

# Hieff NGS<sup>®</sup> Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup> (for 50 ng)

12207ES

---

产品使用说明书

Ver. CN20241016

# 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，最高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℃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。

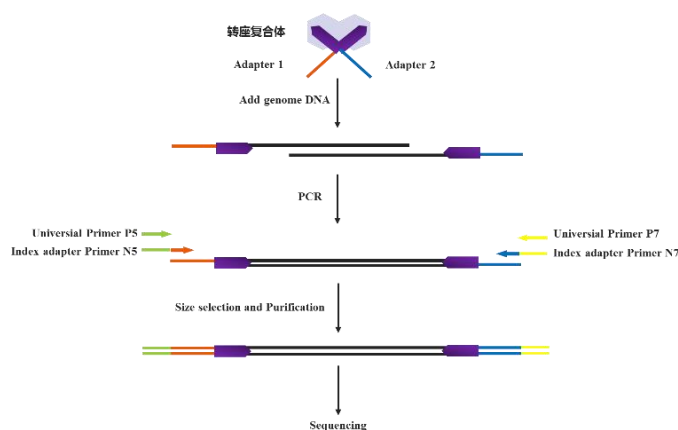


图 1 Fast Tagment DNA 建库试剂盒原理

## 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

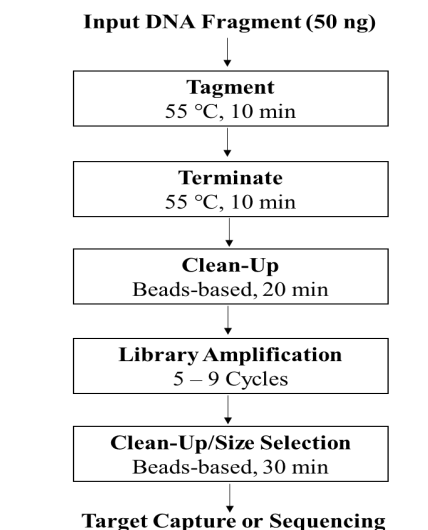


图 2. Fast Tagment DNA 建库试剂盒操作流程

### 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 <sub>2</sub> 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  $\mu$ L 6 $\times$ 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<sup>®</sup> DNA Selection Beads 磁珠，振荡或上下颠倒混匀，以 1.0 $\times$ 比例回收上述片段化产物。
- 2) 吸取 60  $\mu$ L 磁珠加入上述 60  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 ( $\mu$ L)
片段化产物	20
PCR Primer Mix*	3
N5XX*	1
N7XX*	1
2 $\times$ Ultima Amplification Mix	25
ddH <sub>2</sub> O	To 50 $\mu$ L

【注意】：\*Hieff NGS<sup>®</sup> Tagment Index Kit for Illumina<sup>®</sup> (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 ddH<sub>2</sub>O，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×磁珠进行纯化，0.8×/0.2×、0.7×/0.2×、0.5×/0.15×磁珠比例进行长度分选，结果使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

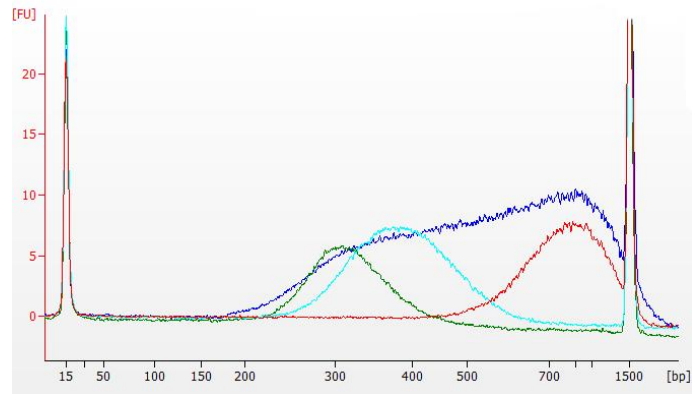


图3 Agilent 2100 Bioanalyzer 文库质量分析



[illegible]

[illegible]

www.yeasen.com



**帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐**