

编号: H-940-000184-00-00



使用说明书

版本: 2.0

MGIEasy 游离DNA文库 制备试剂套装

货号: 940-000184-00 (48 RXN)

940-000185-00 (96 RXN)

试剂盒版本号: V1.0

关于说明书

©2023 深圳华大智造科技股份有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造科技股份有限公司（以下简称华大智造）的专有保密信息，未经华大智造的书面许可，任何个人或组织不得全部或部分地对本说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本说明书的读者为终端用户。说明书作为产品的一部分，由华大智造授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本说明书。

华大智造对本说明书不做任何种类的保证，包括（但不限于）用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。华大智造已经采取措施，确保本说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本说明书和产品进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

本说明书中的所有图片均为示意图，图片内容可能与实物有细微差异，请以购买的产品为准。

DNBSEQ™、MGISEQ™、Agilent®、Ambion®、Axygen®、Invitrogen®、Thermo Fisher®、Qubit®，以及文中涉及的其它名称及商标属于各自所有者资产。

制造商信息

生产企业	深圳华大智造科技股份有限公司
生产地址	中国深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼
客服电话	4000-688-114
技术支持	MGI-service@mgi-tech.com
网 址	www.mgi-tech.com

版本记录

说明书版本	试剂盒版本	日期	修订内容摘要
2.0	V1.0	2023 年 9 月	• 更新技术支持电话 • 更新说明书风格 • 更新组分规格
1.0	V1.0	2021 年 12 月	变更试剂产品货号信息



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: <https://www.mgi-tech.com/download/files>

目录

1	产品信息	1
1.1	产品描述	1
1.2	适用范围	1
1.3	适配测序平台	1
1.4	组分	1
1.5	储存与运输	3
1.6	自备物料清单	3
1.7	注意事项	4
1.8	流程	5
2	样本要求	6
3	文库构建标准流程	7
3.1	末端修复	7
3.2	接头连接	8
3.3	连接产物纯化	10
3.4	PCR	11
3.5	PCR 产物纯化	12
3.6	PCR产物质检	13
3.7	变性及单链环化	13
4	测序	15
5	附录	16
5.1	关于 Adapter 使用	16
5.2	关于样本 pooling	21

--- 此页有意留白 ---

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 游离DNA文库制备试剂套装是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的游离 DNA 文库制备试剂，可广泛应用于游离 DNA 的研究。使用 MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒可以对游离 DNA 及片段大小为 150 bp~250 bp 的片段化DNA进行操作，制备得到双链 DNA 文库。使用配套的 MGIEasy 快速环化模块，制备得到兼容华大智造测序平台的单链环状 DNA 文库。试剂套装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

本试剂套装适用于游离 DNA、150 bp~250 bp 片段化的 DNA。可用于血浆游离 DNA 研究及病原微生物检测等应用场景。

1.3 适配测序平台

构建的文库可用于以下平台的“SE”或“PE”测序：

- BGISEQ-50RS
- BGISEQ-500RS
- MGISEQ-200RS
- MGISEQ-2000RS

1.4 组分

本试剂套装包含有 2 个规格，分别是 48 RXN 和 96 RXN。每个试剂套装包含 2 ~ 3 个独立试剂盒。不同规格的套装中包含试剂盒、货号、组分信息见下表。

套装中包含信息卡片，客户可通过卡片信息登录 MGI 官网，下载相应说明书及 SDS 文件。

表 1 MGIEasy 游离 DNA 文库制备试剂套装 (48 RXN) (货号: 940-000184-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 1) 货号: 940-000-163-00	ERAT Buffer Mix	 无色	155 μ L/支 $\times$ 3
	ERAT Enzyme Mix	 无色	10 μ L/支 $\times$ 3
	Ligation Buffer Mix	 红色	384 μ L/支 $\times$ 3
	Ligation Enzyme	 红色	16 μ L/支 $\times$ 3
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	400 μ L/支 $\times$ 3
	PCR Primer Mix	 蓝色	64 μ L/支 $\times$ 3
	DNA Control	 黄色	10 μ L/支 $\times$ 1
	Adapter Mix (Barcode 01-48)	 无色	10 μ L/孔 $\times$ 48
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 2) 货号: 940-000-164-00	Elution Buffer	 白色	1500 μ L/支 $\times$ 3
	Purification Beads	 白色	1500 μ L/支 $\times$ 3
MGIEasy 快速环化模块 货号: 1000005258	Splint Buffer	 紫色	186 μ L/支 $\times$ 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μ L/支 $\times$ 1

