

图表 2:

| 组分 | 标准反应 (20 μ L 体系) | 稀释反应 (20 μ L 体系, 0.5 X) | 标准反应 (10 μ L 体系) |
|--|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | 各组分上样量 / 反应 | | |
| RobustDye™ Terminator All-in-One MasterMix | 8 μ L | 4 μ L | 4 μ L |
| RobustDye™ Terminator 5X Sequencing Buffer | / | 2 μ L | / |
| 模板 DNA | 如表 1 所示 | | |
| Primer (Forward 或 Reverse) 3.2 μ M | 3.2 pmol | | |
| 总体积 | 加 ddH ₂ O 至 20 μ L | | 加 ddH ₂ O 至 10 μ L |

* 20 μ L 体系反应可使用 0.2 mL PCR 管或 96 孔 PCR 板。若采用 10 μ L 反应体系，建议换用 384 孔 PCR 板。每次移液均需更换新的无酶吸头，以保证加样精准，避免引起误差。

* 整个操作过程中须始终保证 All-in-One MasterMix 避光。测序上机前，建议用铝箔遮盖反应体系混合液和反应板。

4. 用 PCR 封板膜密封反应板(如 Optical Sensitive Film for qPCR, GeneCodex, Cat #: H035)。

5. 将已封闭反应体系的 PCR 反应板轻柔涡旋 2 ~ 3 秒，再 1000 x g 离心 5 ~ 10 秒，使各反应孔中管壁反应液落于管底。

注意: 试剂盒中 All-in-One MasterMix 为 2.5X, 可根据测序实验实际需求, 使用 5X Sequencing Buffer 对反应体系进行适当稀释, 优化。.

稀释参考: RobustDye™ Terminator 5X Sequencing Buffer 使用体积:

0.5 * [(反应体系总体积 / 2.5) - RobustDye™ Terminator All-in-One MasterMix 使用体积]。

6. PCR 反应程序参数设置:

预变性 96 °C, 1 分钟; 25 个循环 (96 °C, 10 秒; 50 °C, 5 秒; 60 °C, 4 分钟)。

注意: 对于短片段 DNA 模板, 延伸时间可适当缩短, 有利于提升测序质量。



RobustDye™ Terminator DNA Cycle Sequencing Kit

(Cat #: N100, N101, N102, N103)

一、产品简介:

RobustDye™ Terminator DNA Cycle Sequencing Kit 是一款利用高度灵活的化学方法, 专门为 Sanger 测序设计的 DNA 测序试剂盒。本试剂盒采用通过循环测序反应, 将四种不同荧光染料标记的 ddNTPs, 依次掺入引物中。测序操作所需的所有试剂均为即用型预混液。RobustDye™ Terminator DNA Cycle Sequencing Kit 与市售 BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit 兼容, 使用过程中无需修改既有反应程序参数条件。

二、产品特点:

- ❖ 极稳定, 灵敏的荧光信号;
- ❖ 更长的读长和更均一的信号峰高;
- ❖ 对于高 GC 含量模板, 有明显的性能优势。

GeneCodex LLC.

晶科德生物科技(武汉)有限公司

地址: 武汉市东湖新技术开发区光谷三路 777 号自贸生物创新港 B 区

电话: 400-066-7718 E-mail: info@genecodex-bio.cn

网址: www.genecodex-bio.com www.genecodex-bio.com.cn

三、应用程序:

- ❖ 从头测序;
- ❖ 重测序;
- ❖ 复杂模板测序, 例如高 GC 含量的 DNA 片段;
- ❖ 长读长测序;
- ❖ 兼容多种类型模板 (质粒, PCR 产物, BACs, fosmids 等) 的测序;
- ❖ 混合样本检测;
- ❖ 结合快速电泳对短片段 PCR 产物进行测序。

四、适用模板类型:

- ❖ 双链 DNA (dsDNA), 质粒 DNA ($\leq 15\text{Kb}$);
- ❖ 单链 DNA (ssDNA);
- ❖ Fosmids;
- ❖ Lambda DNA;
- ❖ BAC DNA;
- ❖ 基因组 DNA (细菌等)。

五、兼容应用平台:

本试剂盒适用于 GeneAmp® 9700, Veriti® Thermal Cycler, 3730 DNA Analyzer, 3500xL Genetic Analyzer, 3500 Genetic Analyzer, 310 Genetic Analyzer, 3130 Genetic Analyzer, 3130XL Genetic Analyzer, 3730XL DNA Analyzer 等 DNA 分析仪。

六、试剂盒组分:

| 组分 | N100 (10 rxns) | N101 (100 rxns) | N102 (1,000 rxns) | N103 (5,000 rxns) |
|--|-------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| RobustDye™ Terminator All-in-One MasterMix | 1 × 80 µL | 1 × 800 µL | 10 × 800 µL | 2 × 20 mL |
| RobustDye™ Terminator 5X Sequencing Buffer | 1 × 1 mL | 2 × 1 mL | 1 × 12 mL | 2 × 28 mL |

七、运输与储存:

成品试剂盒于 -20°C 运输。避免反复冻融, 荧光染料组分须避光, 防止其信号衰减。收到试剂盒后, 建议将 5X Sequencing Buffer 于 4°C 单独储存。

八、操作步骤:

I. 样品准备

图表 1: 单个反应的推荐 DNA 上样量:

| DNA 模板 | 上样量 |
|--------------------------|--------------|
| PCR 产物: 100 – 200 bp | 1 – 3 ng |
| PCR 产物: 200 – 500 bp | 3 – 10 ng |
| PCR 产物: 500 – 1,000 bp | 5 – 20 ng |
| PCR 产物: 1,000 – 2,000 bp | 10 – 40 ng |
| PCR 产物: > 2,000 bp | 20 – 50 ng |
| 单链 DNA | 25 – 50 ng |
| 双链 DNA (例如质粒) | 50 – 200 ng |
| Cosmid, BAC | 0.5 – 1.0 µg |
| 细菌基因组 DNA | 2 – 3 µg |

※ 测序前需对 DNA 模板进行纯化, 最佳吸光度比值 (A_{260} / A_{280}) 应在 1.8 ~ 2.0 之间。

II. 上机测序

设置测序反应

1. 于冰上充分解冻测序引物和 RobustDye™ Terminator DNA Cycle Sequencing Kit 中各组分, 解冻后置于冰上。
2. 涡旋各组分 2 ~ 3 秒, 然后用台式微型离心机短暂离心 2 ~ 3 秒。
3. 于 EP 管上分别标记“Forward”和“Reverse”字样, 然后按图表 2 所示依次滴加测序反应所需各组分。