

版本号: EP170330

TIANSeq DNA Library Prep Kit (ion torrent)

TIANSeq DNA文库构建试剂盒

(ion torrent平台)

目录号: NG104

产品内容

产品组成	NG104-01 (24 rxn)
End-Repair Mix	24支
Ligation/Nick Repair Mix	24支

储存条件

试剂盒中End-Repair Mix 和Ligation/Nick Repair Mix可于室温下（15~25℃）保存，保质期为一年。

试剂盒中未使用完的组份（末端修复、连接/切刻修复试剂冻干粉）经自封铝箔袋封装后可在室温条件下保存。铝箔袋开封后请勿丢弃其中的干燥剂，并在2个月内用完所有组份。

产品简介

TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent是专门针对于ion torrent高通量测序平台所优化的DNA文库构建试剂盒。由末端修复(End-Repair Mix)和连接/切刻修复(Ligation/Nick Repair Mix)两个模块构成。与同类试剂不同的是：本产品所含有的模块均为一管式包装，且经特殊工艺加工呈冻干粉状，极大增强了试剂稳定性，可在室温条件下运输，保存和实验操作，省去了体系配制，低温保藏等繁琐操作，使得操作更加简便，文库转化效率更高。

适用范围：适用于ion torrent高通量测序平台DNA文库构建。

适用样本量：10 ng~1 µg DNA。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq Fragmentation Module (NG305-01/02)。
2. TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)。
3. BECKMAN Agencourt AMPure XP磁珠。

产品特点

1. 冻干粉形式，单管酶促反应，一管完成一步反应。
2. 高文库转化效率，DNA样本起始量可低至10 ng。
3. 操作简便，省去体系配制，低温保藏等步骤。

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. 若使用本公司TIANSeq Fragmentation Module (NG305-01/02)进行DNA片段化，由于该产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、DNA片段化

本试剂盒不包含DNA片段化相关试剂。对于DNA的片段化过程，客户可在超声处理、化学处理和酶处理等常用方法中选择，具体操作请参考相关产品说明。推荐产品为天根TIANSeq Fragmentation Module (NG305-01/02)试剂盒，当然也可选择其他相关产品。

二、末端修复

1. 沿锡箔纸封口袋顶部切口位置撕开试剂包装袋。
2. 取出一支管盖呈蓝色的1.5 ml离心管用于末端修复反应。每支1.5ml离心管中所含的冻干粉试剂可供一次文库构建反应使用。
3. 如有需要，可瞬时离心以确保冻干粉聚集于离心管底。
4. 按下表建立末端修复反应体系：

组分	用量
双链DNA (ds DNA) 片段 (10 ng-1000 ng)	X μ l
ddH ₂ O	100-X μ l
总体系	100 μ l

5. 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
6. 25℃ 孵育20 min。
7. 使用AMPure® XP磁珠纯化末端修复产物。
8. 纯化开始前将AMPure® XP磁珠平衡至室温。
9. 使用前将AMPure® XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
10. 若反应管与磁力架不兼容，可将末端补平反应液转移至与磁力架兼容的离心管中。

注：此离心管须能够容纳500 μ l液体。

11. 每100 μ l末端修复反应液中加入180 μ l AMPure® XP磁珠，吸打混匀至少5次。
12. 室温放置5 min。
13. 将含磁珠的反应液置磁力架上3 min，待溶液变清澈。

-
13. 用移液器小心吸除上清，注意在吸入上清的过程中不要扰动磁珠，除去上清后管底剩余少量液体不影响后续试验。
 14. 保持反应管置于磁力架上，向反应管管底轻柔加入500 μl 80%乙醇（注意不要扰动磁珠），室温孵育30 sec。
 15. 小心去除80%乙醇（ $\sim 500 \mu\text{l}$ ），不要扰动磁珠。
 16. 用80%乙醇重复洗涤一次（步骤15-16）。
 17. 将反应管瞬时离心后置置于磁力架上，使用 $<20 \mu\text{l}$ 量程的移液器小心去除管底残留的乙醇。
 18. 将反应管开盖置于磁力架上，室温干燥10~15 min。

注：本试剂盒的操作流程需要在下一个模块（连接/切刻修复过程）进行之前将末端修复产物与接头进行预混，因此在磁珠干燥期间请计算预混末端修复产物与接头过程中所需的DNA量（X）。预混末端修复产物与接头的体系如下表所示。

组分	用量
末端修复得到的DNA纯化产物	X+2.5 μl
接头溶液	Y μl
总体系	102.5 μl

注：本产品中不包含接头溶液，一般情况下，建议接头的加入量为文库DNA摩尔量的10倍。也可参考接头供应商的说明书操作。

19. 将反应管从磁力架上取下，加入(X+2.5) μl 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH8.0; 10mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0或者去离子水）。用移液器吸打使磁珠悬浮。
20. 加入Y μl 接头溶液（Y值计算方法参照上表所示），混匀后将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清，小心吸取上清至新离心管。

