

MICH™ TLX DNA-seq kit (illumina Compatible)
TLX DNA 建库试剂盒
Catalog #NGS 0602-96(96 rxns)

使用说明书 (Ver.1.2)

目 录

产品目录	2
产品描述	3
产品组分	3
使用方法	3
注意事项	8
运输和保存	9

产品信息

产品货号	名称	规格
NGS 0602-8	MICH™ TLX DNA-seq kit (illumina Compatible)	8 rxns
NGS 0602-24	MICH™ TLX DNA-seq kit (illumina Compatible)	24 rxns
NGS 0602-96	MICH™ TLX DNA-seq kit (illumina Compatible)	96 rxns

产品描述

MICH™ TLX DNA-seq kit (illumina Compatible) 是为 illumina 平台设计的 DNA 文库准备试剂盒，适用于起始量 1 ng-200 ng 的 DNA 样本，试剂盒经过精心设计和优化，能够快速构建文库（2.5-3.5 小时），有高效的文库转化率与扩增效率，已经经过多样本验证可获得优异的文库与测序数据，可用于石蜡包埋组织 DNA 样本建库。试剂盒包含了 DNA 片段化和末端修复加 A 尾的预混液、连接预混液、高保真扩增预混液、短接头和含有 INDEX 的 PCR 引物（可以根据客户要求选配）。

（注意：本试剂盒不可直接用不带 INDEX 的引物进行 PCR 反应）。

产品组分

名称	体积 (NGS 0602-8)	体积 (NGS 0602-24)	体积 (NGS 0602-96)
TLX Buffer Mix	38 µL	112 µL	448 µL
TLX Enzyme Mix	30 µL	89 µL	356 µL
TLX ligase Enzyme	20 µL	56 µL	224 µL
TLX ligase Buffer	76 µL	224 µL	896 µL
TLX Adapter for ILM	20 µL	56 µL	224 µL
PCR Master Mix	96 µL	280 µL	1120 µL

使用方法

一、用前准备

- 磁珠：Cat#A63881，AMPure XP Beads 或其他等效产品。
- DNA 质控：Cat#Q33238，life qubit4.0；Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品。
- 其他材料：Nuclease-free water、低吸附 EP 管、无水乙醇、TE Buffer（10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5+0.1 mM EDTA）、磁力架、PCR 管、PCR 仪等。

二、使用流程

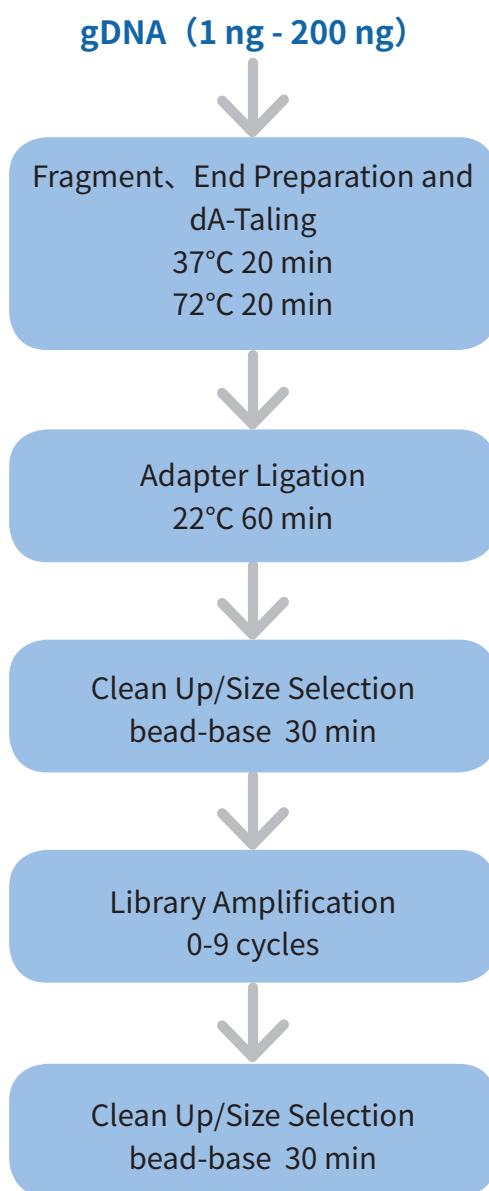


图 1.DNA 文库准备流程图

三、实验步骤

3.1 片段化 / 末端修复 / 加 A 尾 (Fragment/End Preparation/dA-Taling)

