

MGIEasy

个体识别文库制备试剂盒使用说明书

货号: 1000020866 (576 RXN)

试剂盒版本号: V2.0

说明书版本号: A2

版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
A2	V2.0	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A1	V2.0	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”
A0	V2.0	2020 年 5 月	V2.0 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：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	2
1.6 客户自备物料清单	3
1.7 注意事项	4
第二章 样本要求及处理	5
2.1 样本要求	5
2.2 样本起始量	5
第三章 文库构建标准流程	6
3.1 干血片样本前处理（非 Elute 形式）及第一轮 PCR 反应	6
3.2 基因组 DNA 样本第一轮 PCR 反应	6
3.3 Elute 形式血卡样本前处理及第一轮 PCR 反应	7
3.4 第一轮 PCR 产物纯化及第二轮 PCR 反应	8
3.5 第二轮 PCR 产物纯化	9
3.6 第二轮 PCR 产物质检	10
第四章 环化及酶切消化	11
4.1 变性	11
4.2 单链环化	11
4.3 酶切消化	12
4.4 酶切消化产物纯化	13
4.5 酶切消化产物质检	13
第五章 测序	14
第六章 数据分析	14
6.1 数据分析	14
6.2 结果判定	14
6.3 检测结果的解释	14

附录	15
附录 A 关于磁珠及纯化	15
附录 B 关于 PCR Dual Barcode Primer 的使用	16

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒V2.0 (货号: 1000020866) 是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的用于人类个体识别遗传标记检测的文库制备试剂盒。本试剂盒可将经过前处理后的干血片样本或gDNA样本, 直接通过两步PCR方法制备成MGI高通量测序平台专用的文库。通过优化的多重PCR技术, 使本试剂在单个反应中完成对131个STR位点、227个SNP位点及线粒体高变区的高通量测序文库制备, 显著提高司法领域各类应用场景的检测效率。本试剂采用双端分子标签技术, 提高了单次测序的样本检测通量。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

本试剂盒仅适用于人类个体识别遗传标记的高通量测序文库制备。

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:

MGISEQ-2000RS (SE400+10+10);

DNBSEQ-G400RS (SE400+10+10)。

1.4 试剂盒组分

本试剂盒包含有1个规格 (576 RXN)。每个试剂盒包含3个独立试剂盒。包含试剂盒、货号、组分信息见表1。

表1 MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 V2.0 (576 RXN) (货号: 1000020866)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 V2.0 (Box1 of 3)	PCR Primer Pool	蓝色	1.3 mL/管×3 管
	PCR Block	蓝色	0.65 mL/管×3 管
	T Buffer	紫色	30 μ L/支×1 支
	S Enzyme	紫色	5 μ L/支×1 支
	Splint Buffer	紫色	28 μ L/支×1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	2.5 μ L/支×1 支
	Digestion Buffer	白色	7 μ L/支×1 支
	Digestion Enzyme	白色	13 μ L/支×1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	38 μ L/支×1 支

MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 V2.0 (Box2 of 3)	PCR Enzyme Mix	/	8.8 mL/瓶×2 瓶
	PCR Dual Barcode Primer F (01~48)	/	32 μ L/孔×48 孔
	PCR Dual Barcode Primer R (01~96)	/	12 μ L/孔×96 孔
MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 V2.0 (Box3 of 3)	Clean Buffer	/	41 mL/瓶×2 瓶
	DNA Clean Beads	/	34 mL/瓶×1 瓶
	TE Buffer	/	24 mL/瓶×1 瓶

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 (Box1 of 3)

- ◆ 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

MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 (Box2 of 3)

- ◆ 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

MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒 (Box3 of 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

*干冰运输, 请注意检查收到产品时是否有干冰剩余。

*冰袋运输, 请注意检查收到产品时冰袋中的冰是否有剩余。

*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 2 客户自备物料清单

仪器	板式封膜机 漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 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) 酶标仪 (BMG Labtech, FLUOstar Omega)
试剂	无水乙醇 (分析纯) 2M NaOH 溶液 Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 1x TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212) Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854) Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. P7589) 2800M Control DNA (PROMEGA, Cat. No. DD7101)
耗材	移液器吸头 96 孔板铝膜 (VITL, Cat. No. V901002) 96 孔板塑料封膜 (泛特津) 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) UV-Star 96-Well Microplates (GREINER BIO-ONE, Cat. No. 655801)

