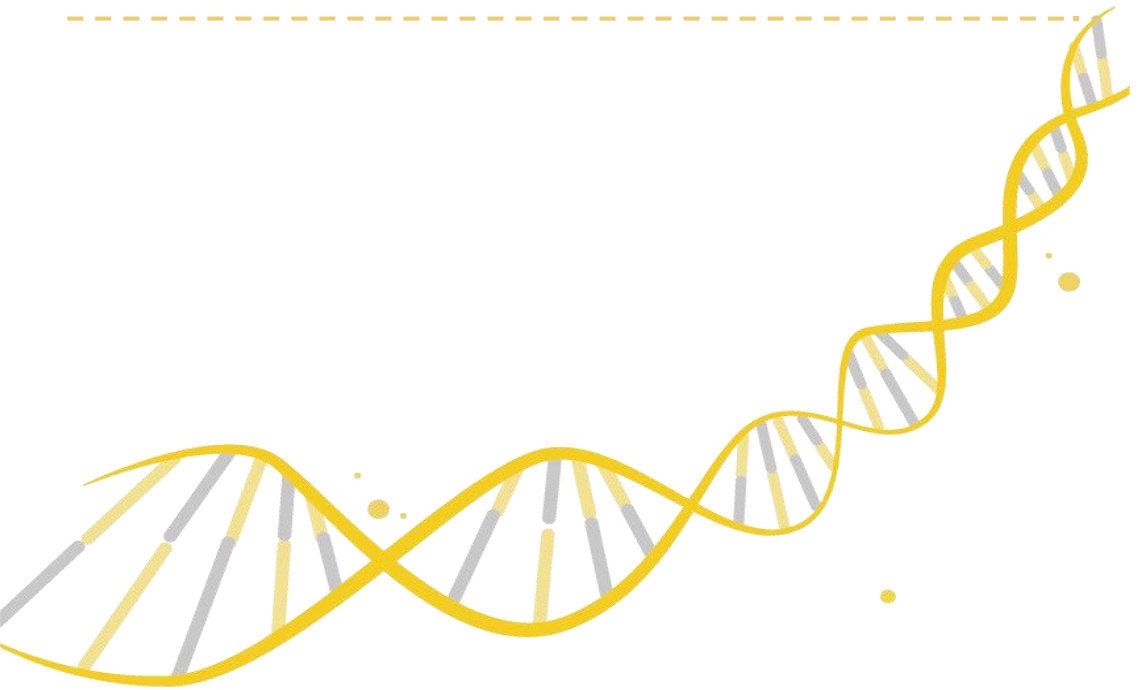
One-step DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (50 ng Input DNA)

RK20239



www.abclonal.com.cn

version: N17A04v4.2

目录

1. 产品介绍 1

2. 产品组分 1

3. 保存条件 2

4. 自备的材料 2

5. 注意事项 2

6. 实验原理和流程 3

7. 样本准备 5

8. 操作步骤 5

    8.1 DNA 片段化与产物纯化 5

    8.2 PCR 文库富集 7

    8.3 扩增产物纯化方案 8

    8.4 扩增产物片段大小分选方案 9

9. 附录 10

1. 产品介绍

One-step DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 是针对纯化的 DNA 样品进行快速文库构建的试剂盒。其原理是采用转座酶对 DNA 进行片段化并同时加上部分接头序列，再使用 N5(N5XX)和 N7(N7XX)进行 PCR 扩增，即可获得用于高通量测序的文库。与传统的 DNA 文库构建方法相比，降低了模板量的需求，减少了对仪器的依赖，且显著缩短了文库构建时间。构建的文库经质检合格后可直接用于 Illumina 平台测序分析。

该试剂盒适用于各类纯化的 DNA 样品（人、动物、植物、微生物基因组及纯化的 PCR 产物），起始模板 DNA 投入量为 50 ng。若为 PCR 样品，PCR 产物片段长度应大于 300 bp。因为转座酶无法作用于 DNA 末端，为了防止 PCR 文库末端覆盖度的降低，建议将 PCR 产物末端延长 50 bp。

