

TD501-TD503

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina®

產品概述

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® 是針對 Illumina 高通量定序平台定向研發的專用試劑組。使用該試劑組可以將 DNA 製備成 Illumina 高通量定序平台專用定序資料庫。和傳統資料庫建構方法相比，TruePrep™ 試劑組採用新型的轉位酵素(transposase)法進行 DNA 片段化，將繁瑣的 DNA 片段化、末端修復和接合子(adapter)連接反應等步驟變為一步簡單的催化反應(Enzyme catalysis)，顯著降低了起始 DNA 的需求量並縮短了建構資料庫時間。試劑組共提供 50 ng、5 ng、1 ng 三種規格，可根據實驗類型自由選擇。試劑組中提供的所有試劑都經過嚴格的質量控制和功能驗證，保證了資料庫建構的穩定性和重複性。

產品組成

編號	TD501-01/02	TD502-01/02	TD503-01/02
規格	24/96 rxn	24/96 rxn	24/96 rxn
起始DNA量	50 ng	5 ng	1 ng
TTE Mix V50	120/480 µl	-----	-----
TTE Mix V5	-----	120/480 µl	-----
TTE Mix V1	-----	-----	120/480 µl
5X TTBL	240/960 µl	96/384 µl	96/384 µl
5X TS	-----	120/480 µl	120/480 µl
PPM	120/480 µl	-----	-----
TAE	24/96 µl	24/96 µl	24/96 µl
5X TAB	240/960 µl	240/960 µl	240/960 µl
Control DNA	10/10 µl	10/10 µl	10/10 µl

*TTE = TruePrep Tagment Enzyme; TTBL = TruePrep Tagment Buffer L; TS= Terminate Solution;
PPM = PCR Primer Mix; TAE = TruePrep Amplify Enzyme; TAB = TruePrep Amplify Buffer.

*Control DNA, Mouse Genomic DNA, 50 ng/µl.

有效日期

TD501，所有組成分-20°C儲存。有效期一年。

TD502，5 × TS室溫儲存；其餘組成-20°C儲存。有效期一年。

TD503，5 × TS 室溫儲存；其餘組成-20°C 儲存。有效期一年。

必需材料

無水酒精/乙醇

無菌超純水

低吸附Eppendorf、PCR tube

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

磁力架

PCR machine

TruePrep™ Index Kit V2 for Illumina® (Vazyme #TD202)

TruePrep™ Dual Index Sequencing Primer Box for Illumina® (Vazyme #TD301或#TD302)

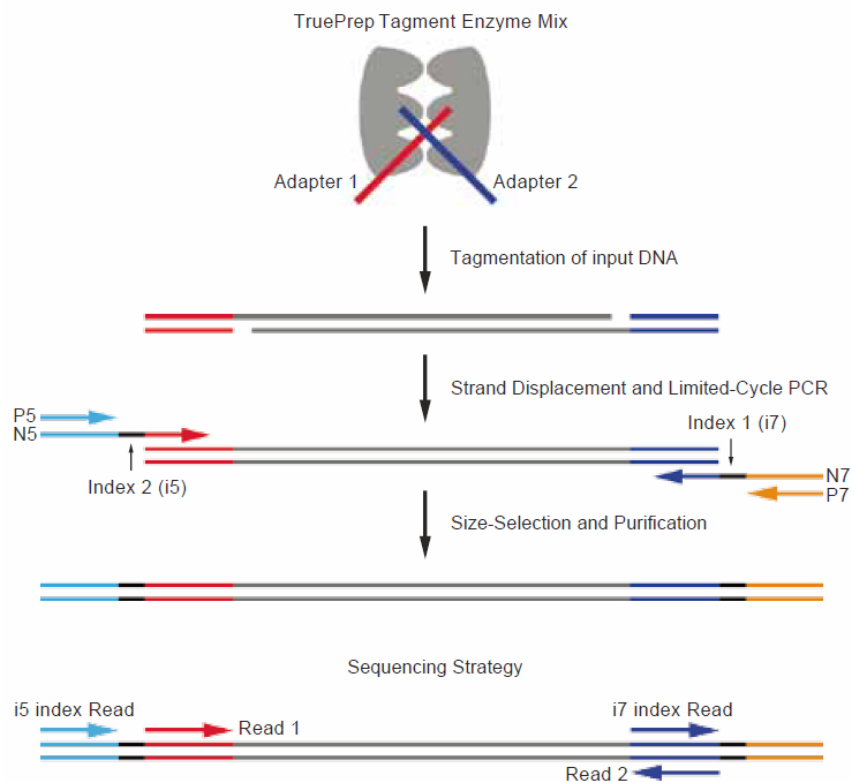
或 TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (Illumina #FC-121-1003 或#PE-121-1003)

