

TransNGS® Transformation Kit For MGI®

转换 & 环化试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KC301

版本号: Version 3.0

保存: -18°C及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS® Transformation Kit For MGI®是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台开发的, 适用于将非MGI试剂盒构建的特定序列线性dsDNA文库转换成兼容华大智造测序平台矩阵式纳米芯片的单链环状DNA文库。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转换的稳定性和重复性。构建的文库搭配BGISEQ-500RS、MGISEQ-200RS、MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装 (App-A) V1.0可用于华大智造 (MGI) 测序平台。

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, 具有转换效率高、操作时间短等特点。本试剂盒提供的环化模块, 不仅适用于经文库转换的非MGI文库, 还适用于MGI两端Barcode文库和MGI单端Barcode文库。

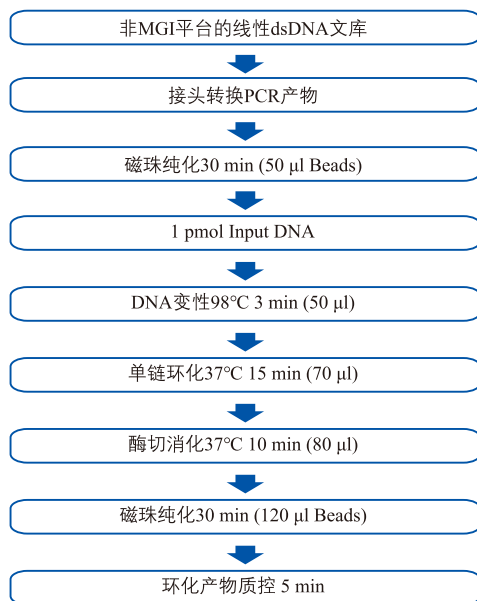
适用范围

本试剂盒适用于非MGI试剂盒构建的特定序列线性dsDNA文库。如需将多个线性dsDNA文库混合测序, 建库时需按照碱基平衡原则选择Barcode。

试剂盒组成

Component	KC301-01 (12 rxns)	KC301-02 (96 rxns)
Library Transformation Primer	60 µl	480 µl
TransNGS® Library Amplification SuperMix (2×)	300 µl	4×600 µl
Splint Oligo IV	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

文库转换流程图



起始样品要求

本试剂盒要求起始样品为非MGI试剂盒构建的特定序列线性dsDNA文库。文库转换前，建议使用1×dsDNA HS Assay Kit等双链DNA荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对线性dsDNA文库进行定量。

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：1×dsDNA HS Assay Kit (目录号: GS401)；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. 文库转换扩增

(1) 将无菌PCR管置于冰上，加入

组分	体积
非MGI平台的线性dsDNA文库	10-50 ng
TransNGS® Library Amplification SuperMix (2×)	25 µl
Library Transformation Primer	5 µl
Total volume	50 µl

(2) 移液枪吹吸混匀，点甩离心收集管壁上的液体。

(3) PCR 仪中进行以下扩增程序。

98°C	3 min	
98°C	30 sec	5-10 cycles*
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	3 min	
≤10°C	Hold	

* 针对不同的起始样本量，扩增循环数参照表1

表1文库转换扩增推荐循环数

线性dsDNA文库投入量	扩增循环数
10 ng	10
25 ng	8
50 ng	5

2. PCR产物纯化

推荐使用1.0×MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化。

使用1.0×磁珠纯化的具体操作如下：

(1) 从2~8°C取出磁珠，室温静置30分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取50 µl 磁珠 (1.0×) 加入上步产物中。

(3) 移液枪吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

(5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 µl新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(6) 重复步骤 (5) 一次。



(7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(8) 将反应管移出磁力架，加入23 µl Nuclease-free Water。移液枪吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

(9) 将反应管置于磁力架上，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。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(10) 小心吸取20 µl洗脱液转移到干净PCR管中，并使用1×dsDNA HS Assay Kit等双链DNA荧光定量试剂盒对PCR产物进行定量。

3. DNA变性

(1) 利用1×dsDNA HS Assay Kit检测Input DNA文库浓度，并根据文库主片段长度，参照公式1和表2取1.0 pmol至0.2 ml PCR管中。若不足40 µl则用Nuclease-free Water补至40 µl。

(2) Splint Oligo IV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
1.0 pmol Input DNA	40 µl
Splint Oligo IV	10 µl
Total volume	50 µl

(4) 混匀后，在PCR仪中进行98°C变性3分钟（热盖105°C），之后立即置于冰上孵育2分钟。

(5) 瞬时离心立即进行单链环化。

公式1：

$$1 \text{ pmol 待环化文库对应的质量(ng)} = \frac{\text{DNA主片段大小(bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

表2 1 pmol不同长度待环化文库对应质量

待环化文库主带大小(bp)	1 pmol对应质量(ng)
234	150
284	190
334	220
384	250
434	290
484	320
534	350
584	390

4. 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 µl
Rapid Splint Buffer	19 µl
Rapid DNA Ligase	1 µl
Total volume	70 µl

(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。

5. 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 volume	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。

6. 环化产物纯化

(1) 将MagicPure® Size Selection DNA Beads从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20 μ l到一个干净的PCR管中，置于-20°C保存。

7. 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Buffer置于室温解冻，解冻后充分混匀，与所有的酶瞬时离心后，置于冰上待用；
- DNA变性处理后的样品需立即置于冰上孵育；
- 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，方可满足两次上机测序；
- 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: V3-202506

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

