

TransNGS[®] Fragmentase DNA Library Prep Kit for Illumina[®]

酶解片段化法DNA文库构建试剂盒 适配Illumina平台

使用前请仔细阅读说明书





品质高于一切
精品服务客户

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KP231

版本号: Version 4.0

保存: -18°C及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS® Fragmentase DNA Library Prep Kit for Illumina®针对 Illumina®高通量测序平台开发, 适用于将起始量为 1 ng - 1 µg 的 dsDNA 高效快速地构建成DNA文库。本产品一步完成DNA片段化、末端修复和加A反应, 产物无需纯化, 可直接用于接头连接; 由于利用片段化酶将基因组片段化, 仅需调整片段化时间即可得到不同长度插入片段的文库, 简化了建库流程, 缩短了建库时间, 适用于不同来源和不同输入量的DNA 的文库构建。

特点

- 适用样本类型广泛。
- 高文库转化率。

适用范围

- 全基因组测序。
- 靶基因测序。
- 外显子测序/其它靶向捕获测序。
- 宏基因组测序。

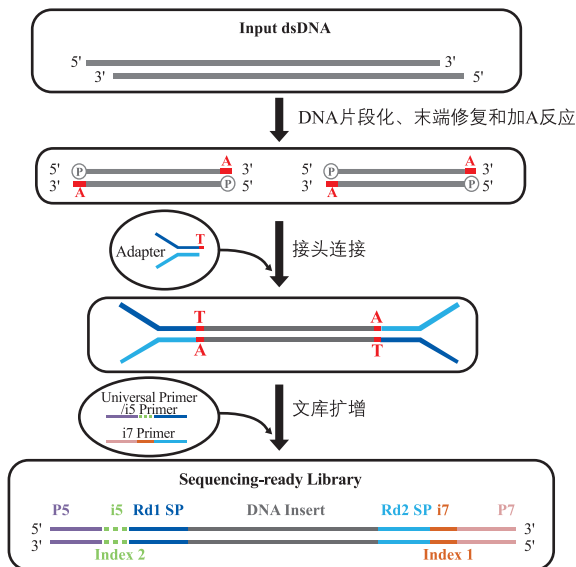
产品组分

Component	KP231-01 (12 rxns)	KP231-02 (96 rxns)
10×Fragmentation Buffer II	60 µl	480 µl
Fragmentation Enzyme Mix II	120 µl	960 µl
TransNGS® Adapter for Illumina®* (16 µM)	60 µl	480 µl
Adapter Dilution Buffer	600 µl	5 ml
Adapter-ligation Buffer for Illumina® III	480 µl	4×960 µl
Adapter-ligation Enzyme V	60 µl	480 µl
TransNGS® Library Amplification SuperMix (2×)	300 µl	4×600 µl
TransNGS® Universal Primer Mix for Illumina®*	60 µl	480 µl
Library Elution Buffer	2 ml	4×4 ml
Nuclease-free Water	1 ml	5 ml

*本产品提供的TransNGS® Adapter for Illumina®和TransNGS® Universal Primer Mix for Illumina®均不含Index, 切勿同时使用, 需分别与含Index的Primer (如KI241/KI251) 或含Index 的Adapter (如KI341) 搭配使用。



文库构建原理示意图及流程图



文库构建原理示意图
(i5位置以虚线表示是指有些文库没有此Index。)



虚线部分不包含在本试剂盒流程内。

★ 代表可进行片段分选的位置

文库构建流程图



文库结构

本试剂盒使用TransNGS® Index/UDI Primers Kit for Illumina® (目录号: KI241/KI251), 或TransNGS® UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI341), 所得文库结构如下:

5'-AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACAC[i5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-XXXXXXX-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[i7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

i5: Index 2, 8 bases;

i7: Index 1, 8 bases;

-XXXXXXX-: 插入序列。

起始样本要求

起始样本为1 ng - 1 µg 溶于Nuclease-free Water 或10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 的基因组DNA, 请使用OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在1.8 - 2.0之间的高纯度样本。DNA 浓度测定需使用基于特异识别dsDNA的荧光染料法, 如Qubit®或荧光染料PicoGreen®。

