

Version 2

Code No. AG12518 / AG12519
AG12520 / AG12521
AG12522 / AG12523
AG12524 / AG12525

AccuNext 快速 DNA 文库制备试剂盒 (Illumina)

AccuNext Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.





目录

➤ 产品概述.....	1
➤ 产品组成.....	1
➤ 保存及运输.....	2
➤ 产品优势.....	2
➤ 实验原理及流程.....	2
➤ 实验注意事项.....	4
➤ 实验前准备.....	6
➤ 操作方法.....	6
A. DNA 片段化.....	6
B. PCR 文库富集.....	7
C. 文库纯化.....	8
D. 文库分选.....	9
E. 文库质量检测.....	10
➤ 实验例.....	11
➤ 产品注意事项.....	11

➤ 产品概述

本产品是针对 illumina 高通量测序平台定向开发的转座酶法建库试剂盒，可以从纯化后的 1 ng ~ 100 ng DNA 样本制备成测序文库。本产品采用新型转座酶及优化的 Buffer 体系，仅需 10 min 即可完成 DNA 片段化与接头连接，与传统文库制备方法相比，更加简单方便，无需进行繁琐的 DNA 片段化、末端修复和接头连接反应等步骤，显著缩短了文库构建的时间。由于 Transposome Mix 对 DNA 加入量非常敏感，所以准确的 DNA 加入量对实验成功与否至关重要。因此，本产品对 Transposome Mix 与 DNA 的用量关系经过了优化，研发出 4 种不同模板起始量的试剂盒，适用于不同 DNA 模板加入量，分别为 100 ng (Code No. AG12518 / AG12519)、50 ng (Code No. AG12520 / AG12521)、5 ng (Code No. AG12522 / AG12523)、1 ng (Code No. AG12524 / AG12525)，可根据需要进行选择。

本产品的反应体系经过了精心优化，实验中所有试剂请使用本产品中提供的，不建议改变任何反应组分的用量及浓度或用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不好的结果。如需替换，请先进行验证。

➤ 产品组成^{°c}

AG12518 / AG12519 组分 (100 ng 的 DNA 模板量)

组分名称	AG12518 (12 rxns)	AG12519 (48 rxns)
<i>AccuNext</i> Transposome Mix V100 ^a	12 μl	48 μl
5X Tn5 Reaction Buffer ^{°b}	48 μl	192 μl
5X Stop Buffer ^{°b}	60 μl	240 μl
<i>AccuNext</i> PCR Mix ^{°b}	324 μl	1.3 ml

AG12520 / AG12521 组分 (50 ng 的 DNA 模板量)

组分名称	AG12520 (12 rxns)	AG12521 (48 rxns)
<i>AccuNext</i> Transposome Mix V50 ^a	12 μl	48 μl
5X Tn5 Reaction Buffer ^{°b}	48 μl	192 μl
5X Stop Buffer ^{°b}	60 μl	240 μl
<i>AccuNext</i> PCR Mix ^{°b}	324 μl	1.3 ml

AG12522 / AG12523 组分 (5 ng 的 DNA 模板量)

组分名称	AG12522 (12 rxns)	AG12523 (48 rxns)
<i>AccuNext</i> Transposome Mix V5 ^a	12 μl	48 μl
5X Tn5 Reaction Buffer ^{°b}	48 μl	192 μl
5X Stop Buffer ^{°b}	60 μl	240 μl
<i>AccuNext</i> PCR Mix ^{°b}	324 μl	1.3 ml

AG12524 / AG12525 组分 (1 ng 的 DNA 模板量)

组分名称	AG12524 (12 rxns)	AG12525 (48 rxns)
<i>AccuNext</i> Transposome Mix V1 ^a	12 μ l	48 μ l
5X Tn5 Reaction Buffer ^b	48 μ l	192 μ l
5X Stop Buffer ^b	60 μ l	240 μ l
<i>AccuNext</i> PCR Mix ^b	324 μ l	1.3 ml

