

# MGIEasy

## 通用 DNA 文库制备试剂套装使用说明书

---

货号: 1000006985, 1000006986, 1000017571

试剂盒版本号: V1.0

说明书版本号: A4

## 版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
A4	V1.0	2021 年 1 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>更新公司联系信息</li> </ul>
A3	V1.0	2020 年 7 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”</li> </ul>
A2	V1.0	2019 年 9 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>1.4 增加新套装货号及试剂盒组分</li> </ul>
A1	V1.0	2018 年 12 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>增加 3.7-3.11 步骤</li> </ul>
A0	V1.0	2018 年 6 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>首次发布</li> </ul>

提示：请下载最新版说明书，对照相应版本的试剂盒使用。

搜索货号或产品名，下载说明书: [www.mgi-tech.com/download/files](http://www.mgi-tech.com/download/files)

# 目录

第一章 产品信息	1
1.1 产品描述	1
1.2 适用范围	1
1.3 适配测序平台	1
1.4 试剂盒组分	2
1.5 试剂盒储存条件及有效期	5
1.6 客户自备物料清单	6
1.7 注意事项	7
第二章 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 的定量和质控	9
第三章 文库构建标准流程	10
3.1 末端修复&添加 dA 尾	10
3.2 接头连接	11
3.3 连接产物纯化	12
3.4 PCR 扩增	12
3.5 PCR 产物纯化	13
3.6 PCR 产物质检	14
3.7 变性	15
3.8 单链环化	16
3.9 酶切消化	16
3.10 酶切消化产物纯化	17
3.11 酶切消化产物质检	18
附录	19
附录 A 打断条件	19
附录 B 关于磁珠及纯化	21
附录 C 磁珠片段筛选步骤	22
附录 D 关于 Adapter 使用	23
附录 E 关于 PCR 扩增	28
附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算	28

# 第一章 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

构建的文库可使用以下平台及测序类型测序：

BGISEQ-500RS (PE50/PE100/PE150)

MGISEQ-2000RS (PE100/PE150)

MGISEQ-200RS (PE100)

## 1.4 试剂盒组分

通用 DNA 文库制备试剂套装有 3 个规格，分别是 1 个 16 RXN 和 2 个 96 RXN。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、组分信息如下：

表 1 MGEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装（货号：1000006985）

试剂盒种类与储存温度	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGEasy 通用 DNA 文库 制备试剂盒 货号：1000005248 规格：16 RXN	ERAT Buffer	橙色	114 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	47 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Ligation Buffer	红色	375 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Ligase	红色	26 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	400 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Primer Mix	蓝色	96 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
MGEasy DNA Adapters- 16 (管式) 试剂盒 货号：1000005284 规格：16 $\times$ 10 $\mu$ L	DNA Adapters	白色	10 $\mu$ L/支 $\times$ 16 支
MGEasy 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 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 $\times$ 1 支
MGEasy 环化模块 货号：1000005260 规格：16 RXN	Splint Buffer	紫色	186 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

表 2 MGEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000006986)

试剂盒种类与储存温度	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGEasy 通用 DNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005250 规格: 96 RXN	ERAT Buffer	橙色	682 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	279 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Ligation Buffer	红色	1124 $\mu$ L/支 $\times$ 2 支
	DNA Ligase	红色	154 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	1200 $\mu$ L/支 $\times$ 2 支
	PCR Primer Mix	蓝色	576 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
MGEasy DNA Adapters-96			
(板式) 试剂盒 货号: 1000005282 规格: 96 $\times$ 10 $\mu$ L	DNA Adapters	—	10 $\mu$ L/孔 $\times$ 96 孔
MGEasy 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 支
MGEasy 环化模块 货号: 1000005260 规格: 16 RXN	TE Buffer	白色	25 mL/支 $\times$ 1 支
	Splint Buffer	紫色	186 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

表 3 MGEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装 (货号: 1000017571)

试剂盒种类与储存温度	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGEasy 通用 DNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005250 规格: 96 RXN	ERAT Buffer	橙色	682 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	279 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Ligation Buffer	红色	1124 $\mu$ L/支 $\times$ 2 支
	DNA Ligase	红色	154 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	1200 $\mu$ L/支 $\times$ 2 支
	PCR Primer Mix	蓝色	576 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
MGEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282 规格: 96 $\times$ 10 $\mu$ L			
	DNA Adapters	—	10 $\mu$ L/孔 $\times$ 96 孔
MGEasy 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 支
MGEasy 环化模块 货号: 1000017573 规格: 96 RXN	TE Buffer	白色	25 mL/支 $\times$ 1 支
	Splint Buffer	紫色	1114 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	48 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Buffer	白色	135 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Enzyme	白色	250 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	720 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

