

# ND103

## CHIP-Seq Library Prep Kit for Illumina®

### 產品概述

CHIP-Seq Library Prep Kit for Illumina®是針對 Illumina 高通量定序平台資料庫建構定向優化而成的試劑組。使用本試劑組可以將 10 ng CHIP DNA 樣品製備成 Illumina 高通量定序平台專用資料庫。試劑組中提供的所有試劑都經過嚴格的品質控制和功能驗證，保證了資料庫建構的穩定性和重複性。

### 產品組成

組成	ND103-01 (24 rxn)	ND103-02 (96 rxn)
End Repair Enzyme Mix	24 µl	96 µl
End Repair Reaction Buffer (10X)	120 µl	480 µl
DNA polymerase I Klenow fragment exo -	24 µl	96 µl
dA-Tailing Reaction Buffer (10X)	120 µl	480 µl
Rapid T4 DNA Ligase	48 µl	192 µl
Rapid Ligation Reaction Buffer (5X)	144 µl	576 µl
Super-Fidelity DNA Polymerase	24 µl	96 µl
Super-Fidelity 2X PCR Buffer	600 µl	2 × 1.2 ml

### 有效日期

所有組成分-20°C儲存。有效期一年。

### 適用範圍

適用於將 10 ng CHIP DNA 樣品製備成 Illumina 高通量定序平台專用資料庫。

### 材料

100%酒精

無菌超純水

低吸附 EP tube (Eppendorf #022431021)

AMPure® XP Beads(Beckman Coulter, Inc. #A63881)

磁力架

PCR machine

Singleplex or Multiplex Oligos for Illumina® (Vazyme #N301,#N302 或#N303)



實驗材料：10 ng CHIP DNA (已經過 qPCR 確認，溶於 Elution Buffer 或超純水且體積≤40 μl)

### 片段化 DNA 末端修復並磷酸化

1. 在無菌 PCR 管中配製如列反應物

End Repair Reaction Buffer (10X)	5 μl
End Repair Enzyme Mix	1 μl
CHIP DNA	1-40 μl
ddH <sub>2</sub> O	To 50 μl

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻 (請勿振盪 Vortex 混合)，並短暫離心將反應液體收集至管底。

3. 將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

上蓋加熱	On, 105°C
20°C	30 min

### 修復產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 90 μl (1.8X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200 μl 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 50 μl 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 44 μl 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 50 μl 無菌超純水或者洗脫緩衝液洗脫 elute。

### 修復產物加 dA-tail

1. 在無菌 PCR tube 中配製下方反應物：

dA-Tailing Reaction Buffer (10X)	5 μl
DNA polymerase I Klenow fragment exo -	1 μl
純化後的末端修復產物	44 μl
In Total	50 μl

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心將反應液體收集至管底。

3. 將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

上蓋加熱	On, 105°C
37°C	30 Min



### 加 dA-tail 產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 90  $\mu\text{l}$  (1.8X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200  $\mu\text{l}$  新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 28  $\mu\text{l}$  無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 21  $\mu\text{l}$  上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 25  $\mu\text{l}$  無菌超純水或者洗脫緩衝液洗脫 elute。

### 接合子 Adapter 連接

- 1.在無菌 PCR tube 中配製下列反應：

Rapid Ligation Reaction Buffer (5X)	6 $\mu\text{l}$
Rapid T4 DNA Ligase	2 $\mu\text{l}$
純化後的加 dA-tail 產物	21 $\mu\text{l}$
1/10X Adapter for Illumina* (1.5 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
In Total	To 30 $\mu\text{l}$

\*Singleplex Oligos for Illumina® (Vazyme #N301), Multiplex Oligos set 1 for Illumina® (Vazyme #N302)或

Multiplex Oligos set 2 for Illumina® (Vazyme #N303)中均提供 Adapter for Illumina，濃度為 15  $\mu\text{M}$ 。用無菌超純水將其稀釋 10 倍後使用，現用現配，不可存放。

- 2.使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心將反應液體收集至管底。
- 3.將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

上蓋加熱	On, 105°C
20°C	15 min



### 連接產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 54  $\mu$ l (1.8X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200  $\mu$ l 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5 兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，若後續使用 AMPure XP beads 進行片段大小分離，加入 110  $\mu$ l 無菌超純水 elute；若後續需要使用切膠回收進行片段大小分離，可根據需要調整洗脫 elute 體積。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心吸取 25  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 100  $\mu$ l 無菌超純水或者洗脫緩衝液洗脫 elute。

### 接合子連接產物使用 AMPure® XP Beads 進行長度分離

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 90  $\mu$ l (0.9X) AMPure XP beads 至 100  $\mu$ l DNA 樣品中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心轉移上清液至乾淨 EP 管中。
5. 吸取 20  $\mu$ l (0.2X) AMPure XP beads 至上清中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
6. 室溫靜置 5 分鐘。
7. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
8. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200  $\mu$ l 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
9. 重複步驟 8 兩次，共清洗三次。
10. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
11. 將 EP 管重磁力架中取出，加入 30  $\mu$ l 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心吸取 22  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR 管中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

