

# ATOPIex

## RNA 多重 PCR 建库通用说明书

---

说明书版本号: A2

## 版本历史

说明书版本	试剂盒版本	修订日期	修订内容摘要
A2	V1.0	2020年 12月	<ul style="list-style-type: none"> <li>增加样本提取试剂盒推荐</li> <li>删除定量 RNA 应用的描述和 960BC 使用内容</li> </ul>
A1	V1.0	2020年 7月	<ul style="list-style-type: none"> <li>变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”</li> </ul>
A0	V1.0	2020年 5月	<ul style="list-style-type: none"> <li>首次发布</li> </ul>

提示：请下载最新版说明书，对照相应版本的试剂盒使用。

搜索货号或产品名，下载说明书：[www.mgi-tech.com/download/files](http://www.mgi-tech.com/download/files)

# 目录

第一章 产品信息.....	1
1.1 概述.....	1
1.2 适用范围.....	1
1.3 适配测序平台.....	1
1.4 试剂盒组分.....	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期.....	2
1.6 客户自备物料清单.....	4
1.7 注意事项.....	5
第二章 样本要求及处理.....	6
2.1 样本要求.....	6
2.2 样本的保存和运输.....	6
第三章 文库构建标准流程.....	7
3.1 反转录.....	7
3.2 第一轮 PCR 反应.....	8
3.3 第一轮 PCR 产物纯化.....	8
3.4 第二轮 PCR 反应.....	9
3.5 第二轮 PCR 产物纯化.....	10
3.6 第二轮 PCR 产物质检.....	11
3.7 变性.....	11
3.8 单链环化.....	11
3.9 酶切消化.....	12
3.10 酶切消化产物纯化.....	13
3.11 酶切消化产物质检.....	13
第四章 测序.....	14
4.1 DNB 制备.....	14
4.2 测序.....	14
附录.....	15
附录 A 关于磁珠及纯化.....	15
附录 B ATOPlex 双标签引物模块（01-96）使用规则.....	16

# 第一章 产品信息

## 1.1 概述

本说明书是针对华大智造（MGI）ATOPlex定制产品平台打造的用于检测RNA定制靶区域的多重PCR扩增通用操作说明书，它仅适用于与本文所述产品使用相关的客户。该操作说明书适用于以下产品：ATOPlex RNA多重PCR通用建库模块V1.0，定制引物池模块，ATOPlex双标签引物模块（01-96），MGIEasy 双barcode环化试剂盒和ATOPlex 双标签平衡文库试剂。多重PCR建库采用两步PCR法，能够在同一管内完成对RNA靶区域的捕获和富集，将RNA制备成兼容华大智造测序平台矩阵式纳米芯片的单链环状DNA文库，通过高通量测序得到靶区域的数据。本试剂盒中双标签能够降低标签串扰的比例，降低错误率，同时建库采用了PCR产物污染清除技术，可以有效地避免假阳性的形成。试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库制备的稳定性和重复性。

## 1.2 适用范围

本说明书适用于各种样本类型，包括血液、组织、口腔拭子等样本提取的总RNA。

## 1.3 适配测序平台

搭配MGIEasy 双barcode环化试剂盒（货号：1000020570）构建文库，构建的文库需要搭配ATOPlex 双标签平衡文库试剂（货号：1000022270）进行测序。

文库进行双barcode测序，推荐使用MGISEQ-2000RS、MGISEQ-200RS及DNBSEQ-T7RS高通量测序试剂盒的“PE”测序，推荐测序类型为PE 100+10+10，对RNA进行全基因组测序，推荐搭配使用的测序套装和试剂盒详见第四章。

## 1.4 试剂盒组分

本建库说明书适用的试剂盒及其组分信息如下：

表 1 ATOPlex RNA 多重 PCR 建库通用说明书相关试剂盒及其组分

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
ATOPlex RNA 多重 PCR 通用建库模块 V1.0 (Box1) 货号：1000021624 规格：96 RXN	PCR Enzyme Mix	白色	4800 μL/瓶 × 1 瓶
	PCR Clean Enzyme	白色	96 μL/支 × 1 支
	PCR Additive	黄色	96 μL/支 × 1 支
	N6 Buffer	绿色	384 μL/支 × 1 支
	RT Buffer	绿色	480 μL/支 × 1 支
	RT Enzyme Mix	绿色	96 μL/支 × 1 支

