

编号: H-940-001195-00-02



操作指南

版本: 1.0

MGIEasy Fast 酶切 Exome 建库

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。

Agilent Technologies®、ALPAQUA®、Ambion®、Axygen®、DNBSEQ™、Eppendorf®、Invitrogen®、MGISEQ™、Qubit®，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	日期	修订内容摘要
1.0	2024 年 5 月	初版发布

 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 适用测序平台	1
1.4 所需试剂	2
1.5 储存与运输	7
1.6 自备物料清单	8
1.7 注意事项	9
2 样本准备	13
2.1 样本类型	13
2.2 样本纯度及要求	13
2.3 样本起始量	13
3 文库构建标准流程	14
3.1 流程	14
3.2 试剂配制	15
3.3 DNA 酶切打断	16
3.4 打断产物片段筛选	19
3.5 接头连接	20
3.6 连接产物纯化	22
3.7 PCR	23
3.8 PCR产物纯化	24
3.9 PCR产物质检	25
3.10 杂交前准备	26
3.11 杂交捕获	28
3.12 杂交后 PCR	31
3.13 杂交后 PCR 产物纯化	32
3.14 杂交后 PCR 产物质检	33
4 环化消化	34
4.1 变性及单链环化	34
4.2 酶切消化	36
4.3 消化产物纯化	37

4.4 消化产物质检	38
5 附录	39
5.1 关于双端独立标签引物试剂盒使用说明	39

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy Fast 酶切 Exome 建库是基于华大智造 (MGI) 高通量测序平台开发的外显子捕获建库方法, 可快速将 200 ng 或 500 ng 基因组 DNA (gDNA) 制备成 MGI 高通量测序平台专用文库, 文库构建时间短。试剂盒中提供的所有试剂均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。包括:

- MGIEasy Fast 酶切文库制备试剂套装 (货号: 940-001193-00 / 940-001194-00 / 940-001196-00 / 940-001831-00)
- MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装 (货号: 940-000187-00)
- MGIEasy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒 (货号: 1000018647)
- MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒 (货号: 1000020570)

1.2 适用范围

本操作指南适用于人源样本外显子区域捕获。

1.3 适用测序平台

根据应用需求, 选择合适的 DNB 制备试剂盒、测序平台和测序类型。

测序平台及测序类型推荐:

MGISEQ-2000RS (PE100/PE150)

DNBSEQ-T7RS (PE100/PE150)

1.4 所需试剂

本操作指南需要订购的试剂包括：

- MGIEasy Fast 酶切文库制备试剂套装（货号：940-001193-00 / 940-001194-00 / 940-001196-00 / 940-001831-00）
- MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装（货号：940-000187-00）
- MGIEasy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒（货号：1000018647）
- MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒（货号：1000020570）

其中所包含的试剂盒、货号、组分信息见下表。

表 1 MGIEasy Fast酶切文库制备试剂套装 V2.0 (16 RXN) (货号：940-001193-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast酶切文库制备模块 V2.0 货号：940-001197-00	Fast FS Buffer II	 绿色	215 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	105 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	450 μL/支 × 1
	Ad Ligase	 红色	100 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	55 μL/支 × 1
	20 × Elute Enhancer	 黑色	7 μL/支 × 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	460 μL/支 × 1
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 货号：1000022800	UDB Adapter	 白色	80 μL/支 × 1
	UDB PCR Primer Mix-57-64, 89-96	 蓝色	12 μL/支 × 16
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号：940-001176-00	DNA Clean Beads	 白色	3.2 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	3.2 mL/支 × 1

表 2 MGIEasy Fast酶切文库制备试剂套装 V2.0 (96 RXN) (货号: 940-001194-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast酶切文库制备模块 V2.0 货号: 940-001195-00	Fast FS Buffer II	 绿色	1440 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	660 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	1440 μL/支 × 3
	Ad Ligase	 红色	600 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	360 μL/支 × 1
	20 x Elute Enhancer	 黑色	25 μL/支 × 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1400 μL/支 × 2
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B 货号: 1000022802	UDB Adapter	 白色	480 μL/支 × 1
	UDB PCR Primer Mix-97-192	-	12 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001174-00	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支 × 1

表 3 MGIEasy Fast酶切文库制备试剂套装C V2.0 (96 RXN) (货号: 940-001831-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast酶切文库制备模块 V2.0 货号: 940-001195-00	Fast FS Buffer II	 绿色	1440 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	660 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	1440 μL/支 × 3
	Ad Ligase	 红色	600 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	360 μL/支 × 1
	20 × Elute Enhancer	 黑色	25 μL/支 × 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1400 μL/支 × 2
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 C 货号: 940-001748-00	UDB Adapter	 白色	480 μL/支 × 1
	UDB PCR Primer Mix-193-288	-	10 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001174-00	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支 × 1

表 4 MGIEasy Fast酶切文库制备试剂套装 V2.0 (192 RXN) (货号: 940-001196-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast酶切文库制备模块 V2.0 × 2 货号: 940-001195-00	Fast FS Buffer II	 绿色	1440 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	660 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	1440 μL/支 × 3
	Ad Ligase	 红色	600 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	360 μL/支 × 1
	20 × Elute Enhancer	 黑色	25 μL/支 × 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1400 μL/支 × 2
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 A 货号: 1000022801	UDB Adapter	 白色	480 μL/支 × 1
	UDB PCR Primer Mix-01-96	-	12 μL/孔 × 96
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B 货号: 1000022802	UDB Adapter	 白色	480 μL/支 × 1
	UDB PCR Primer Mix-97-192	-	12 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 × 2 货号: 940-001174-00	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支 × 1

表 5 MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装 (16 RXN) (货号: 940-000187-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 外显子组捕获 V5探针试剂盒 货号: 1000007741	MGI Exome V5 Probe	● 黑色	80 μL/支 × 1
MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 1) 货号: 940-000168-00	Block 1	● 黄色	40 μL/支 × 1
	Block 2	● 黄色	40 μL/支 × 1
	Block 5	● 黄色	8 μL/支 × 1
	Hyb Buffer 3	● 绿色	64 μL/支 × 1
MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 2) 货号: 940-000169-00	Hyb Buffer 1	● 绿色	160 μL/支 × 1
	Hyb Buffer 2	● 绿色	7 μL/支 × 1
	Hyb Buffer 4	● 绿色	90 μL/支 × 1
	Binding Buffer	○ 白色	12800 μL/瓶 × 1
	Wash Buffer I	○ 白色	8000 μL/瓶 × 1
	Wash Buffer II	○ 白色	24000 μL/瓶 × 1

表 6 MGIEasy 双Barcode外显子组捕获辅助试剂盒 (16 RXN) (货号: 1000018647)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 双Barcode外显子组捕获辅助 试剂盒 货号: 1000018647	UDB Block 3	● 黄色	16 μL/支 × 1
	UDB Block 4	● 黄色	16 μL/支 × 1
	Post-PCR Enzyme Mix	● 蓝色	800 μL/支 × 1
	Dual Barcode PCR Primer Mix	● 蓝色	96 μL/支 × 1

