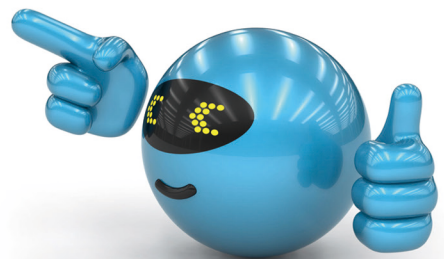


二代测序(NGS) 文库构建技术专刊



- 快速文库构建方案
- 各种科研文库构建指南
- 常用临床文库构建指南
- 样本纯化方案



目录

为什么选择TIANGEN?	01
DNA文库制备流程	
■ 含片段化功能的快速DNA文库制备流程(Illumina 平台)	02
■ 不含片段化功能的快速DNA文库制备流程(Illumina 平台)	04
■ 含片段化功能的快速DNA文库制备流程(Ion Torrent 平台)	05
■ 经典DNA文库制备流程(Illumina 平台)	06
■ 经典DNA文库制备流程(Ion Torrent平台)	07
■ RNA文库制备推荐流程(Illumina平台)	08
■ Small RNA文库制备推荐流程(Illumina平台)	09
RNA文库构建方案	10
■ mRNA文库构建流程	10
■ Small RNA文库构建流程	10
临床诊断NGS文库构建	11
■ 唐筛及肿瘤筛查文库构建方案	11
■ 胚胎染色体异常筛查文库构建方案	11
科研服务NGS文库构建	12
■ 科研服务文库构建方案-基因组DNA	12
■ 科研服务文库构建方案-片段化DNA	12
常见问题解决	13
样本纯化方案	18
产品选择指南	20
■ 一站式整体解决方案(DNA 文库)	20
■ 建库模块(建库模块可直接整合)	20
■ 原材料(可根据需求调整组合成建库模块)	21

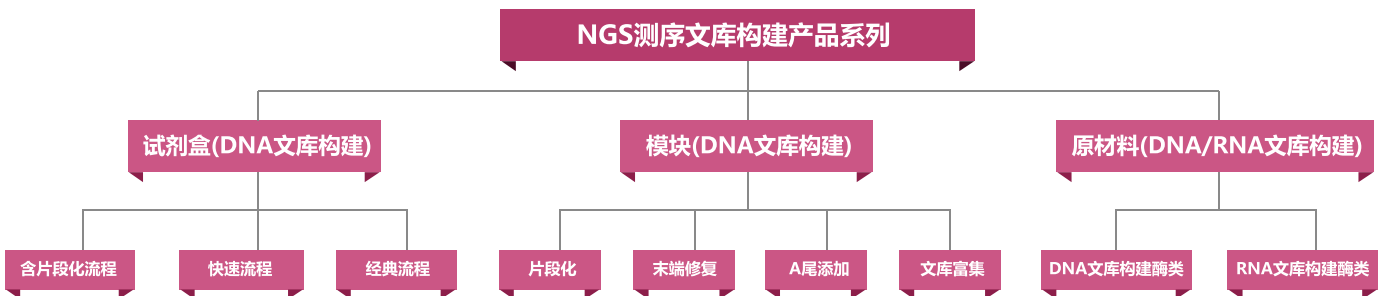
TIANGEN 强势进军二代测序领域!

为什么选择 TIANGEN ?

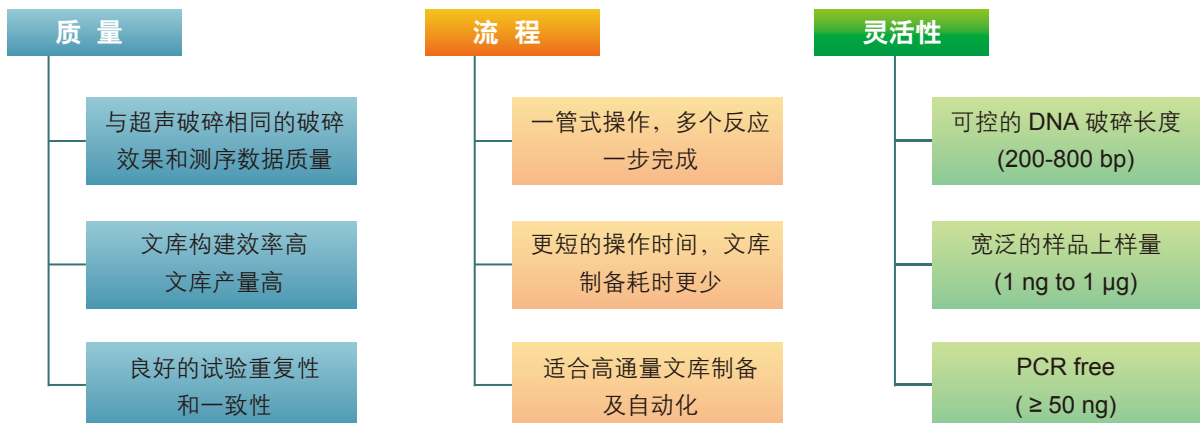
- **灵活**: 样本起始范围宽 (ng 级 - μ g 级), 可选择购买特定功能模块或原材料, 适合科研和不同规模工业用户的选择!
- **高效**: 新型快速解决方案可极大减少纯化过程, 省时、省力、避免纯化过程的损耗, 大幅提升低起始量样本建库成功率!
- **齐全**: 作为 TIANGEN 传统优势的各类核酸提取试剂, 为二代测序相关的核酸提取纯化实验提供最佳的质量保障!
- **便捷**: 所有产品均为原装进口, 配备中英文说明书, 更方便阅读和使用。常规产品在中国大陆地区长期备货, 货期更短, 采购形式更为灵活; 大批量采购客户可提供中国仓储, 按需分配发货, 更快到达您的手中!

TIANGEN 都有什么?

- 灵活的建库模块包含建库过程中的单个或多个可合并操作的步骤, 可以和其它试剂组合用于特殊需要的工作流程。
- 可单独选购的各种原材料, 充分的优化和调整空间, 可以适应各种特殊的实验目的或者大批量建库的需要。
- 个性化的一站式建库解决方案, 针对不同的文库特点和样本类型, 帮您推荐适合您的建库各步所需的试剂, 适合于科研服务建库及工业客户开展 NGS 实验。



快速文库构建平台特点



含片段化功能的快速DNA文库制备流程 (Illumina 平台)

—TIANSeq DirectFast DNA Library Prep Kit (NG201)

基因组 DNA 文库制备

适用样本类型	基因组DNA (gDNA)
样本起始量	1 ng-1 µg

特点

- 含有片段化酶，适用于基因组/大片段DNA的快速文库构建。
- 低起始量样本，适合1 ng ~ 1 µg样本的高效转化。
- 简便、快速，省去多步纯化流程，整个建库流程仅需2.5 hr。

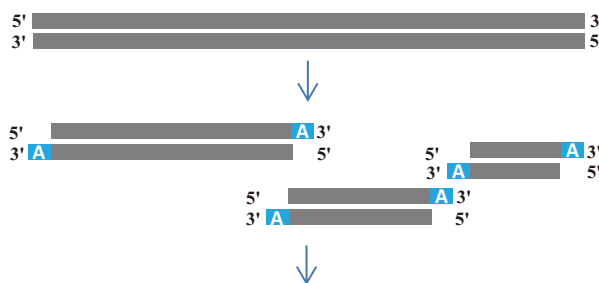
快速一站式建库方案 (Illumina 平台适用)



Step1

DNA片段化/末端修复/添加A尾

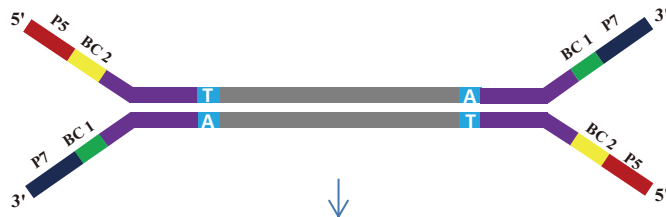
- TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing Module可将gDNA的片段化、末端修复、A尾添加等反应一步完成。
- TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing Module对gDNA的片段化是随机进行的，不具有序列偏好或GC偏好性。



