



NGS Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent

目录号： CW2639S (24 rxns)

CW2639M (96 rxns)

保存条件： -20℃保存，干冰运输

产品内容

Component	CW2639S 24 rxns	CW2639M 96 rxns
10×End Repair Buffer	200 μl	800 μl
End Repair Enzyme Mix	48 μl	192 μl
Ligation and Nick Repair Buffer	400 μl	2×800 μl
T4 DNA Ligase	48 μl	192 μl
Bst DNA Polymerase	48 μl	192 μl
2×HiFidelity PCR Mix	600 μl	2×1.2 ml
10×Primer Mix (5 μM each)	150 μl	600 μl

产品简介

康为二代测序快速DNA建库试剂盒(Ion torrent)提供了构建DNA文库需要的酶预混体系及反应缓冲液, 包含除接头以外的所有成分, 制备的文库可用于Ion torrent PGM、Ion Proton二代测序平台的测序。和常规建库方法相比, 该试剂盒将多个步骤进行了合并, 省略了多个纯化步骤, 因此显著降低了起始模板DNA的最少需求量, 缩短了文库构建时间。另外, 试剂盒采用高保真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, 可高效的制备用于Ion torrent二代测序平台的DNA文库。

自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架: 建议使用Life公司磁力架。
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 (CW2508)。
3. 样本接头引物试剂盒。
4. 无水乙醇, EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 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. 避免试剂盒中Buffer的反复冻融, 建议首次使用时将Buffer进行分装保存。酶在使用完应尽快放回-20℃保存,
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, 定期对各实验区域进行清洁。

DNA建库流程示意图：

2小时15分  得到DNA文库



起始材料：5 ng-1 μ g打断的双链DNA，溶于EB（10 mM Tris-HCl pH 8.0）或去离子水中，DNA纯度要求：OD260/OD 280=1.8-2.0。

DNA末端修复反应：

1. 向200 μ l PCR管中加入以下成分，用枪头将上述溶液轻轻混匀，瞬时离心使所有组分收集到管底。

试剂名称	体积
10×End Repair Buffer	6 μ l
End Repair Enzyme Mix	2 μ l
fragmented DNA	X (10 ng-1 μ g)
RNase-Free Water	Up to 60 μ l

2. 将管子置入PCR仪中，热盖打开，反应程序如下：

20 min @ 25°C

10 min @ 70°C

Hold on 4°C

Adaptor 连接:

建议使用康为adaptor进行连接，也可选择使用Life、Kapa公司的adaptor，具体连接方法可参考各公司的产品使用说明书。以下为使用康为adaptor进行连接的操作步骤:

1. 向上述反应液中直接加入以下试剂，用枪头将上述试剂混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。

试剂名称	体积
Ligation and Nick Repair Buffer	10 μ l
T4 DNA Ligase	2 μ l
Bst DNA Polymerase	2 μ l
Adaptor A	7 μ l
Adaptor P1	7 μ l
RNase-Free Water	12 μ l
Total volume	40 μl

注：建议Adaptor的加入量与DNA片段的摩尔比为10:1-20:1，具体Adaptor的使用浓度请参照下表。如果DNA量为10-100 ng, adaptor建议使用浓度为1 μ M (小于260 bp) 或 0.5 μ M (300-400 bp)。

插入 DNA 量/反应	不同大小 DNA 建议 Adaptor 使用浓度			
	130 bp	260 bp	320 bp	410 bp
1 μ g	10 μ M	10 μ M	5 μ M	5 μ M
500 ng	5 μ M	5 μ M	2.5 μ M	2.5 μ M
100 ng	1 μ M	1 μ M	0.5 μ M	0.5 μ M

2. 反应步骤

15 min @ 25°C

5 min @ 65°C

Hold on 4°C

Adaptor连接DNA片段的的选择性回收

构建不同大小的DNA文库时，需进行DNA片段的的选择性回收。若起始样本量低于50ng，不建议进行DNA片段选择性回收。可参考另一种方案，直接进行DNA片段的纯化。建议使用康为世纪磁珠法DNA纯化回收试剂盒(CW2508)进行DNA片段选择性回收。若使用除康为以外厂家的磁珠，需自行摸索最佳磁珠用量。以下操作步骤采用康为世纪磁珠法DNA纯化回收试剂盒，可选择回收DNA片段长度范围为310-370bp（读长为200bp），反应起始体积为100 μ l。

1. 涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将100 μ l adaptor连接反应缓冲液转移至一新的1.5ml离心管中；
3. 加入60 μ l混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温静置5分钟；
4. 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5分钟），小心地将上清溶液转移至新的1.5ml离心管中,并弃去磁珠；

注意：不要弃除上清。

5. 向上清中加入20 μ l混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温放置5分钟；
6. 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟），小心移取上清并弃除，期间避免接触结合目标DNA的磁珠；

注意：不要弃除磁珠。

7. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μ l新配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
8. 重复步骤7：为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体。
9. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置5分钟，使磁珠在空气中干燥；
10. 将离心管从磁力架上取下，加入25 μ l 10 mMTris-HCl (pH 8.0) 或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5分钟；
11. 短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将25 μ l洗脱液转移至一个新的PCR管中；

另一种方案：Adaptor连接DNA片段的全部回收

1. 涡旋振荡CMPure 20秒，使其彻底混匀为均一溶液。
2. 将adaptor连接反应液转移至一新的1.5 ml离心管中。
3. 加入1倍样品体积的CMPure，涡旋震荡5秒钟后，室温静置5分钟。
4. 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需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。

5. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μ l新鲜配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。
6. 重复步骤5。为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体。
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置5分钟，使磁珠在空气中干燥。
8. 将离心管从磁力架上取下，加入25 μ l EB（自备）或去离子水，涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置5分钟。
9. 短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清（约需5分钟），将25 μ l洗脱液转移至一个新的PCR管中。

PCR富集

1. 在PCR管中加入以下试剂并混匀

试剂	体积
连接adaptor后的DNA片段	20 μ l
2×HiFidelity PCR Mix	25 μ l
10×Primer Mix (5 μ M each)	5 μ l
总体积	50 μ l

2. PCR反应条件

步骤	温度	时间	
预变性	98℃	30s	
变性	98℃	10s	} 4-12 cycles
退火	65℃	30 s	
延伸	72℃	30 s	
终延伸	72℃	5min	

注：样本量为1ug时，4-6个cycles，样本量100ng时6-8个cycles，样本量为10ng时10-12个cycles。

PCR循环数可根据实验进行优化。

PCR产物的纯化

1. 涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将PCR反应液转移至一新的1.5 ml离心管中；
3. 加入1倍样品体积的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温静置5分钟；
4. 短暂离心，将离心管放于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需5分钟）。小心移取上清并弃除，期间避免接触结合目标DNA的磁珠；

注意：不要弃除磁珠

5. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250 μ l新鲜配置的80%乙醇，室温放置30秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清。
6. 重复步骤5：为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体。
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置5分钟，使磁珠在空气中干燥。
8. 将离心管从磁力架上取下，加入25 μ l EB（自备）或去离子水，涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，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（约需5分钟），将25 μ l洗脱液转移至一个新的PCR管中，DNA文库在-20℃保存。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途