

TransNGS® Tn5 DNA Library Prep Kit for Illumina® (for 50 ng DNA)

Tn5 DNA文库构建试剂盒 适配illumina平台 (for 50 ng DNA)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KP101

保存: -18°C及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS® Tn5 DNA Library Prep Kit for Illumina®是针对Illumina高通量测序平台开发的,适用于50 ng 起始DNA量的基因组文库构建试剂盒,所得文库可用于单端或双端测序。该试剂盒采用体外转座技术,5分钟内即可同时完成DNA片段化和接头连接。与传统文库构建必须进行DNA片段化、末端修复和接头连接相比,体外转座技术不仅快速、操作简便,而且建库所需DNA量少。

特点

- 建库时间短、操作简便。
- 所需DNA量少。

适用范围

将基因组DNA制备成适用于Illumina高通量测序平台的短片段文库。

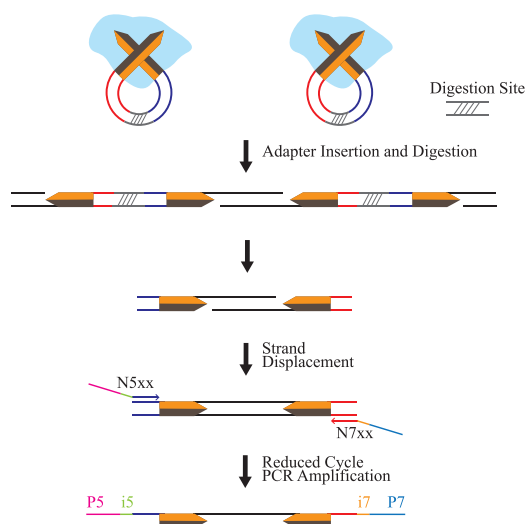
试剂盒组成

Component	KP101-11 (12 rxns)	KP101-03 (96 rxns)
Tn5-50 Enzyme Mix	24 µl	192 µl
5×Insertion Buffer	75 µl	600 µl
2×Tn5 Digestion Mix	375 µl	4×750 µl
TransNGS® Tn5 Library Amplification SuperMix (2×)	300 µl	4×600 µl
Library Elution Buffer	1.2 ml	2×5 ml
Nuclease-free Water	1 ml	5 ml

起始样品要求

起始样品为纯化后溶于Nuclease-free Water或10 mM Tris-HCl (pH8.0)的基因组DNA, OD_{260}/OD_{280} 在1.8-2.0之间。DNA浓度测定需使用基于特异识别dsDNA的荧光染料法,如Qubit或荧光染料PicoGreen,且同一DNA样品采用吸光度法(如Nanodrop)所测浓度与荧光染料法所测浓度的比值 ≤ 2 。

文库构建原理示意图



文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
-XXXXXXXX-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCCACGAGAC[i7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

i5: Index 2, 8 bases;

i7: Index 1, 8 bases;

-XXXXXXXX-: 插入序列。

操作步骤

自备试剂: 新鲜配制的80%乙醇, *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号:EC401), *TransNGS*[®] Tn5 Index Kit for Illumina[®] (目录号:KI101)。

1、接头插入与片段化

转座酶 Tn5 在室温下也可缓慢反应, 因此反应混合液需在冰上配制, 吹吸混匀后立即进行孵育反应。

2×Tn5 Digestion Mix 置于室温下彻底解冻。

(1) 将灭菌PCR管置于冰上, 加入

Component	Volume
Tn5-50	2 μl
50 ng gDNA	Variable
5×Insertion Buffer	6 μl
Nuclease-free Water	Variable
Total volume	30 μl

(2) 移液枪吹吸混匀, 管壁上如有液体可点甩离心, 并立即进行下步反应。

(3) 将样品置于PCR仪中, 55℃孵育5分钟 (盖子温度70℃)。

(4) 立即置于冰中, 并立即向反应管中加入30 μl 2×Tn5 Digestion Mix, 移液枪吹吸混匀, PCR仪中55℃孵育5分钟 (盖子温度70℃), 立即置于冰中。

2、DNA纯化

推荐使用*MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号:EC401) 进行产物纯化, 具体操作如下:

(1) 从2-8℃取出磁珠, 室温静置30分钟后备用。

(2) 将上步60 μl反应产物全部转移到1.5 ml灭菌离心管中。

(3) 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取60 μl磁珠(1.0×)加入上步产物中。

(4) 移液枪吹吸混匀, 室温静置5分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(5) 将1.5 ml离心管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清(约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。弃上清。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则会影响最终产量。

(6) 保持1.5 ml离心管在磁力架上, 向管中加入200 μl新鲜配制的80%乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置30秒。弃上清。

注意: 一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。

(7) 重复步骤(6)一次。

(8) 保持1.5 ml离心管在磁力架上, 室温晾干磁珠。

注意: 切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。

(9) 将1.5 ml离心管移出磁力架, 加入22 μl Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀, 或涡旋混匀, 室温静置2分钟。

(10) 将1.5 ml离心管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清(约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 室温静置时间可延长至5分钟, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(11) 小心吸取20 μl洗脱液转移到干净PCR管中, 进行下步文库扩增反应, 或于-20℃保存。



