

编号：H-940-000188-00



使用说明书

版本：4.0

MGICare 单细胞染色体 拷贝数变异检测试剂套装

货号：940-000188-00 (48 RXN)
试剂套装版本：V1.0

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。

DNBSEQ™、MGISEQ™、Agilent®、Ambion®、Axygen®、Invitrogen®、Thermo Fisher®、Qubit®，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
4.0	V1.0	2023 年 9 月	<ul style="list-style-type: none">更新组分规格更新说明书风格修订部分纯化混匀操作、孵育时间增加附录关于样本 pooling删除附录关于磁珠及纯化
3.0	V1.0	2022 年 12 月	更新联系方式
2.0	V1.0	2022 年 6 月	删除附录 增加文库均一化、单个文库取样量的计算公式
1.0	V1.0	2021 年 12 月	变更试剂产品货号信息



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	3
1.6	自备物料清单	3
1.7	注意事项	4
1.8	流程	4
2	样本要求	6
3	单细胞全基因组扩增	7
3.1	实验前准备	7
3.2	样本准备	7
3.3	细胞裂解	8
3.4	前扩增处理	9
3.5	后扩增处理	10
4	文库构建标准流程	12
4.1	酶切打断	12
4.2	打断产物纯化	13
4.3	末端修复	14
4.4	接头连接	15
4.5	连接产物纯化	16
4.6	PCR	17
4.7	PCR 产物纯化	18
4.8	PCR产物质检	19
4.9	变性及单链环化	20
5	测序	22
6	附录	23
6.1	关于 Adapter 使用	23
6.2	关于样本 pooling	25

--- 此页有意留白 ---

1 产品信息

1.1 产品描述

MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂套装是针对华大智造 (MGI) 测序平台量身打造的检测单细胞染色体拷贝数变异的试剂盒。本试剂盒可以对人类单细胞或微量细胞（例如体外受精 - 胚胎移植的人胚胎细胞、人外周血淋巴细胞等）进行操作，制备得到双链 DNA 文库，使用配套的MGIEasy 快速环化模块，制备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，用于高通量测序并得到数据以进行染色体拷贝数变异的分析。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

本试剂套装适用于人类单细胞或微量细胞（例如体外受精 - 胚胎移植的人胚胎细胞、人外周血淋巴细胞等）。可用于人胚胎细胞染色体拷贝数变异研究及循环肿瘤细胞研究等应用场景。

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：

- BGISEQ-500RS (SE50)
- MGISEQ-200RS (SE50)
- MGISEQ-2000RS (SE50)

1.4 组分

本试剂套装规格是 48 RXN。每个试剂套装包含 4 个独立试剂盒。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 MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂套装 (48 RXN) (货号: 940-000188-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 (Box 1) 货号: 940-000-176-00 规格: 48 RXN	细胞裂解液	 黄色	10 μ L/支 \times 1
	细胞裂解液缓冲液	 紫色	235 μ L/支 \times 1
	前扩增酶	 白色	10 μ L/支 \times 1
	前扩增酶缓冲液	 红色	235 μ L/支 \times 1
	后扩增酶	 蓝色	40 μ L/支 \times 1
	后扩增酶缓冲液	 橙色	1200 μ L/支 \times 1
	去核酸酶水	 无色	1650 μ L/支 \times 1
	阳性对照	 黑色	24 μ L/支 \times 1
	阴性对照	 黑色	24 μ L/支 \times 1
MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 (Box 2) 货号: 940-000-177-00 规格: 48 RXN	DNA 打断酶缓冲液	 粉色	48 μ L/支 \times 3
	DNA 打断酶	 粉色	48 μ L/支 \times 3
	末端修复缓冲液	 橙色	150 μ L/支 \times 3
	末端修复酶	 橙色	10 μ L/支 \times 3
	连接缓冲液	 红色	384 μ L/支 \times 3
	连接酶	 红色	16 μ L/支 \times 3
	标签接头(O1-48)	 无色	10 μ L/孔 \times 48
	PCR 反应液	 蓝色	400 μ L/支 \times 3
	PCR 引物	 蓝色	64 μ L/支 \times 3
MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 (Box 3) 货号: 940-000-178-00 规格: 48 RXN	洗脱缓冲液	 白色	5000 μ L/支 \times 2
	磁珠	 白色	1320 μ L/支 \times 6
MGIEasy 快速环化模块 货号: 1000005258 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

