

## BigDye XTerminator™ Purification Kit

货号：4376486, 4376487, 4376484, 4376485

本操作说明提供了 BigDye XTerminator™ Purification 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/cms\\_042772.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042772.pdf)

### 产品概述：

BigDye XTerminator™ Purification Kit 用于去除循环测序反应的组分如盐离子、未结合的染料和 dNTPs 等以防止它们与染料标记的延伸产物一同进样至测序仪。BigDye® XTerminator™ 试剂包含 XTerminator™ Solution 和 SAM™ Solution 两个组分，两者可以按顺序分别加入反应板或者预混后一起加入反应板。

### 订购信息：

货号	包装规格 (mL)		反应次数 (20 µL 体系)	保存条件
	XTerminator™ Solution	SAM™ Solution		
4376486	2	9	100	XTerminator™ Solution 4°C; SAM™ Solution 4°C或室温
4376487	20	90	1000	
4376484	50	225	2500	
4376485	800	3600	40000	

### 注意事项：

- **重要：**在移液过程中，请保持试剂充分混匀。
- 为了得到最好的结果，请按照第 5 页的“测序反应指导”进行操作。
- 从 XTerminator™ Solution 的试剂瓶中吸取试剂时注意：
  - 使用宽口的移液枪头（口径大于 1.0 mm）；
  - 避免从靠近液体表面处吸取试剂。
- 吸取 SAM™ Solution 和“操作步骤二”的预混液时，使用常规的移液枪头。
- 为了达到最好的效果，振荡反应板时请使用推荐的振荡仪并按照说明书上的步骤进行操作。
- 当您将反应板加载至测序仪器时，不要对含有 BigDye XTerminator™ Solution 的样本进行加热变性或使用 Hi-Di™ Formamide。

### 实验前准备：

- 观察 SAM™ Solution。如果看到试剂里有沉淀，需先 37°C 加热并混匀以让其溶解。使用前将试剂降至室温。
- 完全混匀 SAM™ Solution。
- 如果您使用直接进样至测序仪的方法，请确认您的仪器已经安装了对应的 BDx run module（参考详细版英文说明书 BigDye XTerminator™ Purification Kit User Guide (Pub. No. 4374408)）。

### 操作步骤（一、二可任选其一）：

## 一、按顺序分别将试剂添加至反应板：

1. 将测序反应产物在 1000 g 离心 1 分钟。
2. 在移液前，先颠倒混匀 BigDye XTerminator™ Solution 至其呈均一相。
3. 按下表的顺序向每个反应孔添加试剂：

**重要提示：**每隔 1 分钟，就要重新混匀 BigDye XTerminator™ Solution 以避免其分层。

试剂组分	5- $\mu$ L 反应体系的加入量 ( $\mu$ L)	10- $\mu$ L 反应体系的加入量 ( $\mu$ L)	20- $\mu$ L 反应体系的加入量 ( $\mu$ L)
SAM™ Solution	22.5	45	90
BigDye XTerminator™ Solution	5	10	20

### 4. 密封反应板：

- 如果使用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film (货号：4306311) ——转至步骤三“密封反应板”；
- 如果使用热封膜 (仅限 3730/3730xl 测序仪) ——160°C 1.5 秒封膜，然后转至步骤四“振荡、离心反应板”。

## 二、配制预混液后添加至反应板：

每次实验前配置新鲜的预混液。

1. 在移液前，先颠倒混匀 BigDye XTerminator™ Solution 至其呈均一相。
2. 按以下表格的顺序将试剂组分加入合适的瓶子或试剂槽：

对于 384 孔板，5- $\mu$ L 反应体系：

试剂组分	每孔体积 ( $\mu$ L)	每板体积 <sup>[1]</sup> ( $\mu$ L)
BigDye XTerminator™ Solution	5	2304
SAM™ Solution	22.5	10368
预混液总体积 ( $\mu$ L)	27.5	12672

<sup>[1]</sup>为避免移液损失，计算整板体积时多加了 20%。

对于 96 孔板，10- $\mu$ L 反应体系：

试剂组分	每孔体积 ( $\mu$ L)	每板体积 <sup>[1]</sup> ( $\mu$ L)
BigDye XTerminator™ Solution	10	1152
SAM™ Solution	45	5184
预混液总体积 ( $\mu$ L)	55	6336

<sup>[1]</sup>为避免移液损失，计算整板体积时多加了 20%。

对于 96 孔板，20- $\mu$ L 反应体系：

试剂组分	每孔体积 ( $\mu$ L)	每板体积 <sup>[1]</sup> ( $\mu$ L)
BigDye XTerminator™ Solution	20	2304
SAM™ Solution	90	10368
预混液总体积 ( $\mu$ L)	110	12672

<sup>[1]</sup>为避免移液损失，计算整板体积时多加了 20%。

### 3. 将预混液添加至反应板：

**重要提示：**在移液过程中，请保持预混液彻底混匀。

- 1) 将测序反应产物在 1000 g 离心 1 分钟。
- 2) 在移液前，先将预混液混匀：
  - 对于在瓶子里配制的预混液——盖上瓶盖，然后颠倒混匀 10 次，或直至液体呈均一相；
  - 对于在试剂槽里配制的预混液——用移液枪头抽吸液体 2-3 次，或直至液体呈均一相。
- 3) 按下表的用量向每个反应孔添加试剂：  
**重要提示：**每次移液前都要摇动试剂。

反应板类型	每孔添加的预混液体积 (μL)
384 孔板, 5-μL 体系	27.5
96 孔板, 10-μL 体系	55
96 孔板, 20-μL 体系	110