试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，保证产品的稳定性和可重复性。

2. 产品组分

	名称	8 RXN	24 RXN	96 RXN
●	Tagment Enzyme T50	40 μL	120 μL	480 μL
●	5X Tagment Buffer	32 μL	96 μL	384 μL
●	Termination Buffer*	20 μL	60 μL	240 μL
●	PCR Mix	184 μL	552 μL	2208 μL
●	Control DNA (25 ng/μL)	20 μL	20 μL	20 μL

*，注：该组分使用前室温溶解，如果该组分出现了沉淀，属于正常现象；请在水浴 37℃中进行溶解，充分混匀后使用。

3. 保存条件

-20℃保存，采用干冰运输条件。

4. 自备的材料

磁珠：AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257)。

PCR primer 试剂盒： Dual DNA Adapter 96 Kit for One-step DNA Lib Prep（ABclonal, Cat.NO. RK20290）。

DNA 质控：ABQubit dsDNA Quantitation Kit（ABclonal, Cat.NO. RK30140）、Agilent 2100 Bioanalyzer。

其他试剂：80%乙醇溶液（新鲜配置）、超纯水等。

其他仪器耗材：PCR 仪器、（漩涡）振荡器、桌面微型离心机、低吸附 EP 管、移液吸头、低吸附薄壁 PCR 管（200 μL）、磁力架、单道或多道移液器。

5. 注意事项

5.1 关于 Input DNA

5.1.1 纯化后的 Input DNA，溶于灭菌超纯水中。

5.1.2 本试剂盒对 Input DNA 的量非常敏感，所以准确的 DNA 浓度测定对实验成功非常重要。推荐使用 Qubit 对 DNA 样品进行浓度测定。

5.1.3 本试剂盒对应 Input DNA 投入量为 50 ng，其它模板 DNA 投入量请参照对应产品的说明书(1ng，ABclonal, Cat.NO. RK20237；5 ng，ABclonal, Cat.NO. RK20238）。

5.1.4 本试剂盒配套了一个 Control DNA (25 ng/μL)样本，可用来作为阳性对照样本建库。

5.2 关于磁珠的使用

5.2.1 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。

5.2.2 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀。

5.2.3 轻轻吸取磁珠、加入 PCR 管中时，管壁、枪头不要残留磁珠。

5.2.4 转移上清时，请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量。

5.2.5 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。

5.2.6 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。

6. 实验原理和流程

6.1 实验原理

Tagment Enzyme 中包含转座酶和接头 Adapter 1 和 Adapter 2。将该预混液和 DNA 混合，55℃孵育 5 min，即可实现 DNA 片段化的同时末端加上接头。再使用 N5(N5XX)和 N7(N7XX)进行 PCR 扩增，即可获得用于高通量测序的文库。