ATOPlex RNA 多重 PCR 通用建库模块 V1.0 ( Box2 ) 货号: 1000021624 规格: 96 RXN	DNA Clean Beads	白色	3360 $\mu$ L /支 × 3 支
	Elution Buffer	白色	4800 $\mu$ L /支 × 1 支
定制引物池模块 规格: 96 RXN	PCR Primer Pool ( customized )	蓝色	384 $\mu$ L/支 × 1 支
	PCR Block ( customized )	蓝色	192 $\mu$ L/支 × 1 支
ATOPlex 双标签引 物模块 ( 01-96 ) V1.0 货号: 1000021626 规格: 96 RXN	PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)	-	8 $\mu$ L/孔× 96 孔
MGIeasy 双 barcode 环化试剂盒 (MGIeasy 双 Barcode 环化模块) 货号: 1000020570 规格: 16 RXN	Dual Barcode Splint Buffer	紫色	225 $\mu$ L/支× 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	10 $\mu$ L/支× 1 支
	Digestion Buffer	白色	30 $\mu$ L/支× 1 支
	Digestion Enzyme	白色	50 $\mu$ L/支× 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	145 $\mu$ L/支× 1 支
MGIeasy 双 barcode 环化试剂盒 (MGIeasy DNA 纯 化磁珠试剂盒) 货号: 1000020570 规格: 16 RXN	DNA Clean Beads	白色	1600 $\mu$ L/支× 2 支
	TE buffer	白色	1600 $\mu$ L/支× 1 支
ATOPlex 双标签平 衡文库试剂 货号: 1000022270	ATOPlex Dual Barcode Balanced Library Reagent	橙色	26 ng/支× 1 支

### 1.5 试剂盒储存条件及有效期

ATOPlex RNA多重PCR通用建库模块V1.0 ( Box1 )

- ◆ 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 干冰运输

ATOPlex RNA多重PCR通用建库模块V1.0 ( Box2 )

- ◆ 储存温度:  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 冰袋运输

#### 定制引物池模块

- ◆ 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 干冰运输

#### ATOPlex双标签引物模块 (01-96) V1.0

- ◆ 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 干冰运输

#### MGIEasy 双Barcode环化模块

- ◆ 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 干冰运输

#### MGIEasy 纯化磁珠试剂盒

- ◆ 储存温度:  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 冰袋运输

#### ATOPlex 双标签平衡文库试剂

- ◆ 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- ◆ 有效期: 见试剂盒标签
- ◆ 运输条件: 干冰运输

\*干冰运输, 请注意检查收到产品时是否有干冰剩余。

\*当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性。

## 1.6 客户自备物料清单

表 2 客户自备物料清单

仪器	漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 96 孔板磁力架 (ALPAQUA, Part#A00400) 1.5mL 管磁力架 (Thermo Fisher, Cat. No. 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (Thermo Fisher, Cat. No. Q33216) Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA) 或同等 功能仪器
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 1x TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) 无水乙醇 (分析纯) Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212) Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854) / Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. P7589) 安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-4626) DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-1504) 或同等功能仪器配套的分析试 剂
耗材	移液器吸头 1.5 mL 离心管 (Axygen, Cat. No. MCT-150-C) 0.2 mL PCR 管 (Axygen, Cat. No. PCR-02-C) 或 96 孔板 (Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C) Qubit® Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或 0.5mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C)

## 1.7 注意事项

- ◆ 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- ◆ 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。
- ◆ 文库制备流程推荐根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行调整和优化。本说明书提供的实验流程是通用的，可根据需要调整反应参数，以优化性能、效率。
- ◆ 试剂套装各组分使用前提前取出，将Enzyme瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- ◆ 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- ◆ 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应，使用前应预热PCR仪至反应温度附近。



