



# 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)

**目录号：** CW2845S (24 rxns)

CW2845M (96 rxns)

**保存条件：** -20°C 保存，干冰运输。

### 产品内容

Component	CW2845S 24 rxns	CW2845M 96 rxns
TPS V50	144 $\mu$ l	576 $\mu$ l
5 $\times$ FA Reaction Buffer	144 $\mu$ l	576 $\mu$ l
2 $\times$ HiFidelity PCR Mix	600 $\mu$ l	2 $\times$ 1.2 ml
PPM	48 $\mu$ l	192 $\mu$ l

\* 本试剂盒适用于人基因组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) 的人基因组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。

## 产品特点

- DNA片段化、接头连接一步完成。
- 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。

## 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. 该试剂盒适合人基因组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。

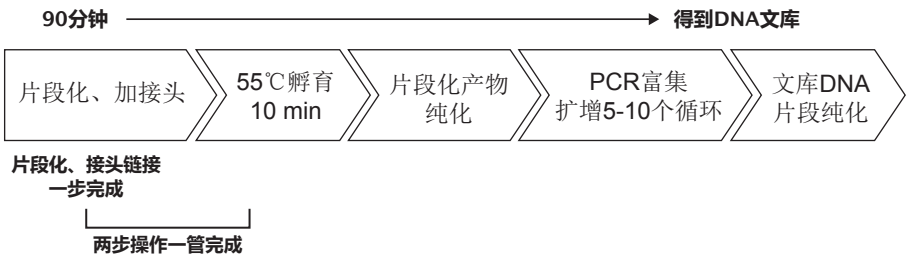
## 样品准备

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  $\mu$ l PCR管中加入以下试剂：

组分	体积
50 ng DNA	X $\mu$ l
TPS V50	6 $\mu$ l
5 $\times$ FA Reaction Buffer	6 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	To 30 $\mu$ l

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°C	热盖
55°C	10 min
10°C	Hold

DNA在进行片段化反应完成后，转座酶仍处于较高的活性状态，应立即进行纯化，以防止DNA过度片段化导致的文库片段变小。

## 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，CW2508）。

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50 $\mu$ l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  $\mu$ l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23  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O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，转移21  $\mu$ l上清至一个新的200  $\mu$ l PCR管中。

## PCR扩增

1. 向200  $\mu$ l PCR管中加入以下试剂：

组分	体积
片段化产物	21 $\mu$ l
PPM	2 $\mu$ l
Primer N5	1 $\mu$ l
Primer N7	1 $\mu$ l
2×HiFidelity PCR Mix	25 $\mu$ l

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
退火	60℃	30 s
延伸	72℃	3 min
终延伸	72℃	5 min
保存	4℃	Hold

} 5-10个循环

## 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，参考说明书第6页直接进行文库DNA片段的纯化。**

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  $\mu$ l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  $\mu$ l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  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O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 $\mu$ l	55 $\mu$ l	45 $\mu$ l
	第二次选择	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

## 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  $\mu$ l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  $\mu$ l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  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O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。

## 文库质量检测

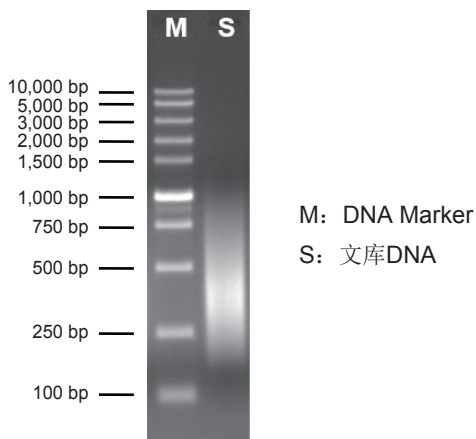
### 文库浓度测定

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。



## 文库结构

Index 2 (i5)

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC■■■■■■TCGTCGGCAGCGTCAGAT  
GTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCACGA  
GAC■■■■■■ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

■■■■■■: Index 2 (i5), 8 bases; ■■■■■■: Index 1 (i7), 8 bases; NNNNNN: 插入序列

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及和其他用途