表 7 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒 (16 RXN) (货号: 1000020570)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 双 Barcode 环化模块 货号: 1000018649	Dual Barcode Splint Buffer	 紫色	186 μL/支 × 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μL/支 × 1
	Digestion Buffer	 白色	23 μL/支 × 1
	Digestion Enzyme	 白色	42 μL/支 × 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	120 μL/支 × 1
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000007325	DNA Clean Beads	 白色	1600 μL/支 × 2
	TE Buffer	 白色	1600 μL/支 × 1

1.5 储存与运输

表 8 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	货号	储存温度	运输温度
MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂盒	1000007741	-80 °C	-80 °C
MGIEasy Fast 酶切文库制备模块 V2.0	940-001197-00	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy Fast 酶切文库制备模块 V2.0	940-001195-00		
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒	1000022800		
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 A	1000022801		
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B	1000022802		
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 C	940-001748-00		
MGIEasy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒	1000018647		
MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 1)	940-000168-00		
MGIEasy 双 Barcode 环化模块	1000018649		
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	940-001176-00		
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	940-001174-00		
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	1000007325		
MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 2)	940-000169-00		
		18 °C ~ 25 °C	18 °C ~ 25 °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。
- MGI Easy Fast 酶切文库制备模块 V2.0 中，20 x Elute Enhancer 和 Ligation Enhancer 首次使用后需室温储存，避免反复冻融。其中 Ligation Enhancer 需注意避光储存。

1.6 自备物料清单

表 9 设备清单

名称	推荐品牌
漩涡混匀仪	Kylin Bell (产品编号: VORTEX-5)
小型离心机	佑宁仪器 (型号: Mini-7KS)
移液器	Eppendorf Research (产品编号: 3120000216, 3120000224, 3120000232, 3120000240, 3120000259 以及 3120000267)
PCR仪	Bioer Technology (产品型号: TC-96/G/H (b) C)
DynaMag-2 磁力架	Thermo Fisher (货号: 12321D) 或同等功能仪器
96 孔板磁力架	ALPAQUA (货号: A00400)
Qubit3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher (货号: Q33216) 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (货号: G2939AA) 或同等功能仪器
浓缩仪	Eppendorf (货号: 5305000398) 或同等功能仪器

表 10 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
M-280 磁珠	Invitrogen (货号: 112.06D)
或 MyOne T1 磁珠	Invitrogen (货号: 65601)
Nuclease free water (NF water)	Ambion (货号: AM9937)
1x TE buffer, pH 8.0	Ambion (货号: AM9858)
无水乙醇 (分析纯)	西陇化工 (货号: 72188-01)
Qubit ssDNA Assay Kit	Invitrogen (货号: Q10212)
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen (货号: Q32854)
安捷伦高灵敏度DNA分析试剂盒	Agilent (货号: 5067-4626)
移液器吸头	Axygen (货号: T-300 10 μ L 短白吸头, T-200-Y 200 μ L 黄吸头以及 T-1000-B 1000 μ L 蓝吸头)
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen (货号: PCR-02-C 或 PCR-96M2-HS-C)

名称	推荐品牌
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen (货号: Q32856) 或 Axygen (货号: PCR-05-C)

1.7 注意事项

1.7.1 关于双端独立标签引物试剂盒使用说明

不同规格的MGIEasy Fast酶切文库制备试剂套装V2.0中:

- 16 RXN 搭配 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 (货号: 1000022800), 共提供16管管式引物, 可同时支持 16 个样本混合测序。
- 96 RXN 搭配 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B (货号: 1000022802), 共提供1套板式引物, 可同时支持 96 个样本混合测序。
- 96 RXN 搭配 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 C (货号: 940-001748-00), 共提供1套板式引物, 可同时支持 96 个样本混合测序。
- 192 RXN 搭配 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 A (货号: 1000022801) 和 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B (货号: 1000022802), 共提供 2 套板式引物, 可同时支持 192 个样本混合测序。

各规格搭配双端独立标签引物接头试剂盒具体 Barcode 编码及序列信息, 见附录第 39 页“关于双端独立标签引物试剂盒使用说明”。

1.7.1.1 UDB Adapter 及 UDB PCR Primer Mix 使用注意事项

- UDB Adapter 请勿置于 30 °C 以上的温度, 否则易发生解链, 影响使用效果。
- UDB Adapter 及 UDB PCR Primer Mix 使用前必须先混匀并离心, 将液体聚集于管底或板底。
- 管式 UDB PCR Primer Mix 使用时需轻柔地揭开管盖, 防止液体飞溅, 避免交叉污染, 使用完毕后及时盖上管盖;
- 板式 UDB PCR Primer Mix 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。
- 吸取不同的 UDB PCR Primer Mix 时注意更换枪头, 避免交叉污染。

1.7.1.2 UDB PCR Primer Mix 混合指南

 **提示** 在 DNBSEQ、MGISEQ 测序仪平台测序时, 每 lane 的 Barcode 需尽量保证碱基平衡。本试剂盒 Barcode 位于引物序列上, 搭配 16 管式及 96 板式双端独立标签引物接头试剂盒, 其中 16 管式、set A及set B 均由每列 8 个为一组且碱基平衡的 Barcode 组合而成, setC 第一列前 4 个Barcode及第一列后 4 个Barcode分别为一组碱基平衡的 Barcode 组合。

下面预设了不同应用场景下, 选择 Barcode 的推荐方法。

1. 当样本数据量要求相同时, 推荐按照下表选择 Barcode 进行使用。

表 11 UDB PCR Primer Mix 使用规则

pooling文库数	使用方法（举例）
4	使用UDB-193~UDB-196或UDB-197~UDB-200
5	使用 UDB-193~ UDB-196 + 使用其他任意列中任意 1 个 UDB 或使用 UDB-197~ UDB-200 + 使用其他任意列中任意 1 个 UDB
6	使用 UDB-193~ UDB-196 + 使用其他任意列中任意 2 个 UDB 或使用 UDB-197~ UDB-200 + 使用其他任意列中任意 2 个 UDB
7	使用 UDB-193~ UDB-196 + 使用其他任意列中任意 3 个 UDB 或使用 UDB-197~ UDB-200 + 使用其他任意列中任意 3 个 UDB
8	使用 X 列（任意一组）成组的 Barcode，每个样本加 1 个 Barcode
8X+1	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 1 个 Barcode
8X+2	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 2 个 Barcode
8X+3	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 3 个 Barcode
8X+4	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 4 个 Barcode
8X+5	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 5 个 Barcode
8X+6	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 6 个 Barcode
8X+7	使用 X 列成组的 Barcode+其他列任意 7 个 Barcode
备注：X为≥1的整数	

