

编号: SOP-013-B02-034



使用说明书

版本: 7.0

MGIEasy 通用DNA文库 制备试剂套装

货号: 1000006985, 1000006986
1000017571

套装版本号: V1.0

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
7.0	V1.0	2024 年 4 月	<ul style="list-style-type: none">变更制造商信息更新说明书风格
6.0	V.1.0	2022 年 3 月	更改公司 LOGO
A4	V1.0	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A3	V1.0	2020 年 7 月	变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”
A2	V1.0	2019 年 9 月	1.4 增加 96 RXN 新套装货号及试剂盒组分
A1	V1.0	2018 年 12 月	增加环化消化步骤
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	4
1.7 注意事项	6
1.8 流程	7

2 样本要求及处理	8
2.1 样本要求	8
2.2 DNA 打断方法和片段筛选	8
2.3 样本 DNA 定量与质控	9

3 文库构建标准流程	10
3.1 末端修复	10
3.2 接头连接	11
3.3 连接产物纯化	13
3.4 PCR	14
3.5 PCR 产物纯化	15
3.6 PCR产物质检	16
3.7 Pooling (可选)	17

4 环化消化	20
4.1 变性、单链环化	20
4.2 酶切消化	21
4.3 消化产物纯化	22
4.4 消化产物质检	23

5 附录	24
5.1 打断条件	24
5.2 关于磁珠及纯化	26
5.3 磁珠片段筛选	27
5.4 关于 Adapter 使用	28

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 通用 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 文库制备试剂盒。本试剂盒可以将 0.5 - 50 ng 片段化后的 DNA 制备成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、meta、FFPE 等。不同物种均有稳定的表现。

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:

- MGISEQ-200RS (PE100)
- BGISEQ-500RS (PE50/PE100/PE150)
- 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 通用 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000006985)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005248 规格: 16 RXN	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 通用 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000006986)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005250 规格: 96 RXN	ERAT Buffer	 橙色	682 μ L/支 \times 1
	ERAT Enzyme Mix	 橙色	279 μ L/支 \times 1
	Ligation Buffer	 红色	1124 μ L/支 \times 1
	DNA Ligase	 红色	154 μ L/支 \times 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μ L/支 \times 1






















试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	PCR Primer Mix	 蓝色	576 μ L/支 \times 1
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282 规格: 96 \times 10 μ L	DNA Adapters	-	10 μ L/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 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 3 MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000017571)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 通用 DNA 文库 制备试剂盒 货号: 1000005250 规格: 96 RXN	ERAT Buffer	 橙色	682 μ L/支 \times 1
	ERAT Enzyme Mix	 橙色	279 μ L/支 \times 1
	Ligation Buffer	 红色	1124 μ L/支 \times 1
	DNA Ligase	 红色	154 μ L/支 \times 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μ L/支 \times 1
	PCR Primer Mix	 蓝色	576 μ L/支 \times 1
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282 规格: 96 \times 10 μ L	DNA Adapters	---	10 μ L/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

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 环化模块 货号: 1000017573 规格: 96 RXN	Splint Buffer	 紫色	1114 μ L/支 \times 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	48 μ L/支 \times 1
	Digestion Buffer	 白色	135 μ L/支 \times 1
	Digestion Enzyme	 白色	250 μ L/支 \times 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	720 μ L/支 \times 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 通用 DNA 文库制备试剂盒	-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C	-80 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ 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 纯化磁珠试剂盒

表 6 设备清单

名称	推荐品牌
Covaris 打断仪	/
漩涡混匀仪	/
小型离心机	/

名称	推荐品牌
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
Covaris 打断管	/
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 Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C
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

本标准实验流程样本 DNA 来源：500 ng 基因组 DNA 进行 Covaris 打断，打断体积是 80 μL ，使用 64 μL +16 μL 磁珠片段筛选，得到 50 ng 主带为 280 bp 的样本 DNA。若样本 DNA 量不同，样本 DNA 主带不同，可根据 2.2.2 中不同磁珠体积片段筛选量、接头连接以及 PCR 反应阶段对实验细节进行调整。

