

## iCloning

克劳宁（北京）生物科技有限公司

产品名称: Topomize DNA LT Library Prep Kit

Cat #: TOPO-100A, TOPO-100B

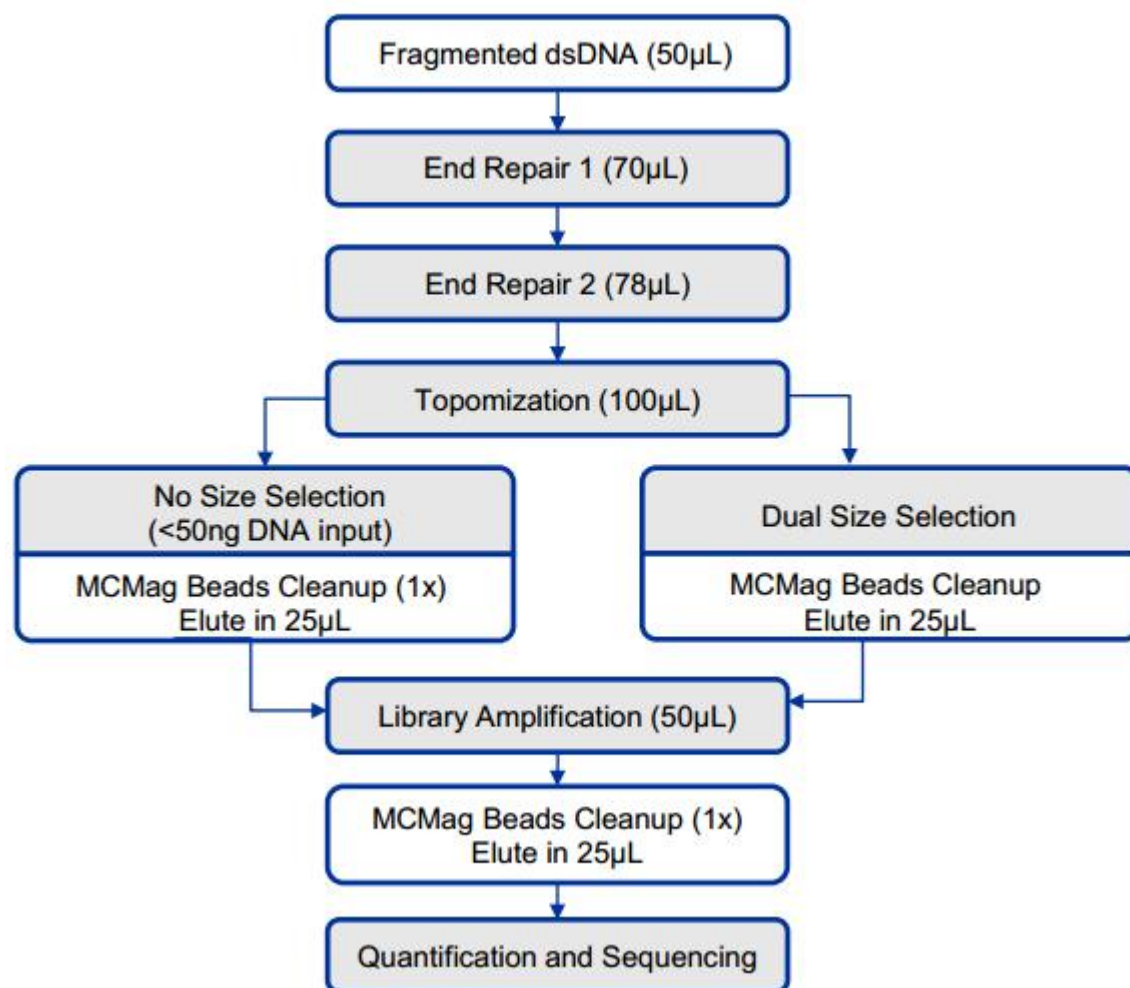
储存条件: -20℃ 保存

### 制品说明:

MCLAB 的 Topomize 扩增子文库制备试剂盒是一种新型的快速、高质量的二代测序 DNA 文库制备试剂盒,适用于遗传性疾病检测和癌症相关基因变异的研究。获得 PCR 扩增子文库后,可用该试剂盒快速加带条形码(1-24)的接头,进行深度测序。该试剂盒使用拓扑异构酶取代传统的连接酶在扩增子上加带条形码(1-24)的接头,高产、高效、不会产生接头二聚体和片段嵌合体。PCR 产物初始量为 10ng-1ug,整个文库制备工作流程最多需要 40 分钟。

