



NGS TPL DNA Library Prep Set for Illumina (1 ng) 转座酶法二代测序快速 DNA 建库试剂盒 (Illumina, 1 ng)

Cat. No. CW2847

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 1 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	CW2847S 24 rxns	CW2847M 96 rxns
TPS V1	120 μL	480 μL
5×FA Reaction Buffer	96 μL	384 μL
TS Buffer	72 μL	288 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 1 ng。本公司还有针对 50 ng (CW2845) 和 5 ng (CW2846) 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.CW2508)。
- 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

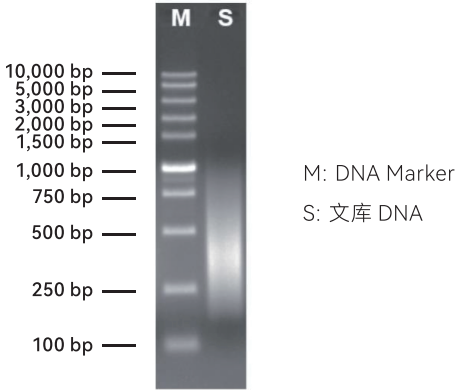
为了得到高质量的测序结果, 需要对 DNA 文库进行精确定量, 首先推荐使用 Real-time PCR 方法对 DNA 文库进行绝对定量。此外, 还可使用荧光染料法, 如 Qubit 法或荧光染料 picogreen 法, 此处请勿使用基于吸光度测量的定量方法。最终可使用以下近似公式换算 DNA 文库的摩尔浓度。

附表: 不同片段选择回收时磁珠建议用量

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。



- 重复步骤 6 一次。
- 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。
- 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

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, CW2508)。

- CMPure 使用前应震荡混匀后置于室温平衡 30 min。
- 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。
- 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。
- 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。
- 重复步骤 4。
- 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。
- 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。

实验前准备及重要注意事项

- 避免试剂的反复冻融。
- 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。
- 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。
- 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。

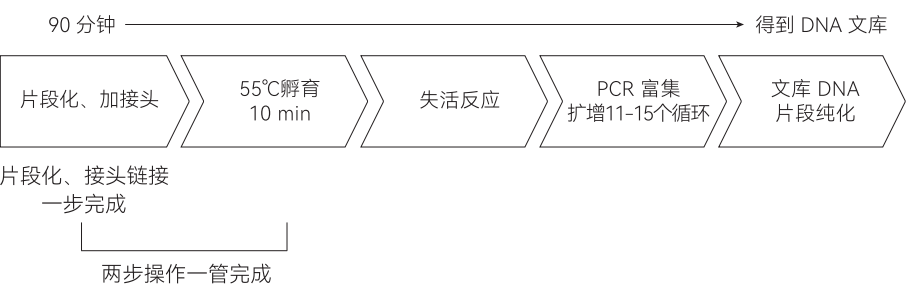
样品准备

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
1 ng DNA	X μL
TPS V1	5 μL
5×FA Reaction Buffer	4 μL
ddH ₂ O	To 20 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 3 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。

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	} 11-15个循环
退火	60℃	30 s	
延伸	72℃	3 min	
终延伸	72℃	5 min	
保存	4℃	Hold	

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, CW2508) 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。