

TransNGS® Circularization Kit For MGI®

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KC101

保存: -20℃保存一年。

产品说明

TransNGS® Circularization Kit For MGI®是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台开发的, 适用于将MGI线性双链DNA扩增文库高效快速地制备成环状单链DNA文库, 并用于MGI高通量测序平台测序。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。

特点

本产品采用高质量的酶和经优化后的Buffer组成, 显著提高反应效率, 使整个环化消化流程在30分钟内完成, 具有环化效率高、操作时间短等特点。

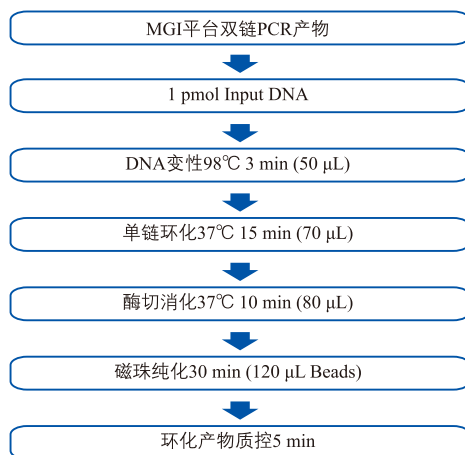
适用范围

本试剂盒适用于但不限于MGI高通量测序平台的文库制备试剂盒获得的接头连接后的扩增产物, 可将所有连接MGI标准接头的文库扩增产物制备成单链环化文库并用于MGI高通量测序平台测序。

试剂盒组成

Component	KC101-01 (12 rxns)	KC101-02 (96 rxns)
Splint Oligo	120 µl	960 µl
Rapid DNA Ligase	12 µl	96 µl
Rapid Splint Buffer	228 µl	2×912 µl
Digestion Enzyme Mix	24 µl	192 µl
Digestion Buffer	96 µl	768 µl

MGI环状dsDNA制备流程图



起始样品要求

1. 样品要求

本试剂盒要求起始样品为经纯化后的连接华大标准接头的文库扩增产物, 推荐溶于Nuclease-free Water。

2. 样品量要求

样品起始量推荐为1 pmol, 为确保较高的环化效率, 且环化产量满足MGI上机测序要求, 投入量应不少于0.5 pmol, 不高于2 pmol。若文库制备试剂盒有特殊的环境投入量需求, 则按照文库制备试剂盒的要求投入所需的样品量。



3. 样品混合要求

Input DNA 可以是单个样品，也可以是多个带有不同 Barcodes 的样品的混合物。对样品进行混合时需满足 Barcodes 混合的要求。混合的样品总量推荐为 1 pmol，若每个样本所需数据量相同，则等量混合。单个样品所需的质量可根据公式1计算。

公式1:

$$\text{单个样品所需的质量(ng)} = \frac{1 \text{ pmol Input DNA对应的质量(ng)}}{\text{混合的样本个数N}}$$

4. 样品质量计算

1 pmol不同片段大小DNA对应不同的质量，可根据公式2计算或参考表3选择所需的DNA样本量。

公式2:

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量(ng)} = \frac{\text{DNA主片段大小(bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

表1 不同扩增产物片段大小1 pmol对应产量

插入片段主带大小 (bp)	扩增产物主带大小(bp)	1pmol对应产量(ng)
150	234	150
200	284	190
250	334	220
300	384	250
350	434	290
400	484	320
450	534	350
500	584	390

自备试剂

DNA纯化: MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401); 新鲜配制的80% 乙醇; Nuclease-free Water。

DNA定量: Qubit™ 1× dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher); Qubit™ ssDNA Assay Kit (ThermoFisher)。

相关仪器耗材: Qubit 荧光定量仪; PCR仪; Nuclease-free PCR管; 低吸附1.5 ml离心管; 磁力架等。

操作步骤

1. DNA变性

- (1) 利用Qubit™ 1× dsDNA HS Assay Kit检测Input DNA文库浓度，并根据文库主片段长度，取1.0 pmol至0.2 ml PCR管中。若不足40 μl则用Nuclease-free Water补足40 μl。
- (2) Splint Oligo解冻后，颠倒混匀并置于冰上备用。
- (3) 在PCR管中配制如下DNA变性反应体系

组分	体积
Input DNA	40 μl
Splint Oligo	10 μl
Total	50 μl

- (4) 混匀后，在PCR仪中进行98℃变性3分钟(热盖105℃)，之后立即置于冰上孵化2分钟。
- (5) 瞬时离心立即进行单链环化。

2. 单链环化

- (1) Rapid Splint Buffer解冻后颠倒混匀，置于冰上待用；



(2) 在冰上配制单链环化反应体系，如下：

组分	体积
DNA变性产物	50 μ l
Rapid Splint Buffer	19 μ l
Rapid DNA Ligase	1 μ l
Total	70 μ l

(3) 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

(4) 将PCR管置于PCR仪中，按照下表的条件进行反应：

温度	体积
热盖	Off
37°C	15 min
4°C	Hold

(5) 反应结束后，瞬时离心立即进行酶切消化。

3. 酶切消化

(1) Digestion Buffer解冻后颠倒混匀，置于冰上待用。

(2) 在冰上配制酶切消化体系，如下：

组分	体积
单链环化产物	70 μ l
Digestion Buffer	8 μ l
Digestion Enzyme Mix	2 μ l
Total	80 μ l

(3) 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并瞬时离心将反应液离心至管底。

(4) 将PCR管置于PCR仪中，按照下表的条件进行反应：

温度	体积
热盖	Off
37°C	10 min
4°C	Hold

(5) 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。

4. 环化产物纯化

(1) 将MagicPure® Size Selection DNA Beads由2-8°C冰箱中取出，室温平衡至少30分钟后，充分涡旋混匀。

(2) 吸取120 μ l 磁珠至消化产物中，使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，室温静置5分钟。

(3) 瞬时离心后，将PCR管置于磁力架中分离磁珠与液体，待溶液澄清后(约5分钟)小心移除上清。

(4) 保持PCR管始终置于磁力架中，向管中加入200 μ l新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

(5) 重复步骤4一次；

(6) 保持PCR管于磁力架，室温晾干至磁珠刚刚出现干裂(约5分钟)；

(7) 将PCR管移出磁力架，加入22 μ l Nuclease-free Water洗脱DNA，移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，室温静置2分钟；

(8) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

(9) 转移洗脱液到一个干净的PCR管中，置于-20°C保存。



5. 环化产物质检

使用Qubit™ ssDNA Assay Kit (ThermoFisher) 对酶切消化产物进行定量。

注意事项

- 请于使用前将试剂盒中的Buffers置于室温解冻，解冻后充分混匀，与Enzymes瞬时离心后，置于冰上待用；
- DNA变性处理后的样品需立即置于冰上孵化；
- 反应液的混匀应避免剧烈振荡，以防酶活降低，导致环化效率下降；
- 针对华大智造高通量测序平台，单链环化产物纯化后产量应达到80 fmol以上，方可足够两次上机测序；
- 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)，以保证实验环境的洁净度。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2-202112

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

