

# **GenNext Transposase-based DNA Library Prep Kit**

[Code No. TNP-101, TNP-101L, TNP-101T]

**使用说明书**

TOYOBO CO., LTD.

Bioproducts Sales and Marketing Department

OSAKA JAPAN

**TOYOBO**

## - 目录 -

[1] 简介	3
[2] 产品内容	5
[3] 需另行准备的物品	6
[4] 使用方法	8
1. DNA 文库制备	·8
A. 转座酶片段化/标签化反应	·8
B. Additional 反应	·8
C. Gap Repair 反应	·8
D. 文库富集	·9
E. 文库纯化	·10
2. 文库验证	·10
文库定量	·10
确认文库大小分布	·10
[5] 故障排除	·11
[6] 相关产品	·12
[7] 参考文献	·12

## - 注意事项 -

本试剂盒中包含的试剂均为研究用试剂。请勿用作诊断或临床试剂。使用本试剂盒时，请参阅产品 SDS，严格遵守实验室的一般注意事项，并注意安全。

※RamDA-seq®、RT-RamDA®、Shin-RamDA-seq®是国立研究开发法人理化学研究所的注册商标。

※GenNext®、KODEasy®、Fortissimo™是东洋纺株式会社研究用试剂的注册商标或商标。

※其他注册商标或商标归各自所有者所有。

## [1] 简介

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit 是一款专为从微量双链 DNA 中简便、快速制备二代测序 (NGS) 用文库而设计的试剂盒。

