

ATOplex

宏条形码文库制备说明书

引物池: 16S V3V4/18SV4/ITS1/COI/Ac12S/MiFish

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	2023 年 10 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 试剂盒储存条件及有效期.....	4
1.6 客户自备物料清单.....	5
1.7 注意事项.....	5
第二章 样本要求及处理	7
2.1 样本要求.....	7
2.2 样本的保存和运输.....	7
第三章 文库构建标准流程	8
3.1 第一轮 PCR 反应.....	8
3.2 第一轮 PCR 产物纯化.....	9
3.3 第二轮 PCR 反应.....	10
3.4 第二轮 PCR 产物纯化.....	11
3.5 PCR 产物定量和 Pooling.....	12
第四章 测序	14
4.1 16S V3V4, 18SV4, ITS1, COI, Ac12S Primer Pool 的 DNB 制备.....	14
4.2 16S V3V4, 18SV4, ITS1, COI, Ac12S Primer Pool 文库测序.....	14
4.3 MiFish Primer Pool 的 DNB 制备与文库测序.....	14
附录	16
附录 A 关于磁珠及纯化.....	16
附录 B ATOPlex 双标签引物模块使用规则.....	17

第一章 产品信息

1.1 产品描述

本操作说明书旨在为使用华大智造 (MGI) 定制产品平台的客户提供有关宏条形码测序的多重PCR扩增操作的通用指导。宏条形码测序技术可用于物种分类、丰度分析、群落比较等研究。用于生物多样性评估的常见条形码包括原核16S核糖体DNA (用于细菌和古菌)、真核18S核糖体DNA (用于各种真核生物, 如植物、原生生物和真菌)、真核ITS核糖体DNA (用于真菌)、线粒体COI基因 (用于各种真核生物, 如动物和原生生物) 和线粒体12S DNA (用于鱼类)。本操作说明书仅适用于使用本文所述建库产品: ATOplex 16S V3V4 rDNA 引物池、ATOplex 18SV4 rDNA引物池、ATOplex ITS1 rDNA 引物池、ATOplex COI mtDNA 引物池、ATOplex Ac12S mtDNA 引物池、ATOplex MiFish 引物池、以及ATOplex DNA双标签建库试剂盒套装。

ATOplex建库方案采用两步PCR法, 首先通过单个反应管中捕获和富集DNA条形码区域, 然后生成兼容于华大智造测序平台矩阵式纳米芯片的文库。此外, 本试剂盒采用PCR产物污染清除技术, 能够有效降低气溶胶污染的风险。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, 以最大程度地保证文库制备的稳定性和可重复性。

1.2 适用范围

本试剂盒适用于从环境样本 (如: 土壤、水体、底泥、空气) 中提取的基因组DNA。

1.3 适配测序平台

构建的文库可根据需求选择以下平台及测序类型进行测序及分析:

DNBSEQ-G99ARS

DNBSEQ-E25RS

MGISEQ-2000RS

1.4 试剂盒组分

试剂盒包含引物池和ATOplex DNA 双标签建库试剂盒套装, 有96RXN和576RXN两种规格, 试剂盒组分信息如下:

表 1-1 ATOplex 宏条形码文库制备引物池 (96 人份)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
ATOplex 16S V3V4 rDNA 引物池 货号: 940-001260-00	16S rDNA PCR Primer Pool	蓝色	192 μ L/支 \times 1 支
	16S rDNA PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
ATOplex 18SV4 rDNA 引物池 货号: 940-001533-00	18SV4 rDNA PCR Primer Pool	蓝色	192 μ L/支 \times 1 支
	18SV4 rDNA PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
ATOplex ITS1 rDNA 引物池 货号: 940-001536-00	ITS1 rDNA PCR Primer Pool	蓝色	192 μ L/支 \times 1 支
	ITS1 rDNA PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
ATOplex COI mtDNA 引物池 货号: 940-001534-00	COI mtDNA PCR Primer Pool	蓝色	192 μ L/支 \times 1 支
	COI mtDNA PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
ATOplex Ac12S mtDNA 引物池 货号: 940-001535-00	Ac12S mtDNA PCR Primer Pool	蓝色	192 μ L/支 \times 1 支
	Ac12S mtDNA PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
ATOplex MiFish 引物池 货号: 940-001539-00	MiFish PCR Primer Pool	蓝色	192 μ L/支 \times 1 支
	MiFish PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支

