

Hieff NGS[®] Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina[®] (for 50 ng)

12207ES

产品使用说明书

Ver. CN20240617

A large, decorative orange wave graphic that spans the bottom of the page, starting from the left edge and curving upwards and then downwards towards the right edge.

目录

产品简介	1
产品信息	1
组分信息	1
储存条件	1
注意事项	1
使用说明	3

产品简介

Hieff NGS® Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina® (for 50 ng)是针对 Illumina®高通量测序平台专业开发设计的转座酶法建库试剂盒,适用于 50 ng 的基因组 DNA、cDNA、扩增子 (>500 bp) 等样本的建库。与常规分步法建库相比, Hieff NGS® Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina®采用新型转座酶和优化的缓冲体系, 仅需 10 min 即可完成 DNA 片段化、末端修复和接头连接过程, 显著缩短建库时间至 1.5 小时以内, 并获得优异的测序质量。此外, 本试剂盒已经不同 GC 含量 DNA 样本的验证, 无偏好性或仅具有极低的偏好性。本试剂盒提供的所有试剂盒组分, 都经过严格的质量与功能验证, 最大程度保障产品优异性能与批间稳定性。

产品信息

货号	12207ES08 / 12207ES24 / 12207ES96
规格	8 T / 24 T / 96 T

组分信息

组分编号		组分名称	12207ES08	12207ES24	12207ES96
12207-A	●	5×Reaction Buffer	80 μL	240 μL	960 μL
12207-B	●	Transposome Mix V50	40 μL	120 μL	480 μL
12207-C	●	6×Terminate Solution	80 μL	240 μL	960 μL
12207-D	○	PCR Primer Mix	24 μL	72 μL	288 μL
12207-E	○	2×Ultima Amplification Mix	200 μL	600 μL	2400 μL
12207-F	○	T5 (T501)*	8 μL	-	-
12207-G	○	T7 (T701)*	4 μL	-	-
12207-H	○	T7 (T702)*	4 μL	-	-

注: *测序时 Index 序列 T501-CTCTCTAT (NovaSeq 6000 v1.0) 或 ATAGAGAG (NovaSeq 6000 v1.5), T701-TAAGGCGA, T702-CGTACTAG。

储存条件

-25~-15°C保存, 有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 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, 短离后置于冰上待用。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染, 进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离; 使用专用的移液器等设备; 并定时对各实验区域进行清洁 (使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理), 以保证实验环境的洁净度。
7. 本产品仅作科研用途!

二、关于产品原理

1. 本产品基于转座酶法开发，其核心原理是转座酶及其转座机制。在 Transposome Mix 中包含由转座酶和两种等摩尔的接头 Adapter 1 和 Adapter 2 构成一个完整的转座子。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。这种产物经 N5 (N5XX) 和 N7 (N7XX) 以及 P5 和 P7 (PCR Primer Mix) 两对引物扩增，产物经分选和纯化后即可为可测序文库。

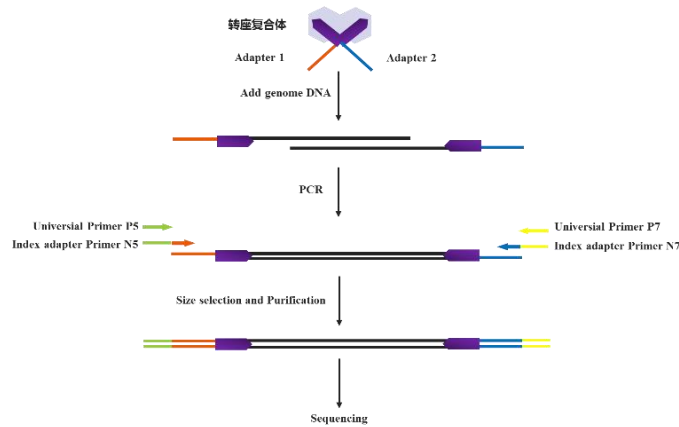


图 1 Fast Tagment DNA 建库试剂盒原理

三、关于 DNA 片段化

1. 本试剂盒使用转座酶进行 DNA 片段化。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端各延长 50-100 bp，以避免末端测序覆盖度降低的情况。
2. 本试剂盒适用 50 ng Input DNA。在 Input DNA 投入前，应将其纯化并溶于灭菌蒸馏水中， $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$ ，并使用基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit®、PicoGreen® 等进行定量。【注意：因 Transposome Mix 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。】