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。
- ◆ 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。
- ◆ 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。
- ◆ 试剂盒各组分使用前提前取出，将酶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仪至反应温度附近。
- ◆ PCR产物因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，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。
- ◆ 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊。
- ◆ 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 样本要求及处理

2.1 样本要求

2.1.1 干血片样本

本试剂盒适用于常见的滤纸或FTA卡片（推荐使用非Elute形式血卡）为载体的干血片样本，不适用于含有强PCR抑制剂的载体所制干血片样本。干血片应两面均有可见血色，并充分干燥，且无霉变，无严重降解，需置于干燥阴凉处保存。

2.1.2 基因组 DNA

推荐使用完整度较好，片段主带大小 $\geq 500\text{bp}$ ，浓度 $\geq 0.25\text{ng}/\mu\text{L}$ 的基因组DNA。基因组DNA样本应置于 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

2.2 样本起始量

根据不同的样本类型，优先推荐按照下表的投入量进行文库构建，以达到最优效果。推荐起始量如下表3。

表 3 样本起始量推荐

样本类型	起始量范围	推荐起始量	推荐浓度
干血片	直径 1~1.2 mm 干血片	直径 1.2 mm 干血片	/
基因组 DNA	0.25~10 ng	1 ng	$\geq 0.25\text{ ng}/\mu\text{L}$

第三章 文库构建标准流程

3.1 干血片样本前处理（非 Elute 形式）及第一轮 PCR 反应



注意：如果样本为基因组 DNA 样本，文库构建流程则从步骤 3.2 开始操作。Elute 形式血卡制成的干血片样本前处理流程推荐从步骤 3.3 开始操作。每次建库建议设置以 2800M 标准品和 NF 水为模板的对照组。

- 3.1.1 使用打孔器在干血片样本中心位置取 1 个直径约 1.2 mm 干血片，将血片置于 0.2 mL 离心管或 96 孔 PCR 板底部。
- 3.1.2 加入 25 μ L Clean Buffer，应确保干血片样本落入液面以下。
- 3.1.3 置于 60°C PCR 仪中孵育 10 分钟。
- 3.1.4 取出离心管或 96 孔 PCR 板短暂离心，应确保干血片样本落入离心管或 96 孔板管底部，用移液器快速吹打 3~5 次后吸弃 20 μ L 上清，再次加入 95 μ L Clean Buffer，快速吹打 6~8 次后（注意应吹起血卡，确保血卡在此步骤被充分清洗，且吹打过程中避免产生气泡），吸弃 93.5 μ L 上清，剩余部分（包括干血片和 6.5 μ L 上清）即为 PCR 反应模板，若此时上清仍呈现淡红色，可吸弃所有上清后回补 6.5 μ L Clean Buffer。
- 3.1.5 在冰上配制第一轮 PCR 反应液（见表 4）
- 3.1.6 用移液器吸取 18.5 μ L 按表 4 配制好的第一轮 PCR 反应混合液直接加入 3.1.4 装有经过前处理干血片样本的离心管或 96 孔板中，用移液器缓慢吹打 3~5 次混匀后，瞬时离心确保将反应液及血卡收集至管底。
- 3.1.7 将步骤 3.1.6 所述离心管或 96 孔板置于 PCR 仪上，按照表 5 的条件进行第一轮 PCR 反应。

3.2 基因组 DNA 样本第一轮 PCR 反应

- 3.2.1 取 0.25~10 ng（推荐投入量 1ng）待测基因组 DNA 于 PCR 管中，补齐 TE Buffer 至体积 6.5 μ L。
- 3.2.2 在冰上配制第一轮 PCR 反应液（见表 4）。
- 3.2.3 用移液器吸取 18.5 μ L 按表 4 配制好的第一轮 PCR 反应混合液直接加入装有基因组 DNA 样本的离心管或 96 孔板中，用移液器缓慢吹打 3~5 次混匀后，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.2.4 将上述所述离心管或 96 孔板置于 PCR 仪上，按照表 5 的条件进行第一轮 PCR 反应。

