xLiBPreP™转座酶 DNA 快速建库试剂盒 (50 ng/5 ng/1ng)

操作说明书

(Cat#TC001/TC002/TC003, Version1.0)

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co.,Ltd

For Research Use Only.
Not For Use in Diagnostic Procedures.

仅供科研使用

目录

产品概述 1

实验原理与流程概要 2

产品组成 4

保存与运输条件 4

适用范围 4

注意事项 5

实验前准备 8

实验流程 8

1. DNA 片段化 8

2. 纯化片段化产物 9

3. 文库 PCR 富集 10

4. 文库纯化或分选 11

5. 文库质检 13

产品概述

xLiBPreP™转座酶 DNA 快速建库试剂盒(50 ng/5 ng/1ng)是针对 Illumina 高通量测序平台定向开发的转座酶法建库试剂盒。和传统文库构建方法相比，xLiBPreP™转座酶 DNA 快速建库试剂盒(50 ng/5 ng/1ng)采用新型 Tn5 转座酶和优化的缓冲体系，能够将繁琐的 DNA 片段化、 末端修复和接头连接反应等步骤变为一步简单的酶促反应，在降低起始模板投入量的同时，显著缩短文库构建时间并获得优异的测序质量。该试剂盒共有三种规格，分别适用于起始模板 DNA 为 50 ng 、5 ng 和 1 ng 的反应，使用者可根据实验类型自由选择。试剂盒中所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

实验原理与流程概要

1. 基本原理

在 Tn5 Transposome 中包含转座酶和两种等摩尔的接头 Adapter 1 和 Adapter 2。转座发生时，该转座子将 Adapter 1 和 Adapter 2 接头序列插入靶基因中，形成一端带有 Adapter 1，一端带有 Adapter 2 的 DNA，之后利用 DNA 聚合酶将转座形成的切口补齐。使用 YWG™ illumina 转座酶接头套装引物扩增后，即可获得用于高通量测序的文库。