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	末端修复	50 min	5 ~ 10 min
3.2	接头连接	40 min	10 min
3.3	连接产物纯化 	20~30 min	10 ~ 15 min
3.4	PCR	50 min	10 min
3.5	PCR产物纯化 	30 min	10 ~ 15 min
3.6	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	45 min	10 min
4.3	消化产物纯化 	40 ~ 50 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 样本要求

本试剂盒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、meta、FFPE 等样本提取的基因组 DNA 进行文库制备。

推荐使用完整度较好， $A_{260/280}=1.8 \sim 2.0$ 的高质量基因组 DNA 进行打断。

2.2 DNA 打断方法和片段筛选

2.2.1 打断

- 请将基因组 DNA 打断至所需主带范围：
 - PE50 推荐主带约 180 bp;
 - PE100 推荐主带约 280 bp;
 - PE150 推荐主带约 420 bp。
- 第 24 页“打断条件”列举了各 Covaris 型号 55 μL 打断条件参数。若需要其他体积 (15 μL 、130 μL 或 200 μL 等) 打断条件，请至 Covaris 官网查询。
- 若采用其他耗材打断，推荐设计梯度打断实验摸索最适打断条件。

2.2.2 片段筛选


- 打断后 DNA 分布范围若较宽，通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。推荐使用下表磁珠片段筛选方案，也可通过切胶纯化的方式进行片段筛选。

表 8 100 μL 打断后样本用不同磁珠体积片段筛选的理论 DNA 主带

目的片段 (bp)	180	230	280	335	420
第一轮磁珠投入量 (μL)	100	90	80	70	60
第一轮磁珠投入量 (μL)	50	20	20	20	20

- 磁珠片段筛选具体操作可参考 第 27 页“磁珠片段筛选”，提供了 500 ng 基因组 DNA 打断后（体积为 80 μL ），在末端修复之前进行 64 μL + 16 μL 磁珠片段筛选的详细步骤，最终得到 50 ng 主带 280 bp 的目的片段。

2.3 样本 DNA 定量与质控

- 样本 DNA 定量指对投入末端修复步骤中的 DNA 量进行控制，本试剂盒兼容样本 DNA 量范围为 0.5 - 50 ng，体积 $\leq 40 \mu\text{L}$ 。
- 应尽可能保证样本 DNA 片段集中度，样本 DNA 片段越集中，测序质量越好；反之，测序质量会有所下降。
- 本试剂盒片段筛选条件支持一定长度的片段主带（见表 8）。测序时，随着片段增大，测序质量可能会略微下降。请根据不同的测序类型选择不同插入片段进行建库。
 - PE50 测序，推荐片段主带在 180 bp 左右；
 - PE100 测序，推荐片段主带在 250 - 300 bp；
 - PE150 测序，推荐片段主带在 380 - 420 bp。
-  提示 不同长度的样本 DNA 不建议混合测序。
- 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。

3.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 9 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	自备物料，室温
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

3.1.2 末端修复

1. 根据样本浓度，取适量样本（推荐 50 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer 补足至总体积 40 μL 。
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 10 末端修复反应液的配制

组分	单个反应体积
ERAT Buffer	7.1 μL
RAT 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，涡旋混匀 3 次，每次 3s，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 11 末端修复反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
70 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
65 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ 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，末端修复产物可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存不超过 16 h，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 28 页“关于 Adapter 使用”，或参照 MGIEasy DNA Adapters 说明书。

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。

表 12 不同样本DNA量 (280 bp) 推荐 Adapter 使用量

样本DNA (ng)	MGI Adapter 稀释倍数	MGI Adapter 稀释后投入量 (μ L)
50	不稀释	5
25	2	5
10	5	5
5	10	5
2.5	15	5
1	45	5
0.5	80	5

提高 Adapter 的使用量可以在一定程度上提高文库产出，尤其当样本 DNA \leq 25 ng 时。当需要优化建库效率时，可在上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）。


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 13 试剂准备

试剂名称	要求
Adapters	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存

试剂名称	要求
Ligation Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
DNA Ligase	轻弹底部混匀，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。如需将样本混合测序，请先按规则将 **Adapter** 等量混合，冰上备用。
 - **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。

3.2.2 接头连接

1. 按规则吸取 **5 μL Adapter** 至对应的样本管中（3.1.2 节步骤 5），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 秒，瞬时离心后置于冰上。

