

MGI Easy

呼吸道微生物基因组扩增试剂盒使用说明书

货号：940-000059-00 (16 RXN)

试剂盒版本号：V1.0

说明书版本号：1.0

版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
1.0	V1.0	2022 年 4 月	◆ 首次发布

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

目录

第一章 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 试剂盒组分.....	1
1.5 试剂盒储存条件.....	2
1.6 客户自备物料清单.....	4
1.7 注意事项.....	4
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 RT-PCR 扩增.....	7
3.2 PCR free 文库制备.....	9
3.3 酶切消化产物制备.....	14
第四章 测序	17
4.1 DNB 制备.....	17
4.2 测序.....	17
附录	18
附录 A 关于磁珠及纯化.....	18
附录 B 关于 Adapter 使用.....	19
附录 C 关于接头连接反应.....	21

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 呼吸道微生物基因组扩增试剂盒是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的用于扩增甲型流感和乙型流感病毒全基因组的试剂盒。该试剂盒采用一步法RT-PCR方法, 在一管中快速地扩增流感病毒的8个片段全基因组, 包括甲型HA (1-16)、NA (1-9) 亚型流感和乙型Yamagata与Victoria流感, 再搭配MGIEasy Fast PCR-FREE酶切文库制备试剂套装进行文库制备。采用的一步法RT-PCR扩增方法和Fast PCR-free建库方法, 简化了建库流程, 缩短了操作时间。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

本试剂盒适用于多种类型样本提取的总RNA, 包括培养毒株、咽拭子等, 推荐用于甲型流感和乙型流感病毒的全基因组捕获、分型和组装等应用。

1.3 适配测序平台

构建的PCR free文库搭配MGIEasy 双barcode环化试剂盒 (货号: 1000020570) 进行单链环化、酶切消化操作, 然后使用测序套装里试剂制备DNB。

DNB进行双Barcode测序, 推荐搭配MGISEQ-2000RS或MGISEQ-200RS高通量试剂盒的“PE”测序套装进行上机测序, 测序类型为PE100+10+10。搭配的测序套装和试剂盒详见第四章。

1.4 试剂盒组分

MGIEasy 呼吸道微生物基因组扩增试剂盒为16 RXN, 可搭配16 RXN或96 RXN MGIEasy Fast PCR-FREE酶切文库制备试剂套装进行文库构建, 本试剂盒及可搭配的建库套装试剂盒、货号、组分信息见下表。

表 1-1 MGIEasy 呼吸道微生物基因组扩增试剂盒 (16 RXN) (货号: 940-000059-00)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 呼吸道微生物基因组 扩增试剂盒 (16 RXN) 货号: 940-000059-00	FluA/B Primer Pool	蓝色	32 μ L/支 \times 1 支
	Flu Control Primer	蓝色	32 μ L/支 \times 1 支
	RT-PCR Buffer	黄色	400 μ L/支 \times 1 支
	RT-PCR Enzyme Mix	白色	40 μ L/支 \times 1 支

表 1-2 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 (16 RXN) (货号: 940-000019-00)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切 文库制备模块 货号: 940-000017-00	20x Elute Enhancer	黑色	5 μ L/支 \times 1 支
	Fast FS Buffer	绿色	180 μ L/支 \times 1 支
	Fast FS Enzyme	绿色	90 μ L/支 \times 1 支
	Fast Ligation Buffer	红色	391 μ L/支 \times 1 支
	Ad Ligase	红色	85 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Enhancer	棕色	34 μ L/支 \times 1 支
MGIEasy 双端独立标签 PF 接 头试剂盒 货号: 940-000018-00	UDB Adapters	蓝色	5 μ L/支 \times 16 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1 支

表 1-3 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 (96 RXN) (货号: 940-000021-00)

试剂盒种类与货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切 文库制备模块 货号: 940-000020-00	20x Elute Enhancer	黑色	15 μ L/支 \times 1 支
	Fast FS Buffer	绿色	1360 μ L/支 \times 1 支
	Fast FS Enzyme	绿色	600 μ L/支 \times 1 支
	Fast Ligation Buffer	红色	1360 μ L/支 \times 3 支
	Ad Ligase	红色	600 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Enhancer	棕色	320 μ L/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 2 支
MGIEasy 双端独立标签 PF 接 头试剂盒 A 货号: 940-000023-00	UDB Adapters A	无色	5 μ L/孔 \times 96 孔
MGIEasy DNA 纯化 磁珠 \times 2 盒 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1 支