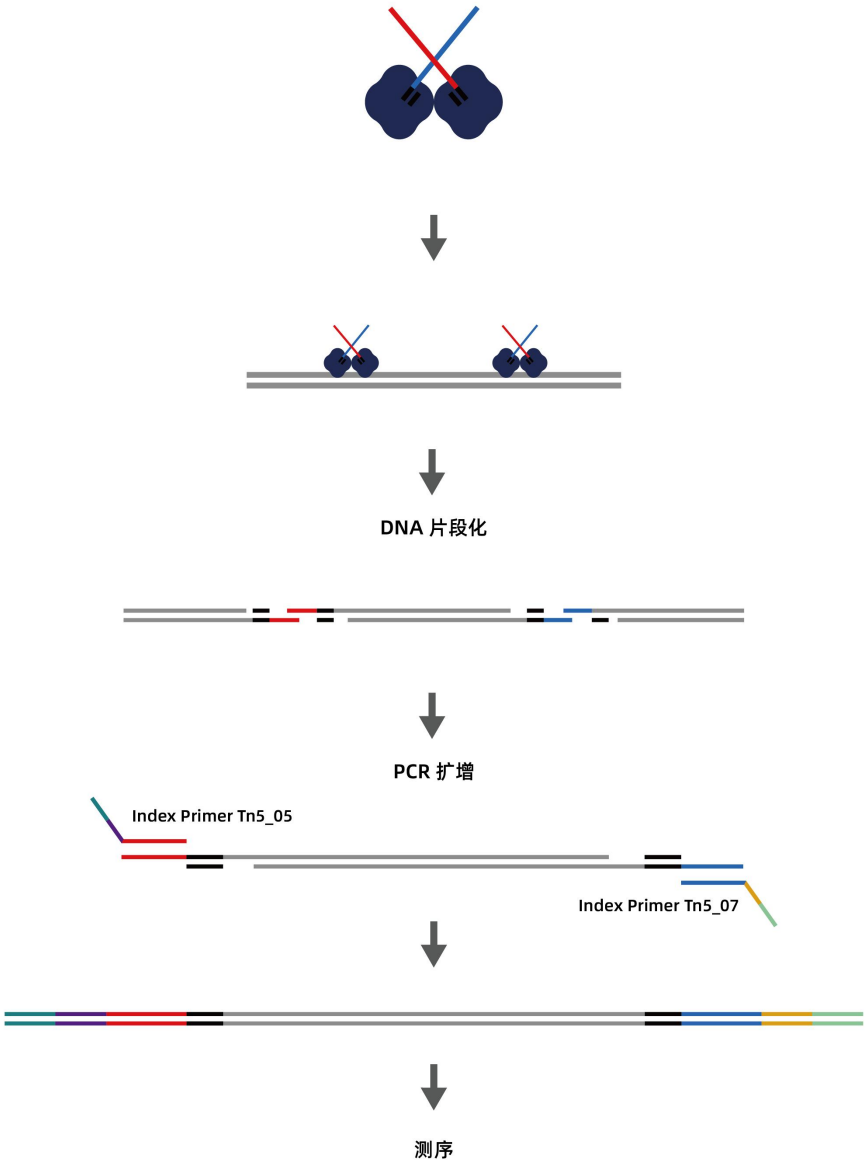

图 1. xLiBPreP™转座酶 DNA 快速建库试剂盒(50 ng/5 ng/1ng)建库原理示意图

2. 文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5 index]TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[i7 index]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

3. 流程概要

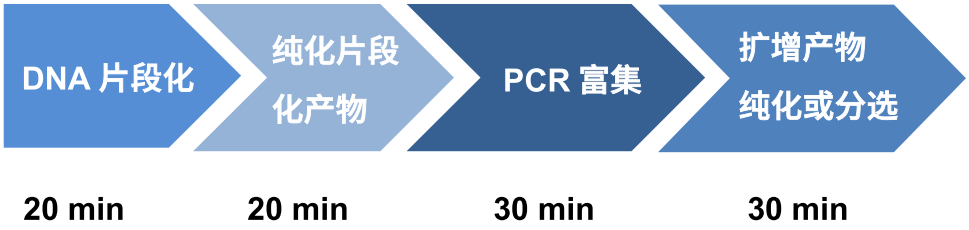

图 2. xLiBPreP™转座酶 DNA 快速建库试剂盒(50 ng/5 ng/1ng)建库流程示意图

产品组成

主货号：TC001/TC002/TC003　　规格：8 rxns/24 rxns / 96 rxns

货号	TC001	TC002	TC003
规格	8/24/96 rxns	8/24/96 rxns	8/24/96 rxns
起始 DNA	50 ng	5 ng	1 ng
Tn5 Transposome V1	16/48/192 μL	-	-
Tn5 Transposome V2	-	16/48/192 μL	-
Tn5 Transposome V3	-	-	16/48/192 μL
5x Tagment Buffer	32/96/384 μL	32/96/384 μL	32/96/384 μL
Termination Buffer	40/120/480 μL	40/120/480 μL	40/120/480 μL
2X HiFi Master Mix	200/600/2400 μL	200/600/2400 μL	200/600/2400 μL

产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖的颜色 。

保存与运输条件

-30 ～ -15 ℃保存，⩽ 0 ℃运输

适用范围

本产品适用于纯化的基因组 DNA、cDNA 和 PCR 产物。

注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 请于使用前将试剂盒酶组分置于冰盒解冻，Buffer 组分置于室温解冻，解冻后上下颠倒充分混匀。
2. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
3. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度。
4. 如 DNA 样品为 PCR 产物，应保证其长度>500 bp。因转座酶无法作用于 DNA 末端，因此 PCR 产物最末端 50 bp 测序覆盖度可能会有所降低。我们推荐您在制备 PCR 产物时将待测区域两末端各延长 50-100 bp，以避免末端测序覆盖度降低的情况。
5. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
6. 使用前将磁珠平衡至室温，所有磁珠操作都应于室温进行，切勿将磁珠置于-20°C 冻存。
7. 80%乙醇应现配现用，漂洗磁珠后应尽量吸干残留乙醇。
8. 本产品仅作科研用途！