本试剂盒利用转座酶进行片段化和标签化反应, 无需预先对样本 DNA 进行片段化处理。此外, 采用独特的文库制备方法, 实现了简便性、快速性和高效率。

本试剂盒还可与从 RNA 制备双链 DNA 的试剂盒配合使用, 从而能够从微量 RNA 中制备 NGS 用文库。

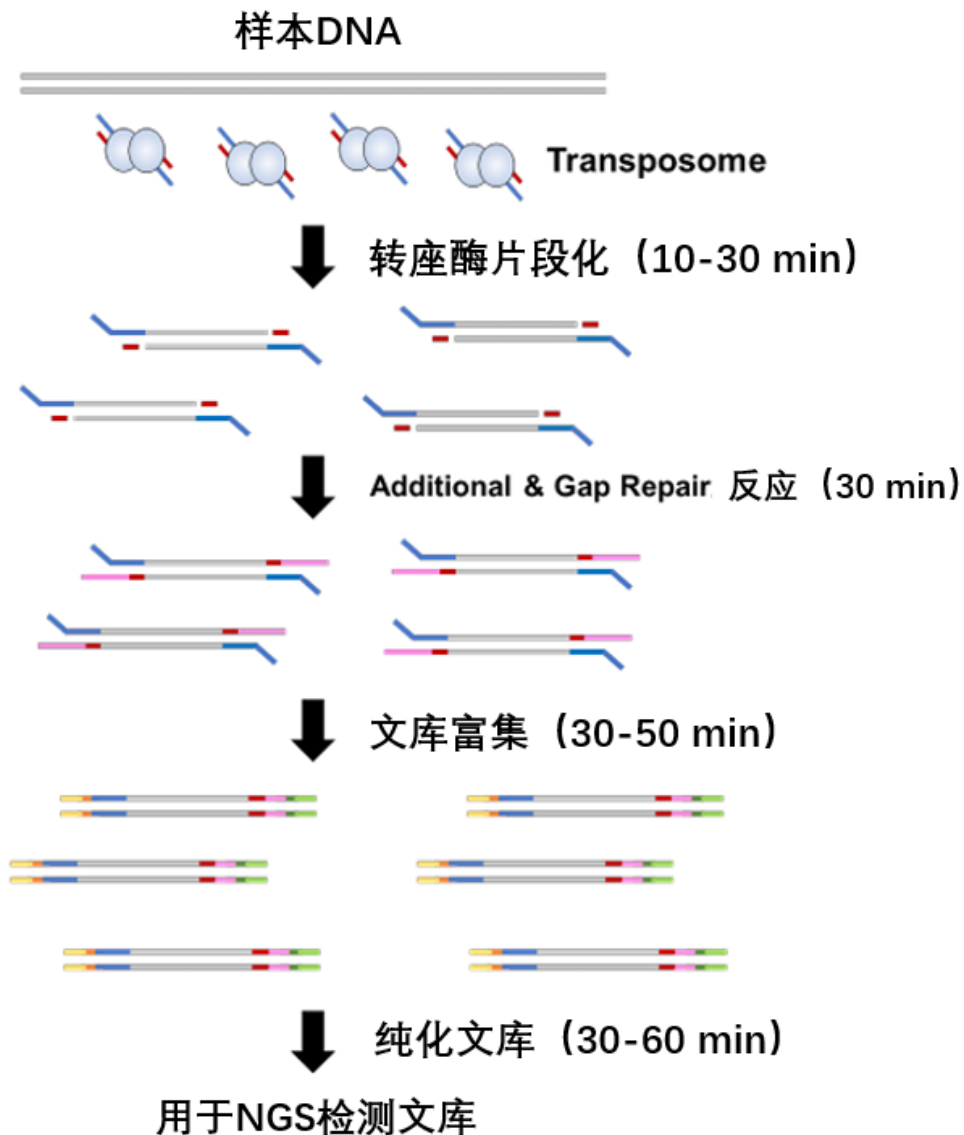


图 1. 本试剂盒的工作流程

各步骤的反应时间如下所示。本试剂盒不包含工作流程中的文库富集和文库纯化所需的磁珠、Index 接头试剂。请参阅 “[3] 需另行准备的物品” (第 4 页) 进行准备。

## ◆ 本试剂盒特点 ◆

### 1. 微量 DNA 即可制备文库

样本量可支持 100 pg~10 ng DNA (推荐 1 ng)。

### 2. 无需片段化的 DNA 即可制备文库

利用转座酶进行片段化和标签化反应, 可直接使用未片段化的 DNA 作为样本。

### 3. 简便、快速、高效

采用独特的文库制备方法, 流程中无需磁珠等纯化步骤, 可简便且无损失地制备文库 (NGS 解析前的纯化是必要的)。

### 4. 可与从 RNA 制备双链 DNA 的试剂盒配合使用

可与 GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [货号: RMD-101, RMD-101T]、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit w/o LP [货号: RML-111, RML-111T]、Fortissimo™、GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA [货号: RMF-111, RMF-111T]等本公司试剂盒配合使用, 实现从微量 RNA 中制备文库 (详情请参阅各试剂盒使用说明书)。

## ◆ 关于使用本试剂盒进行全基因组解析 ◆

使用本试剂盒进行全基因组解析 (Whole Genome Sequence) 时, 建议样本使用微生物基因组等 5M bp 以下的 DNA。

若以人类等高等生物的全基因组作为样本, 可能会出现部分序列测序集中, 导致无法获得足够的测序覆盖度。

## [2] 产品内容

GenNext® Transposase-based DNA Library Prep Kit (TNP-101、TNP-101L、TNP-101T) 包含以下试剂。请将试剂保存于-20°C。

试剂名称	保存	TNP-101T (12 次份*)	TNP-101 (48 次份*)	TNP-101L (96 次份*)
① Tagmentation Buffer	-20°C	37.5 µL	150 µL	300 µL
② Transposase for Tagmentation	-20°C	30 µL	120 µL	240 µL
③ Additional Solution	-20°C	30 µL	120 µL	240 µL
④ Gap Repair Buffer	-20°C	156 µL	624 µL	1248 µL
⑤ Gap Repair Enzyme Mix	-20°C	54 µL	216 µL	432 µL
⑥ KOD Master Mix	-20°C	120 µL	480 µL	960 µL

\* 将本试剂盒与 GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [货号: RMD-101, RMD-101T]、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit w/o LP [货号: RML-111, RML-111T]、Fortissimo™、GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA [货号: RMF-111, RMF-111T]配合使用时, 以 1/2 倍规模使用, 因此容量变为 2 倍 (12 次份→24 次份、48 次份→96 次份、96 次份→192 次份)。

### - 注意事项 -

本产品不含磁珠和 NGS 用 Index 接头。请另行准备【[3] 需另行准备的物品】中描述的纯化用磁珠和 NGS 用 Index 接头。

由于本试剂盒从微量样本中制备文库, 如果在操作过程中混入环境中的 DNA 等, 可能会严重影响实验结果。请在洁净度高的房间进行操作, 并注意防止污染。

### [3] 需另行准备的物品

除本试剂盒外，请准备以下设备、试剂和耗材：

- **热循环仪或培养箱**

使用时请遵循各设备的使用说明书。

- **磁珠**

推荐使用 Agencourt AMPure XP 试剂 (Beckman Coulter, 目录号: A63880、A63881 等)。使用时请遵循试剂的使用说明书。

- **磁力架**

用于磁珠纯化。磁力架可使用 Magna Stand for 8-well tube preparation (Nippon genetics, 货号: FG-SSMAG2) 或 Bit-Mag96 (Samplatech Co., Ltd., 货号: 30550)。

- **80%乙醇**

用于磁珠纯化时的清洗液。

- **TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)**

用于文库制备时 DNA 的洗脱。也可用 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液等替代。

- **NGS 用 Index 接头**

可使用带有索引的 Nextera XT Library Prep Kit (Illumina) 等文库制备中常用的接头。

产品名称 (示例)	货号
Nextera XT Index Kit (24 Indexes, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A-D (96 Indexes, 384 Samples)	FC-131-2001~2004
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654, 20091656, 20091658, 20091660