Step2

接头连接

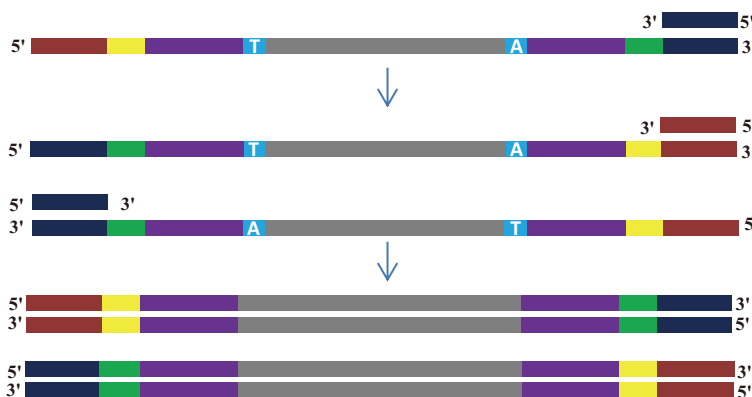
- 使用TIANSeq Fast Ligation Module在DNA片段两端连接含有1-2个Barcode序列的接头。
- 接头中已经含有测序所需的P5及P7序列，可根据片段化DNA的起始上样量，选择将连接产物纯化后直接用于NGS测序，或进行PCR扩增后再进行测序。



Step3

PCR富集

- 由于接头上含有P5及P7序列，利用P5及P7引物可使用TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing Module直接对文库进行PCR富集。



灵活的上样量和片段处理长度

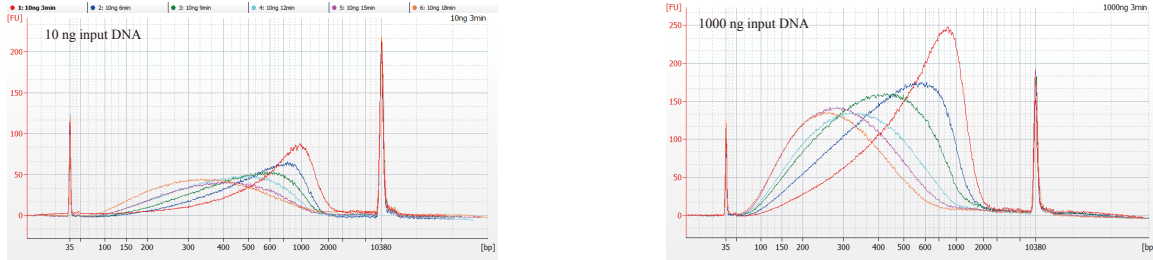


图 1. 不同反应时间对 DNA 片段化效果的影响

使用“Fragmentation Module (NG301)”对 10 ng 和 1000 ng DNA 进行片段化处理。处理不同时间的反应产物经 1.8X Ampure XP 磁珠进行纯化后用于 Agilent 2100 分析。

片段化酶与机械片段化效果比较

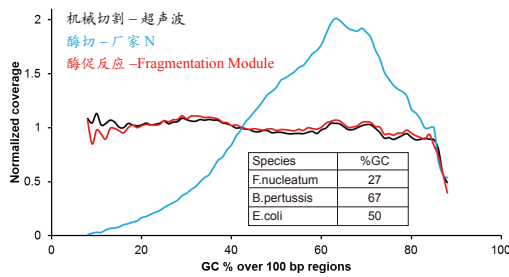


图 2. 不同文库制备方案基因组覆盖的对比结果，三种不同 GC 含量细菌基因组 DNA 等摩尔混合，100 ng 混合 DNA 经不同方案制备文库测序后比较基因组覆盖度。结果表明：Fragmentation Module (NG301) 对 DNA 的片段化效果与超声破碎高度一致，均不存在切割的偏好性。

样本低至 1ng 建库效果比较

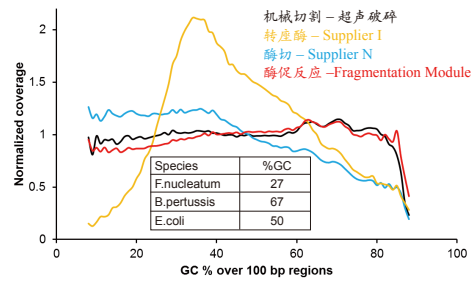


图 3. 不同文库制备方案基因组覆盖的对比结果，三种不同 GC 含量细菌基因组 DNA 等摩尔混合，1 ng 混合 DNA 经不同方案制备文库测序后比较基因组覆盖度。结果表明：即使低至 1 ng 的 DNA 上样量，Fragmentation Module (NG301) 的片段化效果仍然与超声破碎方法高度一致，没有切割偏好性。

采用 PCR free 步骤测序结果比较

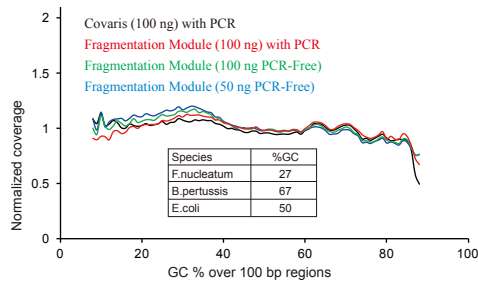


图 4. 不同初始量的基因组 DNA 使用 PCR 或 PCR free 的方式进行文库构建，最终的基因组覆盖度对比。结果表明：使用 Fragmentation Module (NG301) 试剂及一管式操作和高效的文库构建步骤，无论是否进行 PCR 富集，所得到的 DNA 文库在片段覆盖度分布方面均与机械破碎方法保持高度一致。

文库构建效率与得率统计

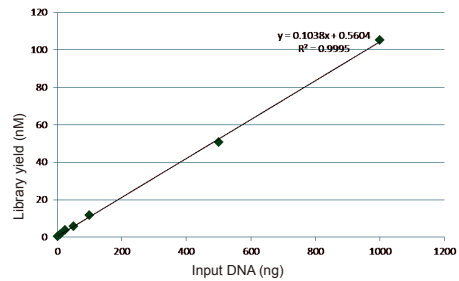


图 5. 不同起始量样本 (1、10、25、50、100、500、1000 ng) 经 PCR-free 方式进行文库构建后，使用 qPCR 对得到的文库 DNA 进行定量分析结果。线性回归分析表明在广泛的上样量范围内，文库得率均呈良好的线性关系。即使在上样量低至 1 ng 的情况下，文库构建效率也不会降低。

不同产品测序数据对比

Fragmentation method		1ng Input DNA		100 ng Input DNA	
		Mapped Reads	Duplication	Mapped Reads	Duplication
Covaris	Mechanical	92.96%	0.09%	93.61%	0.03%
Supplier I	Tagmentation	93.76%	0.28%	/	/
Supplier N	Enzyme-based	86.91%	0.68%	91.40%	0.06%
Fragmentation Module	Enzyme-based	91.92%	0.07%	94.45%	0.04%

不含片段化功能的快速DNA文库制备流程(Illumina 平台)

—TIANSeq Fast DNA Library Prep Kit (NG202)

片段化 DNA 文库制备

适用样本类型	DNA 片段
样本起始量	0.25 ng-1 μg

特点

- 适用于片段化DNA的快速文库构建
- 低起始量样本, 适合0.25 ng ~ 1 μg样本的高效转化
- 简便、快速, 省去多步纯化流程, 整个建库流程仅需 2 hr

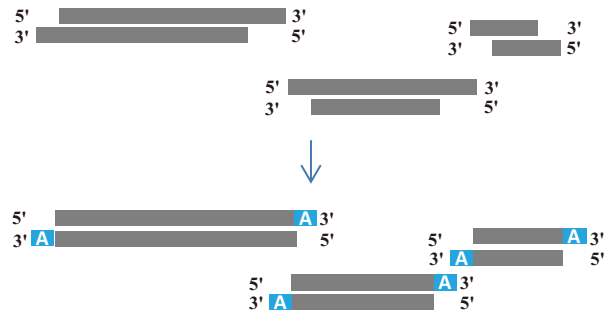
快速一站式建库方案 (illumina)



