

Hieff NGS[®] Fast-Pace DNA Cyclization Kit for MGI[®]
DNA 环化试剂盒

Cat#13341

使用说明书
Product Manual



目 录

产品信息	1
产品描述	1
产品组分	1
运输与保存方法	1
注意事项	1
使用方法	2






产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® Fast-Pace DNA Cyclization Kit for MGI® DNA 环化试剂盒	13341ES08	8 T
	13341ES16	16 T
	13341ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® Fast-Pace DNA 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, 使整个环化消化流程在 30 min 内完成。本试剂盒适用于所有连接华大标准接头的文库扩增产物, 除建库试剂本身的限制外, 本环化试剂盒不限 MGI®测序平台。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格		
		13341ES08	13341ES16	13341ES96
13341-A	 Splint Oligo	48 µL	96 µL	576 µL
13341-B	 Splint Buffer	120 µL	240 µL	2×720 µL
13341-C	 Ligase	40 µL	80 µL	480 µL
13341-D	 Digestion Buffer	64 µL	128 µL	768 µL
13341-E	 Digestion Enzyme	16 µL	32 µL	192 µL

运输与保存方法

冰袋运输。

所有组分-20°C 保存, 有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 请于使用前将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀, 短暂离心后置于冰上待用。
3. 配制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。
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。
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。
6. 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。
7. 本产品仅作科研用途!

二、样本要求及处理

2.1 样本量要求

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. 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。
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 计算或参考表 1 选择所需的 Input DNA 量：

公式 1 PCR 产物摩尔数与质量间的换算

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

表 1 不同片段大小 PCR 产物 1pmol 对应产量

插入片段大小 (bp)	PCR 产物主片段大小 (bp)	1 pmol 对应产量 (ng)
150	230	152
200	280	185
250	330	218
300	380	251

2.2 样本混样要求

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. 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。
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

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

4. 单个样本或混合后样本用于环化时，体积应为 34 μL ，若不足则用 ddH₂O 补充至 34 μL 。

三、关于磁珠纯化 (Bead-based Clean Up)

1. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致纯化得率下降。
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. 磁珠漂洗使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
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 5 min。
5. 单链环产物纯化保存，可使用 TE Buffer 洗脱，产物可于 -20°C 可保存 1 个月。

四、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

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。
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 $\geq 80 \text{ fmol}$ (足够 2 次上机测序)。
3. 可根据公式 3 计算或参考表 2。

公式 3 单链环摩尔数与质量间的换算

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

表 2 不同 PCR 产物片段大小对应 80fmol 单链环产量

插入片段大小 (bp)	PCR 产物主片段大小 (bp)	80 fmol 对应产量 (ng)
150	230	6.07
200	280	7.39
250	330	8.71
300	380	10.03

使用方法

一、自备材料

1. 纯化磁珠: Cat#12601, Hieff NGS® DNA Selection Beads 或 Cat#A63880, AMPure XP Beads 或其他等效产品。
2. 文库质控: Cat # Q10212, Thermo fisher Qubit® ssDNA Assay Kit。
3. 其他材料: 无水乙醇、灭菌超纯水、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-8.5+0.1 mM EDTA)、低吸附 EP 管、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

二、操作流程

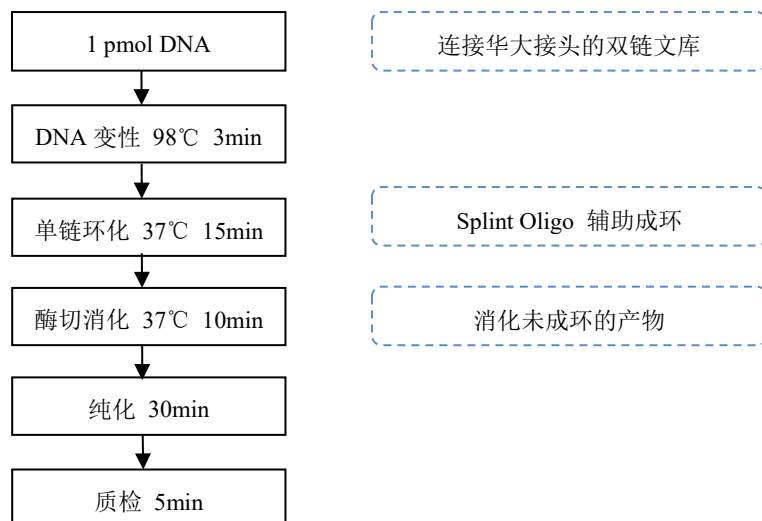


图1 单链环化文库构建流程

三、操作步骤

3.1 变性

1. 根据文库长度, 取 1 pmol 至 0.2 ml PCR 管中, 用 ddH₂O 补充至 34 μL。
2. 将表 3 中试剂解冻后, 颠倒混匀并置于冰上备用。
3. 于冰上配制表 3 反应体系。

表 3 DNA 变性体系

名称	体积 (μL)
单个或混合好的双链文库	34
Splint Oligo	6
Total	40

4. 混匀后, 在 PCR 仪上进行 98°C 变性 3 min, 之后立即置于冰上, 冰浴 2 min 后瞬时离心。

3.2 单链环化

1. 将表 4 中各试剂解冻后, 颠倒混匀, 置于冰上备用。
2. 于冰上配制表 4 反应体系。

表 4 单链环化体系

名称	体积 (μL)
上一步反应物	40
Splint Buffer	15
Ligase	5
Total	60

- 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。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 5 所示设置反应程序，进行单链环化反应。

表 5 单链环化反应程序

温度	时间
热盖 105°C	OFF
37°C	15min
4°C	Hold

3.3 酶切消化

- 将表 6 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
- 于冰上配制表 6 所示反应体系。

表 6 酶切消化体系

名称	体积 (μL)
上一步反应物	60
Digestion Buffer	8
Digestion Enzyme	2
Total	70

- 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。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 7 的条件进行反应：

表 7 酶切消化反应程序

温度	时间
热盖 105°C	OFF
37°C	10 min
4°C	Hold

- 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。

3.4 消化产物纯化

该步骤使用磁珠对 3.3 步骤的产物进行纯化。

- 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 或 Beckman AMPure XP Beads 由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
- 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- 吸取 120 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 至消化产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 10min。
- 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。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
- 重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂。
- 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 22 μL 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。
- 短暂离心，将 PCR 管始终置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 2min），将上清小心移至新 PCR 管中。

★停止点：环化纯化产物，可置于-20°C储存一个月。

3.4 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四。

Good science

Good products

翌圣生物科技（上海）股份有限公司

服务电话:400-6111-883

咨询邮箱:marketing@yeasen.com

网 址:www.yeasen.com

地 址:上海市浦东新区国际医学园区天雄路166号1号楼402室

