

编号: SOP-013-B02-033



使用说明书

版本: 10.0

MGIEasy 酶切DNA文库 制备试剂套装

货号: 1000006987, 1000006988
1000017572

套装版本号: V2.1

关于说明书

©2024 深圳华大智造生物电子科技有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造生物电子科技有限公司（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。

ALPAQUA®、Agilent®、Ambion®、Axygen®、Invitrogen®、PerkinElmer®、Qubit®、Thermo Fisher®，以及文中涉及的其他名称及商标属于各自所有者资产。

制造商信息

生产企业	深圳华大智造生物电子科技有限公司
生产地址	深圳市盐田区盐田街道沿港社区北山道 146 号北山工业区 11 栋 2 楼
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	套装版本	日期	修订内容摘要
10.0	V2.1	2024 年 4 月	<ul style="list-style-type: none">变更制造商信息更新说明书风格
B6	V2.1	2022 年 2 月	更改步骤3.1酶切打断的操作说明
B5	V2.1	2021 年 11 月	新增对肺泡灌洗液/痰液提取样品的打断风险说明
B4	V2.1	2021 年 4 月	<ul style="list-style-type: none">试剂盒版本V2.0升级成V2.1更改3.1步骤打断酶的组分（货号不同）及打断方式（体积、温度、时间）更改3.2步骤磁珠纯化条件
B3	V2.0	2021 年 1 月	更新公司联系信息
B2	V2.0	2020 年 7 月	<ul style="list-style-type: none">变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”更新说明书风格省略部分定量步骤
B1	V2.0	2019 年 9 月	<ul style="list-style-type: none">增加附录病原样本建库流程1.4增加 96 RXN 新套装货号及试剂盒组分
B0	V2.0	2019 年 7 月	<ul style="list-style-type: none">试剂盒版本 V1.0 升级成 V2.0更改打断酶的组分（货号不同）及打断方式（体积、温度、时间）更改 PE150 建库条件及低起始量建库条件
A1	V1.0	2018 年 12 月	<ul style="list-style-type: none">增加微生物建库流程增加 PE150 建库流程
A0	V1.0	2018 年 6 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: <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	4
1.6 自备物料清单	5
1.7 注意事项	6
1.8 流程	7

2 样本要求及处理	8
2.1 样本类型	8
2.2 样本完整度	8
2.3 样本起始量	8
2.4 样本储存条件	9

3 文库构建标准流程	10
3.1 酶切打断	10
3.2 磁珠片段筛选	12
3.3 末端修复	15
3.4 接头连接	16
3.5 连接产物纯化	18
3.6 PCR	19
3.7 PCR 产物纯化	20
3.8 PCR产物质检	21

4 环化消化	23
4.1 变性、单链环化	23
4.2 酶切消化	24
4.3 消化产物纯化	25
4.4 消化产物质检	26

5 附录	27
5.1 关于磁珠及纯化	27
5.2 关于 Adapter 使用	28

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 酶切 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 WGS 文库构建试剂套装。本试剂套装可快速将 5 ng - 400 ng 基因组 DNA 制备成 MGI 高通量测序平台专用的文库。本试剂盒采用高质量的酶学组成, 改进型接头连接技术以及具有强扩增效率的高保真酶, 显著提高文库转化率与扩增效率。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

本试剂套装适用于所有常见的动物、植物、真菌、细菌等物种, 包括人、鼠、水稻、拟南芥、酵母、大肠杆菌等。不同物种均有稳定的表现。但对于肺泡灌洗液/痰液中提取的 DNA 进行打断会有失败风险。

1.3 适配测序平台

构建的文库可用于以下平台及测序类型:

- BGISEQ-500RS (PE100)
- MGISEQ-200RS (SE100)
- MGISEQ-2000RS (PE100/PE150)

