



GeticoDye Terminator v1.1 和 v3.1 5X 测序缓冲液使用说明书

一、产品简介

本说明书旨在指导用户正确使用 GeticoDye Terminator v1.1 和 v3.1 5X 测序缓冲液（以下简称“缓冲液”），该缓冲液专为荧光法循环测序反应设计，可与 GeticoDye Terminator v1.1 或 v3.1 系列 Ready Reaction Mix 搭配，适配 3730XL 等主流一代测序仪，为测序反应提供稳定优化的环境，保障测序结果准确性与可靠性。请在使用前仔细阅读本说明书，严格遵循操作步骤与注意事项。

二、试剂准备

（一）试剂清单（单独采购或试剂盒配套）

1. GeticoDye Terminator v1.1 和 v3.1 5X 测序缓冲液（存储于 4°C 环境）；
2. GeticoDye Terminator v1.1 或 v3.1 Ready Reaction Mix（2.5X，含荧光终止子与 DNA 聚合酶，需按对应说明书存储）；
3. 引物（如 -21 M13 对照引物，浓度推荐 3.2 μM 或 0.8 μM ，根据实验需求选择）；
4. DNA 模板（单链 DNA、双链 DNA、PCR 片段、BAC 克隆等，需符合测序质量要求，如双链 DNA 浓度建议 150-300 ng/ μL ）；
5. 无酶无 RNase 水（用于补足反应体积，避免核酸酶污染）；
6. 对照 DNA（如 pREF-BDT™ 对照 DNA，200 ng/ μL ，可选，用于验证测序体系有效性）。

（二）试剂解冻与处理

1. 从 4°C 冰箱取出缓冲液及其他试剂，置于室温或冰上自然解冻，**禁止加热解冻**，避免试剂活性受损；
2. 缓冲液解冻后，轻轻涡旋混匀 2-3 秒，确保组分均匀，随后短暂离心（2-3 秒，转速建议 3000-5000 rpm），使液体集中于管底，防止管口残留导致用量不准；
3. 若缓冲液需分装（避免反复冻融），需使用无酶无 RNase 离心管，按单次使用量（如 100 μL / 管）分装，分装后仍需 4°C 冷藏保存，且分装后使用周期不超过 1 个月；



4. 所有试剂解冻并处理完成后，除热循环反应过程外，其余操作建议在冰上进行，减少试剂暴露于室温的时间。

三、测序反应体系配置

(一) 反应体系规格选择

常规推荐配置 20 μL 终体积的测序反应体系，若需调整体积（如 10 μL 或 50 μL ），需按比例同步调整各组分用量，确保缓冲液最终在体系中发挥稳定作用。以下以 20 μL 终体积的 0.5X 稀释反应为例，提供标准体系配置方案。

(二) 20 μL 标准反应体系配置步骤

1. 准备无酶无 RNase 的 0.2 mL 或 0.5 mL 离心管（适配热循环仪模块），做好样品标记，避免混淆；
2. 按以下顺序依次加入各组分（建议先加无酶无 RNase 水与缓冲液，再加入其他试剂，减少模板与酶过早接触），并记录各组分用量：

组分	体积 (20 μL 反应)	操作要点
无酶无 RNase 水	10 μL	先加入离心管底部，作为反应基础液
GeticoDye Terminator v1.1 & v3.1 5X 测序缓冲液	2 μL	缓慢加入，避免产生气泡，与水轻轻混匀
GeticoDye Terminator Ready Reaction Mix (2.5X)	4 μL	避免反复冻融，加入后轻轻混匀，勿剧烈涡旋
引物 (3.2 μM)	2 μL (3.2 pmol)	若使用 0.8 pmol/ μL 引物，需调整为 8 μL ，同时减少无酶无 RNase 水至 4 μL
DNA 模板	2 μL	确保模板无杂质污染，加入后轻轻弹管混匀

1. 体系配置完成后，短暂离心（2-3 秒，3000-5000 rpm），使管内液体完全集中于管底，避免管壁残留影响反应效率；
2. 若设置对照实验，需单独配置含对照 DNA 的反应体系，将上述“DNA 模板”替换为 2 μL pREF-BDT™ 对照 DNA (200 ng/ μL)，其他组分用量不变。



(三) 体系配置注意事项

1. **用量准确性**：使用校准合格的移液器（建议量程 0.5-10 μL 、10-100 μL ），确保各组分体积精准，尤其是缓冲液与 Ready Reaction Mix，用量偏差可能导致测序信号异常；
2. **污染防控**：所有耗材（离心管、移液器吸头）需为无酶无 RNase 级别，操作过程中佩戴一次性手套，定期更换，避免手部皮肤接触试剂或耗材；缓冲液管口禁止接触离心管内壁、移液器吸头或其他试剂管口，防止交叉污染；
3. **试剂兼容性**：缓冲液仅可与 GeticoDye Terminator v1.1 或 v3.1 系列 Ready Reaction Mix 搭配，禁止与其他品牌、其他版本的测序试剂混用，否则可能导致反应失败或数据质量差。