实验前准备

1. Input DNA

因为 Tn5 Transposome 对 DNA 浓度非常敏感，所以准确的 DNA 浓度测定对实验成功与否至关重要。推荐使用 Qubit 或荧光染料 PicoGreen 对 DNA 样品进行浓度测定。A260/280=1.8-2.0。

2. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#MB002	xCapSeq™ SPRI Beads	/
WisGen#YG010	YWG™ Transposase Index Kit for illiumina	/
*	Nuclease-Free Water	/

* 常规实验室供应商品牌即可

3. 自备材料

实验仪器及耗材

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	PCR 基因扩增仪	/
*	微型离心机	/
*	涡旋振荡混匀仪	/
*	移液器	单通道或多通道
Thermo Fisher# Q33216	Qubit® 3.0 Fluorometer	可选择基于荧光染料法的 DNA 定量系统的其它同类产品
Agilent#G2939AA	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system	或其它同类产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
WisGen#MR-C-16	xMag™ 磁力架 (0.2 mL*16 孔)	或其它同类产品
WisGen#QC001-R	xQuant™ 管 (适配 Qubit® 平台)	可选择适配 Qubit® 荧光计的其它同类产品
WisGen#QC002-R	xQuant™ 检测联管 (适配 Qubit® 平台)	可选择适配 Qubit® Flex 荧光计的其它同类产品
Axygen#PCR-02-C	0.2 mL 透明平盖 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的 其它同类产品
Axygen# PCR-0208-C	0.2 mL 八连排透明 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的 其它同类产品
Axygen# MCT-060-L-C	0.5 mL 低吸附离心管	可选择低吸附的 其它同类产品
*	1.5 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶的 产品
*	1000 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	200 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	0.5 - 10 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品

* 常规实验室供应商品牌即可

实验流程

1. DNA 片段化

1.1 室温解冻 5× Tagment Buffer 和 Termination Buffer，上下颠倒混匀后备用。 在灭菌 PCR 管中配制如下反应体系：

组分	体积 (μL)
1 ng/5 ng/50 ng input DNA	x
Tn5 Transposome	2
5× Tagment Buffer	4
ddH_2O	14-x
总体积	**20**

1.2 使用移液器吹打混匀。

1.3 将反应管置于 PCR 中，运行如下程序（热盖: 65 ℃）：

温度	时间
55℃	10 min

1.4 反应结束后，立刻向产物中加入 5 μL Termination Buffer，使用移液器吹打混匀。

注意：反应完成后应立即加入 Termination Buffer 终止反应，否则 DNA 样品将过度片段化，导致最终文库片段变小。

1.5 将反应管置于 PCR 中，运行如下程序（热盖: 65 ℃）：

温度	时间
55℃	10 min

2. 纯化片段化产物

2.1 向管中加入 1.0×（25 μL）的分选磁珠，涡旋振荡或移液器吹打 20 次混匀，室温孵育 5 min。

2.2 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。

2.3 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

2.4 重复步骤 **2.3**，总计漂洗两次。

2.5 短暂离心去除 PCR 管内剩余酒精，开盖干燥磁珠至磁珠呈现磨砂状。

2.6 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。

2.7 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 2 min），小心转移 20 μL 上清至干净的 PCR 管中。

3. PCR 富集

3.1 将 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

组分	体积 (μL)
上一步产物	20
2× HiFi Master Mix	25
Index Primer*	5
总体积	**50**

* 需使用 Tn5 转座酶法建库专用的 Tn5_05, Tn5_07 index primer，推荐选择 YWG™ illumina 转座酶接头套装（WisGen#YG010）。