表 2 MGIEasy 游离 DNA 文库制备试剂套装 (96 RXN) (货号: 940-000185-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 1) 货号: 940-000-165-00	ERAT Buffer Mix	 无色	903 μ L/支 $\times$ 1
	ERAT Enzyme Mix	 无色	58 μ L/支 $\times$ 1
	Ligation Buffer Mix	 红色	1152 μ L/支 $\times$ 2
	Ligation Enzyme	 红色	96 μ L/支 $\times$ 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μ L/支 $\times$ 2
	PCR Primer Mix	 蓝色	384 μ L/支 $\times$ 1
	DNA Control	 黄色	10 μ L/支 $\times$ 1
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 2) 货号: 940-000-166-00	DNA Adapters-96 (1 pmol/ μ L)	/	10 μ L/孔 $\times$ 96

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 3) 货号: 940-000-167-00	Elution Buffer	○ 白色	6100 μ L/支 $\times$ 2
	Purification Beads	○ 白色	5500 μ L/支 $\times$ 2
MGIEasy 快速环化模块 货号: 1000005258	Splint Buffer	● 紫色	186 μ L/支 $\times$ 1
	DNA Rapid Ligase	● 紫色	8 μ L/支 $\times$ 1

1.5 储存与运输

表 3 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	货号	储存温度	运输温度
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 1) 48 RXN	940-000163-00	-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	-80 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 1) 96 RXN	940-000165-00		
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 2) 96 RXN	940-000166-00		
MGIEasy 快速环化模块	1000005258		
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 2) 48 RXN	940-000164-00	2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C	2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C
MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒 (Box 3) 96 RXN	940-000167-00		



- 提示
- 有效期见试剂盒标签。
 - 若使用冰袋或干冰进行运输，请在收到货物后检查是否有剩余的冰或干冰。
 - 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 自备物料清单

表 4 MGI 产品订购信息

货号	型号	名称
1000002072	SE50	BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装
1000004635	SE50	MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装
1000012551	SE50	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装

表 5 设备清单

名称	推荐品牌
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
Qubit3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器

表 6 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
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 dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Cat. No. Q32854
移液器吸头	/
1.5 mL 离心管	/
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen, Cat. No. PCR-02-C 或 Axxygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen, Cat. No. Q32856 或 Axxygen, 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。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 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。如果 PCR 仪无法设置热盖温度，也可保持在 105 °C。
- PCR产物如操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；不同功能区使用其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。

- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- 若有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

1.8 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	末端修复	35 ~ 40 min	5 ~ 10 min
3.2	接头连接	30 min	5 ~ 10 min
3.3	连接产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.4	PCR	25 ~ 40 min	5 ~ 8 min
3.5	PCR产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.6	PCR产物质检 	15 ~ 60 min	10 ~ 20 min
3.7	变性及单链环化	45 ~ 50 min	15 min

-  提示
- 总时长：指 8 个反应理论时长，单次建库样本数增多，时间将延长。
 - 手工操作时长：指该流程累计手工操作的总时长。
 - ：停止点。

2 样本要求

- 用于提取血浆游离 DNA 样本的外周血需保存在 EDTA 抗凝管中，不适用于肝素钠抗凝管；建议 200 μ L 血浆起始提取 DNA；
- 若样本为片段化后的 DNA，该 DNA 样本的片段主峰在 150 bp~250 bp 之间，范围集中；
- 建库 DNA 样本投入量在 2 ng~6 ng 之间；
- DNA 样本建议使用 TE Buffer 洗脱，若样本 DNA 制备过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复步骤的效率。

3 文库构建标准流程

3.1 末端修复



- 提示
- 若使用的 PCR 仪升温速度较慢，使用前建议预热 PCR 仪至反应温度附近。
 - 每批次建库可选择加入一个 DNA Control 试剂作为质控品，用于对建库试剂、建库和测序操作的质控。DNA Control 为打断后经过片段筛选的大小为 150 bp ~ 250 bp 人基因组 DNA，DNA Control 构建的文库和同一批待检的文库一起上机测序，DNA Control 的文库浓度和上机测序结果应均符合质控标准。