1.5 试剂盒储存条件

MGIEasy 呼吸道微生物基因组扩增试剂盒

- ◆ 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 Fast PCR-FREE酶切文库制备模块

- ◆ 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
- ◆ TE Buffer 需 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存

⚠ 注意: 20x Elute Enhancer 和 Ligation Enhancer 需室温避光保存。在首次使用时拿出放室温长期保存, 避免反复冻融。

MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒

- ◆ 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 双端独立标签PF接头试剂盒A

- ◆ 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 DNA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

*干冰运输, 收到产品时请注意检查干冰是否还有剩余。

*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有效性能。

1.6 客户自备物料清单

表 1-4 客户自备物料清单

<p>仪器</p>	<p>漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 96 孔板磁力架 (ALPAQUA, Part#A00400) 或 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</p>
<p>试剂和耗材</p>	<p>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) 或同等功能定量试剂 安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-4626) 安捷伦 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 移液器吸头 1.5 mL 离心管 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 0.5 mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C)</p>

1.7 注意事项

- ◆ 本产品仅用于科研用途，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。
- ◆ 试剂套装各组分使用前提前取出，将 Enzyme 上下颠倒轻弹底部充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻后涡旋振荡充分混匀，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。

⚠ 注意： 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，我们推荐将操作区物理隔离为两个区：前区进行 RT-PCR 反应体系配制和加样，后区进行 RT-PCR 扩增反

应, 多重产物纯化、定量与均一化, Fast PCR-free 文库构建、定量、均一化, DNB 试剂配制和 DNB 制备等操作。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。

- ◆ 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应。
- ◆ 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。
- ◆ 若您有其他疑问, 请联系MGI技术支持: 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，包括培养毒株、咽拭子样本等。

2.1.2 RNA 要求

推荐使用完整度较好的RNA样本，且样本Ct值 ≤ 32 。

2.1.3 起始量

RNA投入体积应 $\leq 18.5 \mu\text{L}$ ，推荐投入 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2 样本的保存和运输

待测样本必须冷冻保存， -20°C 以下保存不超过1周， -70°C 以下保存不超过6个月。提取的RNA样本于 -70°C 保存，且时间不超过1周。

样本冷冻运输，避免运输过程中反复冻融，需确保RNA的完整性。

第三章 文库构建标准流程

样本RNA采用一步RT-PCR法进行扩增捕获，再通过打断/末端修复，接头连接和磁珠纯化完成文库构建。

3.1 RT-PCR 扩增

3.1.1 RT-PCR 反应体系配制

⚠ 注意：此步骤反应液配制在前区 RNA 实验室或无 RNase 环境下进行操作。样本 RNA 及加样后的反应体系切忌涡旋混匀，建议用吸头混匀或指弹混匀。

- 1) 取 MGIeasy 呼吸道微生物基因组扩增试剂盒待用。将 FluA/B Primer Pool, Flu Control Primer, RT-PCR buffer 从 -20°C 取出，解冻后振荡混匀并瞬时离心。RT-PCR Enzyme Mix 颠倒轻弹底部混匀并瞬时离心，置于冰上待用。
- 2) 根据反应数按表 3-1 中配方在冰上配制 RT-PCR 反应液。涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底，后置于冰上待用。

表 3-1 RT-PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
FluA/B Primer Pool	2 μ L
Flu Control Primer	2 μ L
RT-PCR buffer	25 μ L
RT-PCR Enzyme Mix	2.5 μ L
NF water	8.5 μ L
Total	40 μ L

- 3) 取新的 0.2 mL PCR 管，用移液器吸取 40 μ L 配制好的 RT-PCR 反应液，再吸取 10 μ L 待测 RNA 样本，用移液器吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.2 RT-PCR 反应

⚠ 注意：此反应步骤及后续操作步骤均在后区进行。

- 1) 将 RT-PCR 反应管置于 PCR 仪上，按照表 3-2 中的条件进行反应，总反应体积 50 μ L。

表 3-2 RT-PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
45°C	30 min	1 个循环
55°C	15 min	
95°C	3 min	
95°C	30 s	5 个循环
55°C	30 s	
68°C	3 min	
95°C	30 s	38 个循环*
64°C	30 s	
68°C	3 min	
68°C	5 min	1 个循环
12°C	Hold	