表 1-2 ATOplex DNA 双标签建库试剂盒套装 (96 人份) (货号: 940-001191-00)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品 货号: 940-000950-00	Spike-in Control PCR Primer Pool	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
	Spike-in Control PCR Block	蓝色	96 μ L/支 \times 1 支
ATOplex DNA 多重 PCR 扩增模块 货号: 940-000124-00	PCR Additive	黄色	96 μ L/支 \times 1 支
	PCR Clean Enzyme	白色	96 μ L/支 \times 1 支
	PCR Enzyme Mix	白色	1200 μ L/支 \times 2 支
MGIeasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1 支
ATOplex 双标签引物模块 (01-96) V1.0 货号: 1000021626	PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)	/	8 μ L/孔 \times 96 孔

表 1-3 ATOplex 宏条形码文库制备引物池 (576 人份)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
ATOplex 16S V3V4 rDNA 引物池 货号: 940-000724-00	16S rDNA PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 2 支
	16S rDNA PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
ATOplex 18SV4 rDNA 引物池 货号: 940-001541-00	18SV4 rDNA PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 2 支
	18SV4 rDNA PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
ATOplex ITS1 rDNA 引物池 货号: 940-001532-00	ITS1 rDNA PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 2 支
	ITS1 rDNA PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
ATOplex COI mtDNA 引物池 货号: 940-001537-00	COI mtDNA PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 2 支
	COI mtDNA PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
ATOplex Ac12S mtDNA 引物池 货号: 940-001540-00	Ac12S mtDNA PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 2 支
	Ac12S mtDNA PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
ATOplex MiFish 引物池 货号: 940-001538-00	MiFish PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 2 支
	MiFish PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支

表 1-4 ATOplex DNA 双标签建库试剂盒套装 (576 人份) (货号: 940-001190-00)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品 货号: 940-000947-00	Spike-in Control PCR Primer Pool	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
	Spike-in Control PCR Block	蓝色	576 μ L/支 \times 1 支
ATOplex DNA 多重 PCR 扩增模块 货号: 940-000160-00	PCR Additive	黄色	576 μ L/支 \times 1 支
	PCR Clean Enzyme	白色	576 μ L/支 \times 1 支
	PCR Enzyme Mix	白色	7.2 mL/支 \times 2 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005279	DNA Clean Beads	白色	50 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	25 mL/支 \times 1 支
ATOplex 双标签引物模块 (48 \times 96) 货号: 1000024935	Barcode 1(01-96)	/	12 μ L/孔 \times 96 孔
	Barcode 2(01-48)	/	24 μ L/孔 \times 48 孔

1.5 试剂盒储存条件及有效期

表 1-5 试剂盒存储、运输条件

试剂盒	存储温度	运输温度
ATOPlex 16S V3V4 rDNA 引物池	-25°C~-15°C	-25°C~-15°C
ATOPlex 18SV4 rDNA 引物池		
ATOPlex ITS1 rDNA 引物池		
ATOPlex COI mtDNA 引物池		
ATOPlex Ac12S mtDNA 引物池		
ATOPlex MiFish 引物池		
ATOPlex 多重 PCR Spike-in 质控品		
ATOPlex DNA 多重 PCR 扩增模块		
ATOPlex 双标签引物模块 (01-96) V1.0		
ATOPlex 双标签引物模块 (48x96)		
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	2°C~8°C	2°C~8°C

*有效期：见试剂盒标签。

*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 1-6 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 Bioanalyzer (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) 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	带滤芯移液器吸头 灭菌移液器吸头 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。
- ◆ 试剂套装各组分使用前提前取出，将 PCR Clean Enzyme 和 PCR Enzyme Mix 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 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而导致假阳性产生。因此，我们推荐将第一轮 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。上机前产物定量、pooling、单链环化、酶切消化和制备 DNB 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。

- ◆ 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

基因组 DNA 类型

本试剂盒适用于从环境样本（如：土壤、水体、底泥、空气）中提取的基因组DNA。

基因组 DNA 起始量

建库DNA起始量决定目标群体各物种检出丰富度。如表2-1，通常，对于16S V3V4、18SV4、ITS1和COI引物池建库，建议每个反应投入1-50 ng，对于Ac12S和MiFish引物池建库，建议每个反应投入50-100 ng。

表 2-1 建库 DNA 起始量

测序引物池	起始量范围	推荐起始量
16S V3V4、18SV4、ITS1、COI	1-50 ng	1-50 ng
Ac12S、MiFish	10-100 ng	50-100 ng