本产品用于 Illumina 测序平台在 PCR 扩增子上加带条形码(1-24)的接头序列,生成单向测序或双向测序的文库。

### 操作流程:



# 操作手册

## iCloning

克劳宁（北京）生物科技有限公司

### 产品组分

- 1、该试剂盒有两种规格（A和B），每种规格的试剂盒均可做24个样本。如果两种试剂盒一起使用，可以满足24个样本使用两种试剂盒中的12个不同的index。
- 2、每种Topomize DNA LT Library Prep Kit包含：A规格或B规格试剂盒和MCMag磁珠试剂盒。

| 试剂                                                       | 盖子颜色 |
|----------------------------------------------------------|------|
| End Repair Mix 1                                         | 黄色   |
| End Repair Mix 2                                         | 黄色   |
| Topomized Adapters (12)                                  | 蓝色   |
| Topomization Mix                                         | 蓝色   |
| 2x MCamp Mix                                             | 红色   |
| Primer Mix                                               | 红色   |
| MCMag Beads (5 ml)                                       |      |
| Resuspension Buffer                                      | 透明   |
| Sequencing Primers (200μM)<br>(Read 1/Index Read/Read 2) | 绿色   |

试剂盒1/2： A规格或B规格样本试剂盒 保存于-25℃~ -15℃

| 数量 | A规格试剂                               | B规格试剂                               |
|----|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1  | End Repair Mix 1                    | End Repair Mix 1                    |
| 1  | End Repair Mix 2                    | End Repair Mix 2                    |
| 1  | Topomization Mix                    | Topomization Mix                    |
| 1  | Primer Mix                          | Primer Mix                          |
| 1  | 2X MCamp Mix                        | 2X MCamp Mix                        |
| 1  | Resuspension Buffer                 | Resuspension Buffer                 |
| 1  | Topomized adapter Index 2 (CGATGT)  | Topomized adapter Index 1 (ATCACG)  |
| 1  | Topomized adapter Index 4 (TGACCA)  | Topomized adapter Index 3 (TTAGGC)  |
| 1  | Topomized adapter Index 5 (ACAGTG)  | Topomized adapter Index 8 (ACTTGA)  |
| 1  | Topomized adapter Index 6 (GCCAAT)  | Topomized adapter Index 9 (GATCAG)  |
| 1  | Topomized adapter Index 7 (CAGATC)  | Topomized adapter Index 10 (TAGCTT) |
| 1  | Topomized adapter Index 12 (CTTGTA) | Topomized adapter Index 11 (GGCTAC) |
| 1  | Topomized adapter Index 13 (AGTCAA) | Topomized adapter Index 20 (GTGGCC) |
| 1  | Topomized adapter Index 14 (AGTTCC) | Topomized adapter Index 21 (GTTTCG) |
| 1  | Topomized adapter Index 15 (ATGTCA) | Topomized adapter Index 22 (CGTACG) |
| 1  | Topomized adapter Index 16 (CCGTCC) | Topomized adapter Index 23 (GAGTGG) |
| 1  | Topomized adapter Index 18 (GTCCGC) | Topomized adapter Index 25 (ACTGAT) |
| 1  | Topomized adapter Index 19 (GTGAAA) | Topomized adapter Index 27 (ATTCTT) |
| 1  | Sequencing Primer Read 1            | Sequencing Primer Read 1            |
| 1  | Sequencing Primer Index Read        | Sequencing Primer Index Read        |
| 1  | Sequencing Primer Read 2            | Sequencing Primer Read 2            |