1.4 组分

本试剂套装包含有 3 个规格。每个试剂套装包含 4 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 酶切 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000006987)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 DNA 文库 制备试剂盒 货号: 1000005254 规格: 16 RXN	Frag Buffer II	 绿色	160 μ L/支 \times 1
	Frag Enzyme II	 绿色	80 μ L/支 \times 1
	ERAT Buffer	 橙色	114 μ L/支 \times 1
	ERAT Enzyme Mix	 橙色	47 μ L/支 \times 1
	Ligation Buffer	 红色	375 μ L/支 \times 1
	DNA Ligase	 红色	26 μ L/支 \times 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	400 μ L/支 \times 1
	PCR Primer Mix	 蓝色	96 μ L/支 \times 1
MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒 货号: 1000005284 规格: 16 \times 10 μ L	DNA Adapters	 白色	10 μ L/支 \times 16
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005278 规格: 8 mL	DNA Clean Beads	 白色	8 mL/支 \times 1
	TE Buffer	 白色	4 mL/支 \times 1
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260 规格: 16 RXN	Splint Buffer	 紫色	186 μ L/支 \times 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μ L/支 \times 1
	Digestion Buffer	 白色	23 μ L/支 \times 1
	Digestion Enzyme	 白色	42 μ L/支 \times 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	120 μ L/支 \times 1

表 2 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000006988)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 DNA 文库 制备试剂盒 货号: 1000005256 规格: 96 RXN	Frag Buffer II	 绿色	960 μ L/支 \times 1
	Frag Enzyme II	 绿色	480 μ L/支 \times 1
	ERAT Buffer	 橙色	682 μ L/支 \times 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	ERAT Enzyme Mix	 橙色	279 μL /支 \times 1
	Ligation Buffer	 红色	1124 μL /支 \times 1
	DNA Ligase	 红色	154 μL /支 \times 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μL /支 \times 1
	PCR Primer Mix	 蓝色	576 μL /支 \times 1
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282 规格: 96 \times 10 μL	DNA Adapters	---	10 μL /孔 \times 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005279 规格: 50 mL	DNA Clean Beads	 白色	50 mL/支 \times 1
	TE Buffer	 白色	25 mL/支 \times 1
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260 规格: 16 RXN	Splint Buffer	 紫色	186 μL /支 \times 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μL /支 \times 1
	Digestion Buffer	 白色	23 μL /支 \times 1
	Digestion Enzyme	 白色	42 μL /支 \times 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	120 μL /支 \times 1

表 3 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000017572)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 DNA 文库 制备试剂盒 货号: 1000005256 规格: 96 RXN	Frag Buffer II	 绿色	960 μL /支 \times 1
	Frag Enzyme II	 绿色	480 μL /支 \times 1
	ERAT Buffer	 橙色	682 μL /支 \times 1
	ERAT Enzyme Mix	 橙色	279 μL /支 \times 1
	Ligation Buffer	 红色	1124 μL /支 \times 1
	DNA Ligase	 红色	154 μL /支 \times 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μL/支 × 1
	PCR Primer Mix	 蓝色	576 μL/支 × 1
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282 规格: 96 × 10 μL	DNA Adapters	--	10 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005279 规格: 50 mL	DNA Clean Beads	 白色	50 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	25 mL/支 × 1
MGIEasy 环化模块 货号: 1000017573 规格: 96 RXN	Splint Buffer	 紫色	1114 μL/支 × 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	48 μL/支 × 1
	Digestion Buffer	 白色	135 μL/支 × 1
	Digestion Enzyme	 白色	250 μL/支 × 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	720 μL/支 × 1

1.5 储存与运输

表 4 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	储存温度	运输温度
MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂盒	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒		
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒		
MGIEasy 环化模块		
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	2 °C ~ 8 °C	



- 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 5 MGI 产品订购信息

货号	规格	名称
1000005279	50 mL	MGIEasy DNA 纯化磁珠

表 6 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
Agilent 2100 Bioanalyze	Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA 或同等功能仪器

表 7 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 ssDNA Assay Kit	Invitrogen, Cat. No. Q10212
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Cat. No. Q32854
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
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

名称	推荐品牌
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen, Cat. No. Q32856 或 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。
- 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	酶切打断	40 ~ 50 min	10 ~ 15 min
3.2	磁珠片段筛选（二选一） 	30 ~ 60 min	15~ 25 min
3.3	末端修复	50 min	5 ~ 10 min
3.4	接头连接	40 min	10 min
3.5	连接产物纯化 	20~30 min	10 ~ 15 min
3.6	PCR	50 min	10 min
3.7	PCR产物纯化 	30 min	10 ~ 15 min
3.8	PCR产物质检 	15 ~ 60 min	10 ~ 20 min
4.1	变性及单链环化	45 min	15 min
4.2	酶切消化	40 min	10 min
4.3	消化产物纯化 	40 min	10 ~ 15 min
4.4	消化产物质检 	15 ~ 20 min	10 ~ 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 样本要求及处理