2.2 样本的保存和运输

将DNA样品储存于-20°C，可保存长达1年，在保存过程中应避免反复冻融。如果需要运输样品，请在冷冻条件下运输。

第三章 文库构建标准流程

样品 DNA 通过两轮 PCR 扩增和纯化完成文库构建，如图 3-1，再进行 DNB 制备及测序。

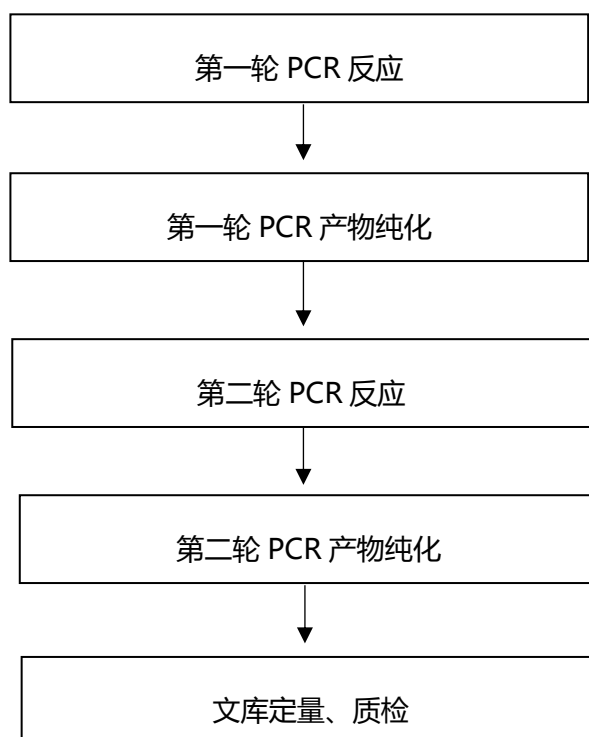


图 3-1 两轮 PCR 建库流程图

3.1 第一轮 PCR 反应

3.1.1 取出 ATOplex DNA 多重 PCR 扩增模块、ATOplex 宏条形码文库制备引物池和 ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品（可选择使用）待用。将 PCR Enzyme Mix 置于冰上溶解，（16S V3V4/18SV4/ ITS1/COI/Ac12S/MiFish）PCR Primer Pool 和 Spike-in Control PCR Primer Pool 置于室温溶解，均充分振荡混匀后离心，置于冰上待用。

3.1.2 根据所需反应数，取新的 0.2 mL PCR 管，按照表 3-1 在冰上配制第一轮 PCR 反应液。

表 3-1 第一轮 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
DNA	V
PCR Enzyme Mix	12.5 μ L
(16S V3V4/18SV4/ITS1/COI/Ac12S/MiFish)	
PCR Primer Pool	2 μ L
PCR Clean Enzyme	0.5 μ L
TE Buffer	10 μ L-V
Total	25 μ L

⚠ 注意：建库 DNA 起始量决定目标群体各物种检出丰富度，DNA 样本要求和建议投入量请参照第二章 2.1 的样本要求。

⚠ 注意：PCR Primer Pool 使用前务必充分混匀，涡旋振荡 5-6 次，每次 3-5 s。

⚠ 注意：ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品的 Spike-in control PCR Primer Pool 中包含恒定拷贝数的外参 DNA 和对应扩增引物，可作为阳性质控品质控扩增试剂，根据实际情况选择使用。
用法：①不使用；②在第一轮 PCR 反应液中加入 10 μL Spike-in control PCR Primer Pool 替代样本 DNA 进行 PCR 反应（如表 3-1）。

3.1.3 配制完成后，将混合液涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

⚠ 注意：确保 PCR 管中无气泡，否则会影响 PCR 反应的效率。

3.1.4 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 3-2 中条件进行反应。

表 3-2 第一轮 PCR 反应条件（体系：25 μL）

温度	时间	循环数
热盖 (104°C)	On	
37°C	5 min	1 个循环
95°C	10 min	
95°C	20 s	25-30 个循环
55°C (16S V3V4/18SV4/ITS1/COI) 或 65°C (Ac12S/MiFish)	30 s	
72°C	30 s	
12°C	Hold	

⚠ 注意：根据样品的不同，需要对 PCR 循环次数进行优化，以达到所需的 PCR 产物浓度。通常，建议在 16S V3V4、18SV4、ITS1 和 COI 引物建库第一轮 PCR 反应程序循环数设置为 25 个循环，Ac12S 和 MiFish 引物池建库第一轮 PCR 反应程序循环数设置为 30 个循环。

3.1.5 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底，产物在 PCR 管中进行下一步纯化。

3.2 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。

⚠ 提前配制新鲜的 80%乙醇（无水乙醇和 NF water 体积比为 8：2）。

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

3.2.2 用移液器吸取 25 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.1.5 的产物中，并充分震荡混匀。

