

BeyoNGS™ 人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|---------------------------------------|-----|
| D9501S | BeyoNGS™ 人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina) | 8次 |
| D9501M | BeyoNGS™ 人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina) | 96次 |

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoNGS™ 人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina), 即BeyoNGS™ Human mtDNA Mutation Detection Kit (For Illumina), 是一种用于人类线粒体DNA (Human mitochondrial DNA, hmtDNA)全基因长度进行基因分型检测的高通量测序文库构建试剂盒。本试剂盒通过多重PCR反应对人线粒体DNA全序列进行扩增和富集, 并使用BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina)为每个DNA样品添加双端标签, 从而稳定、高效地获得适用于Illumina测序平台的mtDNA扩增子测序文库, 最终获得全长人线粒体DNA的突变信息。
- 线粒体是细胞的能量工厂, 是细胞内氧化还原反应的主要场所, 其结构和功能异常可导致多种疾病的发生[1]。每个线粒体含有约2-10个拷贝的mtDNA, 通常位于内膜附近或基质中。mtDNA呈双链环状, 通常全长16,569bp, 分为调控区和编码区。调控区是线粒体DNA的高突变率区; 编码区共编码37个基因, 包括13种多肽链、22种tRNA和2种rRNA[2]。mtDNA编码的蛋白的主要功能是调控氧化磷酸化和蛋白质的组装, 线粒体DNA突变是其结构和功能异常的主要原因[3]。
- 线粒体突变所导致的疾病被称为线粒体遗传病(Mitochondrial genetic disorders), 其发生率约为万分之二。目前, 已发现人类100多种疾病与线粒体基因突变有关, 如Leber遗传性视神经病、mtDNA突变与氨基糖苷类抗生素致聋(又称“一针致聋”)、MELAS综合征、MERRF综合征、Kearns-Sayre综合征等[4]。线粒体遗传病呈现“母系遗传效应”及“阈值效应”[5]。
- 线粒体突变检测可辅助线粒体遗传病的早期诊断, 可明确病症, 对病人良好预后十分重要; 此外, 线粒体突变检测可以有效预防“一针致聋”的发生。因此人线粒体DNA突变检测及其研究非常重要。
- 本试剂盒包含了用于线粒体突变检测的多重PCR扩增的引物和试剂、用于去除多余引物的Primer Cleanup Mix, 以及对每个样品进行标签PCR反应所需相关试剂。本试剂盒的工作原理如图1所示。带有通用标签的目标区域扩增引物与线粒体基因组DNA结合, 通过多重PCR反应对线粒体基因组DNA进行全序列多片段扩增, 同一样品的扩增产物混合后经Primer Cleanup Mix酶解、1:100倍稀释, 再使用BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina)标签引物进行第二轮正链和负链的标签扩增反应给样品添加上测序标签, 最后经磁珠纯化后完成测序文库构建。