四、热循环反应操作

(一) 适配热循环仪选择

缓冲液支持的热循环仪包括 Applied Biosystems™ 专用型号及其他兼容品牌，推荐优先使用以下型号，以获得最佳测序效果：

- GeneAmp™ PCR System 9700 Dual 96-Well
- GeneAmp™ PCR System 9700 Dual 384-Well
- Veriti™ Fast 96- Well Thermal Cycler
- Veriti™ 384- Well Thermal Cycler

若使用非推荐型号热循环仪，需提前优化循环条件，且控制升温速率 $\leq 1^\circ\text{C} / \text{秒}$ ，避免升温过快导致 DNA 模板损伤或酶活性下降，增加测序数据噪声。

(二) 热循环程序设置

根据 DNA 模板类型（单链 / 双链 / PCR 片段等），选择对应的热循环程序，以下为常规双链 DNA 模板的推荐程序（可根据实际模板调整退火温度）：

步骤	温度	时间	循环次数	目的
预变性	96°C	1 分钟	1	使 DNA 模板完全变性，打开双链
变性	96°C	10 秒	25-35	每次循环前使 DNA 解链
退火	50°C	5 秒	25-35	使引物与模板特异性结合（可按引物 T_m 值调整温度）

延伸	60°C	4 分钟	25-35	使 DNA 聚合酶完成链延伸，加入荧光终止子
最终延伸（可选）	60°C	7 分钟	1	确保所有延伸反应完全结束
保温（暂存）	4°C	∞（直至处理）	1	防止样品降解，等待后续纯化步骤

注：循环次数建议根据模板浓度调整，低浓度模板（如 <100 ng/μL 双链 DNA）可增加至 35 次循环，高浓度模板可减少至 25 次循环，避免过度循环导致非特异性产物增加。

（三）热循环操作要点

1. 将配置好的反应管放入热循环仪模块，确保管底与模块紧密接触，避免因接触不良导致温度不均；若为 96 孔 / 384 孔板，需检查板盖是否盖紧，防止蒸发；
2. 启动程序前，确认热循环仪的温度校准状态（建议每 3-6 个月校准一次），避免温度偏差影响反应；
3. 热循环过程中，禁止随意打开仪器门，若需暂停，需按照仪器操作说明执行，防止样品污染或温度骤变。

五、测序反应后处理

（一）产物纯化目的

热循环反应完成后，反应液中含有未结合的荧光终止子、盐类、多余引物等杂质，若直接上样测序仪，会干扰毛细管电泳过程，导致数据信号紊乱、峰形异常。因此需通过纯化去除杂质，确保测序产物纯度符合上样要求。

（二）推荐纯化方法

方法一：纯化试剂盒纯化（高效便捷）

1. 准备 GeticoDye 纯化树脂（需提前平衡至室温），按每管反应液加入 10 μL 纯化树脂的比例，将树脂加入反应管中；
2. 盖紧管盖，置于振荡器上，以 1400 rpm 振荡 30 分钟，使树脂充分吸附杂质；
3. 振荡完成后，将反应管放入离心机，以 16000 rpm 离心 2 分钟，使树脂沉淀于管底，上清液即为纯化后的测序产物，可直接上样测序仪。



方法二：乙醇 / EDTA 沉淀法纯化（成本较低）

1. 向反应管中加入 2 μL 3 M 乙酸钠溶液（pH 5.2），轻轻混匀；
2. 再加入 50 μL 冰乙醇（ -20°C 预冷），颠倒混匀 5-10 次，置于 -20°C 冰箱静置 15-30 分钟，使 DNA 充分沉淀；
3. 取出后以 16000 rpm 离心 20 分钟，弃去上清液（注意勿倒出沉淀）；
4. 向管中加入 50 μL 70% 冰乙醇，轻轻颠倒洗涤沉淀，再以 16000 rpm 离心 5 分钟，弃去上清液；
5. 室温晾干沉淀（约 10-15 分钟，避免过度干燥导致 DNA 难溶解），随后加入 10-20 μL 无酶无 RNase 水或 Hi-Di™ 甲酰胺（适配测序仪上样），轻轻涡旋使沉淀完全溶解，即为纯化产物。

（三）纯化后产物处理

1. 纯化后的产物需在 24 小时内上样测序仪，若需暂存，需置于 -20°C 冰箱，保存时间不超过 1 周，避免反复冻融；
2. 上样前需短暂离心（2-3 秒），确保液体集中于管底，且需根据测序仪要求调整产物体积（如 3730XL 测序仪通常推荐上样体积 10-20 μL ）。