2.1 样本类型

本试剂盒适用于所有常见的动物、植物、真菌、细菌等物种，例如人（血液、唾液、新鲜组织）、鼠、水稻、拟南芥、酵母、大肠杆菌等样本提取的基因组 DNA 进行文库制备。

对于肺泡灌洗液/痰液中提取的 DNA 进行打断会有失败风险。

2.2 样本完整度

推荐使用完整度较好（无明显降解或轻微降解）且纯度良好（ $OD_{260/280} = 1.8 \sim 2.0$ ， $OD_{260/230} > 2.0$ ）的高质量基因组 DNA。

2.3 样本起始量

随着基因组 DNA 量的减少，成功转换成含有接头的 DNA 片段比例会下降，若基因组 DNA 量足够，优先推荐使用高起始量基因组 DNA 进行文库构建，以达到最优效果。详细见下表。

表 8 样本起始量推荐

样本类型	起始量范围	推荐起始量	推荐浓度
复杂基因组	50-400 ng	200 ng	≥ 15 ng/ μ L
简单基因组	5-400 ng	100 ng	≥ 7.2 ng/ μ L
微生物基因组	5-400 ng	100 ng	≥ 7.2 ng/ μ L
Meta样本	5-400 ng	100 ng	≥ 7.2 ng/ μ L

2.4 样本储存条件

本酶切试剂盒兼容的 DNA 储存 Buffer 有：水、EB、0.1×TE、buffer AE、TE 等常见提取溶解 buffer。为了防止过多的 EDTA、EGTA 等抑制剂对打断时效的影响，建议样品提取时溶于水、EB 或 0.1×TE 中，以确保打断结果一致性：

- 若 DNA 提取过程中带入其他成分复杂（高盐离子/蛋白/二价阳离子/ EDTA/ EGTA），建议在酶切打断之前使用 2 倍体积磁珠进行纯化，用水、EB 或 0.1×TE 洗脱，回收率约 90%。关于 DNA Clean Beads 的使用注意事项及纯化步骤，请参照本说明书附录 5.1 及步骤 3.5 或步骤 3.7。
- 若基因组 DNA 较珍贵，建议使用 50 ng 同等提取条件及溶解 Buffer 的非珍贵 DNA，参考步骤 3.1 进行打断测试，取 3-5 ng 使用 Agilent 2100 对其片段分布进行检测，根据结果适当调整 30 °C 反应时间使打断主带符合预期。

3 文库构建标准流程

3.1 酶切打断

-  **提示**
- 本试剂盒酶切打断是通过控制 30 °C 反应时间来控制 DNA 的片段分布，因此操作过程中请尽量保证时间和温度的精确，确保整个加样过程在冰上进行。
 - 当手动处理大量的样本时，酶切打断反应的控制会变得困难。推荐先在反应管中加入稀释好的样品，再使用排枪迅速加入酶切反应液，同时确保整个加样过程在冰上进行。
 - 下述酶切打断步骤适用于溶于水、EB、0.1×TE 的 DNA，打断得到的 DNA 主带片段在 300 -500 bp 之间，适用于 PE150 测序。若是其他溶解 Buffer，请自行摸索 30 °C 打断时长。

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 9 试剂准备

试剂名称	要求
补充 buffer	自备物料，室温
Frag Buffer II	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Frag Enzyme II	冰上暂存

 **注意** Frag Enzyme II 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），瞬时离心后置于冰上。

3.1.2 酶切打断

1. 根据样本浓度，取适量样本至新的 0.2 mL PCR 管，用补充 buffer 补足至总体积 45 μ L。涡旋混匀 3 次，每次 3 秒，瞬时离心后置于冰上。

表 10 酶切打断 DNA 的配制

组分	单个反应体积
gDNA	X μ L
补充 buffer	45 - X μ L
Total	45 μ L

2. 提前设置 PCR 程序并运行第 1 步 4 °C hold。

表 11 酶切打断反应条件 (体系: 60 μ L)

温度	时间
70 °C 热盖	On
4 °C	Hold
30 °C	8 min
65 °C	15 min
4 °C	Hold

3. 将 Frag Enzyme II 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，瞬时离心后置于冰上。

