

**TruePrep<sup>®</sup> DNA Library Prep  
Kit V2 for Illumina**

**TD501-TD503**



---

**使用说明书**

Version 20.1

# 目录 Contents










01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	03
06/注意事项	03
07/样品准备	03
08/实验原理与流程概要	04
09/实验流程	05
09-1/DNA片段化	05
09-2/PCR富集	07
09-3/扩增产物长度分选	08
09-4/文库质量检测	09
10/常见问题与解决方案	10

\*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

## 01/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样品制备成Illumina高通量测序平台专用的测序文库。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，显著降低了起始模板的投入量并缩短了文库构建时间。该试剂盒共有三种规格，分别适用于起始模板DNA投入量为50 ng、5 ng和1 ng的反应，使用者可根据实验类型自由选择。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。

## 02/产品组分

货号	TD501-01/02	TD502-01/02	TD503-01/02
规格	24/96 rxns	24/96 rxns	24/96 rxns
起始DNA量	50 ng	5 ng	1 ng
 TTE Mix V50	120/480 $\mu$ l	-----	-----
 TTE Mix V5	-----	120/480 $\mu$ l	-----
 TTE Mix V1	-----	-----	120/480 $\mu$ l
 5 $\times$ TTBL	240/960 $\mu$ l	96/384 $\mu$ l	96/384 $\mu$ l
 5 $\times$ TS	-----	120/480 $\mu$ l	120/480 $\mu$ l
 PPM	120/480 $\mu$ l	-----	-----
 TAE	24/96 $\mu$ l	24/96 $\mu$ l	24/96 $\mu$ l
 5 $\times$ TAB	240/960 $\mu$ l	240/960 $\mu$ l	240/960 $\mu$ l
 Control DNA	10/10 $\mu$ l	10/10 $\mu$ l	10/10 $\mu$ l

▲产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色。

▲TTE = TruePrep Tagment Enzyme，转座酶；TTBL = TruePrep Tagment Buffer L，转座酶反应缓冲液；TS = Terminate Solution，终止反应缓冲液；PPM = PCR Primer Mix，引物混合液；TAE = TruePrep Amplify Enzyme，聚合酶；TAB = TruePrep Amplify Buffer，聚合反应缓冲液。

▲Control DNA (Mouse Genomic DNA, 50 ng/ $\mu$ l)，小鼠核酸对照品。

## 03/保存条件

TD501: -30 ~ -15 $^{\circ}$ C保存， $\leq$ 0 $^{\circ}$ C运输；

TD502: 5  $\times$  TS，15 ~ 25 $^{\circ}$ C保存，其余组分，-30 ~ -15 $^{\circ}$ C保存； $\leq$ 0 $^{\circ}$ C运输；

TD503: 5  $\times$  TS，15 ~ 25 $^{\circ}$ C保存，其余组分，-30 ~ -15 $^{\circ}$ C保存； $\leq$ 0 $^{\circ}$ C运输。

## 04/适用范围

本产品适用于将纯化的DNA样品制备成Illumina高通量测序平台专用文库。

▲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。推荐在制备PCR产物时将待测区域两端各延长50 - 100 bp，以避免出现末端测序覆盖度降低的情况。

## 05/自备材料

VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme #N411) ;  
 磁力架;  
 PCR热循环仪;  
 低吸附EP管、PCR管;  
 无水乙醇;  
 灭菌超纯水;  
 TruePrep Index Kit V2 for Illumina (Vazyme #TD202) ;  
 或TruePrep Index Kit V3 for Illumina (Vazyme #TD203) 。

## 06/注意事项

### 1. 磁珠操作注意事项:

使用前将磁珠平衡至室温，所有磁珠操作都应于室温进行，切勿将磁珠置于-20°C冻存；  
 每次吸取磁珠前都应涡旋振荡充分混匀，DNA样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀；  
 移取上清时应在磁珠被彻底吸附后小心进行，避免吸到磁珠而影响后续实验；  
 80%乙醇应现配现用，漂洗磁珠后应尽量吸干残留乙醇；  
 磁珠在洗脱前应充分干燥（表面由光亮褐色变为磨砂褐色），以免乙醇残留影响后续实验，但也需避免磁珠过分干燥开裂而影响DNA样品洗脱效率。

