

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

货号：4337454, 4337455, 4337456, 4337457, 4337458

本操作说明提供了 BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 的简要操作指南。更详细信息，请至赛默飞世尔官方网站下载英文版说明书：

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4337035_BDTv31CycSqKt_RUO_UG.pdf

产品概述：

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 提供了用于 Sanger 测序反应的预混试剂。试剂盒内包含 BigDye™ v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer，是专门为与 BigDye™ Ready Reaction Mix 共同使用而优化的。

试剂信息：

| 组分 | 货号 4337454 (24 次 反应) | 货号 4337455 (100 次 反应) | 货号 4337456 (1000 次反 应) | 货号 4337457 (5000 次 反应) | 货号 4337458 (25000 次 反应) | 保存 条件 |
|--|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------|
| BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix | 192 µL | 800 µL | 10 × 800 µL | 2 × 20 mL | 10 × 20 mL | -15 到 -25°C |
| pGEM™ -3Zf(+) doublestranded DNA Control Template (200ng/ µL) | 10 µL | 10 µL | 250 µL | 2 × 250 µL | 10 × 250 µL | |
| - 21 M13 Control Primers (0.8pmol/ µL) | 10 µL | 10 µL | 200 µL | 2 × 200 µL | 10 × 200 µL | |
| BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer ^[1] | 1 mL | 2 × 1 mL | 12 mL | 2 × 28 mL | 10 × 28 mL | 4°C |

^[1] 与试剂盒其它组分分开运输。

实验流程：



一、模板制备

模板用量

推荐的 DNA 用量表：

| DNA 模板 | 用量 |
|----------------|------------|
| PCR 产物: | |
| • 100-200 bp | 1-3 ng |
| • 200-500 bp | 3-10 ng |
| • 500-1000 bp | 5-20 ng |
| • 1000-2000 bp | 10-40 ng |
| • >2000 bp | 20-50 ng |
| 单链 DNA | 25-50 ng |
| 双链 DNA | 150-300 ng |
| Cosmid, BAC | 0.5-1.0 µg |
| 细菌基因组 DNA | 2-3 µg |

在进行循环测序反应之前，应先纯化测序模板。可以参考以下网址选择合适的试剂盒：

<https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/dna-extraction.html>。

二、循环测序反应

配制循环测序反应体系

重要提示：本试剂含荧光染料需要避光。反应混合液和测序反应板在使用前都应用铝箔遮盖以避光。

1. 将 BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing 试剂和您的引物完全融化并放置在冰上。
2. 振荡 2-3 秒，然后使用桌面离心机离心 2-3 秒使得试剂沉于管底。
3. 按下表添加组分：

重要提示：对于对照实验，不论使用 10 µL 还是 20 µL 的反应体系，都添加 4 µL 的对照引物（0.8 pmol/µL）。

| 组分 | 标准反应体系（20 µL） ^[1] | | |
|---|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 每个反应的加入量 | Forward 示例 | Reverse 示例 |
| BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix | 8 µL | 8 µL | 8 µL |
| Forward primer (3.2 µM) | 3.2 pmol | 1 µL | — |
| Reverse primer (3.2 µM) | | — | 1 µL |
| 去离子水 (RNase/DNase-free) | 根据模板和引物体积进行调整 | 9 µL | 9 µL |
| 模板 | 见前文“模板用量” | 2 µL ^{[2],[3]} | 2 µL ^{[2],[3]} |
| 总体积 | 20 µL | 20 µL | 20 µL |

^[1] 如果使用 384 孔板，可将反应体系缩小至 10 µL。保持引物的浓度和用量与 20 µL 体系中一致。

^[2] 例如：150–300 ng/µL 的双链 DNA。

^[3] 模板的浓度会影响加入的体积，请根据模板的体积来调整体系中加入水的体积。

注意：放置在冰上并避光。

4. 使用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film（货号：4306311）封好反应板。
5. 振荡反应板 2-3 秒，然后使用带吊篮的离心机离心反应板（转速 1000 g，离心 5-10 秒）以使反应液沉于管底。