注意：轉移上清液時請勿吸取 AMPure XP beads，即使微量殘留都將影響後續資料庫擴增效率。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 100  $\mu$ l 無菌超純水或者洗脫緩衝液洗脫 elute。

### 接合子連接產物 PCR 擴增



1. 在無菌 PCR 管在配製下列反應體積：

純化過的接合子連接產物	22 µl
Super-Fidelity 2X PCR Buffer	25 µl
Universal PCR Primer for Illumina*	1 µl
Index Primer for Illumina*	1 µl
Super-Fidelity DNA Polymerase	1 µl
In Total	50 µl

Singleplex Oligos for Illumina® (Vazyme #N301), Multiplex Oligos set 1 for Illumina® (Vazyme #N302) 或 Multiplex Oligos set 2 for Illumina® (Vazyme #N303)中均提供 Universal PCR Primer for Illumina 和 Index Primer for Illumina。

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心將反應液體收集至管底。

3. 將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

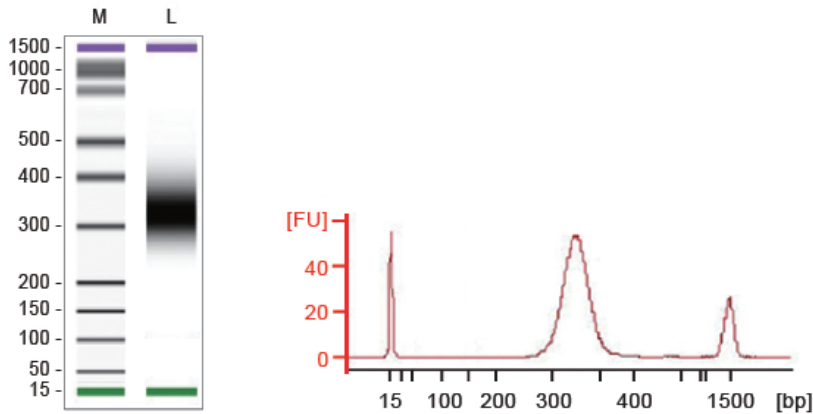
步驟	溫度	時間	循環次數
預變性	98°C	30 sec	1
變性 Denature	98°C	10 sec	
退火 Annealing	65°C	30 sec	15
延伸 Extension	72°C	30 sec	
完全延伸	72°C	5 min	
Hold	4°C		

### PCR 產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 50 µl (1X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200 µl 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 20 µl 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 15 µl 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。
9. 將制备好的 DNA 文库置于-20°C 保存。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 100 µl 無菌超純水或者洗脫緩衝液洗脫 elute。

### 實例參考



Agilent 2100 Bioanalyzer 資料庫品質分析

M：DNA Ladder

L：使用 Turbo DNA Library Prep Kit for Illumina® 製備的 300-350 bp 資料庫 (接合子連接產物通過 AMPure XP beads 片段長度分離方案進行純化)。

## 品質控制

### End Repair Enzyme Mix

SDS-PAGE 純度：所有酵素組成純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中加入 10  $\mu$ l 酵素和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經膠體電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10  $\mu$ l 酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

功能性活性檢測：在 1X End Prep Reaction Buffer 中加入 1  $\mu$ l 酵素和 0.5  $\mu$ g 包含 5' 和 3' 突出末端的片段化 DNA，25°C 下反應 20 分鐘。經毛細管電泳檢測，末端修復磷酸化的 DNA 比率 > 95%。

### End Repair Reaction Buffer (10 X)

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X End Repair Reaction Buffer 和 1  $\mu$ g HindIII- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經膠體電泳檢測，無條帶降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X End Prep Reaction Buffer 和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經膠體電泳檢測後，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X End Prep Reaction Buffer 和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經膠體電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：在 1X End Repair Reaction Buffer 中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺膠體電泳檢測，無條帶降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X End Repair Reaction Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下靜置 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基陰離子吸收高峰。

### DNA polymerase I Klenow fragment exo -

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

RNase 活性殘留：在 1 µl 酵素中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，無條帶降解。

外切酶活性檢測：50 µl 反應體積中加入 40 µl 本酶和 1 µg [3H] DNA (105cpm/µg)，37°C 下反應 4 小時。經同位素測定，放射強度釋放量 < 0.1%。

3'→5'外切酶活性檢測：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 10 nM 5'-FAM 標記的寡核核苷酸，37°C 下反應 30 分鐘。經毛細管電泳檢測，無 3'→5'降解產物可見。