### 2. 样品交叉污染注意事项:

吸取不同样品时应更换枪头；  
 使用带滤芯的枪头。

### 3. PCR产物污染注意事项:

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；  
 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)。

### 4. 试剂使用注意事项:

试剂应避免反复冻融，首次使用后将剩余试剂小份分装冻存。

## 07/样品准备

### 1. 起始材料:

纯化过的DNA，溶于灭菌超纯水中。

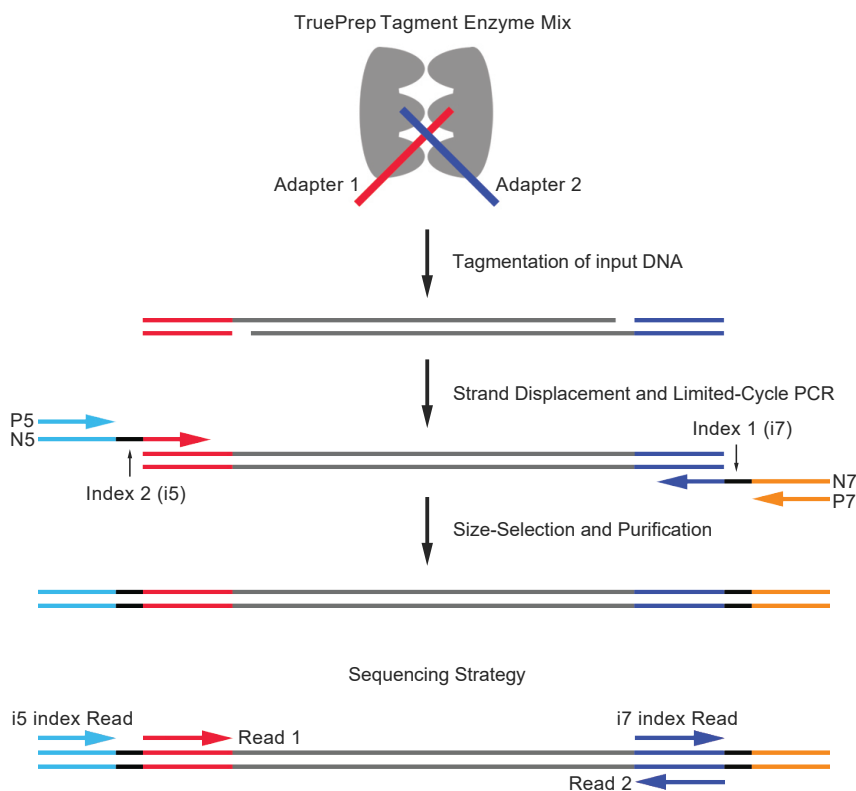
### 2. DNA浓度测定:

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。  
 推荐使用Qubit或荧光染料PicoGreen对DNA样品进行浓度测定，请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法。

### 3. DNA纯度要求:

$A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$

## 08/实验原理与流程概要



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，55°C下孵育10 min，即可实现DNA片段化的同时末端接上接头。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。

### 文库结构

Index 2 (i5)