*a: *AccuNext* Transposome Mix V100、V50、V5、V1 需保存于 -80°C ；分别适用于 100 ng、50 ng、50 ng、1 ng 的 DNA 模板量，请勿调整模板加入量。

*b: 5X Tn5 Reaction Buffer、5X Stop Buffer 和 *AccuNext* PCR Mix 可保存于 -80°C ，也可保存于 -20°C 。

*c: PCR 扩增用的 illumina 测序接头引物是实验必须的，但本产品中未配置，需要单独购买。
 【例如，可使用 *AccuNext* 转座体建库适配接头引物 (Illumina) (Code No. AG12532、AG12533、AG12534) 】。

➤ 保存及运输

保存温度： -80°C 保存

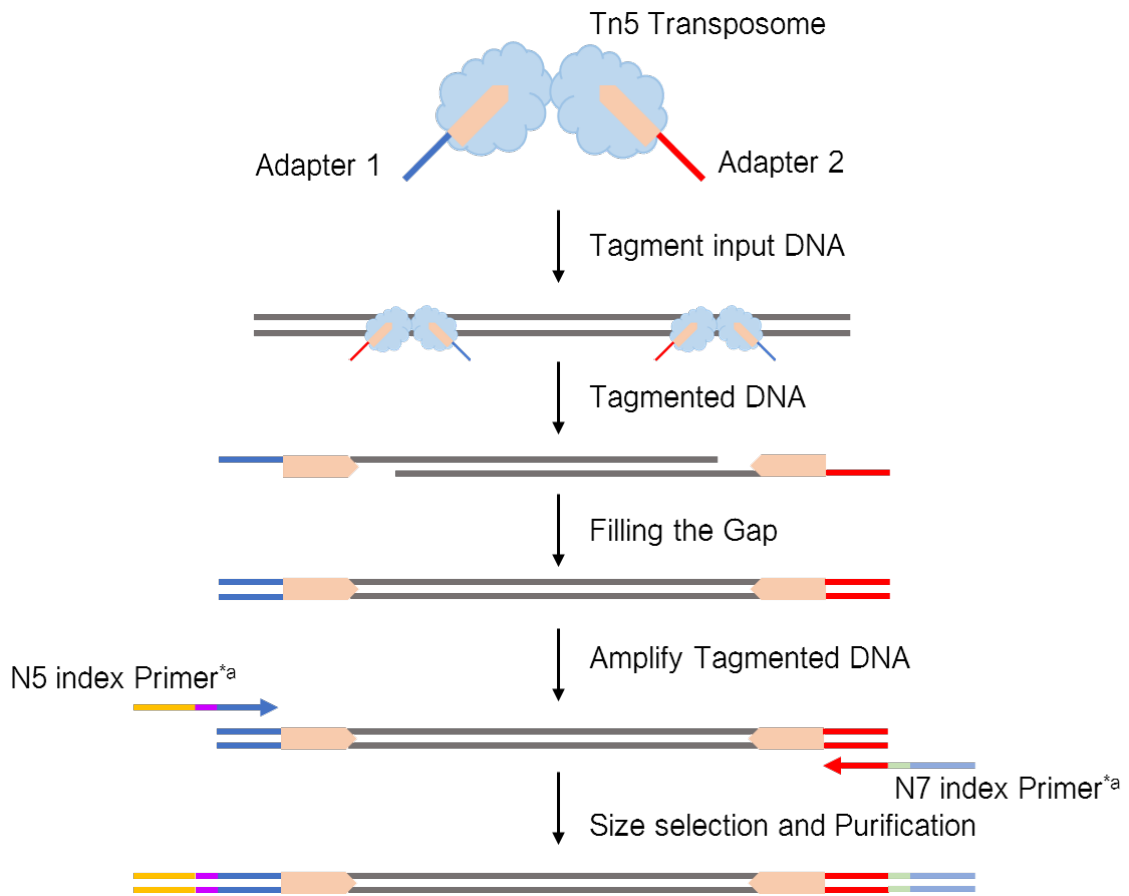
运输温度：干冰运输

➤ 产品优势

1. 采用新型转座酶和优化的反应体系，仅需 10 min 即可完成 DNA 片段化和接头连接步骤，显著缩短建库时间，可在 1.5 小时以内完成文库构建，且文库质量优异。
2. 操作简单，单管的酶促反应，即可完成片段化与加接头，无需机械打断。
3. DNA 模板加入量较低，可做到低至 1 ng 的 DNA 模板。
4. 模板适用性广，设计了 4 种不同模板量的产品 (100 ng / 50 ng / 5 ng / 1 ng) ，可根据需要进行选择。

➤ 实验原理及流程

AccuNext Transposome Mix 是由转座酶和两种接头 Adapter 1 和 Adapter 2 构成一个完整的转座体。转座发生时，该转座体将 Adapter 1 和 Adapter 2 接头序列插入靶基因中，形成一端带有 Adapter 1，一端带有 Adapter 2 的 DNA，之后利用 DNA 聚合酶将转座形成的切口补齐。使用 illumina 测序接头引物 N5 index Primer 和 N7 index Primer 对加上接头的 DNA 片段进行扩增，经纯化和分选后即获得测序文库。图 1 是原理过程，图 2 是最终获得的文库结构。



*a: N5 / N7 index Primer 可使用 *AccuNext* 转座体建库适配接头引物 (Illumina) (Code No. AG12532、AG12533、AG12534)。