**注意：**PCR产物因操作不当容易产生气溶胶污染，进而导致假阳性产生。因此，我们推荐将逆转录、第一轮PCR和第二轮PCR进行物理隔离，分为前中后三个区。在前区完成逆转录反应和第一轮PCR反应体系配制，在中区进行第一轮PCR反应、第一轮PCR产物纯化和第二轮PCR反应体系配制，在后区完成第二轮PCR反应、第二轮PCR产物纯化。上机前产物pooling、环化等可在后区进行。每个区需使用专用的移液器等设备并定时对各实验区域进行清洁（使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。

- ◆ 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊。
- ◆ 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- ◆ 若您有其他疑问，请联系MGI技术支持：[MGI-service@mgi-tech.com](mailto:MGI-service@mgi-tech.com)



## 第二章 样本要求及处理

### 2.1 样本要求

#### 2.1.1 样本类型

适用于多种类型样本提取的总RNA，包括血液、组织、口腔拭子等样本。

推荐使用以下提取试剂盒进行不同情景下样本RNA提取：

- **QIAamp Viral RNA Mini Kit** ( QIAGEN, 货号: 52904/ 52906 ):

适合手工操作，采用柱式提取法。

- **核酸提取试剂** ( MGI, 货号: 1000023879 ( VDR02P-96 )):

仅适用于自动化操作，采用磁珠提取法。搭配MGISP-960仪器可一次对96个样本进行RNA自动化提取。



**注意：其他非推荐的提取试剂盒提取的 RNA 未经过验证，不能确保建库或测序成功，请优先选择以上推荐的提取试剂盒。**

#### 2.1.2 起始量

RNA投入体积为10  $\mu\text{L}$ ， cDNA投入体积 $\leq 20.5 \mu\text{L}$ ，且必须为非打断cDNA。

### 2.2 样本的保存和运输

待测样本必须冷冻保存， $-20^{\circ}\text{C}$ 以下保存不超过1周， $-70^{\circ}\text{C}$ 以下保存不超过6个月。提取的RNA样品于 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下保存或立即逆转录为cDNA冷冻保存，且时间不超过1周。样本在保存过程中应避免反复冻融。

## 第三章 文库构建标准流程

样品RNA先完成一链cDNA合成，再通过两轮PCR扩增和PCR产物单链环化、酶切消化及质检完成文库制备。

### 3.1 反转录



**注意：**反转录与步骤 3.2 第一轮 PCR 反应液配制在前区进行操作。以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。如果样本为已经反转录的 cDNA，则从步骤 3.2 开始操作。

- 3.1.1 取 ATOplex RNA 多重 PCR 通用建库模块 V1.0 试剂待用。取 10  $\mu\text{L}$  RNA 样品至新的 0.2 mL PCR 管中。
- 3.1.2 将 N6 Buffer 和 RT Buffer 从  $-20^{\circ}\text{C}$  取出，解冻后颠倒混匀。按照表 3 中的配方在冰上配制反转录反应液。

表 3 反转录反应液的配制

组分	单个反应体积
N6 Buffer	4 $\mu\text{L}$
RT Buffer	5 $\mu\text{L}$
RT Enzyme Mix	1 $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

- 3.1.3 用移液器吸取 10  $\mu\text{L}$  配制好的反转录反应液加入 3.1.1 的 RNA 样品中，吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.1.4 将步骤 3.1.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 4 中的条件进行反应。

表 4 反转录反应条件

温度	时间
热盖 ( $105^{\circ}\text{C}$ )	On
$25^{\circ}\text{C}$	10 min
$42^{\circ}\text{C}$	30 min
$70^{\circ}\text{C}$	15 min
$4^{\circ}\text{C}$	Hold

- 3.1.5 反应结束后，瞬时离心 10 s，将产物置于冰上待用。

### 3.2 第一轮 PCR 反应

3.2.1 根据所需反应数，按照表 5 配方在冰上配制第一轮 PCR 反应液。

表 5 第一轮 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 $\mu$ L
PCR Clean Enzyme	0.5 $\mu$ L
PCR Primer Pool	4 $\mu$ L
Total	29.5 $\mu$ L