四、关于 DNA 磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection)

1. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
2. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
3. 转移上清时，请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量。
4. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
5. 磁珠使用过程中，应保证移液准确性。
6. 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。
7. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 $0.1 \times TE$ Buffer 洗脱，产物于 $4^{\circ}C$ 可保存 1 周， $-20^{\circ}C$ 可保存 1 个月。

五、关于文库扩增 (Library Amplification)

1. 使用本试剂盒必须进行文库扩增步骤。因转座反应产物并非完整的双链 DNA 文库，必须通过 PCR 反应生成完整的 DNA 文库。
2. 当 Input DNA 量为 50 ng 时，推荐使用 5-9 个扩增循环，7 个循环的文库产出约为 900 ng。

六、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

1. 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

2. 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit[®]、PicoGreen[®]等；基于 qPCR 绝对定量的方法。
3. 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit[®]、PicoGreen[®]等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物以及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。
4. 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop[®]等。
5. 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

使用说明

一、自备材料

1. 纯化磁珠：Cat#12601, Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 或 Cat#A63880, AMPure XP Beads 或其他等效产品。
2. DNA 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
3. T5 (T5XX) 和 T7 (T7XX) Index 引物：Hieff NGS[®] Tagment Index Kit for Illumina[®] (96 Index) (Cat#12416ES96)。
4. 其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5; 0.1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

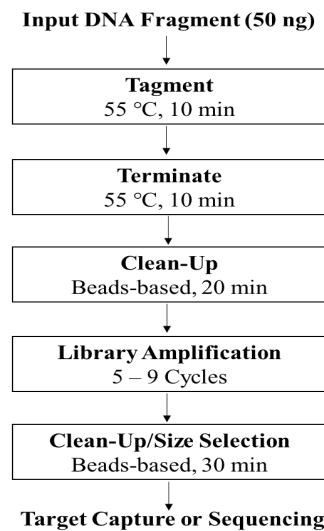


图 2. Fast Tagment DNA 建库试剂盒操作流程

三、操作步骤

3.1 DNA 片段化 (DNA Fragment)

1. 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。将 5× Reaction Buffer 室温解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 1 所示反应体系。

表 1 DNA 片段化体系

名称	体积 (μL)
50 ng Input DNA	x
5× Reaction Buffer	10
Transposome Mix V50	5
ddH ₂ O	Up to 50 μL

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 2 所示反应程序，进行 DNA 片段化反应。

表 2 DNA 片段化反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
55°C	10 min
4°C	Hold

5. 终止反应: 立即向反应物中加入 10 μL 6×Terminate Solution, 使用移液器轻轻吹打混匀, 短暂离心, 55°C 反应 10 min, 如表 3。

表 3 终止反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
55°C	10 min
4°C	Hold

6. 片段化产物纯化

- 1) 将平衡至室温的 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠，振荡或上下颠倒混匀，以 1.0× 比例回收上述片段化产物。
- 2) 吸取 60 μL 磁珠加入上述 60 μL 片段化产物中，使用移液枪轻轻吹打混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
- 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 后小心移除上清。
- 5) 重复步骤 4)，总计漂洗两次。
- 6) 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）。
- 7) 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL 灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置孵育 5 min。
- 8) 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清（约 5 min）后小心吸取 20 μL 上清至干净的灭菌 PCR 管中。

7. 立即进行步骤 3.2, 文库 PCR 富集。

3.2 文库扩增 (Library Amplification)

1. 提前将表 4 中的试剂解冻混匀，置于冰上备用。
2. 片段化程序结束后，立即将 PCR 管置于冰上配制表 3 中 PCR 反应体系。

表 4 PCR 扩增反应体系

名称	体积 (μL)
片段化产物	20
PCR Primer Mix*	3
N5XX*	1
N7XX*	1
2×Ultima Amplification Mix	25
ddH ₂ O	To 50 μL

