

MGI Easy

酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂套装使用说明书

货号: 1000013454 (16 RXN), 1000013455 (96 RXN)

试剂盒版本号: V1.1 (16 RXN), V1.2 (96 RXN)

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	V1.1 (16 RXN) V1.2 (96RXN)	2020年5月	<ul style="list-style-type: none"> 更新 96 RXN 试剂盒版本为 V1.2 更新表 2 中 MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂盒中各组分的规格。
A1	V1.1	2019年11月	<ul style="list-style-type: none"> 更新试剂盒版本为 V1.1; 降低基因组 DNA 起始量要求 (最低至 50ng) 增加产品适用范围 (WGA DNA); 增加 DNA 打断产物一步法磁珠纯化条件, 对应步骤 3.3.2; 增加产品适配测序平台 (MGISEQ-200RS PE100、DNBSEQ-T7RS PE100); 更改 3.2.2、3.5.5、3.8.3 步骤的反应时间; 更改 3.1.2 步骤 En-TE 的配制体积(表 6); 更改 3.10.8 步骤低起始量文库 elute 体积; 更新连接产物定量合格的标准。
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：www.mgitech.cn/download/files

Doc. #: B02-128-A2

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.....	2
1.5 试剂盒储存条件及有效期.....	4
1.6 客户自备物料清单.....	5
1.7 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 文库插入大小要求.....	7
第三章 文库构建标准流程.....	8
3.1 试剂准备.....	8
3.2 DNA 酶切打断.....	9
3.3 DNA 打断产物片段纯化.....	12
3.4 末端修复.....	15
3.5 接头连接.....	16
3.6 连接产物纯化.....	17
3.7 变性.....	18
3.8 单链环化.....	18
3.9 酶切消化.....	19
3.10 酶切消化产物纯化.....	19
3.11 酶切消化产物质检.....	20
附录.....	22
附录 A 关于磁珠及纯化.....	22
附录 B 关于 Adapter 使用.....	24
附录 C 关于接头连接反应.....	28
附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算.....	28

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy酶切PCR-Free DNA文库制备试剂套装是针对华大智造(MGI)高通量测序平台量身打造的WGS PCR-free文库构建试剂套装。本试剂套装可快速将50 ng ~ 1000 ng基因组DNA制备成MGI高通量测序平台专用的文库。本试剂盒采用高质量的快速打断酶,改进接头连接技术,显著提高文库转化率。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

本试剂套装适用于常见的动物、植物、真菌、细菌等物种,例如人(血液、唾液、新鲜组织)、水稻、光滑念珠菌、大肠杆菌等,还适用于WGA DNA。不同类型样本在建库之前需进行酶切打断条件测试,以达到最佳打断效果。

1.3 适配测序平台

构建的文库可使用以下测序平台及测序类型进行测序:

BGISEQ-500RS (PE100)

MGISEQ-200RS (PE100)

MGISEQ-2000RS (PE100/PE150)

DNBSEQ-T7RS (PE100)

1.4 试剂盒组分

MGIEasy 酶切PCR-Free DNA文库制备试剂套装有2个规格，分别是16 RXN和96 RXN。每个试剂套装包含3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 MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂套装 V1.1 (16 RXN) (货号：1000013454)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂盒 V1.1 货号：1000013458	20x Elute Enhancer	黑色	3 μ L/支× 1 支
	FS Buffer	绿色	80 μ L/支× 1 支
	FS Enzyme Mix	绿色	160 μ L/支× 1 支
	ER Buffer	橙色	112 μ L/支× 1 支
	ER Enzyme Mix	橙色	48 μ L/支× 1 支
	Ad-Lig Buffer	红色	288 μ L/支× 1 支
	Ad Ligase	红色	80 μ L/支× 1 支
	Ligation Enhancer	棕色	32 μ L/支× 1 支
	Cir Buffer	紫色	184 μ L/支× 1 支
	Cir Enzyme Mix	紫色	8 μ L/支× 1 支
	Exo Buffer	白色	23 μ L/支× 1 支
	Exo Enzyme Mix	白色	42 μ L/支× 1 支
	Exo Stop Buffer	白色	48 μ L/支× 1 支
MGIEasy PF Adapters-16 (管式) 试剂盒 货号：1000013460	DNA Adapters	无色	5 μ L/支× 16 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号：1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支× 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支× 1 支