**注意：**PCR Primer Pool 为定制引物池组分，使用前务必充分混匀，涡旋震荡 5-6 次，每次 3-5 s。

3.2.2 用移液器缓慢吸取 29.5  $\mu$ L 配制好的第一轮 PCR 反应液加入步骤 3.1.5 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.3 将步骤 3.2.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 6 中的条件进行反应。



**注意：**第一轮 PCR 反应至步骤 3.4 第二轮 PCR 反应液的配制在中区进行。

表 6 第一轮 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖 (105°C)	on	
37°C	5 min	1 循环
95°C	10 min	
95°C	15 s	13 循环
64°C	1 min	
60°C	1 min	
72°C	30 s	
4°C	Hold	1 循环

3.2.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

### 3.3 第一轮 PCR 产物纯化



**注意：**操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

3.3.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。

3.3.2 用移液器吸取 60  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.2.4 中的产物中，并轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。

- 3.3.3 室温孵育 5 min。
- 3.3.4 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。
- 3.3.5 保持离心管置于磁力架上，加入 150  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.3.6 重复步骤 3.3.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.3.7 保持离心管置于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.3.8 将离心管从磁力架上取下，加入 14  $\mu\text{L}$  Elution Buffer 进行 DNA 洗脱，应保证加入的 Elution Buffer 充分浸润磁珠，防止磁珠过分晾干导致 PCR 产物损失。
- 3.3.9 室温下孵育 5 min。



**注意：**第二轮 PCR 反应带磁珠进行反应，产物无需进行磁力吸附和转移上清。



**停止点：**PCR 产物纯化后可置  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱储存。

### 3.4 第二轮 PCR 反应



**注意：**操作前请仔细阅读附录 B 关于 ATOplex 双标签引物模块 (01-96) 使用规则。

- 3.4.1 取 ATOplex 双标签引物模块 (01-96)，用移液器吸取 8  $\mu\text{L}$  对应的 PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)加入步骤 3.3.9 的 PCR 管中。
- 3.4.2 根据所需反应数，按照表 7 配方在冰上配制 PCR 反应液。

表 7 第二轮 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 $\mu\text{L}$
PCR Clean Enzyme	0.5 $\mu\text{L}$
PCR Additive	1 $\mu\text{L}$
PCR Block	2 $\mu\text{L}$
Total	28.5 $\mu\text{L}$



**注意：**PCR Block 为定制引物池组分，使用前务必充分混匀，涡旋震荡 5~6 次，每次 3~5 s。

- 3.4.3 用移液器吸取 28.5  $\mu\text{L}$  配制好的第二轮 PCR 反应液加入步骤 3.3.9 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.4.4 将步骤 3.4.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 8 的条件进行 PCR 反应。



**注意：第二轮 PCR 反应及后续操作在后区进行，PCR 反应结束后应立即进行下一步纯化操作，不能将 PCR 反应液置于 PCR 仪器中过夜反应。**

表 8 第二轮 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖 (105°C)	on	
37°C	5 min	1 循环
95°C	10 min	
95°C	15 s	
64°C	1 min	27 循环
60°C	1 min	
72°C	30 s	
4°C	Hold	
		1 循环

3.4.5 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

### 3.5 第二轮 PCR 产物纯化



**注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

- 3.5.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 3.5.2 吸取 45  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至步骤 3.4.5 的 50  $\mu\text{L}$  PCR 产物中，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
- 3.5.3 室温孵育 5 min。
- 3.5.4 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。
- 3.5.5 保持离心管置于磁力架上，加入 150  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.5.6 重复步骤 3.5.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.5.7 保持离心管置于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.5.8 将离心管从磁力架上取下，加入 25  $\mu\text{L}$  Elution Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.5.9 室温下孵育 5 min。
- 3.5.10 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器吸取 23  $\mu\text{L}$  上清液转移

到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ **停止点: PCR 纯化后产物可置-20°C 冰箱储存。**

### 3.6 第二轮 PCR 产物质检

3.6.1 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒, 按照定量试剂盒的操作说明对 PCR 纯化后产物进行定量。要求样本文库浓度 $\geq 4$  ng/ $\mu$ L。

