

**Rai**ssol<sup>TM</sup>  
**Bio**

**Набор для приготовления полногеномных библиотек размером  
более 300 п.н.**

**«SG GM Maxi Plus»**

## #SG\_GM\_maxi\_plus-96 # SG\_GM\_maxi\_plus-192

**Набор реагентов предназначен для приготовления полногеномных библиотек размером более 300 п.н. с применением ферментативного фрагментирования геномной ДНК. В набор включены все необходимые реагенты для приготовления полногеномных библиотек:**

1. 3v1 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;
10. Элюирующий буфер;
11. Магнитные частицы.

**Ферменты и буферы** набора «**SG GM Maxi Plus**» необходимо хранить при температуре от -20°C до -15°C, срок хранения составляет 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

**Магнитные частицы и элюирующий буфер** набора «**SG GM Maxi Plus**» могут храниться при температуре от +4°C до +8°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

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 планшетного типа для пробирок объемом 0,2 мл.

Необходимые реагенты: 80% этанол; праймеры – комплект индексов 1 (#Plate1\_SG\_GM), праймеры – комплект индексов 2 (#Plate2\_SG\_GM).

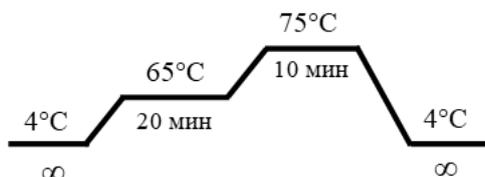
## Проведение процедуры приготовления полногеномных библиотек

### Фрагментация

1. Внести 10 мкл образца ДНК с концентрацией 30 нг/мкл в пробирки в стрипах либо в 96-луночный планшет объемом 0,2 мл. Концентрация должна быть установлена: спектрофотометрически при длине волны 260 нм.
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.

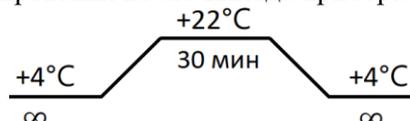
**Примечание:** рекомендованная программа рассчитана на средний размер продукта 300-350 п.н.

### 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 35 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. Повторно центрифугировать образцы на максимальных оборотах центрифуги в течение 10-20 с.
5. Поместить образцы на магнитный штатив, аккуратно, не задевая осадок частиц, максимально удалить остатки супернатанта.
6. Добавить 24 мкл элюирующего буфера 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.

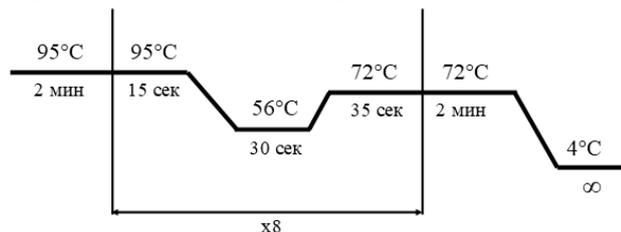
### Постановка индексной ПЦР

1. Добавить к каждому образцу по 2 мкл индивидуального праймерного микса из планшета с праймерами (#Plate1\_SG\_GM/#Plate2\_SG\_GM).

- 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

- Добавить 35 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.
- Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
- Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
- 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.
- 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 элюирующего буфера 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.
- 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.