6.2 实验流程

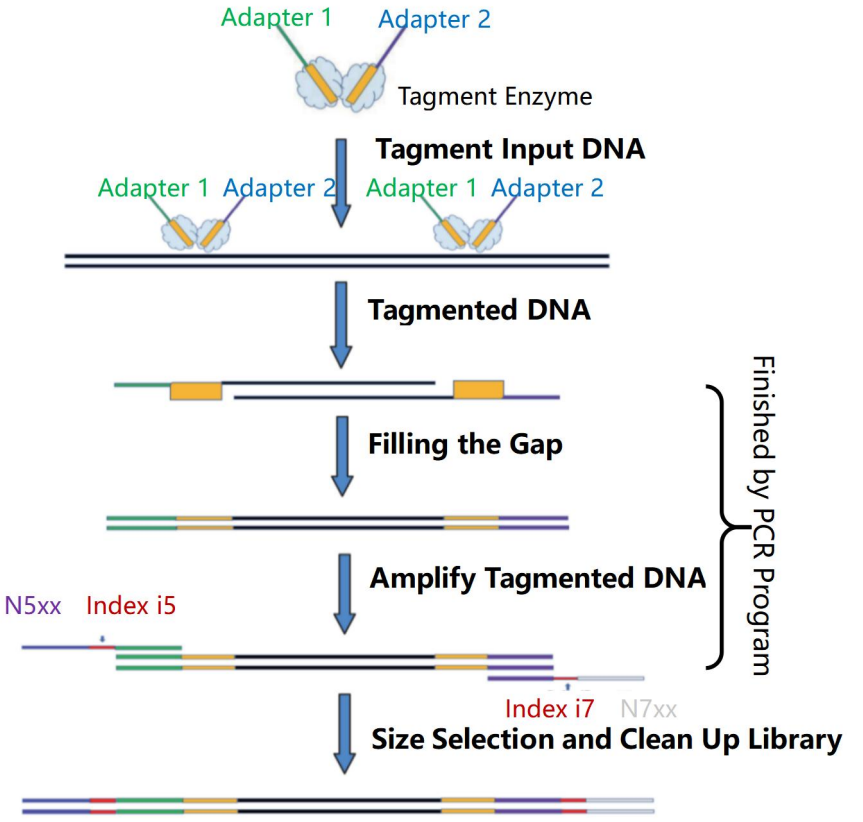


图 1. 实验流程图

6.3 文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5-index)TCGTCGGCAGCGTCAGAT GTGTATAAGAGACAG-NNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC (i7-index)ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

7. 样本准备

纯化的 DNA 样本溶于灭菌后超纯水中。试剂盒对 Input DNA 投入量较为敏感，建议采用 Qubit 对 DNA 样品进行准确定量。本试剂盒 Input DNA 投入量为 50 ng，Input DNA 量过多会导致文库打断的片段偏大，Input DNA 量过少，会导致文库打断的片段偏小。如果 Input DNA 投入量较大，可以选择 ABclonal 其它试剂盒（1ng，ABclonal, Cat.NO. RK20237；5 ng，ABclonal, Cat.NO. RK20238）。

8. 操作步骤

8.1 DNA 片段化与产物纯化

8.1.1 试剂准备

	试剂	储存条件	使用说明
🟢	5X Tagment Buffer	-20℃	冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
	样品 DNA	-20℃	冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
🟡	Tagment Enzyme T50	-20℃	冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
	ddH_2O	-20℃	融化后直接使用
🟢	Termination Buffer	-20℃	室温溶解，观察其是否存在沉淀，若存在沉淀，请 37℃加热溶解混匀，离心后使用
	AFTMag NGS DNA Clean Beads	4℃	使用前室温平衡半小时，使用前涡旋混匀
	80%乙醇	室温	将无水乙醇稀释至 80%浓度，现配现用

8.1.2 无菌 PCR 管中准备如下反应体系：

	试剂	使用量
	5X Tagment Buffer	4 μL
	Input DNA	50 ng
	Tagment Enzyme T50	5 μL
	ddH_2O	Up to 20 μL
	Total	20 μL

注：若有多个样品，请注意更换枪头，避免样品间交叉污染；加组分时可以先加入 ddH_2O，再加入其它组分，最后统一加入 Tagment Enzyme T50。

8.1.3 使用移液器上下吸打，充分混匀。

8.1.4 将 PCR 管放到 PCR 仪上，进行如下的反应程序：

反应温度	时间
热盖(75℃)	---
55℃	5 min
12℃	hold

8.1.5 反应结束，立即取出 PCR 管，加入 2 μL Termination Buffer，涡旋混匀或使用移液枪上下吸打，充分混匀后室温孵育 5 min。

注：此步骤是终止打断反应，使转座酶和 DNA 片段相互分离；若不进行此步骤会导致文库产量的降低。

8.2 PCR 文库富集

8.2.1 试剂准备

	试剂	储存条件	使用说明
●	PCR Mix	-20℃	冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
	Index Primers	-20℃	冰上解冻后涡旋混匀，离心后使用
	Tagment Products (from Step 8.1.5)	冰上	直接使用

