

*Trans*NGS[®] DNA Library Prep Kit for MGI[®]

使用前请仔细阅读说明书





品质高于一切
精品服务客户



使用前请仔细阅读说明书

目录号: KP221

保存: -20°C保存一年。

产品说明

TransNGS[®] DNA Library Prep Kit for MGI[®] 是针对 MGI 高通量测序平台开发的, 适用于将 1 ng -1 μg 片段化的 dsDNA 高效快速地构建为测序文库试剂盒。本试剂盒的样本可为超声打碎的基因组 DNA、酶切产物、核酸扩增产物、免疫共沉淀 DNA (ChIP DNA)、石蜡切片 DNA (FFPE DNA) 等片段化的 dsDNA, 并可结合外显子或其它靶向捕获试剂进行外显子测序或靶向捕获测序。

特点

- 适用样本类型广泛。
- 高文库转化率。

适用范围

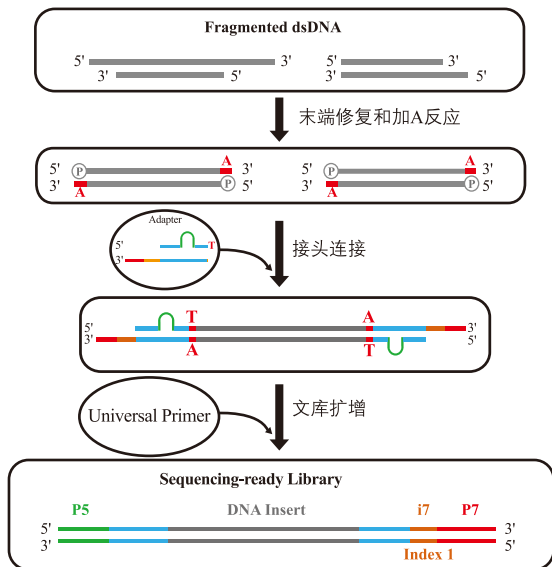
- 全基因组测序。
- 靶基因测序。
- 外显子测序 / 其它靶向捕获测序。
- 宏基因组测序。
- 免疫共沉淀测序。

试剂盒组成

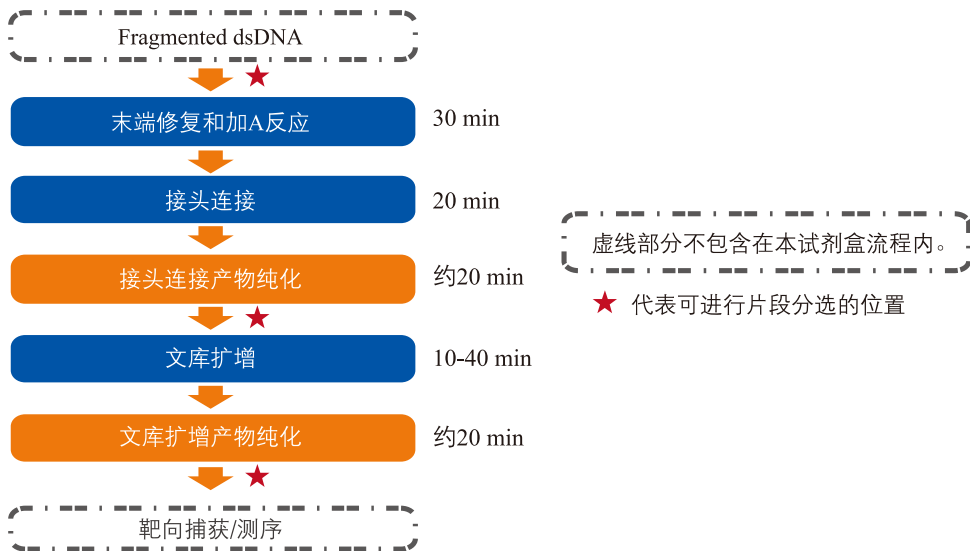
Component	KP221-01 (12 rxns)	KP221-02 (96 rxns)
End-repair and A-tailing Reaction Mix	120 μl	960 μl
End-repair and A-tailing Enzyme Mix II	60 μl	480 μl
End-repair and A-tailing Enhancer	36 μl	288 μl
Adapter Dilution Buffer	600 μl	5 ml
Adapter-ligation Buffer II	360 μl	4×720 μl
Adapter-ligation Enzyme	60 μl	480 μl
<i>TransNGS</i> [®] Library Amplification SuperMix (2×)	300 μl	4×600 μl
<i>TransNGS</i> [®] Universal Primer for MGI [®]	60μl	480μl
Library Elution Buffer	2 ml	4×4 ml
Nuclease-free Water	1 ml	5 ml



