

Rai**sol**TM
Bio

Набор реагентов для приготовления полногеномных библиотек

«SG GM»

#SG_GM_test-24 #SG_GM-96 #SG_GM-192

Набор реагентов предназначен для приготовления полногеномных библиотек с применением ферментативного фрагментирования геномной ДНК и ампликонов размерами от 800 п.н. В набор включены все необходимые реагенты для приготовления полногеномных библиотек:

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

Все реагенты набора «SG GM» 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; амплификатор; магнитный штатив планшетного типа для пробирок объемом 0,2 мл.

Необходимые реагенты: магнитные частицы для селективной очистки ДНК, например, «Smart beads» Raissol™ (#smartb 50/120/240), или аналоги технологии SPRI; деионизированная вода; TE буфер с низким содержанием ЭДТА; 80% этанол; праймеры – комплект индексов 1 (#Plate1_SG_GM); праймеры – комплект индексов 2 (#Plate2_SG_GM).

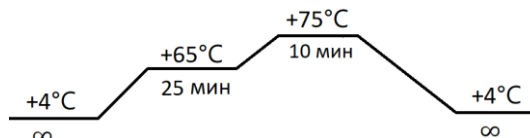
Проведение процедуры приготовления полногеномных библиотек

Фрагментация

1. Внести 10 мкл образца ДНК с концентрацией 20 нг/мкл (для геномной ДНК) или 10 нг/мкл (для ампликонов) в пробирки в стрипах либо в 96-луночный планшет объемом 0,2 мл. Концентрация должна быть установлена: 1) для геномной ДНК – спектрофотометрически при длине волны 260 нм 2) для ампликонов – 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	1,6
ДНК-нуклеаза	1

3. Перемешать мастер-микс, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Внести 16 мкл мастер-микса к образцам.
5. Поместить пробирки в амплификатор с предварительно установленной программой для фрагментации после выхода прибора в рабочее состояние 1-го этапа:



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

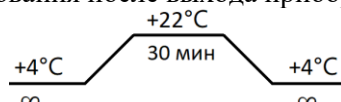
Примечание: при использовании ДНК-нуклеазы для фрагментирования ДНК на необходимый размер следует провести предварительное тестирование времени фрагментации (полка 2: +65°C) с шагом 2,5 минуты для установления оптимального размера (уменьшение времени приводит к увеличению размера продукта). Рекомендованная программа рассчитана на средний размер продукта 140-160 п.н.

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 фрагментации внести 25 мкл мастер-микса к образцам.
4. Установить программу для лигирования. Поместить пробирки в амплификатор с предварительно установленной программой для лигирования после выхода прибора в рабочее состояние 1-го этапа:



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

Очистка после лигирования

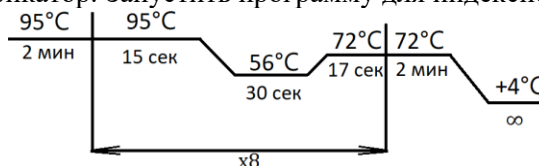
1. Добавить 45 мкл магнитных частиц к каждому образцу, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
3. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. 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.
5. Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
6. Добавить 24 мкл деионизированной воды к осадку частиц. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
7. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
8. Перенести 22 мкл элюата в новые пробирки, не захватывая магнитные частицы.

Постановка индексной ПЦР

1. Добавить к каждому образцу по 2 мкл индивидуального праймерного микса из планшета с праймерами (#Plate1_SG_GM/#Plate2_SG_GM).
2. 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

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



Очистка после индексной ПЦР

1. Добавить 50 мкл магнитных частиц к каждому образцу, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
3. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.

4. Добавить 180 мкл 80% этанола к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
5. Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
6. Добавить 22 мкл ТЕ буфера с низким содержанием ЭДТА к осадку частиц. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
7. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
8. Перенести 20 мкл элюата в новые пробирки.

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