功能性活性檢測：37°C 下反應 30 分鐘，1 µl 酵素可使 50 nmol 的 dNTP 摻入酸不溶性沉澱物。

### **dA-Tailing Reaction Buffer (10X)**

16 小時反應檢測：50 µl 反應體積中包含 1X dA-Tailing Reaction Buffer 和 1 µg HindIII-λDNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50 µl 反應體積中包含 1 × dA-Tailing Reaction Buffer 和 1 µg T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中包含 1X dA-Tailing Reaction Buffer 和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：在 1X dA-Tailing Reaction Buffer 中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X dA-Tailing Reaction Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

### **Rapid T4 DNA Ligase**

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 本酶和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

RNase 活性殘留：在 10µl 本酶中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

外切酶活性檢測：50 µl 反應體積中加入 10 µl 本酶和 1 µg [3H] DNA (105cpm/µg)，37°C 下反應 4 小時。經同位素測定，放射強度釋放量 < 0.1%。功能性活性檢測(平末端連接)：50 µl 反應體積中加入 5 µl 本酶，1X Rapid Ligation Reaction Buffer，平末端 300 bp DNA 片段 1.5 pmol 和 30 bp 5'磷酸化平末端雙鏈接合子 DNA 片段 15 pmol，20°C 下反應 15 分鐘。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，雙端連接接合子 DNA 的比率 > 95%。

功能性活性檢測(TA 末端連接)：50 µl 反應體積中加入 5 µl 本酶，1X Rapid Ligation Reaction Buffer，兩端均包含 dA 突出的 300 bp DNA 片段 1.5 pmol 和 30 bp 末端包含 dT 突出雙鏈接合子 DNA 片段 15 pmol，20°C 下反應 15 分鐘。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，雙端連接接合子 DNA 的比率 > 95%。



### **Rapid Ligation Reaction Buffer (5X)**

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 1  $\mu$ g HindIII- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 1  $\times$  Rapid Ligation

Reaction Buffer 和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：在 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

### **Super-Fidelity DNA Polymerase**

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中加入 10  $\mu$ l 酵素和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10  $\mu$ l 酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基陰離子吸收高峰。

擴增性能檢測：50  $\mu$ l 反應體積中加入 1  $\mu$ l 本品，10 ng 人基因組 DNA 以及 0.5  $\mu$ M 擴增引子擴增 1 kb 片段。30 個循環後經瓊脂糖凝膠電泳檢測，有特异性 1 kb 擴增產物可見。

### **Super-Fidelity 2X PCR Buffer**

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 25  $\mu$ l 本品和 1  $\mu$ g Hind III- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，無發現條帶降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 25  $\mu$ l 本品和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，無發現條帶降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X 本品和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

### **DNA Library Prep Kit for Illumina®**

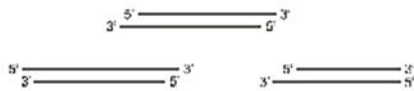
所有批次均進行 DNA 資料庫建構並在 Illumina 定序平台上進行定序驗證。

## **建構流程示意圖**

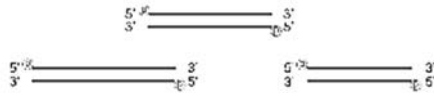




1. Fragmented DNA Input

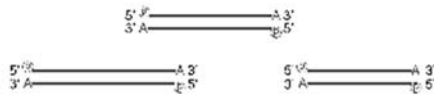


2. End Repaired and 5' Phosphorylation



3. Clean Up

4. dA-Tailing



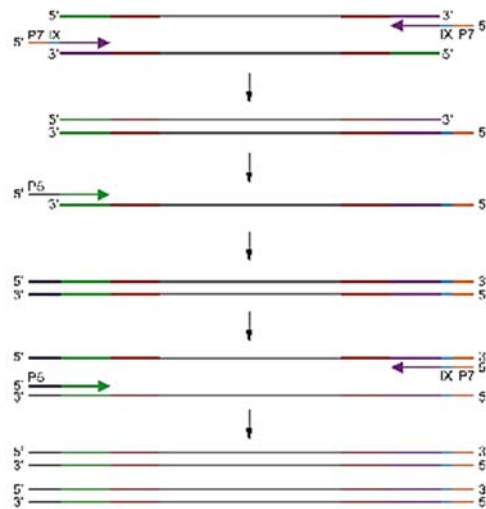
5. Clean Up

6. Ligated to Y adapters

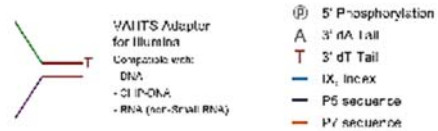


7. Clean Up/Size Selection

8. PCR Amplification



9. Clean Up



1. CHIP DNA 為初始模板 (10 ng) ;
2. 片段化 DNA 進行末端修復、5'磷酸化 ;
3. 修復產物純化 ;
4. 修復產物 3'加 dA 尾 ;
5. 加 dA 尾產物純化 ;
6. 加 dA 尾產物末端連接 Y 型接合子 ;
7. 連接產物純化、長度分離 ;
8. 資料庫擴增 ;
9. 擴增產物純化。