

ATOplex

RNA 多重 PCR 建库试剂盒套装 V3.1

使用说明书

货号：940-000132-00 (16RXN)

940-000133-00 (96RXN)

试剂盒版本号：V3.1

说明书版本号：2.0

版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
2.0	V3.1	2022 年 4 月	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 升级了内参引物池 V3.1 ◆ 修改了 PCR 反应条件 ◆ 删除了建库流程图 ◆ 减少制备 DNB 投入的连接产物量 ◆ 增加了 DNBSEQ-E5RS 测序平台
1.0	V3.0	2021 年 12 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。

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 试剂盒组分	2
1.4 试剂盒储存条件及有效期	4
1.5 客户自备物料清单.....	5
1.6 注意事项.....	6
第二章 样本要求及处理	7
2.1 样本要求.....	7
2.2 样本保存和运输	7
第三章 文库构建标准流程	8
3.1 反转录	8
3.2 PCR 反应.....	8
3.3 PCR 产物纯化.....	9
3.4 Fast PCR-Free 建库试剂准备	10
3.5 打断末端修复.....	11
3.6 打断产物快速纯化.....	12
3.7 接头连接.....	13
3.8 连接产物纯化.....	14
第四章 测序	16
4.1 DNB 制备.....	16
4.2 测序.....	16
附录	17
附录 A 关于磁珠及纯化.....	17
附录 B 关于 Adapter 使用	18
附录 C 关于接头连接反应	20

第一章 产品信息

1.1 产品描述

本说明书是针对基于华大智造（MGI）ATOplex定制产品平台打造的ATOplex RNA多重PCR建库试剂盒套装V3.1的操作说明书，它仅适用于使用本文所述产品的相关用户。产品采用多重RT-PCR技术，在两管内完成对RNA靶区域的捕获和富集，搭配MGIEasy Fast PCR-FREE酶切文库制备试剂套装和DNBSEQ一步法 DNB制备试剂盒将产物制备成兼容华大智造测序平台的DNA纳米球，通过高通量测序得到靶区域的数据。本试剂盒中双端独立标签PF接头能够降低标签串扰的比例，降低错误率，同时建库采用了PCR产物污染清除技术，可以有效地避免假阳性的形成。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

本说明书适用于各种样本类型，包括血液、组织、口咽和鼻咽拭子等样本提取的总RNA。

文库进行双barcode测序，推荐使用DNBSEQ-E5RS、MGISEQ-200RS和MGISEQ-2000RS高通量测序试剂盒的“SE100”测序。推荐搭配使用的测序套装和试剂盒详见第四章。

1.3 试剂盒组分

ATOPlex RNA多重PCR建库试剂盒套装V3.1有2个规格，分别是16 RXN和96 RXN。每个试剂套装包含5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 1-1 ATOPlex RNA 多重 PCR 建库试剂盒套装 V3.1 (16 RXN)(货号：940-000132-00)

套装种类与货号	试剂盒种类与货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
ATOPlex RNA 多重PCR扩增 试剂盒套装 V3.1 货号：940- 000119-00	ATOPlex RNA 多重 PCR扩增模块 货号：940-000128- 00	PCR Enzyme Mix	蓝色	384 μ L /支 \times 1支	
		PCR Clean Enzyme	白色	16 μ L /支 \times 1支	
		PCR Additive	黄色	16 μ L /支 \times 1支	
		N6 Buffer	绿色	64 μ L /支 \times 1支	
		RT Buffer	绿色	80 μ L /支 \times 1支	
		RT Enzyme Mix	绿色	16 μ L /支 \times 1支	
		内参引物池 V3.1	PCR Primer Pool 1 V3.1	蓝色	32 μ L /支 \times 1支
		货号：940-000333- 00	PCR Primer Pool 2 V3.1	蓝色	32 μ L /支 \times 1支
	MGIEasy Fast PCR-FREE 酶 切文库制备试剂 套装 货号：940- 000019-00	MGIEasy Fast PCR-FREE酶切文 库制备模块 货号：940-000017- 00	20x Elute Enhancer	黑色	5 μ L/支 \times 1支
			Fast FS Buffer	绿色	180 μ L/支 \times 1支
Fast FS Enzyme			绿色	90 μ L/支 \times 1支	
Fast Ligation Buffer			红色	391 μ L/支 \times 1支	
Ad Ligase			红色	85 μ L/支 \times 1支	
Ligation Enhancer			棕色	34 μ L/支 \times 1支	
		MGIEasy 双端独立 标签PF接头试剂盒 货号：940-000018- 00	UDB Adapters	蓝色	5 μ L/支 \times 16支
		MGIEasy DNA纯化 磁珠试剂盒 货号：1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1支
		TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1支	

