天净沙系列

CAT#:240735

低温运输，-20℃保存

天净沙

单链 DNA 文库构建试剂盒（Illumina 平台）

ssDNA Library Preparation Kit for Illumina Platform

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

单链 DNA 文库构建试剂盒（Illumina 平台）是针对 Illumina 高通量测序平台开发的单链 DNA 文库构建试剂盒。本产品基于高效单链连接技术，将单链 DNA 转化为可测序文库,还适用于双链 DNA 建库,以及单双链混合 DNA 建库。试剂盒中所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性,它具有下列特点:

1. 兼容短至 40 bp 的 DNA 样本。
2. 兼容 10 pg-250 ng 起始 DNA。
3. 适用于严重损伤、变性或降解的 DNA 样本。
4. 可在 2 h 内完成，且手动操作时间小于 30 min
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成 份	编 号	规 格	包装材料
稀释缓冲液	240735a	2.1 mL	5 mL 本色瓶
3'连接缓冲液	240735b	100 μL	0.5 mL 绿盖管
3'连接酶混合液	240735c	50 μL	0.5 mL 红盖管
3'接头	240735d	50 μL	0.5 mL 黄盖管
延伸引物	240735e	50 μL	0.5 mL 本色管
延伸酶混合液	240735f	350 μL	0.5 mL 红盖管
5'连接混合液	240735g	100 μL	0.5 mL 本色管
5'接头	240735h	100 μL	0.5 mL 黄盖管
高保真扩增混合液	240735i	250 μL	0.5 mL 红盖管
使用手册	240735sc	1 份	无

运输及保存

稀释缓冲液常温运输，4℃保存，其他组分低温运输，-20℃保存、有效期一年。

自备物品

DNA 定量试剂盒、DNA 纯化磁珠、Index primer

相关资料

一、热变性

1. 预热 PCR 仪：热盖设为 105℃，反应温度设置为 95℃。在无核酸酶 PCR 管中配制接头连接的预混液，用移液器轻轻吹打混匀后置于冰上待用。
2. 在新的无核酸酶 PCR 管中配制如下混合液：

组分	体积

起始 DNA(10 pg-250 ng)	X μL
稀释缓冲液	到 20 μL

3. 95℃加热 2 min，迅速置于冰上静置 2 min（避免已变性为单链的 DNA 慢慢复性）。

二、链接接头

4. 室温解冻 3'连接缓冲液、3'连接酶混合液和 3'接头，上下颠倒混匀后备用。

5. 在无核酸酶 PCR 管中配制如下 3'接头连接预混液（此预混液需在 DNA 变性前完成配制，使变性后的 DNA 可立即进行 3'接头连接。）：

成份	用量
3'连接缓冲液	10 μL
3'连接酶混合液	5 μL
3'接头	5 μL
总计	20 μL

6. 将 20 μL 的 3'接头连接预混液与已变性的 DNA 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

7. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖 105℃	开启
37℃	15 min
95℃	2 min
4℃	保持

三、延伸

8. 室温解冻延伸引物和延伸酶混合液，上下颠倒混匀后备用。

9. 在无核酸酶 PCR 管中配制如下混合液：

成份	用量
上步所得	40 μL
延伸引物	5 μL
延伸酶混合液	35 μL
总计	80 μL

10. 使用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

11. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖 105℃	开启
98℃	30 sec
63℃	15 sec
68℃	5 min
4℃	保持

12. 反应完成后，使用 1.2× DNA 纯化磁珠对反应产物进行纯化，具体步骤以使用的磁珠法纯化试剂盒为准，可将最后洗脱体积控制在 22.5 μL。

四、接头连接：

13. 室温解冻 5'连接混合液和 5'接头，上下颠倒混匀后备用。

14. 在无核酸酶 PCR 管中配制如下混合液（不可将 5'连接混合液和 5'接头预先配成混合液，以免出现接头自连。）：

成份	用量
上步纯化产物	20 μL
5'连接混合液	10 μL
5'接头	10 μL
总计	40 μL

15. 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

16. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
热盖 105℃	开启
25℃	15 min
4℃	保持

17. 反应完成后，使用 1× DNA 纯化磁珠对反应产物进行纯化，具体步骤以使用的磁珠法纯化试剂盒为准，可将最后洗脱体积控制在 22.5 μL。

五、文库扩增

18. 室温解冻高保真扩增混合液，上下颠倒混匀后备用。

19. 在无核酸酶 PCR 管中配制如下混合液（*Index primer 是含 Index 的扩增引物，需自备）：

成份	用量
上步纯化产物	20 μL
Index primer*	5 μL
高保真扩增混合液	25 μL
总计	50 μL

20. 用移液器吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

21. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

过程	温度	时间
热盖	105℃	开启
预变性	98℃	45 sec
PCR 反应 (2-21 个循环)	98℃	15 sec
	60℃	30 sec
	72℃	30 sec
延伸	72℃	1 min
保温	4℃	保持

22. 扩增循环数可参考下表。下表列举了当使用 10 pg-250 ng 高质量 DNA 时，为获得 100 ng 或 1 μg 文库时推荐的扩增循环数。

3' 接头连接体系中的起始 DNA	需要进行的扩增循环数	
	100 ng	1 μg
10 pg	16-18	19-21
100 pg	13-15	16-18
1 ng	10-12	13-15
10 ng	7-9	10-12
50 ng	5-7	8-10
100 ng	3-5	6-8
250 ng	2-4	5-7

23. 反应完成后，使用 0.85×DNA 纯化磁珠对反应产物进行纯化，具体步骤以使用的磁珠法纯化试剂盒为准，可将最后洗脱体积控制在 22.5 μL。

关联产品 PicoGreen 超敏 dsDNA 定量试剂盒