3.2.3 室温孵育 5 min。

3.2.4 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。

3.2.5 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，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。

3.2.6 重复步骤 3.2.5，将 PCR 管瞬时离心，用小量程的移液器将管底液体吸干。

3.2.7 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。

3.2.8 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 6.5 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱，应保证加入的 TE Buffer 充分浸润磁珠，防止磁珠过分晾干导致 PCR 产物损失。

3.2.9 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。

3.2.10 瞬时离心将反应液收集至管底。

✓ 停止点：PCR 纯化后产物可置于 -20°C 冰箱储存。

3.3 第二轮 PCR 反应

⚠ 注意：请仔细阅读附录 B 关于 ATOplex 双标签引物模块 (01-96) (96 人份) 和 ATOplex 双标签引物模块 (48x96) (576 人份) 的使用规则。双标签引物含有两种 Barcode，根据不同测序策略构建文库，建议最终测序的文库保证每种 Barcode 含有至少一套成组 Barcode。

3.3.1 若使用 ATOplex 双标签引物模块 (01-96)，在步骤 3.2.10 的 PCR 管中分别加入 4 μL 的 PCR Dual Barcode Primer Mix；若使用 ATOplex 双标签引物模块 (48x96)，在步骤 3.2.10 的 PCR 管中分别加入 2 μL 的 Barcode 1 (01-96) 和 2 μL 的 Barcode 2 (01-48)。

3.3.2 根据所需反应数，按照表格 3-3 在冰上配置 PCR 反应液。

表 3-3 第二轮 PCR 反应液的配置

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	12.5 μL
PCR Clean Enzyme	0.5 μL
PCR Additive	0.5 μL
(16S V3V4/18SV4/ITS1/COI/Ac12S/MiFish)	1 μL
PCR Block 或 Spike-in control PCR Block	
Total	14.5 μL

3.3.3 将 3.3.1 的 PCR 反应混合液进行涡旋振荡混匀后，瞬时离心将反应液收集至管底。

⚠️ PCR Block 使用前务必充分混匀，涡旋振荡 5-6 次，每次 3-5 s。

⚠️ ATOplex 多重 PCR Spike-in 质控品的 Spike-in control PCR Block 根据第一轮 PCR 反应选择使用：①不使用；②作为质控品，在质控文库的第二轮 PCR 反应体系中加入 1 μL Spike-in control PCR Block 进行 PCR 反应。

3.3.4 用移液器吸取 14.5 配制的第二轮 PCR 反应液加入步骤 3.3.1 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：确保 PCR 管中无气泡，否则会影响 PCR 反应的效率。

3.3.5 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 3-4 条件进行 PCR 反应。

表 3-4 第二轮 PCR 反应条件 (体系: 25 μL)

温度	时间	循环数
热盖 (104°C)	On	
37°C	5 min	1 个循环
95°C	10 min	
95°C	20 s	10 个循环
55°C	30 s	
72°C	30 s	
12°C	Hold	

3.3.6 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。产物在 PCR 管中进行下一步纯化。

⚠️ 注意：PCR 反应结束后应尽快进行下一步纯化操作，不宜将 PCR 产物置于 12°C 超过 30 分钟。

3.4 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。

⚠️ 注意：提前配制新鲜的 80%乙醇 (无水乙醇和 NF water 体积比为 8: 2)。

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

3.4.2 用移液器吸取 25 μL DNA Clean Beads 加入至步骤 3.3.6 的产物中，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 PCR 管中。

3.4.3 室温孵育 5 min。

3.4.4 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。

- 3.4.5 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，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.4.6 重复步骤 3.4.5，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，待上清和磁珠在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.4.7 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。
- 3.4.8 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 25 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.4.9 室温下孵育 5 min。
- 3.4.10 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 23 μL 上清液转移到新的离心管中。

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

3.5 PCR 产物定量和 Pooling

- 3.5.1 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 ≥ 5 ng/ μL 。
- 3.5.2 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，不同引物池 PCR 纯化产物主峰片段大小见表 3-5。

表 3-5 宏条形码 PCR 纯化产物主峰片段大小

引物池	PCR 纯化产物片段大小范围
16S V3V4	550-650 bp
18SV4	400-600 bp
ITS1	300-600 bp
COI	400-600 bp
Ac12S	400-600 bp
MiFish	300-400 bp