Step1

末端修复/添加A尾

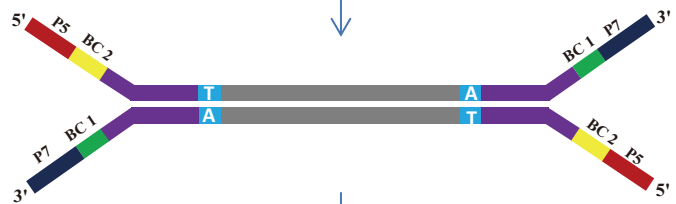
- TIANSeq End repair/dA-tailing Module 可将末端修复、A尾添加等反应一步完成。



Step2

接头连接

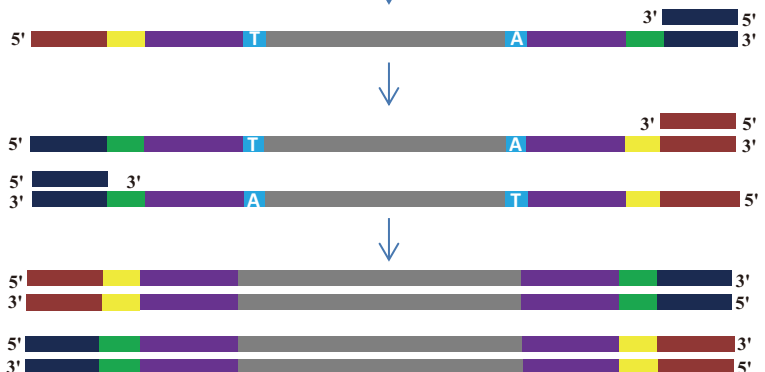
- 使用TIANSeq Fast Ligation Module在DNA片段两端连接含有1-2个Barcode序列的接头。
- 接头中已经含有测序所需的P5及P7序列, 可根据片段化DNA的起始上样量, 选择将连接产物纯化后直接用于NGS测序, 或进行PCR扩增后再进行测序。



Step3

PCR富集

- 由于接头上含有P5及P7序列, 利用P5及P7引物可使用TIANSeq NGS Library Amplification Module直接对文库进行PCR富集。



含片段化功能的快速DNA文库制备流程 (Ion Torrent 平台)

基因组 DNA 文库制备

适用样本类型	基因组DNA (gDNA)
样本起始量	1 ng-1 µg

Step1

DNA片段化/末端修复

- TIANSeq DNA Fragmentation Module (NG305)对gDNA的片段化是随机进行的,不具有序列偏好或GC偏好性。



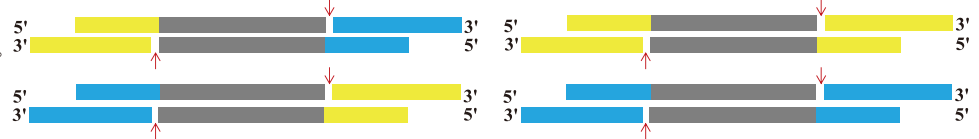
Step2

接头连接及切口平移

- 向末端修复后的DNA片段两端连接P1和A接头。



- 连接后形成接口处含有切刻的4种连接产物。注：“↑”切口位置



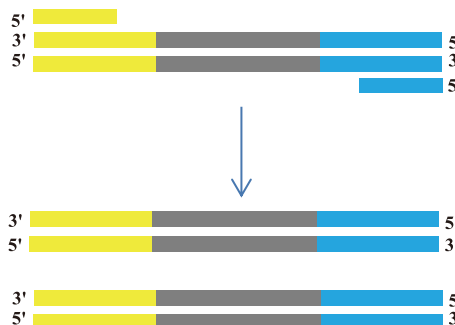
- 利用DNA聚合酶进行切口平移以补平连接处的切口。



Step3

PCR富集

- 利用与接头序列结合的引物对接头连接产物进行扩增。



经典DNA文库制备流程(Illumina 平台)

—TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina (NG103)

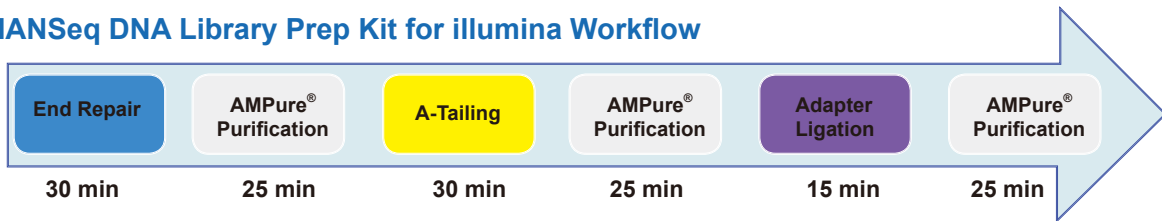
片段化 DNA 文库制备

适用样本类型	DNA片段
样本起始量	10 ng-1 µg

特点

- 高度优化经典建库流程，高文库转化效率
- 反应模块冻干包装，操作简便，性能稳定
- 适合10 ng ~ 1 µg样本的高效转化

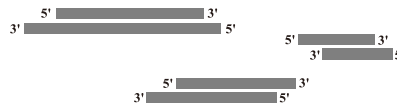
TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina Workflow



Step1

DNA片段化

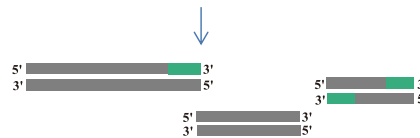
- 使用超声处理、化学处理或片段化酶处理使DNA片段化（ChIP 测序无需进行片段化处理）。



Step2

末端修复

- 通过互补链的延伸对5'-突出末端进行补齐，同时对3'-突出末端进行切割，使DNA双链片段形成平末端。
- 末端修复的同时对DNA片段进行磷酸化。



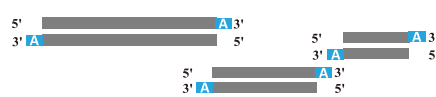
末端修复供选原料

- T4 DNA 聚合酶 (NG205-01/02)
- Klenow片段 (NG203-01/02)
- T4 多聚核苷酸激酶 (NG206-01/02)

Step3

添加A尾

- 对DNA片段3'-末端添加A尾。



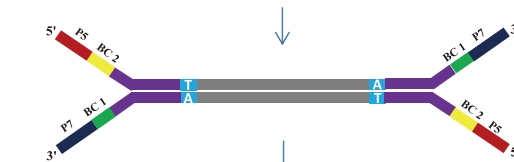
添加A尾供选原料

- Klenow片段 (3'-5' exo-) (NG202-01/02)
- T4多聚核苷酸激酶 (NG206-01/02)

Step4

接头连接

- 使用DNA连接酶在DNA片段两段连接含有1-2个Barcode序列的接头。
- 接头中已经含有测序所需的P5及P7序列，可根据片段化DNA的起始上样量，选择将连接产物纯化后直接用于NGS测序，或进行PCR扩增后再进行测序。



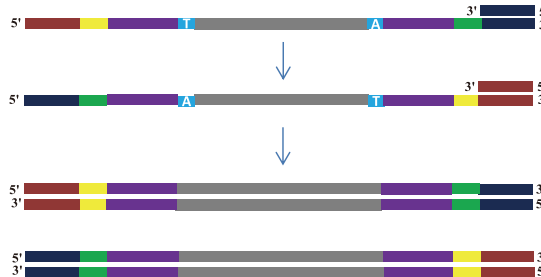
接头连接供选原料

- T4 DNA 连接酶 (NG201-01/02)

Step5

PCR富集

- 由于接头上含有P5及P7序列，利用P5及P7引物可直接对文库进行PCR富集。



PCR富集试剂

- TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)

经典DNA文库制备流程(Ion Torrent平台)

—TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent (NG104)

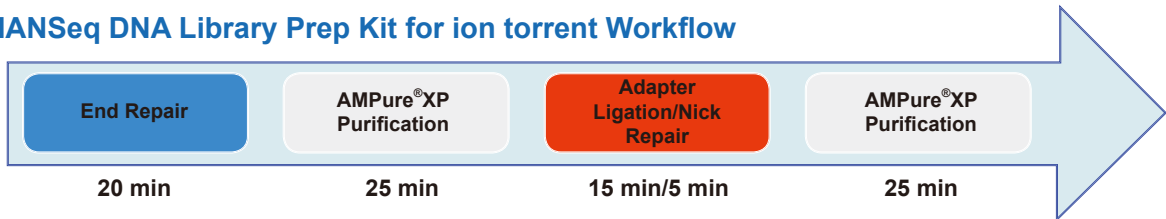
片段化 DNA 文库制备

适用样本类型	DNA片段
样本起始量	10 ng-1 µg

特点

- 适合于ion torrent平台的高效文库转化流程
- 反应模块冻干包装，操作简便，性能稳定
- 适合10 ng ~ 1 µg样本的高效转化

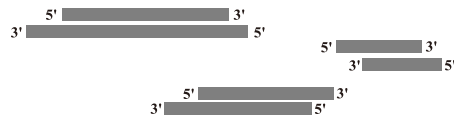
TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent Workflow