试剂盒2/2： MCMag磁珠试剂盒 保存于2℃~8℃

| 数量 | A规格试剂   | B规格试剂   |
|----|---------|---------|
| 1  | MCMag磁珠 | MCMag磁珠 |

### 下游实验需要但试剂盒中不提供的试剂及材料

片段化的DNA样本、超声波DNA破碎仪、新鲜制备的80%乙醇、无核酸酶水、移液器和tip头（10 $\mu$ l、100 $\mu$ l、1000 $\mu$ l）、PCR管、离心管:1.5ml、离心管架、磁力架、PCR仪、离心机、涡旋振荡器、生化分析仪（可选）、水平电泳仪（可选）、Real-time PCR仪器（可选）、荧光光谱仪（可选）

### 操作步骤:

#### 一、末端修复反应1

1、无核酸酶处理的PCR离心管中加入下列试剂，用tip反复吸几次，轻轻混匀，瞬时离心将试剂离至管底。

| 试剂                   | 试剂量        |
|----------------------|------------|
| End Repair Mix 1     | 20 $\mu$ l |
| 片段化DNA10ng-1 $\mu$ g | 50 $\mu$ l |
| 终体积                  | 70 $\mu$ l |

2、PCR仪上热盖反应：50 $^{\circ}$ C 25分钟，75 $^{\circ}$ C 10分钟，4 $^{\circ}$ C保温。

#### 二、末端修复反应2

1、无核酸酶处理的PCR离心管中加入下列试剂，用tip反复吸几次，轻轻混匀，瞬时离心将试剂离至管底。

| 试剂                    | 试剂量        |
|-----------------------|------------|
| End Repair Reaction 1 | 70 $\mu$ l |
| End Repair Mix 2      | 8 $\mu$ l  |
| 终体积                   | 78 $\mu$ l |

2、PCR仪上热盖反应：72 $^{\circ}$ C 5分钟，4 $^{\circ}$ C保温。

3、立即进行下一步实验。

#### 三、Topomization反应（冰上操作）

1、在上一步PCR离心管中加入下列试剂，用tip反复吸几次，轻轻混匀，瞬时离心将试剂离至管底。

| 试剂                | 试剂量         |
|-------------------|-------------|
| End Repair 反应液    | 78 $\mu$ l  |
| Topomization Mix  | 20 $\mu$ l  |
| Topomized adapter | 2 $\mu$ l   |
| 终体积               | 100 $\mu$ l |

2、PCR仪上热盖反应：16 $^{\circ}$ C 15分钟，4 $^{\circ}$ C保温。

3、立即进行下一步实验。

#### 四、筛选DNA片段大小及DNA纯化（DNA $\geq$ 50ng，片段大小根据客户要求，使用1 $\times$ 的磁珠进行常规的纯化）

1、将上述反应液移至一1.5ml离心管中。

2、涡旋震荡使MCMag 磁珠重新悬起。

3、用PCR级的水稀释MCMag 磁珠，每100 $\mu$ l末端修复样本需要加入160 $\mu$ l稀释后的磁珠。

# 操作手册

## iCloning

克劳宁（北京）生物科技有限公司

| 文库片段大小 | 计算公式             |           | 多个样本（多出10%） | 您的计算结果 |
|--------|------------------|-----------|-------------|--------|
| 350bp  | 磁珠               | 样本数×85 ul | 样本数×93.5 ul |        |
|        | H <sub>2</sub> O | 样本数×75 ul | 样本数×82.5 ul |        |
| 550bp  | 磁珠               | 样本数×70 ul | 样本数×77 ul   |        |
|        | H <sub>2</sub> O | 样本数×90 ul | 样本数×99 ul   |        |