- 3.5.3 定量质检合格后，根据使用的引物池和测序策略选择对应的文库混合及环化方案。


表 3-6 基于 DNBSEQ 平台推荐的测序策略

引物池	测序仪	推荐读长
16S V3V4, 18SV4, ITS1, COI, Ac12S	DNBSEQ-G99	PE300
MiFish	DNBSEQ-G99	PE150
MiFish	DNBSEQ-E25	PE150

3.5.4 对于宏条形码文库制备引物池为 16S V3V4、18SV4、COI、ITS1、Ac12S 的文库，单个引物池文库按所需测序数据量比例取相应质量体积进行混合 pooling，推荐混合后总质量 500 ng，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$ 。混合文库使用 *MGI Easy 双 barcode 环化试剂盒* (货号: 1000020570) 进行环化、消化操作，制备成 ssDNA，要求酶切消化产物产量 (ssDNA) $\geq 10 \text{ ng}$ 。具体操作步骤参照《*MGI Easy 双 barcode 环化试剂盒说明书*》。

 **注意：如建库使用了多个引物池，建议分别进行混合 pooling 及环化。**

3.5.5 对于宏条形码文库制备引物池为 MiFish 的文库，文库按所需测序数据量比例取相应质量体积进行混合 pooling，推荐混合后 PCR 产物总质量 25 ng，总体积 $\leq 20 \mu\text{L}$ 。推荐使用一步法 DNB 制备方法制备成 DNB 用于测序。具体试剂与操作步骤请参照 4.3。

 **注意：例如 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) = $M \text{ ng} / N$ (M 为单个反应所需混合文库的总量，根据上述方案选择 500 ng 或 25 ng)，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)。需保证单个文库取样体积 $\geq 1 \mu\text{L}$ ，若体积不足 $1 \mu\text{L}$ ，可按 500 ng 或 25 ng 的 X ($X > 1$) 倍的量取样混合，充分振荡混匀后从中取一份 500 ng 的体积后进行环化、消化操作，或取一份 25 ng 的体积后进行一步法 DNB 制备步骤。**

第四章 测序

4.1 16S V3V4, 18SV4, ITS1, COI, Ac12S Primer Pool 的 DNB 制备

对于实验步骤3.5.4制备的ssDNA文库需搭配*ATOPlex E450*双标签平衡文库试剂 (货号: 940-000637-00) 进行测序平衡。样本文库与平衡文库均使用*DNBSEQ-G99RS*高通量快速测序试剂套装 (*G99 SM FCL PE300*) (货号: 940-000415-00) 里的DNB制备试剂按照如下策略进行DNB制备, 具体操作步骤参考《DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装说明书》:

1) 样本文库 DNB 制备:

- 如建库使用了单个引物池, 取 6 ng 步骤 3.5.4 的 ssDNA 进行 DNB 制备, 用 TE Buffer 补充至总体积 10 μ L。
- 如建库使用了多个引物池, 建议根据数据量需求比例将 ssDNA 混合 pooling 后进行 DNB 制备。例如 N 个引物池的 ssDNA 等质量混合, 单个引物池文库 ssDNA 取样量=6 ng /N, 单个引物池文库 ssDNA 取样体积(μ L)=单个引物池文库 ssDNA 取样量(ng)/单个引物池 ssDNA 的浓度(ng/ μ L), 用 TE Buffer 补充至总体积 10 μ L。


2) 平衡文库 DNB 制备: 取 5 ng 平衡文库进行 DNB 制备, 用 TE Buffer 补充至总体积 10 μ L。

3) 样本文库 DNB 与平衡文库 DNB 混合: 将样本文库 DNB 与平衡文库 DNB 按质量比 4:1 混合后上机测序, 即样本文库 DNB (ng) :平衡文库 DNB (ng) = 4:1。

4.2 16S V3V4, 18SV4, ITS1, COI, Ac12S Primer Pool 文库测序

DNB 文库进行双 barcode 测序, 推荐搭配以下 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂盒, 选择 PE300+10+10的测序类型进行上机:

DNBSEQ-G99RS高通量快速测序试剂套装 (*G99 SM FCL PE300*) (货号: 940-000415-00)

 **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。**

 **也可使用其他具有 PE300 测序策略的 MGI 测序仪, 如 MGISEQ-2000 测序仪, 具体操作请参考对应的说明书进行。**

4.3 MiFish Primer Pool 的 DNB 制备与文库测序

以下步骤仅描述了MiFish引物文库基于DNBSEQ-G99和DNBSEQ-E25测序平台的DNB制备及测序的操作流程, 也可使用其他具有PE150测序策略的MGI测序仪进行测序, 如MGISEQ-2000测序仪, 具体DNB制备及测序的操作流程请参考对应的说明书。