3.6.2 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测, PCR 纯化产物片段分布范围应符合定制 panel 扩增子大小。

3.6.3 文库质检合格后, 根据实际情况制定混合方案, 文库混合后总量为 400 ng, 总体积 $\leq 48$   $\mu$ L。

**⚠ 注意: N 个样本文库进行混合, 每个样本文库需要相同测序数据量, 则将所有文库等质量混合, 单个文库取样量(ng)=400 ng/N, 单个文库取样体积( $\mu$ L)=单个文库取样量 (ng) / 单个文库的浓度(ng/ $\mu$ L)。**

### 3.7 变性

混合文库用 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒 (货号: 1000020570) 进行单链环化、酶切消化操作, 按照本操作说明书完成步骤 3.7 到 3.10, 制备成适用于 MGISEQ 系列和 DNBSEQ 系列测序仪的单链环文库。

3.7.1 取 400 ng 混合的 PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中, 用 TE Buffer 补充至总体积 48  $\mu$ L。

3.7.2 将步骤 3.7.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 9 的条件进行反应。

表 9 变性反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
95°C	3 min
95°C	Hold

3.7.3 反应结束后, 立即将步骤 3.7.2 所述 PCR 管置于冰上, 静置 2 min 后瞬时离心。

### 3.8 单链环化

3.8.1 根据反应数, 按照表 10 的配方在冰上配制单链环化反应液。

表 10 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.5 $\mu\text{L}$
DNA Rapid Ligase	0.5 $\mu\text{L}$
Total	12.0 $\mu\text{L}$

3.8.2 用移液器吸取 12  $\mu\text{L}$  配制好的单链环化反应液加入步骤 3.7.3 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.8.3 将步骤 3.8.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 11 的条件进行反应。

表 11 单链环化反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.8.4 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上，立即进入下一步反应。

### 3.9 酶切消化

3.9.1 在步骤 3.8.3 反应时，提前按照表 12 的配方在冰上配制酶切消化反应液。

表 12 酶切消化反应液的配制

组分	单个反应体积
Digestion Buffer	1.4 $\mu\text{L}$
Digestion Enzyme	2.6 $\mu\text{L}$
Total	4.0 $\mu\text{L}$

3.9.2 用移液器吸取 4  $\mu\text{L}$  配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.8.4 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.3 将步骤 3.9.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 13 的条件进行反应。

表 13 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
37°C	30 min
4°C	Hold

- 3.9.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.9.5 立即向 PCR 管中加入 7.5  $\mu$ L Digestion Stop Buffer，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底，吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

### 3.10 酶切消化产物纯化



**注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

- 3.10.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 3.10.2 吸取 170  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.9.5 的酶切消化产物中，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
- 3.10.3 室温孵育 10 min。
- 3.10.4 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。
- 3.10.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.10.6 重复步骤 3.10.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.10.7 保持离心管置于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.10.8 将离心管从磁力架上取下，加入 22  $\mu$ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 3.10.9 室温下孵育 10 min。
- 3.10.10 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器吸取 20  $\mu$ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。



**停止点：酶切消化纯化后产物可置-20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。**

### 3.11 酶切消化产物质检

使用 Qubit<sup>®</sup> ssDNA Assay Kit 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对酶切消化纯化后产物进行定量。最终要求酶切消化产物产量 (ssDNA)  $\geq 10$  ng，若产物 7 ng  $\leq$  ssDNA 产量  $< 10$  ng，建议进行风险 Make DNB。



## 第四章 测序

### 4.1 DNB 制备

以上构建的文库搭配 ATOplex 双标签平衡文库试剂进行测序。样本文库与平衡文库均使用测序套装里的试剂 Make DNB:

- 4.1.1 样本文库 DNB 制备: 取 10 ng 步骤 3.10 酶切消化产物进行 Make DNB 操作, 若当 7 ng  $\leq$ ssDNA 产量 < 10ng 时, 全部投入消化产物进行 Make DNB 操作, 用 TE Buffer 补充至总体积 20  $\mu$ L。
- 4.1.2 平衡文库 DNB 制备: 根据 ATOplex 双标签平衡文库的浓度, 取 6 ng 平衡文库进行 Make DNB 操作, 用 TE Buffer 补充至总体积 20  $\mu$ L。
- 4.1.3 DNB 混合: 将 4.1.1 的样本文库 DNB 与 4.1.2 的平衡文库 DNB 按质量比 3:1 混合后上机测序, 即样本文库 DNB 量 (ng) : 平衡文库 DNB 量 (ng) = 3:1。

### 4.2 测序

DNB文库进行双barcode测序, 推荐搭配以下MGISEQ-2000RS、MGISEQ-200RS及DNBSEQ-T7RS高通量测序试剂盒的“PE”测序套装和试剂盒, 选择PE100+10+10的测序类型进行上机:

CPAS 条形码引物 3 试剂盒: (货号: 1000020834);

MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100) 或

MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100);

MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100) 或

MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100);

DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100);



**注意: “PE”测序需搭配 CPAS 条形码引物 3 试剂盒: (货号: 1000020834)**

测序前请仔细阅读对应的说明书, 并严格按照说明书的内容进行操作。

## 附录

### 附录 A 关于磁珠及纯化

本试剂盒推荐使用包装内的DNA Clean Beads进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需要重新摸索。

#### 磁珠使用前注意事项

- ◆ 磁珠使用前，提前30 min从4°C取出，涡旋混匀且平衡至室温，有利于保证回收效率。
- ◆ 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吸打，确保充分混匀。
- ◆ 磁珠用量直接影响纯化得到的DNA片段的下限长度。磁珠用量越高，纯化得到的DNA片段的下限长度越小。

#### 磁珠操作注意事项

- ◆ 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发减少，应加入TE Buffer补齐体积，再用推荐磁珠用量纯化。
- ◆ 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，一般需要2~3 min。但由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间有时可能需要延长，以液体彻底澄清为准。
- ◆ 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留2~3  $\mu\text{L}$  液体，避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。
- ◆ 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架中，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠。
- ◆ 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。
- ◆ 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成无水乙醇残留影响后续反应，过分干燥（磁珠开裂）会降低纯化得率。通常情况下，室温干燥需要5~10 min，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察，磁珠表面无反光，即可进行产物洗脱，可用试剂盒附带的TE Buffer进行洗脱。
- ◆ 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应，所以，洗脱体积应该比最终吸取上清的体积多2  $\mu\text{L}$ 。
- ◆ 在1.5 mL磁力架上开关管盖应小心，避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住1.5 mL离心管中下段，然后开盖。

## 附录 B ATOplex 双标签引物模块 (01-96) 使用规则

- ◆ 本模块为双标签建库提供双标签引物，提供1板PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)，共96个。双标签建库能够降低标签串扰的比例，降低错误率。标签基于碱基平衡的设计原则，经过反复实验测试，挑选的最佳Barcode组合，为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录B的使用规则。
- ◆ 请勿将其置于室温以上的温度，否则易发生降解，影响使用效果。
- ◆ 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于板底，用吸水纸擦拭干净铝箔表面；使用过程中注意更换吸头，避免污染，使用完毕后若还有剩余试剂需重新封膜，做好标记，-20℃保存。

### PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)使用规则

PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)分布图及成组规则如图1所示。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	02	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	03	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	04	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	05	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	06	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	07	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

图1 PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)分布图及成组规则

另外，基于碱基平衡的设计原则，需将PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)成组使用，分组规则如下：

4 个 PCR Dual Barcode Primer Mix 成组：01-04、05-08、09-12、13-16，共计 4 组

8 个 PCR Dual Barcode Primer Mix 成组：17-24、25-32、33-40、41-48，49-56，57-64，65-72，73-80，81-88，89-96 共计 10 组；

要求每次至少上机测序 4 个文库，且 PCR Dual Barcode Primer Mix 按照上面规则成组使用。

联系我们

生产企业：深圳华大智造科技股份有限公司

生产地址：深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼

客服电话：4000-966-988

技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

网 址：www.mgi-tech.com



官方微信