3.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 7 试剂准备

试剂名称	要求
NF Water	室温暂存
DNA Control	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
ERAT Buffer Mix	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
ERAT Enzyme Mix	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.1.2 末端修复

1. 根据样本浓度，取 200 μL 血浆制备的游离 DNA 样本或 2 ng ~ 6 ng 游离 DNA 样本至新的 0.2 mL PCR 管，体积应少于 40 μL ，不足 40 μL 部分用 **NF Water** 补足。涡旋混匀，瞬时离心。
2. 取 **1.5 μL DNA Control** 至新的 0.2 mL PCR 管，加入 **38.5 μL NF Water** 至总体积 40 μL ，涡旋混匀，瞬时离心。（推荐）
3. 根据所需反应数，在冰上配制末端修复反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 8 末端修复反应液的配制

组分	单个反应体积
ERAT Buffer Mix	9.4 μ L
ERAT Enzyme Mix	0.6 μ L
Total	10 μ L

4. 吸取**10 μ L末端修复反应液**至各样本管中（步骤1、2），涡旋混匀3次，每次3s，瞬时离心后置于冰上。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 9 末端修复反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
85 °C 热盖	On
37 °C	10 min
65 °C	15 min
4 °C	Hold

6. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底。



注意 不建议在此处停止，请继续完成接头连接。如果必须停止，末端修复产物可放在 -20 °C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20% 左右。

3.2 接头连接



提示 操作前请仔细阅读第 16 页“关于 Adapter 使用”。

3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 10 试剂准备

试剂名称	要求
Adapters Mix (Barcode 01-48) 或 DNA Adapters-96	涡旋混匀、离心，冰上暂存
Ligation Buffer Mix	室温溶解，混匀离心，冰上暂存
Ligation Enzyme	瞬时离心，冰上暂存



提示 • Adapters Mix、Adapters 使用前须充分涡旋混匀，且不可直接与接头连接反应液混合。

- Ligation Buffer Mix 溶液较粘稠，使用前涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心。吸取时请慢吸慢放，确保加液量正确。

3.2.2 接头连接

1. 吸取 5 μL Adapters Mix (Barcode 01-48) 或 DNA Adapters-96 至对应的样本管中（3.1.2 节步骤 6），涡旋混匀 3 次，每次 3 秒，瞬时离心后置于冰上。
2. 根据所需反应数，在冰上配制接头连接反应液，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 11 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Ligation Buffer Mix	24 μL
Ligation Enzyme	1 μL
Total	25 μL

3. 缓慢吸取 25 μL 接头连接反应液至各样本管中，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心使液体收集至管底后置于冰上。



提示 接头连接反应液较粘稠，吸取时请慢吸慢放，确保加液量正确。

4. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 12 接头连接反应条件（体系：80 μL ）

温度	时间
30 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
23 $^{\circ}\text{C}$	20 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。



注意 不建议在此处停止，请继续完成接头连接产物纯化。如果必须停止，末端修复产物可放在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜，但产量可能会下降。

3.3 连接产物纯化

 提示 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

3.3.1 准备

表 13 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
Elution Buffer	室温暂存
Purification Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.3.2 连接产物纯化

 提示 若使用 1.5 mL 样本管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本全部反应液转移至新的1.5 mL 样本管。

1. 混匀 Purification Beads，吸取**40 μ L Purification Beads**至样本管中（3.2.2 节步骤 5），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管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **200 μ L 80% 乙醇**漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将样本管从磁力架上取下，加入 **23 μ L Elution 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。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **21 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.4 PCR

3.4.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 14 试剂准备

试剂名称	要求
PCR Enzyme Mix	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
PCR Primer Mix	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存

3.4.2 PCR

1. 根据所需反应数，在冰上配制 PCR 反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 15 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Primer Mix	4 μL
Total	29 μL

2. 吸取 **29 μL PCR 反应液**至样本管中（3.3.2 节步骤 9），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心使液体收集至管底。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 16 PCR 反应条件（体系：50 μL）

温度	时间	循环数
105 °C热盖	on	-
98 °C	2 min	1
98 °C	15 s	12
56 °C	15 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1
4 °C	Hold	-

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

3.5 PCR 产物纯化

 提示 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

3.5.1 准备

表 17 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
Elution Buffer	室温暂存
Purification Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.5.2 PCR 产物纯化

