

货号：A29151

1/16



CleanSEQ 产物纯化试剂盒说明书

B39283AB

2017 年 1 月

【产品名称】

通用名称：CleanSEQ 产物纯化试剂盒

英文名称：CleanSEQ - 800 rxn - 96 well

【Agencourt CleanSEQ 染料终止子去除方案】

Agencourt CleanSEQ 是一种基于 SPRI（固相可逆固定化）磁珠的测序纯化系统，采用简易三步方案。Agencourt CleanSEQ 方法可直接在 PCR 反应板板中进行，无需离心或过滤。该系统能有效纯化测序产物，以提供优质测序数据。

注：有关 CleanSEQ 应用说明，请在线搜索以下文件：

- 与 ABI PRISM 3100 联合使用的 CleanSEQ
- MD Anderson SPRI 经验：在基于 HLA 测序的分型中使用 Agencourt CleanSEQ 和 Agencourt AMPure

Beckman Coulter 已为常见测序染料组开发优化 CleanSEQ 方案，包括 Life Technologies 和 Beckman Coulter。这些测序化学试剂的使用说明见以下部分：

- Life Technologies: 用于 Life Technologies BigDye Terminator 的 CleanSEQ 方案
- Beckman Coulter: 用于 Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒的 CleanSEQ 方案

注：对于 ET Terminator 用户，可从以下网址获取用于 MegaBACE 的 CleanSEQ 方案：

<https://www.beckmancoulter.com/wsportal/bibliography?docname=Protocol+000411v001.pdf>

除 CleanSEQ 方案外，本文件还包含 [CleanSEQ FAQ 列表](#)、[缩略语和词汇表](#)。

【使用】

不用于诊断或治疗应用。

Agencourt CleanSEQ 系统是一种基于固相可逆固定化（SPRI）技术的快速、高性能染料终止子去除过程。顺磁性微粒形式无需离心或过滤，可轻松手动或全自动去除高通量染料终止子。

【试剂内容物】

- Agencourt CleanSEQ 试剂

【测序反应产量】

表 1 列出了每种 CleanSEQ 试剂盒支持的反应次数，具体取决于样品板形式和试剂量。

表 1 每种样品板形式的 CleanSEQ 数量/产量

样品板形式	8 mL (PN A29151) 可支持测序反应的大致数量	50 mL (PN A29154) 可支持测序反应的大致数量
96 孔板形式	800	5,000
384 孔板形式	1,600	10,000

【储存条件】

- 到货后储存在 4°C 下，最长可储存 18 个月（有效期见瓶标签）。
- 使用前将 CleanSEQ 充分混合。

【警告声明】

以下是使用 CleanSEQ 时应考虑的潜在危险。

重要提示：有关完整的产品安全信息，请参阅 www.beckmancoulter.com 上的 CleanSEQ 化学品安全技术说明书 (PN A29161)。

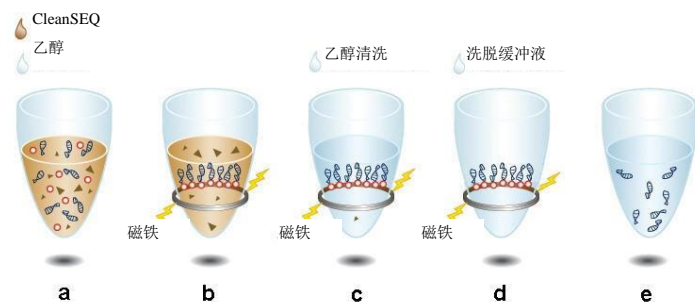
- 叠氮化钠与重金属形成爆炸性化合物。本产品含有的叠氮钠浓度 < 0.1% (w/w)，其与排水管路中常见的铅和铜反复接触时，可能导致冲击敏感化合物的积累。
- 如吸入产品，请将接触者转移至新鲜空气中。如个人没有呼吸，请立即开始人工呼吸并就医。
- 如产品进入眼睛，请在流水下轻轻清洗眼睛 15 分钟或以上，确保眼睑张开。如果出现疼痛或刺激，请就医。
- 一旦与皮肤接触，用大量水冲洗至少 15 分钟。脱下受污染的衣服和鞋子。如果出现疼痛或刺激，请就医。
- 如误食，请用水冲洗口腔。如出现刺激或不适，请就医。
- 请遵循联邦、州及当地法规处置废弃产品、未使用产品及污染包装。如果不确定适用要求，请与当局联系以获取信息。叠氮化钠防腐剂可在金属排水管道中形成爆炸性化合物。请参阅 NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76)（美国国家职业安全与卫生研究所公报：易爆的叠氮化物危险品[76/8/16]）。

【过程概述】

CleanSEQ 染料终止子去除方案包括以下三个主要步骤（图 1）：

1. 将测序延伸产物与磁珠结合 (a)；然后在磁力板上分离 (b)。
2. 清洗磁珠 (c)，以去除未结合的染料、核苷酸、盐和其他杂质。
3. 使用水性缓冲液 (d) (e) 洗脱 DNA。

图 1 过程概述



【用于 Life Technologies BigDye Terminator 的 CleanSEQ 方案】

注：CleanSEQ 可用于所有 BigDye Terminator 版本（1.1 和 3.1）。

用于 Life Technologies BigDye Terminator 的 CleanSEQ 方案包含两个不同方案，每种可用板选项用一个方案。遵照适用部分的说明：

- [96 孔板形式方案](#)
- [384 孔板形式方案](#)

