

版本号: NG170222

TIANSeq NGS Library Amplification Module

TIANSeq NGS文库富集模块

目录号: NG304

产品内容

产品组成	NG304-01 24 rxn	NG304-02 96 rxn
2 × HiFi PCR MasterMix	600 μl	4 × 600 μl
10 × P5/P7 Primers Mix	120 μl	480 μl

储存条件

请将试剂盒置于-25~-15°C保存，避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

TIANSeq NGS Library Amplification Module是专为illumina高通量测序平台DNA文库扩增优化的PCR反应试剂，扩增所得DNA序列高度保真、无碱基偏好性。试剂中所包含有的P5/P7 Primers Mix是正向和反向引物的混合液，适用于两侧含有P5及P7序列的文库DNA片段的扩增。如果选用其他引物，请参照相应的供应商说明书。若使用TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing module (NG301-01/02)进行文库构建，当上样量低于100 ng时需要对外文库进行扩增。

适用范围：适用于illumina高通量测序平台DNA文库的富集。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq Fragmentation/End Repair/dA-Tailing Module (NG301-01/02)
2. TIANSeq End Repair/dA-Tailing Module (NG302-01/02)
3. TIANseq Fast Ligation Module (NG303-01/02)
4. BECKMAN Agencourt AMPure XP磁珠

产品特点

1. 扩增保真性高，无碱基偏好性。
2. 高扩增效率，可对低至1 ng起始文库DNA进行富集。
3. 包含P5/P7引物，直接用于illumina平台DNA文库的富集。

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。
-

操作步骤

1. 将2×HiFi PCR MasterMix和10×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℃。

步骤	温度	时间	循环数
1	98℃	2 min	1
2	98℃	20 sec	6-12*
3	60℃	30 sec	
4	72℃	30 sec	
5	72℃	1 min	1
6	4℃	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 (μl)
2×HiFi PCR MasterMix	25
10×P5/P7 Primers Mix	5
总体积	30

注：对于多个样品，请计算所需试剂的总体积并在此基础上额外添加10%，以避免分装过程中枪头挂壁损失而导致试剂体积不足。

4. 将纯化后的带有adapter的文库连接产物20 μl转移至PCR管中，加入30 μl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。
 - a) 将Agencourt AMPure XP磁珠置于室温平衡20 min。
 - b) 涡旋Agencourt AMPure XP磁珠使充分悬浮，加入50 μl磁珠至PCR产物中，充分吸打混匀。

-
- c) 室温孵育5 min，将反应管置于磁力架上1~2 min，至磁珠完全贴壁后，用移液器小心移除上清。
- d) 从磁力架上取下反应管，加入200 μ l 80%乙醇洗涤，轻弹混匀洗涤磁珠。
将反应管置于磁力架上1~2 min，至磁珠充分贴壁，弃上清，回收磁珠。
- e) 重复步骤d) 1次。
- f) 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。
- g) 加入32.5 μ l 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 μ l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 $^{\circ}$ C。
-