

**Rai**ssol<sup>™</sup>  
**Bio**

**Набор реагентов для приготовления библиотек из ампликонов**

**«SG GM Ampli»**

## #SG\_GM\_ampli\_test-24 #SG\_GM\_ampli-96 #SG\_GM\_ampli-192

Набор реагентов предназначен для приготовления библиотек из ампликонов размером от 70 п.н. до 600 п.н. В набор включены все необходимые реагенты для приготовления библиотек из ампликонов:

1. 3в1 буфер;
2. 3-фермент А;
3. Лигазный буфер;
4. Лигаза;
5. Адаптеры;
6. ПЦР буфер;
7. ПЦР фермент 1;
8. ПЦР фермент 2.

Все компоненты набора «SG GM Ampli» необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев.

Необходимые материалы и оборудование: микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл; штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл; пробирки в стрипах либо 96-луночный планшет объемами 0,2 мл; автоматические дозаторы переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники; вортекс; центрифуга для пробирок в стрипах объемом 0,2 мл либо для 96-луночных планшетов; амплификатор; магнитный штатив.

Необходимые реагенты: магнитные частицы для селективной очистки ДНК, например, «Smart beads» Raissol™ (#smartb 50/120/240), или аналоги технологии SPRI; деионизированная вода; ТЕ буфер с низким содержанием ЭДТА; 80% этанол; праймеры – комплект индексов 1 (#Plate1\_SG\_GM); праймеры – комплект индексов 2 (#Plate2\_SG\_GM).

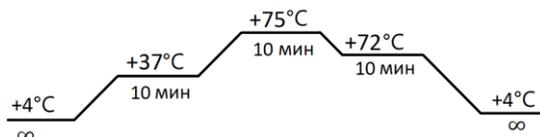
### Проведение процедуры приготовления библиотек

#### Репарация

1. Внести 10 мкл очищенных фрагментов ДНК с концентрацией от 1 до 10 нг/мкл в пробирки в стрипах либо в 96-луночный планшет объемом 0,2 мл. Концентрация для ампликонов должна быть установлена спектрофотометрически с применением интеркаляторов (#spectrahs-100/500/1000; #spectrabr-100/500/1000).
2. Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
3в1 буфер	13,4
3-фермент А	1,6

3. Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Внести 15 мкл мастер-микса к образцам.
5. Поместить пробирки в амплификатор с предварительно установленной программой для репарации после выхода прибора в рабочее состояние 1-го этапа:



6. После установки пробирок в амплификатор необходимо пропустить первый этап.

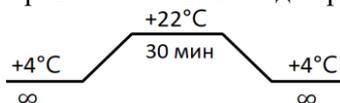
#### Лигирование

1. Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
Лигазный буфер	20,5
Адаптеры	3,5
Лигаза	1

2. Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. После завершения программы репарации, внести 25 мкл мастер-микса к образцам.

- Установить программу для лигирования. Поместить пробирки в амплификатор с предварительно установленной программой для лигирования после выхода прибора в рабочее состояние 1-го этапа:



- После установки пробирок в амплификатор необходимо пропустить первый этап.

### Очистка после лигирования

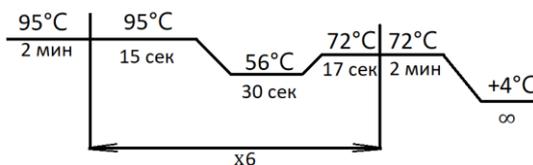
- К образцам, содержащим фрагменты <150 п.н., добавить 60 мкл магнитных частиц, к образцам, содержащим фрагменты >150 п.н., добавить 50 мкл магнитных частиц, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.
- Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
- Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
- Добавить 180 мкл 80% этанола к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе, меняя их положение относительно магнита. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
- Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
- Добавить 24 мкл деионизированной воды к магнитным частицам. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
- Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
- Перенести 22 мкл элюата в новые пробирки, не захватывая магнитные частицы.

### Постановка индексной ПЦР

- Добавить к каждому образцу по 2 мкл индивидуального праймерного микса из планшета с праймерами (#Plate1\_SG\_GM/#Plate2\_SG\_GM).
- Приготовить мастер-микс на необходимое количество реакций:

Название реагента	мкл на 1 реакцию
ПЦР буфер	25
ПЦР фермент 1	0,5
ПЦР фермент 2	0,75

- Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
- Внести по 26,25 мкл мастер-микса к образцам.
- Поместить пробирки в амплификатор. Запустить программу для индексной ПЦР:



### Очистка после индексной ПЦР

- К образцам, содержащим фрагменты <150 п.н., добавить 60 мкл магнитных частиц, к образцам, содержащим фрагменты >150 п.н., добавить 50 мкл магнитных частиц, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.
- Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
- Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
- Добавить 180 мкл 80% этанола к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе. Аккуратно, не задевая частицы, удалить супернатант.
- Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
- Добавить 22 мкл ТЕ буфера с низким содержанием ЭДТА к осадку частиц. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
- Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.

8. Перенести 20 мкл элюата в новые пробирки.

Полученные ДНК библиотеки могут храниться при +4°C в течение суток или при -20°C более длительный срок. ДНК библиотеки могут быть использованы в дальнейшей подготовке к секвенированию.