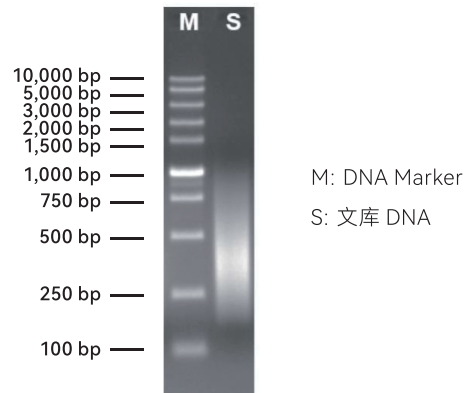




文库片段分布

制备好的 DNA文库可用琼脂糖凝胶电泳或 Agilent 2100 Bioanalyzer检测 DNA文库中的片段长度分布范围。



版本号：202505V01

NGS TPH DNA Library Prep Set for Illumina (50 ng)

转座酶法二代测序快速 DNA建库试剂盒 (Illumina, 50 ng)

Cat. No. CW2845

产品简介

该试剂盒是针对Illumina高通量测序平台定向开发的专用试剂盒，提供了基因组DNA文库构建所需要的酶预混体系及反应缓冲液，包含除 PCR引物外的所有成分。和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，可以将 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，扩大了序列的覆盖区域，可高效制备用于 Illumina二代测序平台的 DNA文库。该试剂盒适用于起始模板 DNA投入量为 50 ng。试剂盒中所有试剂都经过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。

保存条件

-20±5℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW2845S 24 rxns	CW2845M 96 rxns
TPS V50	120 µL	480 µL
5×FA Reaction Buffer	240 µL	960 µL
TS Buffer	120 µL	480 µL
2×Ultra HiFi PCR Mix	600 µL	2×1.2 mL

* 本试剂盒适用于基因组 DNA文库构建, 起始模板 DNA投入量为 50 ng。本公司还有针对 5 ng (CW2846) 和 1 ng (CW2847) 的基因组 DNA起始的转座酶法文库构建试剂盒, 为得到质量较高的文库, 不同的 DNA起始量建议使用不同的试剂盒。

产品特点

- 1. DNA片段化、接头连接一步完成。
- 2. 超保真扩增, 最大程度上降低了扩增偏好性。

自备仪器试剂盒耗材

- 1. 磁力架: 建议使用 DynaMag™-2 (Cat.No. 12321D)。
- 2. DNA纯化回收试剂盒: 建议使用康为磁珠法 DNA纯化回收试剂盒 (Cat.No.CW3171) 。
- 3. 文库PCR引物试剂盒: 建议使用康为转座酶法二代测序多样本引物试剂盒 (Cat.No.CW2958/CW2959/CW2960/CW2961/CW2962/CW2963)。
- 4. 无水乙醇, 去离子水 (pH 在 7.0-8.0之间) 。
- 5. 反应管: 建议使用低吸附的 PCR管与 1.5 mL离心管。
枪头: 建议使用高质量过滤枪头防止试剂盒、文库样本污染。

文库 DNA 片段纯化

建议使用康为世纪磁珠法 DNA纯化回收试剂盒 (CMPure, CW3171) 。

- 1. CMPure使用前应震荡混匀后置于室温平衡 30 min。
- 2. PCR产物中加入 50 µL 平衡至室温的磁珠, 涡旋震荡 5 秒钟后, 室温静置 5 分钟。
- 3. 短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需3-5分钟), 小心吸取上清并弃除, 期间避免接触已结合目标 DNA的磁珠。
注意: 不要弃除磁珠。
- 4. 继续保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入 200 µL 新鲜配置的80%乙醇, 室温放置 30 秒, 小心弃除上清。
注意: 加乙醇时, 液体不可直接吹打到磁珠上。
- 5. 重复步骤 4。
- 6. 保持离心管固定于磁力架上, 室温静置干燥至磁珠表面微裂, 加入 25 µL ddH₂O回溶。
注意: 不要使磁珠过度干燥, 以免影响洗脱效率。
- 7. 将离心管从磁力架上取下, 涡旋振荡使磁珠完全重悬, 室温静置 5 分钟。短暂离心, 将离心管放于磁力架上直至溶液澄清, 将上清溶液转移至一个新的离心管中。

