

ND104

Mate Pair Library Prep Kit for Illumina®

產品概述

Mate Pair Library Prep kit for Illumina®是針對 Illumina 高通量的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 DNA 樣品製備成 Illumina 高通量的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

Mate Pair Library Prep Kit-Box1

組成	ND104-01 (48 rxn)	ND104-02 (96 rxn)
Tagmentase	192 µl	384 µl
Tagmentase Buffer (5X)	1 ml	2×1 ml
Strand Displacement Polymerase	48 µl	96 µl
Strand Displacement Buffer (5X)	500 µl	1 ml
dNTP (10 mM each)	48 µl	96 µl
Circulation Ligase	336 µl	672 µl
Circulation Buffer (10X)	1.5 ml	2×1.5 ml
Exonuclease	288 µl	864 µl
Turbo End Prep Enzyme Mix	144 µl	288 µl
Turbo End Prep Reaction Buffer (10X)	312 µl	624 µl
Turbo T4 DNA Ligase	96 µl	192 µl
Turbo Ligation Enhancer	2×1 ml	4×1 ml

Mate Pair Library Prep Kit-Box2

組成	ND104-01 (48 rxn)	ND104-02 (96 rxn)
Adapter for Illumina (15 µM)	120 µl	120 µl
Universal PCR Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 2 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 4 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 5 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 6 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 7 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 12 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 13 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 14 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 15 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 16 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl
Index 18 Primer for Illumina (25 µM)	50 µl	50 µl



Index 19 Primer for Illumina (25 μ M)	50 μ l	50 μ l
---	------------	------------

Mate Pair Library Prep Kit-Box3

組成	ND104-01 (48 rxn)	ND104-02 (96 rxn)
Bead Bind Buffer	20 ml	80 ml
Bead Wash Buffer	80 ml	320 ml
Resuspension Buffer	45 ml	180 ml

Mate Pair Library Prep Kit-Box4

組成	ND104-01 (48 rxn)	ND104-02 (96 rxn)
Super-Fidelity DNA Polymerase	48 μ l	96 μ l
Super-Fidelity PCR Buffer (2X)	1.2 ml	2 \times 1.2 ml

有效日期

Box1、Box2 和 Box4 -20 $^{\circ}$ C 保存, Box3 常溫保存, 所有成分有效期一年。

材料

70%乙醇/酒精

無菌超純水

磁力架

低吸附 EP 管 (Eppendorf #022431021)

AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc. #A63880)

Dynabeads M-280 streptavidin magnetic beads (Invitrogen #112-05D)

Covaris AFATM Ultrasonicator (Covaris S2 or S220 Ultrasonicator device)

Covaris T6 (6 \times 32) glass tubes (Covaris #520031)

Covaris Snap-Cap-Teflon Silicone Septa 8mm (Covaris #520041)

Zymo Genomic DNA Clean & Concentrator Kit (ZYMO RESEARCH #D4010)

Zymoclean™ Large Fragment DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH #D4045)