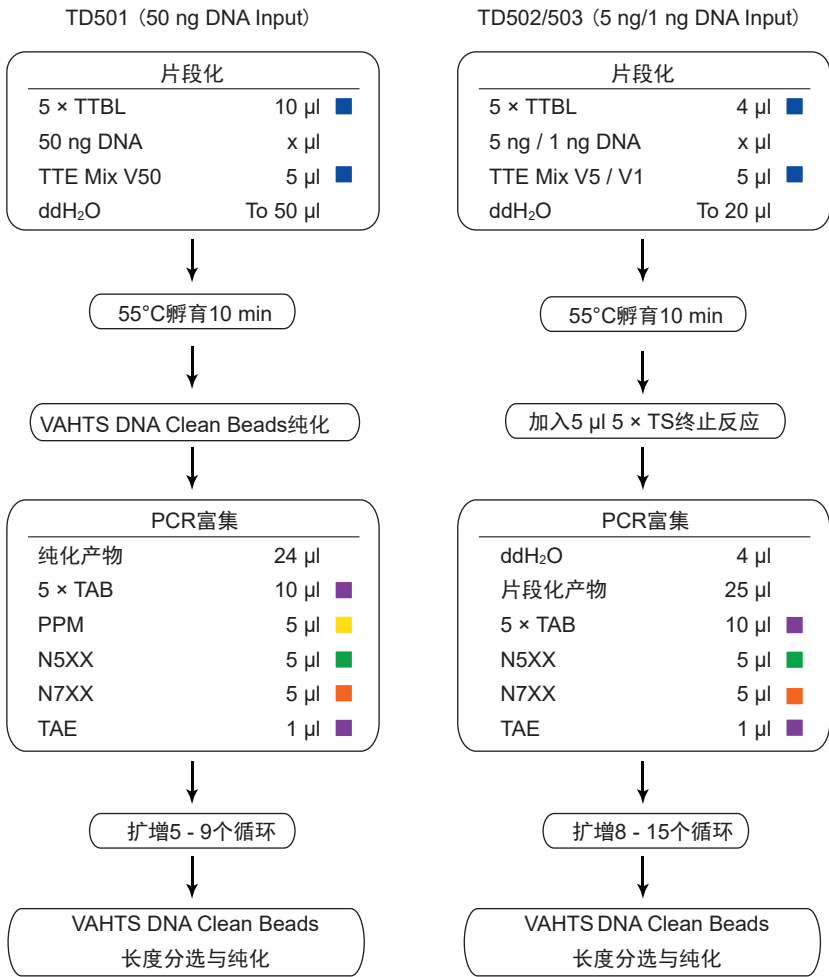
5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC||||||TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG  
ACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCACGAGAC||||||ATCTCGTATGCCGT  
TTCTGCTTG-3'

Index 1 (i7)

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

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

-NNNNNN-: 插入序列



## 09/实验流程

请在实验前仔细阅读本操作说明，本说明书适用于三种规格的试剂盒，分别对应起始模板DNA投入量为50 ng、5 ng和1 ng的反应。三种规格试剂盒中某些组分有差异，相应的反应体系有细微差别，实验操作过程中不可混用，以免造成不必要的浪费或者实验进度的耽误！

### 09-1/DNA片段化(根据试剂盒货号选择合适的方案)

#### 1-A: 50 ng起始DNA片段化(适用于试剂盒TD501)

1. 室温解冻5 × TTBL，上下颠倒混匀后备用。确认5 × TS是否处于室温，并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀，37°C加热并涡旋振荡混匀，沉淀即可溶解。

## 2. 在灭菌PCR管中配制如下反应体系：

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

3. 使用移液器轻轻吹打20次充分混匀。(重要!)

4. 将反应管置于PCR仪中，运行如下反应程序：

温度	时间
105°C	热盖
55°C	10 min
10°C	Hold

▲反应完成后应立即进行产物纯化，否则DNA样品将过度片段化，导致最终文库片段变小。

## 5. 片段化产物使用VAHTS DNA Clean Beads进行纯化

- ① 涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads并吸取50 μl至50 μl片段化产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀，室温孵育5 min。
- ② 将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后(约5 min)小心移除上清。
- ③ 保持反应管始终处于磁力架上，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
- ④ 重复步骤③，总计漂洗两次。
- ⑤ 保持反应管始终处于磁力架上，开盖空气干燥约5 min。
- ⑥ 将反应管从磁力架上取出，加入26 μl灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀，室温孵育5 min。
- ⑦ 将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后(约5 min)小心吸取24 μl上清至新的灭菌PCR管中。

▲除此之外，片段化产物也可使用其他磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。

## 6. 立即进行步骤 09-2/PCR富集。

### 1-B: 5 ng起始DNA片段化(适用于试剂盒TD502)

1. 室温解冻5 × TTBL，上下颠倒混匀后备用。确认5 × TS是否处于室温，并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀，37°C加热并涡旋振荡混匀，沉淀即可溶解。
2. 在灭菌PCR管中配制如下反应体系：

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

3. 使用移液器轻轻吹打20次充分混匀。(重要!)