2. 如遇到特殊情况（如 1 个孔位 Barcode 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%**。

表 12 成组的 8 个 Barcode（各碱基含量符合要求）

Sample1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	A
Sample2	C	T	G	A	A	C	C	G	A	A
Sample3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample6	C	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample7	T	T	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample8	G	G	A	T	G	C	T	A	C	C
各碱基占比 (%)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0

表 13 不成组的 9 个 Barcode（各碱基含量不符合要求）

Sample1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	T
Sample2	A	C	G	A	A	G	G	T	C	C
Sample3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample6	G	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample7	T	G	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample8	G	G	A	T	G	A	T	A	C	C
Sample9	G	A	C	G	G	T	C	G	A	G
A碱基占比 (%)	33.3	33.3	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	22.2	22.2	0
T碱基占比 (%)	22.2	0	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	33.3	22.2	33.3
C碱基占比 (%)	0	33.3	33.3	22.2	22.2	0	22.2	22.2	33.3	33.3
G碱基占比 (%)	44.4	33.3	22.2	33.3	33.3	33.3	33.3	22.2	22.2	33.3

1.7.2 其他注意事项

- 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。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。
- 文库制备流程推荐根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行调整和优化。本说明书提供的实验流程是通用的，可根据需要调整反应参数，以优化性能、效率。
- 试剂套装各组分使用前提前取出，将涉及酶相关的试剂上下颠倒，轻弹底部混匀，瞬时离心后置于冰上待用。其他试剂室温解冻后涡旋充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- 配制各步骤反应液时，反应液推荐采用涡旋混匀以保证组分充分混匀。
- 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。
- 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。
- 为避免因转管操作造成建库产量的损失，磁珠纯化步骤不推荐转管操作。
- 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊。
- 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。

2 样本准备

2.1 样本类型

适用于人基因组 DNA 样本。

2.2 样本纯度及要求

推荐使用完整度较好（无明显降解）且纯度良好 ($1.8 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$, $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$) 高质量的基因组 DNA 进行打断。

由于溶解 gDNA 的 Buffer 会影响试剂盒中 Fast FS Enzyme II 的打断效果，推荐使用 TE Buffer (pH8.0) 溶解 gDNA。

- 若溶解 Buffer 为 AE Buffer (pH 8.5)，10 mM Tris (pH 6.8 ~ 8.0)，0.1 × TE (pH 8.0) 或其他 Buffer，建议进行酶切打断条件测试，通过调整 第 18 页“表 21 酶切打断反应条件（体系：60 μL）”中 30 °C 的反应时间进行测试。
- 若样本含杂质及抑制剂较多，建议将样本 DNA 用 1.8 × 体积的磁珠纯化后用 TE buffer (pH 8.0) 溶解后，通过调整第 18 页“表 21 酶切打断反应条件（体系：60 μL）”中 30 °C 的反应时间进行测试。

 提示 若样本纯度在推荐指标之外，存在文库产量偏低或者建库失败风险，影响测序结果。

2.3 样本起始量

人基因组 DNA 的起始量推荐 200 ng 或 500 ng。

3 文库构建标准流程

标准建库流程如下：

1: 打断产物片段筛选-磁珠单选：

本流程推荐使用 200 ng 人基因组 DNA，酶切打断后 0.9 X (54 μ L) 磁珠片段筛选，最终得到插入片段主带约 330 bp 的 DNA 文库，用于 PE150 测序。

2: 打断产物片段筛选-磁珠双选：

本流程推荐使用 500 ng 人基因组 DNA，酶切打断后 0.7 X + 0.2 X (42 μ L + 12 μ L) 磁珠片段筛选，最终得到插入片段主带约 300 bp 的 DNA 文库，用于 PE150 测序。

3.1 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
1	基因组 DNA 酶切打断	31 min	2 min
2	打断产物片段筛选（单、双选）	7 ~ 13 min	1 ~ 2 min
3	接头连接	12 min	2 min
4	连接产物纯化 	18 min	5 min
5	PCR 扩增	30 min	2 min
6	PCR产物纯化 	18 min	5 min
7	PCR产物质检 	4 min	2 min
8	杂交前准备	30 ~ 70 min	5 ~ 10 min
9	杂交捕获	25 h ~ 28 h	20 ~ 30 min
10	杂交后PCR	40 ~ 50 min	10 min
11	杂交后PCR产物纯化	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
12	杂交后PCR产物质检 	15 ~ 60 min	10 ~ 20 min
13	变性及单链环化	45 ~ 50 min	15 min

序号	流程	总时长	手工操作时长
14	酶切消化	35 ~ 40 min	10 min
15	消化产物纯化	50 min	10 ~ 15 min
16	消化产物质检 	15 ~ 20 min	10 ~ 15 min

-  提示
- 总时长：指样本起始量 ≥ 200 ng 时，单个反应的理论时长，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参考总时长。操作人员的熟练程度不同，手工操作实际时间会有一定波动。
 - ：停止点。

3.2 试剂配制

3.2.1 准备

表 14 试剂准备

试剂名称	要求
Nuclease-Free Water	自备物料
TE Buffer	涡旋混匀，室温暂存
20 x Elute Enhancer	首次使用后室温储存
DNA Clean Beads	涡旋混匀，离心，室温暂存

3.2.2 操作

-  提示 以下配方试剂均满足 8 个样本建库需求，若有多个样本，可按需求等比例放大配制。所配试剂 EN-TE 和 En-Beads 在 4 °C 存储 60 天内可用。

1. 配制 1 x Elute Enhancer，室温存储条件下 7 天内可用。

表 15 1 x Elute Enhancer 的配制

组分	体积
20 x Elute Enhancer	1 μ L
Nuclease-Free Water	19 μ L
Total	20 μ L

2. 配制 En-TE，4 °C 存储条件下 60 天内可用。

表 16 En-TE 的配制

组分	体积
1 x Elute Enhancer	3 μ L
TE Buffer	1497 μ L
Total	1500 μ L

3. 配制 En-Beads, 4 $^{\circ}$ C 存储条件下 60 天内可用。

表 17 En-Beads 的配制

组分	体积
1 x Elute Enhancer	10 μ L
DNA Clean Beads	990 μ L
Total	1000 μ L

3.3 DNA 酶切打断

 提示 通过控制 30 $^{\circ}$ C 反应时间来控制 DNA 片段分布，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。

3.3.1 准备

 提示 试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 18 试剂准备

试剂名称	要求
TE buffer (pH 8.0)	自备物料，室温暂存
Fast FS Buffer II	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Fast FS Enzyme II	冰上暂存
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
EN-TE	步骤 3.2.2 中配制，室温暂存
En-Beads	步骤 3.2.2 中配制，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 酶切打断

1. gDNA 样本参考下表进行均一化。根据样本浓度，取 200 ng 或 500 ng gDNA 至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE buffer (pH 8.0) 补足至总体积 45 μ L。