注：如需确定哪种实验流程适合达到所需测序反应产量，请参阅表 1。

【96 孔板形式方案】

【所需材料】

本节完整列出了完成 96 孔板形式的 Life Technologies BigDye Terminator 的 CleanSEQ 方案所需材料：

- 有关**耗材和附件**，请参阅表 2。
- 有关**试剂**，请参阅表 3。

表 2 耗材和附件 — 96 孔板形式

项目	制造商	货号/描述
SPRIPlate 磁力板	Beckman Coulter	<ul style="list-style-type: none"> • A29164, Agencourt SPRIPlate 96R – 环形磁力板或 • A32782, Agencourt SPRIPlate 96R – 环形超极磁力板
反应板	ThermoFisher Scientific, Inc.	<ul style="list-style-type: none"> • AB-0800, 96-孔 PCR 板 或 • AB-1400, 96 孔 PCR 板 注：有关产品信息，请参见 www.thermofisher.com 或 www.fishersci.com 。
直接进样磁铁（可选）	Beckman Coulter	<ul style="list-style-type: none"> • A29173, Agencourt 直接进样板（96 孔板） 注：直接进样磁铁为可选项，使用该磁铁无需执行以下步骤 12。
多通道移液枪	不适用	用于 10 μ L 和 100 μ L（最小值）或 20 μ L 和 200 μ L 体积

表 3 试剂 — 96 孔板形式

项目	制造商/货号	描述	备注
CleanSEQ	Beckman Coulter, <ul style="list-style-type: none"> • A29151 (8 mL) 或 • A29154 (50 mL) 	Agencourt CleanSEQ 试剂盒 - 染料终止子去除	使用前用力摇晃，以确保磁珠完全重新悬浮。
乙醇	<ul style="list-style-type: none"> • American Bioanalytical, AB-00138 或 • 等效物^a 	85% 乙醇，由非变性乙醇制成	<ul style="list-style-type: none"> • 每块 96 孔板准备 25 mL 85% 乙醇。 • 在 CleanSEQ 方案中使用乙醇进行结合，因此必须使用新鲜制备的 85% 乙醇。 • 为避免产品损失，仅需制备足够 1-3 天使用的乙醇，并储存在密封容器中。 • 有关产品信息，请参见 www.americanbio.com。
洗脱缓冲液	<ul style="list-style-type: none"> • Ambion, AM9937 或 • American 	试剂级水或 0.1mM EDTA (pH 8.0)	<ul style="list-style-type: none"> • 最佳洗脱缓冲液因反应条件而异。

	Bioanalytical , AB00502 (用 Ambion , AM9937 稀释) 或 • 等效物 ^a		
--	---	--	--

^a。等效产品是指具有相同名称或纯度规范的产品。

【96 孔板形式实验流程】

注：有关 Life Technologies BigDye Terminator 方案的故障排除，请参阅 [Life Technologies BigDye Terminator 测序反应故障排除](#)。

- 1 使用前摇晃 CleanSEQ 试剂，使磁珠完全重新悬浮。试剂颜色应看起来均匀一致。确保瓶中没有可见的磁珠颗粒沉淀。
- 2 将 10 μL CleanSEQ 试剂加入每份样品中；无论测序反应体积是多少，均使用 10 μL CleanSEQ 试剂。
- 3 根据表 4，将 85%乙醇加入每份样品中。用移液器混合七次，或直至溶液在每个孔中均匀（乙醇浮在样品顶部，而 CleanSEQ 沉在底部）。

重要提示：充分混合各层，使测序产物与磁珠完全结合。

表 4 计算 96 孔板形式的乙醇体积

测序反应体积 (μL)	85%乙醇体积 (μL)
5	31
10	42
15	52
20	62
25	73

如需计算表 4 中未列出的其他样品体积，请使用以下公式：

- 85%乙醇体积 = 2.077 × (10 μL + 样品体积)

- 4 将样品板放置在 Beckman Coulter Agencourt SPRIPlate 96R 上 3-5 分钟，或直至溶液变清。磁珠在孔侧面形成环状或月牙状。

重要提示：在样品板位于磁铁上时执行此步骤。

- 5 吸出样品板上的清澈溶液（上清液）并丢弃；确保移除每个孔中的所有液体。为避免干扰磁珠，吸液时将吸头置于孔底部。由于上清液含有多余荧光染料和杂质，去除尽可能多的上清液。

重要提示：在样品板位于磁铁上时执行此步骤。在此步骤中无需混合或重新悬浮磁珠。

6 将 100 μL 85%乙醇加入每个孔中。在继续下一步之前，等待至少 30 秒，让磁珠重新沉淀。

重要提示：在样品板位于磁铁上时执行此步骤。

7 完全去除乙醇并丢弃。确保清除每个孔中的所有液体。为避免干扰磁珠，吸液时将吸头置于孔底部。由于乙醇含有多余荧光染料和杂质，去除尽可能多的乙醇。

8 重复步骤 6 和 7，共进行两次 85%乙醇清洗。

9 让样品在室温下干燥 10 分钟。干燥时，可将样品板放置在磁铁上，也可不放置在磁铁上。

或

继续下一步，因为最佳时间应根据具体条件通过实验确定。

注：过分干燥会导致荧光染料降解。

10 将 40 μL 洗脱缓冲液加入每个孔中。见表 5，在室温下孵育 2-5 分钟以洗脱。如果使用 Beckman Coulter 96 孔直接进样磁板*（无需最终样品板转移），则使用 70-80 μL 洗脱缓冲液进行洗脱。