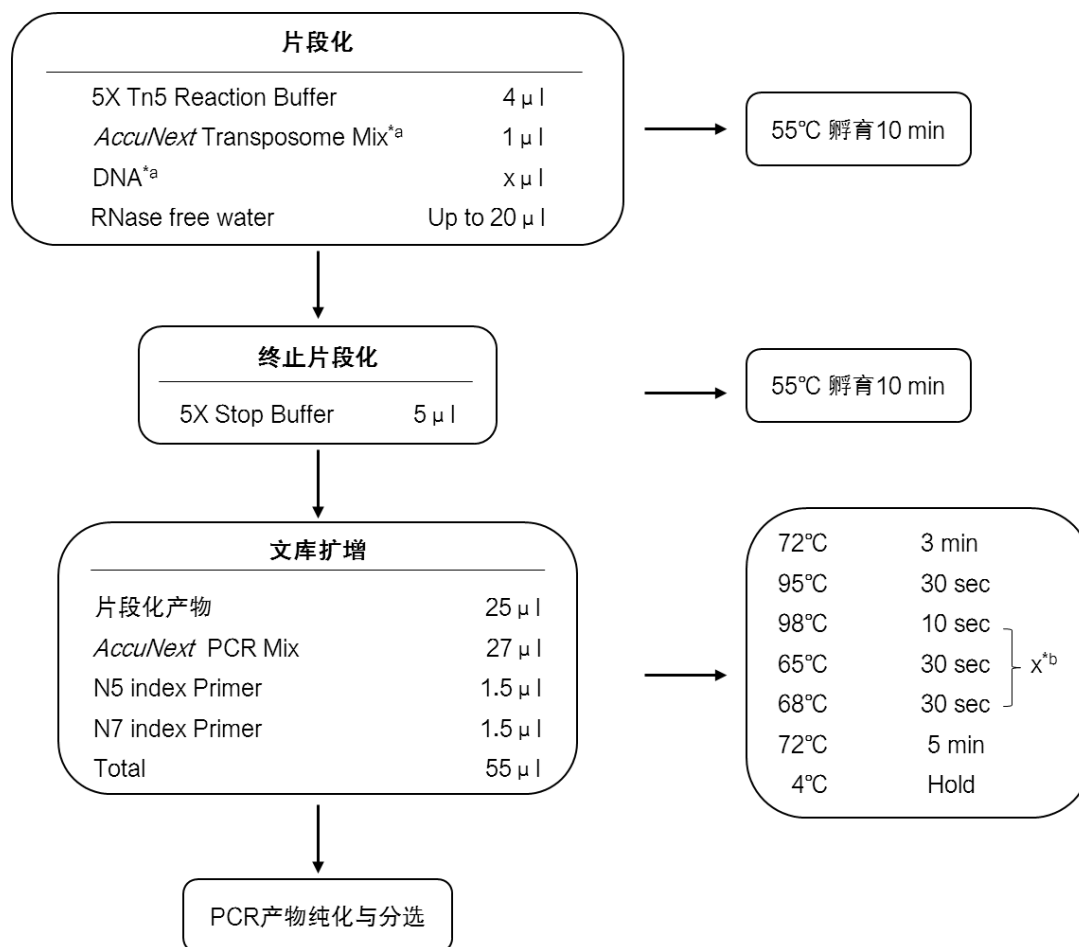
图 1 试剂盒原理

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-**i5 index**-TCGTCCGGCAGCGTCAG
 ATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGA
 GAC-**i7 index**-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG- 3'

注: -NNNNNN-: 表示插入序列。



图 2. 文库结构



*a: *AccuNext* Transposome Mix 与 DNA 的加入量对应关系: *AccuNext* Transposome Mix V100 / V50 / V5 / V1, 分别对应 DNA 量为 100 ng / 50 ng / 5 ng / 1 ng。

*b: X 表示扩增循环数, 需要根据投入的模板量进行调整, 可参考<表 1. PCR 循环数推荐表>。

图 3. 实验操作流程

► 实验注意事项

1. 操作过程

- ❖ 实验过程中, 要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 DNA 被污染或降解。
- ❖ 本产品中的试剂, 应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中, 避免试剂被污染。
- ❖ 耗材方面, 使用无菌无酶的耗材, 为避免样品交叉污染, 推荐使用带滤芯的枪头, 吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区: 试剂配制区 (建议设置正向气流)、模板添加区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
 - 1) 在试剂配制区进行以下操作: 片段化试剂配制、PCR 扩增试剂配制;
 - 2) 在模板添加区加入模板;

