



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

ATG[®] HTS Tagment DNA Library Prep Kit

转座酶法高通量测序 DNA 建库试剂盒

SD201

Version 23.1.1



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

01/产品概述	1
02/产品组分	1
03/保存及运输条件	1
04/注意事项	1
04-1/关于实验操作	1
04-2/关于 Input DNA 适用范围	2
04-3/关于纯化与分选	2
04-4/关于文库质检	2
05/自备材料	3
06/实验流程	3
06-1/DNA 片段化	3
06-2/PCR 富集	4
06-3/文库纯化或分选	5
06-4/文库质量检测	7

01/产品概述

ATG[®] HTS Tagment DNA Library Prep Kit 是针对 Illumina 与 MGI 高通量测序平台开发设计的转座酶法文库构建试剂盒。与常规的 DNA 文库构建方法相比，本产品采用转座酶法进行 DNA 片段化。仅需 10 min 即可完成 DNA 片段化、末端修复和接头连接过程，显著缩短文库构建时间，并获得优异的测序质量。试剂盒适用于起始量在 100 pg - 500 ng DNA 样本进行文库构建。试剂盒中提供的所有试剂都经过了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。

02/产品组分

组分编号	组分	SD201-01 (24 rxns)	SD201-02 (96 rxns)
SD201-A	■ Transposome	120 µl	480 µl
SD201-B	■ 5 × Tag Buffer	240 µl	960 µl
SD201-C	■ Stop Solution	240 µl	960 µl
SD201-D	■ 2 × Proofast [®] HTS Master Mix	600 µl	4 × 600 µl

03/保存及运输条件

Stop Solution，于-30 ~ 25℃保存，其余组分，于-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

04/注意事项

04-1/关于实验操作

- ❖ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- ❖ 使用前请将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
- ❖ 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。
- ❖ 本产品仅作科研用途！

04-2/关于 Input DNA 适用范围

- ❖ 本产品适用于制备 Illumina 与 MGI 高通量测序平台专用文库,兼容 DNA 起始投入量为 100 pg - 500 ng。
- ❖ 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 测序覆盖度可能会降低。推荐在制备 PCR 产物时将待测区域两端各延长 50 - 100 bp,以避免出现末端测序覆盖度降低的情况。

04-3/关于纯化与分选

- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配,否则将影响回收效率。
- ❖ 磁珠使用过程中,应保证移液准确性。
- ❖ 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。
- ❖ 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°C 可保存 1 周, -20°C 可保存 1 个月。

04-4/关于文库扩增 (Library Amplification)

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:

- ❖ 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。文库浓度检测不可使用:基于光谱检测的方法,如 NanoDrop 等。
- ❖ 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测,原因是: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),可排除单端或两端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。另外,过度扩增因产物不是完整的双链结构,当使用基于识别双链 DNA 的荧光染料来进行文库定量时,定量结果会比实际值偏低;但基于 qPCR 的文库定量体系(如 ATG[®] HS qPCR SYBR Green Master Mix, ATG #Q401)在定量过程中包含变性过程,仍然可以准确定量这种过度扩增的文库。
- ❖ 文库长度分布检测:可通过 Agilent Bioanalyzer 2100, Qsep 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

05/自备材料

DNA 片段纯化分选磁珠：ATG® DNA Selection Beads (ATG#S501)，AMPure XP Selection Beads (或国产性能相当同类产品)

PCR Primer Mix：N5XX & N7XX (ATG #SD201)

DNA 质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。



其他材料：无水乙醇、灭菌超纯水，低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

06/实验流程

06-1/DNA 片段化

1. 室温解冻 Stop Solution，轻弹管壁，确认有无沉淀。如有沉淀，可 37℃ 加热涡旋振荡混匀，待沉淀溶解后室温放置备用。

2. 于无菌 PCR 管中配制以下反应体系：

组分	用量
Input DNA	X μ l
5 × Tag Buffer	10 μ l 
Transposome*	5 μ l 
Total	50 μ l

❖ 当 Input DNA < 100 ng 时，Transposome 建议投入 5 μ l；当 Input DNA > 100 ng 时，Transposome 建议投入 10 μ l。

3. 使用移液器轻轻吹打混匀 (请勿振荡)，并短暂离心将反应液收集至管底。

4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖 105℃	On
55℃	10 min
4℃	Hold

5. 终止反应：立即向反应物中加入 10 μ l Stop Solution，使用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于 PCR 仪中进行以下反应：

温度	时间
热盖 105℃	On
55℃	10 min
4℃	Hold

6. 片段化产物纯化

- 1) 将平衡至室温的 ATG[®] 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，开盖干燥磁珠至哑光状态 (约 5 min)，注意避免磁珠龟裂。
- 7) 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22 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。

