

**QKGEN®转座酶法快速 DNA 文库
构建试剂盒（for MGI-SI）**

使用说明书（V1.0）

本产品仅供科研用途

目 录

一、产品简介：	1
二、产品组分：	1
三、保存方法：	1
四、注意事项：	1
1. 适用范围	1
2. 样品准备	1
3. 自备材料	1
五、文库构建原理	2
六、实验流程：	3
1. 片段化反应	3
2. 终止反应	3
3. 转新管	3
4. PCR 扩增	4
5. PCR 扩增产物纯化	5
6. 文库质检	5
附录 片段筛选操作步骤	6

一、产品简介：

本试剂盒是基于新型转座酶体系的快速 DNA 文库构建试剂盒，适用于华大测序平台。试剂盒采用的转座酶文库构建方案，利用一步简单酶促反应即取代了常规 DNA 文库构建过程中片段化、末端补平加 A 以及接头连接的步骤，加接头后无需纯化，只需转新管即可进行 PCR 扩增，PCR 扩增后进行纯化或片段筛选，极大简化操作流程以及缩短文库构建时间，单个文库构建时间不超过 60 min。而且，在 1~50 ng 样本投入量范围内，不必考虑模板的投入量，优化的试剂盒体系可以满足仅使用同一套试剂、同一种流程，即可完成文库构建的需求，保证了文库构建的高效性和稳定性。

二、产品组分：

	组分	QZM0096 (96T)
DNA 片段化	M-TTE1.0	96 μ L
	5 \times M-Tnp Buffer	384 μ L
	10 \times Digestion buffer	192 μ L
PCR 扩增	5 \times High-Fidelity buffer	960 μ L
	High-Fidelity DNA pol	144 μ L
	10mM dNTP Mix	240 μ L

三、保存方法：

-20 保存；干冰运输；有效期一年

四、注意事项：

1. 适用范围

1ng~50ng 的纯化 DNA 样品（A260/280=1.0~2.0）。

2. 样品准备

DNA 样品溶解于纯水，转座酶对 EDTA 敏感，不能使用 TE 溶液溶解 DNA。

推荐使用 Qubit 或荧光染料 PicoGreen 对 DNA 样品进行浓度测定，请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法。

如 DNA 样本为 PCR 产物时，应保证 PCR 产物的长度大于 500bp，由于转座方案不能作用于 DNA 的末端，所以 PCR 产物两端的覆盖度可能会有所降低。推荐在制备 PCR 产物时将待测区域两末端各延长 50 - 100 bp，以避免出现末端测序覆盖度降低的情况。

3. 自备材料

扩增引物试剂盒 QKGEN® NGS Tn5 Index Primers Kit (for MGI-SI)。

纯化试剂盒 Beckman 的 Agencourt AMPure XP reagent 或齐凯基因磁珠分选试剂
磁力架

无水乙醇

无核酸酶水/ddH₂O

EP 管和 PCR 管 (DNase/RNase free)、各规格移液器、各规格枪头

PCR 仪

Qubit dsDNA HS 分析试剂盒

五、文库构建原理

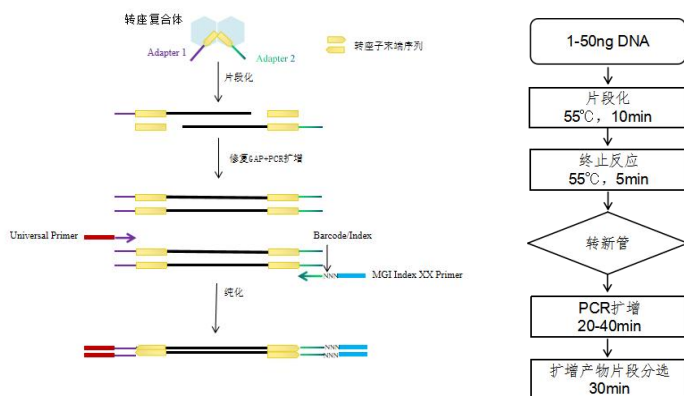


图 1. 文库构建原理和操作流程

文库结构:

/5Phos/GAACGACATGGCTACGATCCGACTTTCGTGCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA
GACAG--NNNNNN--CTGTCTTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC[Barcode]GA
AGACAACAACCTCTTGGCTACA-3'

5'Phos: 5'磷酸化; **--NNNNNN--**: 插入序列; **[Barcode]**: 10bp index 序列;

六、实验流程:

1. 片段化反应

1) 提前将 5×M-Tnp buffer、10×Digestion buffer 以及扩增所用试剂取出, 室温解冻, 轻微振荡混匀并短暂离心。

2) 取出新的 200 μL PCR 管 (DNase/RNase free) 按照表一中配制反应体系 (冰盒上操作):

表一 片段化反应体系

组分	体积/反应
5×M-Tnp buffer	4 μL
M-TTE1.0 *	1 μL
1~50ng DNA	x μL
无核酸酶水/ddH ₂ O	15-x μL
总体积	20 μL