## 1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂盒

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -18^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA Adapters 试剂盒

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -18^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA 纯化磁珠

- 储存温度:  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 冰袋运输

MGIEasy 环化模块

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -18^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

\*干冰运输, 请注意检查收到产品时是否有干冰剩余

\*当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性



## 1.6 客户自备物料清单

表 4 客户自备物料清单

仪器	Covaris 打断仪 漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 磁力架 ( ThermoFisher, Cat. No. 12321D ) Qubit® 3.0 荧光定量仪 ( ThermoFisher, Cat. No. Q33216 ) Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA)
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 无水乙醇, 100% 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 ) 安捷伦 DNA 分析试剂盒 ( Agilent, Cat. No. 5067-1504 )
耗材	Covaris 打断管/板 移液器吸头 1.5 mL 离心管 ( Axygen, Cat. No. MCT-150-C ) 0.2 mL PCR 管 ( Axygen, Cat. No. PCR-02-C ) 或 96 孔板 ( Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C ) Qubit® Assay Tubes ( Invitrogen, Cat. No. Q32856 ) 或 0.5mL 透明薄壁管 ( Axygen, Cat. No. PCR-05-C )

## 1.7 注意事项

- ◆ 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- ◆ 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Enzyme瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- ◆ 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样品时请更换吸头。
- ◆ 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应，使用前应预热PCR仪至反应温度附近。
- ◆ PCR产物因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，我们推荐将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；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
- ◆ 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- ◆ 若您有其他疑问，请联系MGI技术支持：[MGI-service@mgi-tech.com](mailto:MGI-service@mgi-tech.com)

## 第二章 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，A260/A280=1.8 ~ 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~180 bp，PE100 推荐主带~280 bp，PE150 推荐主带~420 bp。
- 附录 A 列举各 Covaris 型号 55  $\mu\text{L}$  打断条件参数。若需要其他体积（15  $\mu\text{L}$ 、130  $\mu\text{L}$  或 200  $\mu\text{L}$  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，摸索最适打断条件后，方可正式开始打断。

#### 2.2.2 片段筛选

- 打断后 DNA 分布范围较宽，通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。推荐使用磁珠片段筛选方案（如表 5），也可通过切胶纯化的方式进行片段筛选。

表 5 100  $\mu\text{L}$  样本用不同磁珠体积片段筛选的理论 DNA 主带

主带片段 (bp)	180	230	280	335	420
第一轮 ( $\mu\text{L}$ )	100	90	80	70	60
第二轮 ( $\mu\text{L}$ )	50	20	20	20	20

- 磁珠片段筛选具体操作可参考附录 B，提供了 500 ng gDNA 打断后（体积为 80  $\mu\text{L}$ ），在末端修复之前进行 64  $\mu\text{L}$ +16  $\mu\text{L}$  磁珠片段筛选的详细步骤，最终得到主带 280 bp 的目的片段。
- 进行磁珠片段筛选，DNA 损失量约为 60% ~ 95%。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。

## 2.3 样本 DNA 的定量和质控

- 样本 DNA 指投入末端修复步骤中的 DNA 量，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 5）。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，针对 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。注意：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。

## 第三章 文库构建标准流程

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  $\mu\text{L}$ ，使用 64  $\mu\text{L}$  +16  $\mu\text{L}$  磁珠片段筛选，得到 50 ng 主带为 280bp 的样本 DNA。

若样本 DNA 量不同，样本 DNA 主带不同，请根据 2.1 样本要求中表 5、附录 D 中表 20 以及附录 E 中表 23 对实验细节进行调整。

### 3.1 末端修复&添加 dA 尾

3.1.1 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 补充至总体积 40  $\mu\text{L}$ 。

3.1.2 在冰上配制末端修复反应液（见表 6）：

表 6 末端修复反应&添加 dA 尾反应液的配制

组分	体积
ERAT Buffer	7.1 $\mu\text{L}$
ERAT Enzyme Mix	2.9 $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

3.1.3 用移液器吸取 10  $\mu\text{L}$  配制好的末端修复反应液加入步骤 3.1.1 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.4 将步骤 3.1.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 7 中的条件进行反应：

