



# Circularization Kit For MGI

## 环化试剂盒（MGI 平台）

**目录号：** CW3013S (16 rxns)

**保存条件：** Box 1: -20℃保存，干冰运输。

Box 2: 2℃~8℃保存，冰袋运输。

### 产品内容

#### Box 1: 环化试剂

Component	CW3013S
Splint Oligo	20 $\mu$ l
5×Splint Buffer	250 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	50 $\mu$ l
Digestion Buffer	20 $\mu$ l
Digestion Enzyme I	70 $\mu$ l
Digestion Enzyme III	25 $\mu$ l

#### Box 2: DNA纯化回收磁珠

Component	CW3013S
CMPure	1.5 ml/管×4管

## 产品介绍

环化试剂盒是针对华大智造（MGI）高通量测序平台量身打造的模块化试剂盒。使用本试剂盒可以将接头连接后的PCR产物制备成适用于MGI测序仪专用的单链环状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构建的稳定性和重复性。

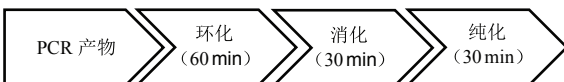
## 自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架：建议使用DynaMagTM-2 (Cat.No. 12321D)。
2. Qubit® 3.0 荧光定量仪（ThermoFisher, Cat. No. Q33216）
3. Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212)
4. 无水乙醇，EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0), NF Water (pH 在7.0-8.0之间)。
5. 反应管：建议使用低吸附的PCR管与1.5 ml EP管；  
枪头：建议使用高质量过滤枪头防止试剂盒、文库样本污染。

## 实验前准备及重要注意事项

1. 样本准备：
  - PCR 产物：总量 $\geq 330$  ng（多个 PCR 产物混合时，是指混合后的总量），体积 49  $\mu$ L（如果 PCR 产物本身体积不足，补充 NF Water 至总体积 49  $\mu$ l）。
  - PCR 产物片段大小：片段主峰在 200-500 bp 之间。
  - PCR 产物修饰：已加入适用于MGISEQ-2000、MGISEQ-200以及 BGISEQ-500等测序平台的固定序列（含Index）
2. 试剂准备
  - 取出试剂盒内对应试剂，短暂离心，酶混合液置于冰上待用；缓冲液使用前需在室温溶解后，震荡离心，置于冰上待用，NF Water和EB置于室温待用；
  - 请在冰上配制混合液；
  - 试剂盒内缓冲液溶解后可能出现沉淀，沉淀不影响试剂功能，请充分震荡混匀直至沉淀消失后使用。

## 环化流程示意图



## 操作步骤

### 环化

1. 向 49  $\mu\text{l}$  PCR 产物加入 1  $\mu\text{l}$  Splint Oligo，在 PCR 仪上进行 95 $^{\circ}\text{C}$  变性孵育 3 分钟，然后立即转移到冰浴，静置 2min。

组分	体积 ( $\mu\text{l}$ )
PCR产物	49
Splint Oligo	1
总体积	50

2. 在冰上按如下体系配制反应混合液：

组分	CW 体积 ( $\mu\text{l}$ )
5 $\times$ Splint Buffer	13
T4 DNA Ligase	2
总体积	15

3. 向 50  $\mu\text{l}$  变性后的 DNA 中加入上述 15  $\mu\text{l}$  反应混合液；
4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪上，如下条件反应：

温度	时间
热盖 38 $^{\circ}\text{C}$	On
37 $^{\circ}\text{C}$	60 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

### 酶切消化

1. 在冰上按如下体系配制消化反应液：

组分	体积 ( $\mu\text{l}$ )
Digestion Buffer	0.8
Digestion Enzyme I	3.9
Digestion Enzyme III	1.3
NF Water	2
总体积	8

2. 环化反应结束后，向环化体系中直接加入 8  $\mu$ l 消化反应液，混匀，短暂离心后将 PCR 管置于 PCR 仪上，如下条件反应：

组分	时间
热盖 38°C	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3. 反应结束后，立即进行纯化。

### 消化产物纯化

1. 提前 30 分钟取出 CMPure 置于室温，使用前充分震荡混匀；
2. 消化产物转移至 1.5 ml EP 管中，吸取 340  $\mu$ l CMPure 至消化产物中，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10 分钟；
3. 瞬时离心，将 EP 管置于磁力架，静置 5 分钟至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
4. 保持 EP 管固定于磁力架上，加入 250  $\mu$ l 新鲜配制的 80% 乙醇，室温静置 1 分钟后小心弃去上清；
5. 重复步骤 4 一次，尽量吸干管底液体；  
**注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。**
6. 保持 EP 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥 5-10 分钟；
7. 将 EP 管从磁力架上取下，加入 35  $\mu$ l EB 或 NF Water 进行 DNA 洗脱，移液器吹打混匀并室温下溶解 10 分钟；
8. 瞬时离心，将 EP 管置于磁力架上，静置 2 分钟至液体澄清，将上清液转移到新 EP 管中。-20°C 保存，待制备 DNB。

### 【文库质控】

使用 Qubit™ ssDNA Assay Kit 或者 Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Reagent 单链 DNA 定量试剂盒对文库进行定量。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途