 提示 请勿涡旋 Frag Enzyme II。混匀不充分将影响打断效果。

4. 根据所需反应数，在冰上配制酶切打断反应液，吹打 10 次混匀，或涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 12 酶切打断反应液的配制

组分	单个反应体积
Frag Buffer II	10 μ L
Frag Enzyme II	5 μ L
Total	15 μ L

5. 吸取 15 μ L 酶切打断反应液至各样本管中 (步骤 1)，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
6. 确保 PCR 仪已经降至 4 °C。将 PCR 管置于 PCR 仪上，跳过第一步 (4 °C Hold)，开始 30 °C 反应。

 提示 若 PCR 仪不能实现跳过步骤，可设置程序 4 °C 1 min，待温度降至 4 °C 后暂停，放入样本后运行。

7. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

 注意 初次进行样本酶切打断时，建议从产物中取 3~5 ng 样本进行 1.8 \times 磁珠纯化 (5 μ L TE Buffer 洗脱，具体步骤参考磁珠单选方案)，安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒分析，正常的 PE150 打断片段大小应

在 100 bp~1000 bp，主峰 300 bp~500 bp。若片段过大或过小，建议重新调整 30 °C 反应时长，进行酶切打断条件测试。

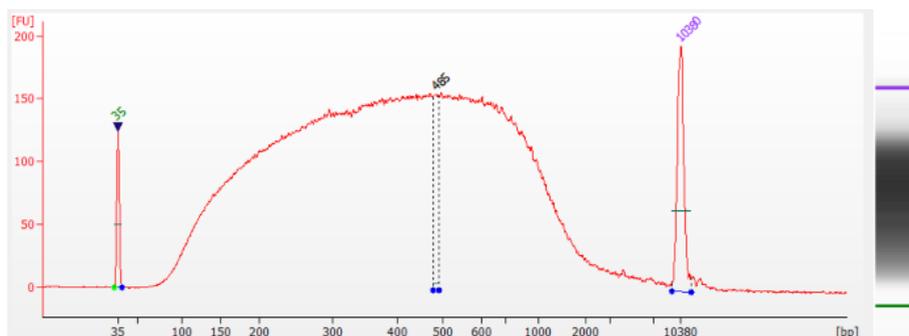


图 1 标准流程酶切打断后产物（1.8x磁珠纯化）Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.2 磁珠片段筛选

打断后 DNA 分布范围较宽，建议进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。

- 若样本量 > 100 ng，建议使用磁珠双选方案；
- 若样本起始量较低（≤ 50 ng）或者降解程度较高（如 FFPE 样本），建议使用磁珠单选方案。磁珠使用量如下表所示。

表 13 打断后（60 μL）纯化条件推荐

起始量	方案	PE150磁珠用量
400 ng	磁珠双选	36 μL+12 μL
200 ng	磁珠双选	36 μL+12 μL
100 ng	磁珠单选	48 μL
50 ng	磁珠单选	48 μL
25 ng	磁珠单选	48 μL
10 ng	磁珠单选	48 μL
5 ng	磁珠单选	48 μL

3.2.1 磁珠双选

- 提示**
- 因磁珠双选方法筛选的 DNA 损失量约为 60% - 95%。若样本较珍贵，可选择回收第一轮磁珠，操作步骤 8~13 回收 DNA，保存备份。
 - 下述步骤使用 36 μL+12 μL 磁珠对打断产物进行片段筛选，得到主带 ≈ 330 bp 的产物，适用于 PE150。
 - 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。

3.2.1.1 准备

表 14 试剂准备

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

3.2.1.2 磁珠双选

 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. 检查样本体积（3.1.2 节步骤 7），若体积不足 60 μL ，用 TE buffer 补足。
2. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 36 μL DNA Clean Beads 至各样本管中，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管中。或涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 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 94 μL 上清液至新的 PCR 管/离心管。

 提示 此步保留上清，丢弃磁珠。根据需要回收磁珠上的 DNA。

5. 吸取 12 μL DNA Clean Beads 至含有上清液的 PCR 管中，用移液器轻轻吸打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
6. 室温孵育 5 min。
7. 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。
8. 保持样本管固定于磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
9. 重复步骤 8 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。
10. 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。

