



**Набор реагентов для приготовления полногеномных библиотек в
широком диапазоне размеров
«SG GM Ultra»**

#SG_GM_ultra-96 #SG_GM_ultra-192

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

1. 3в1 буфер;
2. 3-фермент;
3. Нуклеаза Mini;
4. Нуклеаза Maxi;
5. Лигазный буфер;
6. Лигаза;
7. Адаптеры;
8. ПЦР буфер;
9. ПЦР фермент 1;
10. ПЦР фермент 2;
11. Элюирующий буфер;
12. Магнитные частицы.

Ферменты и буферы набора «SG GM Ultra» необходимо хранить при -20°C, срок хранения составляет 12 месяцев с даты выпуска изготовителя.

Магнитные частицы и элюирующий буфер набора «SG GM Ultra» 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 объемом 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), праймеры – комплект индексов 3 (#Plate3_SG_GM), праймеры – комплект индексов 4 (#Plate4_SG_GM).

Проведение процедуры приготовления полногеномных библиотек

Фрагментация

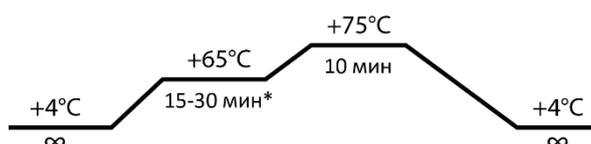
	концентрация ДНК
Нуклеаза Mini	20 нг/мкл (для геномной ДНК) или 10 нг/мкл (для ампликонов)
Нуклеаза Maxi	30 нг/мкл для геномной ДНК

1. Внести 10 мкл образца ДНК 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
Нуклеаза Mini/Maxi	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.



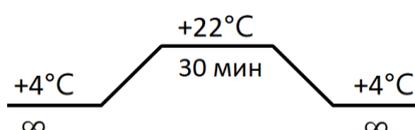
*при использовании Нуклеазы Mini/Maхи для фрагментирования ДНК на желаемый размер установить время фрагментации (полка: 65°C) согласно Приложению 1/2.

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

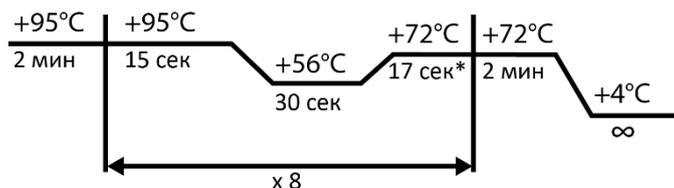
1. В зависимости от ожидаемого размера продукта, добавить магнитные частицы к каждому образцу, согласно Приложению 1/2.
2. Интенсивно перемешать образцы на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
4. Аккуратно, не задевая магнитные частицы, удалить супернатант.
5. Повторно центрифугировать образцы при макс. об/мин в течение 10-20 секунд.
6. Поместить образцы на магнитный штатив, аккуратно, не задевая магнитные частицы, максимально удалить остатки супернатанта.
7. Добавить 24 мкл элюирующего буфера к магнитным частицам. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
8. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
9. 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; #Plate3_SG_GM; #Plate4_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.



* 17 секунд на этапе элонгации соответствует размеру библиотеки 300 п.н.; при увеличении размера библиотеки на каждые 100 п.н. необходимо увеличивать время этапа элонгации на 10 секунд (например, 400 п.н. – 27 секунд элонгации; 450 п.н. – 32 секунды и т.д.).