8.2.2 配制 PCR 反应体系如下：

	试剂	使用量
●	PCR Mix	23 μL
	Tagment Products (来自步骤 8.1.5)	22 μL
●	N5xx (Index Primers)	2.5 μL
●	N7xx (Index Primers)	2.5 μL
	Total	50 μL

8.2.3 将配好的 PCR 反应体系涡旋混匀，离心后放入 PCR 仪进行如下程序：

反应温度	时间	循环数
热盖(105℃)	---	---
72℃	3 min	1
98℃	30 s	1
98℃	15 s	
60℃	30 s	7
72℃	1 min	
72℃	5 min	1
4℃	hold	---

8.2.4 PCR 反应结束后，可直接进行扩增产物纯化（按照操作步骤 8.3 扩增产物纯化方案进行操作）或者片段大小筛选（按照操作步骤 8.4 扩增产物片段大小分选方案进行操作）。

8.3 扩增产物纯化方案

8.3.1 试剂准备

试剂	储存条件	使用说明
AFTMag NGS DNA Clean Beads	4℃	使用前室温平衡半小时，使用前涡旋混匀
80%乙醇	室温	将无水乙醇稀释至 80%浓度，现配现用

8.3.2 加 50 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（1X），使用移液器上下吸打，充分混匀，室温静置 5 min。

8.3.3 将 PCR 管放到磁力架上，待溶液澄清后，移除上清液（不要碰到磁珠)。

8.3.4 加入 200 μL 的 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清液。

8.3.5 重复步骤 8.3.4 一次。

8.3.6 保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，并打开 PCR 管盖干燥至管中不再有残留乙醇。

8.3.7 取出干燥的 PCR 管，加入 32 μL 超纯水，充分混匀，室温孵育 2 min。

8.3.8 重新将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后，吸取 30 μL 上清液转移至新的 PCR 管中。

8.3.9 洗脱下来的 DNA 可以在-20℃冰箱长期保存，用于后续的 QC，测序等。

8.4 扩增产物片段大小分选方案

8.4.1 试剂准备

试剂	储存条件	使用说明
AFTMag NGS DNA Clean Beads	4℃	使用前室温平衡半小时，使用前涡旋混匀
80% 乙醇	室温	将无水乙醇稀释至 80%浓度，现配现用

片段分选方案如下表所示：

文库平均片段大小	350 bp	450 bp	550 bp
第一轮磁珠用量	35 μL（0.70X）	30 μL（0.60X）	25 μL（0.50X）
第二轮磁珠用量	10 μL（0.20X）	7.5 μL（0.15X）	7.5 μL（0.15X）

8.4.2 磁珠使用前涡旋混匀，按照表中需要筛选的片段大小，轻轻吸取第一轮磁珠需要的用量，加入 PCR 管中，涡旋振荡或移液器上下吸打充分混匀，室温静置 5 min。

8.4.3 将 PCR 管放到磁力架上，待溶液澄清后，移除上清液至新的 PCR 管中，丢弃磁珠。

8.4.4 按表中第二轮磁珠需要的用量，吸取相应体积的磁珠加至新的 PCR 管中，涡旋振荡或移液器上下吸打充分混匀，室温静置 5 min。

8.4.5 将 PCR 管放到磁力架上，待溶液澄清后，移除上清液。

8.4.6 加入 200 μL 的 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清液。

8.4.7 重复步骤 8.4.6 一次。

8.4.8 保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，并打开 PCR 管盖干燥至管中不再有残留乙醇。

8.4.9 取出干燥的 PCR 管，加入 22 μL 超纯水，充分混匀，室温孵育 2 min。

8.4.10 重新将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后，吸取上清液 20 μL 转移至新的 PCR 管。

