

版本号: NG230710

TIANSeq Library Amplification Kit

TIANSeq文库富集试剂盒

目录号: NG231

产品内容

产品组成	NG231-01 (24 rxn)	NG231-02 (96 rxn)
2×Library Amplification Mix	0.6 ml	4×0.6 ml
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2×1 ml

储存条件

收到试剂盒后, 请于-30~-15°C下保存。保质期: 18个月。

从-30~-15°C取出使用时, 将冻存的2×Library Amplification Mix融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用, 须彻底混匀后再重新冷冻。(因为在解冻过程中盐会出现分层现象, 若未混匀就进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损伤)。使用过程中要避免反复多次冻融。

产品简介

TIANSeq Library Amplification Kit是针对二代测序（NGS）文库富集反应开发的高效、高保真PCR反应试剂。试剂盒中的2×Library Amplification Mix为即用型PCR反应液，使用时只需加入模板和引物即可进行文库富集反应，操作简便。

PCR反应液中的DNA聚合酶为热启动型高保真酶，同时封闭了酶的5' -3' 的聚合酶活性和3' -5' 的外切酶活性，保证了PCR反应液的稳定、高效、特异的扩增。PCR反应液中的Buffer系统是专门针对NGS文库富集反应而优化，使得PCR反应液对不同投入量的模板和不同GC含量的模板均保持着稳定的扩增效率和极低的扩增偏好性。

适用范围：

本产品用于NGS文库构建过程，比如：NGS文库制备，扩增子测序，Indexing PCR，低频突变检测，杂交捕获流程，单细胞分析，全基因组测序，RNA测序，ChIP-Seq，ATAC-Seq等。

产品特点：

1. 特异性高。高保真酶的两个活性中心均具有热启动效果，扩增特异性高，稳定性好。
2. 偏好性低。针对不同GC含量的模板都有均衡的扩增效果。
3. 保真性好。可将PCR过程中碱基错配率控制在极低水平，使得数据更可靠。
4. 适应性广。在0.1 pg~1 μg的DNA模板投入量范围内均能得到稳定的结果。

注意事项（请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项）。

1. 模板适用性。本产品适用的DNA模板投入范围是0.1 pg~1 μg，扩增长度可达1 kb。
 2. 乙醇的控制。本产品对乙醇的耐受度较低，因此在DNA纯化过程中要尽可能的去除样品中残留的乙醇。
 3. 扩增引物。建议用TE溶液溶解和稀释引物，并尽量减少引物的冻融次数。引物终浓度为500 nM时可以在大多数体系中获得良好的扩增结果，扩增效率不高时，可在500 nM~2 μM范围内调整。
 4. 延伸时间。产物小于500 bp，30 Sec的延伸时间是足够的；产物在500 ~1000 bp，可将延伸时间设置为45 Sec。
 5. 扩增循环数。扩增偏好性与扩增循环数呈反相关，因此要尽可能的使用最少的循环数得到目标产量的PCR产物。关于扩增循环数的建议如附表1所示。
-

操作步骤

1. 融解2×Library Amplification Mix、模板、引物和RNase-Free ddH₂O，并将所有试剂在室温下溶解并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行文库富集 PCR反应液的配制，以illumina平台文库富集体系为例，具体如下表所示：

组成成分	50 μ l 体系加入量	反应浓度
模板DNA	Variable	0.1 pg~1 μ g
2×Library Amplification Mix	25 μ l	1×
P5 (20 μ M)	5 μ l	2 μ M*
P7 (20 μ M)	5 μ l	2 μ M*
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μ l	-

* 对于illumina®平台的P5/P7引物，建议将反应浓度添加到2 μ M；对于其他扩增引物，建议在0.5~2 μ M范围内调整引物的最适反应浓度。

3. 反应程序

按下表设置PCR仪反应程序，开启热盖，温度设置于105°C。

步骤	温度	时间	循环数
1	98°C	45 sec	1
2	98°C	15 sec	参考附表1
3	60°C	30 sec ¹	
4	72°C	30 sec ²	
5	72°C	1 min	1
6	4°C	Hold	1

¹对于illumina®平台的P5/P7引物，最适的退火温度为60°C；对于其他扩增引物，建议在55~70°C范围内筛选引物的最适退火温度。

²产物小于500 bp，30 Sec的延伸时间是足够的；产物在500 ~1000 bp，可将延伸时间设置为45 Sec。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

4. 产物纯化

PCR样品温度降至4°C后，可将PCR产物取出并进行纯化回收。

本产品的PCR产物对纯化磁珠的普适性良好，纯化磁珠的加入比例和纯化比例参考磁珠供应商的说明书即可。纯化前，应保证磁珠平衡至室温（15~30°C）并混合均匀。

附表1 模板投入量与扩增循环数参考表

文库类型	初始模板使用量	参考循环数 (Cycles)
DNA文库	1 µg	2-5
	500 ng	3-6
	100 ng	6-9
	10 ng	10-13
	1 ng	14-17
	100 pg	17-20
	10 pg	20-23
	1 pg	23-26
	0.1 pg	26-29
RNA文库	1 µg	11-13
	100 ng	14-16
	10 ng	17-19
	1 ng	20-22
	100 pg	23-25
	10 pg	26-28

* 上表中的循环数适用于平均大小为300~600 bp的文库样品，如果平均片段大小不在此范围内，则需对建议的循环数做相应调整；此外，如果在PCR富集之前经过片段大小筛选步骤 (size-selection)，则建议在原有基础上再增加2-4个循环；如果DNA质量较差 (比如提取于FFPE样品)，则建议在原有基础上再增加1-3个循环。