

MGICare

单细胞染色体拷贝数变异检测试剂套装使用说明书

货号：1000014630（48 RXN）

试剂套装版本：V1.0

说明书版本号：4.0

版本历史

说明书版本	试剂套装版本	修订日期	修订内容摘要
4.0	V1.0	2022年6月	<ul style="list-style-type: none">删除附录 C;4.7 增加文库均一化、单个文库取样量的计算公式
A2	V1.0	2021年1月	<ul style="list-style-type: none">更新公司联系信息
A1	V1.0	2020年7月	<ul style="list-style-type: none">变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”
A0	V1.0	2019年5月	<ul style="list-style-type: none">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

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.....	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期.....	3
1.6 客户自备仪器与物料清单.....	4
1.7 注意事项.....	5
第二章 样本要求.....	5
第三章 单细胞全基因组扩增标准流程.....	6
3.1 实验前准备.....	6
3.2 样本准备.....	6
3.3 细胞裂解.....	6
3.4 前扩增处理.....	7
3.5 后扩增处理.....	8
第四章 文库构建标准流程.....	9
4.1 DNA 打断回收.....	9
4.2 末端修复反应.....	10
4.3 接头连接.....	11
4.4 连接产物纯化.....	11
4.5 PCR 扩增反应.....	12
4.6 PCR 产物纯化.....	13
4.7 PCR 产物定量和均一化.....	13
4.8 变性.....	14
4.9 单链环化.....	14
第五章 测序.....	16
附录.....	17
附录 A 关于标签接头的使用.....	17
附录 B 关于磁珠及纯化.....	19

第一章 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-2000RS (SE50)

MGISEQ-200R (SE50)

1.4 试剂盒组分

MGICare单细胞染色体拷贝数变异检测试剂套装规格是48RXN。试剂套装包含MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒V2.0、MGIEasy 快速环化模块 2个独立试剂盒。每个独立试剂盒货号、组分信息如表 1:

表 1 MGIcare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂套装 (48 RXN) (货号: 1000014630)

试剂盒种类	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 V2.0 (包装盒 1) 货号: 1000005291 规格: 48 RXN	细胞裂解酶	黄色	11 μ L/管 \times 1 管
	细胞裂解缓冲液	紫色	280 μ L/管 \times 1 管
	前扩增酶	白色	11 μ L/管 \times 1 管
	前扩增缓冲液	红色	280 μ L/管 \times 1 管
	后扩增酶	蓝色	40 μ L/管 \times 1 管
	后扩增缓冲液	橙色	1400 μ L/管 \times 1 管
	去核酸酶水	无色	1700 μ L/管 \times 1 管
	阳性对照	黑色	30 μ L/管 \times 1 管
	阴性对照	黑色	30 μ L/管 \times 1 管
	MGIcare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 V2.0 (包装盒 2) 货号: 1000005291 规格: 48 RXN	DNA 打断酶缓冲液	粉色
DNA 打断酶		粉色	70 μ L/管 \times 3 管
末端修复缓冲液		橙色	200 μ L/管 \times 3 管
末端修复酶		橙色	15 μ L/管 \times 3 管
连接缓冲液		红色	450 μ L/管 \times 3 管
连接酶		红色	30 μ L/管 \times 3 管
标签接头 (01-48)		无色	15 μ L/孔 \times 48 孔
PCR 反应液		蓝色	475 μ L/管 \times 3 管
MGIcare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒 V2.0 (包装盒 3) 货号: 1000005291 规格: 48 RXN	PCR 引物	蓝色	80 μ L/管 \times 3 管
	洗脱缓冲液	白色	5500 μ L/管 \times 2 管
MGIEasy 快速环化模块 V1.0 货号: 1000005258 规格: 16 RXN	磁珠	白色	1600 μ L/管 \times 6 管
	Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 \times 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒48 RXN (包装盒1)

- 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒48 RXN (包装盒2)

- 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 冰袋运输

MGICare 单细胞染色体拷贝数变异检测试剂盒48 RXN (包装盒3)

- 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 快速环化模块

- 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- 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 客户自备仪器与物料清单

表 2 客户自备仪器与物料清单

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) 或 SPECTROstar Omega 全波长全自动酶标仪或其他同等功能的仪器 超净工作台
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) 无水乙醇, 100% 乙醇 (分析纯) Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854) 细胞保存液 (PBS) 高通量测序试剂“SE”
耗材	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应提前取出，将酶类试剂上下颠倒数次混匀瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻，解冻后震荡 3 次，每次 15 s 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 产物因操作不当容易产生气溶胶污染，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；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

第二章 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°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°C - 8°C 融化；
- 样本运输：寄送细胞样本前，需将送样管放置于 -70°C - 18°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，操作时按国家相关标准执行。