1.5 储存与运输

表 2 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	储存温度	运输温度
MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 (Box 1)	-25 °C~-15 °C	-80 °C~-15 °C
MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 (Box 2)		
MGIEasy 快速环化模块		
MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 (Box 3)	2 °C~8 °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 3 MGI 产品订购信息

货号	型号	名称
1000002072	FCL SE50	BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装
1000004635	FCL SE50	MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装
1000003703	FCL SE50	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装
1000012551	FCL SE50	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装V3.1

表 4 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	/
96 孔板磁力架	ALPAQUA, Part#A00400 或同等功能仪器
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D 或同等功能仪器
Qubit3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器
全波长全自动酶标仪	Omega或其他同等功能的仪器
超净工作台	/

表 5 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
分子级水	/
1x TE Buffer, pH 8.0	Ambion, Cat. No. AM9858
无水乙醇 (分析纯)	/
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Cat. No. Q32854
细胞保存液 (PBS)	/
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

3.1 ~ 3.5 节对单细胞或微量细胞进行细胞裂解、前扩增处理、后扩增处理，获得全基因组扩增产物。
4.1 ~ 4.9 节为文库制备过程，获得 PCR 纯化产物后再进行快速环化，获得单链环状 DNA 文库。

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	实验前准备	35 min	5 min
3.2	样本准备	5 min	5 min
3.3	细胞裂解	20 min	3 ~ 5 min
3.4	前 PCR 扩增	50 ~ 55 min	5 min
3.5	后 PCR 扩增 	40 ~ 45 min	5 min
4.1	酶切打断	25 min	5 min
4.2	酶切打断产物纯化	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
4.3	末端修复	35 ~ 40 min	5 ~ 10 min
4.4	接头连接	30 min	5 ~ 10 min
4.5	连接产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
4.6	PCR	25 ~ 30 min	5 ~ 8 min
4.7	PCR产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
4.8	PCR产物质检 	15 ~ 20 min	5 ~ 10 min
4.9	变性及单链环化	45 ~ 50 min	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

- 样本采集与处理：按照不同方法获取的单细胞或微量细胞要置于含有 3~ 6 μL 细胞保存液的 PCR 管中；
- 样本保存：采集细胞样本置于细胞保存液中可在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下长期保存。应保持样本管直立放置，禁止上下颠倒。检测前应将样本置于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 融化；
- 样本运输：寄送细胞样本前，需将送样管放置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}\sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下短暂冷冻，待细胞保存液冻结后将样本埋入干冰运输，运输时间应不超过 7 天，并确保样本送达时有足够的干冰剩余，PCR 管液体部分应保持冻结状态；
- 样本安全性：所有样本均视为有潜在的感染性，操作时按相关法规标准执行。

3 单细胞全基因组扩增


3.1 实验前准备

3.1.1 环境和仪器

单细胞或微量细胞全基因组扩增的操作须在专用超净台和 PCR 仪上完成。
超净台使用前应打开风机，并使用 75% 消毒酒精对超净台内的物品表面（特别是金属、塑料制品）进行全面擦拭；然后关闭风机，紫外照射至少 30 min 杀菌。

3.1.2 试剂准备

每一步反应前，将所需试剂从试剂盒中取出，酶类试剂需轻弹或颠倒混匀并短暂离心，置于冰盒上备用；其他试剂置于 2 °C~8 °C 或室温融化，涡旋混匀，短暂离心后备用。

-  注意
1. 实验人员须严格佩戴口罩及一次性无粉乳胶手套，操作过程中若手套接触超净台外的区域后，需用75%消毒酒精仔细擦拭手套表面方可继续实验；


2. 实验中所用吸头、离心管等耗材必须为无核酸、无核酸酶。

3.2 样本准备


表 6 试剂准备

试剂名称	要求
NF Water	自备物料，室温暂存
阳性对照（1 ng/μL）	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
阴性对照（1 ng/μL）	


1. **阴性对照品**：将试剂盒中 1 ng/μL 的阴性对照品用 NF Water 稀释至 15 pg/μL。如取 2 μL 对照品加入 131 μL NF Water 中，混匀离心。取 4 μL 稀释后的阴性对照品至 PCR 管中。
2. **阳性对照品**：同法制备 15 pg/μL 阳性对照品，取 4 μL 至 PCR 管中。



