

# MGIEasy

## 简化基因组文库制备试剂盒使用说明书

---

货号: 1000005242 (64 RXN)

试剂盒版本号: V1.0

说明书版本号: A3

## 版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
A3	V1.0	2021 年 1 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>更新公司联系信息</li> </ul>
A2	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>
A1	V1.0	2019 年 10 月	<ul style="list-style-type: none"> <li>更换新模板</li> <li>修改 3.11 文库质控中的部分语言描述</li> </ul>
A0	V1.0	2018 年 4 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 产品简介	1
1.2 产品描述	1
1.3 适配测序平台	1
1.4 试剂盒组分	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期	2
1.6 客户自备物料清单	2
1.7 注意事项	3
第二章 样本要求及处理	4
2.1 样本要求	4
2.2 试剂准备	4
第三章 文库构建标准流程	5
3.1 酶切打断	5
3.2 接头连接	5
3.3 连接产物混样	7
3.4 连接产物纯化	7
3.5 PCR	8
3.6 PCR 产物纯化	9
3.7 均一化	9
3.8 环化	10
3.9 酶切消化	10
3.10 消化后纯化	11
3.11 文库质控	11
第四章 测序说明	13

# 第一章 产品信息

## 1.1 产品简介

试剂盒中文名: MGIEasy 简化基因组文库制备试剂盒

试剂盒英文名: MGIEasy RAD Library Prep Kit

## 1.2 产品描述

“MGIEasy 简化基因组文库制备试剂盒”是针对华大智造 (MGI) 测序平台量身打造的简化基因组文库构建试剂盒。本试剂盒可以对动植物基因组DNA进行操作, 制备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。

## 1.3 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 (PE100)

MGISEQ-2000RS (PE100)

## 1.4 试剂盒组分

MGIEasy 简化基因组文库制备试剂盒组成组分信息如表1所示:

表 1 MGIEasy 简化基因组文库制备试剂盒 (64 RXN) (货号: 1000005242)

试剂盒名称	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 简化基因组 文库制备试剂盒 货号: 1000005242	Fragmentation Enzyme I	无色	77 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	Fragmentation Enzyme II	无色	116 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	Fragmentation Buffer	无色	384 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	RAD Adapter Mix (64 barcode)	无色	10 $\mu$ L/孔 $\times$ 64 孔
	Ligase Enzyme	红色	125 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	PCR Primer Mix	蓝色	240 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	Splint Buffer	紫色	20 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	Digestion Buffer	白色	14 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	Digestion Enzyme	白色	25 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管
	Digestion Stop Buffer	白色	72 $\mu$ L/管 $\times$ 1 管



**注意：不同批次组分严禁混用**

## 1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 简化基因组文库制备试剂盒

- 储存温度：-25°C--18°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

## 1.6 客户自备物料清单

表 2 客户自备物料清单

仪器	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)
耗材	Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA)
	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)
试剂	安捷伦 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-1504)
	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，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
- 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

- DNA 总量: 1  $\mu\text{g}$  基因组 DNA
- DNA 浓度:  $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- DNA 纯度:  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.8\sim 2.0$
- DNA 质量: 完整或者轻微降解的动植物基因组 DNA



**注意:** 建议使用 1  $\mu\text{g}$  完整度良好的基因组 DNA (1% 琼脂糖凝胶电泳图中 DNA 主带完整且  $>23 \text{ kb}$  的样品判断为完整基因组 DNA 样本)。采用轻微降解的基因组 DNA 可进行风险建库。(注意: 高质量的基因组 DNA 能获得更高的实验成功率和更可靠的测序数据)。

- 建议使用高纯度基因组 DNA, DNA 中残留的蛋白、盐和其他污染物会降低试剂盒中酶的活性。

### 2.2 试剂准备

- 取出试剂盒内对应试剂酶混合液短暂离心后置于冰上待用; 缓冲液使用前需在室温溶解后, 震荡离心, 置于冰上待用; NF water 和 TE 置于室温待用。
- 请在冰上配制混合液。
- 试剂盒内缓冲液冰冻溶解后可能出现沉淀, 沉淀不影响试剂功能, 请充分震荡混匀直至沉淀消失后使用。

## 第三章 文库构建标准流程

### 3.1 酶切打断

3.1.1 根据 DNA 样本的定量结果，取 1  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 并补 TE 至总体积 20  $\mu\text{L}$ 。

3.1.2 根据表 3 不同样品类型选择相应的打断酶反应体系，在 PCR 管中按下表配制混合液，混匀离心

表 3 植物 gDNA 打断 PCR 反应程序

组分	一个反应标准量	
	动物 gDNA	植物 gDNA
DNA	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Fragmentation Buffer	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
Fragmentation Enzyme I	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Fragmentation Enzyme II	1 $\mu\text{L}$	不加
NF water	5 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$
Total	30 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$