Step1

DNA片段化

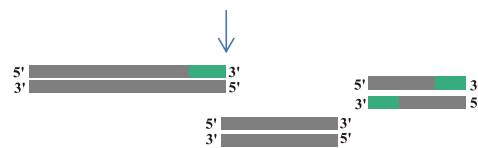
- 使用超声处理、化学处理或片段化酶处理使DNA片段化（ChIP 测序无需进行片段化处理）。



Step2

末端修复

- 通过互补链的延伸对5'-突出末端进行补平，同时对3'-突出末端进行切割，使DNA双链片段形成平末端。
- 末端修复的同时对DNA片段进行磷酸化。



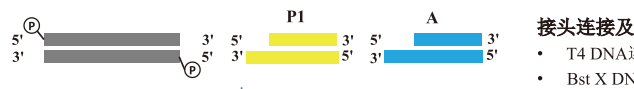
末端修复供选原料

- T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02)
- Klenow片段 (NG203-01/02)
- T4 多聚核苷酸激酶 (NG206-01/02)

Step3

接头连接及切口平移

- 向末端修复后的DNA片段两端连接P1和A接头。



接头连接及切口平移供选原料

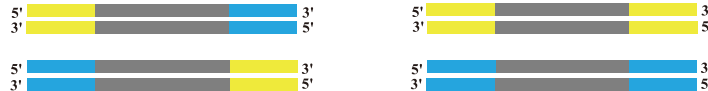
- T4 DNA连接酶 (NG201-01/02)
- Bst X DNA聚合酶 (NG208-01/02)

- 连接后形成接口处含有切口的4种连接产物。

注“↑”切口位置



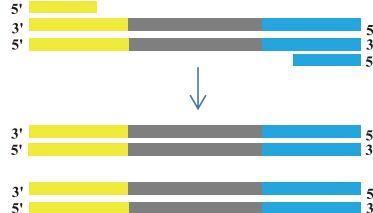
- 利用DNA聚合酶进行切口平移以补平连接处的切口。



Step4

PCR富集

- 利用与接头序列结合的引物对接头连接产物进行扩增。



PCR富集试剂

- TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)

RNA文库制备推荐流程 (Illumina平台)

Step1

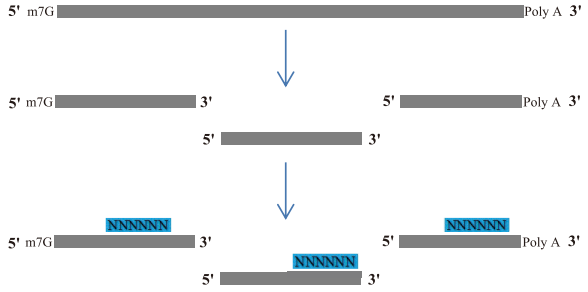
RNA富集
 • 以mRNA或以去除rRNA的总RNA为起始样本进行文库构建。

Step2

RNA片段化
 • 用超声破碎、化学处理或热处理方式将mRNA片段化。

Step3

第一链cDNA合成
 • 使用随机引物对片段化的mRNA进行反转录。

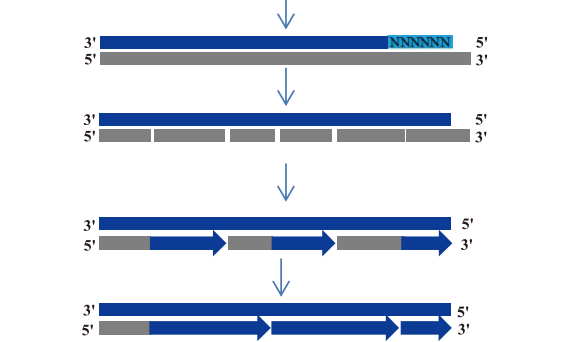


第一链cDNA合成供选原料

- EnzScript M-MLV (RNase H-) (NG212-01)
- RNA酶抑制剂 (NG209-01/02)

Step4

第二链cDNA合成
 • 使用RNase H产生缺口, 从切口处以RNA为引物进行延伸并连接生成cDNA第二链。



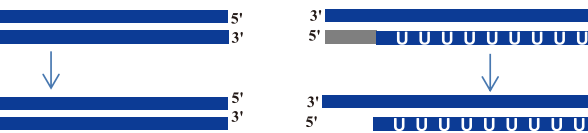
第二链cDNA合成供选原料

- RNA酶H (NG207-01/02)
- DNA聚合酶I (NG204-01/02)
- T4 DNA连接酶 (NG201-01/02)

Undirectional sequencing Directional sequencing

Step5

末端修复
 • 对双链cDNA进行末端修复, 使DNA双链片段形成平末端。
 • 末端修复的同时对DNA片段进行磷酸化。

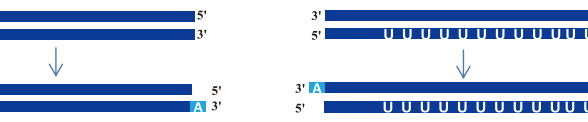


末端修复供选原料

- T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02)
- Klenow片段 (NG203-01/02)
- T4多聚核苷酸激酶 (NG206-01/02)

Step6

添加A尾
 • 对DNA片段3'-末端添加A尾。

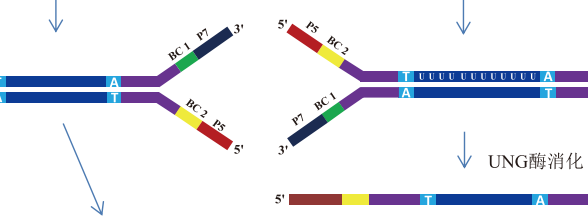


添加A尾供选原料

- Klenow片段 (3'-5' exo-) (NG202-01/02)
- T4多聚核苷酸激酶 (NG206-01/02)

Step7

接头连接
 • 使用DNA连接酶在DNA片段两端连接含有1-2个Barcode序列的接头。
 • 接头中已经含有测序所需的P5及P7序列, 可选择将连接产物纯化后直接用于NGS测序, 或进行PCR扩增后再进行测序。

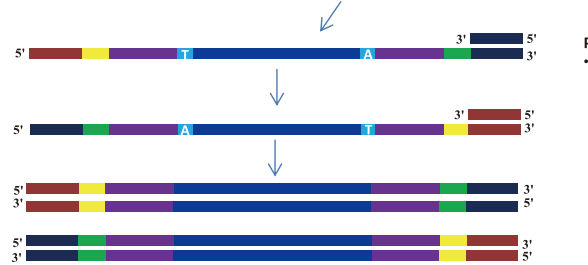


接头连接供选原料

- T4 DNA连接酶 (NG201-01/02)

