

Regene™ DNA 样品建库试剂盒



简单、高效的 DNA 样品高通量测序的建库试剂

Catalog # MD-3002

24、48、96 次反应

公司网址： www.mdtkbio.com

服务电话： 18601040016

企业邮箱： support@mdtkbio.com

[产品描述]

Regene™ DNA 样品建库试剂盒可用于基因组 DNA 文库建库样本的预处理实验，可与 Illumina 测序仪兼容。其所采用的高效的新技术可以在同一实验步骤里同时实现 DNA 的片段化和添加标签，可以在两小时内完成建库的预处理步骤（取代之前多次的实验步骤：DNA 片段化，DNA 末端修饰，添加标签）；

Regene™ DNA 样品制备只需要使用 50ng 的 DNA 起始量；

Regene™ DNA 样品建库试剂盒具有高效、简单、快速的特点。

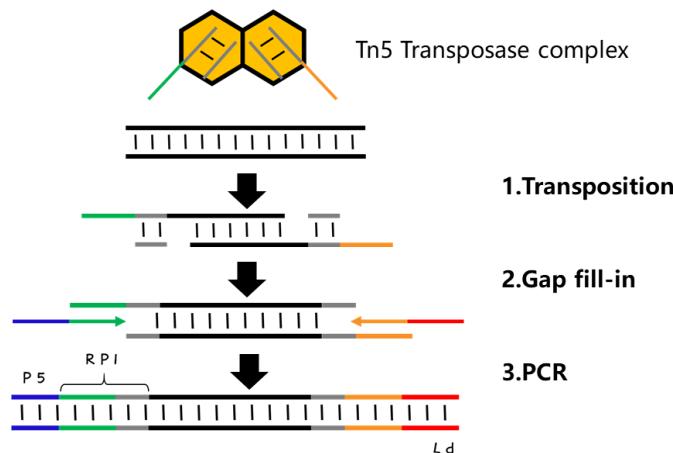


图 1 基于 Tn5 转座酶的建库原理

[组分&说明]

储存： 20°C 保存 12 个月

适用： 将 DNA 制备成 Illumina 高通量测序平台所适用的文库

组成：

- Regene™ Enzyme Mix
- 5× Regene™ Reaction Buffer
- 2× Regene™ PCR Master Mix
- 25× Regene™ N502, N503, N505, N506, N507, N508
- 25× Regene™ N701, N702, N703, N704, N705, N706, N707, N708

[使用方法]

物品准备：

- ✓ 无水乙醇；
- ✓ 高压灭菌超纯水
- ✓ 低吸附、灭菌 EP 管和 PCR 管
- ✓ Zymo® Purification Kit (DNA Clean & Concentrator™ -5, #D4013)
- ✓ AMPure® XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
- ✓ Regene™ DNA Sample prep kit (Regene #MD-3024)
- ✓ Illumina 适用的 Dual Index Sequencing Primers
- ✓ 磁力架、PCR 仪、涡旋仪、掌上离心机
- ✓ 纯化 DNA (建议用 Qubit ® 对 DNA 浓度测定；DNA 纯度为：OD260/OD280=1.8~2.0)

操作步骤：

1. DNA 片段化-加标签反应

- 1.1 室温解冻 5×Regene™ Reaction Buffer，涡旋混匀，瞬时离心后，放于冰盒备用。
- 1.2 在 PCR 管中依次添加各反应组分：

Nuclease-Free Water	To 20uL
起始 50ng 的 DNA	XuL
5×Regene Reaction Buffer	4uL
Regene Enzyme Mix	1uL

注：DNA 的量：50~150ng 均可

- 1.3 加好各组分后，用移液器吹打混匀 10 次，或者涡旋混匀，然后瞬时离心，放于冰盒备用。
- 1.4 将 PCR 管置于 PCR 仪中，55 °C，孵育 7 分钟，4°C 放置备用。（为避免反应过程中水分蒸发，PCR 仪的盖子需要在反应中始终处于热盖状态）

