

TransNGS® Universal Circularization Kit For MGI® 通用型环化试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KC401

版本号: Version 2.0

保存: -18℃及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS® Universal Circularization Kit For MGI®是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台开发的, 以MGI平台双端Barcode文库、MGI平台单端Barcode文库或经文库转换的非MGI文库的dsDNA为底物, 将其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

- 环化效率高
- 操作时间短

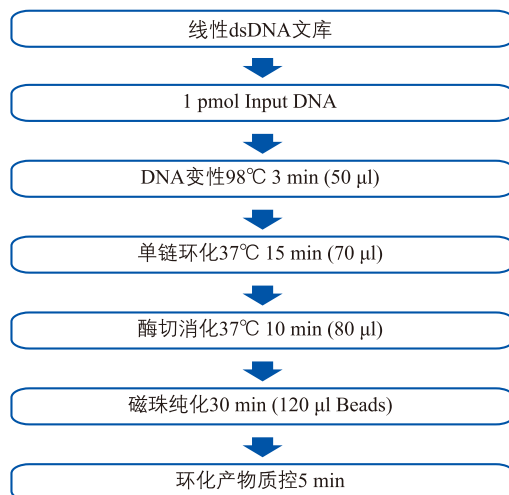
适用范围

- MGI平台双端Barcode dsDNA文库
- MGI平台单端Barcode dsDNA文库
- 经转换的非MGI平台特定序列 dsDNA文库

试剂盒组成

Component	KC401-01 (12 rxns)	KC401-02 (96 rxns)
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

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dsDNA文库（MGI平台双端Barcode文库、MGI平台单端Barcode文库或经文库转换的非MGI文库），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化投入量需求，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，并根据测序数据量、样本浓度及片段长度调整混合比例。

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1计算或参考表1选择所需的DNA样本量。

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1 1 pmol不同长度待环化文库对应的质量

待环化文库主带大小(bp)	1 pmol对应质量(ng)
281	185
331	220
381	250
431	285
481	320
531	350
581	385
631	420

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 (GS401); Qubit™ ssDNA Assay Kit (ThermoFisher)。

相关仪器耗材: Qubit 荧光定量仪; PCR仪; Nuclease-free PCR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
Input DNA	40 μl
Splint Oligo IV	10 μl
Total volume	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育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 volume	70 μ l

(3) 使用移液器轻轻吹打10下，切勿震荡混匀，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℃	15 min
4℃	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 volume	80 μ l

(3) 使用移液器轻轻吹打10下，切勿震荡混匀，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℃	10 min
4℃	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℃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℃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所有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: V2.0-202506

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