Step8

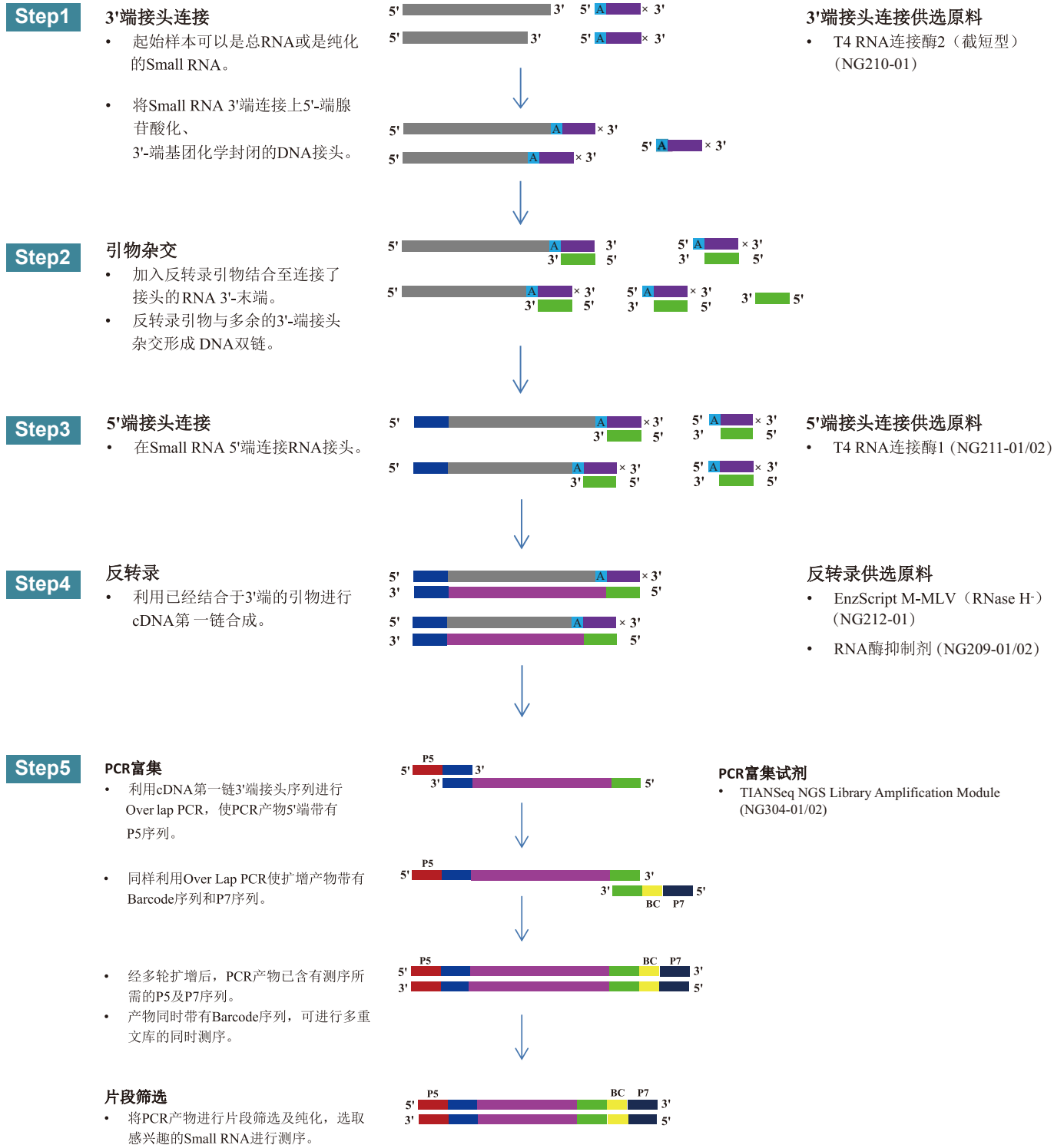
PCR富集
 • 由于接头上含有P5及P7序列, 利用P5及P7引物可直接对文库进行PCR富集。



PCR富集试剂

- TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)

Small RNA文库制备推荐流程 (Illumina平台)



RNA文库构建方案

mRNA文库构建流程

		mRNA片段化	第一链cDNA合成	第二链cDNA合成	末端修复	A尾添加	接头连接	PCR富集
Illumina 平台流程	模块	/	/	/	• TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing Module (NG301-01/02)		• TIANSeq Fast Ligation Module (NG303-01/02)	• TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
	原材料	/	• EnzScript M-MLV (RNase H) (NG212-01) • RNA酶抑制剂 (NG209-01/02)	• DNA聚合酶I (NG204-01/02) • RNA酶H (NG207-01/02) • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02)	• T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4多聚核苷酸激酶 (NG206-01/-2)	• Klenow片段 (3'→5' exo-) (NG202-01/02)	• T4 DNA连接酶 (NG201-01/02)	• TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
Ion Torrent 平台流程	原材料	/	• EnzScript M-MLV (RNase H) (NG212-01) • RNA酶抑制剂 (NG209-01/02)	• DNA聚合酶I (NG204-01/02) • RNA酶H (NG207-01/02) • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02)	• T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4多聚核苷酸激酶 (NG206-01/-2)	/	• T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • Bxt X DNA聚合酶 (NG208-01/02)	

Small RNA文库构建流程

		3'端接头连接	引物杂交	5'端接头连接	第一链cDNA合成	PCR富集
Illumina 平台流程	原材料	• T4 RNA连接酶 2 (截短型) (NG210-01)	/	• T4 RNA连接酶 1 (NG211-01/02)	• EnzScript M-MLV (RNase H) (NG212-01) • RNA酶 H (NG207-01/02) • RNA酶抑制剂 (NG209-01/02)	• TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)

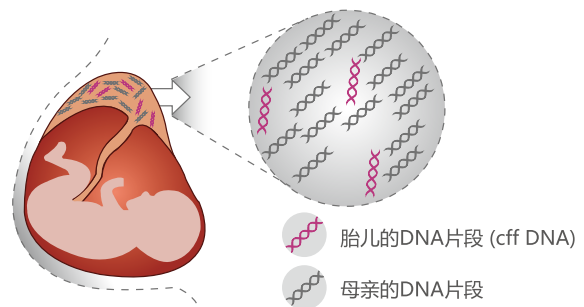
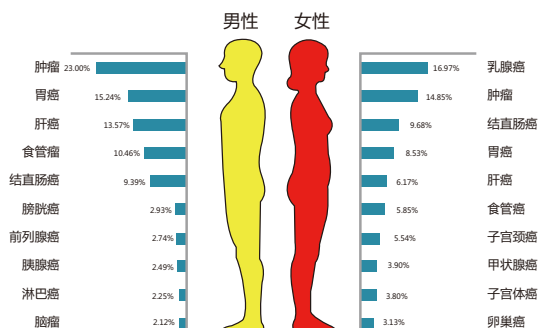
临床诊断NGS文库构建

唐氏及肿瘤筛查文库构建方案

	游离核酸	末端修复	A尾添加	接头连接	PCR富集
Illumina 平台流程	试剂盒	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq Fast DNA Library Prep Kit (illumina) (NG102-01/02) (所需时间2 hr) • TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina(NG103-01/02) (所需时间3.5-5 hr) 			<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
	模块	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq End repair/dA-tailing Module (NG302-01/02) 		<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq Fast Ligation Module (NG303-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
	原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶(NG205-01/02) • Klenow片段(NG203-01/02) • T4多聚合核苷酸激酶(NG206-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • Klenow (3'→ 5'exo-) (NG202-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • TIANSeq 单索引接头 (Illumina) (NG214-01/02/03) 	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
Ion Torrent 平台流程	试剂盒	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent (所需时间2-3 hr) 			/
	原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段(NG203-01/02) • T4 多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	/	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • Bst X DNA 聚合酶 (NG208-01/02) 	/

染色体异常筛查文库构建方案

	DNA片段化	末端修复	A尾添加	接头连接	文库富集
Illumina 平台流程	试剂盒	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq DirectFast DNA Library Prep Kit (illumina) (NG101-01/02) (所需时间2.5 hr) • TIANSeq Fast DNA Library Prep Kit (illumina) (NG102-01/02) (所需时间2 hr) • TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina(NG103-01/02) (所需时间3.5-5 hr) 			<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
	模块	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq Fragmentation/End repair/dA-tailing Module (NG301-01/02) 		<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq Fast Ligation Module(NG303-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
	原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段(NG203-01/02) • T4 多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • Klenow (3'→ 5'exo-) (NG202-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • TIANSeq 单索引接头 (Illumina)(NG214-01/02/03) 	
Ion Torrent 平台流程	试剂盒	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent (所需时间2-3 hr) 			/
	模块	<ul style="list-style-type: none"> • TIANSeq DNA Fragmentation Module (NG305-01/02) 	/	/	/
	原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4 多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	/	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • Bst X DNA 聚合酶 (NG208-01/02) 	/