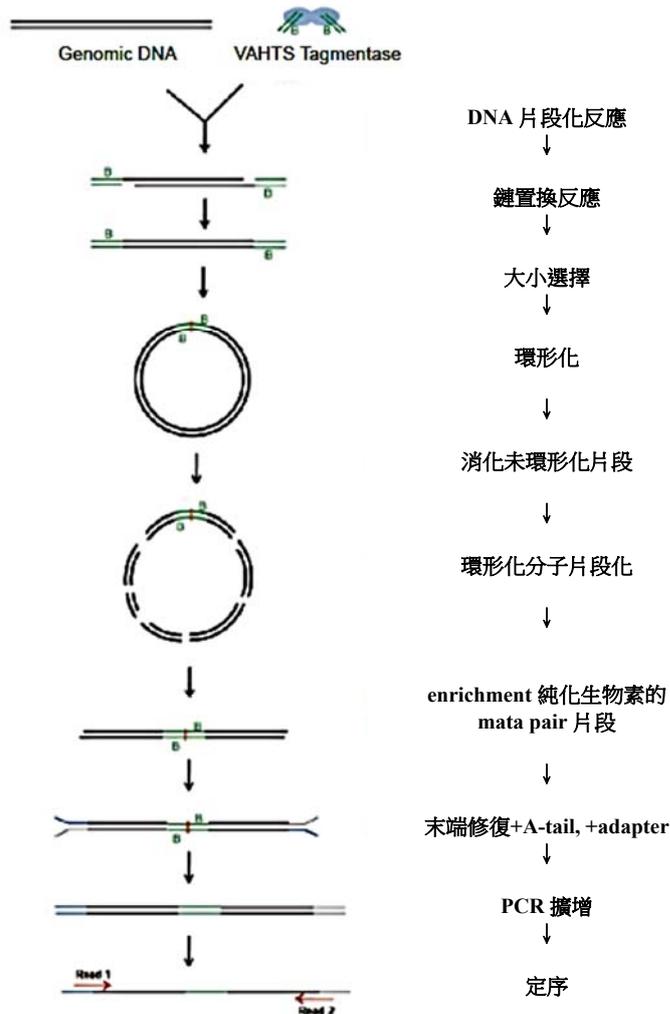
適用範圍

適用於將 1– 4 μ g DNA 樣品製備成 Illumina 高通量的定序平台專用資料庫。

Index 序列

	序列
Index 2 Primer for Illumina (25 μ M)	CGATGT
Index 4 Primer for Illumina (25 μ M)	TGACCA
Index 5 Primer for Illumina (25 μ M)	ACAGTG
Index 6 Primer for Illumina (25 μ M)	GCCAAT
Index 7 Primer for Illumina (25 μ M)	CAGATC
Index 12 Primer for Illumina (25 μ M)	CTTGTA
Index 13 Primer for Illumina (25 μ M)	AGTCAA
Index 14 Primer for Illumina (25 μ M)	AGTTCC
Index 15 Primer for Illumina (25 μ M)	ATGTCA
Index 16 Primer for Illumina (25 μ M)	CCGTCC
Index 18 Primer for Illumina (25 μ M)	GTCCGC
Index 19 Primer for Illumina (25 μ M)	GTGAAA

流程示意圖



使用方案

1. 片段化 DNA 並在兩端加上生物素標記的接合子

此步驟反應可以將基因組 DNA 片段化的同時在兩端連上生物素標記的接合子。生物素標記的接合子將用於後續的反應中 DNA 的純化以及定序後，數據分析時作為大片段 DNA 兩端的標識。

1) 在 EP 管中按順序加入如下組成：

	非膠體回收方式	膠體回收方式
基因組 DNA	x μ l (1 μ g)	x μ l (4 μ g)
ddH ₂ O	76-x μ l	308-x μ l
Tagmentase Buffer	20 μ l	80 μ l
Tagmentase	4 μ l	12 μ l
總體積	100 μ l	400 μ l

2) 使用 pipetmen 溫和混勻以上反應混合液 5 次，短暫離心(1-2 秒)將混合液收集到管底。

3) 55°C 反應 10 分鐘。

4) 使用 Zymo Genomic DNA Clean & Concentrator Kit 純化片段化的 DNA，使用 30 μ l 緩衝液 elute 片段化的



DNA 並應用於下一步的鏈置換反應。

2. 鏈置換反應

前一步的片段化反應在 DNA 鏈上留下了一個缺口。此步驟反應使用一個 DNA 聚合酶補平這個缺口，保證所有 DNA 片段平端化以適合 DNA 環形化反應。

1) 在 EP 管中依順序加入下列組成：

	非膠回收方案	膠回收方案
片段化的 DNA	30 μ l	30 μ l
ddH ₂ O	8 μ l	122 μ l
Strand Disp Buffer	10 μ l	40 μ l
dNTPs	1 μ l	4 μ l
Strand Disp Polymerase	1 μ l	4 μ l
總體積	50 μ l	200 μ l

2) 使用 pipetmen 溫和混勻以上反應混合液 5 次，短暫離心(1-2 秒)將混合液收集到管底。

3) 72°C 反應 30 分鐘。

4) 片段化 DNA 鏈置換反應後應用於 AMPure 磁珠純化鏈置換產物。

3. AMPure 磁珠純化鏈置換產物

此步驟 AMPure 磁珠純化並去除不需要的小片段 DNA(<1500bp)，大片段 DNA 會結合在磁珠上。

1) 在 EP 管中依順序加入下列組成：

	非膠體回收方式	膠體回收方式
Strand Displaced DNA	50 μ l	200 μ l
ddH ₂ O	50 μ l	0 μ l
AMPure XP Beads	40 μ l	100 μ l
總體積	140 μ l	300 μ l