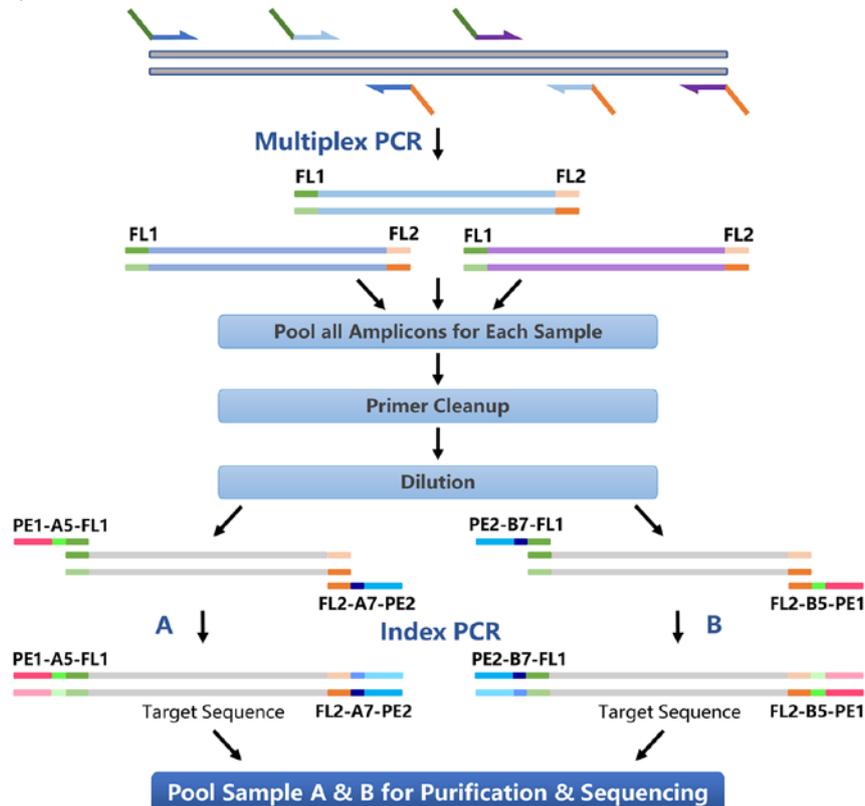


图1. BeyoNGS™人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina) (D9501)的建库流程图。

- 本试剂盒不含用于添加文库标签的PCR引物，推荐选购碧云天生产的BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina) (D9037)。
- Primer Cleanup Mix的主要有效成分为单链核酸外切酶，用于酶解去除PCR反应后多余的引物，降低多余引物对第二次PCR的负面影响。
- 本试剂盒适用于包括血液、唾液或其它组织来源的基因组DNA，但只适用于点突变及20bp以内的缺失插入突变(微小突变)。
- BeyoNGS™人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina)分为不同大小的2种包装，具有384孔PCR仪的用户，可分别用于8个和96个样品的mtDNA全长扩增子测序文库的构建。对于使用PCR管或96孔PCR体系的用户，建议将第一次多重PCR反应体积增加一倍至10μl，可有效降低因体积损耗所导致的扩增失败率。

包装清单：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|--------------------------------|------|
| D9501S-1 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix01 | 10μl |
| D9501S-2 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix02 | 10μl |
| D9501S-3 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix03 | 10μl |
| D9501S-4 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix04 | 10μl |
| D9501S-5 | Multiplex PCR Mix | 85μl |
| D9501S-6 | Primer Cleanup Mix | 25μl |
| D9501S-7 | Index PCR Master Mix | 85μl |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|--------------------------------|-------|
| D9501M-1 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix01 | 100μl |
| D9501M-2 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix02 | 100μl |
| D9501M-3 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix03 | 100μl |
| D9501M-4 | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix04 | 100μl |
| D9501M-5 | Multiplex PCR Mix | 1ml |
| D9501M-6 | Primer Cleanup Mix | 300μl |
| D9501M-7 | Index PCR Master Mix | 1ml |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- 需自备的试剂与材料：BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina) (D9037)、BeyoMag™ DNA片段分选磁珠(D0038/D0039)、无水乙醇、BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)、磁分离架(BeyoMag™磁分离架系列产品)、96/384孔PCR仪、96孔或384孔PCR板(FTUB333/FTUB384/FTUB335/FTUB337/FTUB339)、耐高温PCR封板膜(FSF002/FSF030/FSF035/FSF039)。
- Multiplex PCR Mix、Primer Cleanup Mix和Index PCR Master Mix含有易失活的酶，使用时宜存放在冰盒内或冰浴上，使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. DNA样品的准备

- 使用常规的基因组DNA抽提试剂盒，例如碧云天的基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型，离心柱式)(D0063)、BeyoMag™基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型，磁珠法)(D0088)、BeyoMag™磁珠法血液基因组DNA抽提试剂盒(D0091)，制备基因组DNA样品。通过检测A260、A280和A230来确定DNA样品的浓度和纯度。确保A260/A280比值在1.7-2.0之间，A260/A230比值在1.5-3.0之间。DNA质量越好，多重PCR扩增的效率就越高，最终测序数据的均一性越好。
- 推荐使用1%琼脂糖凝胶电泳评估DNA的降解情况，确保DNA条带清晰，无明显降解。
- 将DNA样品使用超纯水稀释为10ng/μl，按照适当顺序排列在96孔板上。

