

Version 1

Code No. AG12571

AccuNext MGI 文库环化适配试剂盒 (适用于双端 Barcode)

AccuNext MGI Cyclization Kit (Dual Barcode)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



目录

➤ 产品概述	1
➤ 产品组成	1
➤ 保存及运输	1
➤ 产品优势	1
➤ 实验原理及流程	2
➤ 实验注意事项	3
➤ 实验前准备	4
➤ 操作方法	4
A. 变性	4
B. 单链环化	5
C. 酶切消化	5
C-1. 产物纯化	6
D. 产物质量检测	7

➤ 产品概述

本产品是专为华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的新一代高效 DNA 环化试剂盒，适用于所有已连接 MGI 标准双标签 PCR 接头文库扩增产物。采用优化的反应体系与高品质酶组分，显著提升 DNA 模板的环化效率与成功率。

本产品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，因此不建议改变任何反应组分的用量及浓度或用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不良的实验结果。如需替换，请先进行验证。

➤ 产品组成

组分名称	AG12571 (16 rxns)
DB Splint Oligo	80 µl
Splint Buffer	80 µl
Ligase	80 µl
Digestion Buffer	96 µl
Digestion Enzyme	64 µl

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃ 保存

运输温度：-20℃ 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 低起始量需求：支持 0.2 pmol 输入量，降低样本消耗成本，拓宽珍贵样本应用场景。
2. 操作极简快速：单个步骤耗时 ≤ 10 分钟。

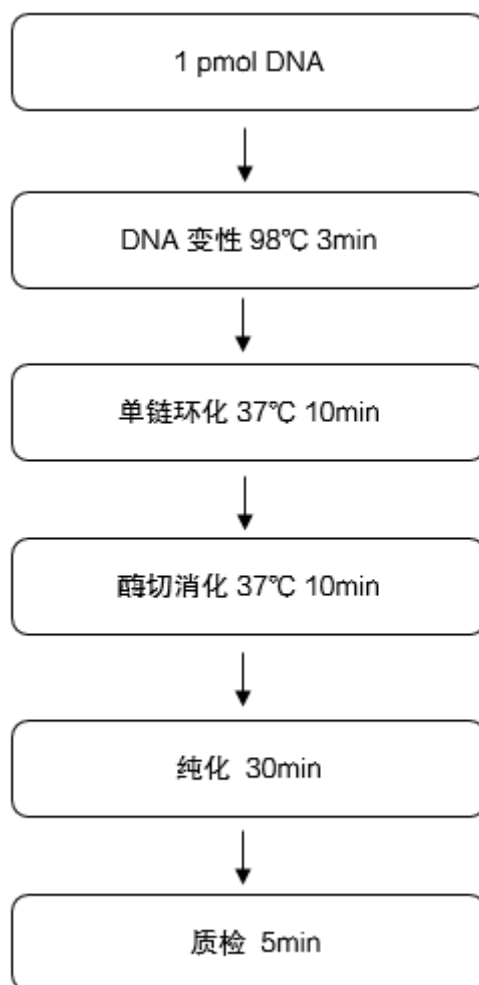
➤ 实验原理及流程

将末端连接有 MGI 特殊接头的双链 DNA 文库片段高效转化为单链环状 DNA 分子。

首先通过加热变性使双链 DNA 解离为单链。随后进行快速退火，每条单链 DNA 两端发生特异性碱基配对，引导线性单链分子自发折叠成环形构象。

在优化的反应体系中，试剂盒所含的高效 DNA 连接酶可精确识别接头互补配对区域并催化其发生共价闭合连接。最终，输入的线性 DNA 片段被成功环化为稳定的单链环状结构。

图 1.实验操作流程



➤ 实验注意事项

1. 操作过程

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套进行操作。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和无核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 耗材方面，使用无菌无酶的耗材。为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（用 70%乙醇）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的乙醇擦拭。

2. 样本要求

- ❖ 推荐的 Input DNA 量为 1 pmol，如果 Input DNA 较少，最少可降低至 0.2 pmol。

【公式 1：MGI 平台线性 dsDNA 文库摩尔数与质量间的换算】

$$1 \text{ pmol DNA 文库对应的质量}(\text{ng}) = \text{DNA 主带大小}(\text{bp}) \times 0.66$$

表 1 不同片段大小 PCR 产物 1pmol 对应产量

插入片段主带大小 (bp)	PCR 产物主带大小 (bp)	1pmol 对应产量 (ng)
150	300	198
200	350	231
250	400	264
300	450	297
350	500	330
400	550	363

- ❖ 混合样本要求

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，多个文库混合时，应根据测序数据量、样本浓度及片段长度调整混合比例，如果片段长度差异较大，可能会导致测序数据量差异较大。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】