 提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本全部反应液转移至新的1.5 mL 离心管。

1. 混匀 Purification Beads，吸取**50 μ L Purification Beads** 至样本管中（3.4.2 节步骤 4），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管中。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **200 μ L 80% 乙醇**漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将样本管从磁力架上取下，加入 **32 μ L Elution 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。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **30 μ L** 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.6 PCR产物质检

- 使用双链荧光定量法，按照定量试剂盒的操作说明书对 PCR 纯化后产物进行定量。

表 18 PCR纯化后产物不同质检方法及标准

质检方法	设备/试剂	标准
双链荧光定量法	Qubit dsDNA HS Assay Kit 等	PCR产物的浓度: $\geq 2 \text{ ng } / \mu\text{L}$

- 不同片段大小的双链 DNA 样本 1 pmol 分子对应不同的质量，可根据第 21 页“关于样本 pooling”公式 1 计算所需的 DNA 量。
- 如需将多个样本混合测序，建议根据第 16 页“关于 Adapter 使用”设计混合方案，在定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，推荐混合质量 168 ng，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$ 。

3.7 变性及单链环化

 提示 操作前请根据纯化后 PCR 产物的主带分布，样本浓度，参考公式 1、2 计算所需纯化后 PCR 产物体积。

3.7.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 19 试剂准备

试剂名称	要求
Elution Buffer	室温暂存
Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	瞬时离心，冰上暂存

3.7.2 变性

- 吸取 1 pmol PCR 纯化产物或 PCR 纯化后混合测序产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 Elution Buffer 补足至总体积 48 μL 。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 20 变性反应条件（体系：48 μL ）

温度	时间
105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min

- 反应结束后，立即将 PCR 管置于冰上，静置 2 min，瞬时离心后置于冰上。

3.7.3 单链环化

1. 根据反应数，在冰上配制单链环化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 21 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12.1 μL

2. 吸取 **12.1 μL 单链环化反应液**至各样本管中 (3.7.2 节步骤 3)，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 22 单链环化反应条件（体系：60.1 μL）

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	30 min
4 °C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上。

 停止点 产物可置 -20 °C 冰箱储存。

4 测序

取 20 μ L 单链环化产物制备 DNB 及后续操作。请根据具体应用的要求选择合适的测序平台和测序类型进行上机：

- 在 BGISEQ-500RS 基因测序仪使用 BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装（SE50）进行测序；
- 或在 MGISEQ-2000RS 基因测序仪使用 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（SE50）进行测序；
- 或在 MGISEQ-200RS 基因测序仪使用 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装（SE50）进行测序；

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。

5 附录

5.1 关于 Adapter 使用

试剂套装根据反应数不同提供 2 种不同规格的 **Adapter** 试剂盒。两款试剂盒均为满足大量样本批量化建库、多样本混合测序而研发，基于碱基平衡的设计原则，经过反复实验测试，挑选了最佳的 **Adapter** 组合，但 **Adapter** 编号不连续。为保证最佳效果，使用时请详细阅读两种规格的使用规则。

- 两款 **Adapter** 试剂盒编号存在重叠，编号一致的 **Adapter**，**Barcode** 碱基序列相同，不能在同一条 lane 中测序。
- **Adapter** 为双链接头，请勿将其置于室温以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。
- **Adapter**使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底或板底。
- 吸取不同 **Adapter** 时注意更换吸头，避免交叉污染。
- 对于管式 **Adapters** 使用时需小心地揭开管盖，防止液体飞溅，避免交叉污染，使用后及时盖上管盖。
- 对于板式 **Adapters**，用 75% 酒精喷洒表面并用吸水纸擦拭干净铝膜表面。封膜是可穿透的，封膜表面不能接触尖锐物体。第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝膜直接吸取液体。使用后，刺破孔位的剩余试剂需逐一转移到离心管中，做好标记，-20 °C 保存。
- 若有使用 **MGI** 其它建库试剂盒中的 **barcode** 接头或引物，由于设计工艺不同，禁止混用，否则数据无法拆分。

5.1.1 Adapters Mix (Barcode 01-48) 试剂使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将 **Adapter** 成组使用，试剂盒中包含的 **Adapter Mix**具备如下的分组规则：

- 4个 **Adapter** 成组：01-04，05-08，09-12，13-16，共计 4 组。
- 8个 **Adapter** 成组：17-24，25-32，33-40，41-48，共计 4 组。