4. 将反应管置于PCR仪中，运行如下反应程序：

温度	时间
105°C	热盖
55°C	10 min
10°C	Hold

5. 反应完成后立即向产物中加入5  $\mu$ l 5  $\times$  TS，使用移液器轻轻吹打充分混匀，置于室温放置5 min。

▲反应完成后应立即加入 5  $\times$  TS 终止反应，否则DNA样品将过度片段化，导致最终文库片段变小。

6. 立即进行步骤 09-2/PCR富集。

1-C: 1 ng起始DNA片段化(适用于试剂盒TD503)

1. 室温解冻5  $\times$  TTBL，上下颠倒混匀后备用。确认5  $\times$  TS是否处于室温，并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀，37°C加热并涡旋振荡充分混匀，沉淀即可溶解。

2. 在灭菌PCR管中配制如下反应体系：

组分	体积
5 $\times$ TTBL	4 $\mu$ l <span style="color:blue">■</span>
1 ng DNA	x $\mu$ l
TTE Mix V1	5 $\mu$ l <span style="color:blue">■</span>
ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ l

3. 使用移液器轻轻吹打20次充分混匀。(重要!)

4. 将反应管置于PCR仪中，运行如下反应程序：

温度	时间
105°C	热盖
55°C	10 min
10°C	Hold

5. 反应完成后立即向产物中加入5  $\mu$ l 5  $\times$  TS，使用移液器轻轻吹打充分混匀，置于室温放置5 min。

▲反应完成后应立即加入 5  $\times$  TS 终止反应，否则DNA样品将过度片段化，导致最终文库片段变小。

6. 立即进行步骤 09-2/PCR富集。

09-2/PCR富集

1. 将PCR管置于冰上，配制如下反应体系：

试剂盒货号	TD501	TD502/TD503
ddH <sub>2</sub> O	-----	4 $\mu$ l
步骤09-1产物	24 $\mu$ l	25 $\mu$ l
5 $\times$ TAB	10 $\mu$ l <span style="color:purple">■</span>	10 $\mu$ l <span style="color:purple">■</span>
PPM	5 $\mu$ l <span style="color:yellow">■</span>	-----
N5XX*	5 $\mu$ l <span style="color:green">■</span>	5 $\mu$ l <span style="color:green">■</span>
N7XX*	5 $\mu$ l <span style="color:orange">■</span>	5 $\mu$ l <span style="color:orange">■</span>
TAE	1 $\mu$ l <span style="color:purple">■</span>	1 $\mu$ l <span style="color:purple">■</span>

\*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搭配策略自行选择。



2. 使用移液器轻轻吹打充分混匀，将反应管置于PCR仪中，运行如下反应程序：

温度	时间	循环数
105°C	热盖	
72°C*	3 min	
98°C	30 sec	
98°C	15 sec	5 - 15
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	适用试剂盒	参考循环数
50 ng	TD501	5 - 9
5 ng	TD502	8 - 12
1 ng	TD503	11 - 15

▲扩增循环数越少，扩增Duplication越低，但文库产量也相应降低；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考步骤 09-4/文库质量检测。

3. PCR反应结束后进行步骤 09-3/扩增产物长度分选。

### 09-3/扩增产物长度分选

推荐使用VAHTS DNA Clean Beads对扩增产物进行长度分选，使用前请将磁珠平衡至室温并涡旋振荡充分混匀。

▲初始PCR产物体积为50 μl，因PCR过程中样品蒸发导致产物体积不足50 μl。进行分选操作前必须使用灭菌蒸馏水将体积补齐至50 μl，否则分选片段的长度可能与预期不一致。

扩增产物长度分选中两轮磁珠的使用量 (R1和R2) 参见下表：

文库平均总长度	约 350 bp	约 450 bp	约 550 bp
文库平均插入长度	约 230 bp	约 330 bp	约 430 bp
文库总长度分布范围	250 - 450 bp	300 - 700 bp	400 - 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 ×)

▲磁珠用量是依据PCR产物初始体积计算而得，如使用“0.60 ×”进行分选，则R1：0.60 × 50 μl = 30.0 μl，R2：0.15 × 50 μl = 7.5 μl

1. 涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads并吸取R1体积至50 μl PCR产物中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀，室温孵育5 min。

▲磁珠比较粘稠，请准确移取相应的体积，否则可能导致分选片段的长度与预期不一致。

2. 将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后(约5 min)小心转移上清至新的灭菌PCR管中，丢弃磁珠。