注：为了防止文库DNA片段的相互连接或接头自连，此步纯化得到的文库DNA片段必须先与适量接头溶液混合后才可添加至Ligation/Nick Repair Mix冻干粉中。

21. 立刻进入连接/切刻修复程序或将产物保存于 -20°C （末端修复产物可在 -20°C 保存7天）。

三、连接/切刻修复

1. 沿锡箔纸封口袋顶部切口位置撕开试剂包装袋。
2. 取出一支管盖呈红色的1.5 ml离心管用于末端修复反应。每支1.5 ml离心管中所含的冻干粉试剂可供一次文库构建反应使用。
3. 如有需要，可瞬时离心以确保冻干粉聚集于离心管底。
4. 取100 μ l末端补平DNA与接头溶液的混合物，添加至红色反应管中。
5. 用移液器轻柔吸打6~8次混匀反应体系。
6. 25 $^{\circ}$ C 孵育15 min后，再于65 $^{\circ}$ C 下处理5 min。
7. 使用AMPure[®] XP磁珠纯化末端修复产物。
8. 纯化开始前将AMPure[®] XP磁珠平衡至室温。
9. 使用前将AMPure[®] XP磁珠涡旋使其充分悬浮。
10. 若反应管与磁力架不兼容，可将末端补平反应液转移至与磁力架兼容的离心管中。（注意：此离心管须能够容纳500 μ l液体）。
11. 对于100 bp读长的文库，则每100 μ l连接/切刻修复反应液中加入140 μ l AMPure[®] XP磁珠；对于200-300 bp读长的文库，则每100 μ l连接/切刻修复反应液中加入180 μ l AMPure[®] XP磁珠。吸打5次混匀。
12. 室温放置5 min。
13. 将含磁珠的反应液置磁力架上3 min，待溶液变清澈。
14. 用移液器吸除上清。注意在吸入上清的过程中不要扰动磁珠，除去上清后管底剩余少量液体不影响后续试验。
15. 保持反应管置于磁力架上，向反应管管底轻柔加入500 μ l 80%乙醇（注意不要扰动磁珠），室温孵育30 sec。
16. 小心去除80%乙醇（~500 μ l），不要扰动磁珠。
17. 用80%乙醇重复洗涤一次（步骤15-16）。
18. 将反应管瞬时离心后置于磁力架上，使用 <20 μ l量程的移液器小心去除管底残留的乙醇。
19. 将反应管开盖置于磁力架上，室温干燥5 min。磁珠干燥期间请计算片段筛选过程中所需的DNA量（Z）。

注：由于不同的片段选择方法所需的上样量不同，用户可以根据后续片段筛选方法确定连接/切刻修复产物的洗脱体积($Z+2.5 \mu\text{l}$)。其中，推荐 Z 的取值范围为： $20 \leq Z \leq 100$ 。如果不进行片段筛选，则推荐再次使用AMPure® XP磁珠进行纯化以降低接头污染($50 \mu\text{l}$ 接头连接产物加入 $50 \mu\text{l}$ 磁珠， $Z=50 \mu\text{l}$)。如果不明确如何选择 Z 值，请参阅说明书第四部分。

20. 将反应管从磁力架上取下，加入($Z+2.5$) μl 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH8.0; 10mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0或者去离子水）。用移液器吸打使磁珠悬浮。
21. 将反应管置于磁力架上3 min，待溶液澄清。小心吸取上清至新离心管。
22. 小心吸取上清 $Z \mu\text{l}$ 至新离心管，直接进入说明书第四部分或将产物保存于 -20°C （接头连接后的DNA产物可在 -20°C 保存7天）。

四、片段筛选

若使用ion torrent平台进行测序或进行基因组测序，文库DNA片段平均大小应为200-390 bp（包含接头）。片段筛选步骤即旨在特异性地回收得到这部分片段，而去除过大或过小的双链及单链DNA片段。以下是常用的片段筛选方法，以及使用这些方法时所需要的连接产物体积（ Z ）。

1. 琼脂糖凝胶回收（ $Z=20 \mu\text{l}$ ）；
2. Sage Science Pippin Prep™（ $Z=30 \mu\text{l}$ ）；
3. Life Technologies™ E-Gel® SizeSelect™ Gels（ $Z=20 \mu\text{l}$ ）；
4. 基于磁珠的片段筛选方法（ $Z=100 \mu\text{l}$ ）。

注：片段筛选步骤一般在接头连接后进行，以控制文库中DNA片段大小。但用户也可以根据自身需要在末端修复完成后即进行片段筛选。

五、文库扩增

本试剂盒不含PCR试剂及引物。用户需要自行选择PCR试剂，并根据文库DNA上样量确定扩增循环数。PCR结束后，可使用AMPure® XP磁珠（Cat# A63881）对产物进行纯化，并使用凝胶电泳、Qubit®、qPCR以及Angilent生物分析仪对纯化后的DNA文库进行分析。推荐试剂为TIANGEN的TIANSeq NGS Library Amplification Module（NG304），但相关引物需要客户自己准备。

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