表 7 末端修复反应&添加 dA 尾反应条件

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

3.1.5 瞬时离心将反应液收集至管底。



**注意：**不建议在此处停止，请继续做步骤 3.2。如果必须停止，末端修复产物可以放在 -20°C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20% 左右。

### 3.2 接头连接



**注意：**操作前请仔细阅读附录 D。

3.2.1 参照 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则（参见附录 D），在步骤 3.1.5 的 PCR 管中加入 5  $\mu\text{L}$  对应的 MGIEasy DNA Adapters，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.2 在冰上配制接头连接反应液（见表 8）：

表 8 接头连接反应液的配制

组分	体积
Ligation Buffer	23.4 $\mu\text{L}$
DNA Ligase	1.6 $\mu\text{L}$
Total	25 $\mu\text{L}$

3.2.3 用移液器缓慢吸取 25  $\mu\text{L}$  配制好的接头连接反应液加入步骤 3.2.1 的 PCR 管中，涡旋震荡 6 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。



**注意：**接头连接反应液较粘稠，操作时请慢慢放，确保加液量正确；涡旋震荡多次确保完全混匀。

3.2.4 将步骤 3.2.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 9 中的条件进行反应：

表 9 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	On
23°C	30 min
4°C	Hold

3.2.5 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.6 加入 20  $\mu\text{L}$  TE Buffer 至总体积 100  $\mu\text{L}$ ，全部转移到新的 1.5 mL 离心管中。



**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



**注意：**操作前请仔细阅读附录 B。

- 3.3.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.3.2 用移液器吸取 50  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.2.6 中的接头连接产物中，并轻轻吸打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
- 3.3.3 室温孵育 5 min。
- 3.3.4 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.3.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 3.3.6 重复步骤 3.3.5，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.3.7 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.3.8 将离心管从磁力架上取下，加入 40  $\mu$ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀。



**注意：**当样本 DNA=50 ng，连接产物纯化时洗脱 40  $\mu$ L TE Buffer，取 19  $\mu$ L 进行 PCR。

当样本 DNA< 50 ng，推荐连接产物纯化时洗脱 21  $\mu$ L TE Buffer，取 19  $\mu$ L 进行 PCR。

- 3.3.9 室温下孵育 5 min。
- 3.3.10 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 38  $\mu$ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。



**停止点：**连接产物纯化后，可置-20℃冰箱储存。

### 3.4 PCR 扩增



**注意：**操作前请仔细阅读附件 E。

- 3.4.1 取 19  $\mu$ L 步骤 3.3.10 的连接纯化后产物于新的 0.2 mL PCR 管中。
- 3.4.2 在冰上配制 PCR 反应液（见表 10）：

表 10 PCR 扩增反应液的配制

组分	体积
PCR Enzyme Mix	25 $\mu\text{L}$
PCR Primer Mix	6 $\mu\text{L}$
Total	31 $\mu\text{L}$

3.4.3 用移液器吸取 31  $\mu\text{L}$  配制好的 PCR 反应液加入步骤 3.4.1 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.4.4 将步骤 3.4.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 11 的条件进行 PCR 反应：

表 11 PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
95°C	3 min	1 循环
98°C	20 s	
60°C	15 s	7 循环
72°C	30 s	
72°C	10 min	1 循环
4°C	Hold	

3.4.5 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.4.6 吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

### 3.5 PCR 产物纯化



**注意：操作前请仔细阅读附录 B。**

3.5.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.5.2 吸取 50  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至步骤 3.4.6 的 50  $\mu\text{L}$  PCR 产物中，用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。

3.5.3 室温孵育 5 min。

3.5.4 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.5.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。

3.5.6 重复步骤 3.5.5，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。

3.5.7 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.5.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀。

3.5.9 室温下孵育 5 min。

3.5.10 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，将 30  $\mu\text{L}$  上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ **停止点：PCR 纯化后产物，可置 -20°C 冰箱储存。**

### 3.6 PCR 产物质检

3.6.1 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对 PCR 纯化后产物进行定量。要求最终 PCR 产物的摩尔产量  $\geq 1$  pmol，不同片段大小的 PCR 产物对应的产量请参考表 12，或参考附录 F 的公式 1 进行计算。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（见附录 D），在定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，总体积  $\leq 48$   $\mu\text{L}$ 。

表 12 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	170
230	314	210
280	364	240
335	419	280
420	504	330

3.6.2 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies); LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer); Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。图 1 为标准实验流程 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果：