- 3) 在 PCR 扩增区进行扩增;
 - 4) 产物纯化区进行磁珠纯化;
 - 5) 在电泳检测区进行检测。
- ❖ 实验过程中要避免讲话, 每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁 (70%酒精)。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖, 避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套, 建议更换手套; 若喷洒至桌面, 立即用水或 70%的酒精擦拭。
 - ❖ 每次实验, 建议设置阴性对照 (不加 DNA 模板) 实验, 确认实验是否有污染。

2. DNA 样本

- ❖ 本产品适用 4 种 (100 ng / 50 ng / 5 ng / 1 ng) 纯化后的 DNA 样本; 由于 *AccuNext* Transposome Mix 对 DNA 用量比较敏感, 请根据试剂盒选择合适的模板量。同时, 投入的 DNA 浓度测定, 建议使用基于荧光染料的方法 (如 Qubit、PicoGreen 等), 请勿使用基于吸光度检测的方法, 以免 DNA 浓度偏差较大, 影响文库构建。
- ❖ 使用高纯度 DNA 进行反应, 防止 DNA 模板中残留蛋白质、有机溶剂和盐等影响反应中酶的活性, 降低反应性能。
- ❖ 当使用 PCR 产物进行建库时, 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末端各延长 50 ~ 100 bp, 以避免出现末端测序覆盖度降低的情况。

3. 文库扩增

- ❖ 下表 1 为推荐的文库扩增循环数, 实验前建议对循环数进行摸索, 在满足文库产量的前提下, 尽量选用少的循环数, 确保得到高质量文库。

表 1. PCR 循环数推荐表

起始 DNA 量	推荐循环数	1 μg 文库产量	500 ng 文库产量
100 ng	6 ~ 12	10	7
50 ng	6 ~ 12	10	8
5 ng	11 ~ 15	13	11
1 ng	12 ~ 16	16	14