表 19 gDNA 的均一化

组分	单个反应体积
TE buffer (pH 8.0)	45 - X μ L
200 ng 或 500 ng gDNA	X μ L
总体积	45 μ L

 **提示** 因打断酶对 DNA 溶解液的 pH 值敏感，gDNA 溶解与 DNA 均一化应使用相同溶解液，以确保不同类型样本都在相同 pH 值环境下进行打断。

2. 提前设置PCR程序并运行第一步4°C Hold，详见第 18 页“表21酶切打断反应条件（体系：60 μ L）”。
3. 将 Fast FS Enzyme II 上下颠倒，轻弹底部混匀 10 次以上，轻弹时管底无试剂残留，瞬时离心后置于冰上备用。

 **注意** Fast FS Enzyme II 禁止涡旋，请严格按上述说明进行操作，混匀不充分将影响打断效果，使用后尽快放回冰箱储存。

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

表 20 酶切打断反应液的配制

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

5. 吸取 **15 μ L 酶切打断反应液**至均一化样本中（步骤 1，体积 45 μ L）。涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
6. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，跳过第一步（4 °C Hold），按下表开始反应。

表 21 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	16 min
65 °C	15 min
4 °C	Hold

表 22 不同起始量 gDNA 打断时间

gDNA 起始量	打断时间	打断产物片选方法
500 ng	16 min	磁珠双选
200 ng	16 min	磁珠单选

7. 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。

 注意 请勿在此处停止，继续完成打断产物片段筛选。

3.4 打断产物片段筛选

请根据第 18 页“表 22 不同起始量 gDNA 打断时间”，不同 gDNA 起始量选择合适的片段筛选方法。

3.4.1 方案一：磁珠单选

3.4.1.1 准备

表 23 试剂准备

试剂名称	要求
En-TE	步骤 3.2.2 中配制，室温暂存
En-Beads	步骤 3.2.2 中配制，提前 30 min 取出置于室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.4.1.2 磁珠单选

1. 检查 3.3.2 节步骤 7 酶切打断产物体积，若体积不足 60 μL ，用 En-TE 补足。
2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 54 μL En-Beads 至各样本管中，涡旋混匀。
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，小心吸取上清并丢弃。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。
5. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μL En-TE 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀后瞬时离心。

 注意 带磁珠进入下一步反应。请勿在此处停止，继续完成接头连接反应。

3.4.2 方案二：磁珠双选

3.4.2.1 准备

表 24 试剂准备

试剂名称	要求
En-TE	步骤 3.2.2 中配制，室温暂存
En-Beads	步骤 3.2.2 中配制，提前 30 min 取出置于室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.4.2.2 磁珠双选

1. 检查 3.3.2 节步骤 7 酶切打断产物体积，若体积不足 60 μL ，用 En-TE 补足。

2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **42 μ L En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
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，吸取上清至新的 0.2 mL PCR 管中。

 提示 此步为取上清至新的 PCR 管，切勿丢弃上清。

磁珠可保留至实验结束，若样本较珍贵，可选择回收第一轮磁珠，80%乙醇漂洗两次，晾干后 TE Buffer 洗脱，保存备份。

5. 加入 **12 μ L En-Beads** 至含有上清液的 PCR 管中，涡旋混匀。
6. 室温孵育 5 min。
7. 将 PCR 管瞬时离心，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。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。
8. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **45 μ L En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀后瞬时离心。

 注意 带磁珠进入下一步反应。请勿在此处停止，继续完成接头连接反应。

3.5 接头连接

 提示 接头为通用接头序列，不包含 Barcode 序列。

3.5.1 准备

表 25 试剂准备

试剂名称	要求
MGIEasy 系列接头试剂盒	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Fast Ligation Buffer	
Ad Ligase	涡旋混匀，离心，冰上暂存
Ligation Enhancer	涡旋混匀，离心，使用后至于室温，避光存储

-  提示
- UDB Adapter 使用前充分涡旋混匀，不可与接头连接反应液直接混合。
 - Fast Ligation Buffer 溶液较粘稠，使用前涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心。吸取时请慢吸慢放，确保加液量正确。
 - Ad Ligase 使用前涡旋混匀 2 次，每次 2 s，瞬时离心后置于冰上备用。
 - Ligation Enhancer 首次使用后，置于 10 ~ 30 °C 避光储存。

3.5.2 接头连接

1. 吸取 **5 μ L UDB Adapter** 至磁珠单选或磁珠双选产物样本管中，涡旋混匀 **3 秒**，瞬时离心。
2. 根据所需反应数，在冰上配制接头连接反应液，涡旋混匀 **3 次**，每次 **3 s**，瞬时离心后置于冰上。

表 26 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Fast Ligation Buffer	23 μ L
Ad Ligase	5 μ L
Ligation Enhancer	2 μ L
总体积	30 μ L

 提示 推荐在打断产物片段筛选等待过程中配制接头连接反应液，配制完成置于冰上，须 **30 min** 内使用。

3. 缓慢吸取 **30 μ L 接头连接反应液**至各样本管中，涡旋混匀 **2 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。

4. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 27 接头连接反应条件（体系：**80 μ L**）

温度	时间
30 $^{\circ}$ C 热盖	On
25 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 提示 若文库产量偏低，可适当延长 **25 $^{\circ}$ C** 反应时间至 **30 min**。

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。

 注意 请勿在此处停止，继续完成连接产物纯化。

3.6 连接产物纯化

3.6.1 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
En-TE	步骤 3.2.2 中配制，室温暂存
En-Beads	步骤 3.2.2 中配制，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.6.2 连接产物纯化

1. 吸取 **20 μ L En-TE** 至各样本管中（3.5.2 节步骤 5，体积 80 μ L）。
2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **28 μ L En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
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，小心吸取上清并丢弃。
5. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 **160 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。
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 PCR 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 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 μ L En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。
9. 室温孵育 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，小心吸取 **19 μ L 上清液** 至新的 0.2 mL PCR 管。

|| 停止点 连接产物纯化后，可置 -20 °C 冰箱储存。

3.7 PCR

 提示 Barcode 序列位于 Primer 序列上，操作前仔细阅读第 9 页“关于双端独立标签引物试剂盒使用说明”。

3.7.1 准备

试剂使用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 29 试剂准备

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

3.7.2 PCR

1. 吸取 25 μL PCR Enzyme Mix 至各样本管中（3.6.2 节步骤 10）。
2. 按照第 9 页“关于双端独立标签引物试剂盒使用说明”加入 6 μL 相对应的 UDB PCR Primer Mix，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

表 30 PCR 反应体系

组分	单个反应体积
3.6.2 节步骤 10 产物	19 μL
PCR Enzyme Mix	25 μL
相对应 UDB PCR Primer Mix	6 μL
总体积	50 μL