表 1-2 ATOplex RNA 多重 PCR 建库试剂盒套装 V3.1 (96 RXN) (货号: 940-000133-00)

套装种类与货号	试剂盒种类与货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
ATOplex RNA 多重PCR扩增试剂盒套装 V3.1 货号: 940-000135-00		PCR Enzyme Mix	蓝色	1200 μ L /支 \times 2支	
	ATOplex RNA 多重PCR扩增模块	PCR Clean Enzyme	白色	96 μ L /支 \times 1支	
		PCR Additive	黄色	96 μ L /支 \times 1支	
	货号: 940-000127-00		N6 Buffer	绿色	384 μ L /支 \times 1支
			RT Buffer	绿色	480 μ L /支 \times 1支
			RT Enzyme Mix	绿色	96 μ L /支 \times 1支
货号: 940-000135-00	内参引物池 V3.1	PCR Primer Pool 1 V3.1	蓝色	192 μ L /支 \times 1支	
	货号: 940-000334-00	PCR Primer Pool 2 V3.1	蓝色	192 μ L /支 \times 1支	
货号: 1000005278	MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1支	
		TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1支	
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 货号: 940-000021-00		20x Elute Enhancer	黑色	15 μ L/支 \times 1支	
	MGIEasy Fast PCR-FREE酶切文库制备模块	Fast FS Buffer	绿色	1360 μ L/支 \times 1支	
		Fast FS Enzyme	绿色	600 μ L/支 \times 1支	
	货号: 940-000020-00		Fast Ligation Buffer	红色	1360 μ L/支 \times 3支
			Ad Ligase	红色	600 μ L/支 \times 1支
			Ligation Enhancer	棕色	320 μ L/支 \times 1支
货号: 1000005278		TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 2支	
	MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒A	UDB Adapters A	无色	96 \times 5 μ L	
货号: 1000005278	MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 \times 2盒	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1支	
		TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1支	

1.4 试剂盒储存条件及有效期

ATOplex RNA多重PCR扩增模块

- ◆ 储存温度：-25 °C ~ -15 °C
- ◆ 有效期：见试剂盒标签
- ◆ 运输条件：干冰运输

内参引物池 V3.1

- ◆ 储存温度：-25 °C ~ -15 °C
- ◆ 有效期：见试剂盒标签
- ◆ 运输条件：干冰运输

MGIEasy Fast PCR-FREE酶切文库制备模块

- ◆ 储存温度：-25 °C ~ -15 °C
- ◆ 有效期：见试剂盒标签
- ◆ 运输条件：干冰运输

MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒

- ◆ 储存温度：-25 °C ~ -15 °C
- ◆ 有效期：见试剂盒标签
- ◆ 运输条件：干冰运输

MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒A

- ◆ 储存温度：-25 °C ~ -15 °C
- ◆ 有效期：见试剂盒标签
- ◆ 运输条件：干冰运输

MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒

- ◆ 储存温度：2 °C ~ 8 °C
- ◆ 有效期：见试剂盒标签
- ◆ 运输条件：冰袋运输

*干冰运输，收到产品时请注意检查干冰是否还有剩余。

*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。

1.5 客户自备物料清单

表 1-3 客户自备物料清单

仪器	漩涡混匀仪 小型离心机 微孔板离心机 移液器 PCR 仪 96 孔板磁力架 (ALPAQUA, Cat. No.: A00400) 1.5 mL 管磁力架 (Thermo Fisher, Cat. No.: 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (Thermo Fisher, Cat. No.: Q33216)
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No.: AM9937) 1x TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No.: AM9858) 无水乙醇 (分析纯) Qubit ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No.: Q10212) Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No.: Q32854)
耗材	移液器吸头 1.5 mL 离心管 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 0.5 mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No.: PCR-05-C)