*可根据实际情况降低扩增循环数，若样本 RNA 的 Ct 值 \leq 20，推荐 36 个循环。

2) 反应结束后，取出反应管并瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.3 RT-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。

- 1) 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 2) 用移液器吸取 35 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.1.2 2) 中的 RT-PCR 产物中，将移液器量程调至 70 μ L 并轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入管中，无挂壁。
- 3) 室温孵育 5 min。
- 4) 将 PCR 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。
- 5) 保持 PCR 管置于磁力架上，加入 160 μ 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。
- 6) 重复步骤 5)，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心，待磁珠与液体在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 7) 保持 PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 32 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮混匀。
- 9) 室温下孵育 5 min。

10) 将 PCR 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 30 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

✓ **停止点：RT-PCR 产物纯化后可置-20°C 冰箱储存。**

3.1.4 RT-PCR 产物质检

- 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。要求最终 PCR 产物浓度 ≥ 5 ng/ μL 。
- 2) 推荐通过琼脂糖凝胶电泳、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。文库的 RT-PCR 纯化产物片段分布范围应在 800~2400 bp (此步骤可选做)。

3.2 PCR-free 文库制备

取 200 ng RT-PCR 产物进行打断/末端修复，接头连接和纯化等步骤，若 RT-PCR 产物总量为 150~200 ng 时，全部投入进行建库操作。

3.2.1 试剂准备

- 1) 取 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装待用，按照表 3-3 配方准备 1x Elute Enhancer，10°C~30°C 存储条件下，7 天内可用。20x Elute Enhancer 首次使用后，置于 10°C~30°C 储存。

表 3-3 1x Elute Enhancer 的配制

组分	单个反应体积
20x Elute Enhancer	1 μL
Nuclease-Free Water	19 μL
Total	20 μL

- 2) 按照表 3-4 配方准备 En-TE，4°C 存储条件下，7 天内可用。


表 3-4 En-TE 的配制

组分	单个反应体积
1x Elute Enhancer	2.4 μL
TE Buffer	1197.6 μL
Total	1200 μL

3) 按照表 3-5 配方准备 En-Beads, 4°C 存储条件下, 7 天内可用。

表 3-5 En-Beads 的配制

组分	单个反应体积
1x Elute Enhancer	15 μL
DNA Clean Beads	1485 μL
Total	1500 μL

 **注意:** 表 3-3 至表 3-5 试剂满足大约 10 个样本建库需求, 若有更多样本, 可按试剂需求等比例放大配制。

3.2.2 DNA 酶切打断

1) 提前取出 Fast FS Buffer 溶解并涡旋混匀, Fast FS Enzyme 上下颠倒, 并轻弹底部混匀 10 次以上, 轻弹时保证管底无试剂残留 (**禁止涡旋振荡**), 瞬时离心后置于冰上备用。

 **注意:** 混匀不充分会影响打断效果, 请严格按照说明操作。

2) 提前设置 PCR 程序并运行。按照表 3-6 反应条件, 提前在 PCR 仪上设置反应 PCR 程序并运行: **第 1 步 (4°C, Hold)**, 反应体积 60 μL 。

表 3-6 酶切打断反应条件

温度	时间
热盖 (70°C)	on
4°C	Hold
4°C	1 min
30°C	12 min
65°C	20 min
4°C	Hold

3) 在冰上配置酶切打断反应液 (表 3-7)。涡旋振荡 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底, 后置于冰上待用。

表 3-7 酶切打断反应液的配制

组分	单个反应体积
Fast FS Buffer	10 μ L
Fast FS Enzyme	5 μ L
Total	15 μ L


- 4) 取新的 0.2 mL PCR 管，用移液器吸取 15 μ L 配制好的打断末端修复反应液加入管中，再根据步骤 3.1.4 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 测定的 RT-PCR 产物浓度计算投入 200 ng 所需加入的样本体积 X μ L，用移液器吸取 X μ L 产物至管中，并补充 TE buffer 至总体积为 60 μ L，将 PCR 管涡旋振荡 3 次，每次 3 s，离心后置于冰上备用。
- 5) 确保步骤 2) 设置的 PCR 程序第一步的温度已降至 4 $^{\circ}$ C，将样本置于 PCR 仪中，**跳过第一步 (4 $^{\circ}$ C Hold)**，开始反应。
- 6) 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底，置于冰上备用。