以下耗材已验证：

产品	制造商	货号
UC,EU Optical wide area 8-cap strip	Nippon genetics /BIOplastics	BPB79701-1
RP,UC,SFGC,Extra Robust, Fits shell Frame Grids (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPK69901
96 well RP,LF,SEMI k,cutttable,96 well plate (0.2 mL)	Nippon genetics /BIOplastics	BPB50651
EU Optical wide area 96 cap plate with wide area indented flat caps	Nippon genetics /BIOplastics	BPB57601
Magna Stand for 8-well tube preparation	Nippon genetics	FG-SSMAG2
Bit-Mag96	Samplatech Co., Ltd.,	30550

## [4] 使用方法

· 本使用说明书记载了以基因组等 DNA 溶液为样本时的实验流程。与 GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit [货号: RMD-101, RMD-101T]、GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit w/o LP [货号: RML-111, RML-111T]、Fortissimo™、GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA [货号: RMF-111, RMF-111T]等本公司试剂盒配合使用时, 请参阅相应试剂盒的使用说明书。

· 在所有步骤中, 添加试剂后请用移液器、混匀仪、轻敲等方式充分混匀。

### 【参考】

添加试剂→离心→混匀(混匀仪: 2000 rpm, 4°C, 1 min.) →离心

添加试剂→混匀(移液器吸打: 20 次, 冰上) →离心 等

## 1. DNA 文库制备

使用本试剂盒从待分析的 DNA 溶液中制备文库, DNA 溶液浓度过高可能会导致片段化效果不佳, 建议预先用无核酸酶灭菌水稀释至约 200 pg/μL (20 pg/μL~2 ng/μL 范围内均可制备文库, 但根据样本状态(样本中含有杂质、DNA 已降解且浓度较低)可能无法获得理想结果。

· 也可使用 TE 缓冲液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 进行稀释。

### A. 转座酶片段化/标签化反应

(1) 向约 200 pg/μL 的 DNA 溶液 5 μL (1 ng 量) 中, 每孔添加①Tagmentation Buffer 2.5 μL, 混匀。

(2) 每孔添加②Transposase for Tagmentation 2.5 μL, 混匀离心后, 按以下温度进行孵育:

步骤	温度	时间
Tagmentation	45°C	10 min.*
	4°C	hold

\* 如果样本量过多或过少, 或 DNA 受损等原因导致无法获得足够的文库产量, 可将 45°C 孵育时间延长至 20 分钟, 可能会改善产量。

### B. Additional 反应

(1) 向标签化后的 DNA 中, 每孔添加③Additional Solution 2.5 μL。然后离心, 25°C、2000 rpm 混匀 1 分钟, 静置 5 分钟。

### C. Gap Repair 反应

(1) 每孔添加④Gap Repair Buffer 13 μL, 离心。

(2) 每孔添加⑤Gap Repair Enzyme Mix 4.5 μL, 混匀离心后, 按以下温度进行孵育:

### Gap Repair 反应

步骤	温度	时间
Gap Repair	20°C	20 min.
Denature	75°C	10 min.
	4°C	hold

### D. 文库富集

(1) 向 Gap Repair 反应后的 30  $\mu$ L 溶液中, 添加 KOD Master Mix 10  $\mu$ L, 离心。然后添加 Nextera XT Library Prep Kit 等可用的 Index primer F 和 Index primer R 各 5  $\mu$ L (Nextera XT Index Kit 时), 或引物混合物 10  $\mu$ L (Illumina DNA/RNA UD Indexes 时), 离心。

例如, 以下 Index 接头试剂盒可以使用。如果自行准备 Index 引物, 请调整至约 3  $\mu$ M 使用。

产品名称 (示例)	货号
Nextera XT Index Kit (24 Indexes, 96 Samples)	FC-131-1001
Nextera XT Index Kit v2 Set A-D (96 Indexes, 384 Samples)	FC-131-2001~2004
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples)	20091654, 20091656, 20091658, 20091660

(2) 离心后, 按以下循环进行 PCR:

步骤	温度	时间
Denature	94°C	2 min.
PCR (12-14 cycles)	98°C	10 sec.
	60°C	30 sec.
	68°C	30 sec.
	4°C	hold

请根据下表调整 PCR 循环数:

DNA 量	PCR 循环数
10 ng - 1 ng	12
1 ng 以下	13-14

\* 如果文库产量过多，可减少 PCR 循环数。

\* 也可增加至 15 循环以上，但可能会对 NGS 解析结果产生不良影响。

## E. 文库纯化

(1) 向 50  $\mu\text{L}$  PCR 溶液中，添加 1 $\times$ AMPure XP beads 30-50  $\mu\text{L}$ \*。然后离心，25 $^{\circ}\text{C}$ 、2000 rpm 混匀 2 分钟，静置 5 分钟。