第三章 单细胞全基因组扩增标准流程

本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。

3.1 实验前准备

3.1.1 仪器准备

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融化，振荡混匀，短暂离心后备用。磁珠在使用前应置于室温平衡30 min，加入前应充分混匀。采用无水乙醇及分子级水配制80%乙醇，现配现用。



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；

注意 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

3.2.1 阴阳性对照品准备 将试剂盒中 1 ng/ μ L 的阳性对照品和阴性对照品用分子级水稀释至 15 pg/ μ L，分别取 4 μ L 稀释后的阳性对照品和阴性对照品至 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；

3.2.2 细胞样本准备 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。

3.3 细胞裂解

3.3.1 根据表 3 的比例在离心管中配制细胞裂解反应混合液；

表 3 细胞裂解反应混合液

组分	单个反应体积
细胞裂解缓冲液	4.8 μ L
细胞裂解酶	0.2 μ L
总体积	5 μ L

- 3.3.2 向装有细胞样本、阳性对照品和阴性对照品的 PCR 管中分别加入 5 μL 步骤 3.3.1 所配制的细胞裂解反应混合液, 瞬时离心后置于 PCR 仪中运行表 4 中的程序。程序运行结束后, 取出 PCR 管, 瞬时离心后置于冰盒上。



注意: 移液器吸头不要深入液面, 沿管壁在液面上加入反应液。

表 4 细胞裂解反应程序

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

3.4 前扩增处理

- 3.4.1 根据表 5 的比例在离心管中配制前扩增反应混合液;

表 5 前扩增反应混合液

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

- 3.4.2 向步骤 3.3.2 反应后的 PCR 管中分别加入 5 μL 步骤 3.4.1 所配制的前扩增反应混合液, 瞬时离心后置于 PCR 仪中运行表 6 中的程序。程序运行结束后, 取出 PCR 管, 瞬时离心后置于冰盒上。



注意: 移液器吸头不要深入液面, 沿管壁在液面上加入反应液。

表 6 前扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 (105°C)	On	
95°C	2 min	1
95°C	15 sec	
15°C	50 sec	
25°C	40 sec	12
35°C	30 sec	
65°C	40 sec	
75°C	40 sec	
4°C	Hold	1

3.5 后扩增处理

3.5.1 根据表 7 的比例在离心管中配制后扩增反应混合液；

表 7 后扩增反应混合液

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

3.5.2 向步骤 3.4.2 反应后的 PCR 管中分别加入 60 μ L 步骤 3.5.1 所配制的后扩增反应混合液，震荡混匀，瞬时离心后置于 PCR 仪中运行表 8 中的程序。程序运行结束后，取出 PCR 管，瞬时离心后置于 2°C~8°C 备用或置于 -18°C 以下长期储存。

表 8 后扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 (105°C)	on	
95°C	2 min	1
95°C	15 sec	
65°C	1 min	14
75°C	1 min	
4°C	Hold	

第四章 文库构建标准流程

本节为测序文库制备过程。主要对细胞的全基因组扩增产物进行DNA打断回收、末端修复、接头连接、PCR扩增，变性和单链环化过程，完成测序文库制备。

4.1 DNA 打断回收

- 4.1.1 取步骤 3.5.2 反应后的 24 μL 全基因组扩增产物于 PCR 管中；
- 4.1.2 根据表 9 的比例在离心管中配制 DNA 打断所需的酶切打断反应混合液；

表 9 酶切打断反应混合液

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

- 4.1.3 向步骤 4.1.1 的 PCR 管中分别加入 6 μL 步骤 4.1.2 所配制的酶切打断反应混合液，充分混匀后瞬时离心；
- 4.1.4 置于 PCR 仪上运行表 10 所示反应程序；

表 10 酶切打断反应程序

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

 **注意：**4.1.4 所得的 DNA 酶切打断反应产物应在 30 min 内进行下一步纯化处理。提前 30 min 取出磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

4.1.5 反应结束后瞬时离心，补足洗脱缓冲液至体积为 50 μL ，加入 75 μL 磁珠，轻轻吹打至少 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管中。室温孵育 5 min。将离心管瞬时离心后置于磁力架，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。

 **注意：**操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。

4.1.6 保持离心管置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。

- 4.1.7 重复步骤 4.1.6。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。
- 4.1.8 保持离心管置于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 4.1.9 将离心管从磁力架上取下，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 次至完全混匀。室温下孵育 5 min。
- 4.1.10 将离心管置于磁力架 3 分钟至溶液澄清，取 40 μL 上清液于新的 PCR 管中。

4.2 末端修复反应

- 4.2.1 根据表 11 的比例在离心管中配制检测所需量的末端修复反应混合液在冰上配制末端修复反应混合液。

表 11 末端修复反应混合液

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
总体积	10 μL

- 4.2.2 用移液器吸取 10 μL 配制好的末端修复反应混合液加入步骤 4.1.10 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。
- 4.2.3 将步骤 4.2.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 12 中的条件进行反应。