3.2.3 DNA 打断产物磁珠纯化

 **注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

- 1) 提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 2) 用移液器吸取 60 μ L En-Beads 至步骤 3.2.2 6) 中的酶切产物中，将移液器量程调至 100 μ L 并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，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) 室温孵育 5 min。
- 4) 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架，静置至液体澄清后继续放置 2-5 min，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 5) 保持 PCR 管置于磁力架上，加入 160 μ 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。
- 6) 若有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心，在磁力架上待磁珠与液体分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 7) 保持 PCR 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。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μ L En-TE，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。

3.2.4 接头连接

 **注意：操作前请仔细阅读附录 B 和附录 C。反应体系中需先加 UDB Adapters，再加接头连接反应液。**

- 1) 提前取出 UDB Adapters、Fast Ligation Buffer 溶解并涡旋混匀，Ad Ligase 上下颠倒 5-10 次至充分混匀后，均瞬时离心后置于冰上备用。

- 2) 参照 UDB Adapters 使用规则 (参见附录 B), 首先在步骤 3.2.3 8) 的 PCR 管中加入 5 μL 对应的 UDB Adapters。
- 3) 在冰上配制接头连接反应液 (见表 3-8)。涡旋振荡 6 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底, 置于冰上。Ligation Enhancer 首次使用后, 置于 10°C~30°C 储存。

表 3-8 接头连接反应液的配制

组分	体积
Fast Ligation Buffer	23 μL
Ad Ligase	5 μL
Ligation Enhancer	2 μL
Total	30 μL

- 4) 用移液器缓慢吸取 30 μL 配制好的接头连接反应液加入步骤 3.2.4 2) 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。

⚠ 注意: 本反应液较粘稠, 请充分混匀。

- 5) 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 3-9 中的条件进行反应, 总反应体积 80 μL 。

表 3-9 接头连接反应条件

温度	时间
热盖 (30°C)	On
25°C	10 min
4°C	Hold

- 6) 反应结束后, 瞬时离心将反应液收集至管底。

⚠ 注意: 不建议在此处停止, 请继续做步骤 3.2.5。


3.2.5 连接产物纯化

- 1) 参考附录 A 步骤, 提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温, 使用前充分振荡混匀。
- 2) 用移液器分别吸取 20 μL En-TE 和 20 μL En-Beads 至步骤 3.2.4 6) 中的接头连接产物中, 将移液器量程调至 100 μL 并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀, 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) 室温孵育 5 min。
- 4) 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架, 静置 2~5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 5) 保持 PCR 管置于磁力架上, 加入 160 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s, 小心吸取并丢弃上清。

- 6) 重复步骤 5), 尽量吸干管内液体, 有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心, 在磁力架上待磁珠与液体分离后, 用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 7) 保持 PCR 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。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 20 μL En-TE 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 9) 再用移液器吸取 20 μL En-Beads 至步骤 8) 中 PCR 管中, 并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀, 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。
- 10) 室温孵育 5 min。
- 11) 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架, 静置 2~5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 12) 保持 PCR 管置于磁力架上, 加入 160 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s, 小心吸取并丢弃上清。
- 13) 重复步骤 12), 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。
- 14) 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 15) 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 27 μL En-TE 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 16) 室温下孵育 5 min。
- 17) 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架上, 静置 2~5 min 至液体澄清, 将 25 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

3.2.6 定量和 Pooling

- 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连接纯化产物进行定量和记录。要求最终产物浓度 ≥ 0.8 ng/ μL 。
- 2) 依据附录 B3 的 barcode 混合规则, 文库按所需测序数据量比例取相应体积进行混合 pooling, 推荐混合总质量 150 ng, 如果产物产量不足, 投入 100~150 ng, 总体积 ≤ 48 μL , 满足至少 1 次环化消化量。

 **例如 N 个文库进行混合, 若每个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) = 150 ng/N, 单个文库取样体积(μL) = 单个文库取样量(ng) / 单个文库的浓度 (ng/ μL)。**

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

3.3 酶切消化产物制备

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3.3.1到3.3.5, 制备成适用于MGISEQ系列和DNBSEQ系列测序仪的单链环形文库。

3.3.1 变性

- 1) 取 3.2.6 2) 混合 pooling 的文库至新的 0.2 mL PCR 管中, 用 TE Buffer 补充至总体积 48 μ L。
- 2) 将步骤 1) 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 3-10 的条件进行反应。