【注意】：*Hieff NGS[®] Tagment Index Kit for Illumina[®] (96 Index) (Cat#12416ES96) 中提供 8 种 N5XX 和 12 种 N7XX, 可根据样品数量和 Index 选择策略自行选择。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 5 所示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 5 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	On	
72°C	3 min*	1
95°C	30 sec	1
95°C	10 sec	n cycles**
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	-

【注意】：*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链 DNA，72°C 孵育 3 min 用于生成成熟的 PCR 模板。

**循环数请根据测序需要进行选择。起始 DNA 量为 50 ng 时，推荐 5-9 个扩增循环。

3.3 文库纯化或分选 (Library Clean UP/Size Selection)

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，而不进行片段分选。如需进行片段分选，则进行以下步骤，推荐使用 Cat#12601 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 进行产物片段分选，为防止接头或大片段残留，可进行两次片段分选，或先使用 1.0×磁珠纯化扩增产物后再进行分选。

1. 将平衡至室温的 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠，振荡或上下颠倒混匀。
2. 根据 DNA 片段长度要求，进行双轮分选时，需将初始 DNA 样本用灭菌蒸馏水补齐至 100 μL，参考表 6 推荐比例向文库上清中加入第一轮分选磁珠，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。【注意：因 PCR 过程中样品挥发会导致产物体积不足 50 μL，进行下面操作之前必须使用灭菌蒸馏水将体积补齐至 100 μL，否则分选长度会与预期不一致。】

表 6 磁珠文库分选推荐比例

文库平均总长度	~300 bp	~400 bp	~500 bp	~800 bp
第一轮磁珠用量	80 μL (0.8×)	70 μL (0.7×)	60 μL (0.6×)	50 μL (0.5×)
第二轮磁珠用量	20 μL (0.2×)	20 μL (0.2×)	20 μL (0.2×)	15 μL (0.15×)

【注意】：“×”数均根据 PCR 产物体积补齐至 100 μL 计算而得，如“0.6×”表示 0.6×100 μL = 60 μL。

3. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移上清到干净的离心管中。
4. 参考表 6 向上清中加入第二轮分选磁珠。
7. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
8. 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。
9. 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。
10. 重复步骤 9，总计漂洗两次。
11. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 5 min）。
12. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入适量 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
13. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 5 min），小心转移 20 μL 上清至干净的管中，于 -20°C 保存。此外，如需获得长度分布更集中的文库扩增产物，可使用胶回收方式进行长度分选和纯化；如对文库长度分布范围等无特殊要求，扩增产物也可不进行长度分选，直接使用磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。

3.4 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项六。

3.5 参考实例

使用 Hieff NGS[®] Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina[®]对 50 ng 嗜盐杆菌 gDNA 样本建库，并分别使用 1.0 \times 磁珠进行纯化，0.8 \times /0.2 \times 、0.7 \times /0.2 \times 、0.5 \times /0.15 \times 磁珠比例进行长度分选，结果使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

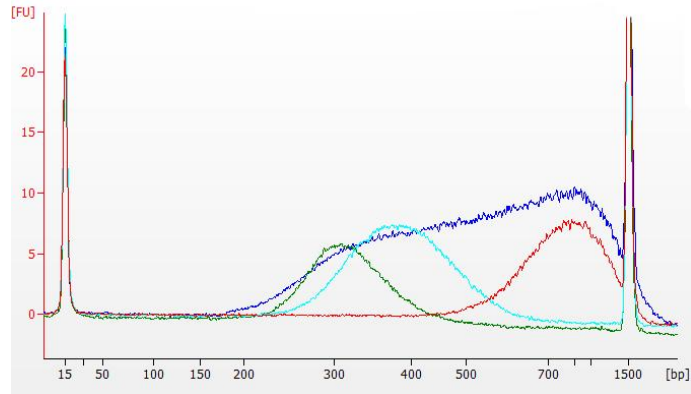


图3 Agilent 2100 Bioanalyzer 文库质量分析



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