

RaissolTM
Bio

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

«SG GM Maxi»

#SG_GM_maxi-test #SG_GM_maxi-96 #SG_GM_maxi-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.

Все реагенты набора «**SG GM Maxi**» необходимо хранить при температуре от -20°C до -15°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 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.

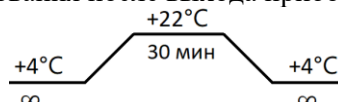
Примечание: рекомендованная программа рассчитана на средний размер продукта 300-350 п.н.

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

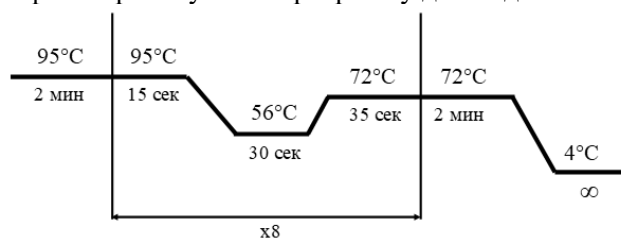
1. Добавить 35 мкл магнитных частиц к каждому образцу, интенсивно перемешать на вортексе до гомогенного состояния, инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Поместить образцы на магнитный штатив, инкубировать в течение 3-5 минут до прозрачности раствора.
3. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удалить супернатант.
4. 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 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. 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 TE 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.