2) 輕彈管壁 5 次混勻磁珠與溶液並短暫離心(1-2 秒)收集。

3) 將 DNA 和磁珠的混合液室溫靜置反應 15 分鐘，每隔 2 分鐘輕彈管壁重新懸浮磁珠。

4) 短暫離心(1-2 秒)將混合液收集到管底。

5) 將 EP 管置於磁力架上 5 分鐘，丟棄液體，注意不要擾動磁珠。

6) 保持 EP 管在磁力架上，加入 400 μ l 70%乙醇，靜置 30 秒。丟棄液體，注意不要擾動磁珠。

- 7) 重複步驟 6. 一次。
- 8) 保持 EP 管在磁力架上，打開蓋子空氣中乾燥 10-15 分鐘。
- 9) 將 EP 管從磁力架上取下，加入 30 μ l Resuspension Buffer 洗脫(elute)磁珠上的 DNA，輕彈管壁混勻。
- 10) 短暫離心(1–2 秒)收集磁珠和 Resuspension Buffer 到管底，室溫孵育 5 分鐘。
- 11) 將 EP 管置於磁力架上 5 分鐘，轉移上清液到新的 EP 管中。
- 12) 已純化的 DNA 可直接進行環型化或者經片段大小選擇後進行下一步還型化。

可選擇：片段大小選擇 (膠體的回收方式)

本方案提供嚴格的片段大小控制，用於製作更大片段和片段大小更集中的資料庫。

- 1) 準備 0.6%瓊脂糖凝膠和 TAE 緩衝液。
- 2) 將 30 μ l AMPure 磁珠純化的鏈置換後 DNA 樣品加 loading buffer 後跑電泳。
- 3) 穩定電壓 100 V 電泳 120 分鐘。
- 4) 小心的切下含有目標 DNA 片段的瓊脂糖凝膠。

注：請在目標位置上下選擇數個 kb 的寬度(例如 4–6 kb, 7–10 kb 或者 9–12 kb)，增加目標區域的寬度可以提高 DNA 的回收量並增加最終資料庫的多樣性。

- 5) 使用 Zymoclean™ Large Fragment DNA Recovery Kit 回收瓊脂糖凝膠中的 DNA 片段，操作過程參考 Zymoclean™ Large Fragment DNA Recovery Kit 說明書。DNA elute 時請使用 30 μ l Resuspension Buffer。
- 6) Elute 下的 DNA 進行下一步環型化。

4. 環型化

此步驟反應將片段化的 DNA 進行分子內平末端連接。在環型化反應進行之前請確定純化回收到的 DNA 的濃度，建議使用 Qubit 定量。使用更多的片段 DNA 進行環型化可以增加最終資料庫的產出和多樣性，但同時也會增加環型化反應中不同分子嵌合連接的機率，綜合考量兩方面因素，建議使用 200–600 ng DNA 片段化 DNA 進行環型化反應。

- 1) 在 EP 管中按順序加入如下組成：

純化的 DNA 片段(200-600 ng)	x μ l
ddH ₂ O	263-x μ l
Circulation Buffer	30 μ l
Circulation Ligase	7 μ l
總體積	300 μ l

- 2) 使用 pipetmen 溫和混勻以上反應混合液 5 次，短暫離心(1–2 秒)將混合液收集到管底。
- 3) 22°C 隔夜反應 overnight (12-16 小時)。
- 4) 65°C 反應 10min 失活 Circulation Ligase。
- 5) 室溫冷卻反應體積後進行下一步消化線性 DNA。



5. 消化線性 DNA

此步驟反應使用外切酶消化環型化體積中未被環型化的線性 DNA，反應後加熱失活外切酶。

- 1) 向隔夜反應的環型化體積中加入 6 μ l 的 Exonuclease，使用 pipetmen 溫和混勻以上反應混合液 5 次，短暫離心(1–2 秒) 將混合液收集到管底。
- 2) 37°C 靜置反應 30 分鐘。
- 3) 70°C 反應 30 分鐘失活 Exonuclease。
- 4) 進行下一步片段化已環型化 DNA。