文库质量检测

文库浓度测定

为了得到高质量的测序结果, 需要对 DNA文库进行精确定量, 首先推荐使用Real-time PCR方法对 DNA文库进行绝对定量。此外, 还可使用荧光染料法, 如Qubit法或荧光染料picogreen法, 此处请勿使用基于吸光度测量的定量方法。最终可使用以下近似公式换算 DNA文库的摩尔浓度。

文库平均总长度	近似转换公式
300 bp	1 ng/µL=5.0 nM
400 bp	1 ng/µL=3.8 nM
500 bp	1 ng/µL=3.0 nM

文库 DNA片段选择性回收

建议使用康为世纪磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒 (CMPure, CW3171) 进行 DNA 片段选择性回收。需要不同大小 DNA 片段时, 磁珠使用量不同, 具体磁珠使用量参照附表 (若使用其他品牌磁珠, 需自行摸索最佳磁珠用量)。

注意: 扩增产物也可使用胶回收试剂盒进行片段长度分选和纯化。如对文库长度分布范围无特殊要求, 扩增产物也可不进行 DNA 片段选择性回收, 参考说明书中下述文库 DNA 片段纯化步骤进行纯化。

- 1. CMPure使用前应震荡混匀后置于室温平衡 30 min。
- 2. PCR产物转移至 1.5 mL离心管中, 补水至 100 μL加入若干体积平衡至室温的磁珠, 涡旋震荡 5秒钟后, 室温静置 5 分钟。
- 3. 短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清分离, 直至溶液澄清, 小心吸取上清转移至一新的 1.5 mL 离心管中。
注意: 不要弃除上清。
- 4. 在上清中加入若干体积的磁珠, 涡旋震荡 5 秒钟后, 室温静置 5 分钟。
- 5. 短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清分离, 直至溶液澄清, 小心吸取上清并弃除, 期间避免接触已结合目标 DNA 的磁珠。
注意: 不要弃除磁珠。
- 6. 继续保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入 200 μL新鲜配置的80%乙醇, 室温放置 30秒, 小心弃除上清。
注意: 加乙醇时, 液体不可直接吹打到磁珠上。
- 7. 重复步骤 6一次。
- 8. 保持离心管固定于磁力架上, 室温静置干燥至磁珠表面微裂, 加入 20 μL ddH₂O回溶。
注意: 不要使磁珠过度干燥, 以免影响洗脱效率。
- 9. 将离心管从磁力架上取下, 涡旋振荡使磁珠完全重悬, 室温静置 5 分钟。短暂离心, 将离心管放于磁力架上直至溶液澄清, 将上清溶液转移至一个新的离心管中。

附表: 不同片段选择回收时磁珠建议用量

DNA 文库大小	插入片段	230 bp	330 bp	430 bp
	(插入片段+adaptor+primer)	350 bp	450 bp	550 bp
磁珠用量	第一次选择	65 μL	55 μL	45 μL
	第二次选择	50 μL	30 μL	30 μL

实验前准备及重要注意事项

- 1. 避免试剂的反复冻融。
- 2. PCR产物因操作不当极易产生污染, 导致实验结果不准确, 建议将PCR反应体系配制区与PCR产物纯化区隔离, 并使用专门的移液器, 定时对各实验区域进行清洁。
- 3. 磁珠纯化: 磁珠使用前应平衡至室温, 磁珠的所有操作都应在室温下进行, 80%乙醇应现配现用, 磁珠漂洗后干燥至表面无液体反光且呈磨砂状, 磁珠干燥不足会有乙醇残留影响后续实验, 磁珠过度干燥影响 DNA回收效率。
- 4. 该试剂盒适合基因组 DNA 文库构建, 如 DNA样品为 PCR 产物, 应保证其长度 >500 bp, 由于转座酶无法作用于 DNA 末端, 推荐在制备 PCR 产物时将 PCR 产物两末端各延长 50-100 bp, 以避免出现末端测序覆盖度低的情况。