文库构建

自备试剂: 新鲜配制的80%乙醇, MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401), 含有Index的引物TransNGS® Index/UDI Primers Kit for Illumina® (目录号: KI241/KI251)或含有Index的接头TransNGS® UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI341)。

1、DNA片段化、末端修复和加A反应

(1) 将无菌PCR管置于冰上, 按下表加入:

Component	Volume
dsDNA	Variable
10×Fragmentation Buffer II	5 µl
Fragmentation Enzyme Mix II	10 µl
Nuclease-free Water	to 50 µl
Total Volume	50 µl

(2) 移液枪吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体至管底。

(3) 将反应管置于PCR仪中, 进行以下孵育步骤(盖子温度 ≥ 90°C)

4°C 1 min

37°C 15 min (插入片段300 bp; 其他长度请参考片段化时间表)

72°C 20 min

4°C Hold

插入片段大小	片段化时间	优化范围
450 - 550 bp	5 min	3 - 7 min
400 bp	10 min	7 - 12 min
300 bp	15 min	12 - 18 min
200 bp	20 min	18 - 25 min
150 bp	30 min	25 - 35 min

2、接头连接

(1) 冰上溶化短接头TransNGS® Adapter for Illumina®或长接头TransNGS® UDI Indexed Adapter for Illumina® (目录号: KI341), 并参考下表使用Adapter Dilution Buffer稀释Adapter至合适浓度。

样本投入量	Adapter稀释倍数	稀释后Adapter浓度
100 ng - 1 µg	不稀释	16 µM
25 ng - 100 ng	稀释2倍	8 µM
5 ng - 25 ng	稀释16倍	1 µM
100 pg - 5 ng	稀释160倍	0.1 µM

*请根据需求选择使用Adapter。Adapter的质量和用量会直接影响建库效率和质量, 建议使用本公司的Adapter产品。提高Adapter加入量可一定程度上提高文库产量, 但是过高的加入量会导致Adapter残留, 形成二聚体; Adapter加入量不足则会降低接头连接效率从而影响文库产量。



(2) 将上步反应结束的PCR管置于冰上，按下表加入：

Component	Volume
上一步产物	50 μ l
合适浓度的Adapter	5 μ l
Adapter-ligation Buffer for Illumina® III	40 μ l
Adapter-ligation Enzyme V	5 μ l
Total Volume	100 μ l

*切勿将Adapter与Adapter-ligation Buffer for Illumina® III和Adapter-ligation Enzyme V提前混匀。

(3) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体至管底。

(4) 将反应管置于PCR仪中，20°C孵育15分钟(盖子不加热)，连接反应结束后请立即按照以下纯化步骤纯化。

3、接头连接产物纯化

如Adapter使用的是TransNGS® Adapter for Illumina®, 推荐使用0.8×MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)进行磁珠纯化；如Adapter使用的是TransNGS® UDI Indexed Adapter for Illumina® (目录号: KI341), 推荐使用0.6×MagicPure® Size Selection DNA Beads进行磁珠纯化。

*如果样本投入量较低，可在文库扩增后进行分选或不进行纯化直接进行分选。分选步骤参见步骤4. 接头连接产物分选，并依据附录表1 对磁珠比例进行调整。

磁珠纯化的具体操作如下：

(1) 从2 - 8°C取出磁珠，静置30分钟平衡至室温。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取60 μ l 磁珠(0.6×)或80 μ l磁珠(0.8×)加入上步连接产物中。

(3) 使用移液枪充分吹吸混匀，室温静置5分钟。

(4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

*管壁上有如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上；弃上清时切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

(5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 μ l 新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(6) 重复步骤(5) 一次。

(7) 保持反应管在磁力架上，室温静置2 - 5分钟晾干磁珠。

*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(8) 将反应管移出磁力架，加入22 μ l Library Elution Buffer。使用移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

(9) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

*管壁上有如有液体可点甩离心后置于磁力架上；室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(10) 小心吸取20 μ l 洗脱液转移到干净PCR 管中，进行下步文库扩增反应，或于-20°C保存。