適用範圍

適用於將DNA製備成Illumina高通量定序平台專用資料庫。

注意: 若DNA樣品為PCR產物，應保證其長度 > 500bp。因轉位酵素(transposase)無法作用於DNA末端，因此PCR產物最末端50bp定序覆蓋度可能會降低。因此建議在製備PCR產物時，將待測區域兩末端各延長50-100bp，以避免末端定序覆蓋度降低的情況。

原理



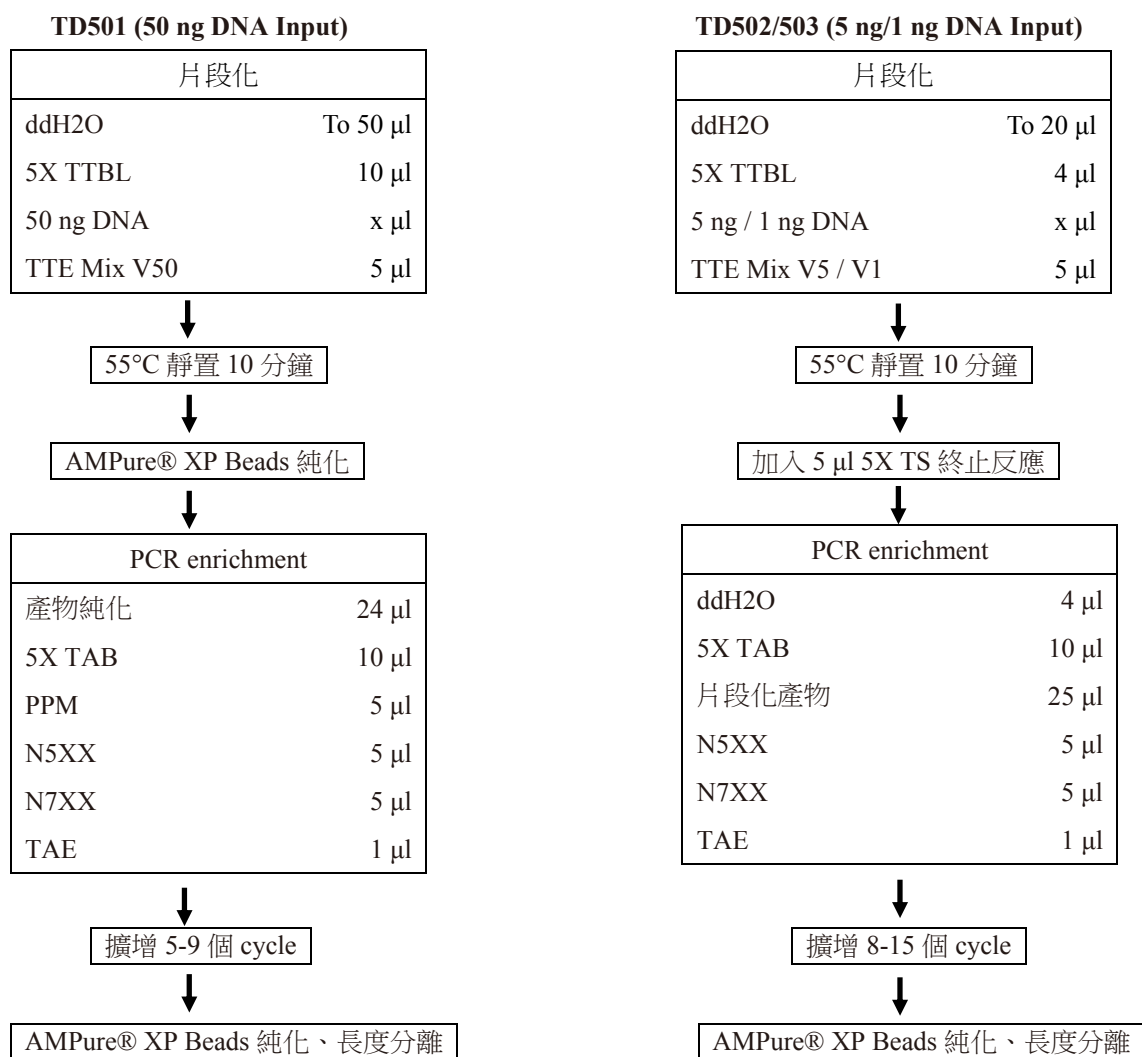
Adapter 1 and Adapter 2, two oligos embedded in TruePrep Tagment Enzyme
P5 and P7, two universal PCR Primers
N5 and N7, two index primers containing index 2 (i5) and index 1 (i7) respectively