1. 将所需试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制下表所示反应体系。

试剂名称	体积
TLX Buffer Mix	4 μ L
TLX Enzyme Mix	3.2 μ L
gDNA	X
Nuclease-free water	Up to 20 μ L

表 1. 片段化 / 末端修复 / dA 尾反应体系

- 吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
- 按下表设置反应程序（热盖设置为 82°C），将上述 PCR 管置于 PCR 仪中反应。

温度	时间
37°C	20 min
72°C	20 min
4°C	Hold

表 2. 片段化 / 末端修复 / 加 dA 尾反应程序

3.2 接头连接 (Adapter Ligation)

- 将所需试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
- 如下表所示配制反应体系。

试剂名称	体积
dA-tailed DNA (3.1 步骤产物)	20 μ L
TLX ligase Enzyme	2 μ L
TLX ligase Buffer	8 μ L
TLX Adapter for ILM	2 μ L
Nuclease-free water	Up 40 μ L

表 3. 接头连接反应体系（接头详细说明见注意事项二）

- 吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
- 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中 22°C，孵育 60min。

【注】：当投入 DNA 量较低，实验效果不理想时，可尝试将连接时间延长。

3.3 连接产物磁珠纯化 (Post Ligation Clean Up)

3.3.1 产物纯化操作步骤 (必选)

1. 准备工作：将 AMPure XP Beads 室温平衡 30 min。配制 80% 乙醇。
2. 吸取 48 μL AMPure XP Beads (1.2 \times , Beads:DNA=1.2:1) 至接头连接产物中，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温孵育 5 min。
3. 短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后 (约 5 min)，弃上清。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，弃上清。
5. 重复步骤 4。
6. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚出现龟裂 (约 5 min) *。
7. 1) 如产物无需进行片段分选，将 PCR 管从磁力架中取出，磁珠 (无需用水洗脱) 直接用于 3.4 步骤反应。
2) 如产物需进行双轮分选，加入 52-102 μL Nuclease-free Water，涡旋振荡或轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移取 50-100 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠 (洗脱体积越大，洗脱效率越高，分选效果越好，详细说明见注意事项三)。

* 等待磁珠干燥过程中，可配制 3.4 步骤反应体系。

3.3.2 双轮分选操作步骤 (可选)

1. 准备工作：将 AMPure XP Beads 室温平衡 30 min。配制 80% 乙醇。
2. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 4 向纯化产物中加入第一轮分选磁珠，涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀。

插入 DNA 片段大小	150 - 250 bp	200-300 bp	300-400 bp	400-600 bp	500-700 bp
DNA 文库大小	250 - 350 bp	300-400 bp	400-500 bp	500-700 bp	600-800 bp
第一轮磁珠体积	0.70X	0.65X	0.62X	0.48X	0.44X
第二轮磁珠体积	0.25X	0.25X	0.16X	0.16X	0.16X

表 4 文库双筛对应磁珠体积参照表

【注】：表中“0.7 \times ”表示样品 DNA 体积的 0.7 倍。如文库插入片段长度为 200 bp，样品 DNA 体积为 100 μL ，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.70 \times 100 μL =70 μL ；第二轮分选磁珠使用体积为 0.25 \times 100 μL =25 μL 。

3. 室温孵育 5 min。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 PCR 管中。
4. 参考表 4 向上清中加入第二轮分选磁珠。涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
5. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后 (约 5 min)，弃上清。

6. 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，弃上清。
 7. 重复步骤 6。
 8. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚出现龟裂（约 5 min）*。
 9. 将 PCR 管从磁力架中取出，磁珠（无需用水洗脱）直接用于 3.4 步骤反应。
- * 等待磁珠干燥过程中，可配制 3.4 步骤反应体系。