DNBSEQ-G99 高通量测序平台

对于实验步骤3.5.5的样本文库, 需搭配*ATOPlex E450*双标签平衡文库试剂 (货号: 940-000637-00)

进行测序平衡。按照如下策略进行DNB制备：

⚠ 样本文库为 PCR 纯化产物，平衡文库为 ssDNA，使用的 DNB 制备方法不同。

- 1) **样本文库 DNB 制备：**取步骤 3.5.5 13 ng 混合文库，用 TE Buffer 补充至总体积 10 μ L。使用 *DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒[OS-DB]V1.0* (货号：1000026466) 进行 DNB 的制备，操作步骤参考《DNBSEQ DNB 制备试剂盒使用说明书》，说明书“制备 DNB 体系 1”中的 DNB 制备缓冲液 (OS) 与“制备 DNB 体系 2”中的 DNB 聚合酶混合液 I (OS)、DNB 聚合酶混合液 II (OS) 及 DNB 终止缓冲液试剂加入体积减少一半，但“DNB 反应条件 1”和“DNB 反应条件 2”不变。
- 2) **平衡文库 DNB 制备：**取 5 ng 平衡文库，用 TE Buffer 补充至总体积 10 μ L，使用 *DNBSEQ-G99RS 高通量快速测序试剂套装 (G99 SM FCL PE150)* (货号：940-000410-00)里的 DNB 制备试剂，操作步骤参考《DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装说明书》进行 DNB 制备。
- 3) **样本文库 DNB 与平衡文库 DNB 混合：**将样本文库 DNB 与平衡文库 DNB 按质量比 4:1 混合后上机测序，即样本文库 DNB (ng) :平衡文库 DNB (ng) =4:1。
- 4) **DNBSEQ-G99ARS 测序：**该 DNB 文库进行双 barcode 测序，推荐搭配以下 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂盒，选择 PE150+10+10 的测序类型进行上机：

DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂盒套装(G99 SM FCL PE150) (货号：940-000410-00)

⚠ 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。

DNBSEQ-E25 高通量测序平台

对于实验步骤3.5.5的文库，需搭配**标准文库试剂 (PCR产物) V4.0** (货号：1000027585) 进行测序平衡。样本文库与平衡文库均使用*DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150)* (货号：940-000567-00) 里的DNB制备试剂按照如下策略进行DNB制备，具体制备操作步骤参考《DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装使用说明书》：

- 1) **样本文库 DNB 制备：**取 25 ng 步骤 3.5.5 制备的 DNA 文库进行 DNB 制备，用 TE Buffer 补充至总体积 20 μ L。
- 2) **平衡文库 DNB 制备：**取 25 ng 平衡文库进行 DNB 制备，用 TE Buffer 补充至总体积 20 μ L。
- 3) **样本文库 DNB 与平衡文库 DNB 混合：**将样本文库 DNB 与平衡文库 DNB 按质量比 2:1 混合后上机测序，即样本文库 DNB (ng) :平衡文库 DNB (ng) =2:1。
- 4) **DNBSEQ-E25RS 测序：**该 DNB 文库进行双 barcode 测序，推荐搭配以下 DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒，选择 PE150+10+10

DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装(FCL PE150) (货号：940-000567-00)

⚠ 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，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。
- ◆ 磁珠使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 μL 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，请勿触碰磁珠，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 磁力架上开关管盖时应小心操作，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，然后开盖或关盖。

附录 B ATOPIlex 双标签引物模块使用规则

B-1 ATOPIlex 双标签引物模块(01-96)使用规则

- ◆ 本模块是为双标签文库构建提供的 96 人份的双标签引物，试剂盒包含 1 板 PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96)，共 96 个双标签引物。
- ◆ 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，使用时请仔细阅读以下使用规则。
- ◆ 请勿将其长期置于室温，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膜表面；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°C 保存。

PCR Dual Barcode Primer Mix (01-96) V1.0 使用规则

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

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

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。

B-2 ATOplex 双标签引物模块(48x96)使用规则

- ◆ 本模块是为双标签文库构建提供的 576 人份的双标签引物，本试剂盒提供 1 板 Barcode 1 (01-96) 和 1 板 Barcode 2 (01-48)。两板均分装在 96 孔板中。Dual Barcode 是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，挑选的最佳 Barcode 组合。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录 D 的使用规则。
- ◆ 请勿将其长期置于室温，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，用吸水纸擦拭干净膜表面；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 使用规则