4. 纯化及分选时磁珠的使用

- ❖ 磁珠使用前应先平衡至室温, 否则会导致回收率下降、分选效果不佳。
- ❖ 磁珠使用前应当充分振荡混匀, DNA 样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀。
- ❖ 吸取上清时, 应避免吸到磁珠, 进而影响文库质量。
- ❖ 80%乙醇应现用现配, 否则将影响回收。

- ❖ 磁珠室温干燥时，80%乙醇干燥不充分会影响后续反应，干燥过度又会导致磁珠开裂进而降低产物回收率。

5. 文库质检

- ❖ 文库浓度检测：推荐使用 qPCR 绝对定量的方法，对文库精确定量，也可以使用其他基于荧光染料的方法，如 Qubit、PicoGreen 等，请勿使用任何基于吸光度检测的方法。
- ❖ 文库大小检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行文库长度分布检测。

➤ 实验前准备

1. 样本准备：

- 1) 高纯度的 DNA ($A_{260} / A_{280} = 1.8 \sim 2.0$)，最好溶于 RNase free water 中。
- 2) 由于 *AccuNext* Transposome Mix 对 DNA 浓度非常敏感，需要使用基于双链 DNA 荧光染料的方法测定（如 Qubit、PicoGreen 等进行定量），请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法。

2. 试剂&耗材

- 1) 磁珠纯化：公司产品 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546、AG12547、AG12548) 或其他等效产品【如 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 】。
- 2) 文库质控：High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 及 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Code No. Q32854) 或其他等效产品。
- 3) illumina 测序接头引物：*AccuNext* 转座体建库适配接头引物 (Illumina) (Code No. AG12532、AG12533、AG12534) 或其他等效产品。
- 4) 其他材料：RNase free water、80%乙醇，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管和低吸附 tube 管 (如 Eppendorf, Code No. 022431021, 或其他等效产品)等。

3. 仪器：

- 1) PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液枪、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

➤ 操作方法

A. DNA 片段化

- ✚ 将所需用的试剂在冰上解冻。融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。其中 *AccuNext* Transposome Mix 用移液枪轻柔吹打混匀，请勿涡旋。其余试剂可轻柔涡旋混匀。

1. 在冰上配制片段化反应液：

组分	反应体系
5X Tn5 Reaction Buffer	4 μ l
<i>AccuNext</i> Transposome Mix ^{*a}	1 μ l
DNA ^{*a}	x μ l
RNase free water	Up to 20 μ l

*a: *AccuNext* Transposome Mix 与 DNA 的加入量对应关系：*AccuNext* Transposome Mix V100 / V50 / V5 / V1，分别对应 DNA 加入量为 100 ng / 50 ng / 5 ng / 1 ng。严格按照推荐的 DNA 加入量加入 DNA 模板，不可调整 DNA 用量。DNA 建议用 RNase free water 稀释。

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀 10 次，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行片段化反应。

3. 在 PCR 仪中运行以下程序（**提前设置反应程序**）：

温度	时间
55°C	10 min
4°C	Hold

4. 反应结束后，立即加入 5 μ l 5X Stop Buffer，使用移液枪轻轻吹打充分混匀，短暂离心，放入 PCR 仪中，终止片段化反应：

温度	时间
55°C	10 min
4°C	Hold

（**注意**：片段化反应结束后，应立即加入 5 μ l 5X Stop Buffer，避免 DNA 样品过度片段化，导致最终文库片段偏小。）

5. 反应结束后，**立即**进行步骤<**B. PCR 文库富集**>。

B. PCR 文库富集

1. 冰上融化 *AccuNext* PCR Mix，用移液枪轻柔吹打混匀，离心后放置于冰上。

2. 按下表在冰上配制 PCR 反应体系：

组分	体积
上述 DNA 片段化产物	25 μ l
<i>AccuNext</i> PCR Mix	27 μ l
N5 index Primer ^{*a}	1.5 μ l
N7 index Primer ^{*a}	1.5 μ l
Total	55 μ l