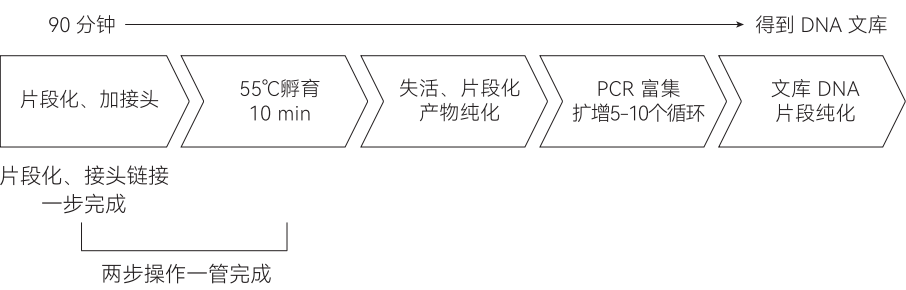
样品准备

DNA纯度要求: A260/A280 = 1.8-2.0。

样本 DNA: 溶解于超纯水中。

DNA定量: DNA投入量过多、过少都会对文库质量有影响, 建议先使用 Nano检测基因组DNA纯度再用 Qubit对基因组进行浓度检测 (请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法进行模板定量)。

DNA 建库流程示意图



操作步骤

DNA片段化、接头连接反应

1. 向 200 μL PCR管中加入以下试剂:

组分	体积
50 ng DNA	X μL
TPS V50	5 μL (可根据用量调整片段大小)
5×FA Reaction Buffer	10 μL
ddH ₂ O	To 50 μL

2. 用移液器轻轻吹打混匀, 短暂离心,使所有组分收集到管底。

3. 将上述 PCR管置于 PCR仪中, 热盖打开, 反应程序如下:

温度	时间
105℃	热盖
55℃	10 min
10℃	Hold

失活反应

DNA在进行片段化反应完成后, 酶仍处于较高的活性状态, 应立即将其从 PCR仪上取下, 加入反应终止 Buffer进行终止反应, 以防止 DNA过度片段化导致的文库片段变小。

1. 向盛有片段化产物的 PCR管中加入 5 μL TS Buffer。

2. 用移液器轻轻吹打混匀, 短暂离心,使所有组分收集到管底。

3. 置于室温孵育 5 min, 如室内温度过低, 可置于 PCR仪上进行反应, 25℃, 关闭热盖。

片段化产物纯化

建议使用康为世纪磁珠法 DNA纯化回收试剂盒 (CMPure, CW3171)。

1. CMPure使用前应震荡混匀后置于室温平衡 30 min。

2. 向片段化产物中加入 55 μL 平衡至室温的磁珠, 涡旋震荡 5 秒钟后, 室温静置 5 分钟。

3. 置短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需 3-5分钟), 小心吸取上清并弃除, 期间避免接触已结合目标 DNA的磁珠。

注意: 不要弃除磁珠。

4. 继续保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入 200 μL 新鲜配置的80%乙醇, 室温放置 30 秒, 小心弃除上清。

注意: 加乙醇时, 液体不可直接吹打到磁珠上。

5. 重复步骤 4。

6. 保持离心管固定于磁力架上, 室温静置干燥至磁珠表面微裂, 加入 25 μL ddH₂O回溶。

注意: 不要使磁珠过度干燥, 以免影响洗脱效率。

7. 离心管从磁力架上取下, 涡旋振荡使磁珠完全重悬, 室温静置 5 分钟。短暂离心, 将离心管放于磁力架上直至溶液澄清, 转移 23 μL 上清至一个新的 200 μL PCR管中。

PCR 扩增

1. 向 200 μL PCR管中加入以下试剂:

组分	体积
片段化产物	23 μL
Primer N5	1 μL
Primer N7	1 μL
2×Ultra HiFi PCR Mix	25 μL

2. 用移液器轻轻吹打混匀, 短暂离心,使所有组分收集到管底。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 热盖打开, 反应程序如下:

步骤	温度	时间	
延伸	72℃	3 min	
预变性	98℃	30 s	
变性	98℃	15 s	} 5-10个循环
退火	60℃	30 s	
延伸	72℃	3 min	
终延伸	72℃	5 min	
保存	4℃	Hold	