Barcode 1 (01-96)和 Barcode 2 (01-48)分布图如图B-2和图B-3所示。基于碱基平衡的设计原则，需分别将Barcode 1和 Barcode 2成组使用，分组规则如下：

8个Barcode 1 (01-96)成组: 01~08、09~16、17~24、25~32、33~40、41~48、49~56、57~64、65~72、73~80、81~88和89~96，共计12组：

	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 B-2 Barcode 1 (01-96) 分布图

8个Barcode 2 (01-48)成组:01~08、09~16、17~24、25~32、33~40、41~48，共计6组：

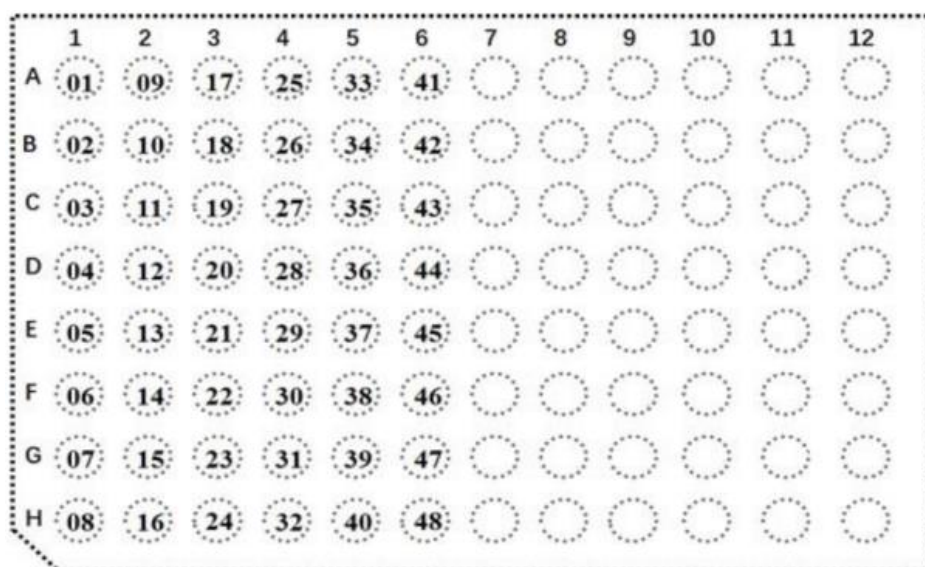


图 B-3 Barcode 2 (01-48) 分布图

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考表B-1的推荐Dual Barcode组合方案。

⚠ 注意：为了保证最优的测序质量，建议 1 个 lane 至少有 8 样本进行测序；若少于 8 样本进行 pooling 测序，可能会因为碱基不平衡导致拆分率较低；对于少于 576 个样本进行建库测序时，Barcode 1 板的每一行与 Barcode 2 板的同一行搭配使用（如 Barcode 1 板中的 A 行可以和任意一个 Barcode 2 板中的 A 行搭配使用），否则使用提供的 576RXN 拆分文件会造成无法拆分。

⚠ 注意：对多于 576 样本进行建库测序时，可以自行规划 Barcode 排布规则，但必须保证 Barcode 1 和 Barcode 2 都最大程度成组使用。同时，测序前需要在测序仪器上根据自定义的 Barcode 排布规则导入对应的拆分文件，最多可支持 48x96 种组合测序。

表 B-1 Barcode 1 (01-96)和 Barcode 2 (01-48)使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
8	加一组 8 Barcode 2（如 Barcode Primer 01F~08F），每个编号 Barcode Primer F 取等体积，分别加入每个样本； 加一组 8 Barcode 1（如 Barcode Primer 01R~08R），每个编号 Barcode Primer R 取等体积，分别加入每个样本。
$8n+x$ ($1 \leq n < 11, x=1 \sim 8$, 总计 9~96 个)	样本 $8n+x$ ，每 8 个样本分为一组， x 为 未成组的样本数： 每组样本分别加入同一列 Barcode 2（如样本 1~8 分别加入 Barcode Primer 01F~08F，样本 9~16 也分别加入 Barcode Primer 01F~08F，以此类推）；未成组样本根据 x 的数值，各加入成组样本所用 Barcode 2 组中的一个 Barcode Primer F； 每组样本采用上述（8 样本数/lane）方法加 Barcode 1；未成组样本根据 x 的数值，各加入一个 Barcode Primer R，并注意按照对应要求加不同组别的 Barcode Primer R。