TruePrep™ 資料庫建構基本原理

TruePrep Tagment Enzyme Mix (TTE Mix)中包含轉位酵素和兩種等莫耳的接合子Adapter 1和Adapter 2。將該預混合液與DNA混合並於55°C靜置10分鐘，即可使DNA片段化並於末端連接接合子。此種片段化產物經N5 (N5XX)和N7 (N7XX)以及P5和P7 (PCR Primer Mix, PPM)兩對引子擴增、擴增產物大小分離與純化後即為可定序資料庫。



流程



方法

材料：純化後的DNA，溶於無菌蒸餾水中。

DNA濃度：由於TTE Mix對DNA濃度非常敏感，因此準確的DNA濃度測定對實驗成功與否相當重要。推薦使用Qubit®或螢光染料PicoGreen®進行DNA濃度測定，請勿使用以吸光值方式為基礎的任何測定方法。

DNA純度：吸光值OD260/OD280 nm=1.8~2.0

I. DNA片段化 (根據試劑組的編號選擇進行)

I-A: 50 ng起始DNA片段化 (適合於使用TD501試劑組)

- 於室溫下解凍5X TTBL，上下顛倒混合均勻後備用。
- 在無菌 PCR tube 中加入各反應物：

ddH ₂ O	To 50 μ l
5X TTBL	10 μ l
50 ng DNA	x μ l
TTE Mix V50	5 μ l

- 使用pipetman輕輕吹打20次充分混合均勻 (重要!)。
- 將 PCR tube 置於 PCR machine 中，設定反應如下：

上蓋加熱	On, 105°C
55°C	10 Min
10°C	Hold

- 片段化產物使用AMPure® XP beads進行純化：

- 以渦旋Vortex振盪混合均勻AMPure XP beads並取50 μ l加至50 μ l片段化產物中，使用pipetman輕輕拍打10次充分混勻。室溫下靜置5分鐘。
 - 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠與液體。待溶液澄清(約5分鐘)小心移除上清。
 - 保持ependrof處於磁力架中，加入200 μ l新鮮配製的80%酒精清洗磁珠。於室溫靜置30秒後小心移除上清液。
 - 重複步驟3，總計清洗兩次。
 - 保持ependrof始終置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥10分鐘。
 - 將ependrof從磁力架中取出，加入26 μ l無菌超純水。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與液體。待溶液澄清(約5分鐘)小心吸取24 μ l上清液至無菌PCR管中。
此外，片段化產物也可使用其他磁珠或管柱純化試劑組進行純化。
- 立即進行**步驟 II. PCR enrichment**。

I-B: 5 ng 起始 DNA 片段化 (適合於使用 TD502 試劑組)

- 於室溫下解凍5X TTBL，上下顛倒混合均勻後備用。確認5X TS處於室溫，輕拍管壁確認是否有沉澱產生。若有沉澱，可於37°C加熱並劇烈震盪充分混合均勻使沉澱溶解。
- 在無菌 PCR tube 中加入各反應物：

ddH ₂ O	To 20 μ l
5X TTBL	4 μ l
5 ng DNA	x μ l
TTE Mix V50	5 μ l

- 使用pipetman輕輕拍打20次充分混合均勻 (重要!)。
- 將 PCR tube 置於 PCR machine 中，設定反應如下：

上蓋加熱	On, 105°C
55°C	10 Min
10°C	Hold



- e. 立即於反應物中加入 5 μ l 5X TS，使用 Vortex 振盪移輕輕拍打充分混勻。置於室溫下放置 5 min。
- f. 立即進行**步驟 II. PCR enrichment**。