- 4) 密封反应板：
  - 如果使用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film (货号：4306311) ——转至步骤三“密封反应板”；
  - 如果使用热封膜 (仅限 3730/3730xl 测序仪) ——160°C 1.5 秒封膜，然后转至步骤四“振荡、离心反应板”。

### 三、密封反应板：

**重要提示：**如果使用 MicroAmp™ Clear Adhesive Film，要注意密封严实，以避免振荡时漏液。

1. 将反应板放置在 MicroAmp™ Splash-Free 96-Well Base (货号：4312063) 上，擦干反应板表面的液体。
2. 将粘性封膜盖在反应板上。
3. 向下压膜时，用刮板缓慢地刮过，横向和纵向都要刮。
4. 重复第 3 步 5 次。当向下压膜时，用刮板的边缘刮膜的四周。
5. 观察反应板以确认所有孔都被密封。

如果在封板膜的表面能看到每个孔的印记，则说明反应板被密封好了。

### 四、振荡、离心反应板：

1. 将反应板在振荡器上固定牢。  
 对于您仪器的设置和操作方法，请参考详细版英文说明书 BigDye XTerminator™ Purification Kit User Guide (Pub. No. 4374408)。
2. 按下表列出的设置振荡反应板：
  - 对于 96 孔板，振荡 20 分钟；
  - 对于 384 孔板，振荡 30 分钟。

**重要提示：**振荡时间不要超过以上所列出的时间。

振荡器	反应板类型	速度或设置
Thermo Scientific™ Digital Vortex Mixer	96 孔板	1800 rpm
	384 孔板	2000 rpm
Digital Vortex-Genie™ 2	96 孔板	1800 rpm
	384 孔板	2000 rpm
Eppendorf™ MixMate™	96 孔板	1800 rpm
	384 孔板	2600 rpm

IKA™ MS3 Digital Orbital Shaker	96/384 孔板	1800 rpm (Mode B)
IKA™ Vortex 3	96/384 孔板	Setting 5 <sup>[1]</sup>
Taitec MicroMixer E-36	96/384 孔板	最大
Union Scientific™ Vertical Shaker <sup>[2]</sup>	96/384 孔板	Setting 100

<sup>[1]</sup> 在振荡器保持稳定的前提下，使用最大的速度。

<sup>[2]</sup> 如果需要，可以额外增加反应板来达到仪器的重量要求。

3. 使用带吊篮的离心机离心反应板，1000 g 2 分钟。

4. 离心完的反应板请立即用于毛细管电泳。

**提示：**如果反应板不能马上用于毛细管电泳，可以按第 4 页的“保存反应板指导”进行保存。

## 五、为毛细管电泳准备反应板：

**重要提示：**对于含有 BigDye XTerminator™ Solution 的样本，不要进行加热变性或使用 Hi-Di™ Formamide。

仪器	操作
SeqStudio™	对于 96 孔板——去除粘性封膜，然后用一块胶垫盖在反应板上
3500/3500xL	对于 96 孔板或 384 孔板——去除粘性封膜，然后用一块胶垫盖在反应板上
3730/3730xI	对于用热封膜密封的反应板——直接使用密封的反应板； 对于用粘性封膜密封的反应板——根据反应板的类型进行准备： <ul style="list-style-type: none"> <li>• 对于 96 孔板——去除粘性封膜，然后用一块胶垫盖在反应板上；</li> <li>• 对于 384 孔板——去除粘性封膜，然后在下面的方法中选择一种： <ul style="list-style-type: none"> <li>-换上一张热封膜；</li> <li>-取 10 μL 上清液至新的反应板，然后盖上胶垫</li> </ul> </li> </ul>
3130/3130xI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 对于 96 孔板——去除粘性封膜，然后用一块胶垫盖在反应板上；</li> <li>• 对于 384 孔板——去除粘性封膜，取 10 μL 上清液至新的反应板，然后盖上胶垫</li> </ul>
310 Genetic Analyzer	对于 96 孔板——去除粘性封膜，取 10 μL 上清液至新的反应板，然后盖上胶垫

## 六、运行毛细管电泳：

1. 加载反应板至测序仪。

2. 选择合适的运行条件设置实验：

- 如果您使用直接进样至测序仪的方法，按详细版英文说明书 BigDye XTerminator™ Purification Kit User Guide (Pub. No. 4374408) 中列出的 BDx run module 进行选择；
- 如果在纯化完后将上清液转移至新的反应板，则根据您仪器的使用说明选择合适的 run module，不要使用 BDx run module。

3. 开始毛细管电泳。

### 保存反应板指导：

如果不立即进行电泳，可将反应板进行短期保存。

使用 BigDye XTerminator™ Purification Kit 纯化的反应板，盖上粘性封膜、胶垫或者热封膜后，在室温下可以稳定保存 48 小时。

注意：保存了一段时间的反应板在加载至电泳仪之前，需先使用带吊篮的离心机进行离心，1000 g 2 分钟。

### 测序反应指导：

- 使用 BigDye XTerminator™ Purification Kit 纯化的测序反应产物在分析时会产生更高强度的信号。如果有必要，可降低测序反应中的 DNA 模板量，以免分析时的荧光信号超标。  
注意：如果模板的浓度降低了，任何模板对照（例如：pGEM 对照）的浓度也应该等比例降低。
- 保证测序反应体系达到下表中所列的最低体积：  
如果有必要，可以在纯化前添加 UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water 以达到此体积。

反应板类型	最少反应体积 (μL)
384 孔	5
96 孔	10 <sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>如果您的毛细管电泳一次运行超过 48 个样本，建议您使用至少 20 μL 的反应体积。

出版编号 MAN0019937 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**  
S C I E N T I F I C