11. 将样本管从磁力架上取下，加入 43 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。或涡旋混匀。
12. 室温孵育 5 min。
13. 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 41 μL 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 提示 预估磁珠片段筛选后的产量小于 100 ng，可直接进行末端修复反应。

- 预估产量大于 100 ng，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片段筛选产物进行定量。

|| 停止点 产物纯化后可置 -20 °C 冰箱储存。

3.2.2 磁珠单选

-  提示
- 下述步骤使用 48 μL 磁珠对打断产物进行片段筛选，得到主带 ≈ 330 bp 的产物，适用于 PE150。
 - 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。

3.2.2.1 准备

表 15 试剂准备

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

3.2.2.2 磁珠单选

 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. 检查样本体积（3.1.2 节步骤 7），若体积不足 60 μL ，用 TE Buffer 补足。
2. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 48 μL DNA Clean Beads 至各样本管中，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管中。或涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 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。
5. 保持样本管固定于磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
6. 重复步骤 5 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。
7. 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。

8. 将样本管从磁力架上取下，加入 43 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。或涡旋混匀。
9. 室温孵育 5 min。

10. 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 41 μL 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 提示 预计产量 > 100 ng 时，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片段筛选产物进行定量。

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

3.3 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。

3.3.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	室温暂存
ERAT Buffer	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

3.3.2 末端修复

1. 根据磁珠片选后 DNA 定量结果，若总量 ≤ 100 ng，则可全部投入进行末端修复；若总量 ≥ 100 ng，则建议取 100 ng DNA 至新的 0.2 mL PCR 管，体积应少于 40 μL ，不足 40 μL 部分用 TE Buffer 补足。
2. 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 17 末端修复反应液的配制

组分	单个反应体积
ERAT Buffer	7.1 μL
ERAT Enzyme Mix	2.9 μL
Total	10 μL

3. 吸取 10 μL 末端修复反应液至各样本管中（步骤 1），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 18 末端修复反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
70 °C 热盖	On
37 °C	30 min
65 °C	15 min
4 °C	Hold

5. 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。

3.4 接头连接

-  **提示**
- 操作前请仔细阅读第 28 页“关于 Adapter 使用”。
 - Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请按照下表和实际基因组 DNA 用量确定相应的接头稀释倍数。需要稀释接头时，请使用试剂盒中的 TE Buffer 对接头进行稀释。
 - 提高 Adapters 的使用量可以在一定程度上提高文库产出，尤其当基因组 DNA ≤ 50 ng 时。当需要优化建库效率时，可在下表推荐条件下额外尝试几个更高的 Adapter 使用量（推荐 2 - 10 倍范围内）。

表 19 不同基因组 DNA 起始量推荐 Adapter 使用量

基因组 DNA 起始量 (ng)	MGI Adapter 稀释倍数	MGI Adapter 稀释后投入量 (μ L)
400	不稀释	5
200	不稀释	5
100	不稀释	5
50	不稀释	5
25	2	5
10	5	5
5	10	5

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 20 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	室温暂存

试剂名称	要求
MGI Adapters	涡旋混匀、离心，冰上暂存
Ligation Buffer	室温解冻，涡旋混匀，瞬时离心，冰上暂存
DNA Ligase	瞬时离心，冰上暂存

-  提示
- 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。

3.4.2 接头连接

- 根据需要，用 TE Buffer 将 Adapters 稀释相应倍数，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
- 吸取 5 μL Adapters 或稀释后的 Adapters 至对应的样本管中（3.3.2 节步骤 5），涡旋混匀 3 次，每次 3 秒，瞬时离心后置于冰上。
- 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 21 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Ligation Buffer	23.4 μL
DNA Ligase	1.6 μL
Total	25 μL

- 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。

- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 22 接头连接反应条件（体系：80 μL ）

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

- 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。
- 加入 20 μL TE Buffer 至总体积 100 μL 。涡旋混匀，瞬时离心。

 停止点 接头连接后产物可放置 -20°C 冰箱储存不超过 16 h。

3.5 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。

3.5.1 准备

表 23 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
DNA Clean 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 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 DNA Clean Beads，吸取 50 μL DNA Clean Beads 至样本管中（3.4.2 节步骤 7），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 μL 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 21 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。或涡旋混匀。
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 19 μL 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

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

3.6 PCR

 **提示** PCR 扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会影响后续数据性能表现。下表推荐获得 300 ng 和 1 μg PCR 产物推荐的扩增循环数。当基因组 DNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量产物。