注 洗脱样品时请注意以下内容：

- 测序产物洗脱的速度较快。磁珠无需回到溶液中就能完全回收。
- 如果用 EDTA 洗脱时洗脱体积增加一倍，则浓度必须减半，以避免 EDTA 分子数量增加。
- 在将样品装入毛细管测序仪之前，请勿对样品进行变性处理。

建议的洗脱缓冲液包括：

- 0.1mM EDTA (pH 8.0) †
- 试剂级水

水用于产生最大信号，而 EDTA 用于在信号过强时降低信号。合适的洗脱缓冲液因以下因素而异：

- 测序检测仪的灵敏度
- 每种测序反应类型使用的 BigDye 量
- 模板类型

将表 5 用作选择洗脱缓冲液的一般指南。

表 5 选择洗脱缓冲液的指南

测序反应类型	Life Technologies 3100a/3130/3500/3730	Life Technologies 3700
>2 μL BigDye 及 PCR 产物	0.1mM EDTA	0.1mM EDTA
<2 μL BigDye 及 PCR 产物	0.1mM EDTA	DiH ₂ O
>2 μL BigDye 及质粒	0.1mM EDTA	DiH ₂ O
<2 μL BigDye 及质粒	DiH ₂ O	DiH ₂ O

^a对于 Life Technologies 3100 用户或目前使用甲酰胺洗脱的其他用户，请在以下网址获取与 ABI PRISIM 3100 配合使用的 CleanSEQ 应用说明：https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Agencourt_CleanSEQ_3100_AppNote.pdf

*请在以下网址获取直接进样方案：www.beckmancoulter.com；PN A29173。

† 使用直接进样磁铁时，用 0.05mM EDTA 代替 0.1mM EDTA。

11 让样品板在磁铁上分离 3-5 分钟，或直至溶液变清。

重要提示： 仅在不使用 Beckman Coulter Agencourt 直接进样板（96 孔板，PN A29173）的情况下完成此步骤。在 Life Technologies 3700 上加载时无需此步骤。

12 **可选：** 将 35 μL 澄清样品转移至新板，以便加载至检测仪上。

留下 5-10 μL 液体，以防磁珠转移至最终板中。残留磁珠会干扰进样，导致进样延迟启动或进样失败。如果出现这种情况，只需将样品从磁珠上重新转移出去，然后重新进样即可。

13 在加载之前，可将样品密封并在 4°C 下储存 24 小时。如果在 24 小时内不加载样品，则应在 -20°C 下储存。样品在 -20°C 下可储存约一个月。

【384 孔板形式方案】

【所需材料】

本节完整列出了完成 384 孔板形式的 Life Technologies BigDye Terminator 的 CleanSEQ 方案所需材料：

- 有关**耗材和附件**，请参阅表 6。
- 有关**试剂**，请参阅表 7。

表 6 耗材和附件 — 384 孔形式

项目	制造商	货号/描述
SPRIPlate 磁力板	Beckman Coulter	• A29165, Agencourt SPRIPlate 384 磁力板
反应板	ThermoFisher Scientific, Inc. ^a	• AB-1111, 384 孔硬壳 PCR 板
直接进样磁铁 ^b (可选)	Beckman Coulter	• A29166, Agencourt 直接进样板 (384 孔板)
多通道移液器	不适用	用于 10 μL 和 100 μL (最小值) 或 20 μL 和 200 μL 体积。

^a 有关产品信息，请参见 www.thermofisher.com 或 www.fishersci.com。

^b 可选择使用直接进样磁铁。使用直接进样磁铁无需执行以下步骤 12。

表 7 试剂 — 384 孔形式

项目	制造商/货号	描述	备注
CleanSEQ	Beckman Coulter, • A29151 (8 mL) 或 • A29154 (50 mL)	Agencourt CleanSEQ 试剂盒 - 染料终止子去除	使用前用力摇晃，以确保磁珠完全重新悬浮。
乙醇	• American Bioanalytical , AB-00138 或 • 等效物 ^a	85% 乙醇，由非变性乙醇制成	<ul style="list-style-type: none"> • 每个 96 孔板准备 25 mL 85% 乙醇。 • 在 CleanSEQ 方案中使用乙醇进行结合，因此必须使用新鲜制备的 85% 乙醇。 • 为避免产品损失，仅需制备足够 1-3 天使用的乙醇，并储存在密封容器中。 • 有关产品信息，请参见

			www.americanbio.com
洗脱缓冲液	<ul style="list-style-type: none"> Life Technologies , AM9937 (Ambion) 或 American Bioanalytical , AB00502 (用 Ambion , AM9937 稀释) 或 等效物^a 	试剂级水或 0.1mM EDTA (pH 8.0)	<ul style="list-style-type: none"> 最佳洗脱缓冲液因反应条件而异。 有关产品信息, 请参见 www.lifetechnologies.com 和 www.americanbio.com。

^a等效产品是指具有相同名称或纯度规范的产品。

【384 孔板形式实验流程】

注：有关 Life Technologies BigDye Terminator 方案的故障排除，请参阅 [Life Technologies BigDye Terminator 测序反应故障排除](#)。