Очистка после индексной ПЦР

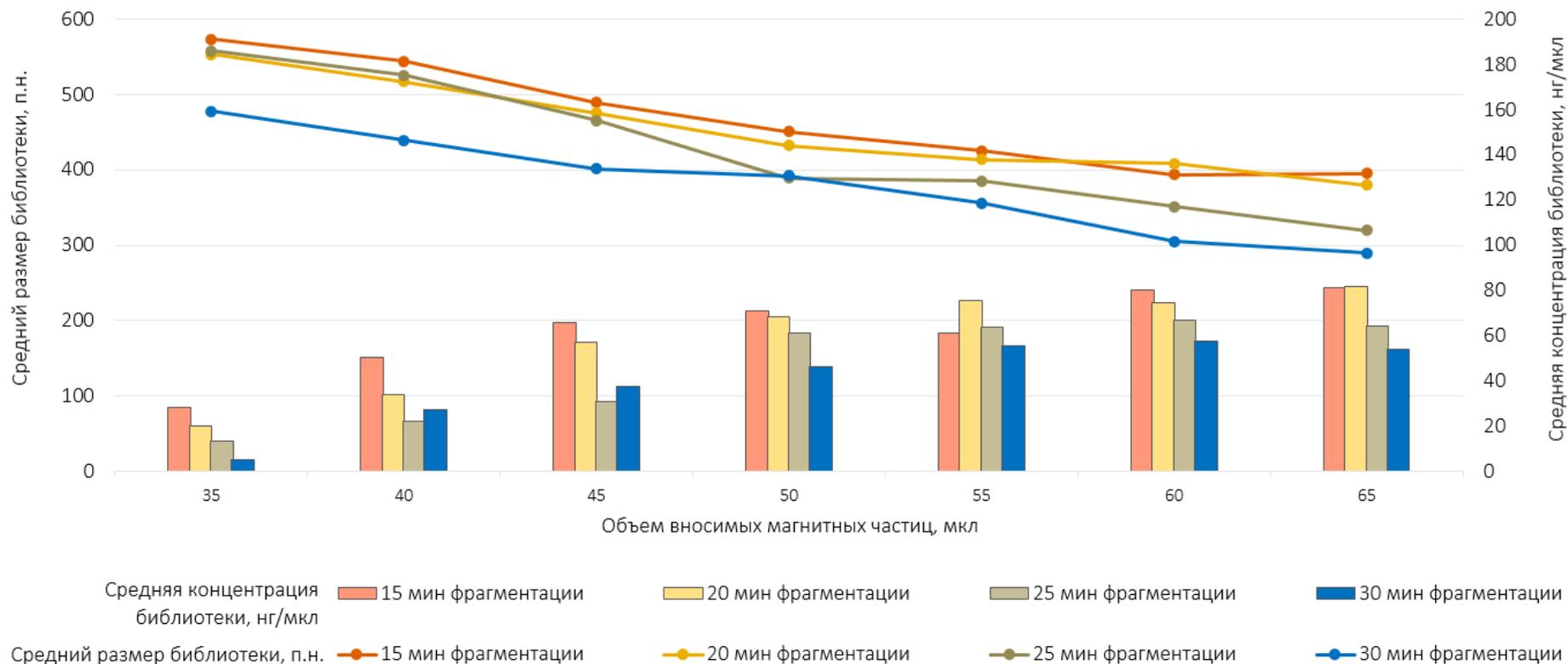
1. В зависимости от ожидаемого размера продукта, добавить магнитные частицы к каждому образцу, согласно Приложению 1/2.
2. Интенсивно перемешать образцы на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
4. Аккуратно, не задевая магнитные частицы, удалить супернатант.
5. Добавить 180 мкл 80% этанола к каждому образцу, инкубировать в течение 30 секунд, перемещая пробирки на магнитном штативе. Аккуратно, не задевая магнитные частицы, удалить супернатант.
6. Повторить пункт 4. Высушить образцы с открытыми крышками при комнатной температуре в течение 10 минут или при +37°C до полного испарения спирта.
7. Добавить 22 мкл элюирующего буфера к магнитным частицам. Интенсивно перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
8. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 2-3 минут до прозрачности раствора.
9. 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.

Приложение 1

к набору реагентов для приготовления полногеномных библиотек в широком диапазоне размеров «SG GM Ultra»

Зависимость размера библиотек от времени фрагментации "Нуклеаза Mini" и количества магнитных частиц SmartBeads®



Приложение 2

к набору реагентов для приготовления полногеномных библиотек в широком диапазоне размеров «SG GM Ultra»

Зависимость размера библиотек от времени фрагментации "Нуклеаза Maxi" и количества магнитных частиц SmartBeads®