❖ 纯化样品应立即进行 06-2/PCR 富集。

06-2/PCR 富集

1. 将 PCR Primer Mix、2 × Proofast[®] Max Master Mix 解冻后颠倒混匀，短暂离心后于无菌 PCR 管中配制如下反应 (冰上操作):

组分	体积
步骤 06-1 产物	20 μl
N5XX*	2.5 μl
N7XX*	2.5 μl
2 × Proofast [®] HTS Master Mix	25 μl
Total	50 μl

❖ N5XX 和 N7XX 是文库扩增专用的 Index primer, 可根据样品数量和 Index 搭配策略自行选择, 推荐使用 N5XX & N7XX (ATG #S801)。

2. 使用移液器轻轻吹打充分混匀，将反应管置于 PCR 仪中，运行如下反应程序:

温度	时间	循环数
72°C*	3 min	1
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	
60°C	30 sec	5 - 15 cycles*
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

❖ 转座反应产物并非完整的双链 DNA，72℃ 孵育 3 min 用于生成完整的 PCR 模板，请勿删除该步骤；

❖ 扩增循环数需根据实际情况自行选择，扩增循环数越少，扩增 Duplication 越低，但文库产量也相应降低。选择原则如下：

Input DNA	参考循环数
50 - 500 ng	5 - 6
11 - 50 ng	7 - 8
6 - 10 ng	9 - 10
1 - 5 ng	11 - 13
100 pg - 1 ng	14 - 15

06-3/文库纯化或分选

PCR 反应结束后根据实验目的进行扩增产物纯化或长度分选，推荐使用 ATG[®] DNA Selection Beads (ATG #S501)，使用前请将磁珠平衡至室温并涡旋振荡充分混匀。

❖ 扩增产物纯化

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。

1. 将平衡至室温的 ATG[®] 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 50 μl 磁珠加入上述 50 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，开盖干燥磁珠至哑光状态 (约 5 min)，注意避免磁珠龟裂。
7. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 25 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 23 μl 上清至干净的灭菌 PCR 管中。

❖ 扩增产物长度分选

扩增产物长度分选中两轮磁珠的使用量 (R1 和 R2) 参见下表:

文库平均总长度	约 350 bp	约 450 bp	约 550 bp
文库平均插入长度	约 230 bp	约 330 bp	约 430 bp
文库总长度分布范围	250 - 450 bp	300 - 700 bp	400 - 900 bp
第一轮磁珠用量 R1	35.0 μ l (0.70 \times)	30.0 μ l (0.60 \times)	25.0 μ l (0.50 \times)
第一轮磁珠用量 R2	7.5 μ l (0.15 \times)	7.5 μ l (0.15 \times)	7.5 μ l (0.15 \times)

1. 文库扩增结束将反应管短暂离心, 涡旋振荡混匀 ATG[®] DNA Selection Beads 并吸取 R1 体积至 50 μ l PCR 产物中, 使用移液器吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 5 min。
2. 将反应管短暂离心并置于磁力架上, 待溶液澄清后 (约 5 min) 小心转移上清至新的 PCR 管中, 丢弃磁珠。
3. 涡旋振荡混匀 ATG[®] DNA Selection Beads 并吸取 R2 体积至上清中, 使用移液器吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 5 min。
4. 将反应管短暂离心并置于磁力架上, 待溶液澄清后 (约 5 min) 小心移除上清。
5. 保持反应管始终处于磁力架上, 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。
6. 重复步骤 5, 总计漂洗两次。
7. 保持反应管始终处于磁力架上, 开盖空气干燥磁珠约 3 min。
❖ 不同地区环境干湿程度有差别, 磁珠晾干时间不一, 磁珠刚好晾干, 表面由光亮褐色变为磨砂褐色。过度干燥会导致洗脱困难, 未完全晾干会有酒精残留影响后续实验反应。
8. 将反应管从磁力架上取出, 加入 22 μ l ddH₂O 洗脱。使用移液器吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 5 min。
9. 将反应管短暂离心并置于磁力架上, 待溶液澄清后 (约 5 min) 小心吸取 20 μ l 上清至新的 PCR 管中, -20 $^{\circ}$ C 保存。

06-4/文库质量检测

通常情况下，构建好的文库可通过浓度测定和长度分布检测来进行质量评价。

❖ 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。推荐使用 Realtime PCR 的方式对文库浓度进行绝对定量。此外，文库浓度还可以使用基于特异性识别双链 DNA 的荧光染料法进行测定（如 Qubit 或荧光染料 PicoGreen），最终使用下表推荐的近似公式换算文库的摩尔浓度。请勿使用任何基于吸光度测量为基础的方法。

文库平均总长度	近似转换公式
350 bp	1 ng/μl = 4.3 nM
450 bp	1 ng/μl = 3.3 nM
550 bp	1 ng/μl = 2.7 nM

❖ 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。