

TransNGS[®] Transformation Kit For MGI[®]

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KC301

保存: -20°C保存一年。

产品说明

TransNGS[®] Transformation 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。

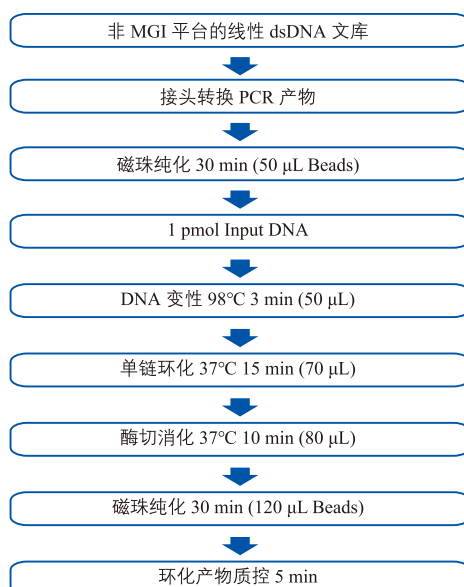
适用范围

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 μ l | 480 μ l |
| TransNGS [®] Library Amplification SuperMix (2 \times) | 300 μ l | 4 \times 600 μ l |
| Splint Oligo III | 120 μ l | 960 μ l |
| Rapid DNA Ligase | 12 μ l | 96 μ l |
| Rapid Splint Buffer | 228 μ l | 2 \times 912 μ l |
| Digestion Enzyme Mix | 24 μ l | 192 μ l |
| Digestion Buffer | 96 μ l | 768 μ l |

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 Qubit® 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: 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. 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 | 20 µl |
| <i>TransNGS</i> ® 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 | } 5-10 cycles* |
| 98°C | 30 sec | |
| 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 Qubit® 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 Qubit™ 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 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 III | 10 μl |
| Total | 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化 2 分钟。

(5) 瞬时离心立即进行单链环化。

表 2 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) | 1 pmol 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 |

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 | 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 | 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 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。

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 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: V2-202308

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

