

NGS Fast DNA Library Prep Set for Illumina 二代测序快速DNA建库试剂盒 (Illumina)

项目号: N665633

保存条件: -20℃ 保存, 干冰运输。

产品内容

| Component | N665633-24TN665633-96T | |
|--|------------------------|------------------------|
| End Prep Enzyme Mix | 48 μ l | 192 μ l |
| 10 \times End Repair Reaction Buffer | 200 μ l | 800 μ l |
| T4 DNA Ligase | 48 μ l | 192 μ l |
| T4 DNA Ligase Buffer | 400 μ l | 2 \times 800 μ l |
| 2 \times HiFidelity PCR Mix | 600 μ l | 2 \times 1.2ml |

产品简介

本试剂盒提供了DNA文库构建所需要的酶预混体系及反应缓冲液, 包含除接头与PCR引物外的所有成分, 用于illumina二代测序平台DNA文库构建。和一般建库方法相比, 该试剂盒操作简单、方便, 极大地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, 可高效制备用于illumina二代测序平台的DNA文库。试剂盒中提供的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。

产品特点

- 末端补平, 磷酸化, 加A一步完成。
- 不需纯化, 直接加接头。
- 超保真扩增, 最大程度上降低了扩增偏好性。
- 支持多种样本, 且所得文库能够用于Illumina GAIIX, HiSacnSQ、HiSeq 2500/2000/1000和MiSeq sequencing等测序平台的测序。

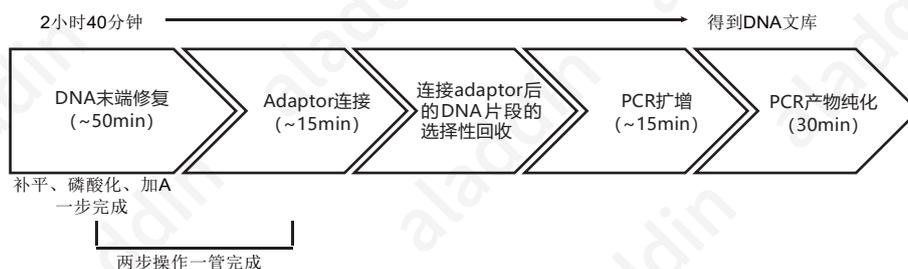
自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架。
2. DNA纯化回收试剂盒。
3. 样本接头引物试剂盒。
4. 无水乙醇, EB(10mM Tris-HCl, pH8.0), 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. ml离心管;
6. 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, 建议您首次使用试剂盒后将剩余试剂分装保存。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。

DNA建库流程示意图



操作步骤

样本要求：5ng-1 μg 打断的双链DNA，溶于EB (10mM Tris-HCl pH8.0) 或去离子水中。DNA纯度要求： $OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$ 。

DNA末端修复反应

1. 向200 μl PCR管中加入以下试剂：

| 试剂名称 | 体积 |
|-------------------------------|--------------|
| 10×End Repair Reaction Buffer | 6.5 μl |
| End Prep Enzyme Mix | 2 μl |
| fragmented DNA | X (5ng-1 μg) |
| RNase-free Water | Up to 65 μl |

2. 用枪头将上述溶液轻轻吹吸混匀，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：

15min @ 12°C

15min @ 37°C

20min @ 72°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NEB、illumina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. 向上述已完成DNA末端修复的反应液中直接加入以下试剂：

| 试剂名称 | 体积 |
|-----------------------------------|--------|
| T4 DNA ligase buffer for illumina | 14 μl |
| T4 DNA ligase | 2 μl |
| Adaptor | 2.5 μl |

此时管中溶液总体积为83.5 μl。

注意：若起始样本量少于100ng，请将adaptor用去离子水稀释10倍至1.5 μM后使用。

2. 用枪头将上述试剂吹吸混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。

3. 20°C温浴15分钟。

注意：若此操作使用pcr仪，请将热盖关闭。

DNA片段的回收

建议使用世纪磁珠法DNA纯化回收试剂盒进行DNA片段选择性回收。

注意：DNA片段选择性回收是可选步骤，若起始样本量低于50ng，不建议进行DNA片段选择性回收，可参考说明书第4页，直接进行DNA片段的纯化。另外构建不同大小的DNA文库时，DNA片段选择性回收的磁珠用量不同，具体磁珠用量可参照附表1。