表 14 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

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 15 接头连接反应条件（体系：80 μL）

温度	时间
30 °C 热盖	On
23 °C	30 min
4 °C	Hold

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。
6. 加入 20 μL TE Buffer 至总体系 100 μL。涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

 停止点 接头连接后产物可放置 -20 °C 冰箱，不超过 16 h。

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 16 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


3.3.2 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 DNA Clean Beads，吸取 50 μL DNA Clean Beads 至样本管中（3.2.2 节步骤 6），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 40 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。

 **提示**

- 当样本 DNA = 50 ng，连接产物纯化时洗脱 40 μL TE Buffer，取 19 μL 进行 PCR 反应。
- 当样本 DNA < 50 ng，推荐连接产物纯化时洗脱 21 μL TE Buffer，步骤 9 取 19 μL 至 PCR 管进行 PCR 反应。

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 38 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

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

3.4 PCR

PCR 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。

下表列举了当使用 0.5-500 ng 高质量样本 DNA (280 bp) 时，获得 300 ng 和 1 µg 文库推荐的扩增循环数，当样本 DNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

表 17 获得 300 ng 和 1 µg 文库推荐的扩增循环数

样本 DNA (ng)	对应产量所需循环数	
	300 ng	1 µg
-	300 ng	1 µg
0.5	14-16	16-17
1	11-13	15-16
2.5	11-13	15-16
5	9-11	13-15
10	8-10	11-13
25	6-8	9-11
50 (取一半产物进行 PCR)	6-8	9-11

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 18 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. 取 19 µL 3.3.2 节步骤 9 的产物至新的 0.2 mL PCR 管中。
2. 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 19 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

3. 吸取 31 μL PCR 反应液至各样本管中（步骤 1），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心使液体收集至管底。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 20 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	7*
60 $^{\circ}\text{C}$	15 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	-

 提示 *：若样本 DNA 投入量、DNA 主带、期望的文库产量不同，可根据表 17 调整循环数。

5. 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 21 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 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（3.4.2 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。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。

- 将样本管从磁力架上取下，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。或涡旋混匀。
- 室温孵育 5 min。
- 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 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 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。
- 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 22 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	/

1 pmol 不同片段大小的双链 DNA 样本分子对应不同的质量，可根据公式计算所需的 DNA 量。

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

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

表 23 不同片段大小 PCR 产物 1 pmol 对应产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR产物主片段大小 (bp)	1 pmol对应产量 (ng)
180	264	175
230	314	208
280	364	241
335	419	277
420	504	333

下图分别为 280 bp、420 bp 主带样本 DNA 标准实验流程 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

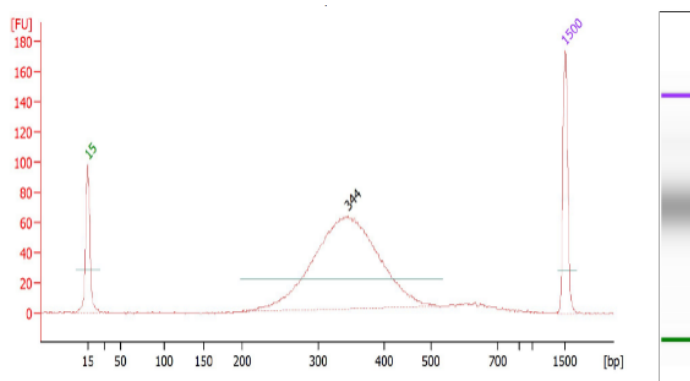


图 1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果 (280 bp 主带样本 DNA)

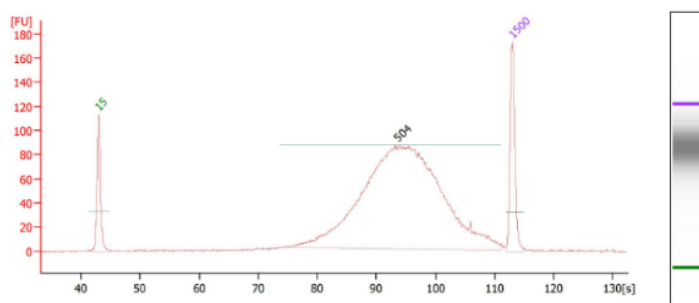


图 2 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果 (420 bp 主带样本 DNA)