1.6 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。
- ◆ 试剂套装各组分使用前提前取出，将 Enzyme 上下颠倒充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。其他 buffer 组分子于室温解冻后涡旋充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- ◆ 为避免样本交叉污染，除 DNB 制备的全流程步骤推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头，如果不使用滤芯吸头，可能会有污染的风险。



- 注意：**PCR 产物如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，我们推荐将操作区物理隔离为两个区：前区进行 RNA 反转录与多重 PCR 扩增的试剂配制和加样，多重 PCR 产物纯化试剂与 Fast PCR-Free 文库构建的试剂配制；后区进行多重 PCR 扩增反应，多重产物移液、纯化、定量与均一化，Fast PCR-Free 文库构建、定量、均一化或混合，DNB 试剂配制和 DNB 制备等操作等操作。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。
- ◆ 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。
 - ◆ 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

适用于多种类型样本提取的总RNA，起始体积10 μ L，包括血液、口咽和鼻咽拭子等样本。

推荐使用以下提取试剂盒进行不同情景下样本RNA提取：

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 货号: 52904/ 52906):

适合手工操作，采用柱式提取法。

- 核酸提取试剂 (MGI, 货号: 1000023878 (VDR02P-96)、1000023938 (VDR03P-32)):

仅适用于自动化操作，采用磁珠提取法。搭配MGISP-960仪器可一次对96个样本进行RNA自动化提取。

 **注意：其他非推荐的提取试剂盒提取的 RNA 未经过验证，不能确保建库或测序成功，请优先选择以上推荐的提取试剂盒。**

2.2 样本保存和运输

- 样本需在冷冻条件下保存：在-20°C保存不超过1周，在-70°C保存不超过6个月。提取的RNA在-70°C保存不超过1周。
- 样本需在冷冻条件下运输。避免在运输过程中反复冻融导致RNA样本降解。

第三章 文库构建标准流程

3.1 反转录

-  **注意：**反转录与步骤 3.2 PCR 反应液配制在前区进行操作。以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。
-  **注意：**每个样本反转录反应后分成两份，分别用 PCR Primer Pool 1 V3.1 和 PCR Primer Pool 2 V3.1 进行 PCR 反应，PCR 反应完成后合并成一管进行纯化。

3.1.1 取 ATOplex RNA 多重 PCR 通用建库模块和内参引物池待用。将 N6 Buffer 和 RT Buffer 从试剂盒中取出，解冻后颠倒混匀。根据所需反应数按照表 3-1 中的配方在冰上配制反转录反应液。

表 3-1 反转录反应液的配制

组分	单个反应体积
N6 Buffer	4 μ L
RT Buffer	5 μ L
RT Enzyme Mix	1 μ L
Total	10 μ L

- 3.1.2 取 1 个新的 0.2 mL PCR 管，标记样本名称，用移液器吸取 10 μ L 配制好的反转录反应液加入管中，再加入 10 μ L 待测 RNA 样品，吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.1.3 将步骤 3.1.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 3-2 中的条件进行反应。

表 3-2 反转录反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
25°C	5 min
42°C	20 min
95°C	5 min
4°C	Hold

3.1.4 反应结束后，瞬时离心 10 s，将产物置于冰上待用。

3.2 PCR 反应

3.2.1 对于每个样本，取 2 个新的 0.2 mL PCR 管，标记为 SampleID-1, SampleID-2，按照表 3-3 配方在冰上配制两管 PCR 反应液，分别使用 PCR Primer Pool 1 V3.1 或 PCR Primer Pool 2 V3.1 进行扩增。

表 3-3 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	12 μ L
PCR Clean Enzyme	0.5 μ L
PCR Additive	0.5 μ L
PCR Primer Pool 1 V3.1 or PCR Primer Pool 2 V3.1	2 μ L
Total	15 μ L