3.3 Elute 形式血卡样本前处理及第一轮 PCR 反应

- 3.3.1 使用打孔器在干血片样本中心位置取 1 个直径约 1.2 mm 血片，将血片置于 0.2 mL 离心管或 96 孔 PCR 板底部。
- 3.3.2 加入新鲜配制的 25 μ L 0.01M NaOH 溶液，用移液器缓慢吹打 3~5 次将干血片样本润湿后短暂离心，应确保血卡落入液面以下。
- 3.3.3 置于 98°C PCR 仪中孵育 10 分钟。
- 3.3.4 取出 PCR 管，室温冷却 2 min 后，涡旋振荡 3~5 s 后 4000 rpm 离心 2 min，确保血卡落入离心管或 96 孔板管底部，上清即为第一轮 PCR 模板，小心取 1 μ L 上清补齐 TE Buffer 至体积 6.5 μ L，注意不要吸取到沉淀物。
- 3.3.5 在冰上配制第一轮 PCR 反应液（见表 4）。
- 3.3.6 用移液器吸取 18.5 μ L 按表 4 配制好的第一轮 PCR 反应混合液直接加入 3.3.4 步骤取出的装有前处理上清样本的离心管或 96 孔板中，用移液器吹打 3~5 次或涡旋振荡 3~5 s 混匀后，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.3.7 将上述所述离心管或 96 孔板置于 PCR 仪上，按照表 5 的条件进行第一轮 PCR 反应。

表 4 第一轮 PCR 反应混合液

试剂名称	一个反应标准量
PCR Enzyme Mix	12.5 μ L
PCR Primer Pool	6 μ L
Total	18.5 μ L



注意：PCR Primer Pool 使用前务必充分混匀，涡旋振荡 5~6 次，每次 3~5 秒。

表 5 第一轮 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	
98°C	5 min	1 循环
98°C	15 s	
64°C	1 min	14 循环
60°C	1 min	
72°C	30 s	
72°C	2 min	1 循环
4°C	Hold	

- 3.3.8 第一轮 PCR 反应完成后，瞬时离心将反应液收集至管底，每孔吸取 20 μL 上清转移至新的离心管或 96 孔 PCR 板。



注意：不建议在此处停止，请继续做步骤 3.4。如果必须停止，第一轮 PCR 产物可放在 -20°C 冰箱过夜。

3.4 第一轮 PCR 产物纯化及第二轮 PCR 反应



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

- 3.4.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀，分别吸取 24 μL 磁珠加至提前转移至新管的 20 μL 第一轮 PCR 产物中。
- 3.4.2 用移液器快速吹打 8~10 次混合均匀，过程中应避免产生气泡。
- 3.4.3 室温孵育 5 min。
- 3.4.4 置于磁力架，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸弃上清。
- 3.4.5 保持离心管或 96 孔板置于磁力架上，加入 100 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，轻轻吹打 3 次后小心吸弃上清。
- 3.4.6 重复步骤 3.4.5，尽量吸干管内液体，若管内仍残留液体，可短暂离心后用 10 μL 枪头吸净底部残留液体。
- 3.4.7 保持离心管或 96 孔板固定于磁力架上，室温干燥至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.4.8 将离心管或 96 孔板从磁力架上取下，加入 5.5 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱，应保证加入的 TE Buffer 充分浸润磁珠，防止磁珠过分晾干导致 PCR 产物损失。
- 3.4.9 室温静置 5 min。
- 3.4.10 按表 6 并参照 PCR Dual Barcode 排列顺序且保持与样本一一对应的原则配制第二轮 PCR 反应体系，并分别加至 3.4.9 的 PCR 管中，移液器快速吹打 5~8 次或涡旋振荡 3 次，每次 3 s 混匀后，瞬时离心将反应液收集至管底。

表 6 第二轮 PCR 反应混合液

试剂名称	一个反应标准量
PCR Enzyme Mix	12.5 μL
PCR Block	3 μL
PCR Dual Barcode Primer F	2 μL
PCR Dual Barcode Primer R	2 μL
Total	19.5 μL