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

3. 磁珠使用

- ❖ 磁珠使用前应先平衡至室温，否则可能会导致回收率下降。
- ❖ 磁珠使用前应当充分振荡混匀，DNA 样品加入磁珠后应保证与磁珠充分混匀。
- ❖ 吸取上清时，应避免吸到磁珠，否则可能会影响文库质量。
- ❖ 80%乙醇溶液应现用现配，避免长时间保存导致乙醇挥发，使乙醇浓度降低而影响文库回收效率。
- ❖ 磁珠室温干燥要充分，通常室温放置 5~10 min 即可。若 80%乙醇溶液干燥不充分会影响后续反应，干燥过度可能会出现磁珠开裂，DNA 片段难以洗脱下来，而导致产物回收率降低。

► 实验前准备

1. 试剂 & 耗材

- 1) 磁珠纯化：公司产品 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548) 或其他等效产品【如 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 】。
- 2) 环化产物质检：Thermo fisher Qubit®ssDNA Assay Kit (Code No.Q10212)。
- 3) 其他材料：TE Buffer、RNase free water、80%乙醇溶液（建议用 RNase free water 配制），0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管和低吸附 tube 管（如 Eppendorf, Code No. 022431021，或其他等效产品）等。

2. 仪器

- 1) PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、磁力架、移液枪、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

► 操作方法

A. 变性

✚ 将此步骤所用的试剂在冰上融化。融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。

1. 根据文库长度，取 1 pmol 至 0.2 ml PCR 管中，用 TE Buffer 补充至 35 μ l。
2. 在冰上配制反应液：

组分	反应体系
单个或混合好的双链文库	35 μ l
DB Splint Oligo	5 μ l
Total	40 μ l

3. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应。反应程序如下（可提前设置反应程序）：

温度	时间
98°C	3 min
立即置于冰上	2 min

【注】反应结束后，若不及时取出，DNA 会发生复性，环化效率降低。建议将 PCR 程序设置为【98°C，hold】，样品放入后，使用 timer 计时 3min，计时结束后立即将样品取出置于冰上。

B. 单链环化

✚ 将此步骤所用的试剂在冰上融化。融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。

1. 在冰上配制反应液：

组分	体积
上述反应物	40 μ l
Splint Buffer	5 μ l
Ligase	5 μ l
Total	50 μ l

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下（可提前设置反应程序）：

温度	时间
37°C	10 min
4°C	Hold

C. 酶切消化

✚ 将此步骤所用的试剂在冰上融化。融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。

1. 在冰上配制反应液：

组分	体积
上述反应产物	50 μ l
Digestion Buffer	6 μ l
Digestion Enzyme	4 μ l
Total	60 μ l

2. 使用移液枪轻柔吹打混匀，短暂离心，立即放入 PCR 仪中进行反应，反应程序如下（可提前设置反应程序）：

温度	时间
37°C	10 min
4°C	Hold

3. 反应结束后，瞬时离心，立即进行纯化。

C-1. 产物纯化

使用磁珠纯化 DNA 产物，推荐使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548) 进行纯化，步骤如下：

实验前准备：

- 首次使用，建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4°C。
- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μ l。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25°C）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

操作步骤：

- 添加 100 μ l 已恢复至室温的磁珠至上述 60 μ l DNA 产物中，涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液枪轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心。
- 在室温（15 ~ 25°C）下孵育 5 min，让 DNA 与磁珠结合。
- 将 PCR 管放在磁力架上至少 2 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心地去除上清液，注意不要吹散磁珠。
- 保持 PCR 管始终处在磁力架上，加入 200 μ l 80%乙醇溶液（注意加入乙醇溶液时不要影响干扰磁珠），室温（15~25°C）孵育 30 sec，小心移除上清。
- 重复步骤 4 一次。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
 - 无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。
- 将 PCR 管从磁力架中取出，进行洗脱：
 - 加入 21 μ l RNase free water 覆盖磁珠，使用移液枪吹打混匀磁珠，短暂离心后室温（15 ~ 25°C）孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。

- 2) 将 PCR 管置于磁力架上，分离磁珠和溶液直到溶液澄清（约 5 min）。小心吸取上清转移到新的 tube 管中（勿吸到磁珠）。
8. 环化纯化产物，可置于-20℃储存一个月。

D. 产物质量检测

1. 使用 Qubit®ssDNA Assay Kit 对纯化后产物进行定量，具体操作请参照说明书。
2. Input DNA 为 1 pmol 时，最终单链环产物纯化后产量应 ≥ 80 fmol（足够 2 次上机测序）。

【公式 3：单链环摩尔数与质量间的换算】

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

表 2 不同 PCR 产物片段大小对应 80 fmol 单链环产量

插入片段主带大小 (bp)	PCR 产物主带大小 (bp)	80 fmol 对应产量 (ng)
150	300	7.92
200	350	9.24
250	400	10.56
300	450	11.88
350	500	13.20
400	550	14.52