文库构建原理示意图及流程图



文库构建原理示意图
(i5 位置以虚线表示是指有些文库没有此 Index。)



文库构建流程图



文库结构

本试剂盒使用 *TransNGS*[®] Indexed Adapter Kit for MGI[®] (目录号:K1401), 所得文库结构如下:

5'-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT-XXXXXXXX-AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAA

[i7]CAACTCCTTGGCTACA-3'

i7: Index 1, 10 bases;

-XXXXXXXX-: 插入序列。

起始样本要求

- 起始样本为 1 ng -1 μg 溶于 Nuclease-free Water 或 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 的基因组 DNA, 请使用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8-2.0 之间的高纯度样本。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。
- 起始样本量指准备进行末端修复、加 A 尾的片段化 dsDNA 量, 如片段化过程中有损失, 或片段化后进行片段纯化或分选等处理, 文库构建开始前请再次精确定量。
- 若起始样本在制备过程中含有过多的金属离子螯合剂或者其他盐类, 可能会影响末端修复与加 A 反应。如果条件不满足, 则需要对片段化后的 DNA 产物进行纯化或者分选后, 用于下一步的文库构建。

文库构建

自备试剂: 新鲜配制的 80% 乙醇, *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)。

- 以下操作步骤不包含片段分选步骤, 片段分选可在末端修复前、接头连接后或文库扩增后进行, 且只需进行一次。推荐在接头连接后或文库扩增后进行分选。
- 使用 *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行片段分选的参考条件见附录表 1。
- 如起始样本量 ≤ 50 ng, 不建议在接头连接后进行分选, 可在文库扩增后进行分选。

1、末端修复和加 A 反应

Component	Volume	Volume
Fragmented dsDNA	Variable (1 ng-10 ng)	Variable (10 ng-1 μg)
Nuclease-free Water	Variable	Variable
End-repair and A-tailing Reaction Mix	10 μl	10 μl
End-repair and A-tailing Enzyme Mix II	5 μl	5 μl
End-repair and A-tailing Enhancer*	3 μl	--
Total volume	60 μl	60 μl

* 起始样本量 ≤ 10 ng 时, 需加入 End-repair and A-tailing Enhancer。

注意: 如样本数量大于 1, 可先将反应试剂混匀于一管, 再分到每个反应管中。

混匀后的反应试剂随着放置时间的延长, 效率会有所下降, 因此尽量现用现配。

(2) 移液枪吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体。

(3) 将反应管置于 PCR 仪中, 进行以下孵育步骤 (热盖温度 ≥ 80°C)

28°C 15 min

68°C 15 min

4°C Hold



2. 接头连接

- (1) 冰上溶化 *TransNGS*[®] Indexed Adapter for MGI[®], 并参考下表准备合适浓度的 Adapter。
如需稀释, 使用 Adapter Dilution Buffer 进行稀释。

起始样本量	Adapter 稀释倍数	稀释后 Adapter 浓度
100 ng < x ≤ 1 μg	不稀释	20 μM
25 ng < x ≤ 100 ng	稀释 2 倍	10 μM
5 ng < x ≤ 25 ng	稀释 10 倍	2 μM
1 ng ≤ x ≤ 5 ng	稀释 25 倍	0.8 μM

- (2) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上, 依次加入

Component	Volume
合适浓度的 Adapter	5 μl
Adapter-ligation Buffer II	30 μl
Adapter-ligation Enzyme	5 μl
Total volume	100 μl

注意: 如样本数量大于 1, 可先将反应试剂混匀于一管, 再分到每个反应管中。混匀后的反应试剂随着放置时间的延长, 效率会有所下降, 因此尽量现用现配。

- (3) 移液枪吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体。
(4) 将反应管置于 PCR 仪中, 20°C 孵育 20 分钟 (盖子不加热)。连接产物可立即进行纯化, 或于 -20°C 保存。

3. 接头连接产物纯化

推荐使用 0.4× *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化。如纯化后需要进行片段分选, 洗脱时推荐使用 105 μl Library Elution Buffer, 转移 100 μl 洗脱产物至干净 1.5 ml 离心管中, 再进行片段分选。