 **注意：** PCR Primer Pool 1 V3.1 和 PCR Primer Pool 2 V3.1，使用前务必充分混匀，涡旋震荡 5-6 次，每次 3-5 s。

3.2.2 用移液器将步骤 3.1.4 中的 20 μ L 产物一分为二，分别吸取 10 μ L 加入步骤 3.2.1 的两个配制好的 PCR 反应液的 0.2 mL 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。

3.2.3 将步骤 3.2.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照 3-4 中的条件进行反应。反应总体积 25 μ L。

 **注意：** PCR 反应至后面步骤需要在后区进行，105°C 热盖。

3-4 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
37°C	5 min	1 循环
95°C	5 min	
95°C	10 s	35 循环
62°C	1 min	
58°C	1 min	
72°C	20 s	
72°C	1 min	1 循环
4°C	Hold	1 循环

3.2.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

 **注意：** 不可在此处停止，请继续做步骤 3.3。

3.3 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。

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

- 3.3.2 取 1 个新的 0.2 mL PCR 管, 标记样本名称, 用移液器吸取 75 μ L DNA Clean Beads 至管中。
- 3.3.3 再将步骤 3.2.4 中的同一个样本的产物 1 和产物 2 转移到步骤 3.3.2 管中 (共 50 μ L 产物), 将移液器量程调至 100 μ L 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离心管中。
- 3.3.4 室温孵育 5 min。
- 3.3.5 将 PCR 管瞬时离心, 置于磁力架上, 静置 2~5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取上清并丢弃。
- 3.3.6 保持 PCR 管置于磁力架上, 加入 160 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.3.7 重复步骤 3.3.6, 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, 待磁珠与液体在磁力架上分离后, 用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.3.8 保持 PCR 管置于磁力架上, 打开管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.3.9 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 32 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。
- 3.3.10 室温下孵育 5 min。
- 3.3.11 将 PCR 管瞬时离心, 置于磁力架上, 静置 2~5 min 至液体澄清, 用移液器吸取 30 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- 3.3.12 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。要求样本文库浓度 \geq 5 ng/ μ L。

✓ **停止点: PCR 产物纯化后可置-20°C 冰箱储存一周。**

3.4 Fast PCR-Free 建库试剂准备

- 3.4.1 按照表 3-5 配方准备 1 \times Elute Enhancer, 室温存储条件下, 7 天内可用。20 \times Elute Enhancer 首次使用后, 置于 10°C~30°C 储存。

表 3-5 1 x Elute Enhancer 的配制

组分	体积
20 x Elute Enhancer	2 μL
Nuclease free water	38 μL
Total	40 μL

3.4.2 按照表 3-6 配方准备 En-TE，4°C 存储条件下，7 天内可用。

表 3-6 En-TE 的配制

组分	体积
1 x Elute Enhancer	4.8 μL
TE Buffer	2395.2 μL
Total	2400 μL

3.4.3 按照表 3-7 配方准备 En-Beads，4°C 存储条件下，7 天内可用。

表 3-7 En-Beads 的配制

组分	体积
1 x Elute Enhancer	30 μL
DNA Clean Beads	2970 μL
Total	3000 μL

 **注意：**表 3-5 至表 3-7 试剂满足大约 20 个样本建库需求，若有更多样本，可按试剂需求等比例放大配制。

3.5 打断末端修复

3.5.1 提前取出 Fast FS Buffer 溶解并涡旋混匀，Fast FS Enzyme 上下颠倒，并轻弹底部混匀 10 次以上，轻弹时保证管底无试剂残留（禁止涡旋振荡），瞬时离心后置于冰上备用。

 **注意：**混匀不充分会影响打断效果，请严格按照说明操作。

3.5.2 提前设置 PCR 程序并运行。按照表 3-9 反应条件，提前在 PCR 仪上设置反应 PCR 程序并运行：第 1 步（4°C，Hold），总反应体积 60 μL 。

