

TransNGS® Tn5 DNA Library Prep Kit for Illumina® (for 5 ng DNA)

Tn5 DNA文库构建试剂盒 适配illumina平台 (for 5 ng DNA)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KP121

保存: -70°C及其以下温度下保存一年 (-18°C及其以下温度下保存六个月)。

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,适用于起始量为5 ng的小基因组、质粒及PCR扩增产物 (大于300 bp) 的文库制备试剂盒。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。**与传统文库制备必须进行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

将小基因组 (细菌、古细菌、双链DNA病毒等), 质粒以及PCR扩增产物 (大于300 bp)制备成适用于Illumina高通量测序平台的短片段文库。

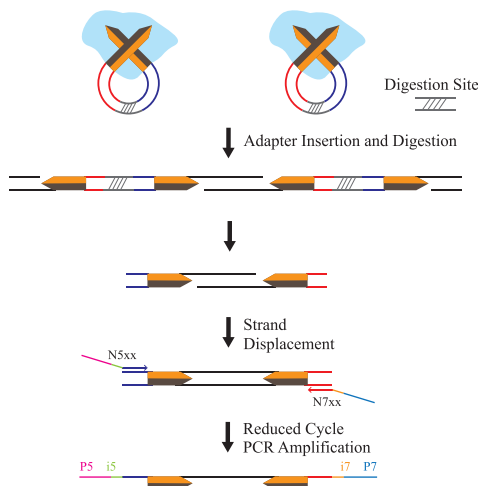
试剂盒组成

Component	KP121-11 (12 rxns)	KP121-03 (96 rxns)
Tn5-5 Enzyme Mix	24 µl	192 µl
5×Insertion and Digestion Buffer II	36 µl	288 µl
4×Stop Buffer	60 µl	480 µl
TransNGS® Tn5 Library Amplification SuperMix (2×)	300 µl	4×600 µl
Library Elution Buffer (LEB)	600 µl	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DNA溶液, 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-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[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。

4×Stop Buffer 置于室温下彻底解冻。

(1) 将灭菌 PCR 管置于冰上, 加入

Component	Volume
Tn5-5 Enzyme Mix	2 µl
5 ng DNA	Variable
5×Insertion and Digestion Buffer II	3 µl
Nuclease-free Water	Variable
Total volume	15 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 5 µl 4×Stop Buffer, 移液枪吹吸混匀, 立即置于冰中。

2、文库扩增

(1) 冰上加入

Component	Volume
上步产物	20 µl
<i>TransNGS</i> ® Tn5 Library Amplification SuperMix (2×)	25 µl
N5xx*	2.5 µl
N7xx*	2.5 µl
Total volume	50 µl

**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℃	3 min*	
98℃	3 min	
98℃	30 sec	9 cycles
62℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	3 min	
≤10℃	Hold	

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



3. 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℃ 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 μl 反应产物全部加入管中。若产物不足 50 μl,需用 Nuclease-free Water 补齐。

(3) 振荡磁珠使其充分混匀,参考附录表 1 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 μl 磁珠 = 50 μl 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 1 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 μl 磁珠 = 50 μl 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 μl 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 μl 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 μl 洗脱液转移到干净 EP 管中,产物可于 -20℃ 保存。



附录

表1 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)	~300	~350	~550
第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.65×	0.6×	0.55×
第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.15×	0.15×	0.12×

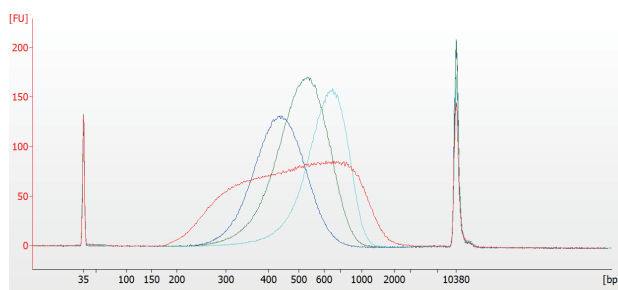


图1 使用MagicPure® Size Selection DNA Beads 片段分选结果参照图
文库扩增产物—使用本试剂盒制备的细菌基因组文库，9个PCR循环后经1.0×磁珠纯化；
0.65× + 0.15× / 0.6× + 0.15× / 0.55× + 0.12×-经相应磁珠比例分选后的文库

注意事项

- 4×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 2)。

表 2 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: V2-202412

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