科研服务NGS文库构建

科研服务文库构建方案——基因组

文库类型	DNA片段化	末端修复	A尾添加	接头连接	文库富集	
<ul style="list-style-type: none"> • 基因组文库 • 宏基因组文库 • 单细胞基因组扩增文库 	Illumina平台流程	TIANSeq DirectFast DNA Library Prep Kit (illumina) (NG101-01/02) (所需时间2.5 hr)				
		试剂盒	TIANSeq Fast DNA Library Prep Kit (illumina) (NG102-01/02) (所需时间2 hr)			• TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)
		模块	TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina(NG103-01/02) (所需时间3.5-5 hr)		• TIANSeq Fast Ligation Module (NG303-01/02)	
	Ion torrent平台流程	试剂盒	TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent (所需时间2-3 hr)			/
		模块	TIANSeq DNA Fragmentation Module (NG305-01/02)	/	/	/
		原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4 多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	• Klenow(3'→ 5'exo-) (NG202-01/02)	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • TIANSeq 单索引接头 (Illumina) NG214-01/02/03) 	/

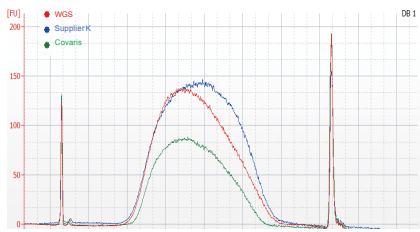
科研服务文库构建方案——片段化 DNA

文库类型	末端修复	A尾添加	接头连接	文库富集		
DNA文库	TIANSeq Fast DNA Library Prep Kit (illumina) (NG102-01/02) (所需时间2 hr)					
	试剂盒	TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina(NG103-01/02) (所需时间3.5-5 hr)		• TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)		
	模块	• TIANSeq End repair/dA-tailing Module (NG302-01/02)	• TIANSeq Fast Ligation Module (NG303-01/02)	• TIANSeq NGS Library Amplification Module (NG304-01/02)		
表观遗传类文库	Illumina平台流程	原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4 多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • Klenow (3'→ 5'exo-) (NG202-01/02) 	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶 (NG201-01/02) • TIANSeq 单索引接头 (Illumina) NG214-01/02/03) 	/
		试剂盒	TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent (所需时间2-3 hr)			/
		原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	/	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶(NG201-01/02) • Bst X DNA 聚合酶 (NG208-01/02) 	/
PCR产物文库	Ion torrent平台流程	试剂盒	TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent (所需时间2-3 hr)			/
		原材料	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA聚合酶 (NG205-01/02) • Klenow片段 (NG203-01/02) • T4多聚合核苷酸激酶 (NG206-01/02) 	/	<ul style="list-style-type: none"> • T4 DNA连接酶(NG201-01/02) • Bst X DNA 聚合酶 (NG208-01/02) 	/

常见问题解决

Q NGS 文库的片段大小分布一般是怎样的？

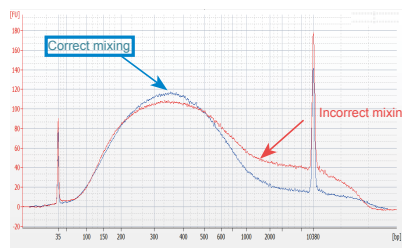
A NGS 文库 DNA 片段一般在 200 bp-800 bp 范围内分布



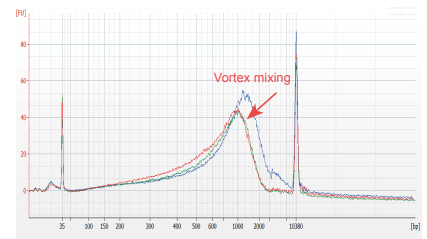
不同方法构建得到的 NGS 文库片段大小分布相似效果

Q 配制 TIANSeq DirectFast DNA Library Prep Kit (NG101) 文库制备反应体系时，混匀方式对试验结果有影响吗？

A 不恰当的混匀方式（涡旋、剧烈振荡等）会造成文库片段分布出现异常（如下图），从而影响文库质量。故而当配制 5×FEA Enzyme Mix 的片段化反应液时，请使用移液器轻柔吸打混匀，或用指尖轻弹混匀。注意不要使用涡旋混匀。



混匀方式错误对结果造成的影响



Q 构建得到的文库 DNA 浓度低？

A a) DNA 质量差，含抑制物

使用高质量的 DNA 样本，以免抑制酶活性。

b) 采用 PCR-free 方式构建 DNA 文库时，DNA 上样量不足

当片段化 DNA 的上样量超过 50 ng 时，可在文库构建过程中不进行 PCR 扩增。如果文库拷贝数过低不能进行直接测序，可在接头连接完成后对 DNA 文库进行 PCR 扩增。

c) RNA 污染造成起始 DNA 定量不准确

基因组 DNA 纯化过程中可能存在 RNA 污染，进而导致 DNA 定量不准确，使文库构建时 DNA 上样量不足。可用 RNase 对 DNA 进行处理，以除去 RNA。

Q DNA 文库在电泳分析中出现异常条带

A-1 a) 出现小片段（60 bp-120 bp）

小片段一般为接头片段或接头所形成的二聚体，使用 Agencourt AMPure XP 微珠进行纯化可以有效去除这些接头片段，保证测序质量。

b) 文库经 PCR 富集后出现大片段

接头连接后文库 DNA 片段的大小会增加 120 bp，若添加接头后 DNA 片段增大幅度超过 120bp，则可能为 PCR 扩增过度，导致产生了片段扩增异常。减少 PCR 循环数可以避免这种情况的发生。

c) 接头连接后文库 DNA 片段大小异常

本试剂盒接头长度为 60 bp，则当片段两端被连接接头后，其长度只会增加 120 bp。如果使用非本试剂盒推荐的接头，请联系供应商提供接头长度等相关信息。请确保试验流程及操作遵守操作手册所描述的步骤进行。

d) 接头连接前 DNA 片段大小异常

此问题产生的原因可能是在 DNA 片段化过程中使用了错误的反应条件。不同的 DNA 上样量应使用不同的反应时间。若 DNA 上样量大于 10ng，我们推荐以 12 min 反应时间作为起始时间进行优化，此时产生的片段大小主要为 300-500 bp 范围。用户可根据自己的需求在此时长基础上增加或减少 2-4 min 优化得到所需大小的 DNA 片段。

A-2 a) 片段化时间未优化

如果片段化的 DNA 过小或过大，请参考说明书中提供的 DNA 片段大小随片段化反应时间变化图进行反应时长的初步确定，并以此时长为对照，额外设置延长或缩短 3 min 的反应体系对片段化时间进行较为准确的判断。

A-3 片段化处理后 DNA 的大小分布出现异常

a) 片段化试剂融化方式不正确，或融化后未完全混匀

将 5×FEA Enzyme Mix 试剂置于冰上融化。一旦融化，轻弹管底将试剂混匀，注意不要涡旋混匀！

b) 用于上样的 DNA 溶液中含有 EDTA 或其他污染物

在 DNA 纯化步骤中除去盐离子和螯合剂对于试验的成功尤为重要。如果 DNA 溶解于 1XTE，可采用说明书中提供的方法进行片段化。如果不确定溶液中的 EDTA 浓度，则建议对 DNA 进行纯化，然后将其溶解于去离子水中进行后续反应。

c) 起始 DNA 定量不准确

片段化处理后 DNA 的大小与 DNA 上样量密切相关。在片段化处理前，使用 Qubit、Picogreen 等方法对 DNA 进行精确定量有助于确定反应体系中 DNA 的准确用量。

d) 配制反应体系时未遵循说明书进行

片段化反应体系的配制必须严格按说明书所述在冰上进行，为了保证最好的效果，所有反应组份也均应置于冰上，并在完全冷却后再进行反应体系的配制。配制完成后请轻弹或吸打混匀，切不可涡旋！

使用 TIANSeq DirectFast DNA Library Prep Kit (NG101) 需要注意的问题

1 必须使用高纯度 DNA 进行文库构建

- DNA 完整度较好：电泳条带 30 kb 以上，无拖尾现象
- $OD_{260/230} > 1.5$
- $OD_{260/280} 1.7-1.9$

2 DNA 上样量必须准确

建议采用 Qubit、Picogreen 方法对 DNA 进行定量，而不宜使用 Nanodrop 进行定量

3 必须明确 DNA 溶液中 EDTA 的含量

EDTA 对片段化反应影响较大，若 EDTA 含量高，则需要对 DNA 进行纯化才能够进行后续试验

4 片段化反应液必须在冰上配制

片段化反应过程对反应温度和时间敏感（尤其是添加 Enhancer 后），为了保证反应时间的准确性请于冰上配制反应体系。

5 片段化反应时间必须准确

片段化步骤的反应时间将直接影响片段化产物的大小，从而对文库中 DNA 片段的大小分布造成影响。

样本库构建的第一步就是高质量的核酸提取，TIANGEN 作为中国核酸提取的龙头企业，拥有针对于各种不同样本和起始量的专业解决方案。



BusinessWire
A Berkshire Hathaway Company

HOME SERVICES NEWS EDUCATION ABOUT US

Tiagen, Qiagen and Life Technologies Emerge as Leading Suppliers in Chinese Nucleic Acid Purification Market According to Percepta