- 1 使用前摇晃 CleanSEQ 试剂，使磁珠完全重新悬浮。试剂颜色应看起来均匀一致。确保瓶中没有可见的磁珠颗粒沉淀。
- 2 将 5 μL CleanSEQ 试剂加入每份样品中；无论测序反应体积是多少，均使用 5 μL CleanSEQ 试剂。
- 3 根据表 8，将 85%乙醇加入每份样品中。用移液器混合七次，或直至溶液在每个孔中均匀（乙醇浮在样品顶部，而 CleanSEQ 沉在底部）。

重要提示：充分混合各层，使测序产物与磁珠完全结合。

表 8 计算 384 孔板形式的乙醇体积

测序反应体积 (μL)	85%乙醇体积 (μL)
5	14.3
10	21.4

如需计算表 8 中未列出的其他样品体积，请使用以下公式：

- 85%乙醇体积 = 1.428 × (5 μL + 样品体积)

- 4 将样品板放置在 Beckman Coulter Agencourt SPRIPlate 384 磁力板 (PN A29165) 上 2-3 分钟，或直至溶液变清。磁珠积聚在孔侧面。

重要提示：在样品板位于磁铁上时执行此步骤。

- 5 吸出样品板上的清澈溶液（上清液）并丢弃；确保移除每个孔中的所有液体。为避免干扰磁珠，吸液时将吸头置于孔底部。由于上清液含有多余荧光染料和杂质，去除尽可能多地的上清液。

重要提示：在样品板位于磁铁上时执行此步骤。

- 6 将 30 μL 85%乙醇加入每个孔中。

- **可选:** 用移液器混合七次以冲洗磁珠。在继续下一步之前, 等待至少 30 秒, 让磁珠重新吸附到磁铁。

重要提示: 在样品板位于磁铁上时执行此步骤。

- 7** 完全去除乙醇并丢弃。确保清除每个孔中的所有液体。为避免干扰磁珠, 吸液时将吸头置于孔底部。由于乙醇含有多余荧光染料和杂质, 去除尽可能多的乙醇。

- 8** 重复步骤 **6** 和 **7**, 共进行两次 85%乙醇清洗。

- 9** 让样品在室温下干燥 10 分钟, 或继续进行洗脱步骤。根据具体条件, 通过实验确定最佳时间。干燥时, 可将样品板放置在磁铁上, 也可不放置在磁铁上。

注: 过分干燥会导致荧光染料降解。

- 10** 将 15–30 μL 洗脱缓冲液加入每个孔中。见表 **9**, 在室温下孵育 2-5 分钟以洗脱。

重要提示: 洗脱样品时请注意以下内容:

- 测序产物洗脱速度较快。磁珠无需回到溶液中就能完全回收。
- 在将样品装入毛细管测序仪之前, 请勿对样品进行变性处理。

建议的洗脱缓冲液包括:

- 0.1mM EDTA (pH 8.0)
- 试剂级水

水用于产生最大信号, 而 EDTA 用于在信号过强时降低信号。合适的洗脱缓冲液因以下因素而异:

- 测序检测仪的灵敏度
- 每种测序反应类型使用的 BigDye 量
- 模板类型

将表 **9** 用作选择洗脱缓冲液的一般指南。

表 9 选择洗脱缓冲液的指南

测序反应类型	Life Technologies 3100/3130/3500/3730	Life Technologies 3700
>2 μL BigDye 及 PCR 产物	0.1mM EDTA	0.1mM EDTA
<2 μL BigDye 及 PCR 产物	0.1mM EDTA	DiH ₂ O
>2 μL BigDye 及质粒	0.1mM EDTA	DiH ₂ O
<2 μL BigDye 及质粒	DiH ₂ O	DiH ₂ O

- 11** 让样品板在磁铁上分离 3-5 分钟, 或直至溶液变清。

重要提示: 仅在不使用 Beckman Coulter (PN **A29166**) Agencourt 直接进样板 (384 孔板) 的情况下完成此步骤。在 Life Technologies 3700 上加载时无需此步骤。

- 12 可选:** 将澄清样品转移至新板, 以便加载至检测仪上。留下 2-5 μL 液体, 以防磁珠转移至最终板中。残留磁珠会干扰进样, 导致进样延迟启动或进样失败。如果出现这种情况, 将样品从磁珠上重新转移出去并重新进样。

【Life Technologies BigDye Terminator 测序反应的故障排除】

表 10 仅适用于 Life Technologies BigDye Terminator 的故障排除指南

问题	原因	解决方案
染料斑点 (染料峰通常位于 70 和 100 碱基处)	上清液去除不充分	<ul style="list-style-type: none"> 目视检查平板，确保完全移除上清液和乙醇清洗液。 必要时再次吸液。
	BigDye 过多	<ul style="list-style-type: none"> 每次测序反应中减少 BigDye 用量。 如有需要，请联系 reagentsupport@beckman.com。
	甲酰胺洗脱	<ul style="list-style-type: none"> 使用水或 EDTA 进行洗脱。 请参见方案和应用说明：<i>ABI 3100 上的 CleanSEQ</i> (www.beckmancoulter.com)。
	乙醇浓度过高	<ul style="list-style-type: none"> 根据测序反应体积加入正确量的乙醇，并确保乙醇正确混合（请参见表 4 和表 8）。
低信号 (信号强度与背景噪声强度相似)	混合不充分	<ul style="list-style-type: none"> 确保进行适当次数的混合。 目视检查各孔，以确保反应看上去混合均匀。
	磁珠损失	<ul style="list-style-type: none"> 确保在移除上清液时未吸入磁珠，但如果发生这种情况，则将上清液打液回去。待磁珠重新磁吸后，用较小体积再次尝试。
	乙醇浓度过低	<ul style="list-style-type: none"> 确保乙醇和存储瓶至少每周新鲜制备一次。 确保向测序反应体积加入正确体积。 在混合乙醇和水之前，分别在不同容器中测量乙醇和水。
过载 (信号强度极高，在电泳图中可能显示为平峰)	BigDye 过多	<ul style="list-style-type: none"> 每次测序反应减少 BigDye 用量；如有需要，请联系 reagentsupport@beckman.com。 仅转移部分洗脱液用于加载上样。 如果信号仅在电泳图开始时较高，然后迅速降低，则使用 EDTA 进行洗脱。 <p>注：如果使用 0.1mM EDTA 进行洗脱后信号仍然过高，则可使用更高浓度的 EDTA。理想浓度可能需要通过实验确定。</p>