以建库 70 例样本为例，每个样本 PCR Dual Barcode 组合如下图所示：

70 samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R01-F01	R09-F01	R17-F01	R25-F01	R33-F01	R41-F01	R49-F01	R57-F01	R65-F01			
B	R02-F02	R10-F02	R18-F02	R26-F02	R34-F02	R42-F02	R50-F02	R58-F02	R66-F02			
C	R03-F03	R11-F03	R19-F03	R27-F03	R35-F03	R43-F03	R51-F03	R59-F03	R67-F03			
D	R04-F04	R12-F04	R20-F04	R28-F04	R36-F04	R44-F04	R52-F04	R60-F04	R68-F04			
E	R05-F05	R13-F05	R21-F05	R29-F05	R37-F05	R45-F05	R53-F05	R61-F05	R69-F05			
F	R06-F06	R14-F06	R22-F06	R30-F06	R38-F06	R46-F06	R54-F06	R62-F06	R70-F06			
G	R07-F07	R15-F07	R23-F07	R31-F07	R39-F07	R47-F07	R55-F07	R63-F07				
H	R08-F08	R16-F08	R24-F08	R32-F08	R40-F08	R48-F08	R56-F08	R64-F08				

采用上述 $8n+x$ 方法加 Barcode 1 和 Barcode 2，注意不同样本板应分别加不同列的 Barcode 2。

以建库 2 板样本为例，每个样本 PCR Dual Barcode 组合如下图所示：

N 个 96 孔板
(N=1~6)

Plate 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R01-F01	R09-F01	R17-F01	R25-F01	R33-F01	R41-F01	R49-F01	R57-F01	R65-F01	R73-F01	R81-F01	R89-F01
B	R02-F02	R10-F02	R18-F02	R26-F02	R34-F02	R42-F02	R50-F02	R58-F02	R66-F02	R74-F02	R82-F02	R90-F02
C	R03-F03	R11-F03	R19-F03	R27-F03	R35-F03	R43-F03	R51-F03	R59-F03	R67-F03	R75-F03	R83-F03	R91-F03
D	R04-F04	R12-F04	R20-F04	R28-F04	R36-F04	R44-F04	R52-F04	R60-F04	R68-F04	R76-F04	R84-F04	R92-F04
E	R05-F05	R13-F05	R21-F05	R29-F05	R37-F05	R45-F05	R53-F05	R61-F05	R69-F05	R77-F05	R85-F05	R93-F05
F	R06-F06	R14-F06	R22-F06	R30-F06	R38-F06	R46-F06	R54-F06	R62-F06	R70-F06	R78-F06	R86-F06	R94-F06
G	R07-F07	R15-F07	R23-F07	R31-F07	R39-F07	R47-F07	R55-F07	R63-F07	R71-F07	R79-F07	R87-F07	R95-F07
H	R08-F08	R16-F08	R24-F08	R32-F08	R40-F08	R48-F08	R56-F08	R64-F08	R72-F08	R80-F08	R88-F08	R96-F08

Plate 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R01-F09	R09-F09	R17-F09	R25-F09	R33-F09	R41-F09	R49-F09	R57-F09	R65-F09	R73-F09	R81-F09	R89-F09
B	R02-F10	R10-F10	R18-F10	R26-F10	R34-F10	R42-F10	R50-F10	R58-F10	R66-F10	R74-F10	R82-F10	R90-F10
C	R03-F11	R11-F11	R19-F11	R27-F11	R35-F11	R43-F11	R51-F11	R59-F11	R67-F11	R75-F11	R83-F11	R91-F11
D	R04-F12	R12-F12	R20-F12	R28-F12	R36-F12	R44-F12	R52-F12	R60-F12	R68-F12	R76-F12	R84-F12	R92-F12
E	R05-F13	R13-F13	R21-F13	R29-F13	R37-F13	R45-F13	R53-F13	R61-F13	R69-F13	R77-F13	R85-F13	R93-F13
F	R06-F14	R14-F14	R22-F14	R30-F14	R38-F14	R46-F14	R54-F14	R62-F14	R70-F14	R78-F14	R86-F14	R94-F14
G	R07-F15	R15-F15	R23-F15	R31-F15	R39-F15	R47-F15	R55-F15	R63-F15	R71-F15	R79-F15	R87-F15	R95-F15
H	R08-F16	R16-F16	R24-F16	R32-F16	R40-F16	R48-F16	R56-F16	R64-F16	R72-F16	R80-F16	R88-F16	R96-F16

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：4000-688-114

技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

网 址：www.mgi-tech.com



官方微信