2 片段化-加标签产物的纯化

- 2.1 加 100μl Zymo DNA Binding buffer 到已经片段化的上述 PCR 管中，用移液器吹打混匀 10-20 次，或者涡旋混匀，然后瞬时离心；将混合物加到 Zymo-Spin™ Column 上的 Collection Tube 中，10000g 离心 1 分钟，弃去流出液。
- 2.2 加 250μl 的 Wash buffer 于 Collection Tube 中，10000g 离心 1 分钟，弃去流出液。
- 2.3 加 250μl 的 Wash buffer 于 Collection Tube 中，10000g 离心 1 分钟，弃去流出液。
- 2.4 将 Zymo-Spin™ Column 转放到干净无菌的 1.5ml 的离心管上，静置 3-5 分钟。
- 2.5 加 11μl 的高压超纯水到 Column，室温孵育 2 分钟，然后 10000g 离心 1 分钟。
- 2.6 会收集大约 10μl 纯化产物，取 5μl 纯化产物用于下一步反应。若起始 DNA 量低于 50ng，可以取全部纯化产物用于后续实验。

3 PCR 扩增纯化产物

3.1 将灭菌 PCR 管置于冰浴，依次添加各反应组分（本试剂盒包含 N5XX 和 N7XX）

Zymo 纯化产物	5uL
Regene PCR Master Mix	25uL
N5XX	2uL
N7XX	2uL
Nuclease-Free Water	14uL

3.2 加好各组分后，用移液器吹打混匀 10-20 次，或者涡旋混匀，然后瞬时离心，将 PCR 管置于 PCR 仪中进行如下反应：

72°C	3分钟
95°C	30秒
95°C	10秒
62°C	30秒
72°C	3分钟
4°C	Hold

- 注：为避免反应过程中水分蒸发，PCR 仪的盖子需要在反应中始终处于热盖状态；如果 PCR 产率不够，可将循环数增至 10-15 个循环，一般而言，1ng 的 DNA 起始量是 15 个循环，5ng 为 13 个循环，10ng 是 12 个循环，25ng 是 10 个循环，100ng 是 7 个循环。

4 AMPure®XP Beads 纯化(不同的磁珠浓度会影响回收的 PCR 产物的得率和片段长度)

- Beckman XP beads 室温放置 30min，每次使用前应充分混匀；
- 涡旋震荡混匀 XP beads 并吸取 R1 体积 XP beads 和 50ul PCR 产物，加入 1.5ml EP 管中，移液器轻轻吹打 10 次充分混，室温放置 5min；
- 将 EP 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清转移上清至干净 1.5ml EP 管中，丢弃磁珠；
- 涡旋震荡混匀 XP beads 并吸取 R2 体积至上清中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5min；
- 将 EP 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清移除上清；
- 保持 EP 管始终处于磁力架中，加入 200ul 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；
- 重复步骤 6，总计漂洗两次；
- 保持 EP 管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min；将 EP 管从磁力架中取出，加入 22ul NF-H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀；
- 将 EP 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取 20ul 上清至干净的 0.2ml PCR 管中；

文库平均总长度	~350 bp	~450 bp	~550 bp
文库平均插入长度	~230 bp	~330 bp	~430 bp
文库总长度分布范围	250~450 bp	300~700 bp	400~900 bp
第一轮磁珠用量	R1=35ul (0.7X)	R1=30ul (0.6X)	R1=25ul (0.5X)
第二轮磁珠用量	R2=7.5ul (0.15X)	R2=7.5ul (0.15X)	R2=7.5ul (0.15X)

[质量控制]

文库浓度测定

为了得到高质量的测序结果，必须对文库浓度进行精确测定。文库浓度还可以使用基于特异性识别双链DNA的荧光染料法进行测定(如 Qubit®)，最终使用下表推荐的近似公式换算文库的摩尔浓度。

文库平均总长度	近似转换公式
250	1ng/ul=6nM
500	1ng/ul=3nM
1000-1500	1ng/ul=1.5nM

[附]

随试剂盒附带的引物如下表所列，可根据需要选择使用

Index Adapter Sequences:

Index 1 (i7)	Sequence	Index 2 (i5)	Sequence
N701	TAAGGCGA	N502	CTCTCTAT
N702	CGTACTAG	N503	TATCCTCT
N703	AGGCAGAA	N505	GTAAGGAG
N704	TCCTGAGC	N506	ACTGCATA
N705	GGACTCCT	N507	AAGGAGTA
N706	TAGGCATG	N508	CTAAGCCT
N707	CTCTCCTAC		
N708	CAGAGAGG		