



品质高于一切
精品服务客户

*Trans*NGS[®] Fragmentase DNA Library Prep Kit for MGI[®]

使用前请仔细阅读说明书



Website www.transgen.com
E-mail trans@transgen.com

Customer Service +86-400-898-0321
Phone +86-10-57815030





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: KP241

版本号: Version 3.0

保存: -20℃保存一年。

产品说明

TransNGS[®] Fragmentase DNA Library Prep Kit for MGI[®] 针对 MGI[®] 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

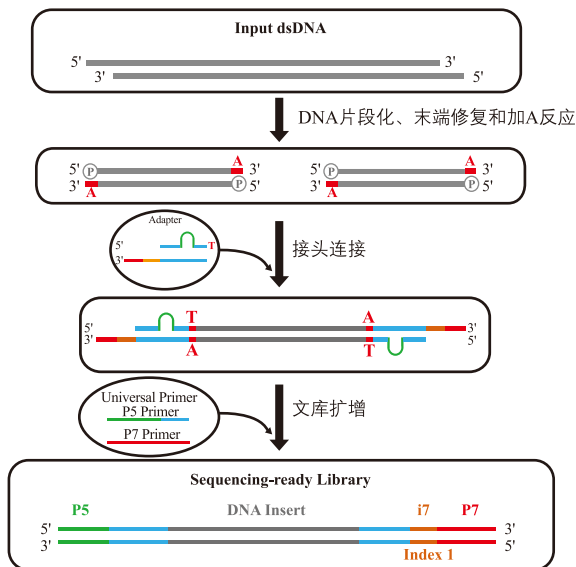
- 全基因组测序。
- 靶基因测序。
- 外显子测序 / 其它靶向捕获测序。
- 宏基因组测序。

产品组分

Component	KP241-01 (12 rxns)	KP241-02 (96 rxns)
10×Fragmentation Buffer II	60 μl	480 μl
Fragmentation Enzyme Mix II	120 μl	960 μl
Adapter Dilution Buffer	600 μl	5 ml
Adapter-ligation Buffer for MGI [®] II	480 μl	4×960 μl
Adapter-ligation Enzyme IV	60 μl	480 μl
<i>TransNGS</i> [®] Library Amplification SuperMix (2×)	300 μl	4×600 μl
<i>TransNGS</i> [®] Universal Primer Mix for MGI [®]	60 μl	480 μl
Library Elution Buffer	2 ml	4×4 ml
Nuclease-free Water	1 ml	5 ml



文库构建原理示意图及流程图



文库构建原理示意图



文库构建流程图



文库结构

本试剂盒使用 *TransNGS*[®] Indexed Adapter Kit for MGI[®] (目录号: KI401), 所得文库结构如下:

5'-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT-XXXXXXXXX-AAAGTCGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAA

[i7]CAACTCCTTGGCTCACA-3'

i7: Index 1, 10 bases;

-XXXXXXXX-: 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), *TransNGS*[®] Indexed Adapter Kit for MGI[®] (目录号: KI401)。

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 *TransNGS*[®] Indexed Adapter Kit for MGI[®] (目录号: KI401), 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
1 µg - 100 ng	稀释 4 倍	5 µM
100 ng - 25 ng	稀释 10 倍	2 µM
25 ng - 5 ng	稀释 20 倍	1 µM
5 ng - 100 pg	稀释 100 倍	0.2 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。



(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 MGI® II	40 μ l
Adapter-ligation Enzyme IV	5 μ l
Total Volume	100 μ l

* 切勿将 Adapter 与 Adapter-ligation Buffer for MGI® II 和 Adapter-ligation Enzyme IV 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

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×) 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 410 bp 左右。

磁珠分选的具体操作如下:

- (1) 从 2 - 8°C 取出磁珠, 静置 30 分钟平衡至室温。
- (2) 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 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 15 μ l 磁珠 (0.15 $\times$), 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°C 保存。

5. 文库扩增

- (1) 将 PCR 管置于冰上, 按下表加入:

Component	Volume
上步纯化产物	20 μ l
TransNGS® Library Amplification SuperMix (2 $\times$)	25 μ l
TransNGS® Universal Primer for MGI®	5 μ l
Total Volume	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°C	3 min	} 2 - 14 cycles*
98°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	3 min	
4°C	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℃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 μl 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 μl 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 μl 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 μl 洗脱液并转移到干净离心管中, 产物可于 -20℃保存。

附录

*Trans*NGS[®] Adapter for MGI[®] 序列信息:

5' TTGTCTTCCTAAG- GAACGACATGGCTACGA -TCCGACT-s-T
3' A C A C T C G G T T C C T C A A C -i- A A C A G A A G G A T T C- T G G C G A A C C G G -A G G C T G A-Ⓟ

-s- 代表硫代修饰, -Ⓟ 代表磷酸化修饰。

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)		~280	~410	~630
文库插入片段长度 (bp)		~200	~330	~550
接头连接产物纯化后进行分选	第一次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.8×	0.65×	0.5×
	第二次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.2×	0.15×	0.1×
接头连接产物不纯化直接分选	第一次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.4×	0.25×	0.1×
	第二次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.15×	0.1×	0.1×
文库扩增产物纯化后进行分选	第一次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.8×	0.65×	0.5×
	第二次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.15×	0.1×	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 μl。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 μ g 文库推荐扩增循环数

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

** 由于 TransNGS[®] Adapter for MGI[®] 的特殊设计，必须进行文库扩增后才能进行环化，因此需要至少 2 - 3 个循环的扩增以使绝大多数文库 DNA 转变为可环化的 DNA。

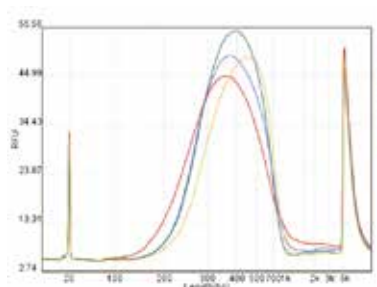


图 1 不同样本投入量下的文库峰型
(未分选扩增)

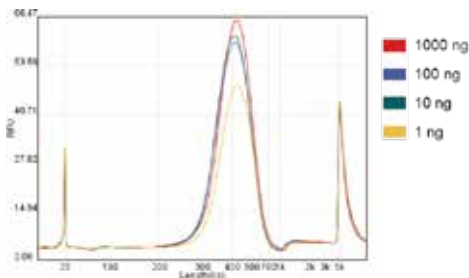


图 2 不同样本投入量下的文库峰型
(分选后扩增)

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/ μ l 的样本建议存放于低吸附离心管中，或存放于含 1 $\times$ 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: V3-202404

服务电话: +86-10-57815020

服务邮箱: complaints@transgen.com