3. 涡旋振荡混匀VAHTS DNA Clean Beads并吸取R2体积至上清中，涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀，室温孵育5 min。

4. 将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后(约5 min)小心移除上清。
5. 保持反应管始终处于磁力架上，加入200  $\mu\text{l}$ 新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育30 sec，小心移除上清。
6. 重复步骤5，总计漂洗两次。
7. 保持反应管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠约5 min。
8. 将反应管从磁力架上取出，加入22  $\mu\text{l}$ 灭菌超纯水洗脱。涡旋振荡或使用移液器吹打10次充分混匀，室温孵育5 min。
9. 将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后(约5 min)小心吸取20  $\mu\text{l}$ 上清至新的灭菌PCR管中， $-20^{\circ}\text{C}$ 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，扩增产物也可不进行长度分选直接使用磁珠或柱纯化试剂盒进行纯化。

## 09-4/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。推荐使用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。请勿使用任何基于吸光度测量为基础的方法。

文库平均总长度	近似转换公式
350 bp	1 ng/ $\mu\text{l}$ = 4.3 nM
450 bp	1 ng/ $\mu\text{l}$ = 3.3 nM
550 bp	1 ng/ $\mu\text{l}$ = 2.7 nM

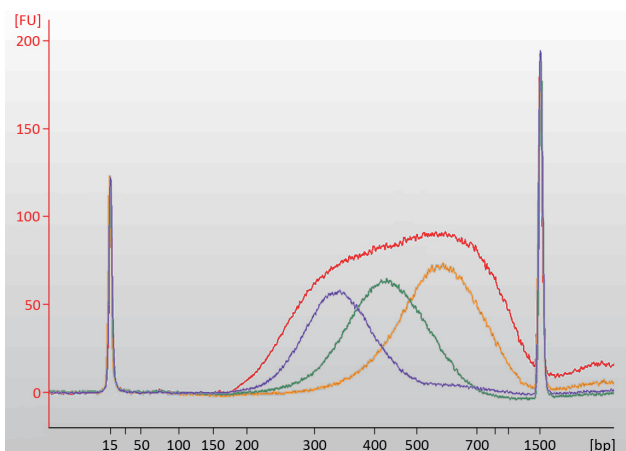
TruePrep DNA Library Prep Kit V2 for Illumina 文库产出参照表:

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	1,000	1,500
文库产出(进行片段长度分选, ng):	100	150	250	500	800

▲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终体积计算而得。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。

### 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约350 bp文库；绿色线：通过磁珠分选得到的约450 bp文库；黄色线：通过磁珠分选得到的约550 bp文库。

## 10/常见问题与解决方案

### ◇ 该试剂盒是否包含打断步骤？

答：包含。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，显著缩短了实验耗时。

### ◇ TruePrep系列试剂盒利用转座酶打断DNA是否存在偏好性？

答：转座酶打断时存在一定的偏好性，但测试表明其并不影响测序结果及数据分析。

### ◇ 可否采用TD502或TD503构建50 ng起始的DNA文库？

答：不推荐这么做，TD501、TD502、TD503分别对应的模板投入量为50 ng、5 ng 和1 ng，相应试剂盒中酶的浓度不同。如采用TD502或TD503构建50 ng起始的DNA文库，将使模板DNA片段化不完全或者大小偏大，导致最终的文库与预期相差较远。因此强烈建议根据实际DNA起始量选择相应规格的产品。

### ◇ 使用TD501/502/503构建DNA文库时，55°C反应10 min后是否不用磁珠纯化或TS溶液终止反应，而直接进行PCR文库扩增？

答：请按照说明书流程进行纯化或终止反应，否则片段化反应不能有效终止，可能导致最终的文库总长度与预期相比偏小、文库质量较差等。

### ◇ TruePrep系列能提供多少index组合？

答：最多提供384种index组合。其中TruePrep Index Kit V2 for Illumina (Vazyme #TD202) 包含8种N5XX和12种N7XX，可提供96种index组合；TruePrep Index Kit V3 for Illumina (Vazyme #TD203) 包含16种N6XX以及24种N8XX，可提供384种index组合。



**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)