3.4 文库扩增 (Library Amplification)

1. 将表 5 所需试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 如下表所示配制反应体系。

试剂名称	体积
Adapter Ligated DNA (3.3 步骤产物)	干燥后的磁珠
PCR Master Mix	10 μL
I7 Primer	1 μL
I5 Primer	1 μL
Nuclease-free water	8 μL

表 5 文库扩增反应体系

【注】：含有 Index 的 PCR 引物 (i5 Primer 和 i7 Primer) 信息详见 MichTM TLX Primer Kit (Catalog #NGS CD-0602-C) 说明。

3. 将配置好的 PCR 反应液加入到 3.3.1 或 3.3.2 步骤完成后的含有磁珠的 PCR 管中，吹打或振荡混匀，并短暂离心。
4. 按下表设置反应程序，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中反应。

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	30 s	参照注意事项四：关于文库扩增的表 1
65°C	30 s	
72°C	40 s	
72°C	4 min	1
4°C	Hold	*

表 6 PCR 扩增反应程序

3.5 产物磁珠纯化 (Post Amplification Clean Up)

- 同 3.3.1 步骤中纯化操作步骤。使用 AMPure XP Beads (1×, Beads:DNA=1:1) 纯化文库扩增产物, 最后加适量 Nuclease-free water (20-50 μL) 进行洗脱 (产物如需保存请使用 TE Buffer 洗脱)。

3.6 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五。

注意事项

一、关于操作

1. 请穿实验服并戴一次性手套进行实验。
2. 使用前请将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后充分混匀, 短暂离心后置于冰上待用。
3. 混匀时请轻轻吹打或轻轻振荡, 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, 推荐使用带滤芯的一次性枪头。
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 仪至反应温度附近。
6. 请在洁净的实验环境下实验, 避免污染。

二、TLX Adapter for ILM 说明

1. TLX Adapter for ILM 采用短接头模式。
2. 接头浓度: 15 μM; 直接用于相应建库试剂盒连接体系里即可。
3. -20°C 保存, 使用前提前融化, 尽量低温融化, 避免在超过 30°C 的环境中融化。
4. 建库推荐用量: 常规 DNA 投入量 100-200 ng, 2 μL/rxns; 其他 DNA 投入量需要适当调整接头使用量。

三、关于磁珠纯化与分选

1. DNA 片段选择步骤可在接头连接后或文库扩增后进行。
2. 当 Input DNA 质量 ≥ 50 ng, 建议在接头连接后分选; 如 Input DNA 质量 < 50 ng, 可在文库扩增后进行分选。

3. TLX Ligase Buffer 包含高浓度的 PEG，对双轮磁珠分选产生显著影响。因此，当在接头连接后进行片段选择，须先进行纯化步骤，再进行双轮分选步骤；如在文库扩增后进行片段选择，可直接进行双轮磁珠分选步骤。
4. 磁珠使用前应先平衡至室温，并混匀再使用，否则会导致得率下降。
5. 80% 乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
6. 进行片段选择时，初始样品体积应尽量 $\geq 100 \mu\text{L}$ ，初始样本体积越大，片段选择效果越好。

四、关于文库扩增

1. 文库扩增循环数与文库产量和文库质量有直接关系，请参照下表列举的本试剂盒设置扩增循环数，并摸索合适的循环数。

DNA 投入量	获得 100 ng 文库需要循环数	获得 300 ng 文库需要的循环数
250 ng	1-4	5-7
100 ng	2-5	6-8
50 ng	4-7	8-10
10 ng	6-8	9-12
5 ng	7-10	11-14
1 ng	9-11	12-15

表 1. 文库扩增循环数参照表

【注】：如文库扩增后需要做片段选择时参照较高循环数扩增。

五、关于文库质检

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® 或 qPCR 绝对定量的方法。
3. 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。

运输与保存方法

-20°C 运输。

所有组分 -20° C 保存，有效期 1 年。