤 14。

16) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

17) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 42 μL ddH₂O 或者 TE Buffer，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

18) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 40 μL 上清至干净的管中，产物保存于-20℃，避免反复冻融。

6.5 文库质检

6.5.1 使用 Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品对文库进行定量。

6.5.2 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他片段分析仪对文库进行片段分析。

七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。