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 31 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	参照下表
60 $^{\circ}\text{C}$	15 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	/

PCR 循环数可参照下表：

表 32 1 μg PCR 产物推荐的扩增循环数

gDNA 起始量	满足1 μg 所需循环数
500 ng	5 ~ 6
200 ng	5 ~ 6

 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，会影响后续duplication、变异检出等数据性能表现。上表推荐获得 1 μg PCR 产物的扩增循环数，当基因组 DNA 质量较差、主带较长或按推荐循环数未能达到理想产量时，需适当提高循环数以获取足量产物。

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

3.8 PCR产物纯化

3.8.1 准备

表 33 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	步骤 3.2.2 中配制，室温暂存
En-Beads	步骤 3.2.2 中配制，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.8.2 PCR产物纯化

1. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **40 μL En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将 PCR 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 PCR 管固定于磁力架上，加入 **160 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 PCR 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 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。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **32 μL En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将 PCR 管瞬时离心，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 0.2 mL PCR 管。

II 停止点 PCR 产物纯化后，可置 -20 °C 冰箱储存。

3.9 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 34 PCR纯化后产物不同质检方法

质检方法	设备/试剂
双链荧光定量法	Qubit 荧光定量仪或同等功能仪器 Qubit dsDNA HS Assay Kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 等
电泳分离法	Bioanalyzer (Agilent Technologies) 或同等功能仪器 安捷伦高灵敏度DNA分析试剂盒等

通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。磁珠单选文库的片段范围为 300 ~ 2000 bp，且主峰范围为 500 ~ 750 bp，磁珠双选文库的片段范围为 300 ~ 2000 bp，且主峰范围为 400 ~ 600 bp。

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

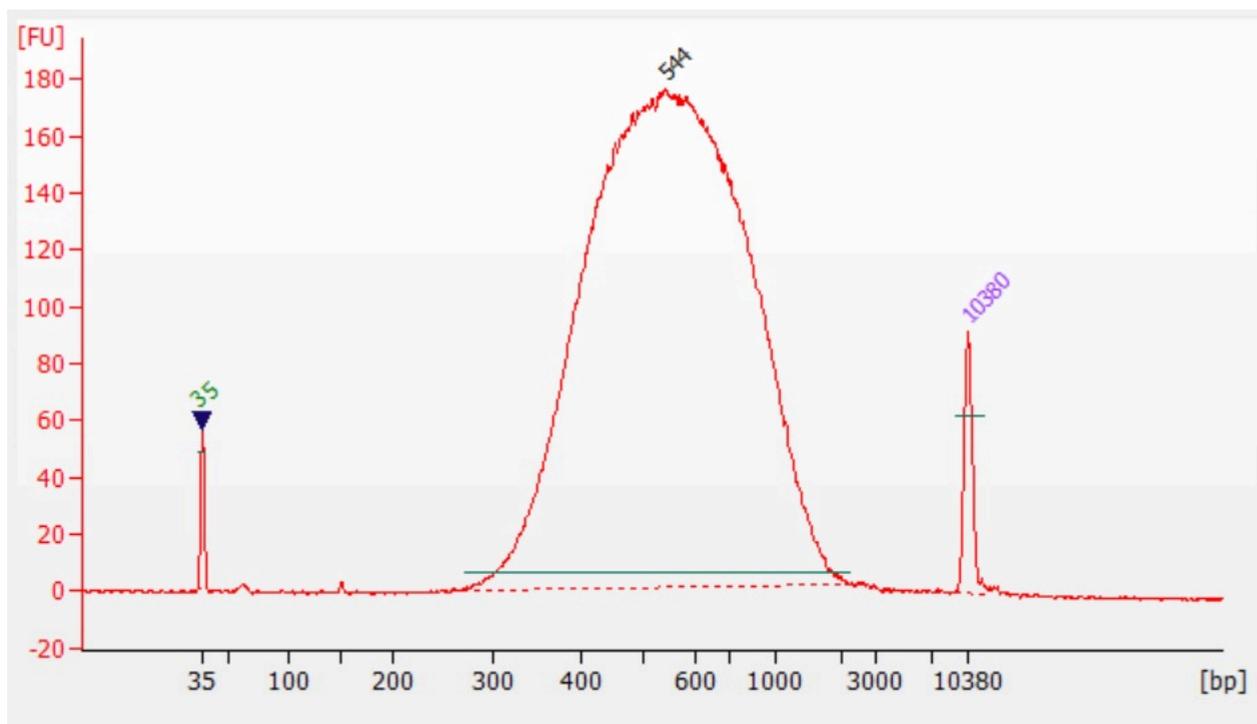


图 1 基因组起始量为 200 ng 单选的 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

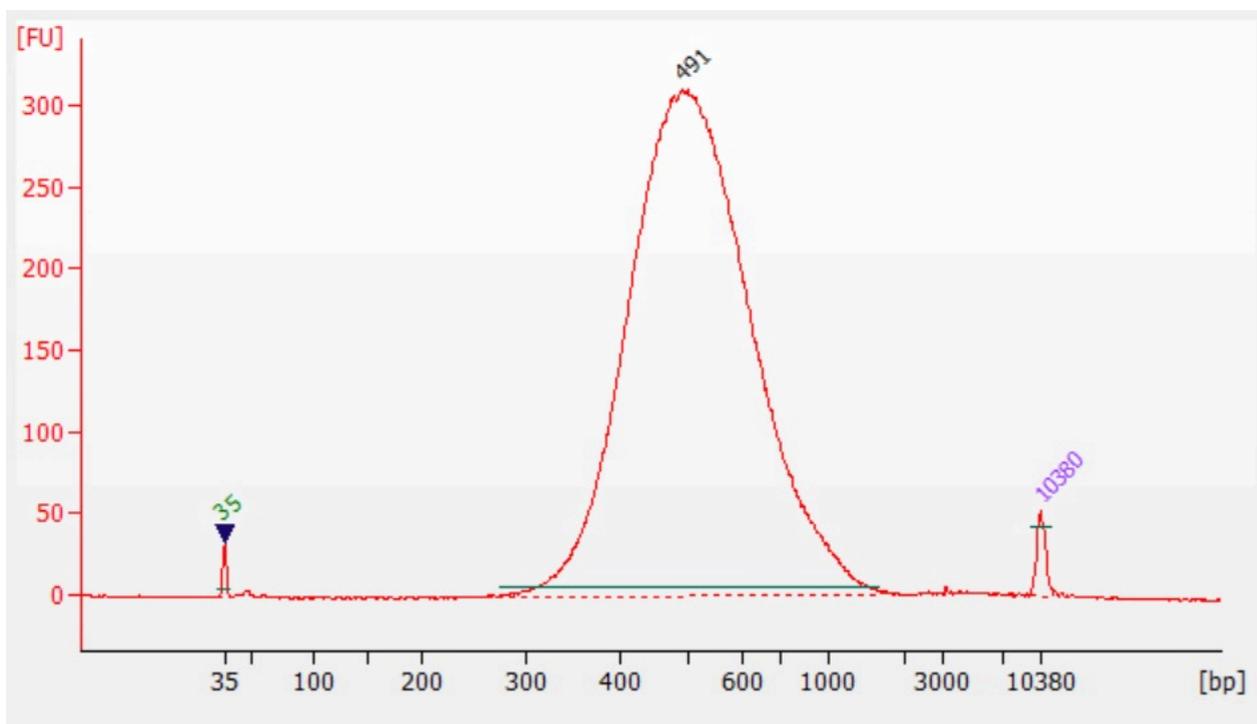


图 2 基因组起始量为 500 ng 双选的 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.10 杂交前准备