3.2 使用移液器吹打混匀，将反应管置于 PCR 中，运行如下反应程序：

温度（℃）	时间	循环数
72 ℃	3 min	1
95 ℃	30 sec	1
95 ℃	10 sec	n*
55 ℃	30 sec	
72 ℃	30 sec	
72 ℃	5 min	1
4 ℃	hold	1

* 起始量为 50 ng 时，推荐 5-8 个循环数；起始量为 5 ng 时，推荐 9-12 个循环数；起始量为 1 ng 时，推荐 11-14 个循环数。

注意：转座反应产物并非完整的双链 DNA，72°C 孵育 3 min 用于进行链置换反应，生成成熟的 PCR 模板，请勿删除该步骤！

3.3 PCR 反应结束后进行纯化或分选。

4. 文库纯化或分选

4.1 如对文库长度分布无特殊要求，可直接使用 1.0×磁珠纯化扩增产物，具体步骤如下：

4.1.1 将平衡至室温的分选磁珠，振荡或上下颠倒混匀。

4.1.2 向 PCR 产物中加入 1.0×（50 μL）的分选磁珠，涡旋振荡或移液器吹打 20 次混匀，室温孵育 5 min。

4.1.3 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。

4.1.4 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

4.1.5 重复步骤 **4.1.4**，总计漂洗两次。

4.1.6 短暂离心去除 PCR 管内剩余酒精，开盖干燥磁珠至磁珠呈现磨砂状。

4.1.7 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 15 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。

4.1.8 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 2 min），小心转移 15 μL 上清至干净的 PCR 管中，于-20 ℃保存。

4.2 如需进行片段分选，进行以下步骤：

4.2.1 根据所需扩增产物长度选择合适的磁珠用量，具体的使用量参见下表：

文库平均总长度	280~380 bp	340~440 bp	450~550 bp
第一轮磁珠用量	0.7×(35 μL)	0.6×(30 μL)	0.5×(25 μL)
第二轮磁珠用量	0.2×(10 μL)	0.2×(10 μL)	0.2×(10 μL)

4.2.2 将平衡至室温的分选磁珠，振荡或上下颠倒混匀。

4.2.3 根据上表吸取第一轮磁珠用量至 50 μL PCR 产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打 20 次充分混匀，室温孵育 5 min。

4.2.4 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移上清到干净的离心管中。

4.2.5 吸取第二轮磁珠用量至上清液中，涡旋振荡或使用移液器吹打 20 次充分混匀，室温孵育 5 min。

4.2.6 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。

4.2.7 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

4.2.8 重复步骤 **4.2.7**，总计漂洗两次。

4.2.9 短暂离心去除 PCR 管内剩余酒精，开盖干燥磁珠至磁珠呈现磨砂状。

4.2.10 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 15 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。

4.2.11 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 2 min），小心转移 15 μL 上清至干净的 PCR 管中，于-20 ℃保存。

5. 文库质量检测

5.1 文库浓度测定

为了得到高质量的测序结果，必须对文库浓度进行精确测定。xLiBPreP™转座酶 DNA 快速建库试剂盒(50 ng/5 ng/1ng)文库产出参照表如下：

TC001（50 ng input）扩增数	5	6	7	8
TC002（5 ng input）扩增数	9	10	11	12
TC003（1 ng input）扩增数	11	12	13	14
文库产出（不进行分选产量，ng）	250	400	750	1200
文库产出（进行分选产量，ng）	100	150	300	500

表中所述 ng 数为文库总质量。文库质量浓度可由该数值除以文库终体积计算而得。

5.2 文库长度分布检测

将制备好的文库在 Agilent 2100 Bioanalyzer 或者 Qsep 上进行长度分布检测。

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co., Ltd
Add：浙江省杭州市钱塘区福城路 400 号 6 幢 8 层
Service： order@wisgen.cn Web : www.wisgen.cn