

# Hieff NGS<sup>®</sup> Dual Barcode Fast-Pace DNA Cyclization Kit for MGI<sup>®</sup>

## DNA 双端 Barcode 环化试剂盒






### 产品简介

Hieff NGS<sup>®</sup> Dual Barcode Fast-Pace DNA Cyclization Kit for MGI<sup>®</sup>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的双标签 PCR 接头文库扩增产物，除建库试剂本身的限制外，本环化试剂盒不限 MGI 测序平台。

### 产品信息

货号	13340ES16 / 13340ES96
规格	16 T / 96 T

### 组分信息

组分编号		组分名称	13340ES16	13340ES96
13340-A		DB Splint Oligo	96 $\mu$ L	576 $\mu$ L
13340-B		Splint Buffer	240 $\mu$ L	2 $\times$ 720 $\mu$ L
13340-C		Ligase	80 $\mu$ L	480 $\mu$ L
13340-D		Digestion Buffer	128 $\mu$ L	768 $\mu$ L
13340-E		Digestion Enzyme	32 $\mu$ L	192 $\mu$ L

### 储存条件

-25~-15 $^{\circ}$ 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

##### 样本量要求

1. 本试剂盒推荐的 Input DNA 量为 1 pmol；若文库产量不足，最低可降至 0.5 pmol 投入量。
2. 若有特殊的环化投入量需求，可按照需求投入，但原则上不宜超过 2 pmol。
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	300	198
200	350	231
250	400	264
300	450	297

#### 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. 混合后的样本总量推荐为 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

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

3. 单个样本或混合后样本用于环化时，体积应为 34  $\mu\text{L}$ ，若不足则用 ddH<sub>2</sub>O 补充至 34  $\mu\text{L}$ 。

#### 三、关于磁珠纯化

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

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. 单链环产物纯化后产量应  $\geq 80$  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	300	7.92
200	350	9.24
250	400	10.56
300	450	11.88

#### 使用说明

##### 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. 文库质检：Cat#12645, ssDNA Assay Kit 或 Cat # Q10212, Thermo fisher Qubit® ssDNA Assay Kit。
3. 其他材料：80%乙醇、低吸附 EP 管、磁力架、PCR 仪等。

## 二、操作流程

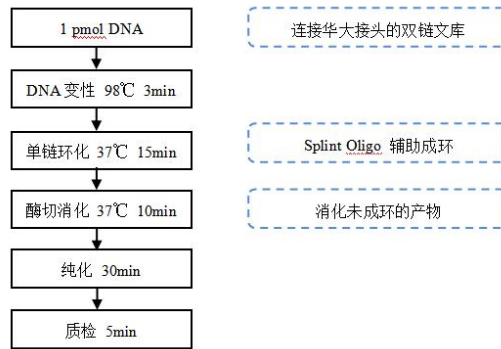


图1 单链环化文库构建流程

## 三、操作步骤

### 变性

1. 根据文库长度，取 1 pmol 至 0.2 ml PCR 管中，用 TE Buffer 补充至 34  $\mu$ L。
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 ( $\mu$ L)
单个或混合好的双链文库	34
DB 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。

**【注】：**部分 PCR 仪在程序结束后会迅速降温，不及时取出会导致 DNA 复性，环化效率降低。可将程序设置为【98°C，hold】，在文库放置到 PCR 仪上后，使用 timer 计时 3min 后将文库立即取出置于冰上。

### 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 ( $\mu$ L)
上一步反应物	40
Splint Buffer	15
Ligase	5
Total	60

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 42°C	on
37°C	15 min
4°C	Hold

## 酶切消化

1. 将表 6 中各试剂解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 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

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 42°C	on
37°C	10 min
4°C	Hold

5. 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。

## 消化产物纯化

该步骤使用磁珠对酶切消化的产物进行纯化。

1. 准备工作：将 Hieff NGS<sup>®</sup> 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。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 120 μL Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads 至消化产物中，室温孵 10min。
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。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 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。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。
7. 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。
8. 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。
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 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。

## 消化产物质控

使用 Qubit<sup>®</sup> ssDNA Assay Kit 荧光试剂对纯化产物进行定量，具体请参见注意事项四。