推荐使用MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装，若使用其他商业探针，则需参考其对应的杂交捕获流程，将其中针对非 MGI 高通量测序平台所用的接头封闭序列替换为本试剂盒中的 UDB Block 3 和 UDB Block 4，推荐体积和替换方案如下：

表 35 针对主流商业探针推荐 UDB Block 3 和 UDB Block 4 使用体积和替换方案

商业探针	UDB Block 3 体积 (μL)	UDB Block 4 体积 (μL)	商业探针杂交试剂盒中需替换的组分
MGI Exome V5 Probe	1	1	无
xGen® Exome Research Panel	1	1	xGen Universal Blocking Oligo (1) xGen Universal Blocking Oligo (2) xGen Universal Blocking Oligo (3)
BOKE Core Exome Panel v3.0	1	1	Universal Blocker

表 36 针对主流商业探针推荐杂交后 PCR 循环数

商业探针	杂交后 PCR 循环数
MGI Exome V5 Probe	11~13
xGen® Exome Research Panel	8~12

商业探针	杂交后 PCR 循环数
BOKE Core Exome Panel v3.0	11~13

以MGI Exome V5 Probe捕获流程为例，实验操作标准流程如下：

3.10.1 待杂交样本准备

-  提示
- 根据 PCR 产物浓度取约 1000 ng PCR 产物，若需要多样本混合杂交，每个样本至少投入 250 ng，且 $1000 \text{ ng} \leq \text{PCR 产物投入总量} \leq 4000 \text{ ng}$ ，最多支持 8 样本混合杂交（8杂推荐每个样本投入500 ng）。
 - 样本混合需参考第 9 页“UDB PCR Primer Mix 混合指南”规则设计混合方案。
 - 搭配 MGIEasy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒。

3.10.2 Block 混合液配制

取出MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒（Box 1）和 MGIEasy 双Barcode外显子组捕获辅助试剂盒，冰上融化后，混匀待用，用于-20 °C 冰箱保存。

表 37 Block 混合液的配制

组分	单个反应体积
Block 1	2.5 μL
Block 2	2.5 μL
UDB Block 3	1 μL
UDB Block 4	1 μL
Total	7 μL

3.10.3 预杂交混合液

- 用移液器吸取 7 μL 配制好的 Block 混合液加入 3.10.1 准备好的 PCR 样本中，配制成预杂交混合液，置于浓缩仪中浓缩至 9 μL 。若体积小于 9 μL ，则用 NF water 补至 9 μL 。
- 将 9 μL 预杂交混合液置于 PCR 仪上，按照下表反应条件进行预杂交。

表 38 预杂交反应条件

温度	时间
105 °C 热盖	On
95 °C	5 min
65 °C	Hold

3.11 杂交捕获

3.11.1 准备

试剂名称	要求
MGIEasy 外显子组捕获 V5探针试剂盒	MGI Exome V5 Probe 需在冰上融化，混匀待用，用完立即放回-80 °C
MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 1)	冰上融化后，混匀待用，用完于-20 °C 冰箱保存
MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 2)	室温待用，充分震荡混匀后确保液体澄清透明，方可使用
MGIEasy 双Barcode外显子组捕获辅助试剂盒	冰上融化后，混匀待用，用完于-20 °C 冰箱保存
NF water	自备物料
M-280 磁珠 (或 MyOne T1 磁珠)	自备物料，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.11.2 杂交混合液

1. 在一个新的 0.2 mL 八连管 (推荐) 中配制杂交混合液

表 39 杂交混合液的配制

试剂名称	单个反应体积
Hyb Buffer 1	10 μ L
Hyb Buffer 2	0.4 μ L
Hyb Buffer 3	4 μ L
Hyb Buffer 4	5.6 μ L
Total	20 μ L

2. 将杂交混合液涡旋混匀，瞬时离心后，置于 PCR 仪上，65 °C 孵育至少 5 min。

 注意 将杂交混合液置于 PCR 仪中 65 °C 孵育至少 5 min，透过光源观察，确认体系中无晶体沉淀才能使用。

3.11.3 探针混合液

1. 取一个新的 0.2 mL 八连管 (推荐)，在冰上配制探针混合液

表 40 探针混合液的配制（冰上配制，按顺序添加）

试剂名称	单个反应体积
NF water	1.5 μ L
Block 5	0.5 μ L
MGI Exome V5 Probe	5 μ L
Total	7 μ L

 注意 MGI Exome V5 Probe 需在冰上融化，最后加入，配制成混合液。

2. 保持探针混合液于冰上，盖紧管盖，轻弹混匀，瞬时离心后，置于 PCR 仪上，按照下表反应条件进行孵育：

表 41 探针混合液的孵育

温度	时间
105 $^{\circ}$ C 热盖	On
65 $^{\circ}$ C	2 min
65 $^{\circ}$ C	Hold

3.11.4 杂交捕获

1. 保持上述各混合液于 65 $^{\circ}$ C，迅速吸取 3.11.2 节中 13 μ L 的杂交混合液转移到 3.10.3 节 9 μ L 预杂交混合液中，用移液器吹打混匀。

 注意 该步骤推荐使用 100 μ L 带滤芯无色吸头

2. 保持各混合液于 65 $^{\circ}$ C，迅速将上一步骤的 22 μ L 液体全部转移到 3.11.3 节中的探针混合液中，用移液器吹打混匀。

 注意 该步骤推荐使用 100 μ L 带滤芯无色吸头。为了防止样本数量过多，PCR 仪开盖体积时间长，导致杂交液蒸发量较大的情况，该流程（杂交混合液 \rightarrow 预杂交混合液 \rightarrow 探针混合液）可以完成 1-2 个反应后盖好八连管管盖并盖上 PCR 仪热盖，保持 15 s 后继续。

3. 盖好八连管管盖并盖紧 PCR 仪热盖，保持 PCR 仪于 65 $^{\circ}$ C，按照下表反应条件进行杂交反应 24 h。

表 42 杂交反应条件

温度	时间
105 $^{\circ}$ C 热盖	On
65 $^{\circ}$ C	Hold

3.11.5 洗脱前准备

 提示 使用前请确认所有 Buffer 均无明显沉淀；若出现沉淀，请在使用前进行 65 °C 水浴加热 5min 至沉淀完全消失，充分震荡混匀后确保液体澄清透明，方可使用。