*低浓度DNA不易稳定保存，如样本投入量 < 50 ng，建议立即进行文库扩增，不建议-20°C保存。如按此说明继续进行分选步骤，建议采用100 μ l洗脱体系；如样本投入量低，需要在文库扩增后进行分选，则建议采用上述20 μ l洗脱体系。



4、接头连接产物分选(可选)

如样本投入量 ≥ 50 ng，建议在接头连接后进行分选；如样本投入量 < 50 ng，建议在文库扩增后进行分选，以减少DNA损失。按照下列步骤和比例进行分选，最终文库主峰位置在450 bp左右。

磁珠分选的具体操作如下：

- (1) 从2 - 8℃取出磁珠，静置30分钟平衡至室温。
- (2) 向待分选产物中加入Nuclease-free Water至终体积100 μ l。
- (3) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取65 μ l 磁珠(0.65 $\times$) 加入上述待分选产物中。
- (4) 使用移液枪充分吹吸混匀，室温静置5分钟。
- (5) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，吸取160 - 162 μ l上清至一新管中。注意不要吸入磁珠。
- (6) 向(5)上清中加入10 μ l磁珠(0.10 $\times$)，使用移液枪充分吹吸混匀，室温静置5分钟。
- (7) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。
*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上；务必使磁珠全部吸附在管壁上；弃上清时切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。
- (8) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 μ l 新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。
*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。
- (9) 重复步骤(8)一次。
- (10) 保持反应管在磁力架上，室温放置2 - 5分钟晾干磁珠。
*切勿加热晾干，否则会影响最终产量。
- (11) 将反应管移出磁力架，加入22 μ l Library Elution Buffer。用移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。
- (12) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。
*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上；室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。
- (13) 小心吸取20 μ l 洗脱液并转移到干净PCR管中，进行下步文库扩增反应，或于-20℃保存。

5、文库扩增

- (1) 将PCR 管置于冰上，按下表加入：

Component	For TransNGS [®] Adapter for Illumina [®]	For TransNGS [®] UDI Indexed Adapter for Illumina [®]
上步纯化产物	20 μ l	20 μ l
TransNGS [®] Library Amplification SuperMix (2 $\times$)	25 μ l	25 μ l
TransNGS [®] Universal Primer Mix for Illumina [®]	-	5 μ l
i5 Primer	2.5 μ l	-
i7 Primer	2.5 μ l	-
Total Volume	50 μ l	50 μ l

- (2) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体至管底。
- (3) PCR 仪中进行以下扩增程序。

98℃	3 min	} 2 - 14 cycles*
98℃	30 sec	
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	3 min	
4℃	Hold	

*针对不同的样本投入量，推荐的扩增循环数参照附录表2；若在扩增前进行了分选，建议增加1 - 2个扩增循环数。



6、文库扩增产物纯化

推荐使用0.9×*MagicPure*® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)进行产物纯化, 可以根据需要增大(获得含更短插入片段的文库)或者减小磁珠比例(减少引物残留)。

磁珠纯化的具体操作如下:

- (1) 从2 - 8°C取出磁珠, 静置30分钟平衡至室温。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取45 μ l 磁珠(0.9×) 加入上步扩增产物中。
- (3) 使用移液枪充分吹吸混匀, 室温静置5分钟。
- (4) 将反应管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清(约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上, 弃上清。
*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上; 弃上清时切勿吸到磁珠, 否则会影响最终产量。
- (5) 保持反应管在磁力架上, 向管中加入200 μ l 新鲜配制的80%乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置30秒, 弃上清。
*一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。
- (6) 重复步骤(5) 一次。
- (7) 保持反应管在磁力架上, 室温静置2 - 5分钟晾干磁珠。
*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜; 切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。
- (8) 将反应管移出磁力架, 加入22 μ l Library Elution Buffer。使用移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠, 室温静置2分钟。
- (9) 将反应管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清(约2分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。
*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上; 室温静置时间可延长至5分钟, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。
- (10) 小心吸取20 μ l 洗脱液并转移到干净离心管中, 产物可于-20°C保存。

