

Tn5-DNAseq Library Prep Kit

AT4101-01/02/03 使用说明书

产品简介

Tn5-DNAseq Library Prep Kit 是针对 illumina 测序平台开发的 DNA 文库构建试剂盒。试剂盒极大的简化了 DNA 小片段文库构建过程，使用一步简单的酶促反应替代了传统 DNA 文库构建过程中的片段化、末端修复以及接头连接反应等步骤，显著缩短了文库构建的时间。仅需 2.5h 即可将 5ng/50ng DNA 构建成高质量的 DNA 文库。试剂盒操作简单，极大的避免了繁杂操作带来的误差，构建的文库均一性高。

试剂盒组成

AT4101-03				
产品名称	(6 次)	(24 次)	(96 次)	保存条件
Tn5-Frag Buffer	24 uL	96 uL	384 uL	-20℃
TnZ	24 uL	96 uL	384 uL	-20℃
Stop Solution	120 uL	480 uL	1920 uL	4℃
Tn5-PCR Buffer	60 uL	240 uL	960 uL	-20℃
dNTP(2.5 mM)	25 uL	100 uL	400 uL	-20℃
Tn5-Universal Primer	30 uL	120 uL	480 uL	-20℃
Tn5-PCR Enzyme	1.5 uL	5 uL	20 uL	-20℃

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
4. DNA 浓度需使用 Qubit 测定，起始 DNA 量测定不准确，会影响文库得率。
5. 实验所用磁珠应提前 30 分钟自 4℃环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
6. Stop Solution 在使用前，请确保其恢复室温，如有沉淀析出，请放置 37℃加热混匀，使沉淀溶解。
7. 80%乙醇需现配现用，用其清洗磁珠后，需清除干净，避免对后续反应产生影响。

需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-free H₂O；ATPure Plus beads（DNA 片段分选纯化磁珠）或效果相同的纯化磁珠
 200uL PCR 管；1.5mL 离心管；磁力架；

实验原理图

操作步骤

一，样本片段化反应：

1. 在新的 PCR 管中配制如下反应体系：

DNA 样品(5ng/50ng)	X uL
Tn5-Frag Buffer	4.0 uL
TnZ*	4.0 uL
Nuclease-free H ₂ O	(12-X) uL
总体积	20.0 uL

* TnZ 在使用时，请先使用移液器轻轻吹打，混合均匀，然后每个样本单独加入，切勿配置混合液

移液器轻轻吹打 20 次充分混匀，55℃ 反应 5 分钟，热盖 70℃；

反应结束后加入 20uL Stop Solution 并且充分混匀；

- 移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，转移混和样本至新的 1.5 mL 离心管中，室温孵育 5min；
- 2) 将反应管短暂离心并置于磁力架上，放置 5min，待溶液澄清，移除上清；
 - 3) 保持离心管始终处于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；
 - 4) 重复步骤 3，总计漂洗两次；
 - 5) 保持离心管始终处于磁力架中，开盖干燥 5min，直至磁珠表面无液体；
 - 6) 将离心管从磁力架中取出，加入 27 μ L Nuclease-free H₂O 洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀；
 - 7) 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清吸取 25.8 μ L 上清至干净的 200 μ L PCR 管中，待用。

二，PCR 扩增：

在新的 PCR 管中配制如下反应：

Recovered DNA Fragment	25.8 μ L
Tn5-PCR Buffer	10.0 μ L
dNTP(2.5 mM)	4.0 μ L
Tn5-Universal Primer	5.0 μ L
Tn5-Primer8 Index N*	5.0 μ L
Tn5-PCR Enzyme	0.2 μ L
总体积	50.0 μ L

*Tn5-DNAseq Library Index kit 提供多种 index，可根据样本数量选购。

充分混匀后在 PCR 仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
72°C	3min	
95°C	30s	} n* Cycles
95°C	15s	
60°C	30s	
72°C	3min	
72°C	5min	
4°C	∞	

*样本起始量为 5ng 时，扩增反应的循环数为 12

样本起始量为 50ng 时，扩增反应的循环数为 9

反应结束后取出，进行片段筛选。

- 1) 使用 Nuclease-free H₂O 将 PCR 产物补足至 100uL;

注意：因 PCR 反应中会使反应体系发生变化，此步骤非常重要，体积不准确会导致筛选后的片段长度范围有偏差。

- 2) 将室温放置 30min 后的 ATPure Plus beads 涡旋震荡混匀,吸取 65ul 的 ATPure Plus beads 和 100uL PCR 产物, 加入 1.5mL 离心管中, 移液器轻轻吹打 10 次充分混匀, 室温放置 10min;
- 3) 将 1.5mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 室温放置 10min, 待溶液澄清转移上清 160uL 至干净 1.5mL 离心管中, 丢弃磁珠;
- 4) 向上清中加入 10uL 的 ATPure Plus beads, 移液器轻轻吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 10min;
- 5) 将 1.5mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 室温放置 10min, 待溶液澄清移除上清;
- 6) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架中, 加入 200uL 80% 乙醇 (现用现配) 漂洗磁珠, 室温孵育 30s 后移除上清;
- 7) 重复步骤 6, 总计漂洗两次;
- 8) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架上, 开盖空气干燥磁珠 5min,直至磁珠表面无液体; 将 1.5mL 离心管从磁力架中取出, 加入 16uL Nuclease-free H₂O 洗脱, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温孵育 5min;
- 9) 将 1.5mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体,待溶液澄清,吸取 15uL 上清至干净的 200uL PCR 管中。

四, 文库质检

文库质检分为两方面, 定性检测和定量检测

文库的定性检测, 推荐使用凝胶电泳或者 Agilent 生物分析仪等方案对文库进行检测; 文库的定量检测, 推荐使用 Realtime PCR 对文库进行检测。

文库结构

Tn5-DNAseq Library Prep Kit 的文库结构如下:

5'-AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-nnnnnn
n-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCACGAGACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注: nnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 index 序列