根据所需反应数，预热试剂。如下操作为 1 个反应所需量。

1. 提前至少 30 min 将 Thermomixer 调至 65 °C，取 1.8 mL Wash Buffer II 于 2.0 mL 离心管中，置于 Thermomixer 中预热至 65 °C。
2. 取出 M-280 磁珠（或 MyOne T1 磁珠）充分震荡混匀，用移液器吸取 50 μL M-280 磁珠（或 MyOne T1 磁珠）至新的 2.0 mL 离心管中。
3. 加入 200 μL Binding Buffer，涡旋震荡 5 s 至所有磁珠悬浮。
4. 将离心管瞬时离心，置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 3 到步骤 4 两次。
6. 加入 200 μL Binding Buffer 重悬磁珠。

3.11.6 洗脱

1. 将经 24 h 孵育后的杂交反应液，继续保持在 PCR 仪上 65 °C 孵育，使用移液器快速吸取并估计剩余杂交液体积，然后全部转移到 3.11.5 节步骤 6 中含有 200 μL 磁珠的离心管中。

 注意 若剩余体积少于 19 μL 则有杂交产量低的风险。

若进行多样本操作，为了防止样本数量过多，量取体积时间长，导致杂交液蒸发量较大的情况，可以完成 1-2 个反应后盖好八连管管盖并盖上 PCR 仪热盖，保持 15 s 后继续。

2. 将离心管置于 Nutator 或类似的装置上 360° 旋转混匀，室温旋转孵育 30 min。
3. 将样本从 Nutator 取下，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. 加入 500 μL Wash Buffer I，上下颠倒至磁珠完全混匀，室温下孵育 15 min，每隔 5min 上下颠倒混匀液体。
5. 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。
6. 吸取 500 μL Wash Buffer II（3.11.5 步骤 1，确保已 65 °C 预热）至样本管中，再置于 65 °C Thermomixer 中 1000 rpm 震荡 10 s。所有磁珠悬浮后将转速调至 0 rpm，65 °C 静置孵育 10 min。
7. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 10 s 至液体澄清，**立即**吸取上清并丢弃。
8. 重复步骤 6~7 两次。
9. 将离心管从磁力架上取下，加入 100 μL NF water 重悬磁珠，小心吸取全部液体（含磁珠）至新的 1.5 mL 离心管。
10. 将 1.5 mL 离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体完全澄清，小心吸取上清并丢弃，可用小量程的移液器重复吸取以尽量保证无液体残留。
11. 加入 44 μL NF water 重悬磁珠，小心吸取全部液体（含磁珠）至新的 0.2 mL PCR 管。

3.12 杂交后 PCR

3.12.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 43 试剂准备

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

3.12.2 杂交后 PCR

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

表 44 杂交后 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
Post-PCR Enzyme Mix	50 μ L
Dual Barcode PCR Primer Mix	6 μ L
Total	56 μ L

 提示 Post-PCR Enzyme Mix 与 Dual Barcode PCR Primer Mix 来自“MGIEasy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒”。

2. 吸取 56 μ L 杂交后 PCR 反应液至各样本管中（44 μ L 含磁珠样本），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 45 杂交后 PCR 反应条件（体系：100 μ L）

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

-  提示
- 若采用单杂，建议循环数为 13。
 - 若采用多杂且杂交投入量 > 1000 ng，可适当降低循环数至 12。

- 若采用8杂且每个样本的杂交投入量为500ng时，建议循环数为 11。
4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使反应液收集至管底。
 5. 将 PCR 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清。小心吸取 100 μ L 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

3.13 杂交后 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。

3.13.1 准备

表 46 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

3.13.2 PCR 产物纯化

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 100 μ L DNA Clean Beads 至各样本管中（3.12.2 节步骤 5），用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持样本管固定于磁力架上，加入 200 μ L 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 **提示** 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。
7. 将样本管从磁力架上取下，加入 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 0.2 mL PCR 管。

⏸ 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.14 杂交后 PCR 产物质检

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

表 47 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

- 1 pmol 不同片段大小的双链 DNA 样本分子对应不同的质量，可根据下列公式计算所需的 DNA 量及体积。

公式 1: 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

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

- 如需每个杂交后 PCR 产物样本单独环化测序，则建议最终 PCR 产物的摩尔产量 ≥ 1 pmol。
- 如需将多个杂交后 PCR 产物样本混合测序，建议根据 第 9 页“关于双端独立标签引物试剂盒使用说明”设计混合方案，在定量后进行不同 Barcode 样本混合，混合后总量为 1 pmol，总体积 $\leq 48 \mu$ L。

4 环化消化

4.1 变性及单链环化

4.1.1 准备

试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 48 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer (pH 8.0)	自备物料，室温暂存
Dual Barcode Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	冰上解冻，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

4.1.2 变性

1. 根据 PCR 产物浓度，取 1 pmol PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer (pH 8.0) 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 49 变性反应条件（体系：48 μ L）

温度	时间
100 °C 热盖	On
95 °C	3 min
4 °C	10 min

3. 反应结束后，立即将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

4.1.3 单链环化

1. 根据所需反应数，在冰上配制单链环化反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 50 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.6 μ L
DNA Rapid Ligase	0.5 μ L
总体积	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 3，48 μ L），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 51 单链环化反应条件（体系：60 μ L）

温度	时间
42 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上，进入下步反应。

4.2 酶切消化

4.2.1 准备

试剂使用前混匀离心，使用后尽快放回冰箱储存。

表 52 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	冰上解冻，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Digestion Stop Buffer	室温解冻，混匀后离心，冰上暂存

4.2.2 酶切消化

1. 根据所需反应数，在冰上配制酶切消化反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 53 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
总体积	4.0 μ L

2. 吸取 **4 μ L 酶切消化反应液**至样本管中（4.1.3 节步骤 4，60 μ L），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 54 酶切消化反应条件（体系：64 μ L）

温度	时间
42 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	10 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、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。

4.3.1 准备

表 55 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer (pH 8.0)	自备物料，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 μ L DNA Clean Beads** 至各样本管中（4.2.2 节步骤 4，体积 **71.5 μ L**），涡旋混匀。
2. 室温孵育 **10 min**。
3. 将 PCR 管瞬时离心，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 PCR 管固定于磁力架上，加入 **500 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 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。

 **提示** 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **25 μ L TE Buffer (pH 8.0)** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。
8. 室温孵育 **10 min**。
9. 将 PCR 管瞬时离心，置于磁力架上静置 **2 ~ 5 min** 至液体澄清，小心吸取 **23 μ L 上清液** 至新的 **1.5 mL** 离心管或 **0.2 mL PCR 管**。

