

## TD501-TD503

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2  
for Illumina®



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Tel: 400-600-9335

Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Vazyme biotech co., ltd.

---

**使用说明书**

Version 5.2

# 目录 Catalog

- 产品概述
- 产品组分
- 有效日期
- 必需材料
- 适用范围
- 建库原理
- 流程概要
- 使用方法
- 文库结构
- 测序相关
- 注意事项
- 附录

## 产品概述

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® 是针对Illumina高通量测序平台定向开发的专用试剂盒。使用该试剂盒可以将DNA制备成Illumina高通量测序平台专用测序文库。和传统文库构建方法相比，TruePrep™试剂盒采用新型的转座酶法进行DNA片段化，将繁琐的DNA片段化、末端修复和接头连接反应等步骤变为一步简单的酶促反应，显著降低了起始DNA的需求量并缩短了文库构建时间。试剂盒共提供50 ng、5 ng、1 ng三种规格，可根据实验类型自由选择。试剂盒中提供的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。

## 产品组分

货号 规格 起始DNA量	TD501-01/02 24/96 rxn 50 ng	TD502-01/02 24/96 rxn 5 ng	TD503-01/02 24/96 rxn 1 ng
■ TTE Mix V50	120/480 µl	-----	-----
■ TTE Mix V5	-----	120/480 µl	-----
■ TTE Mix V1	-----	-----	120/480 µl
■ 5 × TTBL	240/960 µl	96/384 µl	96/384 µl
■ 5 × TS	-----	120/480 µl	120/480 µl
■ PPM	120/480 µl	-----	-----
■ TAE	24/96 µl	24/96 µl	24/96 µl
■ 5 × 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, 所有组分-20°C储存。

TD502, 5 × TS室温储存; 其余组分-20°C储存。

TD503, 5 × TS室温储存; 其余组分-20°C储存。

## 必需材料

无水乙醇

灭菌超纯水

低吸附EP、PCR管

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

磁力架

PCR热循环仪

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

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

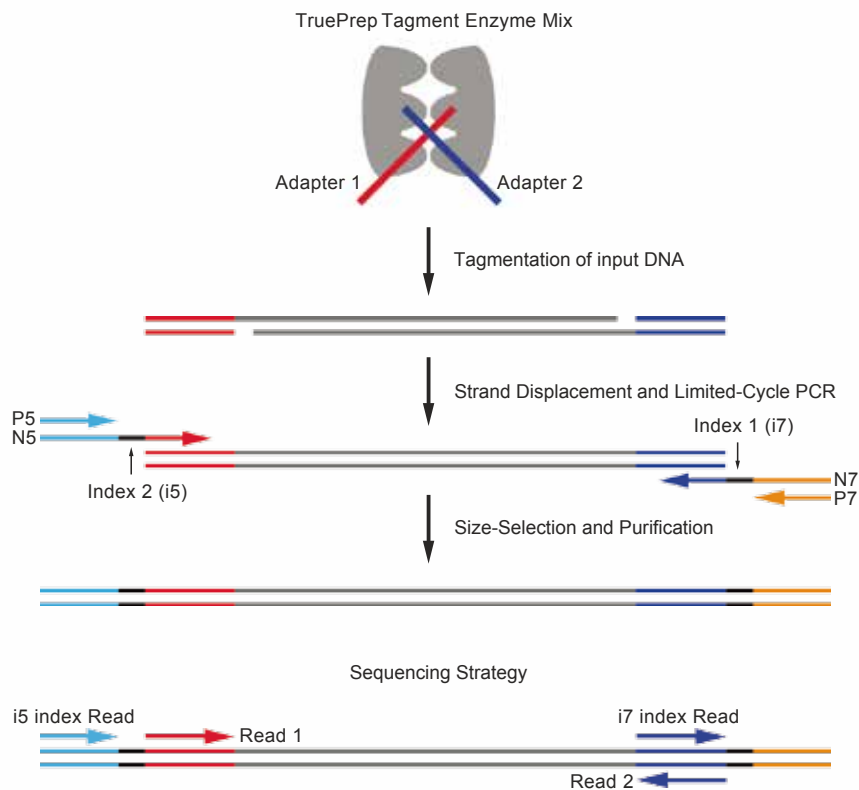
或TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (Illumina #FC-121-1003或#PE-121-1003)