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考下表所示的推荐 **Barcode** 组合方案：

 **注意** 同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。

表 23 Adapters Mix (Barcode 01-48) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	- 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04，将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 - 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 41-48，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。
2	- 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04，将 01 和 02 取等体积混合成 mix 后加入样本 1 中。将 03 和 04 取等体积混合成 mix 后加入样本 2 中。 - 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-44 取等体积混合成 mix，加入样本 1 中。将 45-48 取等体积混合成 mix，加入样本 2 中。
3	- 样本 1、2 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 - 样本 3 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	- 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。 - 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别取等体积混合成 mix，分别加入样本 1、2、3、4 中。
5	- 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 - 样本 5 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	- 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 - 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。
7	- 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 - 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 - 样本 7 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。

样本数/lane	使用方法（举例）
8	- 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-48 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。 - 或加两组 4 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，05-08，将 8 个编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。
8n+x (n=1~5 x=1~8, 总计 9~48个)	分两步： 1. 样本 1-8n，每 8 个样本一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。  提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。

当样本数据量要求不同时，需遵循在一条lane中数据量要求大于20%的样本不得使用不成组的Adapter。例如，有 9 个样本 pooling 于一条 lane 中，其中有 1 个样本要求数据量为 30%，此时需采用如下 Barcode 的方案：8 个样本使用 Adapter 41-48；另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要使用 Adapter 01-04或 Adapter 13-16 或其他 41-48 以外的成组 Adapter。

5.1.2 DNA Adapters-96（板式）试剂使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将 Adapter 成组使用，试剂盒中包含的 Adapter 具备如下的分组规则：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	41	57	65	73	81	89	97	121	25	33	49
B	02	42	58	66	74	82	90	98	122	26	34	50
C	03	43	59	67	75	83	91	99	123	117	35	51
D	04	44	60	68	76	84	92	100	124	28	36	52
E	13	45	61	69	77	85	93	101	125	29	37	53
F	14	46	62	70	78	86	94	102	126	30	38	116
G	15	47	63	71	79	87	95	103	127	114	39	55
H	16	48	64	72	80	88	96	104	128	32	115	56

图 1 MGIEasy DNA Adapters-96（板式）Adapters 分布图及成组规则

- 4个 Adapter 成组：第 1 列（01-04，13-16），共计 2 组（上图红色框）。
- 8个 Adapter 成组：第 2-9 列（41-48、57-64、65-72、73-80、81-88、89-96、97-104 和 121-128），共计 8 组（上图蓝色框）。
- 24个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组（上图紫色框）。

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

 **注意** 同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。

表 24 DNA Adapters-96（板式）试剂使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04，将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 41-48，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。
2	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04，将 01 和 02 取等体积混合成 mix 后加入样本 1 中。将 03 和 04 取等体积混合成 mix 后加入样本 2 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-44 取等体积混合成 mix，加入样本 1 中。将 45-48 取等体积混合成 mix，加入样本 2 中。
3	1. 样本 1、2 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 3 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别取等体积混合成 mix，分别加入样本 1、2、3、4 中。

样本数/lane	使用方法（举例）
5	1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。
7	1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 7 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。  提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	• 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 41-48，将 41、42、43、44、45、46、47、48 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。
8n+x (n=1、2 x=1~8, 总计 9~24个)	分三步： 1. 样本 1-8 ▪ 分成 1 组，采用上述（8样本数/lane）方法加 Adapter。 ▪ 或分成 2 组，样本 1-4、5-8 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 9-8n，每 8 个样本一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。  提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。
8n+x (3≤n<11 x=1~8, 总计 25~96个)	分三步： 1. 样本 1-24，加一组 24 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 2. 样本 25-8n，每 8 个样本分为一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。  提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。

当样本数据量要求不同时，需遵循在一条lane中数据量要求大于20%的样本不得使用不成组的Adapter。例如，有 9 个样本 pooling 于一条 lane 中，其中有 1 个样本要求数据量为 30%，此时需采用如下 Barcode 的方案：

1. 8个样本使用 Adapter 41-48；
2. 另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要使用 Adapter 01-04或 Adapter 13-16 或其他 41-48 以外的成组 Adapter。