注: * M-TTE1.0应始终置于冰上, 该用量下酶切产物主带的片段范围一般为 200-500bp, 若反应不理想, 扩增产物的片段过大或过小、甚至无目的条带等, 建议根据实际酶切效果适当调整M-TTE1.0的用量。

3) 轻柔振荡混合均匀, 瞬时离心, 立即将 PCR 管置于提前按照表二设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表二 片段化反应程序

温度	时间
85 °C	ON, 热盖
55 °C	10 min
4°C	Hold

2. 终止反应

1) 以上反应结束后, 在反应体系中加入 2 μL 的 10×Digestion buffer, 涡旋振荡混匀, 短暂离心。

2) 将 PCR 管置于 PCR 仪上进行如下的终止反应:

表三 终止反应程序

温度	时间
85 °C	ON, 热盖
55 °C	5 min
4°C	Hold

3. 转新管

将终止后的酶切产物转移至新的 PCR 管中进行下一步扩增 (在酶切反应管中进行扩

增会降低文库产量)。

4. PCR 扩增

1) 将已经解冻的扩增试剂以及引物 MTN XX 轻柔振荡混匀并短暂离心。(MTN XXr 在 QKGEN® NGS Tn5 Index Primers Kit (for MGI-SI) 试剂盒中提供)

2) 于冰盒上, 按照表四配制 PCR 扩增反应体系:

表四 PCR 扩增反应体系

组分	体积/反应
1~50ng 终止后的 DNA 片段化产物	22 μ L
5 \times High-Fidelity buffer	10 μ L
High-Fidelity DNA pol	1.5 μ L
10mM dNTP Mix	2.5 μ L
MTN XX**	5 μ L
无核酸酶水/ddH ₂ O	9 μ L
总体积	50 μ L

注:** 每个样本加入不同的MTN XX, 具体引物及Barcode序列详见转座酶法接头试剂盒(QKGEN® NGS Tn5 Index Primers Kit (for MGI-SI)) 的说明书中。

3) 轻柔振荡混合均匀, 瞬时离心, 立即将 PCR 管置于提前按照表五设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表五 PCR 扩增反应程序

温度 (热盖 105°C)	时间	循环数
72 °C	3 min	1
98 °C	30 sec	1
98 °C	15 sec	X ***
65 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	3 min	1
4 °C	hold	1

注:*** 在不考虑样本投入量 (1-50ng), 统一扩增循环数时, 建议选择13个循环扩增。但应注意的是: 循环数应根据模板输入量而定, 输入量越低, 则循环数应越高以保证文库产量, 但同时测序数据中 duplication 也会增加, 一般建议按照下表进行设置, 也可以根据实际需要进行调整:

DNA 模板投入量 (ng)	循环数
40-50	7-8
30-40	8-9
20-30	9-11

10-20	11-13
1-10	13-15

5. PCR 扩增产物纯化

- 1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min，恢复室温后彻底振荡混匀。
- 2) 向 50 μ L 扩增产物中加入 1 倍体积（50 μ L）的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
- 3) 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2 min，直至溶液完全变澄清。
- 4) 小心吸弃上清液，保留磁珠。
- 5) 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
- 6) 重复步骤 5）一次。
- 7) 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
- 8) 将离心管从磁力架上取下，加入 26 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 25 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中。
注：如产物需进行片段筛选，可参考附录一的片段筛选操作步骤进行。片段筛选也可以选择胶回收等方法进行，可获得片段大小分布更为集中的 DNA 文库产物。

6. 文库质检

1) 文库浓度测定

推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测。

2) 文库片段大小分布测定

推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或者 Qseq-100 生物片段分析仪对构建好的文库进行片段大小分布检测。

附录 片段筛选操作步骤

1. 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡，配制 80% 乙醇。
2. 先确保样品体积 $\geq 100 \mu\text{L}$ ，不足 $100\mu\text{L}$ ，应加无核酸酶水补足。
3. 根据 DNA 片段长度要求，参考以下表格向样品中加入第一轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。

表 1 DNA 文库不同片段大小的推荐磁珠用量

文库总长度分布范围	250-350bp	330-430bp	440-540bp
目标区域插入长度	约 150bp	约 250bp	约 330bp
第一轮加入磁珠体积倍数	0.8×	0.7×	0.6×
第二轮加入磁珠体积倍数	0.2×	0.2×	0.2×

注意：分选磁珠体积均为 DNA 样品体积的倍数，如样品体积为 $100\mu\text{L}$ ，第一轮分选磁珠为 0.8X，即 $80\mu\text{L}$ ；第二轮分选磁珠为 0.2X，则加入 $20\mu\text{L}$ 磁珠。

4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 5min，直至溶液完全变澄清。
5. 小心将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中（注意不要吸取到磁珠），丢弃磁珠。
6. 向上清液中加入第二轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
7. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
8. 加入 $200\mu\text{L}$ 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
11. 加入 $21\mu\text{L}$ 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 $20\mu\text{L}$ 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。