

YZSeq™ Tn5 Library Prep Kit

使用说明书

目录

一、产品介绍	1
二、产品组分	1
三、保存条件	1
四、样本要求	1
4.1 样本状态	1
4.2 DNA浓度测定	1
4.3 DNA纯度的要求	1
五、自备材料	2
六、注意事项	2
6.1 磁珠操作注意事项	2
6.2 试剂使用注意事项	2
七、实验原理	2
八、操作步骤	2
8.1 DNA片段化	3
8.2 文库扩增	4
8.3 扩增产物长度分选(以分选 $0.5\times/0.15\times$ 为例)	5
8.4 文库质量检测	6

一、产品介绍

YZSeq™ Tn5 Library Prep Kit可以兼容Illumina/MGI两种高通量测序平台。相比传统文库构建方法，试剂盒采用新型的转座酶和缓冲体系，10 min即可完成DNA片段化、末端修复和接头连接等操作，显著缩短了文库构建时间，操作更简单。该试剂盒适用于DNA投入量为标准50 ng的反应。试剂盒中所有试剂都经过严格的质量控制，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

二、产品成分

组分名称	8T	24T	96T
YZ-Tn5 Mix	40 μ L	120 μ L	480 μ L
5 \times Tn5 Reaction Buffer	32 μ L	96 μ L	384 μ L
5 \times Tn5 Stop Buffer	40 μ L	120 μ L	480 μ L
PCR Primer Mix	40 μ L	120 μ L	480 μ L
YZ-S7 Buffer	80 μ L	240 μ L	960 μ L
YZ-S7 Enzyme	8 μ L	24 μ L	96 μ L

三、适用范围

$\leq 0^{\circ}\text{C}$ 运输，5 \times Stop Buffer，15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 保存，其余组分-30 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

四、样本要求

4.1 样本状态

纯化过的基因组DNA，溶于灭菌超纯水中。如样品为PCR产物，应保证其长度 > 500 bp；由于转座酶无法作用于DNA末端，会导致PCR产物末端50 bp测序覆盖度较低。

4.2 DNA浓度测定

因Tn5酶对DNA浓度非常敏感，准确的DNA浓度测定对实验成功与否至关重要，推荐使用Qubit或荧光染料PicoGreen对DNA样品进行浓度测定。

4.3 DNA纯度的要求

$A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$, $A_{260}/A_{230} \geq 1.6$

五、自备材料

磁力架、PCR扩增仪、DNA Clean Beads (推荐KAPA Pure Beads; KK8002)、低吸附1.5mL EP管、0.2mL PCR管、0.2mL 8联排管、无水乙醇、灭菌超纯水、Tn5 Index Kit。

六、注意事项

6.1 磁珠操作注意事项

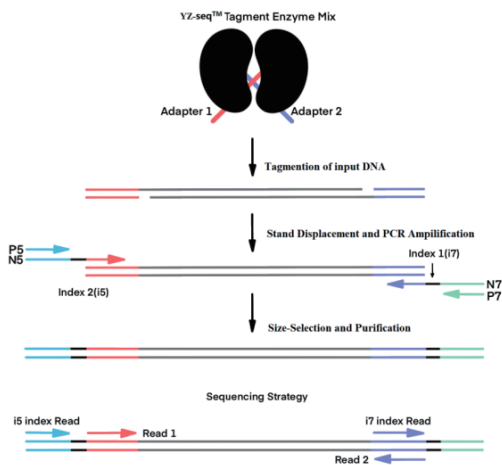
- 6.1.1 使用前将磁珠平衡至室温，所有磁珠操作都应于室温进行，切勿将磁珠置于-20°C冻存；
- 6.1.2 每次吸取磁珠前都应涡旋振荡充分混匀，DNA样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀；
- 6.1.3 移取上清时应在磁珠被彻底吸附后小心进行，避免吸到磁珠而影响后续实验；
- 6.1.4 磁珠漂洗使用的80%乙醇应现配现用，漂洗磁珠后应尽量吸干残留乙醇；
- 6.1.5 产物洗脱前应将磁珠置于室温充分干燥，但也需要避免过分干燥出现干裂而影响文库得率；

6.2 试剂使用注意事项

试剂应避免反复冻融，首次使用后将剩余试剂小份分装冻存。

七、实验原理

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。反应发生后，可实现DNA片段化的同时末端接上接头。这种片段化产物经N5 (N5XX)和N7 (N7XX)以及P5和P7 (PCR Primer Mix)两对引物扩增、扩增产物大小分选和纯化后即可获得测序文库。



Adapter 1 and Adapter 2, two oligos embedded in Tagment Enzyme
P5 and P7, two universal PCR Primers
N5 and N7, two index primers containing index 2 (i5) and index 1 (i7) respectively

八、操作步骤

8.1 DNA片段化

1、准备工作:取出DNA Clean Beads,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。

确认5×Stop Buffer是否处于室温,并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀,37°C加热并涡旋振荡混匀,沉淀即可溶解。

2、在灭菌的PCR管中配制如下反应体系:

组分	体积(μL)
Input DNA (50ng)	X
YZ-Tn5 Mix	5
5×Reaction Buffer	4
ddH ₂ O	To total 20μL

3、使用移液器轻轻吹打或上下颠倒混匀10次 **(重要!切勿涡旋振荡)**

4、将PCR管简短离心,放置PCR仪中,运行如下反应程序:

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

5、**反应结束,立即向产物中加入5μL 5×Stop Buffer**,使用移液器吹打混匀或上下颠倒混匀10次,置于室温放置5-10 min。

注:此步骤完成,可将产物放置-20°C冰箱暂存12h。

8.2 文库扩增

1、提前将文库扩增所需试剂从-20℃冰箱取出，置于冰上解冻。

2、将PCR管置于冰上，配制如下反应体系：

组分	体积 (μL)
片段化产物	25
PCR Primer Mix	5
Y5XX*	5
Y7XX*	5
YZ-S7 Buffer	10
YZ-S7 Enzyme	1

注意：*本公司提供24种Y5XX和24种Y7XX，共计576种Index组合；可根据样品数量自行选择最优Index组合。使用本公司试剂盒成分可兼容Illumina/MGI两种高通量测序平台，不需要单独转化。

3、使用移液器吹打混匀或上下颠倒混匀10次，简短离心，将PCR管置于PCR仪中，运行如下反应程序：

温度	时间	循环数
热盖105℃	On	—
72℃*	3 min	—
98℃	30 sec	—
98℃	15 sec	7-10 cycles
60℃	30 sec	
72℃	1 min	
72℃	5 min	—
4℃	Hold	—

注意：*此步不可省略。Tn5酶片段化产物并非完整的双链DNA，需72℃孵育3 min生成成熟的PCR模板。

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。

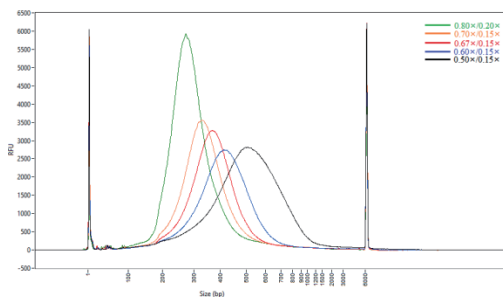
8.3 扩增产物长度分选 (以分选0.5×/0.15×为例)

- 1、将平衡至室温的DNA Clean Beads涡旋振荡充分混匀。
- 2、使用灭菌蒸馏水将PCR产物体积补齐至50 μL。
- 3、取25μL (0.50×) *磁珠至50 μL PCR管中, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育10 min。
- 4、取新的PCR管, 加入7.5 μL (0.15×) *磁珠待用。
- 5、将PCR管简短离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 小心转移上清至分好磁珠的离心管中, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育10 min。
- 6、PCR管简短离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 小心移除上清。
- 7、保持PCR管在磁力架上, 加入200 μL新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育30s, 小心移除上清。
- 8、重复步骤7, 总计漂洗2次。
- 9、将PCR管简短离心, 置于磁力架上, 用10 μL 枪头彻底移除残留液体, 保持PCR管在磁力架上, 磁珠干燥至不反光(成哑光状态)。
- 10、取下PCR管, 加入21 μL ddH₂O, 涡旋混匀或移液器充分吹打10次混匀, 室温孵育5 min。
- 11、将PCR管简短离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 转移20 μL 上清至新的PCR管中, -20℃保存。

注: *一轮磁珠和二轮磁珠的用量, 根据实际分选的片段大小而定, 片段大小分选的磁珠用量可参考文库分选磁珠用量表。

文库总长度范围	180 - 450 bp	200 - 500 bp	220-550	250 - 600 bp	300 - 900 bp
文库平均总长度	270 bp	320 bp	370 bp	420 bp	510 bp
第一轮磁珠用量	40 μL (0.8×)	35 μL (0.70×)	33.5 μL (0.67×)	30 μL (0.60×)	25 μL (0.5×)
第二轮磁珠用量	10 μL (0.2×)	7.5 μL (0.15×)	7.5 μL (0.15×)	7.5 μL (0.15×)	7.5 μL (0.15×)

注意: “×”数均根据PCR产物体积补齐至50 μL计算而得, 如“0.5×”表示 $0.5 \times 50 = 25 \mu\text{L}$ 。



Agilent 5300 Bioanalyzer文库质量分析

8.4 文库质量检测

- 1、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 Realtime PCR绝对定量的方法。
- 2、文库长度分布检测：可通过 Agilent Bioanalyzer 2100、Qsep100等设备进行检测。
- 3、文库产出参照表 (input DNA 50ng)

扩增循环数	6	7	8	9
文库产出量 (分选后, ng)	120	180	240	280

基因科技 影领未来

武汉影子基因科技有限公司
Wuhan Yingzi Gene Technology Co., Ltd

官网: www.yingzigen.com

电话: 027-5921-6838

邮箱: market@yingzigen.com

地址: 湖北省武汉市武汉软件新城3期D5栋4楼

