

xLiBPreP™ 磁珠偶联转座酶 DNA 建库试剂盒(illumina)

操作说明书

(Cat#TC004, 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 1

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 6

实验流程 8

 1. DNA 片段化 8

 2. 磁珠清洗 9

 3. 文库 PCR 富集 10

 4. 文库纯化或分选 11

 5. 文库质量检测 12

产品概述

xLiBPreP™ 磁珠偶联转座酶 DNA 建库试剂盒(illumina) 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，本试剂盒能够将繁琐的 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，显著缩短文库构建时间并获得优异的测序质量。与常规的转座酶文库构建试剂盒相比，本试剂盒通过高效的将转座酶化学偶联到磁珠上，从而显著提升了 DNA 模板投入量的兼容性及文库产量均一性。本试剂盒适用于 1 ng-500 ng DNA 模板构建 illumina 高通量测序文库，且无需在文库混合和测序之前进行文库定量。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

Bead-linked Transposome 是转座酶偶联的磁珠，通过与 DNA 混合孵育，实现 DNA 片段化，并将 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，再使用 YWG™ illumina 转座酶接头套装扩增，即可获得用于高通量测序的文库。

2. 文库结构

5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCTGCGCAGCGTCAGATGTGT
ATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[i7]
ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

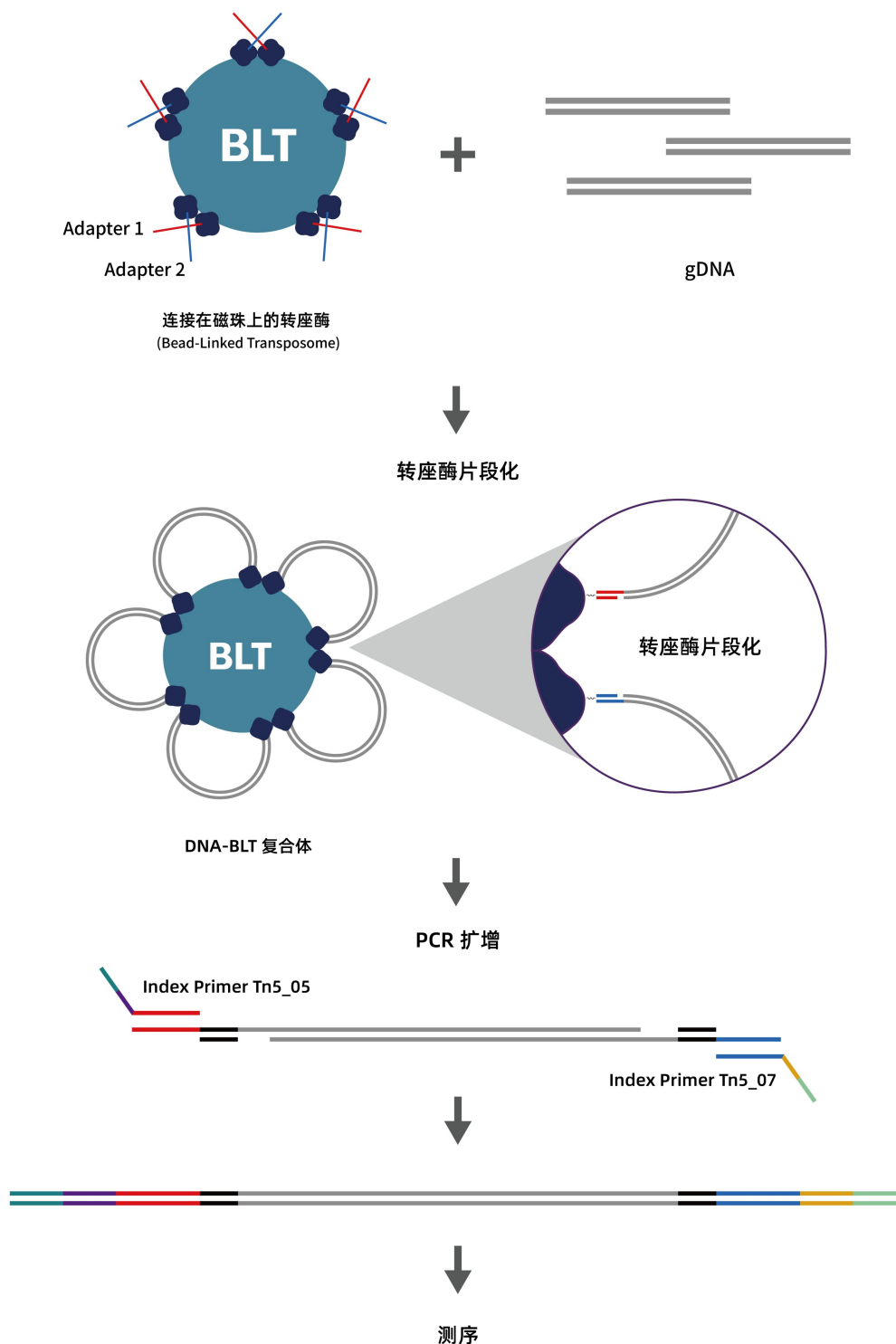


图 1. xLiBPreP™磁珠偶联转座酶 DNA 建库试剂盒(illumina) 建库原理示意图

3. 流程概要

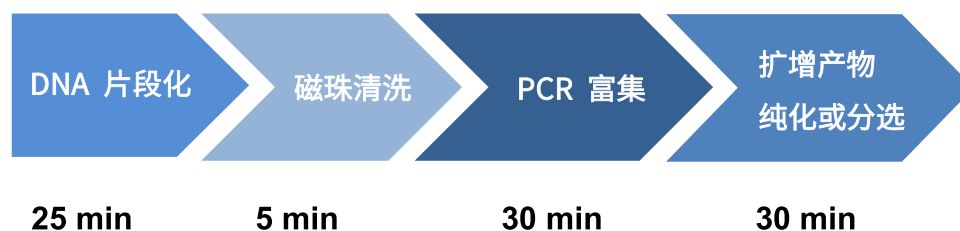


图 2. xLiBPreP™磁珠偶联转座酶 DNA 建库试剂盒(illumina) 建库流程示意图

产品组成

主货号：TC004 规格：8 rxns/24 rxns / 96 rxns

产品		8 rxns	24 rxns	96 rxns
BOX 1	● Bead-linked Transposome	80 μ L	240 μ L	960 μ L
BOX 2	● 5 \times Tagment Buffer	80 μ L	240 μ L	960 μ L
	● 6 \times Stop Buffer	80 μ L	240 μ L	960 μ L
	○ Bead Wash Buffer	1.6 mL	4.8 mL	19.2 mL
	● 2 \times HiFi Master Mix	200 μ L	600 μ L	2400 μ L

⬆ 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

BOX 1: 2 ~ 8 °C保存, 2 ~ 8 °C运输

BOX 2: -30 ~ -15 °C保存, \leq 0 °C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. 使用前将 5× Tagment Buffer 置于室温解冻，解冻后上下颠倒混匀；6× Stop Buffer、Bead Wash Buffer 置于 37 °C加热，解冻后涡旋振荡混匀。
2. 试剂盒酶组分（Bead-linked Transposome）从 4 °C取出后须置于冰盒上待用，使用后立即放回 4°C保存。
3. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或上下颠倒混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
4. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前预热 PCR 仪至反应温度。
5. 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。
6. 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。
7. 使用前将分选磁珠平衡至室温，产物分选纯化应于室温进行，切勿将分选磁珠置于-20°C 冻存。
8. 80%乙醇应现配现用，漂洗磁珠后应尽量吸干残留乙醇。
9. 本产品仅作科研用途！

实验前准备

1. 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 illumina	/
*	Nuclease-Free Water	/

⬆ * 常规实验室供应商品品牌即可

2. 自备材料

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
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

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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 μ L 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	200 μ L 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	0.5 - 10 μ L 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，解冻后上下颠倒混匀；6× Stop Buffer、Bead Wash Buffer 置于 37 °C加热，解冻后涡旋振荡混匀后备用。在灭菌 PCR 管中配制如下反应体系：

组分	体积 (μL)
Input DNA	x
Bead-linked Transposome	10
5× Tagment Buffer	10
Nuclease-Free Water	30-x
总体积	50

1.2 使用移液器吹打混匀或上下颠倒混匀。

1.3 将 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下程序（热盖: 65 °C）：

温度	时间
55°C	15 min

1.4 反应结束后，立刻向产物中加入 10 μL 6× Stop Buffer，使用移液器吹打混匀或上下颠倒混匀。

! 注意：反应完成后应立即加入 6× Stop 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 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下程序（热盖: 65 °C）：

温度	时间
55°C	10 min

2. 磁珠清洗

2.1 将反应后的 PCR 管置于磁力架中，待溶液澄清后（约 3 min），小心移除上清。

2.2 将向 PCR 管中加入 100 μ L Bead Wash Buffer 重悬磁珠，再将反应管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 3 min）移除上清。


2.3 重复步骤 **2.2**，总计漂洗两次。

2.4 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 20 μ L Nuclease-Free Water 重悬磁珠。

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 短暂涡旋振荡（避免过于剧烈）或使用移液器吹打混匀，瞬时离心后将 PCR 管置于 PCR 仪中（磁珠应保持均匀悬浮在溶液中的状态），运行如下反应程序：

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

 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！扩增循环数选择原则如下：

Input DNA	参考循环数
1-5 ng	12-13 cycles
6-10 ng	11-12 cycles
11-75 ng	8-10 cycles
75-500 ng	7-8 cycles

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 3 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 Nuclease-Free Water，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 如对文库长度分布有要求，需进行片段分选，具体步骤如下：

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	~350 bp	~450 bp	~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 μ L 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 3 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 3 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 μ L 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 μ L Nuclease-Free Water，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 μ L 上清至干净的 PCR 管中，于 -20 $^{\circ}$ C 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，建议对文库浓度进行精确测定，推荐使用基于 qPCR 的方法进行绝对定量或使用基于特异性识别双链 DNA 的荧光染料法进行测定，如 Qubit 法。

5.2 文库长度分布检测

将制备好的文库在 Agilent 2100 Bioanalyzer 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