表 10 仅适用于 Life Technologies BigDye Terminator 的故障排除指南 (续)

问题	原因	解决方案
C 和/或 G 肩峰 (C 或 G 碱基右侧的凸起：实际上可能看起来像右侧碱基的底层碱基)	降解	<ul style="list-style-type: none"> 将洗脱缓冲液增加至 70-80 μL (仅适用于 96 孔板形式)。 如果增加洗脱缓冲液无效，或使用 384 孔板形式，则改为使用 Melatonin 或 TCEP 进行洗脱： 重要提示：如果通常使用水进行洗脱，则按以下说明制备 Melatonin 或 TCEP。 如果通常使用 EDTA 进行洗脱 (由于高信号)，则在以下配方中不使用水，而使用 0.1mM (或通常使用浓度) EDTA。 <p>使用 Melatonin 进行洗脱：</p> <ol style="list-style-type: none"> 将 26.135 mg Melatonin (Sigma, PN M5250) 溶于 1.25 mL 异丙醇 (例如, American Bioanalytical, PN AB00866) 中。 加水至 50 mL。 将 Melatonin 溶液储存在 2-8°C。 <p>或</p> <p>使用 TCEP 进行洗脱：</p> <ol style="list-style-type: none"> 将 100 μL Thermo Fisher PI-77720 加入 1250 mL 无核酸酶水 (Ambion, PN AM9932) 中。 颠倒 10 次。

		<ul style="list-style-type: none"> 如果使用 TCEP 或 Melatonin 进行洗脱无效，则可能是在纯化期间发生降解。在每升用于结合和清洗的 85%乙醇中加入 200 μL TCEP。 尽量减少样品在孔中干燥至无任何液体的时间。
上重下轻 Reads (信号开始时极强，但很快减弱，Reads 较短)	测序反应产生大量短测序片段	<ul style="list-style-type: none"> 在反应中加入 EDTA，然后重新加载。EDTA 主要与短测序片段竞争进样。加入 EDTA 的浓度取决于过载的严重程度。在 96 孔板形式中，加入 20-40 μL 0.1-1 mM EDTA；在 384 孔板形式中，用量更少，但浓度应更高。 如果经常出现这种情况，可考虑将加入测序反应的引物量减少至少一半。

【用于 Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒的 CleanSEQ 方案】

【所需材料】

本节完整列出了完成 Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒的 CleanSEQ 方案所需材料：

- 有关耗材和附件，请参阅表 11。
- 有关试剂，请参阅表 12。

表 11 耗材和附件

项目	制造商	部件编号/描述
磁力板	Beckman Coulter	• A32782 , SPRIPlate 96R-环形超极磁力板
样品板	Beckman Coulter	• 609801 , 平板, 微量滴定, 96 孔, V 型底, 聚丙烯, 200 μ L
多通道移液枪	不适用	用于 10 μ L 和 100 μ L (最小值) 或 20 μ L 和 200 μ L 体积。

表 12 试剂

项目	制造商/货号	描述	备注
CleanSEQ	Beckman Coulter, • A29151 (8 mL) 或 • A29154 (50 mL)	Agencourt CleanSEQ 试剂盒 - 染料终止子去除	<ul style="list-style-type: none"> 有关产品信息，请参见 www.beckmancoulter.com。
矿物油	Sigma, M5904	生物试剂，用于分子生物学，轻油	<ul style="list-style-type: none"> 有关产品信息，请参见 www.sigmaaldrich.com。
乙醇	<ul style="list-style-type: none"> American Bioanalytical, AB-00138 或 等效物^a 	85%乙醇 (由非变性乙醇制成)	<ul style="list-style-type: none"> 每块 96 孔板准备 25 mL 85%乙醇。 在 CleanSEQ 方案中使用乙醇进行结合，因此必须使用新鲜制备的 85%乙醇。 为避免产品损失，仅需制备足够 1-3 天使用的乙醇，并储存在密封容器中。 有关产品信息，请参见 www.americanbio.com。
样品加载溶液 (SLS)	Beckman Coulter, 608120	GenomeLab DTCS 快速启动试剂盒	随 Beckman Coulter 染料终止子循环测序快速启动试剂盒提供。

^a。等效产品是指具有相同名称或纯度规范的产品。

【实验流程】

注：有关 Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒使用 CleanSEQ 方案的故障排除，请参阅 [Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒的 CleanSEQ 方案故障排除](#)。

- 1 Beckman Coulter 建议使用 Beckman Coulter CEQ 样品板 (PN 609801) 进行测序反应。如果使用非 Beckman Coulter 样品板, 则将每个测序反应混合物全部转移至 Beckman Coulter 样品板的孔中。
- 2 轻轻摇晃 CleanSEQ 瓶 (PN A29151 和 PN A29154), 使磁珠重新悬浮。
注: 瓶底不应有残留物。试剂颜色应看起来均匀一致。确保瓶中没有可见的磁珠颗粒沉淀。

