

# M5 NGS Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 NGS Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent	24T	MF053-01
M5 NGS Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent	96T	MF053-04

## 【储存条件】

-20°C 保存，干冰运输。

## 【试剂盒组分】

	MF053-01(24T)	MF053-04(96T)
10x End Repair Buffer	200µl	800µl
End Repair Enzyme Mix	48µl	192µl
Ligase and Nick Repair Buffer	400µl	2x800µl
T4 DNA Ligase	48µl	192µl
Bst DNA Polymerase	48µl	192µl
HiFidelity 2xPCR Master Mix	0.625ml	2x1.25ml
10x Primer Mix ( 5µM each)	150µl	600µl

## 【产品简介】

本二代测序快速 DNA 建库试剂盒 (Ion torrent) 提供了构建 DNA 文库需要的酶预混体系及反应缓冲液，包含除接头以外的所有成分，制备的文库可用于 Ion torrent PGM、Ion Proton 二代测序平台的测序。Ion torrent 平台快速 DNA 建库试剂盒包括三个步骤：末端修复、接头连接和 PCR 富集。和常规建库方法相比，该试剂盒将多个步骤进行了合并，整个建库过程只有两个纯化步骤，因此显著降低了起始模板 DNA 的最少需求量，缩短了文库构建时间。另外，试剂盒采用高保真 DNA 聚合酶进行文库富集，无偏好的 PCR 扩增，扩大了序列覆盖区域，可以高效的制备用于 Ion Torrent 二代测序平台的 DNA 文库。

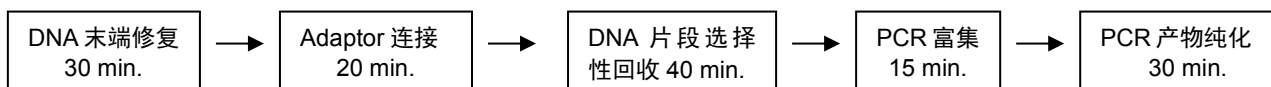
## 【自备仪器、试剂和耗材】

- 1、磁力架：建议使用 Life 公司的磁力架。
- 2、DNA 纯化回收试剂盒：建议使用聚合美磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒（货号 MF050）
- 3、样本接头引物试剂盒
- 4、无水乙醇，EB（10mM Tris-HCl, pH8.0），去离子水（pH 在 7.0-8.0）。
- 5、反应管：建议使用低吸附的 PCR 管与 1.5ml 离心管。枪头：建议使用高质量过滤枪头防止试剂盒、文库样本污染。

## 【实验前准备及注意事项】

1. 避免试剂盒中 Buffer 的反复冻融，建议首次使用时将 Buffer 进行分装保存。酶在使用完尽快放回-20°C 保存。
2. PCR 产物因操作不当极易产生污染，导致实验结果不准确，建议将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化区隔离，并使用专门的移液器，定期对各实验区进行清洁。

## 【DNA 建库流程示意图】



从起始材料到得到 DNA 文库只需 2 小时 15 分钟。

起始材料：5ng-1µg 打断的双链 DNA，溶于 EB（10mM Tris-HCl, pH8.0）或去离子水中。

DNA 纯度要求：OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.8-2.0。

## 【DNA 末端修复反应】

1. 向 200 $\mu$ l PCR 管中加入以下成分，用枪头将上述溶液轻轻混匀，瞬时离心使所有组分收集到管底。

试剂名称	体积
10x End Repair Buffer	6 $\mu$ l
End Repair Enzyme Mix	2 $\mu$ l
Fragmented DNA	X (10ng-1 $\mu$ g)
RNase-Free Water	Up to 60 $\mu$ l

2. 将管子置入 PCR 仪中，热盖打开，反应程序如下：

25°C 20 min.  
70°C 10 min.  
然后置于 4°C。

## 【Adaptor 连接】

建议使用聚合美的 adaptor 进行连接，也可以选择使用 Life、Kapa 公司的 adaptor，具体连接方法可以参考各公司的产品说明书。以下使用聚合美 adaptor 进行连接的操作步骤：

1. 向上述反应液中直接加入以下试剂，用枪头将上述试剂混匀，短暂离心，使溶液收集到管底。

试剂名称	体积
Ligase and Nick Repair Buffer	10 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	2 $\mu$ l
Bst DNA Polymerase	2 $\mu$ l
Adaptor A	7 $\mu$ l
Adaptor P1	7 $\mu$ l
RNase-Free Water	12 $\mu$ l
Total volume	40 $\mu$ l

注意：建议 Adaptor 的加入量与 DNA 片段的摩尔比为 10:1-20:1，具体 Adaptor 工作浓度请参考下表。如果 DNA 的量为 10-100ng，Adaptor 建议使用浓度为 1  $\mu$ M（小于 260bp）或 0.5 $\mu$ M（300-400bp）。