3.5.3 根据所需反应数，按照下表配方在冰上配制打断末端修复反应液。

表 3-8 打断末端修复反应液的配制

组分	单个反应体积
Fast FS Buffer	10 μ L
Fast FS Enzyme	5 μ L
Total	15 μ L

3.5.4 取一个新的 0.2 mL PCR 管，用移液器吸取 15 μ L 配制好的打断末端修复反应液加入管中，再根据步骤 3.3.12 PCR 产物浓度取 200 ng 产物至管中，若 100ng < 产物量 < 200ng，建议全部投入风险建库。用 TE Buffer 补充至总体积 60 μ L，涡旋振荡 3 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底，置于冰上。

3.5.5 确保步骤 3.5.2 设置的 PCR 程序第一步的温度已降至 4°C，将样本置于 PCR 仪中，**跳过第一步 (4°C Hold)**，按照下表中的条件进行反应。

表 3-9 打断末端修复反应条件

温度	时间
热盖 (70° C)	on
4° C	Hold
4° C	1 min
30° C	12 min
65° C	20 min
4° C	Hold

3.5.6 反应结束后，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 3.6。**

3.6 打断产物快速纯化

 **注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

3.6.1 提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。

3.6.2 用移液器吸取 60 μ L En-Beads 至步骤 3.5.6 中的打断末端修复产物中，将移液器量程调至 100 μ L 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离心管中。

3.6.3 室温孵育 5 min。

3.6.4 将 PCR 管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。

- 3.6.5 保持 PCR 管置于磁力架上，加入 160 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。
- 3.6.6 重复步骤 3.6.5，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，待磁珠与液体在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.6.7 保持 PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.6.8 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μL En-TE 进行 DNA 洗脱。

 **注意：接头连接反应带磁珠进行反应，产物无需进行磁力吸附和转移上清。**

3.7 接头连接

 **注意：操作前请仔细阅读附录 B。**

- 3.7.1 提前取出 UDB Adapters、Fast Ligation Buffer 溶解并涡旋混匀，Ad Ligase 上下颠倒 5–10 次至充分混匀后，均瞬时离心后置于冰上备用。
- 3.7.2 参照 UDB Adapters 使用规则（参见附录 B），在步骤 3.6.8 的 PCR 管中加入 5 μL 对应的 UDB Adapters。
- 3.7.3 根据所需反应数，在冰上配制接头连接反应液（见表 3-10）。涡旋振荡 6 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底，快速离心后至于冰上。

表 3-10 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Fast Ligation Buffer	23 μL
Ad Ligase	5 μL
Ligation Enhancer	2 μL
Total	30 μL

- 3.7.4 用移液器缓慢吸取 30 μL 配制好的接头连接反应液加入步骤 3.7.2 的 PCR 管中，涡旋振荡 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，操作时请慢吸慢放，确保加液量正确；涡旋振荡多次确保反应体系充分混匀。**

- 3.7.5 将步骤 3.7.4 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照下表中的条件进行反应。总反应体积 80 μL 。

表 3-11 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	On
25°C	10 min
4°C	Hold

3.7.6 反应结束后，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 3.8。

3.8 连接产物纯化

 **注意：**操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

3.8.1 参考附录 A 步骤，提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温，使用前充分荡荡混匀。

3.8.2 用移液器吸取 20 μ L En-TE 和 20 μ L En-Beads 至步骤 3.7.6 中的接头连接产物 PCR 管中，将移液器量程调至 100 μ L 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离心管中。

3.8.3 室温孵育 5 min。

3.8.4 将 PCR 管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。

3.8.5 保持 PCR 管置于磁力架上，加入 160 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。

3.8.6 重复步骤 3.8.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心，待磁珠与液体在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。

3.8.7 保持 PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.8.8 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 20 μ L En-TE 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。

3.8.9 用移液器吸取 20 μ L En-Beads 至步骤 3.8.8 中的 PCR 管中，并轻轻吹打至少 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离心管中。

3.8.10 室温孵育 5 min。

3.8.11 将 PCR 管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。

- 3.8.12 保持 PCR 管置于磁力架上，加入 160 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。
- 3.8.13 重复步骤 3.8.12，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心，待磁珠与液体在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.8.14 保持 PCR 管置于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.8.15 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 27 μL En-TE 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 3.8.16 室温下孵育 5 min。
- 3.8.17 将 PCR 管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器吸取 25 μL 上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中。
- 3.8.18 取 1 μL 上清液用于定量检测。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连接纯化产物进行定量和记录，浓度 \geq 0.8 ng/ μL 。