I-C: 1 ng 起始 DNA 片段化 (適合於使用 TD503 試劑組)

- a. 於室溫下解凍5X TTBL，上下顛倒混合均勻後備用。確認5X TS處於室溫，輕拍管壁確認是否有沉澱產生。若有沉澱，可於37°C加熱並劇烈震盪充分混合均勻使沉澱溶解。
- b. 在無菌 PCR tube 中加入各反應物：

ddH2O	To 20 μ l
5X TTBL	4 μ l
1 ng DNA	x μ l
TTE Mix V50	5 μ l

- c. 使用pipetman輕輕拍打20次充分混合均勻 (重要!)。
- d. 將 PCR tube 置於 PCR machine 中，設定反應如下:

上蓋加熱	On, 105°C
55°C	10 Min
10°C	Hold

- e. 立即於反應物中加入 5 μ l 5X TS，使用 Vortex 振盪移輕輕拍打充分混勻。置於室溫下放置 5 min。
- f. 立即進行**步驟 II. PCR enrichment**。

II. PCR enrichment

- a. 將無菌 PCR tube 置於冰水浴中，依次加入各反應物:

試劑組編號	TD501	TD502/TD503
ddH2O	-----	4 μ l
步驟 1 產物	24 μ l	25 μ l
5X TAB	10 μ l	10 μ l
PPM	5 μ l	-----
N5XX*	5 μ l	5 μ l
N7XX*	5 μ l	5 μ l
TAE	1 μ l	1 μ l

*TruePrep™ Index Kit V2 for Illumina® (Vazyme #TD202) 中提供8種N5XX和12種N7XX，可根據樣品數量和Index自行選擇策略進行。



b. 使用 Vortex 振盪移輕輕拍打充分混勻，將 PCR tube 置於 PCR machine 中進行下列反應：

上蓋	On, 105°C	
72°C*	3 min	
98°C	30 sec	5-15 cycles*
98°C	15 sec	
60°C	30 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

*72°C的靜置步驟用於進行鏈置換反應，請勿刪除該步驟。

*擴增循環次數需根據實際情況自行選擇，選擇原則如下：

起始DNA量為 50 ng 時(TD501)，推薦進行5-9個擴增循環；

起始DNA量為 5 ng 時(TD502)，推薦進行8-12個擴增循環；

起始DNA量為 1 ng 時(TD503)，推薦進行11-15個擴增循環。

注：擴增循環次數越少，擴增Duplication會越低，但資料庫產出也會變低；不同循環次數的擴增產物，經過磁珠分離後獲得的資料庫總量可參閱附錄。

c. PCR 反應結束後進行步驟 III. 擴增產物長度分離與純化。

III. 擴增產物長度分離與純化

推薦使用AMPure® XP beads進行長度分離和純化。起始PCR產物體積應為50 µl。因PCR過程中樣品揮發會導致產物體積不足50 µl，進行下面操作之前必需使用無菌蒸餾水將體積補齊至50 µl，否則分離長度會與預期不一致。分離過程中，兩次磁珠使用量(R1和R2)參見下表：

資料庫平均總長度	~ 350 bp	~ 450 bp	~ 550 bp
資料庫平均插入長度	~ 230 bp	~ 330 bp	~ 430 bp
資料庫總長度分布範圍	250 bp - 450 bp	300 bp - 700 bp	400 bp - 900 bp
第一次磁珠使用量	R1 = 35.0 µl (0.70X)	R1 = 30.0 µl (0.60X)	R1 = 25.0 µl (0.50X)
第二次磁珠使用量	R2 = 7.5 µl (0.15X)	R2 = 7.5 µl (0.15X)	R2 = 7.5 µl (0.15X)

“X”數值均根據PCR產物體積計算而得，如“0.60 ×”表示 $0.60 \times 50 \mu\text{l} = 30.0 \mu\text{l}$ 。