注意：第二轮 PCR 反应需带磁珠进行反应，无需进行磁力吸附及转移上清。



注意：PCR Block 使用前务必充分混匀，涡旋振荡 5~6 次，每次 3~5 s。



注意：本试剂盒采用双端 barcode 建库，共两种 barcode 引物，分别为 PCR Dual Barcode Primer F(包含 48 个 barcode)、PCR Dual Barcode Primer R(包含 96 个 barcode)，使用前请详细阅读附录 B 关于 PCR Dual Barcode Primer 的使用。

3.4.11 将离心管或 96 孔板移至 PCR 仪，并按表 7 的第二轮 PCR 反应程序进行 PCR 反应。

表 7 第二轮 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	
98°C	5 min	1 循环
98°C	15 s	
64°C	30 s	16 循环
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	2 min	1 循环
4°C	Hold	

3.4.12 第二轮 PCR 反应完成后，振荡使磁珠混合均匀后短暂离心，用移液器转移 20 μL 带有磁珠的反应液至新的 0.2 mL 离心管或 96 孔板进行第二轮纯化。

3.5 第二轮 PCR 产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

3.5.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀，各吸取 22 μL 磁珠至 3.4.12 的离心管或 96 孔板各孔中。

3.5.2 用移液器快速吹打 8~10 次混合均匀，过程中应避免产生气泡。

- 3.5.3 室温孵育 5 min。
- 3.5.4 置于磁力架，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸弃上清。
- 3.5.5 保持离心管或 96 孔板置于磁力架上，加入 100 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，轻轻吹打 3 次后小心吸弃上清。
- 3.5.6 重复步骤 3.5.5，尽量吸干管内液体，若管内仍残留液体，可短暂离心后用 10 μL 枪头吸净底部残留液体。
- 3.5.7 保持离心管或 96 孔板固定于磁力架上，室温干燥至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.5.8 将离心管或 96 孔板从磁力架上取下，加入 23 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器快速吹打至少 10 次至完全混匀，过程中应避免产生气泡。
- 3.5.9 室温下孵育 5 min。
- 3.5.10 将离心管或 96 孔板置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，将 21 μL 上清液转移到新的离心管或 96 孔板中。

✓ **停止点：第二轮 PCR 纯化后产物，可置-20℃冰箱储存。**

3.6 第二轮 PCR 产物质检

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第二轮PCR纯化后产物进行定量。要求最终PCR产物的浓度 $\geq 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。建议根据实际情况设计混合方案，在定量后进行不同Barcode样本混合，混合总量为500 ng，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$ （若文库混合后体积大于48 μL ，可通过真空离心浓缩仪将其浓缩至48 μL ，浓缩温度不宜超过45℃）。



注意：N 个样本文库进行混合，每个样本文库需要相同测序数据量，则将所有文库等质量混合，单个文库取样量(ng)= $500 \text{ ng}/N$ ，单个文库取样体积(μL)= $\text{单个文库取样量}(\text{ng}) / \text{单个文库的浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})$ ，当样本量大时，为减少取样误差，可进行X倍的混合文库方案后，取1/X进行后续的环化步骤。

第四章 环化及酶切消化

4.1 变性

4.1.1 将混合的 500 ng 第二轮 PCR 产物移至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

4.1.2 将步骤 4.1.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 8 的条件进行变性反应：

表 8 变性反应条件

温度	时间
105°C 热盖	On
95°C	5 min

4.1.3 反应结束后，立即将 PCR 管转移到冰上，静置 3 min 后瞬时离心。

4.2 单链环化

4.2.1 在冰上配制环化预处理反应液（见表 9）：

表 9 环化预处理反应液的配制

组分	一个反应标准量
T Buffer	6 μL
S Enzyme	1 μL
Total	7 μL

4.2.2 用移液器吸取 7 μL 配制混匀好的环化预处理反应液加入步骤 4.1.3 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