8.4.11 洗脱下来的 DNA 可以在-20℃冰箱长期保存，用于后续的 QC，测序等。

9. 附录

9.1 文库鉴定

9.1.1 直接纯化的文库

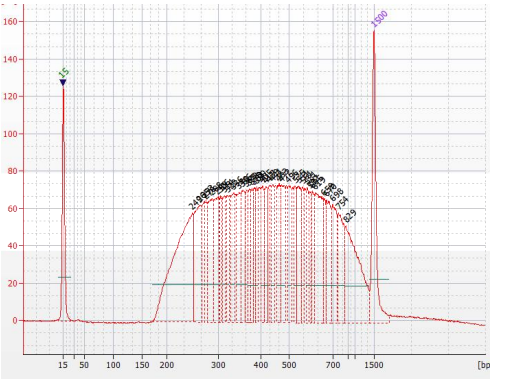


图 2. *E.coli* gDNA 建库直接纯化的片段化文库

按照操作步骤 8.3，使用 1.0X AFTMag NGS DNA Clean Beads 直接纯化 PCR 产物。然后使用 Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 chip 分析文库片段大小分布，典型的片段化文库大小分布在 200 bp-1000 bp。

9.1.2 分选后的文库

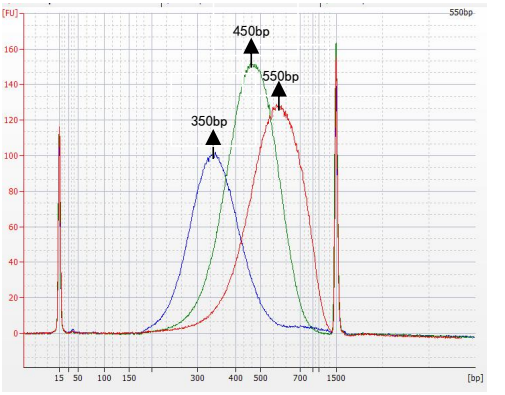


图 3. *E.coli* gDNA 片段分选后的文库

按照操作步骤 8.4 中磁珠的使用比例，获取预期平均大小的文库。然后使用 Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 chip 分析文库片段大小分布。

9.2 常见问题及解决方案

9.2.1 为什么打断的片段偏大？

答：由于转座酶对 Input DNA 样品的量十分敏感，所以浓度的准确测定对实验成功非常重要。文库打断的片段偏大的可能原因是 Input DNA 量过多，减少 Input DNA 的量会减少大片段的产生；还有可能是 Input DNA 中存在抑制剂。建议基于荧光法准确测定浓度，按照试剂盒推荐量加入。采用可靠的 DNA 纯化方法，去除可能干扰转座酶工作的化学物质，保留高质量的 DNA。

9.2.2 为什么打断的片段偏小？

答：文库打断的片段偏小主要的原因是 Input DNA 量过少或者是使用了降解的 DNA 样品，如 FFPE 样品等。建议增加 Input DNA 的量，使用高质量的 DNA 样品，或者减少 DNA 片段化时间。

9.2.3 PCR 文库富集反应程序中的第一步 72℃，3 min 可以删除吗？

答：不可以，因为该反应步骤是为了补齐转座酶打断过程中形成的缺口，如果删除该步骤，可能导致文库产量下降。

9.2.4 该产品除了可以打断基因组 DNA，可以用于其他 DNA 的片段化吗？

答：试剂盒也可以用于打断 PCR 产物，质粒，cDNA 等双链 DNA 样品。如果是 PCR 产物的话，建议长度大于 300 bp，两端各延伸 50 bp 左右，避免出现测序时末端覆盖度的下降。

9.2.5 One step 系列能提供多少 index 组合？

答：Dual DNA Adapter 96 Kit for One-step DNA Lib Prep（ABclonal, Cat.NO. RK20290）包含 8 中 N5XX 和 12 种 N7XX，可提供 96 种 index 组合。

中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院 2 号楼 4 楼

美国研发中心：86 Cummings Park Dr ,Woburn, MA 01801, United States

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com