



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 本产品仅作参考用途。

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. 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)

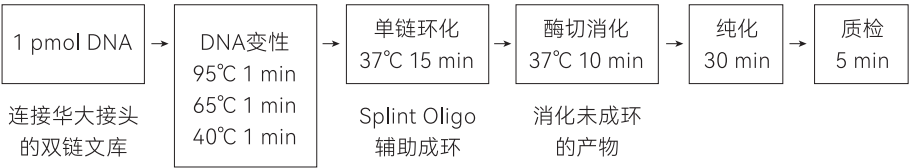
- 4.1 单链环产物纯化后推荐使用Qubit® ssDNA Assay Kit单链DNA荧光染料试剂对纯化后产物进行定量。
- 4.2 针对华大智造高通量测序平台, 单链环产物纯化后产量应≥80fmol(足够2次上机测序)。
- 4.3 可根据公式 3计算。

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 文库质检: 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。

3.2.2 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
4 °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
4 °C	Hold

3.3.5 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。

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。