编号：H-1000004155

华大智造
MGI

使用说明书

版本：1.0

MGIEasy 通用文库转换试剂盒（App-A）

货号：1000004155（16 RXN）
试剂盒版本号：V1.0

创新智造
引领生命科技

仅供科研使用

关于说明书

©2023 深圳华大智造科技股份有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造科技股份有限公司（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®, Agilent Technologies™, ALPAQUA®, Ambion®, Axygen®, Advanced Analytical®, Beckman Coulter®, Invitrogen®, PerkinElmer®, Qubit®, Thermo Fisher™，以及文中涉及的其它名称及商标属于各自所有者资产。

制造商信息

生产企业	深圳华大智造科技股份有限公司
生产地址	中国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

版本记录

说明书版本	试剂盒版本	日期	修订内容摘要
1.0	V1.0	2023 年9 月	• 更新技术支持电话，更新说明书风格 • 增加 Pooling 章节，删除附录磁珠及纯化 • 修改表1规格 • 将手册编码由SOP-013-B02-067更改为H-1000004155
8.0	V1.0	2022 年 3 月	更新公司LOGO
A6	V1.0	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A5	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”
A4	V1.0	2019 年 10 月	删除 Barcode 拆分
A3	V1.0	2019 年 5 月	• 增加 MGISEQ-200RS 适配，增加第四章测序，增加 Barcode 拆分，增加附录 Sample Barcode Pooling 规则 • 在 2.1 样本要求中详细说明了线性 dsDNA 文库投入量，以及对应的总量和浓度要求 • 线性 dsDNA 文库投入量以及 AC-PCR cycles 表格删除了 75 ng 和 100 ng
A2	V1.0	2018 年 12 月	• 修改试剂盒名称和试剂名称 • 增加不同样本投入量样本浓度和总量要求表格；增加样本投入量和PCR循环数对应表格
A1	V1.0	2018 年 8 月	更改货号
A0	V1.0	2018 年 4 月	首次发布

提示　请下载最新版说明书，对照相应版本的试剂盒使用。

搜索货号或产品名，下载说明书: *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 2
1.6 自备物料清单 2
1.7 注意事项 3
1.8 流程 4

2 样本要求及处理 5

2.1 样本要求 5
2.2 样本准备 5

3 接头转换 6

3.1 接头转换 PCR 6
3.2 PCR 产物纯化 7
3.3 PCR产物质检 8
3.4 Pooling 9

4 环化消化 12

4.1 变性、单链环化 12
4.2 酶切消化 13
4.3 消化产物纯化 14
4.4 消化产物质检 15

5 附录 16

5.1 Sample barcode pooling 规则 16

---此页有意留白---

1 产品信息

1.1 产品描述

“MGIEasy 通用文库转换试剂盒（App-A）”可以实现将线性 dsDNA 文库转换成兼容华大智造测序平台矩阵式纳米芯片的单链环状 DNA 文库。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构建的稳定性和重复性。

1.2 适用范围

该试剂盒可将非 MGI 试剂盒构建的特定序列线性 dsDNA 文库转换到华大智造测序平台测序。

如需将多个线性 dsDNA 文库混合测序，建库时需按照碱基平衡原则选择 Barcode，强烈建议根据附录 sample barcode pooling规则设计混合方案。

1.3 适配测序平台

构建的文库可用于以下平台测序：

- BGISEQ-500RS
- MGISEQ-200RS
- MGISEQ-2000RS

同时搭配上述平台的高通量测序试剂套装（App-A）。

1.4 组分

本试剂盒的货号、组分信息见下表。

试剂盒中包含信息卡片，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 通用文库转换试剂盒(App-A)（16 RXN）（货号：1000004155）

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 通用文库转换试剂盒 (App-A) 货号：1000004155	AC-PCR Primer	蓝色	48 μL/支 × 1
	AC-PCR Amplification Master Mix	蓝色	400 μL/支 × 1
	App-A Splint Buffer	红色	186 μL/支 × 1
	Ligation Enzyme	红色	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

1.5 储存与运输

MGIEasy 通用文库转换试剂盒(App-A)

- 储存温度：-25 ℃ ~ -15 ℃
- 运输温度：-80 ℃ ~ -15 ℃
- 有效期：见试剂盒标签

提示 若使用干冰进行运输，请在收到货物后检查是否有剩余的干冰。
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 2 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 3 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	/

名称	推荐品牌
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 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyze	Agilent Technologies 或同等功能仪器