使用 0.4× 磁珠纯化的具体操作如下:

- 从 2-8°C 取出磁珠, 室温静置 30 分钟后备用。
- 振荡磁珠使其充分混匀, 吸取 40 μl 磁珠 (0.4×) 加入上步产物中。
- 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。
- 将反应管置于磁力架上, 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。
- 保持反应管在磁力架上, 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。
- 重复步骤 (5) 一次。
- 保持反应管在磁力架上, 室温晾干磁珠。
注意: 切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。



- (8) 将反应管移出磁力架，加入 23 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 2 分钟。
- (9) 将反应管置于磁力架上，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。
- (10) 小心吸取 20 μ l 洗脱液转移到干净 PCR 管中，进行下步文库扩增反应，或于 -20°C 保存。
注意：低浓度 DNA 不宜稳定保存，如起始样本量 ≤ 50 ng，建议立即进行文库扩增，不建议 -20°C 保存。

4. 连接后分选（可选）

可选步骤：接头连接产物纯化后分选（gDNA 打断后可在此步骤进行分选）

按照 3、接头连接产物纯化步骤进行操作，在完成 3、（7）步骤后，按照以下步骤进行操作

- (1) 将反应管移出磁力架，加入 105 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 5min。
- (2) 将反应管置于磁力架上，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。
- (3) 小心吸取 100 μ l 洗脱液转移至干净的 PCR 管中。
- (4) 取出已室温静置 30min 后的磁珠，振荡使其充分混匀，吸取 60 μ l 磁珠（0.6X）加入上步洗脱液中。
- (5) 移液枪吹吸或振荡充分混匀后，室温静置 5 分钟。
注意：混匀不充分会显著影响实验结果
- (6) 将反应管置于磁力架上，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。吸取全部上清（约 160 μ l 上清）至干净的 PCR 管中。
- (7) 取出已室温静置 30min 后的磁珠，振荡使其充分混匀，吸取 15 μ l 磁珠（0.15X）加入上一步吸出的上清中。
- (8) 移液枪吹吸或振荡充分混匀后，室温静置 5 分钟。
注意：混匀不充分会显著影响实验结果
- (9) 将反应管置于磁力架上，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。
- (10) 保持反应管在磁力架上，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 30s，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) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。
注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。
- (13) 将反应管移出磁力架，加入 23 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 2 分钟。



- (14) 将反应管置于磁力架上，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 洗脱液转移到干净的 PCR 管中，进行下步文库扩增，或于 -20 $^{\circ}$ C 保存。
注意：低浓度 DNA 不宜稳定保存，如起始样本量 \leq 50ng，建议立即进行文库扩增，不建议 -20 $^{\circ}$ C 保存。

5、文库扩增

- (1) 将无菌 PCR 管置于冰上，依次加入

Component	Volume
上步纯化产物	20 μ l
TransNGS [®] Library Amplification SuperMix (2 \times)	25 μ l
TransNGS [®] Universal Primer for MGI	5 μ l
Total volume	50 μ l

- (2) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体。
(3) PCR 仪中进行以下扩增程序。

98 $^{\circ}$ C	5 min	} 2-14 cycles*
98 $^{\circ}$ C	30 sec	
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	3 min	
\leq 10 $^{\circ}$ C	Hold	

* 针对不同的起始样本量，文库产量参照附录表 2。

6、文库扩增产物纯化

推荐使用 1.0 \times MagicPure[®] Size Selection DNA Beads (目录号:EC401) 进行产物纯化。TransNGS[®] Library Amplification SuperMix (目录号:KA101) 不会影响磁珠纯化的片段大小，此步纯化也可根据需要增大 (获得含更小插入片段的文库) 或者减小磁珠比例 (减少引物残留)。如纯化后需要进行片段分选，洗脱时推荐使用 105 μ l Library Elution Buffer，转移 100 μ l 洗脱产物至干净 1.5 ml 离心管中，再进行片段分选。