表 24 获得 300 ng 和 1 μg PCR 产物推荐的扩增循环数

基因组 DNA (ng)	打断后磁珠片选方案	对应产量所需循环数	
		300 ng	1 μg
400 ng	磁珠双选	3-4	6-7
200 ng	磁珠双选	5-6	7-8
100 ng	磁珠单选	5-6	7-8
50 ng	磁珠单选	6-7	8-9
25 ng	磁珠单选	7-8	9-11
10 ng	磁珠单选	8-9	10-12
5 ng	磁珠单选	9-10	11-13

3.6.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 25 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

3.6.2 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 26 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Primer Mix	6 μL
Total	31 μL

2. 吸取 31 μL PCR 反应液至样本管中（3.5.2 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 27 PCR 反应条件（体系：50 μL ）

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	on	-
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 s	3 ~ 12 见表 24
60 $^{\circ}\text{C}$	15 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	-

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

3.7 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。

3.7.1 准备

表 28 试剂准备

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

3.7.2 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 DNA Clean Beads，吸取 50 μL DNA Clean Beads 至样本管中（3.6.2 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。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 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。或涡旋混匀。
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。

3.8 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。
- 使用电泳分离法，按照相应说明书对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。

表 29 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 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 等	PCR产物的产量： ≥ 1 pmol
电泳分离法	Tapestation (Agilent Technologies) Bioanalyzer、LabChip GX、GXII、 GX Touch (PerkinElmer)、 Fragment Analyzer (Advanced Analytical) 等	/

PCR 产量可参考如下公式计算。例如，主带 300 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小 384 bp，其产量应达到 254 ng。

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} = \text{PCR 产物主带大小 (bp)} \times 0.66$$

下图为标准实验流程 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果，PCR 纯化产物。

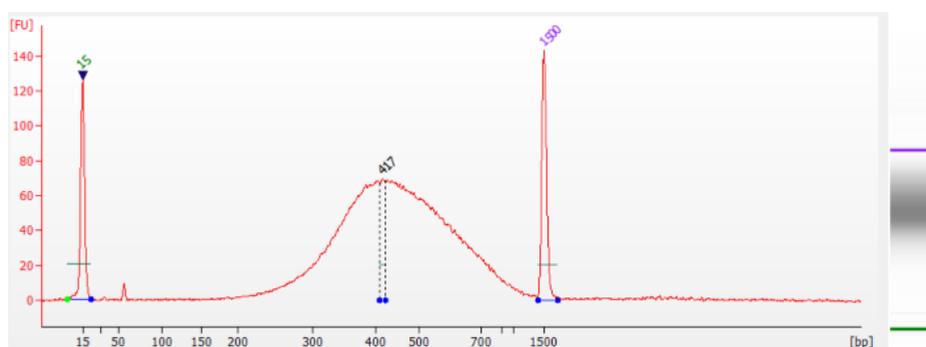


图 2 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

如需将多个样本混合测序，建议根据 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案，或附录关于 Adapter 使用，在定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$ 。

4 环化消化

4.1 变性、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 计算所需纯化后 PCR 产物体积。

4.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 30 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	自备物料，室温平衡、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

4.1.2 变性

1. 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 TE Buffer 补足至总体积 48 μ L。
2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 31 变性反应条件（体系：48 μ L）

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

3. 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。

4.1.3 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 32 单链环化反应液的配制

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

2. 吸取 12.1 μ L 单链环化反应液至各样本管中 (4.1.2 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 33 单链环化反应条件 (体系: 60.1 μ L)

温度	时间
45 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ 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。

4.2 酶切消化

4.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 34 试剂准备

试剂名称	要求
Digestion Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Digestion Enzyme	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Digestion Stop Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存

4.2.2 酶切消化

1. 根据反应数，在冰上配制酶切消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 35 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. 吸取 4 μL 酶切消化反应液至各样本管中（4.1.3节步骤 4），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 36 酶切消化反应条件（体系：64.1 μL ）

温度	时间
45 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，立即加入 7.5 μL Digestion Stop Buffer，涡旋混匀 3 次，每次 3 s。瞬时离心后吸取全部液体至新的 1.5 mL 离心管。