5.2 关于样本 pooling

 注意 不同片段长度的文库不建议 pooling 测序。

 提示 Pooling 前建议参考 Adapter 使用规则设计混合方案。

5.2.1 PCR 纯化产物 pooling

在 PCR 纯化产物定量后进行不同 barcode 样本混合。混合后总量为 1 pmol，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μ L。

混合前，计算同一条 lane 上每个样本所需数据量的百分比。参考公式 1、2 计算混合前单个样本所需质量，参考公式 3 计算混合前单个样本所需体积。

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量(ng)} = \frac{\text{PCR产物主带大小 (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

公式 2 混合前单个样本所需质量计算

$$\text{单个样本所需质量 (ng)} = 1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} \times \text{单个样本数据量占比 (\%)}$$

公式 3 混合前单个样本所需体积计算

$$\text{样本体积 } (\mu\text{L}) = \frac{\text{样本质量 (ng)}}{\text{样本浓度 (ng}/\mu\text{L})}$$

例如：计划将 4 个文库（插入片段长度均为 150 ~ 200 bp, adapter 长度 84 bp，所添加的 adapter 符合使用规则）在同一 lane 上混合测序，1 pmol PCR 产物建议投入 168 ng。

1. 计算各样本所需质量。

- 如预期得到的各样本的数据量是相同的，即 4 个样本的数据量占比均为 25%。参考公式 2 计算每个样本的 PCR 产物需取 $168 \text{ ng} \times 25\% = 42 \text{ ng}$ 。
- 如预期得到的各样本的数据量是不同的。4 个样本的数据量占比为：样本 1：样本 2：样本 3：样本 4 = 20%：20%：30%：30%。参考公式 2 计算样本 1 所需质量为 33.6 ng。同法计算样本 2 ~ 4 所需质量。

2. 样本 1 浓度为 10 ng/ μ L，参考公式 3 计算得到 A μ L。同样方法计算样本 2 ~ 4 的体积。

3. 取 A μ L 样本 1 至新的 0.2 mL PCR 管中。

4. 依次加入样本 2 ~ 4 的相应体积到步骤 3 管中。

5. 用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

 提示 A、B、C、D 体积均需 $\geq 1 \mu\text{L}$ 。

表 25 多样本混合测序

名称	体积
样本 1	A μL
样本 2	B μL
样本 3	C μL
样本 4	D μL
TE Buffer	$48 - (A+B+C+D) \mu\text{L}$
Total	48 μL

当某个样本的取样体积不足 1 μL 时，可采取如下两个方案混合样本，推荐使用方案一。

方案一：将所有样本的体积放大 Z ($Z > 1$)倍。将样本混合后，再取混合样本总体积 W μL 的 $1/Z$ ，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

表 26 待混合测序样本体积放大 Z 倍

名称	体积
样本 1	$A \times Z \mu\text{L}$
样本 2	$B \times Z \mu\text{L}$
样本 3	$C \times Z \mu\text{L}$
样本 4	$D \times Z \mu\text{L}$
Total	W μL

表 27 方案一：多样本混合测序

名称	体积
放大 Z 倍后混合样本	$(W \div Z) \mu\text{L}$
TE Buffer	$48 - (W \div Z) \mu\text{L}$
Total	48 μL

 提示 推荐将放大 Z 倍后的混合样本重新定量，再计算 1 pmol 所需体积，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

方案二：将取样体积不足 1 μL 的高浓度样本稀释 Y ($Y > 1$)倍。再将稀释后的样本重新定量，按稀释后的浓度、公式 3 计算新体积 E，加入混合测序样本中。

例如，样本 3 的取样体积不足 1 μL ，需将样本 3 稀释 Y 倍。

表 28 稀释高浓度样本 Y 倍

名称	体积
样本 3	建议 $\geq 5 \mu\text{L}$

名称	体积
TE Buffer	5Y - 5 μ L
Total	5Y μ L

 提示 高浓度样本稀释时，建议取样体积 $\geq 5 \mu\text{L}$ 。样本稀释后需重新定量。

将稀释后的样本 3 重新定量，计算得到新体积 E。将稀释后的样本 3 与其他样本混合，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

表 29 方案二：多样本混合测序

名称	体积
样本 1	A μ L
样本 2	B μ L
样本 4	D μ L
稀释 Y 倍后的样本 3	E μ L
TE Buffer	48 - (A+B+D) - E μ L
Total	48 μ L

--- 此页有意留白 ---