4.2.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 10 的条件进行环化预处理反应：

表 10 环化预处理反应条件

温度	时间
45°C 热盖	On
37°C	10 min
4°C	Hold

4.2.4 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。

4.2.5 在冰上配制单链环化反应液（见表 11）：

表 11 单链环化反应液的配制

组分	一个反应标准量
Splint Buffer	5.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	6.1 μL

4.2.6 将 6.1 μL 单链环化反应液加入上一步的反应体系中，涡旋振荡 3 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底。

4.2.7 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 12 的条件进行单链环化反应：

表 12 单链环化反应条件

温度	时间
45°C 热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

4.2.8 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。

4.3 酶切消化

4.3.1 在进行步骤 4.2.7 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液(见表 13)：

表 13 酶切消化反应液的配制

组分	一个反应标准量
Digestion Buffer	1.4 μL
Digestion Enzyme	2.6 μL
Total	4 μL

4.3.2 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 4.2.8 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

4.3.3 将步骤上一步所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 14 的条件进行酶切消化反应：

表 14 酶切消化反应条件

温度	时间
45°C 热盖	On
37°C	30 min

4.3.4 瞬时离心将反应液收集至管底。

4.3.5 向 PCR 管中加入 7.5 μ L Digestion Stop Buffer，涡旋振荡 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。

4.4 酶切消化产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

4.4.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。

4.4.2 吸取 170 μ L DNA Clean Beads 至步骤 4.3.5 的 72.6 μ L 酶切消化产物中，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。

4.4.3 室温孵育 10 min。

4.4.4 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。

4.4.5 保持离心管置于磁力架上，加入 500 μ 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。

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 保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥至磁珠表面无反光、无开裂。

4.4.8 将离心管从磁力架上取下，加入 25 μ L TE Buffer 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 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 23 μ 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℃冰箱储存。

4.5 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，要求最终产物总量 ≥ 10 ng，取10 ng酶切消化产物进行DNB制备操作，DNB制备具体操作请参考测序说明书。

第五章 测序

取10 ng酶切消化产物制备成适用于MGISEQ-2000RS或DNBSEQ-G400RS基因测序仪的DNB文库，选择以下测序平台和测序类型进行上机：

- MGISEQ-2000RS 基因测序仪：SE400+10+10
- DNBSEQ-G400RS 基因测序仪：SE400+10+10

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。



注意：本试剂盒所制备的文库进行双 barcode 测序时，需配套测序仪控制软件为 ECR4.0 及以上版本，并搭配本试剂盒所配套的 barcode 列表文件进行拆分，测序前请核对测序仪软件版本并导入本试剂盒配套的 barcode 列表。

第六章 数据分析

6.1 数据分析

司法身份鉴定系统是专门为MGIEasy 个体识别文库制备试剂盒V2.0所设计的配套软件。软件包括数据质控、SNP分析模块、STR分析模块、MT分析模块、样本比较模块、生物祖源与表型预测模块以及报告生成模块部分。通过ZLIMS-华大智造测序平台信息管理系统进行样本输入及报告输出的全流程管理，使用方法简单，对脚本并行化处理，最大限度压缩信息分析周期，可达到快速、高效、准确交付目的。

6.2 结果判定

软件在进行不同分析模块均对结果进行质控并输出相应质控信息以确保结果判定的准确性，详细结果判定标准请查看对应软件说明书。

6.3 检测结果的解释

检测结果包括全部样本的HTML报告，单个样本的HTML报告，详细条目解释请查看司法身份鉴定系统软件说明书。

附录

附录 A 关于磁珠及纯化

推荐使用本试剂盒内的DNA Clean Beads进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，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。

磁珠操作注意事项

- ◆ 待纯化产物及磁珠须准确按要求的体积吸取，若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发减少，应加入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。
- ◆ 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留1~2 μ 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。
- ◆ 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）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。
- ◆ 在1.5 mL磁力架上开关盖应小心，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 B 关于 PCR Dual Barcode Primer 的使用