- 单样本测序，可直接从环化消化步骤开始。
- 如需将多个样本混合测序，请参考 pooling 章节后进行环化消化反应。

3.7 Pooling (可选)

● PCR 纯化产物 pooling

- ⚠ 注意**
- 不同片段长度的 PCR 纯化产物不建议 pooling 测序。
 - Pooling 前请参考 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案，或见第 28 页“关于 Adapter 使用”。

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 上混合测序的每个样本所需数据量的百分比。参考公式 1，公式 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 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 单个样本所需体积计算

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

例如：计划将 4 个（插入片段长度均为 280 bp，接头长度 84 bp）文库混合测序，1 pmol PCR 产物对应的产量约为 241 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 $241 \text{ ng} \times 25\% = 60.25 \text{ ng}$ 。
- 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 48.2 ng。同法计算样本 2 ~ 4 所需质量。

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

3. 取 A μL 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 。

表 24 多样本混合测序（单个样本取样体积均 > 1 μL ）

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

 提示 A、B、C、D 体积均需大于 1 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 25 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 26 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 x 计算新体积 E，加入混合测序样本中。

例如，样本 3 取样体积不足 1 μL ，需将样本 3 稀释 Y 倍。

表 27 稀释高浓度样本 Y 倍

名称	体积
样本 3	5 μL^*
TE Buffer	$5Y - 5 \mu\text{L}$
Total	5Y μL

 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 28 方案二：多样本混合测序

名称	体积
样本 1	A μL
样本 2	B μL
样本 4	D μL
稀释 Y 倍后的样本 3	E μL
TE Buffer	$48 - (A+B+D) - E \mu\text{L}$
Total	48 μL

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、3 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 29 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 30 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 31 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 32 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 33 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 34 酶切消化反应液的配制

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

2. 吸取 4 μ L 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 35 酶切消化反应条件（体系：64.1 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，立即加入 7.5 μ L **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 36 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 取出置于室温平衡，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 一次。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 22 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 20 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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存 1 个月。

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 280 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小为 364 bp，投入 241 ng 进行环化，其酶切消化产物产量应达到 16.9 ng 以上。

表 37 1 pmol 不同片段大小 PCR 产物环化后合格产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR产物主片段大小 (bp)	7% 对应产量 (ng)
180	264	≥ 12.3
230	314	≥ 14.6
280	364	≥ 16.9
335	419	≥ 19.4
420	504	≥ 23.4

5 附录

5.1 打断条件

下表摘取了 Covaris 官网各型号打断仪在 55 μL 样本体积时的打断条件，仅供参考。请根据具体参数，将基因组 DNA 打断至 150~1000 bp 之间，主片段约为 300~500 bp。

表 38 Covaris S220 将样本 DNA(55 μL) 打断至 150-550 bp 的反应条件


S220	Vessel	microTUBE-50 AFA Fiber-Screw-Cap (PN 520166)						
								
	Sample Volume	55 μL						
	Holder	S-Series Holder microTUBE-50 Screw-Cap (PN 500492)						
	Water Level	10						
	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	7						
	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
	Peak Incident Power (W)	100	75	75	75	75	75	50
	Duty Factor	30%	25%	20%	20%	15%	10%	10%
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	150	95	65	45	45	55	50

表 39 Covaris 将样本DNA(55 μL) 打断至150-550 bp的反应条件

E220	Vessel	MicroTUBE-50 Screw-Cap (PN 520166)	8 microTUBE-50 AFA Fiber Strip V2 (PN 520174) 8 microTUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2 (PN 520240)	96 microTUBE-50 AFA Fiber Plate (PN 520168) 96 microTUBE-50 AFA Fiber Plate Thin Foil (PN 520232)
------	--------	------------------------------------	---	--




