

## NGS Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent

项目号: N665848

保存条件: -20℃保存, 干冰运输

## 产品内容

Component	N665848-24T	N665848-96T
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	2×1.2ml
10×Primer Mix (5 μM each)	150 μl	600 μl

## 产品简介

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。

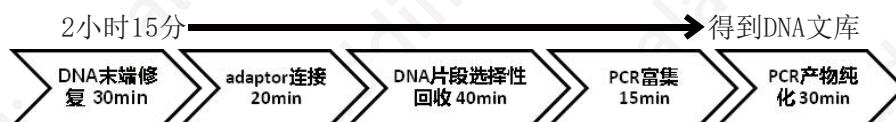
## 自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架。
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1.5ml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:



起始材料: 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: OD260/OD 280=1.8-2.0。

## DNA末端修复反应:

1. 向200 μl 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 μl
End Repair Enzyme Mix	2 μl

fragmented DNA	X (10ng-1 μg)
RNase-Free Water	Up to 60 μl

2. 将管子置入PCR仪中，热盖打开，反应程序如下：  
 20min@25°C  
 10min@70°C  
 Hold on 4°C

### Adaptor连接：

以下为使用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 μl
T4 DNA Ligase	2 μl
Bst DNA Polymerase	2 μl
Adaptor A	7 μl
Adaptor P1	7 μl
RNase-Free Water	12 μl
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10-100ng，adaptor建议使用浓度为1 μM（小于260bp）或0.5 μM（300-400bp）

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

### 2. 反应步骤

- 15min@25°C  
 5min@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。以下操作步骤采用磁珠法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 μl。

- 涡旋振荡CMPure20秒，使其彻底混匀为均一溶液；
- 将100 μl adaptor连接反应缓冲液转移至一新的1.5ml离心管中；
- 加入60μl混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温静置5分钟；
- 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。
- 向上清中加入20μl混合均匀的CMPure，涡旋震荡5秒钟后室温放置5分钟；
- 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。
- 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入250μl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；
- 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 $\mu$ 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；
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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l
2 $\times$ HiFidelity PCR Mix	25 $\mu$ l
10 $\times$ Primer Mix (5 $\mu$ M each)	5 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l

2. PCR反应条件

步骤	温度	时间	
预变性	98 $^{\circ}$ C	30s	
变性	98 $^{\circ}$ C	10s	} 4-12个循环
退火	65 $^{\circ}$ C	30s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30s	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5min	

注：样本量为1 $\mu$ g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1.5ml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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$  l洗脱液转移至一个新的PCR管中，DNA文库在-20 $^{\circ}$ C保存。