表 3-10 变性反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
95°C	3 min

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

3.3.2 单链环化

- 1) 根据反应数, 按照表 3-11 的配方在冰上配制单链环化反应液。

表 3-11 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.5 μ L
DNA Rapid Ligase	0.5 μ L
Total	12.0 μ L

- 2) 用移液器吸取 12 μ L 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.3.1 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) 将步骤 3.3.2 2) 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 3-12 的条件进行反应。

表 3-12 单链环化反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	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, 立即进入下步反应。

3.3.3 酶切消化

- 1) 在步骤 3.3.2 3) 反应时, 提前按照表 3-13 的配方在冰上配制酶切消化反应液。

表 3-13 酶切消化反应液的配制

组分	单个反应体积
Digestion Buffer	1.4 μL
Digestion Enzyme	2.6 μL
Total	4.0 μL

- 2) 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.3.2 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) 将步骤 3.3.3 2) 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 3-14 的条件进行反应。

表 3-14 酶切消化反应条件

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

- 4) 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 5) 立即向 PCR 管中加入 7.5 μL 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。

3.3.4 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。**

- 1) 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 2) 吸取 170 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.3.3 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) 室温孵育 10 min。
- 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。
- 5) 保持离心管置于磁力架上，加入 500 μL 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。
- 6) 重复步骤 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。
- 7) 保持离心管置于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 8) 将离心管从磁力架上取下，加入 32 μL 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。
- 9) 室温下孵育 10 min。

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 30 μ 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°C 冰箱储存。**

3.3.5 酶切消化产物质检

使用Qubit® 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) ≥ 10 ng。

第四章 测序

4.1 DNB 制备

以上制备的酶切消化的产物用测序试剂盒套装里的试剂进行DNB制备，每次DNB制备所需连接产物为10 ng。

4.2 测序

DNB进行双barcode测序，推荐搭配MGISEQ-2000RS或MGISEQ-200RS高通量试剂盒的“PE”测序套装和试剂盒进行上机测序。

选择测序类型PE100+10+10，搭配以下测序套装和试剂盒：

- ◆ CPAS 条形码引物 3 试剂盒（货号：1000020834）（适用于 PE 测序）
- ◆ 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）；

 **注意：“PE”测序需搭配 CPAS 条形码引物 3 试剂盒**

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

- ◆ 本试剂套装推荐使用套装内MGI Easy DNA纯化磁珠试剂盒（MGI, Cat. No. 1000005278或1000005279）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

- ◆ PCR free建库过程推荐使用96孔板磁力架或其他0.2 mL PCR管磁力架进行磁珠纯化。若使用1.5 mL离心管磁力架需在纯化前将全部反应样本从0.2 mL PCR管转移至1.5 mL离心管中，且此步骤会造成纯化损失，尤其在酶切消化产物纯化过程中，此操作会造成大约20%左右的纯化损失。
- ◆ 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发减少，应加入相应的TE Buffer或En-TE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 μ 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TE Buffer或En-TE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 μL 。

- ◆ 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 关于 Adapter 使用

- ◆ 试剂套装根据反应数不同搭配2种不同规格的双barcode Adapter试剂盒：MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒（16RXN）或MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒A（96RXN）。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。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录B 1~3的使用规则。同时，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。
- ◆ 请勿将 UDB Adapter 置于30°C以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。
- ◆ UDB Adapter 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底，用吸水纸擦拭干净管盖表面，使用完毕后及时盖上管盖。
- ◆ 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。

附录 B-1 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒（16RXN）介绍

- ◆ 管式：共16管UDB Adapters，8个为一组碱基平衡的barcode组合，第一组为UDB Adapter-393 ~ UDB Adapter-400，第二组为UDB Adapter-401 ~ UDB Adapter-408



图 B-1 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒（16RXN）孔位
(第 1 组 barcode: 蓝框, 第 2 组 barcode: 红框)

附录 B-2 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A（96RXN）介绍

- ◆ 板式：包含96个UDB Adapters

- ◆ UDB Adapters A: 每列8个为一组碱基平衡的barcode组合，共12列。

表 B-1 UDB Adapters A 孔位:

UDB Adapters A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB-385	UDB-393	UDB-401	UDB-409	UDB-417	UDB-425	UDB-433	UDB-441	UDB-449	UDB-457	UDB-465	UDB-473
B	UDB-386	UDB-394	UDB-402	UDB-410	UDB-418	UDB-426	UDB-434	UDB-442	UDB-450	UDB-458	UDB-466	UDB-474
C	UDB-387	UDB-395	UDB-403	UDB-411	UDB-419	UDB-427	UDB-435	UDB-443	UDB-451	UDB-459	UDB-467	UDB-475
D	UDB-388	UDB-396	UDB-404	UDB-412	UDB-420	UDB-428	UDB-436	UDB-444	UDB-452	UDB-460	UDB-468	UDB-476
E	UDB-389	UDB-397	UDB-405	UDB-413	UDB-421	UDB-429	UDB-437	UDB-445	UDB-453	UDB-461	UDB-469	UDB-477
F	UDB-390	UDB-398	UDB-406	UDB-414	UDB-422	UDB-430	UDB-438	UDB-446	UDB-454	UDB-462	UDB-470	UDB-478
G	UDB-391	UDB-399	UDB-407	UDB-415	UDB-423	UDB-431	UDB-439	UDB-447	UDB-455	UDB-463	UDB-471	UDB-479
H	UDB-392	UDB-400	UDB-408	UDB-416	UDB-424	UDB-432	UDB-440	UDB-448	UDB-456	UDB-464	UDB-472	UDB-480

附录 B-3 UDB Adapters 混合指南

- ◆ DNBSEQ测序平台，MGISEQ测序平台推荐每次保证测序碱基平衡，双端独立标签PF接头试剂盒和双端独立标签PF接头试剂盒A的板位中是8个为一组预设平衡碱基barcode组合。当样本数据量要求相同时，推荐按照表B-2 双barcode 混合规则进行混合。

表 B-2 双 barcode 混合规则

混合数	使用方法
8X	使用 X 列 barcode
8X+1	使用 X 列 barcode+其他列任意 1 个 barcode
8X+2	使用 X 列 barcode+其他列任意 2 个 barcode
8X+3	使用 X 列 barcode+其他列任意 3 个 barcode
8X+4	使用 X 列 barcode+其他列任意 4 个 barcode
8X+5	使用 X 列 barcode+其他列任意 5 个 barcode
8X+6	使用 X 列 barcode+其他列任意 6 个 barcode
8X+7	使用 X 列 barcode+其他列任意 7 个 barcode

- ◆ 如遭遇特殊情况 (如1个孔位的试剂不足), 以至于无法满足常规混合至少有1组barcode组合的要求, 或当样本数据量要求不相同, 则需要通过对每测序cycle下各碱基含量进行计算来确定混合方案。需遵循在一条lane中每个测序位置均保证单个碱基含量不低于12.5%, 不高于62.5%, 如表B-3, 成组的8个barcode各碱基含量符合要求; 如表B-4, 不成组的9个barcode某个碱基含量不合格, 将导致拆分率下降。

表 B-3 成组的 8 个 barcode 各碱基占比

Sample 1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	A
Sample 2	C	T	G	A	A	C	C	G	A	A
Sample 3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample 4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample 5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample 6	C	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample 7	T	T	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample 8	G	G	A	T	G	C	T	A	C	C
各碱基含量(%)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0

表 B-4 不成组的 9 个 barcode 各碱基含量 (不含有成组的 barcode 组合, 不可用)

Sample 1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	T
Sample 2	A	C	G	A	A	G	G	T	C	C
Sample 3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample 4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample 5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample 6	G	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample 7	T	G	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample 8	G	G	A	T	G	A	T	A	C	C
Sample 9	G	A	C	G	G	T	C	G	A	G
A 碱基含量(%)	33.3	33.3	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	22.2	22.2	0
T 碱基含量(%)	22.2	0	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	33.3	22.2	33.3
C 碱基含量(%)	0	33.3	33.3	22.2	22.2	0	22.2	22.2	33.3	33.3
G 碱基含量(%)	44.4	33.3	22.2	33.3	33.3	33.3	33.3	22.2	22.2	33.3

附录 C 关于接头连接反应

- ◆ 接头连接反应液中含有较高浓度的PEG，溶液较粘稠，移液器操作时请慢吸慢放，确保加液量正确。
- ◆ 由于PEG的存在，接头连接产物纯化磁珠乘数可以适当减少，推荐使用20 μ L磁珠进行纯化。若增加磁珠使用量，可能会回收部分接头二聚物。

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