- 3 无论测序反应体积是多少, 将 10 μ L CleanSEQ 加入每个样品中。

- 4 根据表 13, 将一定量的新鲜 85%乙醇加入样品中。

注: 将 25 mL 85%乙醇加入每个 96 孔板中。

- 在 CleanSEQ 方案中使用乙醇进行结合, 因此必须使用新鲜制备的 85%乙醇。
- 为避免产品损失, 仅需制备足够 1-3 天使用的乙醇, 并储存在密封容器中。

表 13 给定测序反应体积下的乙醇添加量比例

测序反应体积 (μ L)	85%乙醇体积 (μ L)
10	42
20	62

如需计算表 13 中未列出的其他样品体积, 请使用以下公式:

- $85\%乙醇体积 = 2.077 \times (10 \mu L + 样品体积)$

- 5 将移液器调整至适当体积, 上下吹打混合七次或中速涡旋, 使磁珠和反应混合物充分混合悬浮。

- 6 将样品板放置在 Beckman Coulter SPRIPlate 96R-环形超级磁力板 (PN A32782) 上 3-5 分钟, 或直至溶液变清。磁珠在孔侧面形成环状或月牙状。

- 7 将移液器调整至适当体积, 小心地从样品板中完全吸出清澈的上清液, 并丢弃上清液。

- 8 加入 100 μ L 85%乙醇, 孵育 30 秒。

- 9 如步骤 7 所述, 彻底移除上清液并丢弃。

- 10 从磁铁上取下样品板, 立即将 40 μ L 样品加载溶液 (SLS) (PN 608082) 加入每个样品孔中。

重要提示: 请勿干燥磁珠! 干燥磁珠会导致样品损失和信号强度降低。

- 11 将移液器调整至适当体积, 上下吹打混合七次或中速涡旋, 直至磁珠悬浮。

重要提示: 此步骤对于防止带负电的磁珠进样到毛细管导致电流崩溃至关重要。

- 12 使磁珠在每个孔的底部磁吸:

- a. 用一张纸完全覆盖 SPRI 磁力板, 作为孔与磁环之间的屏障。
- b. 将样品板放置在用纸覆盖的磁力板上面。溶液中的所有磁珠将在两分钟内被磁吸到底部。

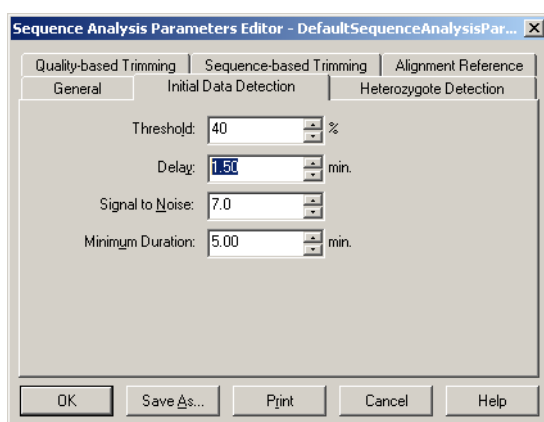
- 13 在样品上滴一滴矿物油进行覆盖 (Sigma, PN M5904)。

- 14 将平板加载入 CEQ 并用标准方法运行。

- 15 编辑序列分析参数, 将延迟迁移时间从 0.75 分钟增加至 1.5 分钟; 请参阅适用用户指南中的说明:
 - CEQ 8000 用户指南 (PN A16637), 修订版 AA, 第 151 页
 - CEQ 8800 用户指南 (PN A16638), 修订版 AA, 第 161 页
 - GenomeLab GeXP 用户指南 (PN A29142) 修订版 AB, 第 114 页

- 16 点击 **OK** (确定), 以使用这些新参数分析结果。参见图 2。

图 2 序列分析参数编辑器



此步骤有助于排除测序反应中残留的游离核苷酸和染料产生的噪声峰。

【Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒的 CleanSEQ 方案故障排除】

表 14 CleanSEQ 方案的故障排除指南 (适用于 Beckman Coulter DTCS 快速启动化学试剂盒)

问题	原因	解决方案
无信号, 但存在染料	DNA 模板错误	<ul style="list-style-type: none"> • 确保使用正确的 DNA 模板。
	引物错误	<ul style="list-style-type: none"> • 确保使用正确的引物。
	引物设计不当	<ul style="list-style-type: none"> • 确保引物未形成二级结构。 • 或者使用 Beckman Coulter 方法开发试剂盒 (PN 60800)。
	试剂问题	<ul style="list-style-type: none"> • 确保正确添加试剂。
低信号	染料降解或仪器问题	<ul style="list-style-type: none"> • 如需有关 DTCS 化学试剂盒或 GeXP 硬件或软件的进一步帮助, 请联系 dnasupport@absciex.com。
	引物与模板比率问题	<ul style="list-style-type: none"> • 建议标准测序反应中的引物浓度为 30:1 至 40:1 (引物:模板)。
	磁珠过度干燥	<ul style="list-style-type: none"> • 在加入 SLS 缓冲液之前, 确保不要过度干燥磁珠。如果执行 96 份样品, 每批处理 24 份样品, 在完全吸出乙醇后, 立即加入 SLS 缓冲液。
	乙醇浓度过低/过高	<ul style="list-style-type: none"> • 确保使用新鲜制备的 85% 优质乙醇。 • 确保为测序反应体积加入正确体积的 85% 乙醇。
	磁珠损失	<ul style="list-style-type: none"> • 确保在移除上清液时未吸入磁珠, 但如果发生这种情况, 则重新悬浮上清液, 并在磁珠重新磁吸后用较小体积吸出