3.1.3 将上述 PCR 管置于 PCR 仪上，根据表 4 不同样品类型选择相应反应条件

表 4 动植物 gDNA 打断 PCR 反应程序

温度	时间	
	动物 gDNA	植物 gDNA
热盖	On	On
37°C	20 min	0 min
65°C	20 min	20 min
4°C	Hold	Hold

3.1.4 酶切完成后，取 2  $\mu\text{L}$  酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，如果后期建库失败，可作为后期原因查找的环节，此步骤不用停滞，可以继续建库，具体流程参考文库指控环节。

### 3.2 接头连接

3.2.1 向上述打断产物中分别加入 5  $\mu\text{L}$  RAD Adapter Mix (64 barcode)，吹打混匀；



**注意：**要求 barcode 以 8 个连续序号为一组（01-08、09-16、17-24、41-48、57-64、65-72、81-88、89-96）进行使用，保证连接后均一化的时候进行成套的混合，如表 5 所示：



表 5 简化基因组文库制备试剂盒接头混合使用方式

Barcode NO.	混样方案		Barcode NO.	混样方案		Barcode NO.	混样方案		Barcode NO.	混样方案	
001	8 样本混合	16 样本混合	017	8 样本混合	16 样本混合	041	8 样本混合	16 样本混合	081	8 样本混合	16 样本混合
002			018			042			082		
003			019			043			083		
004			020			044			084		
005			021			045			085		
006			022			046			086		
007			023			047			087		
008			024			048			088		
009	8 样本混合	16 样本混合	033	8 样本混合	16 样本混合	057	8 样本混合	16 样本混合	089	8 样本混合	16 样本混合
010			034			058			090		
011			035			059			091		
012			036			060			092		
013			037			061			093		
014			038			062			094		
015			039			063			095		
016			040			064			096		

3.2.2 根据表 6 配制如下反应混合液:

表 6 接头连接反应体系

组分	体积	
	动物 gDNA	植物 gDNA
Fragmentation Buffer	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Fragmentation Enzyme II	0.5 $\mu$ L	不加
Ligase Enzyme	1.6 $\mu$ L	1.6 $\mu$ L
NF water	10.9 $\mu$ L	11.4 $\mu$ L
Total	15 $\mu$ L	15 $\mu$ L

3.2.3 将上述 15  $\mu$ L 反应混合液加入含有接头的上一步反应液中，混匀离心后将 PCR 管置于 PCR 仪上，如表 7 条件反应：

表 7 接头连接反应程序

温度	时间
热盖	on
23°C	60 min
65°C	15 min
4°C	Hold

### 3.3 连接产物混样

反应结束后，取出PCR管。按照表5的混合使用方式选取两组16个样本（两组16个barcode需遵循成对使用的原则）进行等体积混合，混合后总体积为200  $\mu$ L，并加入TE补充至320  $\mu$ L，然后进行混合样本的连接产物纯化。以32个样本反应为例，以8个连续barcode序号为一组（如分别加入01-08、09-16、17-24、33-40四组barcode），从两组（如01-08、09-16）即16个连接产物中各取12.5  $\mu$ L连接产物进行等体积混合，然后再加入120  $\mu$ L TE混匀，另外两组也按该方式混匀。此时样本会被混合成两份连接样本，每个样本总计320  $\mu$ L，然后将这两份样本进行下一步的纯化操作。

### 3.4 连接产物纯化

- 3.4.1 提前 30 分钟取出 AMPure XP 磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；此步骤需进行磁珠片段筛选及纯化，谨慎操作。
- 3.4.2 吸取 224  $\mu$ L AMPure XP 磁珠至 320  $\mu$ L 混合连接产物中，用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀室温孵育 10 分钟；
- 3.4.3 瞬时离心，将不粘管置于磁力架，静置 2 分钟至液体澄清，移液器吸取上清，并转移到干净的离心管中；



**注意：**此步保留上清，丢弃磁珠，切记不要吸到磁珠。

- 3.4.4 吸取 32  $\mu\text{L}$  AMPure XP 磁珠至上清中，用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10 分钟；
- 3.4.5 瞬时离心，将不粘管置于磁力架，静置 2 分钟至液体澄清，移液器吸取上清并弃掉；
- 3.4.6 保持不粘管固定于磁力架上，加入 500  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80 %乙醇，室温静置 2 分钟后，弃去上清；
- 3.4.7 重复步骤 3.4.6 一次，尽量吸干管底液体；