注：根据实验操作需求，起始DNA总量≥40ng。

2. 靶基因的多重PCR扩增(Multiplex PCR)

- a. 针对每一个DNA样品，本试剂盒提供了4个多重PCR引物混合液(BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix)，因此每个样品需要进行4个平行进行的多重PCR反应，才能完成对mtDNA的全长进行PCR扩增和富集反应。
注：本说明书以使用384孔PCR仪和384孔板为例，每次多重PCR反应体系为5μl。对于使用PCR管或者96孔PCR体系的用户，因PCR过程中的体积损耗增大，因此建议将反应体系调整为10μl。
- b. 按照如下4个表格在384孔PCR板中设置多重PCR扩增体系。

| System | Reagent | Volume |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| Multiplex PCR 1 | Multiplex PCR Mix | 2.5μl |
| | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix01 | 1μl |
| | Genomic DNA sample (10ng/μl) | 1.5μl |

| System | Reagent | Volume |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| Multiplex PCR 2 | Multiplex PCR Mix | 2.5μl |
| | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix02 | 1μl |
| | Genomic DNA sample (10ng/μl) | 1.5μl |

| System | Reagent | Volume |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| Multiplex PCR 3 | Multiplex PCR Mix | 2.5μl |
| | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix03 | 1μl |
| | Genomic DNA sample (10ng/μl) | 1.5μl |

| System | Reagent | Volume |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| Multiplex PCR 4 | Multiplex PCR Mix | 2.5μl |
| | BeyoNGS™ Amp hmtDNA ProbeMix04 | 1μl |
| | Genomic DNA sample (10ng/μl) | 1.5μl |

注：加入不同引物和不同模板时务必更换移液吸头。

- c. 封上耐高温PCR封板膜，使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm)(E6758)进行瞬时离心。
- d. 将384孔板放置在384孔PCR仪上进行扩增反应，反应条件如下表所示。

| Steps | Temperature | Time | Cycles |
|----------------------|-------------|---------|--------|
| Initial denaturation | 95°C | 3min | 1 |
| Denaturation | 95°C | 30sec | 45 |
| Annealing | 56°C | 30sec | |
| Extension | 72°C | 30sec | |
| Final extension | 72°C | 5min | 1 |
| Hold | 4°C | forever | 1 |

- e. 反应结束后，从PCR仪上取下384孔PCR板，使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm)(E6758)进行瞬时离心。
注：多重PCR扩增完成后可以继续后续步骤，也可以先-20°C保存。

3. PCR产物中引物的酶解去除(Primer Cleanup)

- a. 同一样品的4个平行进行的多重PCR产物(各10μl)合并至同一孔中混匀(共40μl)。
- b. 准备一块新的384孔PCR板，每孔加入上述4管混匀后的多重PCR产物6μl。
- c. 再加入3μl Primer Cleanup Mix，此时样品总体积为9μl。
- d. 封上耐高温PCR封板膜，使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm)(E6758)进行瞬时离心。
- e. 将384孔PCR板放置在384孔PCR仪上进行引物酶解去除反应，反应条件如下表所示。

| Step | Temperature | Time | Cycles |
|--------------|-------------|---------|--------|
| Incubation | 37°C | 40min | 1 |
| Inactivation | 80°C | 20min | 1 |
| Hold | 4°C | forever | 1 |

- f. 反应结束后，从PCR仪上取下384孔PCR板，使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm)(E6758)进行瞬时离心。
注：引物酶解去除反应完成后可以继续后续步骤，或者-20°C保存。

4. PCR产物酶解后的稀释(Dilution)

- a. 准备96孔PCR板，根据样品数量，每孔加入198μl超纯水。
- b. 随后分别加入2μl步骤3中的引物酶解去除后PCR产物，对产物进行1:100稀释，即为稀释后的引物去除后PCR产物(Diluted PCR products after primer depletion)。
- c. 用PCR封板膜将96孔PCR板中稀释后的引物酶解去除后PCR产物封好，放置96孔板混匀仪上，800rpm水平震荡混匀5分钟。