注意 稀释后的阴、阳性对照品浓度较低，不利于长时间保存，建议每次实验现配现用；
3. **细胞样本**：细胞使用前置于冰盒上化冻，短暂离心收集所有液体至管底，置于冰盒上备用。



注意
 - 保持样本管直立放置。
 - 在后续细胞裂解、前扩增处理步骤中，为避免细胞样品粘附到移液器吸头上，或粘附到管壁、管盖上。建议：沿管壁缓慢加入试剂，不要将吸头插入液面下。混匀样本时，轻弹 PCR 管底部或中下部 5~6 次即可，勿使液体飞溅。请勿使用涡旋、上下颠倒样本管、用移液器吹打的方式混匀样本。
- 3.3 细胞裂解
- 3.3.1 准备
- 试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。
- 表 7 试剂准备
- | 试剂名称 | 要求 |
|---------|-------------------|
| 细胞裂解缓冲液 | 室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存 |
| 细胞裂解酶 | 轻弹底部混匀，离心，冰上暂存 |
- 3.3.2 细胞裂解
1. 根据所需反应数，在冰上配制细胞裂解反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。
- 表 8 细胞裂解反应液的配制
- | 组分 | 单个反应体积 |
|---------|--------|
| 细胞裂解缓冲液 | 4.8 μL |
| 细胞裂解酶 | 0.2 μL |
| Total | 5 μL |
2. 吸取 5 μL 细胞裂解反应液至各样本管中（3.2节样本、阴阳性对照），轻弹底部 5 ~ 6 次混匀，瞬时离心使液体收集至管底。



提示 移液器吸头不要深入液面，沿管壁在液面上加入反应液。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。
- 8

表 9 细胞裂解反应条件（体系：9 μL）

温度	时间
105 °C 热盖	On
75 °C	10 min
95 °C	4 min
4 °C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

3.4 前扩增处理

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 10 试剂准备

试剂名称	要求
前扩增缓冲液	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
前扩增酶	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.4.2 前扩增

1. 根据所需反应数，在冰上配制前扩增反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 11 前扩增反应液的配制

组分	单个反应体积
前扩增缓冲液	4.8 μL
前扩增酶	0.2 μL
Total	5 μL

2. 吸取 **5 μL** 前扩增反应液至样本管中（3.3.2 节步骤 4），轻弹底部 5 ~ 6 次混匀，瞬时离心使液体收集至管底。



提示 移液器吸头不要深入液面，沿管壁在液面上加入反应液。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 12 前扩增反应条件（体系：14 μL）

温度	时间	循环数
105 °C热盖	on	-
95 °C	2 min	1
95 °C	15 s	12
15 °C	50 s	
25 °C	40 s	
35 °C	30 s	
65 °C	40 s	
75 °C	40 s	
4 °C	Hold	-

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

3.5 后扩增处理

3.5.1 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
去核酸酶水	室温解冻，室温暂存
后扩增缓冲液	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
后扩增酶	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.5.2 后扩增

1. 根据所需反应数，在冰上配制后扩增反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 14 后扩增反应液的配制

组分	单个反应体积
去核酸酶水	34.2 μL
后扩增缓冲液	25 μL
后扩增酶	0.8 μL
Total	60 μL

2. 吸取 **60 μL** 后扩增反应液至样本管中（3.4.2 节步骤 4），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 15 后扩增反应条件（体系：74 μL）


温度	时间	循环数
105 °C热盖	on	-
95 °C	2 min	1
95 °C	15 s	14
65 °C	1 min	
75 °C	1 min	
4 °C	Hold	-

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心置于冰上。

 停止点 产物可置 - 20 °C 冰箱长期储存。

4 文库构建标准流程

4.1 酶切打断

 **提示** 本试剂盒酶切打断是通过控制 37 °C 反应时间来控制 DNA 的片段分布，因此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。

4.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
DNA 打断酶缓冲液	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
DNA 打断酶	轻弹底部混匀，瞬时离心，冰上暂存

4.1.2 酶切打断

- 取 24 μL 3.5.2 节步骤 4 样本至新的 0.2 mL PCR 管。
- 根据所需反应数，在冰上配制酶切打断反应液，吹打混匀或涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 17 酶切打断反应液的配制