✓ **停止点：**纯化后产物可置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存一个月。

第四章 测序

4.1 DNB 制备

按所需测序数据量比例取相应体积的连接产物进行混合，每次 DNB 制备所需连接产物为 15 ng。如果文库在 MGISEQ-2000RS 和 MGISEQ-200RS 平台测序，按照 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB) (货号: 1000026466) 说明书进行 DNB 制备。如果文库在 DNBSEQ-E5RS 平台测序，按照 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB) (货号: 940-000036-00) 说明书进行 DNB 制备，其中 DNB 反应条件 2 中滚环扩增时间可由 40min 缩短为 25min。

4.2 测序

DNB文库推荐搭配DNBSEQ-E5RS、MGISEQ-200RS和MGISEQ-2000RS高通量测序试剂盒的“SE100”测序套装和试剂盒进行测序。DNBSEQ-E5RS进行单Barcode测序，选择单端100bp测序类型进行上机；MGISEQ-200RS和MGISEQ-2000RS进行双Barcode测序需搭配CPAS 条形码引物 4 试剂盒：（货号：1000014048），选择SE100+10+10的测序类型进行上机。

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测序时，需搭配本试剂盒所配套的 Barcode 列表文件夹 *UDB_PF_Adapter_A (385-480)* 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 列表文件夹。

附录

附录 A 关于磁珠及纯化

- ◆ 本试剂套装推荐使用套装内的MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 (MGI, Cat. No.: 1000005278) 的 DNA Clean Beads进行磁珠纯化。

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。
- ◆ 磁珠用量直接影响纯化到的DNA片段的下限长度。磁珠用量越高，纯化到的DNA片段下限长度越小。

磁珠操作注意事项

- ◆ 本产品推荐使用96孔板磁力架或其他0.2 mL PCR管磁力架进行磁珠纯化。若使用1.5mL离心管，磁力架需在纯化前将全部反应样本从0.2 mL PCR管转移至1.5 mL离心管中，且此步骤会造成纯化损失，尤其在酶切消化产物纯化过程中，此操作会造成大约20%左右的纯化损失。
- ◆ 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，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）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 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1.5 mL离心管中下段，然后开盖。

附录 B 关于 Adapter 使用

- ◆ 试剂套装根据反应数不同提供2种不同规格的双barcode Adapter试剂盒：MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒（16RXN）和MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒A（96RXN）三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。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录B 1~3的使用规则。同时，三款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。
- ◆ 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。
- ◆ 使用前必须先离心将液体聚集于管底/板底，轻柔地揭开管盖/可穿刺膜，防止液体飞溅，避免交叉污染；使用时需用移液器吸打混匀液体；使用完毕后需及时盖好管盖/可穿刺膜。对于板式Adapters，如果发生意外导致可穿刺膜被污染，应立即弃去，用PCR封板膜重新封膜。
- ◆ 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。

附录 B-1 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒（16RXN）介绍

- ◆ 管式：共16管UDB Adapters，8个为一组碱基平衡的barcode组合，第一组为UDB Adapter-393 ~ UDB Adapter-400，第二组为UDB Adapter-401 ~ UDB Adapter-408