\* 从基因组 DNA 等 10 kb 以上的样本制备文库时添加 30  $\mu\text{L}$ ，质粒或 PCR 扩增子等数 kb 以下的样本添加 40  $\mu\text{L}$ ，更短的 DNA 添加 50  $\mu\text{L}$  作为参考。

(2) 将反应管或板置于磁力架上，静置至溶液变透明，然后去除上清。

(3) 将反应管或孔板保持在磁力架上，添加 80%乙醇 150  $\mu\text{L}$ ，室温孵育 30 秒。

(4) 去除乙醇。

(5) 将反应管或孔板保持在磁力架上，添加 80%乙醇 150  $\mu\text{L}$ ，室温孵育 30 秒。

(6) 用移液器完全去除乙醇。

(7) 将反应管或孔板保持在磁力架上，25 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 分钟，或室温干燥 5-10 分钟\*。

\* 如果乙醇残留，可能会影响反应。请干燥至磁珠开始出现裂纹。根据室温和湿度调整干燥时间。

(8) 向 96 孔板或 8 连管中，每孔添加 TE Buffer 40  $\mu\text{L}$ \*，离心。

\* 如希望提高文库浓度，也可用 20-30  $\mu\text{L}$  洗脱。

(9) 涡旋振荡至磁珠完全分散，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 分钟，离心。

(10) 将反应管或孔板置于磁力架上，静置 2 分钟至溶液变透明。

(11) 将透明上清 30  $\mu\text{L}$  转移至新的反应管或孔板中，进行 QC 步骤或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 2. 文库验证

### 文库定量

推荐使用 GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit [货号：NLQ-101]或同等市售产品，通过 qPCR 进行定量。GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit 是用于 Illumina 二代测序仪的文库定量试剂盒，对应 Illumina 采用的 P5、P7 接头序列，可特异且准确地定量能够结合到流动槽上的文库。

### 确认文库大小分布

如需确认文库分布，建议使用 Bioanalyzer (安捷伦科技有限公司)、MultiNA (岛津制作所株式会社) 等电泳设备。

## [5] 故障排除

现象	原因	对策
获得的文库产量少	样本 DNA 链长短	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 将转座酶片段化反应时间从 10 分钟延长至 20 分钟，可能会改善产量（但文库链长会略微缩短）。</li> <li>• 将文库纯化时的磁珠添加量从 30 <math>\mu</math>L 增加到 50 <math>\mu</math>L，可能会改善产量。</li> </ul>
	DNA 投入量过多/ 过少	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA 投入量过多或过少都会导致片段化不充分，文库产量下降。推荐投入量约 1 ng。</li> <li>• 如果 DNA 投入量过少且无法增加投入量，可将转座酶片段化反应时间从 10 分钟延长至 20 分钟，或增加 PCR 循环数，可能会改善产量。但增加 PCR 循环数可能会影响 NGS 解析结果。</li> </ul>
结果不稳定、日间差异、 样本间差异大	纯化时乙醇残留	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 用乙醇清洗磁珠时，如果乙醇残留可能会抑制后续反应。请确认磁珠已干燥。</li> <li>• 如果操作房间湿度高，磁珠可能难以干燥。建议将操作房间湿度控制在 55% 以下。</li> </ul>

## [6] 相关产品

产品名称	内容	货号
GenNext® NGS Library Quantification Kit	Illumina 二代测序文库定量试剂盒 500 次份/20 µL 反应	NLQ-101
GenNext® NGS Library Prep Kit	Illumina 二代测序文库制备试剂盒 24 次份	LPK-101
GenNext® NGS Library Prep Kit -KODEasy®-	改良版 二代测序文库制备试剂盒 24 次份	LPK-201
GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit	NGS 检测用 cDNA 制备试剂盒 96 次份	RMD-101
GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit w/o LP	NGS 检测用 cDNA 制备试剂盒 96 次份	RML-111
Fortissimo™, GenNext® Shin-RamDA-seq® Kit for Degraded RNA	降解 RNA NGS 检测用 cDNA 制备试剂盒 96 次份	RMF-111

## [7] 参考文献

(1) Hayashi T., et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nature Communications. 9: 619 (2018)

更多详细信息, 请访问本公司网站:

[东洋纺\(上海\)生物科技有限公司](#)

# TOYOBO

[制造・销售商]

## 东洋纺（上海）生物科技有限公司

交货期限・订货・产品内容・技术相关咨询

[Tel:021-5879-4900](tel:021-5879-4900) Fax:021-5879-4901

E-Mail:[tech@bio-toyobo.cn](mailto:tech@bio-toyobo.cn)

<http://www.bio-toyobo.cn>