注：稀释后的引物酶解去除后PCR产物可继续进行后续步骤，或者-20°C保存。

5. 标签PCR反应(Index PCR)

- a. 用户需要使用BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina)试剂盒进行标签PCR反应，从而为每个样品添加i5/i7标签和适用于Illumina测序平台的相关引物。

注：碧云天BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina) (D9037)试剂盒共有4个系列(Set01-Set04)，每个系列提供24组i5/i7标签对，i5标签长度为8nt，i7标签长度为10nt。4个系列共可为384个样品文库提供不同的标记标签对。

- b. 进行标签PCR反应时每个样品需要分别进行两个PCR扩增反应，这两个PCR扩增反应可以分别用于高通量测序时获得相应的正链和负链的序列信息。

注：碧云天BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina)试剂盒的每个系列(Set01-Set04)都包含A、B两套引物，A套为正链标签PCR引物组，B套为负链标签PCR引物组。

- c. 标签PCR反应前请先确定所需扩增的文库数量，根据文库数量确定每一个需要扩增的文库对应的正链引物组合(BeyoNGS™ Amp P5 Primer A和BeyoNGS™ Amp P7 Primer A)及负链引物组合(BeyoNGS™ Amp P5 Primer B和BeyoNGS™ Amp P7 Primer B)，注意确保同一个样品使用相同的i5/i7标签对。例如，正链引物组合选择BeyoNGS™ Amp P5 Primer A01和BeyoNGS™ Amp P7 Primer A08，那么负链引物组合则必须选择BeyoNGS™ Amp P5 Primer B01和BeyoNGS™ Amp P7 Primer B08，才能确保样品正/负链标签PCR反应后具有一致的特异性i5/i7标签对。

注：标签匹配信息及标签序列信息请参考BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers (For Illumina) (D9037)试剂盒说明书常见问题1。

- d. 按照下表在384/96孔PCR板中分别配制文库正链和负链的标签PCR反应体系。

| Reagents for Forward Strand PCR (A) | Volume |
|---|--------|
| Diluted PCR products after primer depletion | 1µl |
| BeyoNGS™ Amp P5 Primer Axx | 2µl |
| BeyoNGS™ Amp P7 Primer Ayy | 2µl |
| Index PCR Master Mix | 5µl |
| Total | 10µl |

| Reagents for Reverse Strand PCR (B) | Volume |
|---|--------|
| Diluted PCR products after primer depletion | 1µl |
| BeyoNGS™ Amp P5 Primer Bxx | 2µl |
| BeyoNGS™ Amp P7 Primer Byy | 2µl |
| Index PCR Master Mix | 5µl |
| Total | 10µl |

- e. 封上耐高温PCR封板膜，使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式，2500rpm)(E6758)进行瞬时离心。
- f. 参考下表设置PCR扩增程序，并进行标签PCR反应。

| Steps | Temperature | Time | Cycles |
|----------------------|-------------|---------|--------|
| Initial denaturation | 95°C | 3min | 1 |
| Denaturation | 95°C | 15sec | 10-12 |
| Annealing | 60°C | 30sec | |
| Extension | 68°C | 30sec | |
| Final extension | 68°C | 3min | 1 |
| Hold | 4°C | forever | 1 |

- g. 反应结束后，从PCR仪上取下PCR板，使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式，2500rpm)(E6758)进行瞬时离心。

注：标签PCR反应完成后可以继续后续步骤，或者-20°C保存。

6. 文库混合、纯化及片段选择

- a. 将具有不同i5/i7标签对样品的正负链标签PCR反应产物等体积混合至1.5ml离心管中，建议用户每管混合样品数量不超过48个，每个标签PCR反应等量混合5-10µl即可。

- b. 轻轻震荡混匀混合液。

- c. 吸取50µl混合液(若体积不足则用超纯水补齐)至新的PCR管/96孔PCR板中。

- d. 加入40µl BeyoMag™ DNA片段分选磁珠(D0038/D0039)，通过涡旋或移液器多次上下吹打，将磁珠与文库扩增产物进行彻底混合均匀。后续严格按照BeyoMag™ DNA片段分选磁珠(D0038/D0039)说明书进行操作即可，大致可以参考如下操作步骤。