*a: N5 / N7 index Primer 可使用 *AccuNext* 转座体建库适配接头引物 (Illumina) (Code No. AG12532、AG12533、AG12534)。

*b: 可在片段化过程中, 在冰上将这 3 个组分配制成预混液, 用移液枪轻柔吸打混匀, 待片段化结束, 取 30 μ l 预混液加入至上述片段化反应液中, 再次轻柔吸打混匀并短暂离心。

3. 立即在 PCR 仪中运行以下反应程序 (提前设置反应程序):

温度	时间	循环数
72°C	3 min	1
95°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} X ^a
65°C	30 sec	
68°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	-

*a: 下表为推荐的文库扩增循环数, 实验前建议对循环数进行摸索, 在满足文库产量的前提下, 尽量选用少的循环数, 确保得到高质量文库。

起始 DNA 量	推荐循环数	1 μ g 文库产量	500 ng 文库产量
100 ng	6 ~ 12	10	7
50 ng	6 ~ 12	10	8
5 ng	11 ~ 15	13	11
1 ng	12 ~ 16	16	14

4. 反应结束后将产物放置于冰上, 可立即进行纯化步骤, 也可将扩增产物-20°C过夜保存或-80°C保存一个月 (为避免 DNA 降解, 建议尽快进行后续纯化步骤)。

C. 文库纯化

使用磁珠纯化 PCR 产物。以 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546、AG12547、AG12548) 为例, 步骤如下:

【注: 不同的磁珠使用比例可能不一致, 建议使用前摸索合适的磁珠比例。如果使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881), 推荐按照 1.0X 的磁珠比例进行纯化】。

实验前准备:

- ✚ 首次使用, 建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中, 保存在 4°C。
- ✚ 每次实验前, 可根据实验量, 配制新鲜的 80%乙醇, 每个样品需要 400 μ l。
- ✚ 实验前, 将磁珠恢复至室温 (15 ~ 25°C) (放置约 30 min), 使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤:

1. 添加 60 μ l 已恢复至室温的磁珠至上述 55 μ l PCR 产物中 (磁珠 : 样品的比例为 1.2 : 1), 涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液枪轻柔吸打混匀 10 次, 充分混匀后, 短暂离心。

2. 将磁珠 / PCR 产物在室温 (15 ~ 25°C) 下孵育 5 min, 让 DNA 与磁珠结合。
3. 将 PCR 管放在磁力架上至少 5 min, 直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心地去除上清液, 注意不要吹散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终处在磁力架上, 加入 200 μ l 80%乙醇 (注意加入乙醇溶液时不要影响干扰磁珠), 室温 (15~25°C) 孵育 30 sec, 小心移除上清。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 保持 PCR 管始终置于磁力架上, 开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
✦ 无乙醇残留时, 磁珠表面无光泽; 如果乙醇未干燥完全, 可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠, 避免磁珠表面开裂, 降低 DNA 洗脱效率。
7. 磁珠晾干后, 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 22 μ l RNase free water 覆盖磁珠, 使用移液枪吹打混匀磁珠, 室温 (15 ~ 25°C) 孵育 5 min (如果磁珠干燥开裂, 适当延长孵育时间) 。
8. 将 PCR 管短暂离心, 置于磁力架上, 分离磁珠和液体直到溶液澄清 (约 5 min) 。
9. 小心吸取 20 μ l 上清转移到新的低吸附 tube 管中 (勿吸到磁珠), -20°C 保存。若文库片段大小合适, 则可不进行分选, 直接进行 < E. 文库质量检测 > 并测序; 若文库片段大小不合适, 需要分选, 则进行步骤 < D. 文库分选 > 。