不同大小 DNA 建议 Adaptor 使用浓度

插入 DNA 量/反应	130bp	260bp	320bp	410bp
1 $\mu$ g	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
500ng	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M
100ng	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M

2. 反应步骤：

25°C 15 min.  
65°C 5 min.  
然后置于 4°C。

## 【Adaptor 连接 DNA 片段的选择性回收】

构建不同大小的 DNA 文库时，需进行 DNA 片段的选择性回收。若起始样本量低于 50ng，不建议进行 DNA 片段选择性回收。可以参考另一种方案，直接进行 DNA 片段的纯化。建议使用聚合美 Mei5bio 的磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒（MF050）进行 DNA 片段选择性回收。若使用聚合美以外厂家的磁珠，需自行摸索最佳磁珠用量。以下操作步骤采用聚合美磁珠法 DNA 纯化回收试剂盒，可以选择性回收 DNA 片段长度范围为 310-370bp（读长为 200bp），反应起始体积为 100 $\mu$ l。

1. 涡旋振荡 CMPure 20 秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将 100 $\mu$ l adaptor 连接反应缓冲液转移至一新的 1.5ml 离心管中；
3. 加入 60 $\mu$ l 混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温静置 5 分钟；

4. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心地将上清溶液转移至新的 1.5ml 离心管中，并弃去磁珠。（**注意不要弃除上清**）。
5. 向上清中加入 20 $\mu$ l 混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温放置 5 分钟；
6. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心移取上清并弃除，期间避免接触粗结合目标 DNA 的磁珠。（**注意不要弃除磁珠**）。
7. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 250 $\mu$ l 新配置的 80%乙醇室温放置 30 秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
8. 重复步骤 7：为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体；
9. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置 5 分钟，使磁珠在空气中干燥；
10. 将离心管从磁力架上取下，加入 25 $\mu$ l 10mM Tris-HCl（pH8.0）或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置 5 分钟；
11. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），将 25 $\mu$ l 洗脱液转移到一个新的 PCR 管中。

#### 【其他方案：Adaptor 连接 DNA 片的选择性回收】

1. 涡旋振荡 CMPure 20 秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将 adaptor 连接反应缓冲液转移至一新的 1.5ml 离心管中；
3. 加入 1 倍样品体积混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温静置 5 分钟；
4. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标 DNA 的磁珠。（**注意不要弃除磁珠**）。
5. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 250 $\mu$ l 新配置的 80%乙醇室温放置 30 秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
6. 重复步骤 5，为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体；
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置 5 分钟，使磁珠在空气中干燥；
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 25 $\mu$ l 10mM Tris-HCl（pH8.0）或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置 5 分钟；
9. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），将 25 $\mu$ l 洗脱液转移到一个新的 PCR 管中。

#### 【PCR 富集】

1. 在 PCR 管中加入以下试剂并混匀

试剂名称	体积
连接 adaptor 后的 DNA 片段	20 $\mu$ l
HiFidelity 2x PCR Master Mix	25 $\mu$ l
10x Primer Mix (5 $\mu$ lM each)	5 $\mu$ l
Total volume	50 $\mu$ l

2. PCR 反应条件

步骤	温度	时间
预变性	98°C	30sec.
变性	98°C	10sec.
退火	65°C	30sec.
延伸	72°C	30sec.
重复以上 4-12 个循环		
终延伸	72°C	5 min.

注意：样本量为 1 $\mu$ g 时，4-6 个循环，样本量 100ng 时 6-8 个循环，样本量为 10ng 时 10-12 个循环。  
PCR 循环数可以根据实验进行优化。

### 【PCR 产物的纯化】

1. 涡旋振荡 CMPure 20 秒，使其彻底混匀为均一溶液；
2. 将 PCR 反应液转移至一新的 1.5ml 离心管中；
3. 加入 1 倍样品体积混合均匀的 CMPure，涡旋振荡 5 秒钟后室温静置 5 分钟；
4. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），小心吸取上清并弃除，期间避免接触已结合目标 DNA 的磁珠。（**注意不要弃除磁珠**）。
5. 继续保持离心管固定于磁力架上，向离心管中加入 250 $\mu$ l 新配置的 80%乙醇室温放置 30 秒，待悬起的磁珠完全吸附后，小心弃除上清；
6. 重复步骤 5，为彻底移除残留液体，可将离心管短暂离心后，再次移除残留液体；
7. 保持离心管固定于磁力架上，室温静置 5 分钟，使磁珠在空气中干燥；
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 25 $\mu$ l 10mM Tris-HCl（pH8.0）或去离子水（自备），涡旋振荡使磁珠完全重悬于洗脱液中，室温静置 5 分钟；
9. 短暂离心，将离心管置于磁力架上，使磁珠和上清溶液分离，直至溶液澄清（约需 5 分钟），将 25 $\mu$ l 洗脱液转移到一个新的 PCR 管中。DNA 文库在 -20°C 保存。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。