April 30, 2013 06:00 AM Eastern Daylight Time

CARLSBAD, Calif. --(BUSINESS WIRE)--Percepta Associates announces release of its Series One Nucleic Acid Purification (China) Life Science Dashboard™ market research report revealing Tiagen, Qiagen and Life Technologies as leading suppliers. Fifteen nucleic acid purification (NAP) market segments analyzed in this report include: DNA/RNA library prep for next generation sequencing, RNA/DNA isolation from cells or tissue, whole blood and FFPE samples, plasmid DNA prep, mRNA, microRNA, gel extraction and post-reaction cleanup. Six additional companies emerged as second-tier NAP suppliers: Corning/Axygen, BioTeke, Illumina, Promega, Roche and TaKaRa/Clontech.

"Major differences exist in the Chinese NAP research market such as the competitive landscape distribution/dealer channels, percent usage by customers, and propensity to switch suppliers for 15 product segments analyzed," said Cijian Feng, Market Research Associate for East Asia. "We do not see anywhere near the same level of market entrenchment in China for suppliers like Qiagen, Life Technologies and Illumina as we observe in the US or Europe."

The Life Science Dashboard™
Nucleic Acid Purification
(China)

Series One - April 2013



中华骨髓库项目，累计提供超过 80 万人份 血液基因组提取产品



手足口和流感 疫情，累计提供超过 800 万人份



产前及新生儿早期筛查 工作，累计提供超过 120 万人份 医疗样本检测产品



全球结核病筛查 项目，提供超过 10 万人份 病毒检测产品



中国最大的健康人群样本库 工程，提供核酸自动化提取解决方案



汶川地震 灾区食品安全检查，累计提供超过 2.5 万次 细菌检测产品

专业生产 品质稳定

- **洁净生产车间**
——环境洁净度控制在10万级以上
参照GMP标准建设的洁净生产车间，保证了环境的洁净，是产品稳定可靠的基础保证。
- **中央水处理系统——保证最纯净的供水**
专业生产用Millipore大型中央水处理系统，利用RO反渗透技术及紫外杀菌等纯化处理，结合多层级交换柱及滤膜，去除重金属、细菌、有机物、毒素等污染，保证研发及生产用水纯净。
水质标准：电阻率18.2 MΩ·cm；
TOC<5 ppb，内毒素<0.001 EU/ml
- **生产过程控制——保证产品品质**
生产过程中引入SAP系统全过程管理，使生产管理规范、可控。
批量化、自动化生产，确保产品批间差降至最低。
专业人员培训机制及监控考核系统，最大化降低人为误差。
每一个产品单元都可以一直追溯到原料层面。
- **技术培训**
定期的质量意识、安全、技术培训，不断提高质量意识和生产技术能力。



严格控制 品质保证

- **德国莱茵ISO认证——专业管理控制**
从研发、采购到生产、物流，每个产品从诞生之日起全程在德国莱茵TUV认证的ISO 9001质量管理体系下严格进行。
- **第一类医疗器械生产备案认证企业**
获得北京市食品药品监督管理局认可，授予《第一类医疗器械生产备案凭证》，具有第一类医疗器械备案产品的研发、生产、质检资格。目前已经有微量基因组DNA、干血斑DNA等10余种核酸提取试剂盒获得第一类医疗器械凭证。



- **质量过程控制**

从原料、半成品到成品进行严格质量控制及层层监测。生产全过程跟踪检查、监督，过程文件严格记录。对洁净区、纯水系统的定期专人检测，确保系统正常运行。与总公司联合建立严苛的质量检测流程及质量控制标准。贯穿始终的质量提升项目，确保质检体系随市场要求的变化不断提升。



整合全球资源 实现规模生产

● 全球原材料采供应链

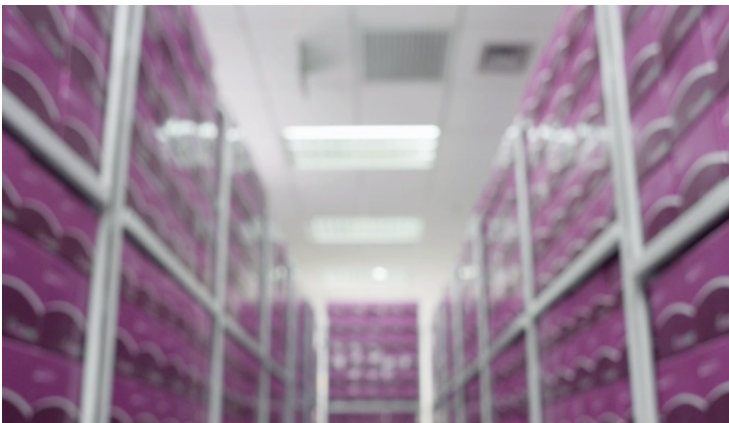
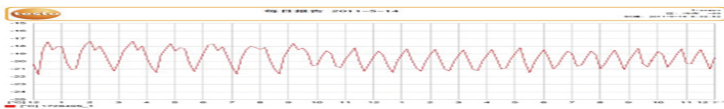
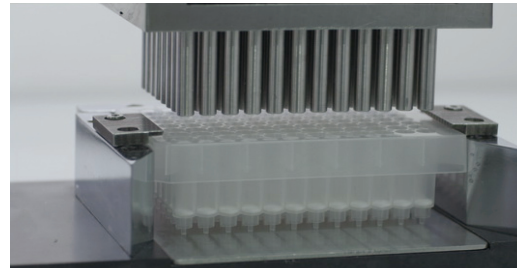
天根依托全球统一采供应链，筛选300多家国际供应商，采用高品质原料。对所有原材料100%严格质检以保证品质及批间稳定。

● 自动化生产

各种自动化生产设备的广泛采用不仅提高了生产效率，而且更有利于控制产品品质的均一性及稳定性，减少人为操作产生的误差。自动化设备涵盖了试剂、耗材的生产到包装各环节。

● 规模化实现全球化

随着国际市场需求的不断增加，天根不断提升生产规模及生产能力。为了适应国际化市场的快速发展，天根自2013年起陆续将所有产品标签英文化。全球供应产品实行统一生产，分别包装。各种自动化生产设备的广泛采用也大大提高了生产效率。保证了全球业务的快速发展。