D. 文库分选

片段分选推荐使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546、AG12547、AG12548) 进行。下表 2 为推荐分选使用的磁珠比例, 如使用其他来源磁珠, 可能需要根据实际情况调整磁珠比例。

表 2: *MagSpherix* DNA Beads 文库分选推荐比例

文库平均长度	300 bp	400 bp	450bp	500 bp
第一轮磁珠用量	90 μ l (0.9X)	80 μ l (0.8X)	75 μ l (0.75X)	70 μ l (0.7X)
第二轮磁珠用量	20 μ l (0.2X)	20 μ l (0.2X)	20 μ l (0.2X)	20 μ l (0.2X)

注: 磁珠用量均是依据 100 μ l DNA 体积计算而得, 如使用 “0.8X” 进行分选, 则磁珠用量: 0.8X 100 μ l = 80 μ l。

【注: 不同的磁珠使用比例可能不一致, 建议使用前摸索合适的磁珠比例。如果使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, A63881), 推荐分选使用的磁珠比例如下表 3: 】。

表 3: AMPure XP Reagent 文库分选推荐比例

文库平均长度	300 bp	400 bp	500 bp
第一轮磁珠用量	80 μ l (0.8 X)	70 μ l (0.7 X)	60 μ l (0.6 X)
第二轮磁珠用量	20 μ l (0.2 X)	20 μ l (0.2 X)	20 μ l (0.2 X)

实验前准备:

- ✚ 首次使用, 建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中, 保存在 4°C。
- ✚ 每次实验前, 可根据实验量, 配制新鲜的 80%乙醇, 每个样品需要 400 μ l。
- ✚ 实验前, 将磁珠恢复至室温 (15~25°C) (放置约 30 min), 使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤:

1. 根据 DNA 片段长度要求, 进行双轮分选时, 需将初始 DNA 样本用 RNase free water 补齐至 100 μ l。
2. 参考表 2 推荐比例向文库上清中加入第一轮分选磁珠, 涡旋混匀或移液枪吹打 10 次混匀, 室温 (15~25°C) 孵育 5 min。磁珠比例可以根据实际情况进行调整。
3. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心转移上清到干净的离心管中 (可留 5 μ l 上清, 避免吸到磁珠)。
4. 参考表 2 向上清中加入第二轮分选磁珠。
5. 涡旋混匀或移液枪吹打 10 次混匀, 室温静置 5 min。
6. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清 (勿吸到磁珠)。
7. 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 加入 200 μ l 80%乙醇 (注意加入乙醇溶液时不要影响干扰磁珠), 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
8. 重复步骤 7 一次。
10. 保持 PCR 管始终置于磁力架上, 开盖干燥磁珠 3~5 min 至无乙醇残留。
 - ✚ 无乙醇残留时, 磁珠表面无光泽; 如果乙醇未干燥完全, 可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠, 避免磁珠表面开裂, 降低 DNA 洗脱效率。
9. 将 PCR 管从磁力架中取出, 加入 22 μ l RNase free water, 涡旋振荡或使用移液枪轻轻吹打充分混匀, 室温静置 5 min。
10. 将 PCR 管短暂离心, 置于磁力架上, 分离磁珠和液体直到溶液澄清 (约 5 min)。
11. 小心转移 20 μ l 上清至低吸附 tube 管中 (勿吸到磁珠), -20°C 保存。

E. 文库质量检测

1. 取 2 μ l 纯化后的文库, 使用 Qubit 4 Fluorometer 和 Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Code No. Q33231) 检测文库浓度。具体操作请参照说明书。
2. 取 1 μ l 纯化后的文库, 使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 和 Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 检测文库的分布范围。具体操作请参照说明书。