		上清液。
过载信号 (染料信号饱和)	模板过多	<ul style="list-style-type: none"> 减少样品进样量。 减少循环次数。 减少模板量。
	引物过多	<ul style="list-style-type: none"> 减少样品进样量。 减少循环次数。 减少引物量。

【CleanSEQ FAQs】

Q — 是否可以用甲酰胺中洗脱 BigDye 测序反应？

A — 甲酰胺会降低 BigDye 测序反应的信号，甲酰胺与磁珠接触时会造成染料斑点。因此，Beckman Coulter 建议使用水或 EDTA 进行洗脱。如果担心蒸发，请参见使用矿物覆盖的应用说明。请参见 https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Agencourt_CleanSEQ_3100_App Note.pdf。

矿物油覆盖也可用于 Life Technologies 3730。

如果甲酰胺是唯一选择，则使用水洗脱样品，将其从磁珠上转移出去，干燥后重新悬浮在甲酰胺中。

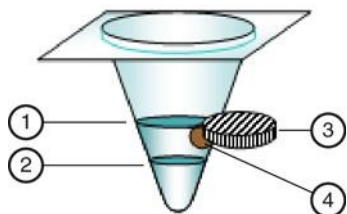
Q — 磁珠是否会损坏毛细管？

A — 否。大量磁珠会干扰进样，但不会造成永久性损伤。磁珠过小，不会堵塞毛细管。Beckman Coulter 建议将上清从磁珠上转移出去或使用直接进样磁铁来防止进样失败。无需担心少量磁珠残留进入检测仪上加载的平板中。

Q — 如何使用直接进样磁铁？

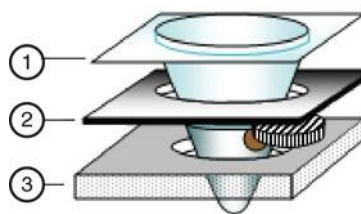
A — 将直接进样磁铁放置在加载上样板和加载上样盒之间，将磁珠吸附在一侧。对计划同时装入堆叠栈的每块板使用一块直接进样磁铁。请参见图 1.3、图 1.5、图 1.4 和图 1.6。

图 1.3 含有 40 μL 或 80 μL 洗脱缓冲液的孔



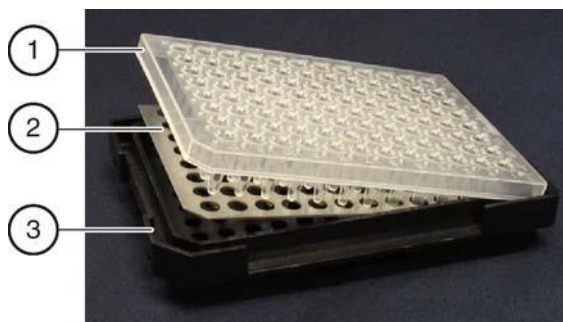
1. 80 μL 洗脱液
2. 40 μL 洗脱液
3. 磁铁
4. 磁珠颗粒

图 1.4 插入平板底座和直接进样磁铁的孔



1. 样品样品板
2. 96 孔直接进样磁铁
3. Life Technologies 平板底座

图 1.5 96 孔直接进样磁铁



1. PCR 板

2. 96 孔直接进样板

3. 底座

还包括 (未显示)

- 固位器
- 密封

图 1.6 384 孔直接进样板



1. 固位器

2. PCR 板

3. 384 孔直接进样磁铁

4. 底座

Q — 哪些 Life Technologies 板底座可与直接进样磁铁联合使用?

A — 96 孔直接进样磁铁适用于 Life Technologies 4334873 和 4334875。其不适合用于 FAST PCR 板的 4367473 和 4367469。384 孔直接进样磁铁适合 4334877 (热封), 但不适合 4334874 (隔垫密封)。

Q — 为什么方案建议 384 孔板形式每孔使用 5 μL CleanSEQ, 而 96 孔板形式每孔使用 10 μL ?

A — 体积通过实验确定。如果使用的试剂较少, 信号将会不一致, 信号本来较低的样品失败可能性就更高。

Q — 为什么在乙醇清洗期间无需重新悬浮磁珠?

A — 试剂中的磁珠含量很低, 在大多数情况下简单冲洗即可。

Q — 洗脱体积的变化对数据有何影响?

A — 对于 3100、3130 和 3730, 影响不大。进样采用电动形式, 且无体积转移; 因此, 检测仪可以访问孔中的所有测序产物。如果使用 EDTA 进行洗脱, EDTA 分子总数将决定信号。因此, 如果使用一定浓度的 EDTA 并考虑增加体积, 如果体积增加一倍, 则 EDTA 浓度应减少一半。对于 3700, 洗脱体积会影响信号, 应加以考虑。

Q — 试剂盒在室温下放置很长时间。是否还能使用?

A — 试剂相当稳定, 但仅在推荐温度下储存才能保证。

Q — 我的试剂盒已过期。是否还能使用?