以下操作步骤中，可选择回收DNA片段长度峰值为320bp（插入片段长度200bp），反应起始体积为100 μl。

1. 涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液。

2. 向连接反应液中加入16.5 μl去离子水，使adaptor连接反应缓冲液体积至100 μl。

注意：若使用NEB adaptor，只需要加入13.5 μl去离子水。

3. 将上述adaptor反应缓冲液转移至一新的1.5ml离心管中。

4. 加入70 μ l混合均匀的CMPure，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。
6. 向上清中加入25 μ l混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温放置5分钟。
7. 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。
8. 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。
9. 重复步骤8。
10. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10分钟，使磁珠在空气中干燥。
11. 将离心管从磁力架上取下，加入28 μ l 10mM Tris-HCl (pH8.0) 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。
12. 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23 μ l洗脱液转移至一个新的PCR管中；
注意：一定不要转移磁珠，微量磁珠污染可影响后续PCR反应的正常进行。

另一种方案：DNA片段的纯化

1. 涡旋振荡CMPure20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1.5ml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。
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10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28 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23 μ l洗脱液转移至一个新的PCR管中。

附表1：不同片段选择回收时磁珠建议用量

| DNA文库大小 | 插入片段 | 150bp | 200bp | 250bp | 300-400bp | 400-500bp | 500-700bp |
|---------|-------|-----------------------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|
| | | （插入片段+adaptor+primer） | 270bp | 320bp | 400bp | 400-500bp | 500-600bp |
| 磁珠用量 | 第一次选择 | 85 | 70 | 55 | 50 | 45 | 35 |
| | 第二次选择 | 25 | 25 | 20 | 20 | 20 | 15 |

PCR扩增

1. 在PCR管中加入以下试剂并混匀。

| 试剂名称 | 体积 |
|-------------------------------|------------|
| 连接adaptor后的DNA片段 | 23 μ l |
| 2 \times HiFidelity PCR Mix | 25 μ l |
| Univesial primer | 1 μ l |
| Univesial primer | 1 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 | } 6-16个循环 |
| 退火 | 65℃ | 30s | |
| 延伸 | 72℃ | 30s | |
| 终延伸 | 72℃ | 5min | |

注意：建议1 μg样本起始量时PCR循环数为6个循环，50ng时10个循环，5ng时14-15个循环，PCR循环数也可根据实验需要进行优化。

PCR产物的纯化

1. 涡旋振荡CMPure 20秒，使其彻底混匀为均一溶液。
2. 将PCR反应液转移至一新的1.5ml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 μl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。
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置10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30 μl 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），将洗脱液转移至一个新的PCR管中约25 μl，DNA文库在-20℃保存。

文库质量检测

文库浓度

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 | 成簇反应DNA文库浓度 |
|---------|---------------|-------------|
| 200bp | 1ng/ μl=7.5nM | 6-12pM |
| 300bp | 1ng/ μl=5.0nM | 6-12pM |
| 400bp | 1ng/ μl=3.8nM | 6-12pM |
| 500bp | 1ng/ μl=3.0nM | 6-12pM |

文库长度分布

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。

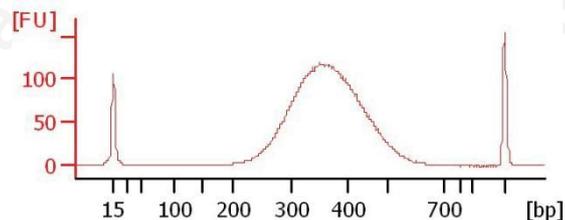
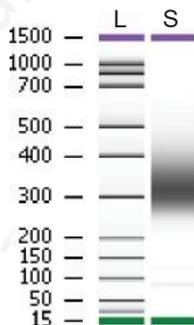


图1: Agilent 2100 Bioanalyzer文库分析结果

L: DNA Ladder;

S: 使用200ng人基因组DNA构建文库, 磁珠进行选择回收后结果。

文库结构

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCC GATCT [Target
Sequence] AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNN NNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
NNNNNN: index, 6bases