1. Vortex振盪混合均勻AMPure XP beads並吸取R1體積至50 µl PCR產物中，使用pipetman輕輕拍打10次充分混合均勻。室溫靜置5分鐘。
2. 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(約5分鐘)小心轉移上清液至乾淨eppendorf中，丟棄磁珠。
3. Vortex振盪混合均勻AMPure XP beads並吸取R2體積至上清液中，使用pipetman輕輕拍打10次充分混勻。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(約5分鐘)小心移除上清液。
5. 保持eppendorf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秒後小心移除上清液。重複此步驟5，總計清洗兩次。
6. 保持eppendorf置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠10分鐘。
7. 將eppendorf從磁力架中取出，加入22 µl無菌超純水。Vortex振盪或使用pipetman輕輕拍打充分混合均勻。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(約5分鐘)小心吸取20 µl上清液至無菌eppendorf中，於-20°C保存。



此外，如需獲得長度分布更集中的資料庫，擴增產物可使用切膠回收試劑組進片段長度分離和純化。如對資料庫長度分布範圍無特殊要求，擴增產物也可以不進行長度分離直接使用磁珠或管柱純化試劑組進行純化。

VI. 資料庫質量檢測

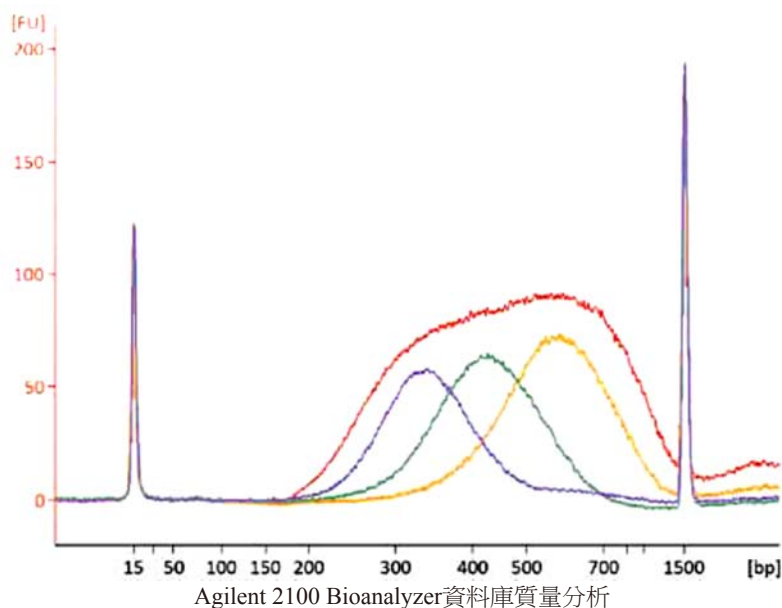
資料庫濃度測定

為了得到高質量的定序結果，必須對資料庫濃度進行精確測定。推薦使用Realtime PCR的方式對資料庫濃度進行絕對定量。此外，資料庫濃度可以使用特異性識別雙股DNA的螢光染料法進行測定(如Qubit®或螢光染料PicoGreen®)，最終使用下列推薦的近似公式換算資料庫的莫爾濃度。請勿使用吸光值測量的任何測定方法。

資料庫平均總長度	近似轉換公式
350 bp	1 ng/μl = 4.3 nM
450 bp	1 ng/μl = 3.3 nM
550 bp	1 ng/μl = 2.7 nM

資料庫長度分布檢測

將製備好的資料庫在 Agilent 2100 Bioanalyzer 上進長度分布檢測。



使用TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® (TD501, PCR擴增9個循環)製備的人類基因組資料庫。
 紅線: PCR產物不進行片段長度分離，直接使用1X磁珠純化後得到的資料庫; 紫線: 通過磁珠分選得到的~ 350 bp 資料庫; 綠線: 通過磁珠分離得到的~ 450 bp 資料庫; 黃線: 通過磁珠分離得到的~ 550 bp 資料庫。

資料庫結構

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® 資料庫結構:

Index 2 (i5)

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACIIIIIIITCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG
ACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCACGAGACIIIIIIATCTCGTATGCCGTC
TTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

IIIIIII: Index 2 (i5), 8 bases

IIIIIII: Index 1 (i7), 8 bases

-NNNNNN-: 插入序列

定序相關

資料庫稀釋和Pool

在MiSeq平台上進行定序參見Illumina使用指南“Preparing DNA for MiSeq”

在HiSeq平台上進行定序參見Illumina HiSeq系統用戶指南

填寫樣品訊息表

在MiSeq平台上進行定序參見Illumina使用指南: “MiSeq Sample Sheet Quick Reference guide”