A — Beckman Coulter 仅保证产品在有效期内的性能。该试剂相当稳定。如果超出产品有效期使用, 应密切监控数据质量。

Q — 我不小心冷冻试剂盒。是否可以使用?

A — 根据大量客户报告和 Beckman Coulter 自身的经验, 冷冻 CleanSEQ 不会影响性能。

Q — 测序产物在纯化后和检测前可以储存多长时间?

A — 在 +4°C 下储存一天至两天; 在 -20°C 下储存几周至几个月。未洗脱的样品在 -20°C 下比洗脱的样品更稳定。请确保平板密封良好。

Q — 样品在洗脱前的建议干燥时间是多长？

A — 这取决于实验室的环境。大多数实验室可以完全跳过洗脱，因为微量乙醇不会对测序数据产生不利影响，但 0 分钟至 20 分钟的效果最佳。

Q — 样品应洗脱多长时间才可以从磁珠上转移出去？

A — 如果是 BigDye 产物，大多数测序产物会迅速洗脱；超过两分钟应不会产生额外信号。

Q — 重新悬浮磁珠进行洗脱是否有效？

A — 在大多数情况下，不混合的被动洗脱是完全没问题的；但是，有些实验室发现在洗脱期间混合磁珠会增加信号。这很可能是由于洗脱缓冲液导致 DNA 比正常情况下更牢固地附着在磁珠上。

Q — 在 384 孔板形式中是否能使用矿物油覆盖以避免甲酰胺洗脱？

A — 是。用 12 μL 洗脱，然后加入 5-8 μL 矿物油。如果在 384 孔板形式中使用隔垫密封，总体积不得超过 20 μL 。

【缩略语】

μL — 微升

CEQ — CEQ 8000 系列基因分析系统

DIH_2O — 去离子水

DNA — 脱氧核糖核酸

DTCS — 染料终止子循环测序

EDTA — 乙二胺四乙酸

ET — 染料终止子化学试剂

mM — 毫摩尔

PCR — 聚合酶链式反应

PN — 货号

SPRI — 固相可逆固定化

TCEP — 三氯乙基磷酸酯

【词汇表】

结合 — 与之结合，形成化学键，或被其吸收，如酶与底物结合。

缓冲液 — 当向溶液中加入酸或碱时，能使溶液酸度变化最小的物质。

毛细管测序仪 — 使用毛细管电泳进行分离的 DNA 测序仪。

杂质 — 特定样品中可能影响诊断或研究结果的物质。

直接进样磁铁 — Beckman Coulter 磁力板，可从仍含有磁珠的纯化板中进样。

染料斑点 — 在电泳图中模糊部分序列的未结合染料。

染料终止子 — 与荧光染料相连的核苷酸，缺少 3' OH 基，从而终止 DNA 链的合成。

染料终止子去除 — 去除未结合染料的纯化步骤。

电泳图 — 自动测序中电泳所得数据的图形描述。

洗脱 — 通常通过溶剂从另一种物质中提取（一种物质）。

乙醇 — 又称乙醇、谷物酒精、酒精。一种无色、易挥发、易燃的液体，分子式为 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 。

荧光染料 — 在光激发后重新发光的化合物。

异丙醇 — 分子式为 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ 或 $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ 的化合物的通用名称。异丙醇是一种无色、易燃并具有强烈气味的化合物。

磁珠 — 含有铁元素的珠子，可被磁场吸引。

磁力板 — 含有磁铁的平板，用于吸引溶液中的磁珠。

核苷酸 — 由核苷与磷酸基团结合而成的各种化合物，构成 DNA 和 RNA 的基本成分。

质粒 — DNA 的环状双链单位，在细胞内独立于染色体 DNA 进行复制，通常存在于细菌中；在 DNA 重组研究中用于在细胞间转移基因。

沉淀 — 之前在溶液中保持或在液体中悬浮的物质形成固体的过程。

方案 — 实验、程序或试验的明确、详细的计划。

测序延伸产物 — 循环测序反应产生的 DNA 链。

测序反应 — 产生测序产物的酶反应。

上清液 — 处于沉淀的不溶物层上方的液体。

未结合染料 — 测序反应未使用的染料终止子分子。

【说明书版本说明】

原文说明书文档版本：B39283AB，原文说明书生效日期：2017 年 1 月 9 日；

中文说明书文档版本：B39283AB-CN，中文说明书生效时间：2024 年 4 月；

中文说明书 B39283AB-CN 内容直接翻译自原文说明书 B39283AB。

贝克曼库尔特（美国）股份有限公司

【客户终端用户许可协议/质保】

本产品受美国专利第 5,898,071、5,705,628 和/或 6,534,262 号中至少一项或多项已独家授权给 Beckman Coulter Genomics, Inc. 的权利要求保护。本产品仅供买方使用，买方无权将本产品[或使用本产品生产的任何材料]转让给任何第三方。

【商标】

Beckman Coulter、标志以及文中提及的贝克曼库尔特产品和服务标记均是贝克曼库尔特（美国）股份有限公司在美国和其他国家/地区的商标或注册商标。

所有其他商标、服务标记、产品或服务均为其各自持有者的商标或注册商标。



贝克曼库尔特（美国）股份有限公司

250 S. Kraemer Blvd.

Brea, CA 92821 U.S.A.



Beckman Coulter Eurocenter S.A.

22, rue Juste-Olivier

Case Postale 1044

CH - 1260 Nyon 1, Switzerland

电话：+41 (0) 22 365 36 11

©2017 贝克曼库尔特（美国）股份有限公司

保留所有权利