3、文库扩增

(1) 冰上加入

Component	Volume
上步纯化产物	20 μ l
Tn5 Library Amplification SuperMix	25 μ l
N5xx*	2.5 μ l
N7xx*	2.5 μ l
Total volume	50 μ l

*TransNGS® Tn5 Index Kit for Illumina® (目录号: KI101)中提供8种N5xx和12种N7xx, 请根据需要自行选择。

(2) 移液枪吹吸混匀, 管壁上如有液体可点甩离心。

(3) PCR扩增程序如下:

72°C	3 min*	
98°C	3 min	
98°C	30 sec	4-7 cycles**
62°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	3 min	
≤10°C	Hold	

*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链DNA, 72°C孵育3分钟用于生成成熟的PCR模板。

**循环数多则文库产出高, 但测序数据duplication值也会增加, 请根据测序需要进行选择。不同循环数文库产出请参照附录表1。

4、文库扩增产物片段分选

如对文库长度分布无特殊要求, 可直接使用1.0×磁珠纯化文库扩增产物, 而不进行片段分选。

推荐使用MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)进行产物片段分选。为防止接头或长片段残留, 建议进行两次片段分选, 或先使用1.0×磁珠纯化后再进行分选。片段分选具体操作如下:

(1) 从2-8°C取出磁珠, 室温静置30分钟后备用。

(2) 取一灭菌1.5 ml离心管, 将上步50 μ l反应产物全部加入管中。若产物不足50 μ l, 需用Nuclease-free Water补齐。

(3) 振荡磁珠使其充分混匀, 参考附录表2向DNA溶液中加入适当体积的磁珠。

磁珠体积=DNA溶液体积×第一次体积比

例如: 30 μ l磁珠=50 μ l DNA溶液×0.6

(4) 移液枪吹吸混匀, 室温静置5分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(5) 将1.5 ml离心管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清(约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(6) 保持1.5 ml离心管在磁力架上, 将上清转移到另一干净的1.5 ml离心管中, 弃去磁珠。

(7) 参考附录表2向上清液中加入适当体积的磁珠。

磁珠体积=初始DNA溶液体积×第二次体积比

例如: 7.5 μ l磁珠=50 μ l DNA溶液×0.15

(8) 移液枪吹吸混匀, 室温静置5分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(9) 将1.5 ml离心管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清(约5分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

弃上清。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则会影响最终产量。



(10) 保持1.5 ml离心管在磁力架上，向管中加入200 μ l新鲜配置的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒。弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(11) 重复步骤(10)一次。

(12) 保持1.5 ml离心管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(13) 将1.5 ml离心管移出磁力架，加入23 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀，或涡旋混匀，室温静置2分钟。

(14) 将1.5 ml离心管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(15) 小心吸取20 μ l洗脱液转移到干净EP管中，产物可于-20℃保存。

附录

表1 文库产出参照表

扩增循环数	4	5	6	7
文库产出(不进行片段分选) (ng)	230	420	800	1200

表2 使用MagicPure® Size Selection DNA Beads片段分选参照表

分选片段平均长度 (bp)	~330	~480	~680
插入片段长度 (bp)	~200	~350	~550
第一次体积比(DNA Beads: DNA)	0.75×	0.63×	0.54×
第二次体积比(DNA Beads: DNA)	0.20×	0.15×	0.12×

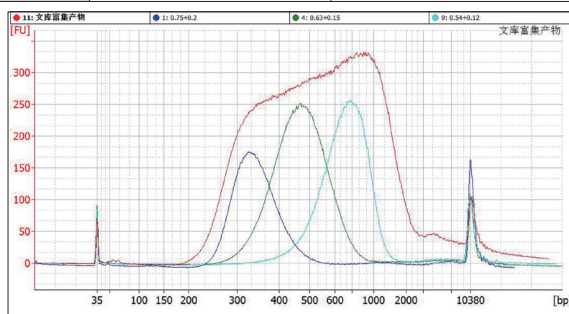


图1 使用MagicPure® Size Selection DNA Beads片段分选结果参照图

文库扩增产物-使用本试剂盒构建的人类基因组文库，7个PCR循环后经1.0×磁珠纯化；

0.75× + 0.2× / 0.63× + 0.15× / 0.54× + 0.12×-经相应磁珠比例分选后的文库

注意事项

- 2×Tn5 Digestion Mix解冻后如有少量沉淀或浑浊现象，请37℃水浴加热溶解后混匀使用。
- 转座酶识别位点具有一定偏好性，导致每个插入片段两端各9个碱基并非完全的随机分布，即每个测序读长的前9个碱基呈现一定偏好性(表3)。

表3 转座酶识别位点偏好性统计表

概率统计 (%)									
碱基位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	20.0375	21.08	24.8825	16.1325	36.29	38.2125	30.3475	34.4075	15.02
T	10.3075	36.355	29.0425	39.1625	35.6925	17.7975	23.9275	21.42	21.6425
C	25.125	24.66	25.1125	31.4525	13.8025	13.2325	19.8475	19.0425	39.17
G	44.345	17.3975	20.96	13.21	14.2175	30.7575	25.8775	25.13	24.165

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