表 4 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 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 ℃。
- PCR产物如操作不当极容易产生气溶胶污染，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	接头转换 PCR ⏸	40 ~ 45 min	10 min
3.2	PCR产物纯化 ⏸	40 min	10 ~ 15 min
3.3	PCR产物质检 ⏸	15 ~ 60 min	10 ~ 20 min
4.1	变性及单链环化	45 ~ 50 min	15 min
4.2	酶切消化	35 ~ 40 min	10 min
4.3	消化产物纯化 ⏸	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

- 样本类型：线性 dsDNA 文库。
- 线性 dsDNA 文库插入片段范围为 100 ~ 500 bp，同时主带集中在 ± 100 bp 以内。

2.2 样本准备

- 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线性 dsDNA 文库进行定量。
- 按照线性 dsDNA 文库的总量选择合适的线性 dsDNA 文库投入量，详见下表。
  例如，线性 dsDNA 文库总量为 20 ng，则线性 dsDNA 文库投入量为 10 ng，线性 dsDNA 文库浓度的最低要求为 0.5 ng/μL。

表 5 线性 dsDNA 文库总量和浓度要求

线性 dsDNA 文库投入量（ng）	线性 dsDNA 文库总量要求（ng）	线性 dsDNA 文库浓度要求（ng/μL）
10	文库总量 ≤ 25	≥0.5
25	25 < 文库总量 ≤ 50	≥1.2
50	文库总量 > 50	≥2.3

提示 如果 PCR 循环数会影响后续数据分析，例如 InDel 分析，建议适当增加线性 dsDNA 文库投入量，并按投入量选择不同的文库转换 PCR 循环数，详见第三章表 9。

线性 dsDNA 文库体积可根据如下公式计算。

公式 1 线性 dsDNA 文库体积的计算

$$\text{线性 dsDNA 文库体积 (μL)} = \frac{\text{线性dsDNA文库投入量 (ng)}}{\text{文库浓度 (ng/μL)}}$$

3 接头转换

3.1 接头转换 PCR

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 6 试剂准备

试剂名称	要求
NF water	自备物料，常温
AC-PCR Amplification Master Mix	涡旋混匀、离心，冰上暂存
AC-PCR Primer	

3.1.2 接头转换 PCR

1. 根据线性 dsDNA 文库浓度，取适量样本至新的 0.2 mL PCR 管，用 **NF water** 补足至总体积 22 μL。
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 7 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
AC-PCR Amplification Master Mix	25 μL
AC-PCR Primer	3 μL
Total	28 μL

3. 吸取 **28 μL PCR 反应液**至各样本管中，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 8 PCR 反应条件（体系：50 μL）

温度	时间	循环数
105 ℃热盖	on	-
98 ℃	3 min	1
98 ℃	30 s	N（见表 9）
62 ℃	15 s	
72 ℃	30 s	
72 ℃	5 min	1
4 ℃	Hold	-

表 9 线性 dsDNA 文库投入量和 PCR 循环数对应关系

线性 dsDNA 文库投入量（ng）	PCR 循环数
10	10
25	8
50	5

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

停止点　PCR 产物可置 -20 ℃ 冰箱储存。

3.2 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。

3.2.1 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 10 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
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 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 Beads，吸取**60 μL Beads** 至各样本管中（3.1.2 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 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 **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
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 μL** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

   停止点 PCR 产物纯化后可置 -20 ℃ 冰箱储存。

3.3 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 11 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。

表 12 不同片段大小接头转换 PCR 产物 1 pmol 对应产量

PCR产物主片段大小（bp）	1 pmol对应产量（ng）	PCR产物主片段大小（bp）	1 pmol对应产量（ng）
150	99	350	231
200	132	400	264
250	165	450	297
300	198	500	330

- 如在一条 lane 上只测 1 个样本，可直接进行环化消化反应。
- 如需将多个接头转换 PCR 产物混合测序，详见第 9 页“Pooling”。

3.4 Pooling

注意 不同片段长度的文库不建议 pooling 测序。

不同 barcode 样本可在三个阶段进行 pooling：PCR 纯化产物（dsDNA）pooling、单链环状 DNA 文库（ssCir，ssDNA，环化消化产物）pooling、DNB pooling。除特别声明，客户可根据需要在三个阶段中选择一个阶段进行多样本 pooling。

下述方法适用于 PCR 纯化产物的 pooling。其他阶段的样本 pooling 方法，请参考 MGI 相关建库试剂、高通量测序试剂或 MGI 测序仪使用说明。

- PCR 纯化产物 pooling

提示 Pooling 前建议参考第 16 页“Sample barcode pooling 规则” 设计混合方案。

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 μL。

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 2、3 计算混合前单个样本所需质量，参考公式 4 计算混合前单个样本所需体积。