在HiSeq平台上進行定序參見Illumina使用指南: “HiSeq 2500 System User Guide”

定序引子

TruePrep 資料庫在 Illumina 定序平台上進行定序時必須使用 TruePrep 專用定序引子試劑組。

Vazyme 相關產品訂購

單端定序(Single Read)

TruePrep™ Dual Index Sequencing Primer Box for Illumina®, Vazyme #TD301

IX2: Index 2 (i5) Sequencing Primer

R1: Read 1 Sequencing Primer

IX1: Index 1 (i7) Sequencing Primer

雙端定序(Paired End)

TruePrep™ Dual Index Sequencing Primer Box for Illumina®, Vazyme #TD302

R1: Read 1 Sequencing Primer

R2: Read 2 Sequencing Primer

IX1: Index 1 (i7) Sequencing Primer

定序時，使用R1進行Read 1定序；使用R2進行Read 2定序；使用IX1進行Index 1 (i7)定序；如進行單端定序，使用IX2進行Index 2 (i5)定序；如進行雙端定序，則使用TruSeq PE Cluster Kit中的RMX進行Index 2 (i5)定序。

Illumina 相關產品訂購



Zgenebio Co TEL:886-2-25361850 E-Mail:zgenebio.inc@gmail.com www.zgenebio.com.tw

單端定序(Single Read)

TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, Single Read, Illumina #FC-121-1003

HP9, Index 2 (i5) SR Sequencing Primer Mix

HP10, Read 1 Sequencing Primer Mix

HP12, Index 1 (i7) Sequencing Primer Mix

雙端定序(Paired End)

TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, Paired End, Illumina #PE-121-1003

HP10, Read 1 Sequencing Primer Mix

HP11, Read 2 Sequencing Primer Mix

HP12, Index 1 (i7) Sequencing Primer Mix

定序時，使用HP10進行Read 1定序；使用HP11進行Read 2定序；使用HP12進行Index 1 (i7)定序；如進行單端定序，使用HP9進行Index 2 (i5)定序；如進行雙端定序，使用TruSeq PE Cluster Kit中的RMX進行 Index 2 (i5)定序。

注意事項

A. 磁珠操作注意事項：

應將磁珠靜置至室溫後再使用

每次吸取磁珠前都應將其充分混合均勻

DNA 樣品加入磁珠後應將其充分混合均勻

所有磁珠操作都應於室溫進行

吸取上清液操作應在磁珠被徹底吸附後後小心進行

80%酒精應使用前配製，使用完後丟棄

80%酒精清洗磁珠後應盡量吸乾

磁珠在 elute 回收片段之前應充分乾燥，避免酒精殘留影響後續實驗進行

B. 避免樣品交叉汙染

吸取不同樣品時更換 tip

使用有濾心 filter 的 tip

C. 資料庫製備試劑分裝保存

為避免反覆解凍回溶或長期使用後活性下降，建議在首次使用後將剩餘試劑小份分裝冷凍保存。

D. 防止 PCR 產物汙染

因 PCR 產物操作不當極容易產生汙染，進而導致實驗結果不準確、可信度不高等問題。因此，建議將 PCR 反應體系配製區和 PCR 產物純化區進行強制性的物理隔離、使用專用的 pipetman 等設備、並定時對各實驗區域進行清潔(使用 0.5%次氯酸鈉或 10%漂白劑進行擦拭清理)以保證實驗結果的可信度。

附錄

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® 資料庫產出參照表:



Zgenebio Co TEL:886-2-25361850 E-Mail:zgenebio.inc@gmail.com www.zgenebio.com.tw

TD501 (50 ng DNA Input)擴增循環次數:	5	6	7	8	9
TD502 (5 ng DNA Input) 擴增循環次數:	8	9	10	11	12
TD503 (1 ng DNA Input) 擴增循環次數:	11	12	13	14	15
資料庫產出(不進行片段長度分離, ng) :	250	400	600	1000	1500
資料庫產出(進行片段長度分離, ng) :	100	150	250	500	800

注: 表中所述數值為資料庫總質量。資料庫質量濃度可由該數值除以資料庫總體積計算而得。資料庫莫耳濃度可根據資料庫平均長度由資料庫質量濃度計算而得。