



NGS TPL DNA Library Prep Set for Illumina (5 ng)

转座酶法二代测序快速DNA建库试剂盒 (Illumina, 5 ng)

目录号： CW2846S (24 rxns)

CW2846M (96 rxns)

保存条件： -20℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW2846S 24 rxns	CW2846M 96 rxns
TPS V5	168 µl	672 µl
5×FA Reaction Buffer	96 µl	384 µl
TS Buffer	72 µl	288 ml
2×PCR Mix	600 µl	2×1.2 µl

* 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5 ng。本公司还有针对50 ng (CW2845) 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5 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。

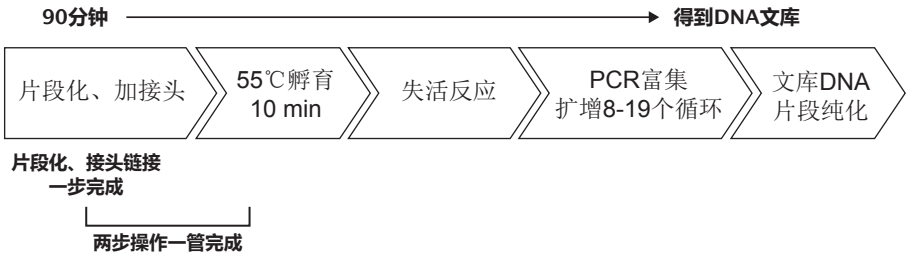
样品准备

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 μ l PCR管中加入以下试剂：

组分	体积
5 ng DNA	X μ l
TPS V5	7 μ l
5 \times FA Reaction Buffer	4 μ l
ddH ₂ O	To 20 μ 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℃	热盖
55℃	10 min
10℃	Hold

失活反应

DNA在进行片段化反应完成后，酶仍处于较高的活性状态，应立即将其从PCR仪上取下，加入反应终止Buffer进行终止反应，以防止DNA过度片段化导致的文库片段变小。

1. 向盛有片段化产物的PCR管中加入3 μ l TS Buffer。
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. 置于室温孵育5 min，如室内温度过低，可置于PCR仪上进行反应，25℃，关闭热盖。

PCR扩增

1. 向200 μ l PCR管中加入以下试剂：

组分	体积
片段化产物	23 μ l
Primer N5	1 μ l
Primer N7	1 μ l
2×PCR Mix	25 μ 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	} 8-19个循环
退火	60℃	30 s	
延伸	72℃	30 s	
终延伸	72℃	5 min	
保存	4℃	Hold	

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4页直接进行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 μ 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 μ 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 μ l ddH₂O回溶。

注意：不要使磁珠过度干燥，以免影响洗脱效率。

9. 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 μ l	55 μ l	45 μ l
	第二次选择	50 μ l	30 μ l	30 μ 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）。

1. CMPure使用前应震荡混匀后置于室温平衡30 min。
2. PCR产物中加入50 μ 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. 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 μ 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25 μ l ddH₂O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，将上清溶液转移至一个新的离心管中。

文库质量检测

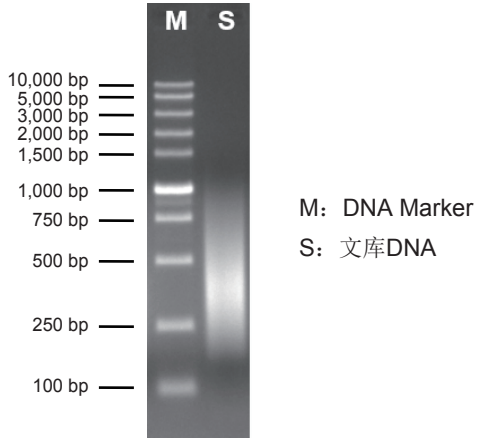
文库浓度测定

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/ μ l=5.0 nM
400 bp	1 ng/ μ l=3.8 nM
500 bp	1 ng/ μ l=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。



本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途