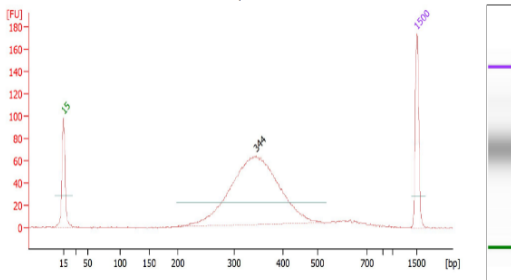


图 1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果 (280bp 主带样本 DNA)

图2为使用50 ng 420bp主带的样本DNA，根据标准实验流程的PCR纯化产物Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果：

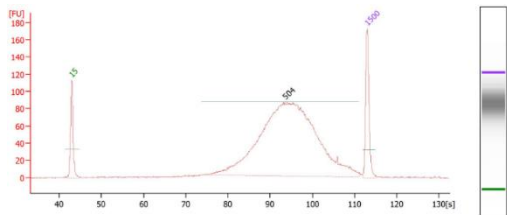


图 2 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果 (420bp 主带样本 DNA)

### 3.7 变性



**注意：操作前请仔细阅读附录 F。**

3.7.1 根据 PCR 产物的主片段分布，参考表 12 或附录 F 的公式 1，取 1 pmol PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48  $\mu$ L。

3.7.2 将步骤 3.7.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 13 的条件进行反应：

表 13 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	3 min

3.7.3 反应结束后，立即将 PCR 管转移到冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

### 3.8 单链环化

3.8.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 14）：

表 14 单链环化反应液的配制

组分	体积
Splint Buffer	11.6 $\mu\text{L}$
DNA Rapid Ligase	0.5 $\mu\text{L}$
Total	12.1 $\mu\text{L}$

3.8.2 用移液器吸取 12.1  $\mu\text{L}$  配制好的单链环化反应液加入步骤 3.7.3 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.8.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 15 的条件进行反应：

表 15 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.8.4 反应结束后，瞬时离心，将 PCR 管转移到冰上，立即进入下一步反应。

### 3.9 酶切消化

3.9.1 在步骤 3.8.3 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液(见表 16)：

表 16 酶切消化反应液的配制

组分	体积
Digestion Buffer	1.4 $\mu\text{L}$
Digestion Enzyme	2.6 $\mu\text{L}$
Total	4.0 $\mu\text{L}$

3.9.2 用移液器吸取 4  $\mu\text{L}$  配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.8.4 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次

3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.3 将步骤 3.9.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 17 的条件进行反应:

表 17 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.9.4 反应结束后, 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.5 向 PCR 管中加入 7.5  $\mu$ L Digestion Stop Buffer, 涡旋震荡 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底, 吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

### 3.10 酶切消化产物纯化



**注意: 操作前请仔细阅读附录 B。**

3.10.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温, 使用前充分震荡混匀。

3.10.2 吸取 170  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.9.5 的酶切消化产物中, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀, 最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。

3.10.3 室温孵育 10 min。

3.10.4 瞬时离心, 将离心管置于磁力架, 静置 2-5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.10.5 保持离心管置于磁力架上, 加入 500  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。

3.10.6 重复步骤 3.10.5, 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, 用小量程的移液器将管底液体吸干。

3.10.7 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.10.8 将离心管从磁力架上取下, 加入 22  $\mu$ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀。

3.10.9 室温下孵育 10 min。

3.10.10 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 将 20  $\mu$ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ **停止点: 酶切消化纯化后产物, 可置-20°C 冰箱储存。**

### 3.11 酶切消化产物质检

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 240 ng 进行环化，其酶切消化产物产量应达到 16.8 ng 以上。

表 18 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)
250	334	$\geq 15.4$
280	364	$\geq 16.8$
300	384	$\geq 17.5$

## 附录

### 附录 A 打断条件

以下摘自 Covaris 官网各型号 55  $\mu\text{L}$  打断条件，仅供参考。

请根据具体参数，将基因组 DNA 打断至 100–700 bp 之间，主带约为 250–300 bp

表 19 Covaris S220 将样本 DNA(55  $\mu\text{L}$ )打断成 150–550 bp 的反应条件


	Vessel	microTUBE-50 AFA Fiber-Screw-Cap (PN 520166) 						
	Sample Volume	55 $\mu\text{L}$						
S220	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 20 Covaris 不同型号仪器将样本 DNA(55  $\mu\text{L}$ )打断成 150–550 bp 的反应条件