图B-1 MGIEasy 双端独立标签PF接头试剂盒（16RXN）孔位
（第1组 barcode：蓝框，第2组 barcode：红框）

附录 B-2 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A（96RXN）介绍

- ◆ 板式：96个UDB Adapters。
- ◆ UDB Adapters A：每列8个为一组碱基平衡的barcode组合，每板各12列。

表 B-1 UDB Adapters A 孔位

UDB Adapters A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB-385	UDB-393	UDB-401	UDB-409	UDB-417	UDB-425	UDB-433	UDB-441	UDB-449	UDB-457	UDB-465	UDB-473
B	UDB-386	UDB-394	UDB-402	UDB-410	UDB-418	UDB-426	UDB-434	UDB-442	UDB-450	UDB-458	UDB-466	UDB-474
C	UDB-387	UDB-395	UDB-403	UDB-411	UDB-419	UDB-427	UDB-435	UDB-443	UDB-451	UDB-459	UDB-467	UDB-475
D	UDB-388	UDB-396	UDB-404	UDB-412	UDB-420	UDB-428	UDB-436	UDB-444	UDB-452	UDB-460	UDB-468	UDB-476
E	UDB-389	UDB-397	UDB-405	UDB-413	UDB-421	UDB-429	UDB-437	UDB-445	UDB-453	UDB-461	UDB-469	UDB-477
F	UDB-390	UDB-398	UDB-406	UDB-414	UDB-422	UDB-430	UDB-438	UDB-446	UDB-454	UDB-462	UDB-470	UDB-478
G	UDB-391	UDB-399	UDB-407	UDB-415	UDB-423	UDB-431	UDB-439	UDB-447	UDB-455	UDB-463	UDB-471	UDB-479
H	UDB-392	UDB-400	UDB-408	UDB-416	UDB-424	UDB-432	UDB-440	UDB-448	UDB-456	UDB-464	UDB-472	UDB-480

附录 B-3 UDB Adapters 混合指南

- ◆ DNBSEQ测序平台，MGISEQ测序平台推荐每次保证测序碱基平衡，双端独立标签PF接头试剂盒和双端独立标签PF接头试剂盒A/B的板位中是8个为一组预设平衡碱基barcode组合。当样本数据量要求相同时，推荐按照表B-2 双barcode 混合规则进行混合。

表B-2 双barcode 混合规则

混合数	使用方法
8X	使用 X 列 barcode
8X+1	使用 X 列 barcode+其他列任意 1 个 barcode
8X+2	使用 X 列 barcode+其他列任意 2 个 barcode
8X+3	使用 X 列 barcode+其他列任意 3 个 barcode
8X+4	使用 X 列 barcode+其他列任意 4 个 barcode
8X+5	使用 X 列 barcode+其他列任意 5 个 barcode
8X+6	使用 X 列 barcode+其他列任意 6 个 barcode
8X+7	使用 X 列 barcode+其他列任意 7 个 barcode

- ◆ 如遭遇特殊情况(如1个孔位的试剂不足),以至于无法满足常规混合至少有1组barcode组合的要求,或当样本数据量要求不不同时,则需要通过对每测序cycle下各碱基含量进行计算来确定混合方案。需遵循在一条lane中每个测序位置均保证单个碱基含量不低于12.5%,不高于62.5%,如表B-3,成组的8个barcode各碱基含量符合要求;如表B-4,不成组的9个barcode某个碱基含量不合格,将导致拆分率下降。

表 B-3 成组的 8 个 barcode 各碱基占比

Sample 1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	A
Sample 2	C	T	G	A	A	C	C	G	A	A
Sample 3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample 4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample 5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample 6	C	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample 7	T	T	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample 8	G	G	A	T	G	C	T	A	C	C
各碱基含量(%)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

表 B-4 不成组的 9 个 barcode 各碱基含量（不含有成组的 barcode 组合，不可用）

Sample 1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	T
Sample 2	A	C	G	A	A	G	G	T	C	C
Sample 3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample 4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample 5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample 6	G	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample 7	T	G	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample 8	G	G	A	T	G	A	T	A	C	C
Sample 9	G	A	C	G	G	T	C	G	A	G
A碱基含量(%)	33.3	33.3	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	22.2	22.2	0
T碱基含量(%)	22.2	0	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	33.3	22.2	33.3
C碱基含量(%)	0	33.3	33.3	22.2	22.2	0	22.2	22.2	33.3	33.3
G碱基含量(%)	44.4	33.3	22.2	33.3	33.3	33.3	33.3	22.2	22.2	33.3

附录 C 关于接头连接反应

- ◆ 接头连接反应液中含有较高浓度的PEG，溶液较粘稠，移液器操作时请慢吸慢放，确保加液量正确。
- ◆ 由于PEG的存在，接头连接产物纯化磁珠乘数可以适当减少，推荐使用20 μ L 磁珠进行纯化。若增加磁珠使用量，可能会回收部分接头二聚物。

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