

版本号: NG170329

TIANSeq DirectFast DNA Library Prep 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 Enhance	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
10 × P5/P7 Primers Mix	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-15~-25℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

TIANSeq DirectFast 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。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-Indexed Adapter (Illumina® Platforms) (NG214-01/02/03)。
2. BECKMAN Agencourt AMPure XP磁珠。

产品特点

1. DNA片段化过程和PCR富集过程不存在碱基偏好性，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融化后用手指后轻弹混匀, 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 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 Fragmentation-End Repair-dA-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%，以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6~8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%，以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6~8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，请使用AMPure® XP 磁珠对DNA进行纯化。纯化步骤如下：

(1) 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。

(2) 加入90 μl (1.8倍体积) 完全涡旋混匀的Agencourt AMPure XP磁珠至DNA溶液中，吸打混匀。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倍体积完全涡旋混匀的Agencourt AMPure XP磁珠。

(3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上2~4 min收集磁珠，小心去除上清液。

(4) 用200 μl 80%乙醇洗涤磁珠，将反应管置于磁力架上收集磁珠，弃去上清。重复此洗涤步骤一次。

(5) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置10 min或至磁珠干燥为止。

(6) 加入45 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 使磁珠完全悬浮后, 置磁力架上2 min。待磁珠贴壁后小心转移42.5 μl 上清至新的离心管。

(7) 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

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, 轻柔吸打混匀后置冰上。

注意: 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-Indexed Adapter (Illumina® Platforms) (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10:1至200:1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, 置于20°C中反应15 min。

注意: 此步骤如果使用PCR仪进行反应, 请不要启动热盖。

4. (无需进行片段分选) 向反应产物中加入0.8 \times 体积(80 μl) Agencourt AMPure XP磁珠进行纯化, 具体步骤如下:

(1) 将AMPure®XP磁珠置于室温平衡20 min。

(2) 涡旋使磁珠充分悬浮, 加入80 μl Agencourt AMPure XP磁珠至步骤3溶液中, 充分吸打混匀。

(3) 室温孵育5 min, 将反应管置于磁力架上1~2 min。待磁珠完全贴壁后, 用移液器吸弃上清。

(4) 向反应管内加入200 μl 80%乙醇, 轻轻震荡混匀, 洗涤磁珠, 并用磁力架回收磁珠, 弃上清。

(5) 重复洗涤步骤(4)一次。

(6) 将含有磁珠的反应管置磁力架上，开盖室温放置5~10 min，至晾干。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

(7) 加入25.5 μ l 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 至离心管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮。将反应管放置于磁力架上1~2 min，只使磁珠完全贴壁后，转移约23.5 μ l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 μ l的10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 洗脱DNA，并转移10 μ l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 $^{\circ}$ C保存。

5. (进行片段分选) 请参考表2中两步筛选过程中的磁珠添加比例进行操作。

表2 片段筛选推荐磁珠用量

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
50-100 bp	150-200 bp	0.8 \times	0.1 \times
80-150 bp	180-250 bp	0.7 \times	0.1 \times
100-200 bp	200-300 bp	0.6 \times	0.1 \times
200-350 bp	300-450 bp	0.5 \times	0.1 \times
300-550 bp	400-650 bp	0.4 \times	0.1 \times
500-750 bp	600-850 bp	0.3 \times	0.1 \times

以初始片段大小为200-350 bp的情况为例，使用Agencourt AMPure XP磁珠进行纯化，具体步骤如下：

- (1) 将AMPure[®]XP磁珠置于室温平衡20 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入50 μ l Agencourt AMPure XP磁珠至步骤3溶液中（100 μ l的连接产物），充分吸打混匀。
- (3) 室温孵育5 min，将反应管置于磁力架上1~2 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸取上清并转移至另一1.5 ml EP管中。
- (4) 向上清中加入0.1倍磁珠（95 μ l \times 0.1 = 9.5 μ l），用枪头吹打混匀；
- (5) 室温孵育5 min，将反应管置于磁力架上1~2 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器吸弃上清。
- (6) 向反应管内加入200 μ l 80%乙醇，轻轻震荡混匀，洗涤磁珠，并用磁力架回收磁珠，弃上清。

(7) 将含有磁珠的反应管置磁力架上，开盖室温放置5~10 min，至晾干。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

(8) 加入25.5 μ l 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 至离心管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮。将反应管放置于磁力架上1~2 min，只使磁珠完全贴壁后，转移约23.5 μ l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 \times HiFi PCR MasterMix和10 \times P5/P7 Primers Mix置于冰上融化，短暂混匀。

2. 按下表设置PCR仪反应程序，开启热盖，温度设置于105 $^{\circ}$ C。

步骤	温度	时间	循环数
1	98 $^{\circ}$ C	2 min	1
2	98 $^{\circ}$ C	20 sec	6-12*
3	60 $^{\circ}$ C	30 sec	
4	72 $^{\circ}$ C	30 sec	
5	72 $^{\circ}$ C	1 min	1
6	4 $^{\circ}$ C	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筛选步骤(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 (μ l)
2 \times HiFi PCR MasterMix	25
10 \times P5/P7 Primers Mix	5
总体积	30

4. 将纯化后的带有adapter的文库连接产物20 μ l转移至PCR管中，加入30 μ l步骤3中配制好的PCR反应液，轻柔吸打6~8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）Agencourt AMPure XP磁珠进行纯化。
 - (1) 将AMPure®XP磁珠置于室温平衡20 min。
 - (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入80 μl Agencourt AMPure XP磁珠至步骤3溶液中，充分吸打混匀。
 - (3) 室温孵育5 min，将反应管置于磁力架上1~2 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器吸弃上清。
 - (4) 向反应管内加入200 μl 80%乙醇，轻轻震荡混匀，洗涤磁珠，并用磁力架回收磁珠，弃上清。
 - (5) 重复洗涤步骤(4)一次。将含有磁珠的反应管置磁力架上，开盖室温晾干10 min至干燥为止。

注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。

 - (6) 加入32.5 μl 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 至离心管内并使用移液器吸打使磁珠充分悬浮。使用磁力架使磁珠充分贴壁后，转移30 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℃。



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