## 适用范围

适用于将DNA制备成Illumina高通量测序平台专用文库。

注意: 如DNA样品为PCR产物, 应保证其长度>500 bp。因转座酶无法作用于DNA末端, 因此PCR产物最末端50 bp测序覆盖度可能会有所降低。我们推荐您在制备PCR产物时将待测区域两端各延长50-100 bp, 以避免末端测序覆盖度降低的情况。

## 建库原理

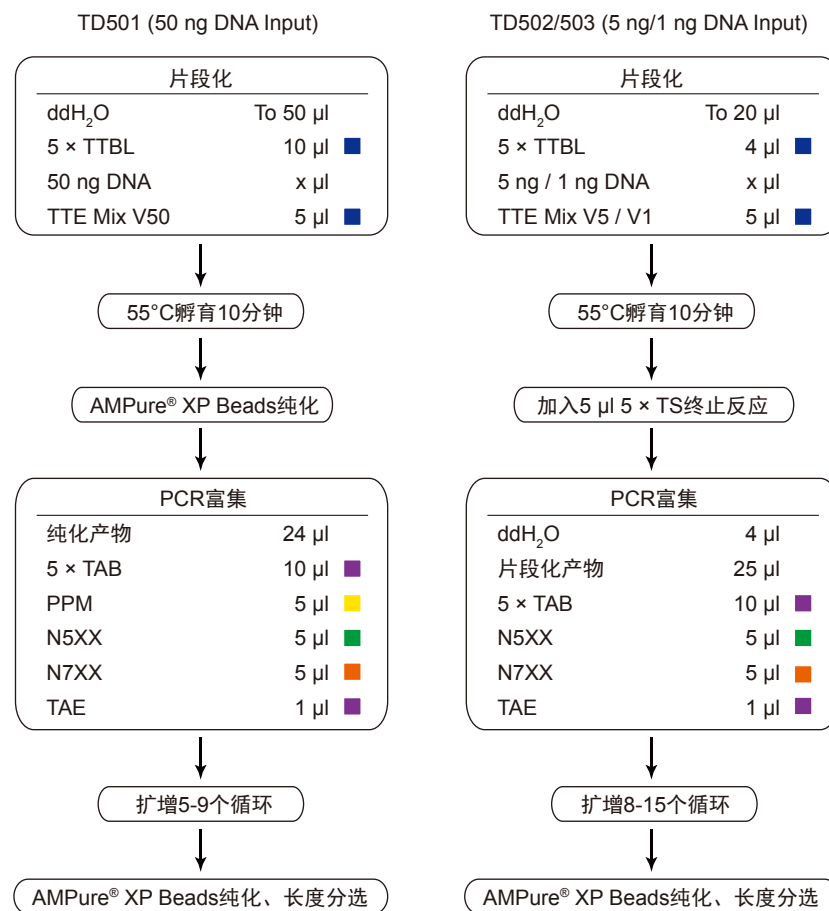


Adapter 1 and Adapter 2, two oligos embedded in TruePrep Tagment Enzyme  
 P5 and P7, two universal PCR Primers  
 N5 and N7, two index primers containing index 2 (i5) and index 1 (i7) respectively

### TruePrep™文库构建基本原理

TruePrep Tagment Enzyme Mix (TTE Mix)中包含转座酶和两种等摩尔的接头Adapter 1和Adapter 2。将该预混液与DNA混合并于55°C下孵育10分钟，即可实现DNA片段化并于末端连接接头。这种片段化产物经N5 (N5XX)和N7 (N7XX)以及P5和P7 (PCR Primer Mix, PPM)两对引物扩增、扩增产物大小分选和纯化后即可为可测序文库。

## 流程概要



## 使用方法

**起始材料:** 纯化过的DNA，溶于灭菌蒸馏水中。

### DNA浓度测定

因TTE Mix对DNA浓度非常敏感，所以准确的DNA浓度测定对实验成功与否至关重要。我们推荐您使用Qubit®或荧光染料PicoGreen®进行DNA浓度测定，请勿使用以吸光度法为基础的任何测定方法。

### DNA纯度要求

260 nm吸光度/280 nm吸光度=1.8~2.0

## 1. DNA片段化(根据试剂盒货号选择进行)

### 1-A: 50 ng起始DNA片段化(适合于使用TD501试剂盒)

- a. 于室温解冻5 × TTBL, 上下颠倒混匀后备用。  
b. 在灭菌PCR管中依次添加各反应组分:

ddH <sub>2</sub> O	To 50 μl	
5 × TTBL	10 μl	■
50 ng DNA	x μl	
TTE Mix V50	5 μl	■

- c. 使用移液器轻轻吹打20次充分混匀。(重要!)  
d. 将PCR管置于PCR仪中, 设置如下反应程序:

热盖	On, 105°C
55°C	10 Min
10°C	Hold

- e. 片段化产物使用AMPure® XP beads进行纯化:

- 涡旋震荡混匀AMPure XP beads并吸取50 μl至50 μl片段化产物中, 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。室温孵育5分钟。
- 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约5分钟)小心移走上清。
- 保持EP管始终处于磁力架中, 加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。于室温孵育30秒后小心移走上清。
- 重复步骤3, 总计漂洗两次。
- 保持EP管始终处于磁力架中, 开盖空气干燥10分钟。
- 将EP管从磁力架中取出, 加入26 μl灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约5分钟)小心吸取24 μl上清至灭菌PCR管中。

此外, 片段化产物也可使用其他磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。

- f. 立即进行步骤 2. PCR富集。

### 1-B: 5 ng起始DNA片段化(适合于使用TD502试剂盒)

- a. 于室温解冻5 × TTBL, 上下颠倒混匀后备用。确认5 × TS处于室温, 并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀, 可于37°C加热并剧烈震荡充分混匀沉淀即会溶解。  
b. 在灭菌PCR管中依次添加各反应组分:

ddH <sub>2</sub> O	To 20 μl	
5 × TTBL	4 μl	■
5 ng DNA	x μl	
TTE Mix V5	5 μl	■

- c. 使用移液器轻轻吹打20次充分混匀。(重要!)  
d. 将PCR管置于PCR仪中, 设置如下反应程序:

热盖	On, 105°C
55°C	10 Min
10°C	Hold

- e. 立即向反应产物中加入5 μl 5 × TS, 使用移液器轻轻吹打充分混匀。置于室温放置5 min。

- f. 立即进行步骤 2. PCR富集。

### 1-C: 1 ng起始DNA片段化(适合于使用TD503试剂盒)

- a. 于室温解冻5 × TTBL, 上下颠倒混匀后备用。确认5 × TS处于室温, 并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀, 可于37°C加热并剧烈震荡充分混匀沉淀即会溶解。  
b. 在灭菌PCR管中依次添加各反应组分:

ddH <sub>2</sub> O	To 20 μl	
5 × TTBL	4 μl	■
1 ng DNA	x μl	
TTE Mix V1	5 μl	■

- c. 使用移液器轻轻吹打20次充分混匀。(重要!)  
d. 将PCR管置于PCR仪中, 设置如下反应程序:

热盖	On, 105°C
55°C	10 Min
10°C	Hold

- e. 立即向反应产物中加入5 μl 5 × TS, 使用移液器轻轻吹打充分混匀。置于室温放置5 min。

- f. 立即进行步骤 2. PCR富集。

## 2. PCR富集

- a. 将灭菌PCR管置于冰浴中, 依次添加各反应组分:

试剂盒货号	TD501	TD502/TD503
ddH <sub>2</sub> O	-----	4 μl
步骤1产物	24 μl	25 μl
5 × TAB	10 μl ■	10 μl ■
PPM	5 μl ■	-----
N5XX*	5 μl ■	5 μl ■
N7XX*	5 μl ■	5 μl ■
TAE	1 μl ■	1 μl ■

\*TruePrep™ Index Kit V2 for Illumina® (Vazyme #TD202)中提供8种N5XX和12种N7XX, 可根据样品数量和Index选择策略自行选择。

- b. 使用移液器轻轻吹打充分混匀, 将PCR管置于PCR仪中进行如下反应:

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

\*72°C孵育步骤用于进行链置换反应, 请勿删除该步骤。

\*扩增循环数需根据实际情况自行选择, 选择原则如下:

起始DNA量为50 ng时(TD501), 推荐进行5-9个扩增循环;

起始DNA量为5 ng时(TD502), 推荐进行8-12个扩增循环;

