



Cyclization Kit for MGI

环化试剂盒（MGI平台）

Cat. No. CW3013S

产品简介

Cyclization Kit for MGI是针对MGI高通量测序平台专门开发设计的单链环化试剂盒。本试剂盒提供的通用MGI平台环化模块，可同时兼容单端(Single Barcode)和双端(Dual Barcode)接头类型文库，将其制备成MGI高通量测序仪专用的单链环状DNA文库。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，保证了文库环化的稳定性。

保存条件

-20±5℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW3013S 16 rxns
Splint Oligo	116 µL
Splint Buffer	216 µL
Ligase	8 µL
Digestion Buffer	109 µL
Digestion Enzyme	28 µL

注意事项

1. 关于操作

- 1.1 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 1.2 请于使用前将试剂盒各组份置于室温解冻, 解冻后上下颠倒数次充分混匀, 短暂离心后置于冰上待用。
- 1.3 配置各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡, 剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
- 1.4 为避免样品交叉污染, 推荐使用带滤芯的枪头, 吸取不同样品时请更换枪头。
- 1.5 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应, 使用前应预热PCR仪至反应温度附近。
- 1.6 定期对各实验室区域进行清洁 (使用0.5%次氯酸钠, 10%漂白剂进行擦拭清理), 以保证实验环境的洁净度。
- 1.7 本产品仅作科研用途。

2. 样本要求及处理

2.1 样本量要求

- 2.1.1 本试剂盒推荐的Input DNA量为1 pmol; 若PCR产物不足, 最低可降至0.5 pmol投入量。
- 2.1.2 若有特殊的环化投入量需求, 则按照文库制备试剂盒的要求投入所需的Input DNA量。
- 2.1.3 不同片段大小DNA 1 pmol分子对应不同的质量, 可根据公式1计算所需的Input DNA量:

公式1 PCR产物摩尔数与质量间的换算

$$1 \text{ pmol PCR产物对应的质量 (ng)} = \text{DNA主片段大小(bp)} \times 0.66$$

2.2 样本混样要求

- 2.2.1 Input DNA可以是单个样本, 也可以是多个带有不同 Barcodes 的样本的混合物。
- 2.2.2 对样本进行混合时需满足 Barcodes 混合的要求, 可参考表Adapters试剂盒说明书选择合适的 Barcodes 进行混合。
- 2.2.3 混合的样本总量推荐为1 pmol, 若每个样本所需数据量相同, 则等量混合, 每个样本所需的质量按照公式2进行计算:

公式2 混合样本中单个样本所需质量的计算

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

- 2.2.4 单个样本或混合后样本用于环化时, 体积应为32.8 μL , 若不足则用ddH₂O补充至 32.8 μL 。

3.4 消化产物纯化

- 3.4.1 准备工作：将康为Beads或Beckman AMPure XP Beads由冰箱中取出，室温平衡至少30min。配置80%乙醇。
- 3.4.2 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- 3.4.3 吸取116 μL Beads至消化产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育10min。
- 3.4.4 将PCR管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约2 min)，小心移除上清。
- 3.4.5 保持PCR管始终置于磁力架中，加入200 μL 新鲜配置的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec后，小心移除上清。
- 3.4.6 重复步骤5，总计漂洗两次。
- 3.4.7 保持PCR管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至磁珠无反光开裂。
- 3.4.8 将PCR管从磁力架中去除，加入22 μL L-TE Buffer，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置10 min。
- 3.4.9 短暂离心，将PCR管始终置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约2 min)，将上清小心移至PCR管中。
- 停止点：环化纯化产物，可置于-20℃储存一个月。

3.5 消化产物质控

使用 Qubit® ssDNA Assay Kit 荧光试剂对酶切消化产物进行定量，具体请参见注意事项。

3. 关于磁珠纯化(Bead-based Clean Up)

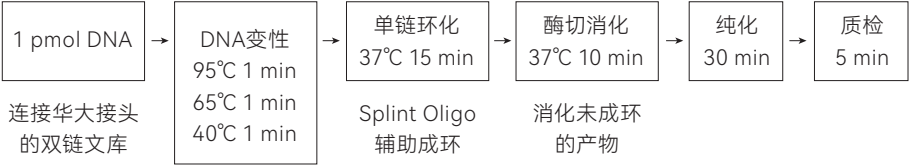
- 3.1 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致纯化得率下降。
- 3.2 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
- 3.3 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
- 3.4 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥，干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥约 5min。
- 3.5 单链环产物纯化保存，可使用L-TE Buffer 洗脱，产物可于-20℃ 可保存 1个月。
4. 关于文库质检(Library Quality Analysis)
- 4.1 单链环产物纯化后推荐使用Qubit® ssDNA Assay Kit单链DNA荧光染料试剂对纯化后产物进行定量。
- 4.2 针对华大智造高通量测序平台，单链环产物纯化后产量应≥80fmol(足够2次上机测序)。
- 4.3 可根据公式 3计算。

公式3 单链环摩尔数与质量间的换算

$$80 \text{ fmol 单链对应的质量 (ng)} = 0.08 \times \text{DNA片段大小 (bp)} \times 0.33$$

使用方法

1. 自备材料
- 1.1 纯化磁珠: CW3171 或其他等效产品
- 1.2 文库质控: Thermo fisher Qubit® ssDNA Assay Kit。
- 1.3 其他材料: 无水乙醇、灭菌超纯水、L-TE Buffer (10 mMTris-HCl,pH 8.0-8.5+0.1 mM EDTA)、低吸附EP管、PCR管、磁力架、PCR仪等。
2. 操作流程



3. 操作步骤

3.1 变性

- 3.1.1 根据文库长度，取1 pmol 至0.2 mL PCR管中，用ddH₂O补充至32.8μL。
- 3.1.2 将表1中试剂解冻后，颠倒混匀并置于冰上备用。
- 3.1.3 于冰上配置表1反应体系。

表1 DNA变性体系

名称	体积
单个或混合好的双链文库	32.8 μL
Splint Oligo	7.2 μL
Total	40 μL

3.1.4 使用移液器吸打均匀，瞬时离心。

温度	时间
热盖105 °C	On
95 °C	1 min
65 °C	1 min
40 °C	1 min
4 °C	Hold

3.1.5 反应结束后，瞬时离心收集反应液至管底，置于冰上。

3.2 单链环化

- 3.2.1 将表2中试剂解冻后，颠倒混匀并置于冰上备用。
- 于冰上配置表2反应体系。

表2 单链环化体系

名称	体积
上一步反应物	40 μL
Splint Buffer	13.5 μL
Ligase	0.5 μL
Total	54 μL

- 3.2.3 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。
- 3.2.4 将PCR管置于PCR仪上，按照表3所示设置反应程序，进行单链环化反应。

表3 单链环化反应程序

温度	时间
热盖38 °C	On
37 °C	15 min
40 °C	Hold

3.3 酶切消化

- 3.3.1 将表4中试剂解冻后，颠倒混匀并置于冰上备用
- 3.3.2 于冰上配置表4反应体系

表4 酶切消化体系

名称	体积
上一步反应物	54 μL
Digestion Buffer	6.8 μL
Digestion Enzyme	1.75 μL
ddH ₂ O	5.45 μL
Total	68 μL

- 3.3.3 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。
- 3.3.4 将PCR管置于PCR仪上，按照表5的条件进行反应：

表5 酶切消化反应程序

温度	时间
热盖38 °C	On
37 °C	10 min
40 °C	Hold

3.3.5 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。