组分	单个反应体积
DNA 打断酶缓冲液	3 μL
DNA 打断酶	3 μL
Total	6 μL

- 吸取 6 μL 酶切打断反应液至各样本管中（步骤 1），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
- 提前设置 PCR 程序，待达到反应温度时，将 PCR 管置于 PCR 仪上进行反应。


表 18 酶切打断反应条件（体系：30 μL）

温度	时间
105 °C 热盖	On
37 °C	5 min
75 °C	15 min
4 °C	Hold

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后置于冰上，进入下一步反应。

 注意 酶切打断产物应在 30 min 内进行纯化处理。

4.2 打断产物纯化

 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。


4.2.1 准备


表 19 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
洗脱缓冲液	室温
磁珠	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

4.2.2 打断产物纯化


1. 检查样本体积（4.1.2 节步骤 5），吸取洗脱缓冲液补足至总体积 50 μL。
2. 混匀磁珠，吸取 75 μL 磁珠至各样本管中，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，小心吸取上清并丢弃。
5. 保持样本管固定于磁力架上，加入 150 μL 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。

7. 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。
8. 将样本管从磁力架上取下，加入 **43 μL 洗脱缓冲液**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。
9. 室温孵育 **5 min**。
10. 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 **40 μL** 上清液至新的 **0.2 mL** PCR 管。
- 

停止点 产物纯化后可置 **-20 °C** 冰箱储存不超过 **7** 天。

4.3 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。

4.3.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 20 试剂准备

试剂名称	要求
末端修复缓冲液	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
末端修复酶	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

4.3.2 末端修复

1. 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 21 末端修复反应液的配制


组分	单个反应体积
末端修复缓冲液	9.4 μL
末端修复酶	0.6 μL
Total	10 μL

2. 吸取 **10 μL** 末端修复反应液至各样本管中（4.2.2节步骤 10），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 22 末端修复反应条件（体系：50 μL）

温度	时间
70 °C 热盖	On
37 °C	10 min
65 °C	15 min
4 °C	Hold

4. 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，末端修复产物可放在 -20 °C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20% 左右。

4.4 接头连接


 **提示** 操作前请仔细阅读 第 23 页“关于 Adapter 使用”。

4.4.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 23 试剂准备

试剂名称	要求
标签接头(01-48)	涡旋混匀、离心，冰上暂存
连接缓冲液	室温溶解，混匀离心，冰上暂存
连接酶	瞬时离心，冰上暂存

 **提示**

- 标签接头(01-48)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。
- 连接缓冲液较粘稠，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。

4.4.2 接头连接

1. 吸取 5 μL 标签接头至对应的样本管中（4.3.2 节步骤 4），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 s，瞬时离心后置于冰上。

表 24 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
连接缓冲液	24 μL
连接酶	1 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 25 接头连接反应条件（体系：**80 μL**）

温度	时间
30 °C 热盖	On
23 °C	20 min
4 °C	Hold

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。

 **注意** 不建议在此处停止，请继续完成接头连接产物纯化。如果必须停止，末端修复产物可放在 **-20 °C** 冰箱过夜，但产量可能会下降。

4.5 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。



4.5.1 准备

表 26 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
洗脱缓冲液	室温暂存
磁珠	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

4.5.2 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. 混匀磁珠，吸取**40 μL 磁珠**至样本管中（4.4.2 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。
 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 **150 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 **23 μL 洗脱缓冲液**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 **21 μL** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。
-  停止点 产物纯化后可置 -20 °C 冰箱储存。

4.6 PCR

4.6.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 27 试剂准备

试剂名称	要求
PCR 反应液	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
PCR 引物	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存

4.6.2 PCR

1. 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 28 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR 反应液	25 μL
PCR 引物	4 μL
Total	29 μL


2. 吸取 **29 μL** PCR 反应液至样本管中（4.5.2 节步骤 9），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 29 PCR 反应条件（体系：50 μL）

温度	时间	循环数
105 °C热盖	on	-
98 °C	2 min	1
98 °C	15 s	12
56 °C	15 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1
4 °C	Hold	-

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

4.7 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。


4.7.1 准备

表 30 试剂准备


试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
洗脱缓冲液	室温暂存
磁珠	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