- 4、涡旋震荡稀释过的磁珠，充分悬起，在步骤三的产物（100 ul）中加入160ul稀释好的磁珠，轻轻上下颠倒数次，充分混匀。
- 5、室温孵育5分钟，将样品放在磁力板上，作用5分钟左右，至溶液清亮。
- 6、转移250ul上清液至一新的离心管。**注意：请勿丢弃上清液。**
- 7、涡旋震荡未稀释的磁珠原液，充分悬起，每个样本中加入30 ul未稀释的磁珠原液，轻轻上下颠倒数次，充分混匀。
- 8、室温孵育5分钟，将样品放在磁力板上，作用5分钟左右，至溶液清亮。弃上清（在磁力板上操作）。
- 9、加入200ul 新鲜配制的80%的乙醇，反应30秒，弃上清。**注意：一定要在磁力板上才做，不要重新悬浮磁珠。**
- 10、重复步骤9。
- 11、用20 ul的移液器去除残留的乙醇。
- 12、室温下放置5分钟，利用空气晾干样品。不要过分干燥，会降低靶DNA的量。
- 13、加入25 ul Resuspension Buffer，将离心管从磁力板上拿下来，吹打混匀，室温孵育2分钟。**注意：洗脱时，样品板必须从磁力板上拿下，确保将珠子重新悬起。**
- 14、将样品放在磁力板上，作用2-5分钟，或至溶液清亮，保持样品在磁力板上，取23 ul 上清至一新的PCR管中。**注意：纯化好的样品可以-20℃条件下保存7天。**

## 五、PCR反应

### （一）反应

- 1、按照下表顺序（从上到下）在200ul PCR管中加入试剂（终体积为50ul），然后，轻轻上下颠倒离心管5次，混匀，然后室温环境下，280g速度离心1分钟。

| 试剂           | 试剂量   |
|--------------|-------|
| 上一步纯化好的DNA   | 23 ul |
| 2x MCamp Mix | 25 ul |
| Primer Mix   | 2 ul  |
| 终体积          | 50 ul |

- 2、PCR上设置程序（热盖）：

|    | 温度（℃） | 时间   | 循环数     |
|----|-------|------|---------|
| 变性 | 95    | 10分钟 |         |
| 扩增 | 98    | 10秒  | X（N）个循环 |
|    | 60    | 30秒  |         |
|    | 72    | 30秒  |         |
| 延伸 | 72    | 2分钟  |         |
| 保温 | 10    |      |         |

注：

| 初始模板量 | （N）循环数 |
|-------|--------|
| 10ng  | 10-12  |
| 50ng  | 8-10   |
| 100ng | 6-8    |
| 250ng | 4-6    |
| 500ng | 3-5    |
| 1ug   | 2-4    |

**iCloning**  
克劳宁（北京）生物科技有限公司

克劳宁（北京）生物科技有限公司  
北京市海淀区中关村西区天创科技大厦407A  
邮编：100080  
China

电话：0086-10-62698317  
传真：0086-10-62698352  
电邮：icloning@icloning.cn  
网站：www.icloning.cn

## iCloning

克劳宁（北京）生物科技有限公司

### （二）纯化PCR产物

- 1、将上一步PCR产物（50ul）全部转移至一1.5 ml的离心管中，加入50 ul MCMag 磁珠，轻轻上下颠倒10次，充分混匀。
- 2、室温孵育5分钟，将样品放在磁力板上，作用5分钟左右，至溶液清亮，弃上清（在磁力板上操作）。
- 3、加入200ul 新鲜配制的80%的乙醇，反应30秒，弃上清。**注意：一定要在磁力板上才做，不要重新悬浮磁珠。**
- 4、重复步骤3。
- 5、用20 ul的移液器去除残留的乙醇。
- 6、室温下放置5分钟，利用空气晾干样品。不要过分干燥，会降低靶DNA的量。
- 7、加入27 ul Resuspension Buffer，将离心管从磁力板上拿下来，吹打混匀，室温孵育2分钟。**注意：洗脱时，样品板必须从磁力板上拿下，确保将珠子重新悬起。**
- 8、将样品放在磁力板上，作用2-5分钟，或至溶液清亮，保持样品在磁力板上，取25 ul 上清（纯化好的DNA文库）至一新的PCR管中，务必不要吸到磁珠。

### 六、验证和定量

- 1、纯化后的样本可以用琼脂糖凝胶电泳或者生物分析仪检测。用水1:2稀释样本（比如，3ul 样本加6 ul水），用高灵敏度的生物分析芯片进行检测。
- 2、使用MCNext™ SYBR® Fast qPCR Library Quantification Kit进行定量检测。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。