大型数控仓储系统

● 多种存储温度分区管理

常温区：15~25℃ 常温库区

低温区：2~8℃ 冷库区

-20℃ 冷库区

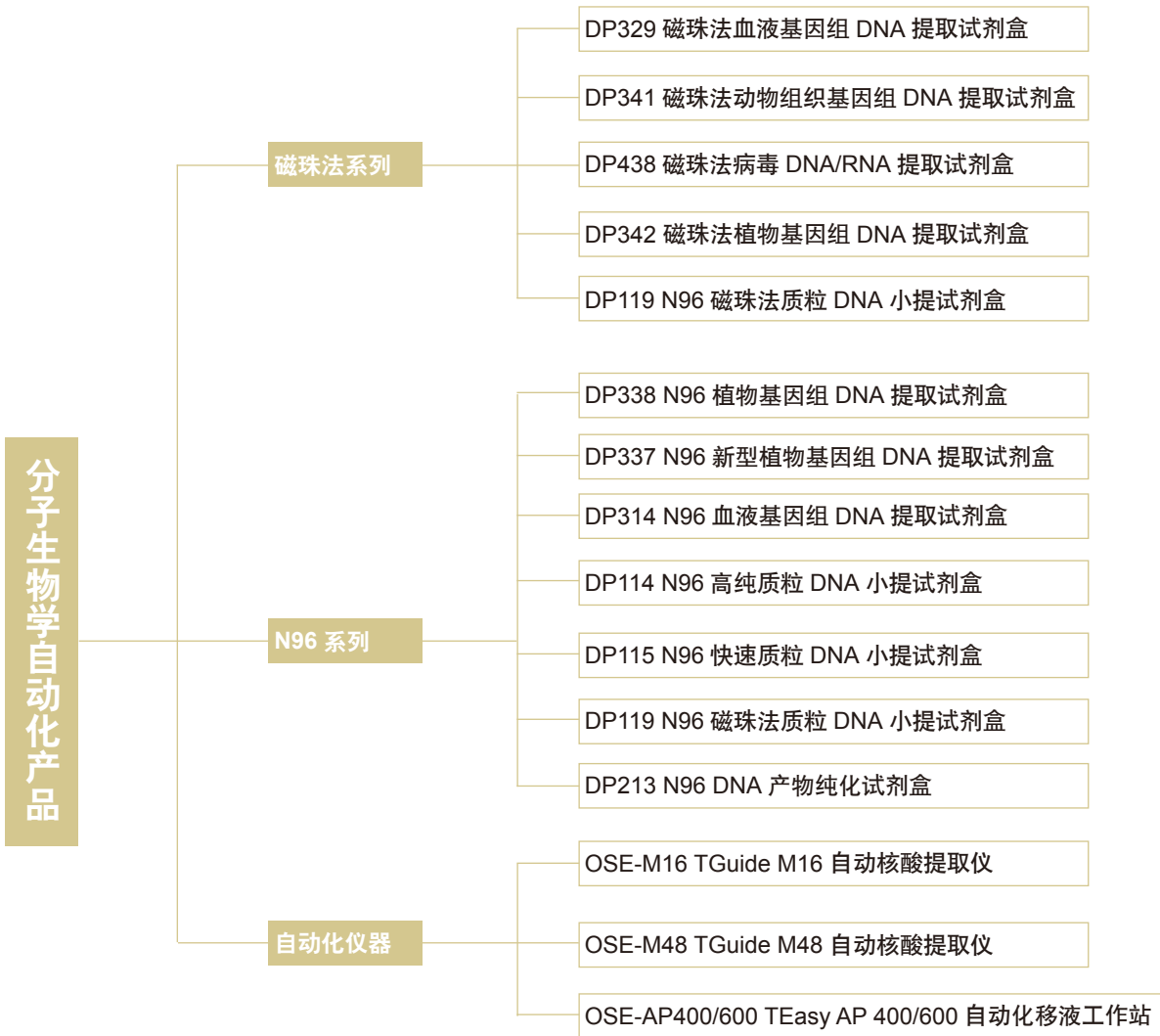
-80℃ 超低温库区

● 先进数控（24 h×365天温度监控）

24小时数控检测。数据波动超出正常范围时，将有即时系统短信通知相关责任人，保证第一时间快速处理，维持温控安全。

样本纯化方案





产品选择指南

一站式 DNA 文库构建试剂盒

产品名称	目录号	规格	目录价
TIANSeq DirectFast DNA Library Prep Kit (illumina)	NG101-01	24 次	6432 元
	NG101-02	96 次	23600 元
<ul style="list-style-type: none"> ·含有片段化酶，适用于基因组 / 大片段 DNA 的快速文库构建 ·低起始量样本，适合 1 ng ~ 1 μg 样本的高效转化 ·简便、快速，省去多步纯化流程，整个建库流程仅需 2.5 hr 			
TIANSeq Fast DNA Library Prep Kit (illumina)	NG102-01	24 次	5680 元
	NG102-02	96 次	19800 元
<ul style="list-style-type: none"> ·适用于片段化 DNA 的快速文库构建 ·低起始量样本，适合 0.25 ng ~ 1 μg 样本的高效转化 ·简便、快速，省去多步纯化流程，整个建库流程仅需 2 hr 			
TIANSeq DNA Library Prep Kit for illumina	NG103-01	24 次	5180 元
	NG103-02	96 次	17500 元
<ul style="list-style-type: none"> ·高度优化经典建库流程，高文库转化效率 ·反应模块冻干包装，操作简便，性能稳定 ·适合 10 ng ~ 1 μg 样本的高效转化 			
TIANSeq DNA Library Prep Kit for ion torrent	NG104-01	24 次	5180 元
	NG104-02	96 次	17500 元
<ul style="list-style-type: none"> ·适合于 ion torrent 平台的高效文库转化流程 ·反应模块冻干包装，操作简便，性能稳定 ·适合 10 ng ~ 1 μg 样本的高效转化 			

建库模块（建库模块可直接整合）

产品名称	目录号	规格	目录价
基因组 DNA 建库模块（illumina 平台适用）			
TIANSeq Fragmentation/End Repair/dA-Tailing Module	NG301-01	24 次	3580 元
	NG301-02	96 次	11560 元
TIANSeq End repair/dA-Tailing Module	NG302-01	24 次	2400 元
	NG302-02	96 次	7680 元
TIANseq Fast Ligation Module	NG303-01	24 次	2500 元
	NG303-02	96 次	8980 元
TIANSeq NGS Library Amplification Module	NG304-01	24 次	1760 元
	NG304-02	96 次	6480 元
基因组 DNA 建库模块（ion torrent 平台适用）			
TIANSeq DNA Fragmentation Module	NG305-01	24 次	720 元
	NG305-02	96 次	2400 元

DNA 文库构建原材料（可根据需求调整组合成建库模块）

产品名称	目录号	规格 (U)	目录价
DNA 建库原材料 (Illumina 平台适用)			
T4 DNA 连接酶 (快速)	NG201-01	24000	720 元
	NG201-02	240000	4380 元
Klenow (3' → 5' exo-) (高浓度)	NG202-01	1500	760 元
	NG202-02	10000	3350 元
Klenow 片段	NG203-01	500	1000 元
	NG203-02	2500	3080 元
T4 DNA 聚合酶	NG205-01	300	780 元
	NG205-02	2000	3080 元
T4 多聚合核苷酸激酶	NG206-01	1500	850 元
	NG206-02	10000	4580 元
DNA 建库原材料 (ion torrent 平台适用)			
T4 DNA 连接酶 (快速)	NG201-01	24000	720 元
	NG201-02	240000	4380 元
Klenow 片段	NG203-01	500	1000 元
	NG203-02	2500	3080 元
T4 DNA 聚合酶	NG205-01	300	780 元
	NG205-02	2000	3080 元
T4 多聚合核苷酸激酶	NG206-01	1500	850 元
	NG206-02	10000	4580 元
Bst X DNA 聚合酶	NG208-01	8000	980 元
	NG208-02	40000	4380 元

RNA 文库构建原材料 (可根据需求调整组合成建库模块)

产品名称	目录号	规格 (U)	目录价
RNA 建库原材料 (Illumina 平台适用)			
T4 DNA 连接酶 (快速)	NG201-01	24000	720 元
	NG201-02	240000	4380 元
Klenow (3' → 5' exo-) (高浓度)	NG202-01	1500	760 元
	NG202-02	10000	3350 元
Klenow 片段	NG203-01	500	1000 元
	NG203-02	2500	3080 元
DNA 聚合酶 I	NG204-01	500	500 元
	NG204-02	5000	3080 元
T4 DNA 聚合酶	NG205-01	300	780 元
	NG205-02	2000	3080 元
T4 多聚合核苷酸激酶	NG206-01	1500	850 元
	NG206-02	10000	4580 元
RNA 酶 H	NG207-01	500	500 元
	NG207-02	5000	3080 元
RNase 抑制剂	NG209-01	4000	670 元
	NG209-02	20000	3080 元
尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UNG)	NG213-01	1000	508 元
	NG213-02	10000	4080 元
EnzScript M-MLV (Rnase H-)	NG212-01	10000	1080 元
Small RNA 建库原材料 (illumina 平台适用)			
T4 RNA 连接酶 1	NG211-01	1500	780 元
	NG211-02	10000	3800 元
EnzScript M-MLV (Rnase H-)	NG212-01	10000	1080 元
T4 RNA 连接酶 2 (截短型)	NG210-01	500	3800 元
RNA 酶 H	NG207-01	500	500 元
	NG207-02	5000	3080 元
RNase 抑制剂	NG209-01	4000	670 元
	NG209-02	20000	3080 元