4.7.2 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. 混匀磁珠，吸取**50 μL 磁珠**至样本管中（4.6.2 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 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 **150 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 洗脱缓冲液**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 1.5 mL 离心管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 °C 冰箱储存。
- ## 4.8 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 31 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 等 | PCR产物的浓度：≥ 2 ng /μL |
- 不同片段大小的双链 DNA 样本 1 pmol 分子对应不同的质量，可根据第 25 页“关于样本 pooling”公式 1 计算所需的 DNA 量。

如需将多个样本混合测序，建议根据 第 23 页“关于 Adapter 使用”设计混合方案，在定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，推荐混合质量 168 ng，总体积 ≤ 48 μL。
- 19

4.9 变性及单链环化

 **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 第 25 页 “关于样本 pooling” 公式 1、2 计算所需纯化后 PCR 产物体积。

4.9.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 32 试剂准备

试剂名称	要求
洗脱缓冲液	室温暂存
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

4.9.2 变性

- 吸取 1 pmol（168 ng）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，用洗脱缓冲液补足至总体积 48 μ L。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 33 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

- 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。

4.9.3 单链环化

- 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 34 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 μL** 单链环化反应液至各样本管中 (3.7.2 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 35 单链环化反应条件（体系：60.1 μL）

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	30 min
4 °C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上。

 停止点 产物可置 -20 °C 冰箱储存。

5 测序

取 20 μ L 单链环化产物制备 DNB 及后续操作。请根据具体应用的要求选择合适的测序平台和测序类型进行上机：

- 在 BGISEQ-500RS 基因测序仪使用 BGISEQ-500RS 系列 SE50 高通量测序试剂进行测序；
- 或在 MGISEQ-200RS 基因测序仪使用 MGISEQ-200RS 系列 SE50 高通量测序试剂进行测序；
- 或在 MGISEQ-2000RS 基因测序仪使用 MGISEQ-2000RS 系列 SE50 高通量测序试剂进行测序；

测序前请仔细阅读对应的说明书，并严格按照说明书的内容进行操作。

6 附录

6.1 关于 Adapter 使用

试剂套装根据反应数提供了 1~48 标签接头 (Adapters Mix (Barcode 01-48))，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，使用时请详细阅读使用规则。

- 不同规格 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。
- 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。

6.1.1 Adapters Mix (Barcode 01-48) 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 Mix 具备如下的分组规则：


- 4 个 Adapter 成组：01-04，05-08，09-12，13-16，共计 4 组。
- 8 个 Adapter 成组：17-24，25-32，33-40，41-48，共计 4 组。

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 36 Adapters Mix (Barcode 01-48) 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"> 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。 <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。
5	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <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"> 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。 <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"> 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。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>

样本数/lane	使用方法（举例）
8	<ul style="list-style-type: none"> 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-48 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。 或加两组 4 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，05-08，将 8 个编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。
8n+x (n=1~5 x=1~8, 总计 9~48个)	<p>分两步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 样本 1-8n，每 8 个样本一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 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：8 个样本使用 Adapter 41-48；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。

6.2 关于样本 pooling

 **注意** 不同片段长度的文库不建议 pooling 测序。

 **提示** Pooling 前建议参考 Adapter 使用规则设计混合方案。

6.2.1 PCR 纯化产物 pooling

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 上每个样本所需数据量的百分比。参考公式 1、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 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

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

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 混合前单个样本所需体积计算

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

例如：计划将 4 个文库（插入片段长度均为 150 ~ 200 bp, adapter 长度 84 bp，所添加的 adapter 符合使用规则）在同一 lane 上混合测序，1 pmol PCR 产物建议投入 168 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 $168 \text{ ng} \times 25\% = 42 \text{ ng}$ 。
 - 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 33.6 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 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 。

 提示 A、B、C、D 体积均需 $\geq 1 \mu\text{L}$ 。

表 37 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	$48 - (A+B+C+D) \mu\text{L}$
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 38 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 39 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 3 计算新体积 E，加入混合测序样本中。

例如，样本 3 的取样体积不足 1 μL ，需将样本 3 稀释 Y 倍。

表 40 稀释高浓度样本 Y 倍

名称	体积
样本 3	建议 $\geq 5 \mu\text{L}$
TE Buffer	$5Y - 5 \mu\text{L}$
Total	$5Y \mu\text{L}$

 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 41 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

--- 此页有意留白 ---