六、测序仪上样与参数设置（以 3730XL DNA Analyzer 为例）

（一）上样前准备

1. 检查 3730XL 测序仪的运行状态，确保毛细管阵列、缓冲液池、检测器等部件正常，且已完成日常维护（如更换缓冲液、清洗毛细管等）；
2. 准备适配 3730XL 测序仪的上样板（96 孔或 384 孔），将纯化后的测序产物按标记顺序加入上样板孔中，每孔加入对应体积（如 10 μL ），并在孔板边缘做好样品信息标记；
3. 向空白孔中加入等量无酶无 RNase 水或 Hi-Di™ 甲酰胺，避免上样板受力不均。

（二）仪器参数设置

1. 打开 3730XL 测序仪控制软件，新建测序实验，选择“Sequencing”模式，实验名称建议包含样品信息、日期等，便于后续数据分析；
2. 电泳参数设置：
 - 聚合物类型：推荐使用 POP-7 聚合物（适配 v3.1 体系）或 POP-6 聚合物（适配 v1.1 体系，提升 5' 端测序质量）；
 - Mobility 文件：选择专用文件，适配 3730XL 测序仪与缓冲液组合，推荐使用 KB_3730_POP7_BDTv3.mob（搭配 POP-7 聚合物时）；



- 运行时间：根据读长需求设置，常规推荐 2400 秒（可满足 500-600 bp 读长），若需更长读长，可延长至 3600 秒；

1. 数据采集参数：设置荧光检测通道（适配 GeticoDye 荧光染料波长），数据存储格式选择 .ab1 格式（便于后续使用 Sequencher 等软件分析）。

（三）上样与运行

1. 将上样板放入 3730XL 测序仪的样品仓，确保上样板位置正确，关闭样品仓门；
2. 在控制软件中确认样品信息与参数设置无误后，启动测序运行程序，运行过程中实时监控仪器状态，若出现报错（如压力异常、检测信号丢失等），需按仪器说明书提示暂停并排查问题；
3. 测序运行完成后，软件自动保存数据，可导出 .ab1 格式文件进行后续序列比对、变异分析等操作。

七、常见问题与解决方案

常见问题	可能原因（与缓冲液相关）	解决方案
测序信号强度整体偏低	1. 缓冲液稀释比例错误（如用量不足）；2. 缓冲液反复冻融导致活性下降；3. 缓冲液污染	1. 重新核对反应体系，按公式（缓冲液体积 = 0.5×(总反应体积 / 2.5) - Ready Reaction Mix 体积）计算用量；2. 更换未反复冻融的缓冲液，重新配置体系；3. 更换新批次缓冲液，严格遵循污染防控操作
测序数据噪声高（峰形杂乱）	1. 缓冲液与其他试剂混合不均匀；2. 缓冲液受核酸酶污染；3. 非推荐热循环仪升温速率过快	1. 缓冲液加入后充分涡旋混匀（2-3 秒），并短暂离心；2. 使用无酶无 RNase 耗材，更换新缓冲液；3. 调整热循环仪升温速率至 $\leq 1^{\circ}\text{C} / \text{秒}$ ，或更换推荐型号热循环仪
5' 端测序质量差（峰形模糊）	缓冲液与 v3.1 体系搭配 POP-7™ 聚合物，5' 端分辨率较低	1. 更换为 v1.1 体系搭配 POP-6™ 聚合物；2. 适当降低退火温度（如 48°C），延长退火时间至 10 秒
同一批次样品数据重复性差	1. 缓冲液批次间差异（若更换过	1. 确认缓冲液批次，使用同一批

	批次) ; 2. 缓冲液分装后保存时间超过 1 个月	次缓冲液重新实验; 2. 更换新分装的缓冲液, 确保分装后使用周期 \leq 1 个月
--	----------------------------	---

在使用缓冲液进行测序实验过程中, 若出现数据异常, 可参考以下常见问题与解决方案, 结合实验实际情况排查:

八、安全与储存

(一) 安全操作规范

1. 缓冲液仅用于科研用途, **禁止用于临床诊断、人体实验或食品相关检测**;
2. 操作过程中需佩戴一次性手套、护目镜, 穿实验服, 避免缓冲液直接接触皮肤、眼睛或口腔; 若不慎接触皮肤, 立即用大量清水冲洗 10-15 分钟; 若不慎入眼, 立即用生理盐水冲洗, 并及时就医;
3. 禁止饮食、吸烟或存放食品于实验操作区域, 防止试剂污染食品;
4. 含缓冲液的废弃反应液、耗材 (如吸头、离心管) 需分类收集, 按照实验室化学废弃物处理标准进行处置, **禁止随意排放或丢弃**。

(二) 储存与保质期

1. **储存条件**: 未开封缓冲液需 4°C 冷藏保存, 避免冷冻 (0°C 以下); 开封后若未分装, 需在 4°C 保存。