 **停止点** 酶切消化产物纯化后，产物可置 **-20 $^{\circ}$ 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) / 杂交PCR产物投入量 (dsDNA) $\geq 7\%$ 。

5 附录

5.1 关于双端独立标签引物试剂盒使用说明

不同规格的试剂套装中：

表 56 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒说明

规格	名称	使用说明
16 RXN	MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 (货号: 1000022800)	16 管管式引物, 支持 16 个样本混合测序
96 RXN	MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B (货号: 1000022802)	提供 1 套板式引物, 支持 96 个样本混合测序
96 RXN	MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 C (货号: 940-001748-00)	提供 1 套板式引物, 支持 96 个样本混合测序
192 RXN	MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 A (货号: 1000022801) MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B (货号: 1000022802)	提供 2 套板式引物, 支持 192 个样本混合测序

- 第一组为 UDB PCR Primer Mix-57 ~ UDB PCR Primer Mix-64 (下图蓝色框)。
- 第二组为 UDB PCR Primer Mix-89 ~ UDB PCR Primer Mix-96 (下图红色框)。

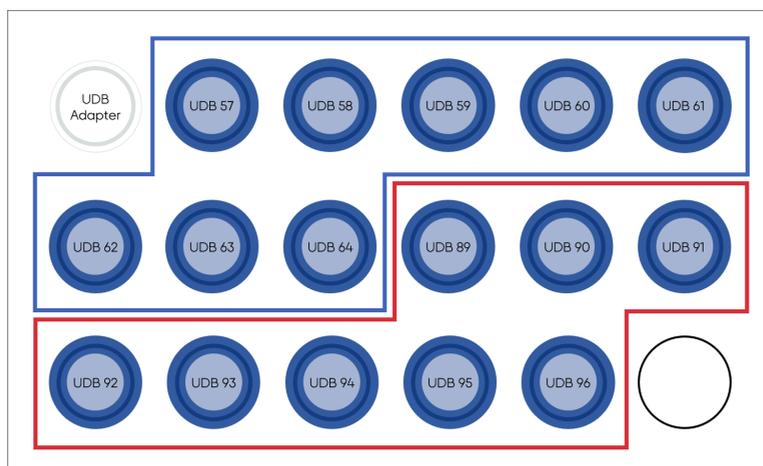


图 3 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 (16 RXN) barcode 组合孔位

板式: Set A、Set B共 2 板, 每板 96 个 UDB PCR Primer Mix。每板各 12 列。具体的排版如下:

-  提示
- set A 及 set B 均由每列 8 个为一组且碱基平衡的 Barcode 组合而成, setC 第一列前 4 个 Barcode 及第一列后 4 个 Barcode 分别为一组碱基平衡的 Barcode 组合。
 - Set A 的 8 和 12 列 Barcode 编号与 16 RXN 试剂盒存在重叠, 碱基序列相同, 不能在同一条 lane 中测序。

表 57 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 A barcode 组合孔位

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB1	UDB9	UDB17	UDB25	UDB33	UDB41	UDB49	UDB57	UDB65	UDB73	UDB81	UDB89
B	UDB2	UDB10	UDB18	UDB26	UDB34	UDB42	UDB50	UDB58	UDB66	UDB74	UDB82	UDB90
C	UDB3	UDB11	UDB19	UDB27	UDB35	UDB43	UDB51	UDB59	UDB67	UDB75	UDB83	UDB91
D	UDB4	UDB12	UDB20	UDB28	UDB36	UDB44	UDB52	UDB60	UDB68	UDB76	UDB84	UDB92
E	UDB5	UDB13	UDB21	UDB29	UDB37	UDB45	UDB53	UDB61	UDB69	UDB77	UDB85	UDB93
F	UDB6	UDB14	UDB22	UDB30	UDB38	UDB46	UDB54	UDB62	UDB70	UDB78	UDB86	UDB94
G	UDB7	UDB15	UDB23	UDB31	UDB39	UDB47	UDB55	UDB63	UDB71	UDB79	UDB87	UDB95
H	UDB8	UDB16	UDB24	UDB32	UDB40	UDB48	UDB56	UDB64	UDB72	UDB80	UDB88	UDB96

表 58 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B barcode 组合孔位

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB97	UDB105	UDB113	UDB121	UDB129	UDB137	UDB145	UDB153	UDB161	UDB169	UDB177	UDB185
B	UDB98	UDB106	UDB114	UDB122	UDB130	UDB138	UDB146	UDB154	UDB162	UDB170	UDB178	UDB186
C	UDB99	UDB107	UDB115	UDB123	UDB131	UDB139	UDB147	UDB155	UDB163	UDB171	UDB179	UDB187
D	UDB100	UDB108	UDB116	UDB124	UDB132	UDB140	UDB148	UDB156	UDB164	UDB172	UDB180	UDB188
E	UDB101	UDB109	UDB117	UDB125	UDB133	UDB141	UDB149	UDB157	UDB165	UDB173	UDB181	UDB189
F	UDB102	UDB110	UDB118	UDB126	UDB134	UDB142	UDB150	UDB158	UDB166	UDB174	UDB182	UDB190
G	UDB103	UDB111	UDB119	UDB127	UDB135	UDB143	UDB151	UDB159	UDB167	UDB175	UDB183	UDB191
H	UDB104	UDB112	UDB120	UDB128	UDB136	UDB144	UDB152	UDB160	UDB168	UDB176	UDB184	UDB192

表 59 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 C barcode 组合孔位

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB193	UDB201	UDB209	UDB217	UDB225	UDB233	UDB241	UDB249	UDB257	UDB265	UDB273	UDB281
B	UDB194	UDB202	UDB210	UDB218	UDB226	UDB234	UDB242	UDB250	UDB258	UDB266	UDB274	UDB282
C	UDB195	UDB203	UDB211	UDB219	UDB227	UDB235	UDB243	UDB251	UDB259	UDB267	UDB275	UDB283
D	UDB196	UDB204	UDB212	UDB220	UDB228	UDB236	UDB244	UDB252	UDB260	UDB268	UDB276	UDB284
E	UDB197	UDB205	UDB213	UDB221	UDB229	UDB237	UDB245	UDB253	UDB261	UDB269	UDB277	UDB285
F	UDB198	UDB206	UDB214	UDB222	UDB230	UDB238	UDB246	UDB254	UDB262	UDB270	UDB278	UDB286
G	UDB199	UDB207	UDB215	UDB223	UDB231	UDB239	UDB247	UDB255	UDB263	UDB271	UDB279	UDB287
H	UDB200	UDB208	UDB216	UDB224	UDB232	UDB240	UDB248	UDB256	UDB264	UDB272	UDB280	UDB288

 提示 如需了解具体 barcode 序列信息, 请联系 MGI 技术支持: MGI-service@mgi-tech.com。

--- 此页有意留白 ---