6. 片段化已環型化 DNA

此步驟反應將大片段已環型化的環狀 DNA 通過物理手段剪切成小片段的 DNA(大約 300-1000bp)。建議使用 Covaris S2 或者 S220 進行片段化。

- 1) 將樣品轉移至 Covaris T6 glass tube。
- 2) 確保樣品體積裝滿整個管子，如果需要可加水補足體積，蓋上蓋子，檢查管子確保管內無氣泡。
- 3) 根據使用的儀器設置參數片段化 DNA。

參數	S2	S220
Peak Power Intensity	N.A	240
Intensity	8	N.A
Duty Cycle/Duty Factor	20%	20%
Cycles Per Burst	200	200
Time	40 s	40 s
Temperature	6°C	6°C

- 4) 片段化之後，將 DNA 樣品轉移至新的 EP 管中，進行下一步 Streptavidin 磁珠收集目的 DNA 片段。

7. Streptavidin 磁珠收集目的 DNA 片段

- 1) 使用前震盪搖勻 Streptavidin M280 Dynabeads。
- 2) 取 20 μ l M280 Dynabeads 到新的 EP 管中。
- 3) 將裝有 M280 Dynabeads 的 EP 管置於磁力架上 1 分鐘，丟棄上清液。
- 4) 加入 50 μ l Bead Bind Buffer 重新懸浮磁珠。
- 5) 將 EP 管置於磁力架上 1 分鐘，丟棄上清液。
- 6) 重複步驟 4 和 5 各一次。
- 7) 將 EP 管從磁力架上取下，加入 300 μ l Bead Bind Buffer 重新懸浮磁珠。
- 8) 將 300 μ l 重新懸浮的磁珠加入到 300 μ l 片段化的 DNA 樣品中，混勻磁珠和樣品。
- 9) 20°C 反應 15 分鐘。每隔 2 分鐘顛倒重新懸浮磁珠。
- 10) 短暫離心(1–2 秒)樣品後 將 EP 管置於磁力架上 1 分鐘。
- 11) 丟棄上清液，加入 200 μ l Bead Wash Buffer。

- 12) 將 EP 管從磁力架上取下，輕彈管壁以重新懸浮磁珠，短暫離心(1-2 秒)並將 EP 管置於磁力架上 30s。
- 13) 重複步驟 11 和 12 三次。
- 14) 丟棄上清液，加入 200 μ l Resuspension Buffer。
- 15) 將 EP 管從磁力架上取下，輕彈管壁重新懸浮磁珠，短暫離心(1-2 秒)並將 EP 管置於磁力架上 30s。
- 16) 重複步驟 14 和 15 一次。
- 17) 進行下一步末端修復、磷酸化並加 dA-tail。在準備好的末端修復、磷酸化並加 dA 層混合液之前，將磁珠留在最後一步的 Resuspension Buffer 中並保持在磁力架上。

8. 末端修復、磷酸化並加 dA-tail

此步驟反應將片段化的 DNA 進行末端修復，磷酸化並加上 dA-tail 以適合之後的接合子連接。

- 1) 在滅菌 PCR 管中配製下列反應物

Turbo End Prep Enzyme Mix	3 μ l
Turbo End Prep Reaction Buffer (10X)	6.5 μ l
ddH ₂ O	55.5 μ l
總體積	65 μ l

- 2) 使用 pipetmen 輕輕拍打混勻，並短暫離心(1-2 秒)將反應液收集至管底。
- 3) 丟棄最後一次洗磁珠的 Resuspension Buffer，將 EP 管短暫離心(1-2 秒) 收集殘留在管壁上的溶液，把 EP 管置於磁力架上，小心的吸去所剩溶液。
- 4) 將 EP 管從磁力架上取下，在磁珠上加 65 μ l 上述酵素反應混合液。
- 5) 輕彈 EP 管壁重新懸浮磁珠，並短暫離心(1-2s)收集樣品到管底。請勿長時間離心以免引起磁珠堆積。
- 6) 20°C 反應 30 分鐘，之後 65°C 反應 30 分鐘。
- 7) 冰上冷卻後進行下一步與接合子的連接。

9. 接合子 adapter 連接

此步驟反應為片段化的 DNA 接上可用於 PCR 擴增接合子。

- 1) 在上述 65 μ l 反應體積中加入下列組成：

Turbo T4 DNA Ligase	2 μ l
Turbo Ligation Enhancer	30.5 μ l
Adapter for Illumina	2.5 μ l
總體積	100 μ l