**注意：吸干管底液时，不要吸取磁珠，以免影响产量。**

- 3.4.8 保持不粘管固定于磁力架上，打开不粘管管盖，室温干燥 3 分钟或者直至磁珠无反光；
- 3.4.9 将不粘管从磁力架上取下，加入 50  $\mu\text{L}$  TE 进行洗脱，移液器吹打混匀并室温孵育 5 分钟；
- 3.4.10 瞬时离心，将不粘管置于磁力架上，静置 3 分钟至液体澄清，将 47  $\mu\text{L}$  上清液全部转移到新 PCR 管中，进行下一步反应或  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 3.5 PCR

- 3.5.1 按照表 8 体系在 PCR 管中配制混合液：

表 8 PCR 反应体系

组分	体积
DNA	20 $\mu\text{L}$
PCR Enzyme Mix	25 $\mu\text{L}$
PCR Primer Mix	2 $\mu\text{L}$
NF water	3 $\mu\text{L}$
Total	50 $\mu\text{L}$

- 3.5.2 将上述 50  $\mu\text{L}$  反应混合液加入装有纯化后的连接产物 PCR 管中，混匀离心后，将 PCR 管置于 PCR 仪上，如表 9 条件反应：

表 9 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
热盖	on	1
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec	9
60 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	1

### 3.6 PCR 产物纯化

3.6.1 提前 30 分钟取出 AMPure XP 磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；此步骤需进行磁珠片段筛选及纯化，谨慎操作。

3.6.2 吸取 30  $\mu\text{L}$  AMPure XP 磁珠至 50  $\mu\text{L}$  PCR 产物中，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10 分钟；

3.6.3 瞬时离心，将不粘管置于磁力架，静置 2 分钟至液体澄清，移液器吸取上清，并转移到干净的离心管中；



**注意：此步保留上清，丢弃磁珠，切记不要吸到磁珠。**

3.6.4 吸取 10  $\mu\text{L}$  AMPure XP 磁珠至上清中，用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10 分钟；

3.6.5 瞬时离心，将不粘管置于磁力架，静置 2 分钟至液体澄清，移液器吸取上清并弃掉；

3.6.6 保持不粘管固定于磁力架上，加入 500  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 80%乙醇，室温静置 2 分钟后小心弃去上清；

3.6.7 重复步骤 3.6.6 一次，尽量吸干管底液体；



**注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。**

3.6.8 保持不粘管固定于磁力架上，打开不粘管管盖，室温干燥 3 分钟或者直至磁珠无反光；

3.6.9 将不粘管从磁力架上取下，加入 32  $\mu\text{L}$  TE 进行 DNA 洗脱，移液器吹打混匀并室温下孵育 5 分钟；

3.6.10 瞬时离心，将不粘管置于磁力架上，静置 3 分钟至液体澄清，将上清液转移到新不粘管中，进行下一步或者  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 3.7 均一化

3.7.1 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 试剂盒或 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对样本进行定量；

3.7.2 根据浓度取 170 ng 样本到 PCR 管中，补充 NF water 至总体积 48.2  $\mu\text{L}$ 。如果需要多个 PCR 产物混合后环化，则需取 PCR 产物进行等量混合达到总量为 170 ng。

### 3.8 环化

3.8.1 将均一化的 48.2  $\mu\text{L}$  PCR 产物,在 PCR 仪上进行 95°C 变性孵育 3 分钟,然后立即转移到冰上,冰浴 2 min, 如表 10 所示:

表 10 链变性反应体系

温度	时间
热盖	on
95°C	3 min
立即置于冰上孵育	2 min

3.8.2 在冰上按表 11 体系配制反应混合液:

表 11 环化反应体系

组分	体积
Splint Buffer	11.6 $\mu\text{L}$
Ligase Enzyme	0.2 $\mu\text{L}$
Total	11.8 $\mu\text{L}$

3.8.3 往 48.2  $\mu\text{L}$  变性后的 DNA 中加入上述 11.8  $\mu\text{L}$  反应混合液, 混匀离心;

3.8.4 将上述 PCR 管置于 PCR 仪上, 如表 12 条件反应:

表 12 环化反应程序

温度	时间
热盖	on
37°C	30 min
4°C	Hold

### 3.9 酶切消化

3.9.1 将 Digestion Buffer 取出, 解冻混匀, 取出上步反应中的环化产物, 在冰上按表 13 体系加入反应混合液, 混匀离心:

表 13 酶切消化反应体系

组分	体积
环化产物	60 $\mu\text{L}$
Digestion Buffer	1.4 $\mu\text{L}$
Digestion Enzyme	2.6 $\mu\text{L}$
Total	64 $\mu\text{L}$

