

## MagPure CleanSeq LQ Kit (DTR Solution)

(从测序反应液中去掉游离的 BigDye 荧光探针)

### 简介

在自动测序应用中，未掺入的荧光染料(BigDye)会影响到测序结果。因此，在测序仪上样之前(如3730 DNA 测序仪)，须对测序反应液进行纯化，以去除未掺入的荧光染料。MagPure A2 为自动测序前的样品制备提供了经济、快速且高通量的解决方案。结合该纯化试剂盒，可将 BigDye 稀释至 32 倍，仍能得到理想的测序结果。推荐使用 Biomex 3000, FX or NX 移液工作站。

### 试剂盒组成

编号	BCS-5	BCS-50	BCS-500
DTR Solution	5 ml	50ml	500ml

### 保存条件

DTR 室温运输。收到该试剂后请于 2-8°C 保存。该试剂可以在 2-8°C 保存一年。

### 测序反应液体积与次数

PCR 体积	BCS-5 5 ml	BCS-50 50ml	BCS-500 500ml
5µl	1000 次	10,000 次	100,000 次
10µl	500 次	5,000 次	50,000 次

### 准备工作

- 85%乙醇
- 0.1mM EDTA, pH8.0 或灭菌水(pH7.0-8.0)
- 8 通道移液枪
- 磁力架

### 操作流程

- 96 孔操作流程 (5µl)
  1. 从PCR 仪取下 PCR 板(反应体系 5µl)，瞬时离心把管壁的液滴甩下。
  2. 取出 DTR，振荡使磁珠充分重悬。**每一个反应液中加入 5µl DTR 和 21µl 85%乙醇**。封膜后振荡混匀。静置 10 min，期间振荡混匀 1-2 次。  
(85%乙醇必须是新鲜的配制的。不要使用变性的乙醇)
  3. 转移至磁力架上，静置 10 分钟富集磁珠，带磁力架倒丢上清。
  4. 用排枪加入 50µl 85%乙醇至每一个孔中。静置 60 秒。带磁力架倒丢上清。
  5. 重复第 4 步一次。
  6. 尽量甩弃管内液滴。倒置于烘箱 65°C 干燥 3 分钟。室温正放 8~10 分钟进一步干燥。
  7. 加入 25µl Water 或 Elute Seq，封膜后振荡混匀使溶解分散，瞬时离心甩至管底；可反复多次以确保磁珠充分混匀分散。取出室温放置 5 分钟。
  8. 转移至磁力架上吸附 10 分钟，使用排枪小心转移 10µl 至 384 上机板上机；剩余样品（带磁珠）板放 -20°C 冰箱保存。
- 384 孔操作流程 (5µl)
  1. 从PCR 仪取下已完成的 PCR 板(反应体系 5µl)，瞬时离心把管壁的液滴甩下。
  2. 取出 DTR，振荡使磁珠充分重悬。**每一个测序反应液中加入 5µl DTR 和 21µl 85%乙醇**。封膜后振荡混匀。静置 10 min，期间振荡混匀 1-2 次。
  3. **把 384 孔板转移至 384 孔磁力架上，静置 5-10 分钟富集磁珠。**小心吸弃上清液；
  4. 加入 30µl 85%乙醇至每一个孔中。静置 30 秒。小心吸弃上清液；
  5. 重复第 4 步一次；
  6. 空气干燥 10~15 分钟。彻底吸弃残留的溶液。彻底干燥

去除乙醇对下游的应用非常重要。若有必要，可以放置在 37°C 烘箱干燥。

7. 从磁力架上取下 96 孔板中。加入 15-20 $\mu$ l Water 或 Elute Seq **至每一个孔中**。吸打 15 次或涡旋振荡 1 分钟充分重悬磁珠。室温静置 5 分钟。
8. 转移至磁力架上静置 5-10 分钟富集磁珠。把 DNA 转移至新的 96 孔板(可直接上测序仪)中。

#### ● 96 孔操作流程 (其它体积)

1. 从 PCR 仪取下 PCR 板(反应体系，瞬时离心把管壁的液滴甩下。
2. 取出 DTR，振荡使磁珠充分重悬。每一个测序反应液中加入 10 $\mu$ l DTR。
3. **按下表加入适量的 85%乙醇**。用移液枪吸打混匀 15 次。(85%乙醇必须是新鲜的配制的。不要使用变性的乙醇)

测序反应体积	85%乙醇的体积
10 $\mu$ l	42 $\mu$ l
15 $\mu$ l	52 $\mu$ l
20 $\mu$ l	62 $\mu$ l

4. **把96 孔板转移至 96 孔磁力架上，静置 10 分钟富集磁珠**。小心吸弃上清液；
5. 加入 100 $\mu$ l 85%乙醇至每一个孔中。静置 30 秒。小心吸弃上清液；
6. 重复第 5 步一次；
7. 尽量甩弃管内液滴。倒置于烘箱 65°C 干燥 3 分钟。室温正放 8~10 分钟进一步干燥。
8. 从磁力架上取下 96 孔板中。加入 40 $\mu$ l 0.1Mm EDTA,

- pH8.0, **或灭菌水(pH7.0-8.0)至每一个孔中**。吸打 15 次或涡旋振荡 1 分钟充分重悬磁珠。室温静置 5 分钟。
9. 转移至磁力架上静置 5-10 分钟富集磁珠。把 DNA 转移至新的 96 孔板(可直接上测序仪)中。

#### 常见问题及解答

##### ● 回收效率不高

影响回收效率的第一因素：洗脱不充分。洗脱液的 pH 必须是 7.0-8.0。酸性的洗脱液会降低洗脱效率。此外洗脱时，磁珠没有充分重悬。

影响回收效率的第二因素：过分干燥。过分干燥会影响洗脱效率。过分干燥后，延长洗脱时间，并最好把洗脱液(Buffer TE, 0.1Mm EDTA, pH8.0)预热至 65°C，以提高洗脱效率。

影响回收效率的第三因素：操作过程中磁珠有丢失。延长磁珠富集时间。在富集期间用移液枪轻轻 2-3 次提高富集效果。

##### ● 引物污染

磁珠洗涤不充分。用 70%乙醇多洗涤一次；

##### ● 杂带去除不干净

非特异的条带(杂带)大小 100bp。该产物只能有效地去除 100bp 以下的片段。

##### ● 影响下游应用

影响下游应用第一原因是：乙醇污染。延长干燥时间或 37°C 干燥。在加入洗脱液之前，须确保磁珠完全干燥。影响下游应用第二原因是：盐污染。70%乙醇必须是室温的。增加一次 70%乙醇洗涤。