附录

表1 使用*MagicPure*® Size Selection DNA Beads进行片段分选参照表

文库平均长度(bp)		~340	~440	~690
文库插入片段长度(bp)		~200	~300	~550
接头连接产物纯化后进行分选	第一次体积比(DNA Beads : DNA)	0.9×	0.65×	0.56×
	第二次体积比(DNA Beads : DNA)	0.2×	0.1×	0.1×
接头连接产物不纯化直接分选	第一次体积比(DNA Beads : DNA)	0.35×	0.25×	0.15×
	第二次体积比(DNA Beads : DNA)	0.15×	0.15×	0.15×
文库扩增产物纯化后进行分选	第一次体积比(DNA Beads : DNA)	0.85×	0.65×	0.57×
	第二次体积比(DNA Beads : DNA)	0.15×	0.15×	0.1×

*片段分选只需在两处可选位置的其中之一处进行, 即接头连接后或文库扩增后。为了片段分选的精确性, 建议片段分选前的样本体积为精确的100 μ l。两处可选位置使用的磁珠比例不同是由插入片段两端的序列长度不同引起的。由于不同样本片段长度分布的差异, 即使使用相同的条件进行分选, 所得产物片段长度也会有所差异。



表2 不同样本投入量产出100 ng/1 μg文库推荐扩增循环数

样本投入量	推荐扩增循环数*	
	100 ng	1 μg
100 pg	13 - 15	15 - 17
1 ng	9 - 11	11 - 13
10 ng	5 - 7	7 - 9
50 ng	4 - 5	6 - 8
100 ng	2 - 4	4 - 6
250 ng	2**	2 - 4**
500 ng	2**	2 - 3**
1 μg	2**	2**

* 本表中推荐的扩增循环数均为使用高质量来源于人基因组的dsDNA 进行文库构建的经验值。如DNA 纯度较差、DNA 损伤严重等情况，请适当增加循环数。

** TransNGS® Adapter for Illumina® 为非完整长度接头，需至少进行2 - 3个扩增循环以补齐下游测序所需的Adapter序列。

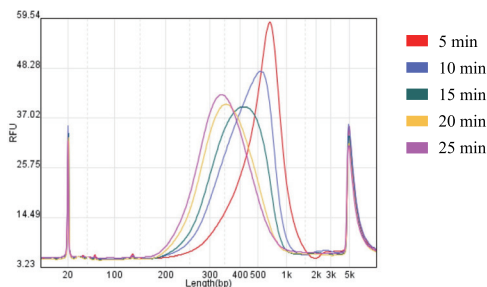


图1 不同酶切时间下的文库峰型

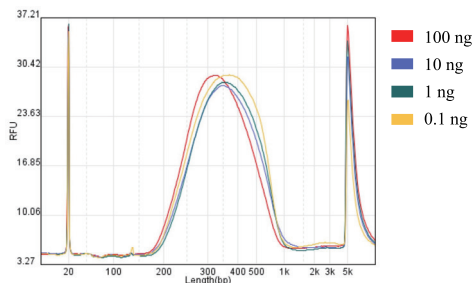


图2 不同样本投入量下的文库峰型

注意事项

- 为获得更优质的测序数据，推荐在接头连接后或文库扩增后进行片段分选。
- 反应液的混匀应避免剧烈震荡，以防酶活降低，导致文库构建效率下降。
- 如使用磁珠进行纯化或片段分选，在洗脱时应充分混匀磁珠。充分混匀的磁珠应悬浮均匀，无肉眼可见的颗粒物，且静置2分钟后无沉降。
- 浓度小于1 ng/μl的样本建议存放于低吸附离心管中，或存放于含1×TransNGS® Library Dilution Buffer(目录号：KB101) 的普通离心管中，以免普通离心管壁对核酸样本的吸附降低有效样本浓度。
- 文库扩增循环数越多，测序数据的重复率越高，即有效数据越少。因此，建议在满足下游应用的基础上，尽量使用较少的扩增循环数。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号：V4-202503

服务电话：+86-10-57815020

服务邮箱：complaints@transgen.com