公式 2 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

$$1\ \text{pmol PCR 产物对应的质量(ng)} = \frac{\text{PCR产物主带大小 (bp)}}{1000\ \text{bp}} \times 660\ \text{ng}$$

公式 3 混合前单个样本所需质量计算

单个样本所需质量 (ng) = 1 pmol PCR 产物对应的质量 (ng) × 单个样本数据量占比 (%)

公式 4 混合前单个样本所需体积计算

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

例如：计划将 4 个(插入片段长度均为 300 bp) 文库混合测序，1 pmol PCR 产物对应的产量约为 198 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 3 计算每个样本的 PCR 产物需取 198 ng × 25% = 49.5 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 3 计算样本 1 所需质量为 39.6 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 4 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。

提示 A、B、C、D 体积均需大于 1 μL。

表 13 多样本混合测序

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) μL
Total	48 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 14 待混合测序样本体积放大 Z 倍

名称	体积
样本 1	A × Z μL
样本 2	B × Z μL
样本 3	C × Z μL
样本 4	D × Z μL
Total	W μL

表 15 方案一：多样本混合测序

名称	体积
放大 Z 倍后混合样本	(W ÷ Z) μL
TE Buffer	48 - (W ÷ Z) μL
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 4 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 16 稀释高浓度样本 Y 倍

名称	体积
样本 3	建议 ≥ 5 μL
TE Buffer	5Y - 5 μL
Total	5Y μL

提示 高浓度样本稀释时，建议取样体积 ≥ 5 μL。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 17 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 μL
Total	48 μL

4 环化消化

4.1 变性、单链环化

提示 根据纯化后 PCR 产物的主带分布，样本浓度，参考公式 2、公式 4 计算所需 PCR 纯化产物体积。

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 18 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	自备物料，室温
APP-A Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	轻弹底部混匀、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 μL。
2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 19 变性反应条件（体系：48 μL）

温度	时间
105 ℃ 热盖	On
95 ℃	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 20 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
APP-A Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12.1 μL

2. 吸取 **12.1 μL 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 21 单链环化反应条件（体系：60.1 μL）

温度	时间
45 ℃热盖	On
37 ℃	30 min
4 ℃	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 22 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 23 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 24 酶切消化反应条件（体系：64.1 μL）

温度	时间
45 ℃ 热盖	On
37 ℃	30 min
4 ℃	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、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

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

表 25 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
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 Beads，吸取**170 μL 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。或涡旋混匀。
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，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 **27 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 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 **25 μL** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

   停止点 酶切消化产物纯化后可置 -20 ℃ 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。

- 要求最终产物摩尔产量 ≥60 fmol，环化效率应至少为 5%。

可根据公式计算 60 fmol 单链环状 DNA 对应的质量。或参考表格。

公式 5 单链环 fmol 与 ng 间的换算

$$60\ \text{fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.06 \times \frac{\text{PCR产物主带大小 (bp)}}{1000\ \text{bp}} \times 330\ \text{ng}$$

表 26 不同 PCR 产物片段大小对应 60 fmol 单链环产量

PCR产物主片段大小（bp）	60 fmol 对应产量（ng）	PCR产物主片段大小（bp）	60 fmol 对应产量（ng）
150	3	350	7
200	4	400	8
250	5	450	9
300	6	500	10

5 附录

5.1 Sample barcode pooling 规则

- 如需将接头转换 PCR 产物混合测序，则 sample barcode pooling 应遵循碱基平衡的原则。
- 以 8 bp Barcode 为例，Barcode 的 1-8 bp 碱基，每 bp ATGC 4 种碱基的占比应分别为 25%，见下表。

表 27 Sample barcode pooling 规则示例表

Barcode	序列	1	2	3	4	5	6	7	8
Example 1	TAGGTCCG	T	A	G	G	T	C	C	G
Example 2	GGACGGAA	G	G	A	C	G	G	A	A
Example 3	CTTACTGC	C	T	T	A	C	T	G	C
Example 4	ACCTAATT	A	C	C	T	A	A	T	T
Barcode 1-8 bp A 碱基占比		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Barcode 1-8 bp T 碱基占比		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Barcode 1-8 bp G 碱基占比		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Barcode 1-8 bp C 碱基占比		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

- 如果不能达到 25%，则要保证每个 cycle 都存在 ATGC 四种碱基序列，且最少的碱基不应低于 12.5%，最多的碱基不应高于 62.5%。
- 如果超出 12.5%-62.5% 这个范围，可能因为碱基平衡问题导致测序质量下降或不能拆分。