- ◆ 本试剂盒提供1板PCR Dual Barcode Primer F(01~48)和1板PCR Dual Barcode Primer R(01~96)，两板均为96孔板式规格。每一种PCR Dual Barcode Primer F含有一种对应的Barcode (barcode2) ,每一种PCR Dual Barcode Primer R也含有一种对应的Barcode (barcode1)。Dual Barcode是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，挑选的最佳Barcode组合。为保证最佳效果，使用时请详细阅读附录B的使用规则。
- ◆ 请勿将其置于室温以上的温度，否则易发生降解，影响使用效果。
- ◆ 使用前必须先2000 rpm离心2 min，将液体聚集于板底，并小心撕去封膜后使用，使用过程中注意更换吸头，避免污染。使用完毕后，使用塑料封膜封板（注意不要使用热封膜），-20℃保存。

PCR Dual Barcode Primer 使用规则

- ◆ PCR Dual Barcode Primer F和PCR Dual Barcode Primer R分布图如图1a和图1b所示。基于碱基平衡的设计原则，需分别将PCR Dual Barcode Primer F和PCR Dual Barcode Primer R成组使用，分组规则如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	17	25	33	41						
B	02	10	18	26	34	42						
C	03	11	19	27	35	43						
D	04	12	20	28	36	44						
E	05	13	21	29	37	45						
F	06	14	22	30	38	46						
G	07	15	23	31	39	47						
H	08	16	24	32	40	48						

图 1a. PCR Dual Barcode Primer F 分布图

- ◆ 8个PCR Dual Barcode Primer F成组:01~08、09~16、17~24、25~32、33~40、41~48，共计6组。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	02	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	03	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	04	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	05	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	06	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	07	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

图 1b. PCR Dual Barcode Primer R 分布图

- 8个PCR Dual Barcode Primer R组: 01-08、09-16、17-24、25-32、33-40、41-48、49-56、57-64、65-72、73-80、81-88和89-96, 共计12组。
- 当每个样本数据量要求相同时, 不同样本数目可参考表15的推荐Dual Barcode组合方案。



注意: 为了保证最优的测序质量, 建议1lane至少有8样本进行测序; 若少于8样本进行 pooling 测序, 可能会因为碱基不平衡导致拆分率较低; 另外, 每一行中的 PCR Dual Barcode Primer F 必须与同一行的 PCR Dual Barcode Primer R 搭配使用, 不可串行使用(如 PCR Dual Barcode Primer F 板中的 A 行任意一个 PCR Dual Barcode Primer F 只能与 PCR Dual Barcode Primer R 板中的 A 行任意一个 PCR Dual Barcode Primer R 搭配使用), 否则会造成无法拆分。

表 15 PCR Dual Barcode Primer F 及 PCR Dual Barcode Primer R 使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
8	1. 加一组 8 PCR Dual Barcode Primer F (如 01-08), 每个编号 PCR Dual Barcode Primer F 取等体积, 分别加入每个样本; 2. 加一组 8 PCR Dual Barcode Primer R (如 01-08), 每个编号 PCR Dual Barcode Primer R 取等体积, 分别加入每个样本。
8n+x (1≤n<11, x=1-8, 总计 9-96 个)	样本 8n+x, 每 8 个样本分为一组, x 为未成组的样本数 1. 每组样本分别加入同一列 PCR Dual Barcode Primer F (如样本 1-8 分别加入 PCR Dual Barcode Primer F 01-08, 样本 9-16 也分别加入 PCR Dual Barcode Primer F 01-08, 以此类推); 未成组样本根据 x 的数值, 各加入成组样本所用 PCR Dual Barcode Primer F 组中

的一个单 PCR Dual Barcode Primer F;

2. 每组样本采用上述 (8 样本数/lane) 方法加 PCR Dual Barcode Primer R; 未成组样本根据 x 的数值, 各加入一个单 PCR Dual Barcode Primer R, 并注意按照对应要求加不同组别的 PCR Dual Barcode Primer R。

以建库 70 例样本为例, 每个样本 PCR Dual Barcode 组合如下图所示:

70例样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R01-F01	R09-F01	R17-F01	R25-F01	R33-F01	R41-F01	R49-F01	R57-F01	R65-F01			
B	R02-F02	R10-F02	R18-F02	R26-F02	R34-F02	R42-F02	R50-F02	R58-F02	R66-F02			
C	R03-F03	R11-F03	R19-F03	R27-F03	R35-F03	R43-F03	R51-F03	R59-F03	R67-F03			
D	R04-F04	R12-F04	R20-F04	R28-F04	R36-F04	R44-F04	R52-F04	R60-F04	R68-F04			
E	R05-F05	R13-F05	R21-F05	R29-F05	R37-F05	R45-F05	R53-F05	R61-F05	R69-F05			
F	R06-F06	R14-F06	R22-F06	R30-F06	R38-F06	R46-F06	R54-F06	R62-F06	R70-F06			
G	R07-F07	R15-F07	R23-F07	R31-F07	R39-F07	R47-F07	R55-F07	R63-F07				
H	R08-F08	R16-F08	R24-F08	R32-F08	R40-F08	R48-F08	R56-F08	R64-F08				

采用上述 8n+x 方法加 PCR Dual Barcode Primer F 及 PCR Dual Barcode Primer R, 注意不同样本板应分别加不同列的 PCR Dual Barcode Primer F。

以建库 2 板样本为例, 每个样本 PCR Dual Barcode 组合如下图所示:

板1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R01-F01	R09-F01	R17-F01	R25-F01	R33-F01	R41-F01	R49-F01	R57-F01	R65-F01	R73-F01	R81-F01	R89-F01
B	R02-F02	R10-F02	R18-F02	R26-F02	R34-F02	R42-F02	R50-F02	R58-F02	R66-F02	R74-F02	R82-F02	R90-F02
C	R03-F03	R11-F03	R19-F03	R27-F03	R35-F03	R43-F03	R51-F03	R59-F03	R67-F03	R75-F03	R83-F03	R91-F03
D	R04-F04	R12-F04	R20-F04	R28-F04	R36-F04	R44-F04	R52-F04	R60-F04	R68-F04	R76-F04	R84-F04	R92-F04
E	R05-F05	R13-F05	R21-F05	R29-F05	R37-F05	R45-F05	R53-F05	R61-F05	R69-F05	R77-F05	R85-F05	R93-F05
F	R06-F06	R14-F06	R22-F06	R30-F06	R38-F06	R46-F06	R54-F06	R62-F06	R70-F06	R78-F06	R86-F06	R94-F06
G	R07-F07	R15-F07	R23-F07	R31-F07	R39-F07	R47-F07	R55-F07	R63-F07	R71-F07	R79-F07	R87-F07	R95-F07
H	R08-F08	R16-F08	R24-F08	R32-F08	R40-F08	R48-F08	R56-F08	R64-F08	R72-F08	R80-F08	R88-F08	R96-F08

N 个 96 孔板
(N=1~6)

板2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R01-F09	R09-F09	R17-F09	R25-F09	R33-F09	R41-F09	R49-F09	R57-F09	R65-F09	R73-F09	R81-F09	R89-F09
B	R02-F10	R10-F10	R18-F10	R26-F10	R34-F10	R42-F10	R50-F10	R58-F10	R66-F10	R74-F10	R82-F10	R90-F10
C	R03-F11	R11-F11	R19-F11	R27-F11	R35-F11	R43-F11	R51-F11	R59-F11	R67-F11	R75-F11	R83-F11	R91-F11
D	R04-F12	R12-F12	R20-F12	R28-F12	R36-F12	R44-F12	R52-F12	R60-F12	R68-F12	R76-F12	R84-F12	R92-F12
E	R05-F13	R13-F13	R21-F13	R29-F13	R37-F13	R45-F13	R53-F13	R61-F13	R69-F13	R77-F13	R85-F13	R93-F13
F	R06-F14	R14-F14	R22-F14	R30-F14	R38-F14	R46-F14	R54-F14	R62-F14	R70-F14	R78-F14	R86-F14	R94-F14
G	R07-F15	R15-F15	R23-F15	R31-F15	R39-F15	R47-F15	R55-F15	R63-F15	R71-F15	R79-F15	R87-F15	R95-F15
H	R08-F16	R16-F16	R24-F16	R32-F16	R40-F16	R48-F16	R56-F16	R64-F16	R72-F16	R80-F16	R88-F16	R96-F16

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