注意：孔内可能会有气泡，但不会对反应有不良影响。

使用 BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer 来稀释测序反应

一些循环测序反应可以使用稀释的 BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix。试剂盒中提供的 BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix 的浓度为 2.5X，可以用 BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer 将其稀释至 1X 的终浓度。

按以下公式计算 BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer 的用量：

$0.5 \times ((\text{反应总体积}/2.5) - \text{BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix 的体积})$

注意：如果不经优化就使用 BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer 进行稀释，测序的质量可能会受影响。对于稀释后的 BigDye™ 试剂，我们不能保证其使用效果。

下表是一个 2 倍稀释测序反应的示例：

| 组分 | 稀释的反应体系 (0.5×) | | |
|---|----------------|-------------------------|-------------------------|
| | 每个反应的加入量 | Forward 示例 | Reverse 示例 |
| BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix | 4 μL | 4 μL | 4 μL |
| BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| Forward primer (3.2 μM) | 3.2 pmol | 1 μL | — |
| Reverse primer (3.2 μM) | | — | 1 μL |
| 去离子水 (RNase/DNase-free) | 根据模板和引物体积进行调整 | 11 μL | 11 μL |
| 模板 | 见前文“模板用量” | 2 μL ^{[1],[2]} | 2 μL ^{[1],[2]} |
| 总体积 | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

^[1] 例如：150–300 ng/μL 的双链 DNA。

^[2] 模板的浓度会影响加入的体积，请根据模板的体积改变来调整体系中加入水的体积。

运行循环测序反应

1. 将反应管或反应板放在 PCR 仪上并设置反应体积。
2. 运行循环测序反应：

| 参数 | Stage / Step | | | | |
|----------|--------------|---------------|-------|----------------------|-------------|
| | 孵育 | 循环反应 (25 个循环) | | | 保持 |
| | | 变性 | 退火 | 延伸 | |
| 升降温速率 | — | 1 °C/秒 | | | |
| 温度 | 96 °C | 96 °C | 50 °C | 60 °C | 4 °C |
| 时间 (分:秒) | 01:00 | 00:10 | 00:05 | 04:00 ^[1] | 直至准备好做下一步纯化 |

^[1]如果模板较短，可以使用较短的延伸时间。

三、测序产物纯化

测序反应体系中的盐、未结合的染料和 dNTPs 会影响测序的早期信号，并干扰碱基识别。

因此，在毛细管电泳前要对测序反应的产物进行纯化。推荐的测序产物纯化方法可见《BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide》(编号 4337035)。

四、毛细管电泳

毛细管电泳参考

- 用 10 μ L Hi-Di™ Formamide 重悬测序反应的产物。
重悬时不要加热样本。重悬后的样本要尽快运行。
注意：如果使用 BigDye XTerminator™ Purification Kit 纯化测序产物，则不需要用 Hi-Di 重悬样本。
- 选择合适的 mobility file。需要对不同荧光间的迁移率差异进行补偿才可获得正常的碱基识别结果。
如果运行时使用了错误的 mobility file，可以在 Sequencing Analysis Software 中进行修改。

适合的测序仪器

- 310 Genetic Analyzer
- 3130/3130xl Genetic Analyzer
- 3500/3500xL Genetic Analyzer
- 3730/3730xl DNA Analyzer
- SeqStudio™ Genetic Analyzer

校准

Matrix 或测序标准品中含有一个用于校准 BigDye™ 染料多色光谱发射光重叠的样本。
安装完毛细管或移动过毛细管检测窗口后应重做光谱校准以维持测序系统中光谱校准的质量。
对于校准的更多信息，请查阅您的仪器对应的使用说明。

出版编号 MAN0019924 修订版 A



Applied Biosystems
技术支持服务中心
800-820-8982
400-820-8982

© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
SCIENTIFIC