	Vessel	MicroTUBE-50 Screw-Cap (PN 520166) 	8 microTUBE-50 AFA Fiber Strip V2 (PN 520174) 	96 microTUBE-50 AFA Fiber Plate (PN 520168) 
	Sample Volume	55 $\mu$ L		
E220	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 evoluti on	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 (*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)	
Screw -Cap	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
	Peak Incident Power (W)	100	75	75	75	75	75	30
	Duty Factor	30%	20%	20%	20%	20%	10%	10%
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
8- Strip	Treatment Time (s)	130	95	62	40	30	50	70
	Peak Incident Power (W)	75	75	75	75	75	75	50
	Duty Factor	15%	15%	20%	20%	20%	10%	10%
	Cycles per Burst	500	500	1000	1000	1000	1000	1000
Plate	Treatment Time (s)	360	155	75	45	35	52	50
	Peak Incident Power (W)	100	100	75	75	75	75	75
	Duty Factor	30%	30%	20%	20%	20%	10%	10%
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	145	90	70	49	34	50	32

## 附录 B 关于磁珠及纯化

本试剂盒推荐使用套装内的 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 (MGI, Cat. No.1000005278 或 1000005279) 的 DNA Clean Beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他来源磁珠, 纯化条件需要重新摸索。

### 磁珠使用前注意事项

- 磁珠使用前, 提前 30 min 从 4°C 取出, 涡旋混匀且置于室温, 使其平衡至室温, 有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前, 需振荡或用移液器上下吸打, 确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化到的 DNA 片段的下限长度。用量越高, 可纯化的 DNA 片段的下限越小。

### 磁珠操作注意事项

- 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发, 应用 TE Buffer 补齐体积, 再用推荐磁珠用量进行纯化。
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 一般需要 2-3 min。但由于磁力架吸力不同等原因, 推荐分离时间有时可能需要延长, 以液体彻底澄清为准。
- 磁珠与液体分离时, 注意吸头不可碰到磁珠, 最后可余留 2-3  $\mu$ L 液体, 避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠, 可将磁珠与液体全部打回管内, 再次分离后再吸取上清。
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80%乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架中, 移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作, 请勿吸打、搅动磁珠。
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体, 有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程的移液器把管底液体吸干。
- 两次乙醇漂洗后, 应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分 (磁珠表面反光) 容易造成无水乙醇残留影响后续反应, 过分干燥 (磁珠开裂) 又会降低纯化得率。通常情况下, 室温干燥需要 5-10 min, 但由于室内温度和湿度的差异, 干燥时间可能会不同, 应随时观察, 磁珠表面无反光, 即可进行产物洗脱, 可用试剂盒附带的 TE Buffer 进行洗脱。
- 洗脱后吸取上清时, 切忌触碰磁珠, 若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应, 所以, 洗脱体积应该比最终吸取上清的体积多 2  $\mu$ L。
- 在 1.5 mL 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, 然后开盖。



## 附录 C 磁珠片段筛选步骤

本案例采用 64  $\mu\text{L}$  + 16  $\mu\text{L}$  磁珠对打断后产物 (80  $\mu\text{L}$ ) 进行磁珠片段筛选, 最终得到主带为 280 bp 的 Input DNA。

若需要筛选其它片段主带, 请根据第二章的表 5 选择合适的磁珠片段筛选条件。

具体步骤如下:

1. 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温, 使用前充分震荡混匀。
2. 吸取所有打断产物至新的 1.5 mL EP 管中, 若体积不足 80  $\mu\text{L}$ , 用 TE Buffer 补足。
3. 吸取 64  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至含有 80  $\mu\text{L}$  打断产物的离心管中, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀, 最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 EP 管中。
4. 室温孵育 5 min。
5. 瞬时离心, 将 EP 管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 吸取上清至新的 1.5 mL EP 管中。



**注意: 此步保留上清, 丢弃磁珠。**

6. 吸取 16  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至 144  $\mu\text{L}$  上清管中, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀。
7. 室温孵育 5 min。
8. 瞬时离心, 将 EP 管置于磁力架, 静置 2-5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取并丢弃上清。
9. 保持 EP 管置于磁力架上, 加入 200  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁, 小心吸取并丢弃上清。
10. 重复步骤 9, 尽量吸干管内液体。
11. 保持 EP 管固定于磁力架上, 打开 EP 管管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。
12. 将 EP 管从磁力架上取下, 加入 32  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至完全混匀。
13. 室温孵育 5 min。
14. 瞬时离心, 将 EP 管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 将 30  $\mu\text{L}$  上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中。

