Library Preparation
VAHTS™ dA-Tailing Module for Illumina®

N204-01/02 Version 4.1

Vazyme™

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

VAHTS™ dA-Tailing Module for Illumina®是针对Illumina高通量测序平台文库构建定向优化而成的试剂盒。使用本试剂盒可以在1 μg – 5 μg平末端DNA的3'端进行高效加dA尾反应，从而可以有效避免后续接头连接反应中DNA片段串联子的形成。加尾产物可直接进行TA克隆或dT尾接头连接反应。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。

产品组成

组　分	N204-01 (24 rxn)	N204-02 (96 rxn)	
DNA polymerase I Klenow fragment exo⁻	72 μl	288 μl	■
VAHTS dA-Tailing Reaction Buffer (10 ×)	120 μl	480 μl	■

贮存及有效期

所有组分-20°C保存，有效期一年。

适用范围

可在1 μg – 5 μg平末端DNA的3'端进行高效加dA尾反应，适用于Illumina高通量测序平台文库构建。

使用方法

实验材料：1 μg – 5 μg平末端DNA (100-1000 bp，≤42μl)

1. 在灭菌PCR管中配制如下反应：

VAHTS dA-Tailing Reaction Buffer (10 ×)	5	μl	■
DNA polymerase I Klenow fragment exo⁻	3	μl	■
纯化后的末端修复产物	x	μl	
ddH_2O	To 50	μl	

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

3. 将反应管置于PCR仪中，进行下述反应：

热盖On, 105°C
37 °C, 30 min

4. 加尾产物纯化。

质量控制

DNA polymerase I Klenow fragment exo $^-$

SDS-PAGE纯度：纯度＞95%。

核酸内切酶残留：50 μl反应体系中加入10 μl本酶和1 μg φX174 RF I DNA，37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测，RF II转化比率＜10%。

磷酸酶活性检测：在磷酸酶活性检测缓冲液中加入10 μl本酶和2.5 mM对硝基苯磷酸，37°C下孵育4小时。经光谱测定法检测，405 nm处无对硝基苯阴离子特征吸收峰。

RNase活性残留：在1 μl本酶中加入40 ng FAM-RNA，37°C下孵育16小时。经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，条带无降解。

外切酶活性检测：50 μl反应体系中加入40 μl本酶和1 μg [^{3}H] DNA (105 cpm/μg)，37°C下孵育4小时。经同位素测定，放射强度释放量＜0.1%。

3'→5'外切酶活性检测：50 μl反应体系中加入10 μl本酶和10 nM 5'-FAM标记的寡核苷酸，37°C下孵育30分钟。经毛细管电泳检测，无3'→5'降解产物可见。

功能性活性检测：37°C下孵育30分钟，1 μl本酶可使50 nmol的dNTP掺入酸不溶性沉淀物。

VAHTS dA-Tailing Reaction Buffer (10 ×)

16小时孵育检测：50 μl反应体系中包含1 × dA-Tailing Reaction Buffer和1 μg HindIII-λDNA，37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测，条带无降解；50 μl反应体系中包含1 × dA-Tailing Reaction Buffer和1 μg T3 DNA，37°C下孵育16小时。经琼脂糖凝胶电泳检测，条带无降解。

核酸内切酶残留：50 μl反应体系中包含1 × dA-Tailing Reaction Buffer和1 μg φX174 RF I DNA，37°C下孵育4小时。经琼脂糖凝胶电泳检测，RF II转化比率＜10%。

RNase活性残留：在1 × dA-Tailing Reaction Buffer中加入40 ng FAM-RNA，37°C下孵育16小时。经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，条带无降解。

磷酸酶活性检测：在磷酸酶活性检测缓冲液中加入1 × dA-Tailing Reaction Buffer和2.5 mM对硝基苯磷酸，37°C下孵育4小时。经光谱测定法检测，405 nm处无对硝基苯阴离子特征吸收峰。

VAHTS™ dA-Tailing Module for Illumina®

所有批次均进行DNA文库构建并在Illumina测序平台上进行测序验证。