- 2) 使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心(1-2 秒) 將反應液收集至管底。
- 3) 20°C 反應 15 分鐘。
- 4) 短暫離心(1-2 秒) 將樣品收集到管底，將 EP 管置於磁力架上 1 分鐘。
- 5) 丟棄上清液，加入 200 μ l Bead Wash Buffer。

- 6) 將 EP 管從磁力架上取下，輕彈管壁以重新懸浮磁珠，短暫離心(1-2 秒)並將 EP 管置於磁力架上 30s。
- 7) 重複步驟 5 和 6 三次。
- 8) 丟棄上清液，加入 200 μ l Resuspension Buffer。
- 9) 將 EP 管從磁力架上取下，輕彈管壁以重新懸浮磁珠，短暫離心(1-2 秒)並將 EP 管置於磁力架上 30s。
- 10) 重複步驟 8 和 9 一次。
- 11) 進行下一步 PCR 擴增，在準備好 PCR 擴增混合液之前，將磁珠留在最後一步的 Resuspension Buffer 中並保持在磁力架上。

10. PCR 擴增

此步驟反應用於富集 enrichment 兩端都成功接上接合子的 DNA 片段。

- 1) 在 EP 管在配製下列反應體積：

Super-Fidelity PCR Buffer(2X)	25 μ l
Universal PCR Primer for Illumina	1 μ l
Index Primer for Illumina	1 μ l
Super-Fidelity DNA Polymerase	2 μ l
ddH ₂ O	21 μ l
總體積	50 μ l

- 2) 丟棄最後一次洗磁珠的 Resuspension Buffer，將 EP 管短暫離心(1-2 秒)收集殘留在管壁上的溶液，把 EP 管置於磁力架上，小心的吸去所剩溶液。
- 3) 將 EP 管從磁力架上取下，在磁珠上加 50 μ l 上述 PCR 混合液。
- 4) 輕輕吹打混勻磁珠和 PCR 混合液，然後轉移至 PCR 管中，以下列程序反應

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		

- 5) 進行下一步 PCR 產物純化

11. PCR 產物純化

此步驟用於純 PCR 產物，並從最終資料庫中去除過小的片段(<300bp)。

注: 使用前請將 AMPure XP 磁珠置於室溫至少 30 分鐘並振盪混勻。

- 1) 將 PCR 反應管置於磁力架上 1 分鐘。
- 2) 轉移 45 μ l 上清液到新的 EP 管中。
- 3) 加入 30 μ l AMPure XP 磁珠到 EP 管中，輕彈 EP 管以混勻樣品和磁珠並短暫離心(1-2 秒)收集樣品到管底。
- 4) 室溫靜置 5 分鐘。
- 5) 將 EP 管置於磁力架上 5 分鐘，然後丟棄所有上清液。
- 6) 勿將 EP 管從磁力架上取下，於 EP 管中加入 200 μ l 70%的乙醇清洗磁珠，靜置 30 秒後小心的去除乙醇。



- 7) 重複步驟 6. 一次。
- 8) 將 EP 管蓋子打開，空氣中乾燥 10-15 分鐘。
- 9) 將 EP 管從磁力架上取下，加入 20 μ l Resuspension Buffer 洗脫 Elute DNA。輕彈管壁重新懸浮磁珠，室溫靜置 5 分鐘。
- 10) 將 EP 管重新置於磁力架上 5 分鐘，將包含資料庫的上清液轉移到新的 EP 管中。

資料庫驗證

資料庫可以通過瓊脂糖凝膠電泳或者 Agilent Technologies 2100 Bio analyzer 來驗證富集 enrichment 的片段大小。

瓊脂糖凝膠電泳驗證：

將 1/10 體積的資料庫進行凝膠電泳，資料庫應該分佈於 300-1000 bp 範圍內。

Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 驗證。

對於非膠體回收方式得到的資料庫，上機樣品 1 μ l 樣品到 7500 或者 12000 DNA Labchip，預期資料庫大小在 300-1500 bp，濃度在 5-50 nM。

對於非膠體回收方式得到的資料庫，上機樣品 1 μ l 樣品到 High Sensitivity DNA Labchip，預期資料庫大小在 300-1500 bp，濃度在 1.5-20 nM。