使用 1.0 \times 磁珠纯化的具体操作如下：

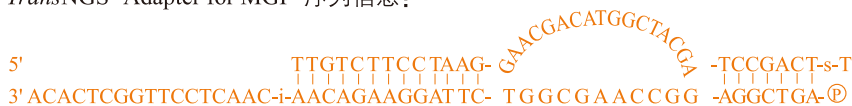
- (1) 从 2-8 $^{\circ}$ C 取出磁珠，室温静置 30 分钟后备用。
(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取 50 μ l 磁珠 (1.0 \times) 加入上步产物中。
(3) 移液枪吹吸混匀，室温静置 5 分钟。
注意：混匀不充分会显著影响实验结果。
(4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。
注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。



- (5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入 200 μ l 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。
- (6) 重复步骤 (5) 一次。
- (7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。
注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。
- (8) 将反应管移出磁力架，加入 23 μ l Library Elution Buffer。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 5 分钟。
- (9) 将反应管置于磁力架上，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。
- (10) 小心吸取 20 μ l 洗脱液转移到干净 1.5 ml 离心管中，产物可于 -20°C 保存。

附录

TransNGS® Adapter for MGI® 序列信息：



-s- 代表硫代修饰，-Ⓟ 代表磷酸化修饰。

表 1 使用 MagicPure® Size Selection DNA Beads 片段分选参照表

文库平均长度 (bp)		~320	~470	~670
文库插入片段长度 (bp)		~200	~350	~550
末端修复前进行分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	1.0×	0.7×	0.55×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.25×	0.2×	0.15×
接头连接产物纯化后进行分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.9×	0.68×	0.56×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.2×	0.15×	0.12×
文库扩增产物纯化后进行分选	第一次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.85×	0.65×	0.57×
	第二次体积比 (DNA Beads: DNA)	0.15×	0.1×	0.1×

注意：片段分选只需在三处可选位置的其中之一处进行，为了片段分选的精确性，建议片段分选前的样本体积为精确的 100 μ l。三处可选位置的磁珠比例不同是由插入片段两端的序列长度不同引起的。由于不同样本片段长度分布的差异，使用相同的条件进行分选时，所得产物片段长度也会有所差异。



表 2 不同起始样本量产出 100 ng/1 μg 文库推荐扩增循环数

样本起始量	推荐扩增循环数 *	
	100 ng 文库	1 μg 文库
1 μg	3**	3**
500 ng	3**	3-4
100 ng	3**	5-6
50 ng	2-3	6-7
10 ng	6-7	9-10
5 ng	7-8	10-11
1 ng	10-11	13-14

* 本表中推荐的循环数均为使用超声打碎的平均长度约 300 bp 的高质量来源于人基因组的 Fragmented dsDNA 进行文库构建的经验值，文库构建过程中未进行片段分选。如 DNA 纯度较差、DNA 损伤严重等情况，请适当增加循环数。

** 由于 MGI 平台接头设计原因，必须进行文库扩增后才能进行环化，因此需要至少 3 个循环以使绝大多数文库 dsDNA 转变为可环化 dsDNA。

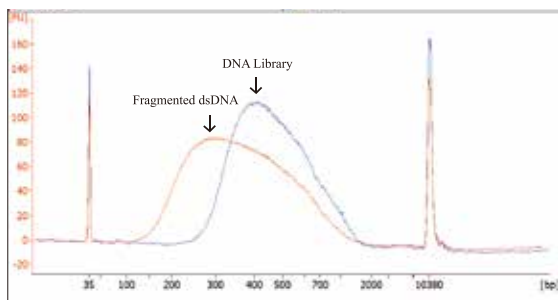


图 1 文库构建前后片段长度分布变化示意图

红线：超声打碎的人类基因组 DNA 样本；

蓝线：经本试剂盒构建后的文库，文库构建过程中未进行片段分选。

注意事项

- 为获得更优质的测序数据，推荐在接头连接后或文库扩增后进行片段分选。
- 反应液的混匀应避免剧烈震荡，以防酶活降低，导致文库构建效率下降。
- 如使用磁珠进行纯化或片段分选，在洗脱时应充分混匀磁珠。充分混匀的磁珠应悬浮均匀，无肉眼可见的颗粒物，且静置 2 分钟后无沉降。
- 浓度小于 1 ng/μl 的样本建议存放于低吸附离心管中，或存放于含 1×TransNGS® Library Dilution Buffer (目录号:KB101) 的普通离心管中，以免普通离心管壁对核酸样本的吸附降低有效样本浓度。
- 文库扩增循环数越大，测序数据的重复率越高，即有效数据越少。因此，建议在满足下游应用的基础上，尽量使用较少的扩增循环。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V4-202111

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

