

准备文库

制备DNB

测定DNB浓度

适用范围

试剂套装 / 试剂盒名称	货号
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-App-A)	1000026467
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-SB)	1000020563
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB)	1000026466
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 (SD)	1000027737
DNBSEQ DNB 制备试剂盒 (SD-App-A)	1000027738

准备文库

片段要求

OS-SB、OS-DB 和 OS-App-A 试剂盒

确认文库插入片段范围在 150 bp ~ 1500 bp。如 MGIEasy RNA 文库快速制备试剂套装 (货号: 1000020509) 所构建的文库, 或使用 MGIEasy 通用文库转换试剂盒 (App-A) (货号: 1000004155) 构建的接头转化 PCR 纯化产物。

提示

- OS-SB 需使用 MGI 接头的单 Barcode PCR 产物文库。
- OS-DB 需使用 MGI 接头的双 Barcode PCR 产物文库。
- OS-App-A 需使用 Truseq 接头或 Nextera 接头的 PCR 产物文库。

SD 和 SD-App-A 试剂盒

确认文库插入片段范围在 150 bp ~ 1500 bp, 如建库试剂盒说明书有特殊要求, 则以建库试剂盒说明书的片段要求为准。

提示

- 详细内容请参考相应的建库试剂盒说明书。
- SD 需使用 MGI 接头的环状文库。
- SD-App-A 需使用 Truseq 接头的环状文库。

文库要求

OS-SB、OS-DB 和 OS-App-A 试剂盒

- 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 和 Qubit 3 荧光定量仪定量文库。初始文库 dsDNA 浓度不小于 4 fmol/μL。
- 根据下列公式换算成 (fmol/μL) :

$$C(\text{fmol}/\mu\text{L}) = \frac{c(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^6}{N \times 2 \times 327}$$

N 表示核苷酸平均数目 (文库总片段长度, 包括接头序列长度), c 表示文库浓度。

- 计算文库投入量。

- 若 dsDNA 文库投入量为 80 fmol, 则每个 DNB 制备体系所需的文库投入量 V 为:

$$\text{文库投入体积 } V(\mu\text{L}) = \frac{80 \text{ fmol}}{C(\text{fmol}/\mu\text{L})}$$

- 若为 App-A 试剂盒, 文库投入量需要视情况保持在 80 ~ 130 fmol。
- 若为 SB 和 DB 试剂盒, 文库投入量为 80 fmol。

SD 和 SD-App-A 试剂盒

- 使用 Qubit ssDNA Assay Kit 和 Qubit 3 荧光定量仪定量出文库实际浓度。
 - 常规 ssDNA 初始文库浓度不小于 2 fmol/μL。
 - App-A ssDNA 初始文库浓度不小于 3 fmol/μL。
- 根据下列公式换算成 (fmol/μL) :

$$C(\text{fmol}/\mu\text{L}) = \frac{c(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 3030}{N}$$

准备文库

N 表示核苷酸平均数目 (文库总片段长度, 包括接头序列长度), c 表示文库浓度。

3. 计算文库投入量。

若 ssDNA 文库投入量为 40 fmol, 则每个 DNB 制备体系所需的文库投入量 V 为:

$$\text{文库投入体积 } V (\mu\text{L}) = \frac{40 \text{ fmol}}{C (\text{fmol}/\mu\text{L})}$$

提示

- App-A 文库投入量为 60 fmol。
- 如建库试剂盒说明书有特殊要求, 则以建库试剂盒说明书的文库要求为准。

制备 DNB

准备 DNB 制备试剂

OS-SB、OS-DB 和 OS-App-A 试剂盒

- 取出文库、TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液 (OS-SB) 或 DNB 制备缓冲液 (OS-DB) 或 DNB 制备缓冲液 (OS-App-A)、DNB 聚合酶混合液 I (OS) 和 DNB 终止缓冲液, 置于冰盒上约 0.5 小时。
- 待融化后, 用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒后, 短暂离心置于冰盒上备用。

提示

- 根据使用的试剂盒选择相应的 DNB 制备缓冲液。
- 此时切勿取出 DNB 聚合酶混合液 II (OS)。

SD 和 SD-App-A 试剂盒

- 取出文库、TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液或 App-A DNB 制备缓冲液、DNB 聚合酶混合液 I 和 DNB 终止缓冲液, 置于冰盒上约 0.5 小时。
- 待融化后, 使用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒后, 短暂离心置于冰盒上备用。

制备 DNB

提示

- 根据使用的试剂盒选择相应的 DNB 制备缓冲液。
- 此时切勿取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC)。

制备 DNB

OS-SB、OS-DB 和 OS-App-A 试剂盒

- 取用 0.2 mL 八联管或 PCR 管, 在冰上按如下体系配制反应混合液:

组分	加入量 (μL)
TE 缓冲液	20 - V
DNB 制备缓冲液 (OS)	20
文库 dsDNA	V
总体系	40

提示

根据使用的试剂盒选择相应的 DNB 制备缓冲液。

- 将反应混合液用漩涡振荡器振荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 置于 PCR 仪中反应, 反应条件如下:

温度	时间
105 °C (热盖)	on
95 °C	3 min
40 °C	3 min
4 °C	hold

- 取出 DNB 聚合酶混合液 II (OS), 短暂离心 5 秒, 置于冰盒上备用。

提示

- 请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (OS) 置于室温。
- 请勿长时间触碰管壁。

- 当 PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管, 迷你离心机离心 5 秒后, 在冰上加入如下组分:

准备文库

制备DNB

测定DNB浓度

组分	体系 (μL)
DNB 聚合酶混合液 I (OS)	40
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	4

5. 反应混合液用漩涡振荡器振荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 即刻置于 PCR 仪中, 反应条件如下:

温度	时间
35 °C (热盖)	on
30 °C	25 min
4 °C	hold

提示

- 对于热盖升降温速度慢的 PCR 仪, 需提前进行热盖预热, 确保进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。
- 热盖温度建议设置为 35 °C, 或尽可能设置为接近 35 °C 的最低温度。

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后, 立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液, 用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5 ~ 8 次。置于 4 °C 保存并于 48 小时内使用。

提示

DNB 一定要用阔口吸头缓慢吹打混匀。切勿离心、震荡及剧烈吹打。

SD 和 SD-App-A 试剂盒

1. 取用 0.2 mL 八联管或 PCR 管, 在冰上按如下体系配制反应混合液:

组分	加入量 (μL)
TE 缓冲液	20 - V
DNB 制备缓冲液或 App-A DNB 制备缓冲液	20
文库 ssDNA	V
总体系	40

提示

根据使用的试剂盒选择相应的 DNB 制备缓冲液。

2. 将反应混合液用漩涡振荡器振荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 置于 PCR 仪中反应, 反应条件如下:

温度	时间
105 °C (热盖)	on
95 °C	1 min
65 °C	1 min
40 °C	1 min
4 °C	hold

3. 取出 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于冰盒上, 短暂离心 5 秒, 置于冰盒上备用。

提示

- 请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于室温。
- 请勿长时间触碰管壁。

4. 当 PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管, 迷你离心机离心 5 秒后, 在冰上加入如下组分:

组分	体积 (μL)
DNB 聚合酶混合液 I	40
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	4

5. 反应混合液用漩涡振荡器振荡混匀, 迷你离心机离心 5 秒, 即刻置于 PCR 仪中, 反应条件如下:

温度	时间
35 °C (热盖)	on
30 °C	25 min
4 °C	hold

提示

- 对于热盖升降温速度慢的 PCR 仪, 需提前进行热盖预热, 确保进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。
- 热盖温度建议设置为 35 °C, 或尽可能设置为接近 35 °C 的最低温度。

6. 当 PCR 仪温度达到 4 °C 后, 立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液, 用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5 ~ 8 次。置于 4 °C 保存并于 48 小时内使用。

提示

DNB 一定要用阔口吸头缓慢吹打混匀。切勿离心、振荡及剧烈吹打。

准备文库

制备DNB

测定DNB浓度

测定DNB浓度

配制Qubit检测工作液

1. 从 Qubit ssDNA Assay Kit 试剂盒中取出 Qubit ssDNA Reagent、Qubit ssDNA Standard #1和 Qubit ssDNA Standard #2,用漩涡振荡器振荡混匀5秒,短暂离心后置于室温备用。

提示

Qubit ssDNA Reagent 需避光融化后混匀。

2. 按照下表配制 Qubit 检测工作液。

组分	加入量 (μL)
Qubit ssDNA Buffer	199 × (N+3)
Qubit ssDNA Reagent	1 × (N+3)

提示

N 表示需定量的 DNB 反应混合液数量。

3. 用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒,短暂离心后,根据下表添加试剂。

试剂	标准品检测管 1	标准品检测管 2	DNB 检测管
工作液	190 μL	190 μL	198 μL
Qubit ssDNA Standard #1	10 μL	/	/
Qubit ssDNA Standard #2	/	10 μL	/
DNB	/	/	2 μL

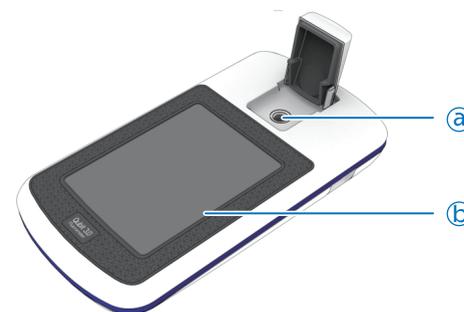
4. 用漩涡振荡器振荡混匀 5 秒,短暂离心后在室温下避光孵育 2 分钟。完成后,进行浓度测定。

提示

操作过程中,避免检测管的管壁外侧与其它物体直接接触,以防管壁温度过高影响测定浓度的数值。

测定DNB浓度

下文以Qubit 3 Fluorometer为例。a为检测室,用于放置检测管;b为触摸屏,用于仪器操作和结果显示。



1. 点击【Oligo】>【ssDNA】>【读取标准值】,开始检测。
2. 放入标准品 #1 检测管,盖上盖子,点击【读取标准值】,完成后取出。
3. 放入标准品 #2 检测管,盖上盖子,点击【读取标准值】。
4. 检测完成后,点击【运行样品】,将体积设为 10 μL,浓度单位设为 ng/μL。
5. 点击【读取试管】。浓度要求为 19.9 ng/μL~20 ng/μL,否则,重复步骤 2~5。
6. 取出标准品 #2 检测管。重新设置体积为 2 μL,浓度单位为 ng/μL。
7. 放入样本检测管,盖上盖子,点击【读取试管】。此时,屏幕上会显示检测浓度。
 - 若浓度小于 8 ng/μL,重新制备 DNB。
 - 若浓度大于 40 ng/μL,用 DNB 加载缓冲液 I 稀释至 20 ng/μL 后使用。
8. 重复步骤 7,检测剩余样本。

提示

如 DNB 数量较多,建议分批定量,避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准。