4.3 消化产物纯化

 提示 添加试剂、吸弃上清时请勿触碰、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。

4.3.1 准备

表 37 试剂准备

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

4.3.2 消化产物纯化

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 170 μL DNA Clean Beads 至各样本管中（4.2.2 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 10 min。
3. 将离心管瞬时离心，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. 保持离心管固定于磁力架上，加入 500 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4。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，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持离心管固定于磁力架上，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。
8. 室温孵育 10 min。
9. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 30 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 酶切消化产物纯化后可置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

4.4 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）/ PCR 投入量（dsDNA） $\geq 7\%$ 。

例如：主带 300 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小为 384 bp，投入 254 ng 进行环化，其酶切消化产物产量应达到 17.8 ng 以上。

5 附录

5.1 关于磁珠及纯化

本试剂盒/套装推荐使用 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒的 DNA Clean beads 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需重新摸索。

5.1.1 磁珠使用前注意事项

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

5.1.2 纯化操作注意事项

- 样本体积：如果待纯化样本体积因孵育温度高导致蒸发，体积减少，应加入 TE Buffer 补齐体积，再用推荐磁珠用量纯化。
- 开盖：在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 离心管中下段再开盖。
- 吸取上清
 1. 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离，请于液体彻底澄清后再吸取上清。
 2. 分离时间一般需要 2~3 min。由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间可能延长，以液体彻底澄清为准。
 3. 吸取上清时，离心管应始终置于磁力架上，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，吸头不可碰到磁珠。
 4. 为避免吸到磁珠，最后可余留 2~3 μ L 液体。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。
- 漂洗

1. 应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇漂洗磁珠。液体高度应没过磁珠。
 2. 漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上，请勿吸打、搅动磁珠。
 3. 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，用小量程移液器将管底液体吸干。
- 干燥
 1. 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。
 - 磁珠开裂：**过分干燥，会降低纯化得率。**
 - 磁珠表面反光：干燥不充分，容易造成无水乙醇残留影响后续反应。
 - 磁珠表面无反光：干燥充分。
 2. 磁珠干燥一般需要 3 ~ 5 min 不等。由于室内温度、湿度的差异，干燥时间可能不同，应随时观察。
 - 洗脱
 1. 用试剂盒附带的 TE Buffer 进行洗脱。
 2. 为避免触碰、吸取磁珠，洗脱体积应比最终吸取上清的体积多 2 μL 。

5.2 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：MGIEasy DNA Adapters-16（管式）试剂盒或 MGIEasy DNA Adapters-96（板式）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 30 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

5.2.1 DNA Adapters-16（管式）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：

- 4个 Adapter 成组: 01-04、13-16, 共计 2 组;
- 8个 Adapter 成组: 97-104, 共计 1 组。

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

 注意 同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。

表 38 DNA Adapters-16 (管式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 97-104, 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。
2	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04, 将 01 和 02 取等体积混合后加入样本 1 中, 将 03 和 04 取等体积混合后加入样本 2 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 97-104, 将 97-100 取等体积混合后加入样本 1 中。将 101-104 取等体积混合后加入样本 2 中。
3	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 97-104, 将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix, 分别加入样本 1、2、3、4 中。

样本数/lane	使用方法（举例）
5	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<p>需使用全部 3 组 Adapter，分三步操作:</p> <ol style="list-style-type: none"> 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，使用剩余的一组 Adapter。加该组内任意一个编号 Adapter。或者将所有编号 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> • 加一组 8 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 97-104，将 97、98、99、100、101、102、103、104 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。 • 或选取两组 4 个 Adapter（01-04 和 13-16）。每个样本加 1 个 Adapter。
8+x (x=1~8, 总计 9~16个)	<p>分两步操作:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 8 样本 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 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. 剩余样本分成 1 组，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。 <p> 提示 上述两组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

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 97-104。
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。

5.2.2 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 3 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 39 DNA Adapters-96 (板式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	<ul style="list-style-type: none"> • 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。

样本数/lane	使用方法（举例）
2	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> 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。

样本数/lane	使用方法（举例）
$8n+x$ ($n=1, 2$ $x=1\sim 8$, 总计 $9\sim 24$ 个)	分三步： 1. 样本 1-8 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 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 $8n+1 \sim 8n+X$ ，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。
$8n+x$ $(3\leq n < 11$ $x=1\sim 8$, 总计 $25\sim 96$ 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 $8n+1 \sim 8n+X$ ，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。