## 附录 D 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，使用时请仔细阅读附录 D-1 和 D-2 的使用规则。同时，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。
- 请勿将其置于室温以上的温度，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，用吸水纸擦拭干净管盖或铝箔表面；对于管式 Adapters 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；对于板式 Adapters，第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝箔膜直接吸取液体，使用过程中注意更换吸头，避免污染，使用完毕后，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序号为 501-596 的接头，由于设计工艺不同，禁止混用，否则数据无法拆分。
- Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请按照表 21 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 21 不同样本 DNA 量（280 bp）推荐 Adapter 使用量

样本 DNA (ng)	MGI Adapter	MGI Adapter
	稀释倍数	稀释后投入量 (μL)
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 ≤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）。

## D-1 MGIEasy DNA Adapters-16（管式）试剂盒使用规则

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：

表 22 MGIEasy DNA Adapters-16（管式）试剂盒使用规则

样本数 /lane	使用方法（举例）
1	需至少使用 1 组 Adapter： 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中 或 2、加一组 8 Adapter（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： 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如 01-04，将 01 和 02 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 03 和 04 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中） 或 2、加一组 8 Adapter（97-104），每个编号 Adapter 取等体积，每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix，形成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如将 97-100 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 101-104 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中）
3	需至少使用 2 组 Adapter： 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，注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter
4	需至少使用 1 组 Adapter： 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入 4 个样本中（如 01-04，将 01、02、03、04 分别依次加样本 1、2、3、4 中） 或 2、加一组 8 Adapter（97-104），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 4 份等体积 mix，分别加入 4 个样本中（如将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix 后，分别依次加入样本 1、2、3、4 中）
5	需至少使用 2 组 Adapter： 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，注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter

6	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <p>样本 1-4 采用上述 ( 4 样本数/lane ) 方法加一组 Adapter, 样本 5-6 采用上述 ( 2 样本数/lane ) 方法加一组 Adapter, 注意样本 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> <p>1) 样本 1-4 采用上述 ( 4 样本数/lane ) 方法加一组 Adapter,</p> <p>2) 样本 5-6 采用上述 ( 2 样本数/lane ) 方法加一组 Adapter,</p> <p>3) 样本 7, 使用剩余的一组 Adapter, 可以加该组内一个单 Adapter, 或者加组内所有编号 Adapter 取等体积混合成的 Adapter mix</p> <p>注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter</p>
8	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <p>1、加一组 8 Adapter ( 97-104 ), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本</p> <p>或 2、选取两组 4 Adapter ( 01-04 和 13-16 ), 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本加 1 个 Adapter</p>

- 当样本数据量要求不相同时, 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。

## D-2 MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒使用规则

- 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：

	或 2、加一组 8 Adapter (如 41-48), 每个编号 Adapter 取等体积, 每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix, 形成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如 41-48, 将 41-44 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 45-48 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中)。
3	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, 注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入 4 个样本中 (如 01-04, 将 01、02、03、04 分别依次加样本 1、2、3、4 中); 或 2、加一组 8 Adapter (如 41-48), 每个编号 Adapter 取等体积, 两两组合, 混合成 4 份等体积 mix, 分别加入 4 个样本中 (如 41-48, 将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别等体积混合成 4 份 mix 后, 分别依次加入样本 1、2、3、4 中)。
5	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, 注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	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, 注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。
7	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, 注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	加一组 8 Adapter (如 41-48), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本。
8n+x (n=1、2, x=1-8, 总计 9-24 个)	分三步: 1) 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、4-8 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+1-8n+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 注意: 上述 1)、2)、3) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter
8n+x (3≤n<11,x=1-8, 总计 25-96 个)	分三步: 1) 样本 1-24, 加一组 24 Adapter, 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本中加 1 个编号 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  
注意: 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相同时, 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 1 使用 Adapter 01-04 或 Adapter 13-16 或其他 97-104 以外的成组 Adapter。

## 附录 E 关于 PCR 扩增

- 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。
- 表 24 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 24 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
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 PCR)	6-8	9-11

## 附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

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

**公式 1** 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算:

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} = \frac{\text{DNA 主片段大小 (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

联系我们

生产企业：深圳华大智造科技股份有限公司

生产地址：深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼

客服电话：4000-966-988

技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

网    址：www.mgi-tech.com



官方微信