起始DNA量为1 ng时(TD503), 推荐进行11-15个扩增循环。

注: 扩增循环数越少, 扩增Duplication会越低, 但文库产出也会变低; 不同循环数的扩增产物经过磁珠分选后能获得的文库总量可参阅附录。

- c. PCR反应结束后进行步骤 3. 扩增产物长度分选、纯化。

### 3. 扩增产物长度分选、纯化

推荐使用AMPure® XP beads进行长度分选和纯化。**起始PCR产物体积应为50 µl。因PCR过程中样品挥发会导致产物体积不足50 µl，进行下面操作之前必须使用灭菌蒸馏水将体积补齐至50 µl，否则分选长度会与预期不一致。**分选过程中，两轮磁珠用量(R1和R2)参见下表：

文库平均总长度	~ 350 bp	~ 450 bp	~ 550 bp
文库平均插入长度	~ 230 bp	~ 330 bp	~ 430 bp
文库总长度分布范围	250 bp - 450 bp	300 bp - 700 bp	400 bp - 900 bp
第一轮磁珠用量	R1 = 35.0 µl (0.70 ×)	R1 = 30.0 µl (0.60 ×)	R1 = 25.0 µl (0.50 ×)
第二轮磁珠用量	R2 = 7.5 µl (0.15 ×)	R2 = 7.5 µl (0.15 ×)	R2 = 7.5 µl (0.15 ×)

\*“×”数均根据PCR产物体积计算而得，如“0.60 ×”表示 $0.60 \times 50 \mu\text{l} = 30.0 \mu\text{l}$ 。

- 涡旋震荡混匀AMPure XP beads并吸取**R1体积**至50 µl PCR产物中，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。室温孵育5分钟。
- 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约5分钟)小心转移上清至干净EP管中，**丢弃磁珠**。
- 涡旋震荡混匀AMPure XP beads并吸取**R2体积**至上清中，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。室温孵育5分钟。
- 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约5分钟)**小心移除上清**。
- 保持EP管始终处于磁力架中，加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30秒后**小心移除上清**。
- 重复步骤5，总计漂洗两次。
- 保持EP管始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠10分钟。
- 将EP管从磁力架中取出，加入22 µl灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清(约5分钟)小心吸取20 µl上清至灭菌EP管中，于-20°C保存。

此外，如需获得长度分布更集中的文库，扩增产物可使用胶回收试剂盒进行片段长度分选和纯化。如对文库长度分布范围无特殊要求，扩增产物也可以不进行长度分选直接使用磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。

### 4. 文库质量检测

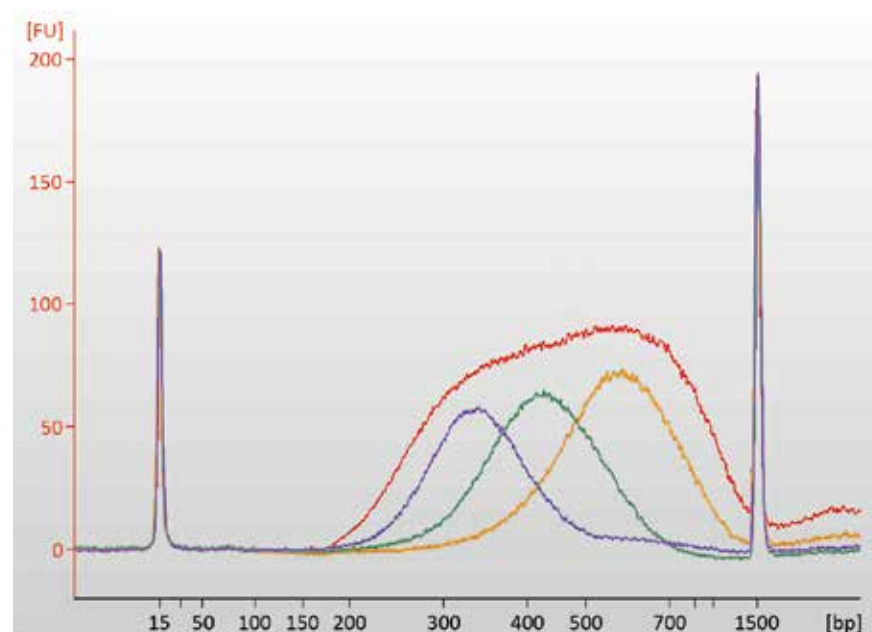
#### 文库浓度测定

为了得到高质量的测序结果，必须对文库浓度进行精确测定。我们推荐您使用Realtime PCR的方式对文库浓度进行绝对定量。此外，文库浓度还可以使用基于特异性识别双链DNA的荧光染料法进行测定(如Qubit®或荧光染料PicoGreen®)，最终使用下表推荐的近似公式换算文库的摩尔浓度。请勿使用基于吸光度测量的任何测定方法。