➤ 实验例

1. 以 50 ng HL60 Cell gDNA 为模板，使用 *AccuNext* Fast Tagment DNA Library Prep Kit for Illumina (50 ng Input DNA) (Code No. AG12520, PCR 扩增 10 个循环) 构建 DNA 文库。使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12547) ，分别使用 1.2X 磁珠纯化，使用 0.9X / 0.2X、0.8X / 0.2X、0.7X / 0.2X 磁珠比例进行长度分选，然后使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。结果如下图 4 所示。

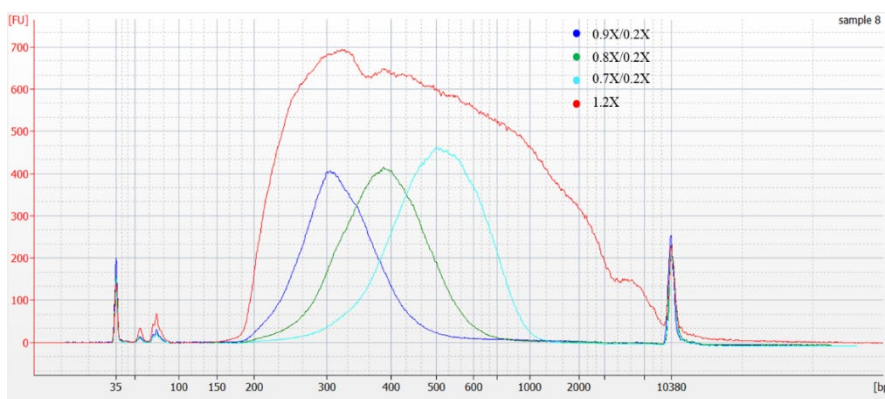


图 4. Agilent 2100 生物分析仪检测结果

➤ 产品注意事项

1. 防污染措施：

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 DNA 被污染或降解。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 耗材方面，使用无菌无酶的耗材，为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置正向气流）、模板添加区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
 - 1) 在试剂配制区进行以下操作：片段化试剂配制、PCR 扩增试剂配制；
 - 2) 在模板添加区加入模板；
 - 3) 在 PCR 扩增区进行扩增；
 - 4) 产物纯化区进行磁珠纯化；
 - 5) 在电泳检测区进行检测。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（70%酒精）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70% 的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加 DNA 模板）实验，确认实验是否有污染。

2. 样品准备:

- ❖ 使用纯化后的 DNA，最好溶于 RNase free water 中。
- ❖ DNA 浓度测定需要使用基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit、PicoGreen 等进行定量，请勿使用任何基于吸光度测量为基础的测定方法。如果 DNA 加入量与推荐 DNA 模板量有较大差别，可能会导致文库产量不足，或文库偏大或者偏小。
- ❖ 当使用 PCR 产物时，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末端各延长 50 ~100 bp，以避免出现末端测序覆盖度降低的情况。

3. 转座体使用量:

- ❖ 本产品适用 4 种加入量 (100 ng / 50 ng / 5 ng / 1 ng) 的 DNA 样本；由于 *AccuNext* Transposome Mix 对 DNA 用量比较敏感，请根据试剂盒选择合适的模板量。

4. 终止片段化:

- ❖ 片段化反应结束后，需要及时添加 5 μ l 5X Stop Buffer，避免 DNA 样本过度片段化，导致最终文库片段偏小。

5. PCR 文库富集:

- ❖ 在 PCR 扩增之前，需要先进行 72°C 孵育 3 min，补齐由于转座产生的 9 bp gap，生产完整的 PCR 模板。
- ❖ 实验前建议对循环数进行摸索，在满足文库产量的前提下，尽量选用少的循环数，确保得到高质量文库。

6. 文库分选:

- ❖ 进行文库分选时，需将纯化后的 DNA 样本补齐 RNase free water 至 100 μ l，否则分选长度会与预期不一致。
- ❖ 磁珠用量是依据补齐体积至 100 μ l 计算而得，如果磁珠投入比例有变化，会导致最终文库大小存在偏差。