表 12 末端修复反应条件

温度	时间
热盖 (42°C)	On
37°C	10 min
65°C	15 min
4°C	Hold

- 4.2.4 瞬时离心将反应液收集至管底。



注意：不建议在此处停止，请继续操作步骤 4.2.4。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。

4.3 接头连接



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于标签接头的使用。

4.3.1 在冰上配制连接反应混合液（见表 13）。

表 13 连接反应混合液

组分	单个反应体积
连接缓冲液	24 μ L
连接酶	1 μ L
总体积	25 μ L

4.3.2 参照标签接头（01-48）使用规则（参见附录 A），在步骤 4.2.3 的 PCR 管中加入 5 μ L 对应的标签接头（01-48）（1 pmol/ μ L），涡旋震荡 3 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底。

4.3.3 用移液器缓慢吸取 25 μ L 配制好的接头连接反应混合液加入步骤 4.3.2 的 PCR 管中，涡旋震荡 6 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底。

4.3.4 将步骤 4.3.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 14 中的条件进行反应。

表 14 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	Off
23°C	20 min
4°C	Hold

4.3.5 瞬时离心将反应液收集至管底，转移至新的 0.2 mL PCR 中。



注意：不建议在此处停止，请继续操作步骤 4.3.5。如果必须停止，连接产物可以放在 -20°C 冰箱过夜，但产量可能会下降。

4.4 连接产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。

4.4.1 提前 30 min 取出磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

4.4.2 用移液器吸取 40 μ L 磁珠至步骤 4.3.5 中的接头连接产物中，并轻轻吹打至少 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管中。

4.4.3 室温孵育 5 min。

4.4.4 将离心管瞬时离心后置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。

- 4.4.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 4.4.6 重复步骤 4.4.5。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。
- 4.4.7 保持离心管置于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 4.4.8 将离心管从磁力架上取下，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 次至完全混匀。
- 4.4.9 室温下孵育 5 min。
- 4.4.10 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，将 21 μL 上清液转移到新的 PCR 管中。

✓ **停止点：连接产物纯化后可置-20°C 冰箱储存。**

4.5 PCR 扩增反应

- 4.5.1 在冰上配制 PCR 反应混合液（见表 15）。

表 15 PCR 反应混合液

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

- 4.5.2 用移液器吸取 29 μL 配制好的 PCR 反应液加入步骤 4.4.10 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。
- 4.5.3 将步骤 4.5.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 16 的条件进行 PCR 反应。

表 16 PCR 扩增反应条件

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

4.5.4 瞬时离心将反应液收集至管底，转移至新的 PCR 管中。

4.6 PCR 产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。

- 4.6.1 提前 30 min 取出磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 4.6.2 吸取 50 μL 磁珠至步骤 4.5.4 的 50 μL PCR 产物中，用移液器轻轻吹打至少 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。
- 4.6.3 室温孵育 5 min。
- 4.6.4 将离心管瞬时离心后置于磁力架，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。
- 4.6.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200 μL 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。
- 4.6.6 重复步骤 4.6.5，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。
- 4.6.7 保持离心管置于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 4.6.8 将离心管从磁力架上取下，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 次至完全混匀。
- 4.6.9 室温下孵育 5 min。
- 4.6.10 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，将 30 μL 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。

4.7 PCR 产物定量和均一化

4.7.1 PCR 产物定量

使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能的双链 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 产物文库浓度 ≥ 2 ng/ μL 。

4.7.2 均一化



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于标签接头的使用。

- 4.7.2.1 取 168 ng PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管，总体积 ≤ 48 μL 。如不足，用洗脱缓冲液补充至总体积 48 μL 。

- 如需将多个样本混合测序，建议根据标签接头使用规则设计混合方案（见附录 A），在定量后进行不同标签样本混合，混合后总量为 1 pmol，根据本试剂盒适用样本类型的片段大小，推荐混合总量为 168 ng，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$ 。如不足，用洗脱缓冲液补充至总体积 $48 \mu\text{L}$ 。

混合前单个文库取样量 (ng) = 168 ng/N (N 代表等量混合样本个数)

单个文库取样体积 (μL) = 单个文库取样量 (ng) / 单个文库的浓度 (ng/ μL)

- 如果每个文库取样体积不足 $1 \mu\text{L}$ ，可按取 168 ng 的 X (X>1) 倍的量混合以保证每个样品的取样量大于 $1 \mu\text{L}$ ，此时每个样本取样体积相应增加 X 倍。

单个文库取样量 (ng) = 168 X ng/N (N 代表等量混合样本个数)