- e. 室温放置5-15分钟，确保磁珠与文库扩增产物充分孵育。

注：磁珠孵育时间可以根据当前实验条件、既往经验、特定设备和样品进行改变/优化，以获得最高的文库构建效率和通量。同时，磁珠捕获时间也应根据使用磁力架及反应容器进行适当调整，尽可能确保磁珠完全吸附在磁力架上。

- f. 将PCR管/板放置在适合PCR管/板的磁分离架(FMS017/FMS081/FMS082)上进行磁珠捕获，孵育直至液体彻底澄清。

- g. 小心吸出并丢弃上清液，可在管底留少量液体(2-5µl)。推荐使用八通道吸液适配器(FAD008/FAD009)。

- h. 保持PCR管/板始终在磁分离架上，加入200µl的80%乙醇，请勿扰动磁珠，室温孵育30秒。
- i. 小心吸出并丢弃上清液。
- j. 保持PCR管/板始终在磁分离架上，再次加入200µl的80%乙醇，请勿扰动磁珠，室温孵育30秒。
- k. 小心吸出并丢弃上清液，在不扰动磁珠的情况下尝试去除所有液体残留。
- l. 在室温下干燥磁珠3-5分钟，直至所有乙醇挥发，干燥后磁珠表面呈朦胧状态，在灯光下无明显反光现象。
注1：切勿干燥过度，导致磁珠开裂，使其难以重悬，影响文库产量。
注2：乙醇洗脱如有残留会影响后续反应及文库质量。且请勿加热干燥(如置于37°C烘箱干燥)。
- m. 将PCR管/板从磁分离架上取下。
- n. 加入22µl的超纯水，使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置2-5分钟。
- o. 将PCR管/板短暂离心，置于磁分离架上，待溶液澄清。
- p. 转移20µl上清液至新PCR管或板孔中，切勿触碰磁珠。
注：洗脱产物可于4°C稳定保存一周；长期保存时应置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

7. 文库质量检测评估及测序

通常情况下，构建好的mtDNA扩增子文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

- a. 文库长度分布可直接通过凝胶电泳和核酸荧光染料染色确定，也可以通过LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer), Bioanalyzer, TapeStation (Agilent Technologies)或Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical)等基于电泳原理的设备进行检测。
- b. 文库浓度检测可以使用基于qPCR绝对定量的方法进行浓度测定，也可以使用Qubit dsDNA HS Assay Kit等基于双链DNA荧光染料的浓度测定方法。
- c. 经文库质量检测合格的样本，可直接用于Illumina测序平台进行测序，建议每个样品的下机数据量为1Gb，最低不少于200Mb。

参考文献：

1. Friedman JR and Nunnari J. Nature. 2014. 505(7483):335-43.
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, et al. Nature. 1981. 290(5806):457-65.
3. Chinnery PF and Turnbull DM. The Lancet. 1999. 354:S17-S21.
4. Taylor RW and Turnbull DM. Nat Rev Genet. 2005. 6(5):389-402.
5. Stewart JB and Chinnery PF. Nat Rev Genet. 2015. 16(9):530-42.

相关产品：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------------|--|------------|
| D9037-Set01 | BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers Set01 (For Illumina) | 96次, 24标签对 |
| D9037-Set02 | BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers Set02 (For Illumina) | 96次, 24标签对 |
| D9037-Set03 | BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers Set03 (For Illumina) | 96次, 24标签对 |
| D9037-Set04 | BeyoNGS™ Bidirect Amp Dual-Index Primers Set04 (For Illumina) | 96次, 24标签对 |
| D0038 | BeyoMag™ DNA长度分选磁珠 | 1ml/5ml |
| D9501 | BeyoNGS™人线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina) | 8次/96次 |
| D9502 | BeyoNGS™小鼠线粒体DNA突变检测试剂盒(For Illumina) | 8次/96次 |

Version 2023.10.07