3.9.2 将上述 PCR 管置于 PCR 仪上，如表 14 条件反应：

表 14 酶切消化反应程序

温度	时间
热盖	on
37°C	30 min
4°C	Hold

3.9.3 反应结束后，向每个反应中加入 7.5  $\mu$ L Digestion Stop Buffer 混匀，中止反应；

3.9.4 将所有反应液转移到新的不粘管中，待纯化。

### 3.10 消化后纯化

3.10.1 提前 30 分钟从 4°C 冰箱取出 AMPure XP 磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀；

3.10.2 将酶切消化产物转移至 1.5 mL 管中，加入 170  $\mu$ L AMPure XP 磁珠，用移液器轻轻吹打 10 次以充分混匀反应液，室温孵育 10 分钟。

3.10.3 瞬时离心，将 1.5 mL 管置于磁力架，静置 2 分钟至液体澄清，用移液器吸取并弃掉上清；

3.10.4 保持 1.5 mL 管固定于磁力架上，加入 500  $\mu$ L 提前配制的 80%乙醇，移液器上下吹打 10 次清洗磁珠，注意不要吹散磁珠，静置 2 分钟后小心弃去上清；

3.10.5 重复步骤 3.10.4 一次，并用移液器吸取残留液体，尽量吸干管底液体；

3.10.6 保持 1.5 mL 管固定于磁力架上，打开 1.5 mL 管管盖，室温干燥 10 分钟或者直至磁珠无反光；

3.10.7 将 1.5 mL 管从磁力架上取下，加入 25  $\mu$ L TE 将磁珠从管壁吹到管底，用移液器吹打混匀并室温下溶解 10 分钟；

3.10.8 瞬时离心，将 1.5 mL 管置于磁力架上，静置 3 分钟至液体澄清，吸取 23  $\mu$ L 上清液转移到新 1.5 mL 管中；

3.10.9 取 2  $\mu$ L 产物使用 Qubit® ssDNA Assay kit 定量，剩余产物置于 -20°C 存放，待制备 DNB。

### 3.11 文库质控

作为建库失败时的问题排查方法之一，可以把打断产物用 2%琼脂糖凝胶进行电泳测试。取 6  $\mu$ L 酶切产物加入 1  $\mu$ L 6 $\times$ loading buffer 为测试样品，以 NEB 100 bp marker 为标准品，在 100 V 电压的条件下电泳 60 min。15 分钟染胶后进行凝胶成像分析。电泳胶图显示酶切打断的基因组 DNA 尽可能多的在 200bp-1000bp 之间呈弥散状分布，若打断后基因组 DNA 均大于 1000 bp 则认为酶切打断步骤异常；若打断后基因组 DNA 部分在 200bp-1000bp 也可接着进行下步操作，可能的影响为 PCR 产量偏低。如图 1 所示：

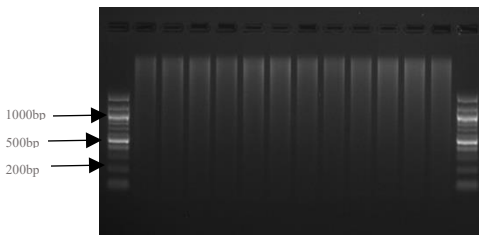


图 1 电泳检测酶切后样本（NEB 100 bp marker）

PCR纯化产物使用Qubit® dsDNA HS Assay Kit试剂盒或Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit等双链DNA定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对样本进行定量，产量 $\geq 200$  ng为合格。

PCR产物纯化后可选用琼脂糖凝胶电泳或Agilent 2100 Bioanalyzer检测PCR产物的长度分布范围。要求DNA片段主带在400 bp左右，无引物二聚体和其他污染。如图2所示：

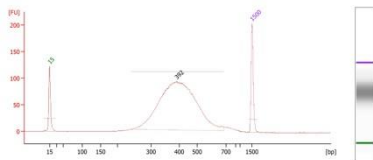


图 2 简化基因组文库 PCR 产物 Agilent 2100 检测结果

## 第四章 测序说明

MGIEasy简化基因组文库制备试剂盒所制备的文库在华大智造测序仪上机时要设置3个暗反应，此步骤为必须，请谨记，具体操作如下所示：依照基因测序仪使用说明书启动测序仪，打开测序软件准备测序。在测序设置页面进行参数设置时，在暗反应前面方格中打勾，并在暗反应读长的方框中填入数字3，如图3所示，即完成暗反应参数的设置。



图 3 暗反应设置说明

备注：由于采用限制性酶切进行简化基因组文库构建，故会在插入片段的两端形成固定序列，而固定序列则会由于碱基不平衡导致测序仪停止运行，因此测序反应的前3个碱基需采取暗反应的操作。



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