

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

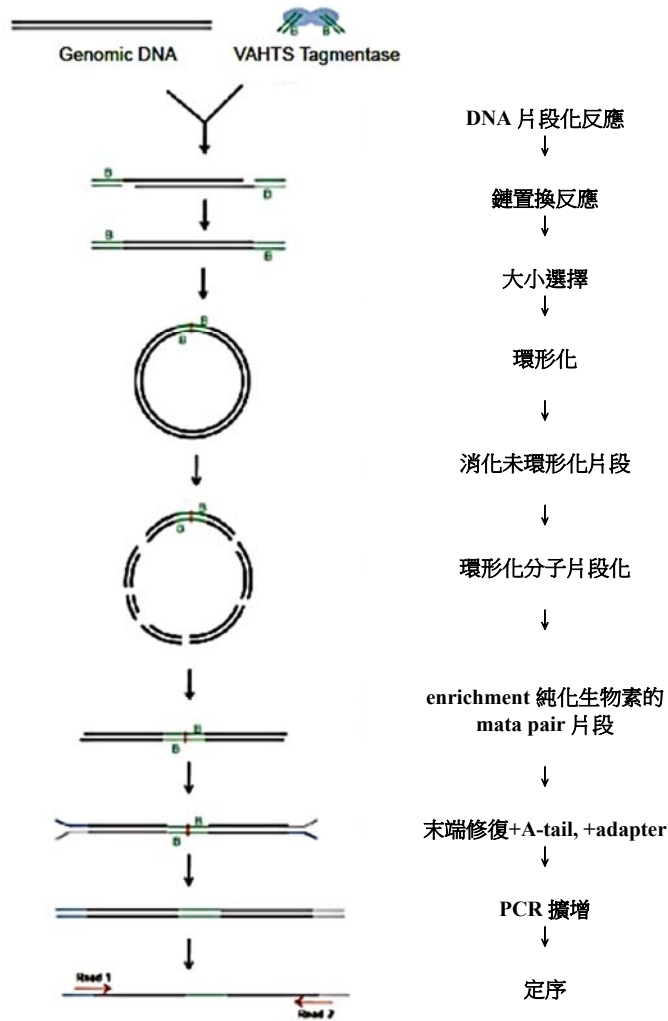
適用於將 1– 4 μ g DNA 樣品製備成 Illumina 高通量的定序平台專用資料庫。

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 µl | 30 µl |
| ddH ₂ O | 8 µl | 122 µl |
| Strand Disp Buffer | 10 µl | 40 µl |
| dNTPs | 1 µl | 4 µl |
| Strand Disp Polymerase | 1 µl | 4 µl |
| 總體積 | 50 µl | 200 µl |

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 µl | 200 µl |
| ddH ₂ O | 50 µl | 0 µl |
| AMPure XP Beads | 40 µl | 100 µl |
| 總體積 | 140 µl | 300 µl |

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 400µl 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 小时)。
- 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。