单个文库取样体积 (μL) = 单个文库取样量 (ng) / 单个文库的浓度 (ng/ μL)

✓ **停止点：混合产物可在 -20°C 冰箱储存或进行下一步 DNA 变性反应。**

4.8 变性

4.8.1 将步骤 4.7.2.1 所述 PCR 管 ($48 \mu\text{L}$ 混合文库) 置于 PCR 仪上，按照表 17 的条件进行反应。

表 17 变性反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
95°C	4 min

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

4.9 单链环化

4.9.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 18）。

表 18 单链环化反应液

组分	单个反应体积
Splint Buffer	$11.6 \mu\text{L}$
DNA Rapid Ligase	$0.5 \mu\text{L}$
总体积	$12.1 \mu\text{L}$

4.9.2 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 4.8.2 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。

4.9.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 19 的条件进行反应。

表 19 单链环化反应条件

温度	时间
热盖 (42°C)	On
37°C	30 min
4°C	Hold

4.9.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

✓ 停止点：环化反应后产物可置-20°C冰箱储存。

第五章 测序

应根据具体应用的要求选择合适测序类型进行上机，推荐使用：

- 在 BGISEQ-500RS 基因测序仪，使用 BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装 (SE50) (货号：1000002072) 进行测序；
- 在 MGISEQ-2000RS 基因测序仪，使用 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50 X) (货号：1000003703) 进行测序；
- 在 MGISEQ-200RS 基因测序仪，使用 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (SE50) (货号：1000004635) 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。

附录

附录 A 关于标签接头的使用

- 试剂套装根据反数提供了 1~48 标签接头，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，挑选了最佳的标签接头组合，但标签接头编号不连续。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录 A-1 的使用规则。编号一致的标签接头，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。
- 标签接头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膜表面；对于管式标签接头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；对于板式标签接头，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。

A-1 标签接头 (01-48) 使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将标签接头成组使用，试剂盒中包含的标签接头 (01-48) 具备如下的分组规则：

4 个标签接头成组：01-04、05-08、09-12、13-16，共计 4 组；

8 个标签接头成组：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如下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

表 20 标签接头 (01-48) 使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	需至少使用 1 组标签接头： 1、加一组 4 标签接头 (如 01-04)，将 4 个标签接头取等体积混合后加入样本中 或 2、加一组 8 标签接头 (如 17-24)，将 8 个标签接头取等体积混合后加入样本中
2	需至少使用 1 组标签接头： 1、加一组 4 标签接头 (如 01-04)，每个编号标签接头取等体积，两两组混合合成 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 标签接头 (如 17-24), 每个编号标签接头取等体积, 每 4 个编号标签接头混合成 1 份 mix, 形成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如将 17-20 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 21-24 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中)
3	需至少使用 2 组标签接头: 样本 1、2 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加标签接头, 样本 3 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加标签接头, 注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的标签接头
4	需至少使用 1 组标签接头: 1、加一组 4 标签接头 (如 01-04), 每个编号标签接头取等体积, 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 标签接头 (17-24), 每个编号标签接头取等体积, 两两组合, 混合成 4 份等体积 mix, 分别加入 4 个样本中 (如 将 17-18、19-20、21-22、23-24 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 组标签接头: 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加标签接头, 样本 5 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加标签接头, 注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的标签接头
6	需至少使用 2 组标签接头: 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组标签接头, 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组标签接头, 注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的标签接头
7	需使用全部 3 组标签接头, 分三步操作: 1) 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组标签接头, 2) 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组标签接头, 3) 样本 7, 使用剩余的一组标签接头, 可以加该组内一个单标签接头, 或者加组内所有编号标签接头取等体积混合成的混合物 注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的标签接头
8	需至少使用 1 组标签接头: 1、加一组 8 标签接头 (如 17-24), 每个编号标签接头取等体积, 分别加入每个样本 或 2、选取两组 4 标签接头 (01-04 和 13-16), 每个编号标签接头取等体积, 每个样本加 1 个标签接头
8n+X (1≤n≤5, x=1-8, 总计 9-48 个)	样本 8n+X, 每 8 个样本一组, 采用上述 (8 样本数/lane) 方法加标签接头, 未成组样本根据 X 的数值, 各加入一个单标签接头, 或者采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加标签接头, 并注意按照对应要求加不同组别的标签接头 注意: 上述每个样本间需使用不同的标签接头

附录 B 关于磁珠及纯化

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吹打，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。

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，应用洗脱缓冲液补齐体积，再用推荐磁珠用量进行纯化，以保证乘数正确，条带正确。
- 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 μL 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，请勿扰动磁珠。
- 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中液体吸干。
- 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 5~10min，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，可用试剂盒附带的洗脱缓冲液进行洗脱。
- 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 μL 。
- 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，建议用手指固定住离心管中下段，然后开盖。

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