				
	Sample Volume	55 μ L		
	Racks	Rack 24 Place microTUBE Screw-Cap (PN 500308)	Rack 12 Place 8 microTUBE Strip (PN 500444)	No Rack needed
	Plate Definitions	“E220_500308 Rack 24 Place microTUBE-50 Screw-Cap +6.5mm offset”	“E220_500444 Rack 12 Place 8 microTUBE-50 Strip V2 -10mm offset”	“E220_520168 96 microTUBE-50 Plate -10.5mm offset” “E220_520232 96 microTUBE-50 Plate Thin Foil -10.5mm offset”
E220 evolution	Racks	Rack E220e 4 Place microTUBE Screw Cap (PN 500432) Rack E220e 8 microTUBE Strip V2 (PN 500437) Non Compatible	Rack E220e 4 Place microTUBE Screw Cap (PN 500432) Rack E220e 8 microTUBE Strip V2 (PN 500437) Non Compatible	Rack E220e 4 Place microTUBE Screw Cap (PN 500432) Rack E220e 8 microTUBE Strip V2 (PN 500437) Non Compatible
	Plate Definitions	“500432 E220e 4 microTUBE-50 Screw Cap -8.32mm offset” “500437 E220e 8 microTUBE- 50 Strip V2 -10mm offset” N/A	“500432 E220e 4 microTUBE-50 Screw Cap -8.32mm offset” “500437 E220e 8 microTUBE- 50 Strip V2 -10mm offset” N/A	“500432 E220e 4 microTUBE-50 Screw Cap -8.32mm offset” “500437 E220e 8 microTUBE- 50 Strip V2 -10mm offset” N/A
All	Temperature ($^{\circ}$ C)	7		
	Water Level	6	-2	0
	Intensifier (PN 500141)	Yes	Yes	Yes
	Y-dithering	No	No	Yes (0.5 mm Y-dither at 10 mm/s)

表 40 Covaris 将样本DNA(55 μ L) 打断至150-550 bp的反应条件 (续)

All	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
Screw-Cap	Peak Incident Power (W)	100	75	75	75	75	75	30
	Duty Factor	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	130	95	62	40	30	50	70

8-Strip	Peak Incident Power (W)	75	75	75	75	75	75	50
	Duty Factor	0.15	0.15	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	Cycles per Burst	500	500	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	360	155	75	45	35	52	50
Plate	Peak Incident Power (W)	100	100	75	75	75	75	75
	Duty Factor	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	145	90	70	49	34	50	32

5.2 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。

5.2.1 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。

5.2.2 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 。

5.3 磁珠片段筛选

-  提示
- 本案例采用 64 μL +16 μL 磁珠对打断后产物 (80 μL) 进行磁珠片段筛选，最终得到主带为 280 bp 的 Input DNA，适用于 PE100 测序。
 - 若需要筛选其它片段主带，请根据第二章片段筛选条件选择合适的磁珠片段筛选条件。
 - 磁珠双选方案筛选的 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。
 - 添加试剂、吸弃上清过程中请勿用吸头触碰、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。

5.3.1 准备

试剂：下列试剂需自备，选用 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒，其他品牌磁珠需测试摸索条件。

表 41 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

5.3.2 磁珠双选

1. 吸取 80 μL 打断产物至新的 1.5 mL 离心管，若体积不足 80 μL ，用 TE Buffer 补足。
2. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 64 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 142 μL 上清至新的 1.5 mL 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 16 μL DNA Clean Beads 至含 142 μL 上清液的样本管中，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 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。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 30 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 产物片选后可置 -20°C 冰箱储存。

5.4 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，使用时请仔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 °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 °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。

5.4.1 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 42 DNA Adapters-16（管式）试剂使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	需至少使用 1 组 Adapter： <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	需至少使用 1 组 Adapter： <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。

样本数/lane	使用方法（举例）
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。
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。

样本数/lane	使用方法（举例）
8+x (x=1~8, 总计 9~16个)	<p>分两步操作：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 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：

- 8个样本使用 Adapter 97-104。
- 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。

5.4.2 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 43 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。
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"> 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	<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。

样本数/lane	使用方法（举例）
5	<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	<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	<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 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。 <p>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。</p>
8n+x (n=1、2 x=1~8, 总计 9~24个)	<p>分三步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>
8n+x (3≤n < 11 x=1~8, 总计 25~96个)	<p>分三步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 上述 1、2、3 每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 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。