文库平均总长度	近似转换公式
350 bp	1 ng/µl = 4.3 nM
450 bp	1 ng/µl = 3.3 nM
550 bp	1 ng/µl = 2.7 nM

### 文库长度分布检测

将制备好的文库在Agilent 2100 Bioanalyzer上进行长度分布检测。



Agilent 2100 Bioanalyzer文库质量分析

使用TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® (TD501, PCR扩增9个循环)制备的人基因组文库。红色线：PCR产物不进行片段长度分选，直接使用1 × 磁珠纯化后得到的文库；紫色线：通过磁珠分选得到的~ 350 bp文库；绿色线：通过磁珠分选得到的~ 450 bp文库；黄色线：通过磁珠分选得到的~ 550 bp文库。

### 文库结构

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® 文库结构：

Index 2 (i5)

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC|||||TCGTCTGCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG  
ACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCACGAGAC|||||ATCTCGTATGCCGTC  
TTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

|||||: Index 2 (i5), 8 bases

|||||: Index 1 (i7), 8 bases

-NNNNNN-: 插入序列

## 测序相关

### 文库稀释和Pool

在Miseq平台上进行测序参见Illumina使用指南“Preparing DNA for MiSeq”

在HiSeq平台上进行测序参见Illumina HiSeq系统用户指南

### 填写样品信息表

在Miseq平台上进行测序参见Illumina使用指南：

“MiSeq Sample Sheet Quick Reference guide”

在HiSeq平台上进行测序参见Illumina使用指南：

“HiSeq 2500 System User Guide”

### 测序引物

TruePrep文库在Illumina测序平台上进行测序时必须使用TruePrep专用测序引物试剂盒。

可以从Vazyme订购相关产品：

单端测序(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

双端测序(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

测序时，使用R1进行Read 1测序；使用R2进行Read 2测序；使用IX1进行Index 1 (i7) 测序；如进行单端测序，使用IX2进行Index 2 (i5) 测序；如进行双端测序，使用TruSeq PE Cluster Kit中的RMX进行Index 2 (i5) 测序。

也可以从Illumina订购相关产品：

单端测序(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

双端测序(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

测序时，使用HP10进行Read 1测序；使用HP11进行Read 2测序；使用HP12进行Index 1 (i7) 测序；如进行单端测序，使用HP9进行Index 2 (i5) 测序；如进行双端测序，使用TruSeq PE Cluster Kit中的RMX进行Index 2 (i5) 测序。

## 注意事项

### A. 磁珠操作注意事项：

应将磁珠孵育至室温后再使用

每次吸取磁珠前都应将其充分混匀

DNA样品加入磁珠后应将其充分混匀

所有磁珠操作都应于室温进行

移取上清操作应在磁珠被彻底吸附后小心进行

80%乙醇应现用现配，用完丢弃

80%乙醇漂洗磁珠后应尽量吸干

磁珠在洗脱之前应充分干燥，避免乙醇残留影响后续实验

### B. 避免样品交叉污染

吸取不同样品时更换枪头

使用带滤芯的枪头

### C. 文库制备试剂分装冻存

为避免反复冻融或长期使用后活性下降，我们推荐您在首次使用后会将剩余试剂小份分装冻存。

### D. 防止PCR产物污染

因PCR产物操作不当容易产生污染，进而导致实验结果不准确、可信度不高等问题。因此，我们推荐您将PCR反应体系配制区和PCR产物纯化区进行强制性的物理隔离、使用专用的移液器等设备、并定时对各实验区域进行清洁(使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理)以保证实验结果的可信度。

## 附录

TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina® 文库产出参照表：

TD501 (50 ng DNA Input)扩增循环数：	5	6	7	8	9
TD502 (5 ng DNA Input)扩增循环数：	8	9	10	11	12
TD503 (1 ng DNA Input)扩增循环数：	11	12	13	14	15
文库产出(不进行片段长度分选, ng)：	250	400	600	1000	1500
文库产出(进行片段长度分选, ng)：	100	150	250	500	800

注：表中所述ng数为文库总质量。文库质量浓度可由该数值除以文库总体积计算而得。文库摩尔浓度可根据文库平均长度由文库质量浓度计算而得。