表 2 MGI Easy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂套装 V1.2 (96 RXN) (货号: 1000013455)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGI Easy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂盒 V1.2 货号: 1000013459	20x Elute Enhancer	黑色	20 μ L/支 \times 1 支
	FS Buffer	绿色	640 μ L/支 \times 1 支
	FS Enzyme Mix	绿色	1120 μ L/支 \times 1 支
	ER Buffer	橙色	896 μ L/支 \times 1 支
	ER Enzyme Mix	橙色	352 μ L/支 \times 1 支
	Ad-Lig Buffer	红色	1108 μ L/支 \times 2 支
	Ad Ligase	红色	560 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Enhancer	棕色	304 μ L/支 \times 1 支
	Cir Buffer	紫色	1456 μ L/支 \times 1 支
	Cir Enzyme Mix	紫色	60 μ L/支 \times 1 支
	Exo Buffer	白色	280 μ L/支 \times 1 支
	Exo Enzyme Mix	白色	374 μ L/支 \times 1 支
	Exo Stop Buffer	白色	512 μ L/支 \times 1 支
MGI Easy PF Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000013461	DNA Adapters-96 plate	-	5 μ L/孔 \times 96 孔
MGI Easy DNA 纯化 磁珠试剂盒 货号: 1000005279	DNA Clean Beads	白色	50 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	25 mL/支 \times 1 支

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂盒

- 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
- **Ligation Enhancer** 需**室温避光**保存。
- **20x Elute Enhancer** 和 **Exo Stop Buffer** 需**室温**保存。

MGIEasy PF Adapters-16 (管式)试剂盒

- 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 PF Adapters-96 (板式)试剂盒

- 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 DNA 纯化磁珠试剂盒

- 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。

*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 3 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（具热盖调节温度功能） 96 孔板磁力架（ALPAQUA, Part#A000400）推荐 1.5mL 管磁力架（ThermoFisher, Cat. No. 12321D） Qubit® 3.0 荧光定量仪（ThermoFisher, Cat. No. Q33216） Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA) 水平电泳槽 凝胶成像仪 电泳仪
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 1x TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) 0.5M EDTA (LONZA 51234) 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） DNA 分析试剂盒（Agilent, Cat. No. 5067-1504） REGULAR AGAROSE G-10 (BIOWEST, CB005-100G) GelStain (10000x) (TRANSGEN, Cat. No. #GS101-01)
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 0.5 mL 透明薄壁管（Axygen, Cat. No. PCR-05-C）

1.7 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。
- 试剂套装各组分使用前提前取出，将 Enzyme Mix 上下颠倒充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。其他 buffer 室温解冻后涡旋充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- 除 3.2 DNA 酶切打断步骤反应液禁止采用涡旋混匀的混合方式外，配制其他各步骤反应液时，反应液可采用涡旋混匀或上下颠倒数次的方式以保证组分充分混匀。
- 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。
- 推荐在末端修复反应时若使用升温速度慢的 PCR 仪时，使用前应预热 PCR 仪至反应温度。
- 为避免因转管操作造成建库产量的损失，在磁珠纯化步骤时不推荐转管操作，尤其是 3.10 酶切消化产物纯化步骤。
- 若您有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@genomics.cn

第二章 样本要求及处理

2.1 样本要求

- 本试剂盒适用于常见的动物、植物、真菌、细菌等物种，例如人（血液、唾液、新鲜组织）、水稻、光滑念珠菌、大肠杆菌等样本提取的基因组 DNA 进行文库制备，还适用于 WGA DNA。推荐使用完整度较好（无明显降解或轻微降解）且纯度良好（ $OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$, $OD_{260}/OD_{230}>2.0$ ）的高质量基因组 DNA 进行打断。
- 由于 DNA 的溶解 buffer 成分会影响 FS Enzyme Mix 的反应时效，我们推荐使用 1x TE buffer 进行 DNA 溶解，若 DNA 为 H₂O, 10 mM Tris 或 0.1xTE 溶解，请参照表 8、表 11 进行调整；若 DNA 为其他特殊 buffer 溶解，请使用 35 mM EDTA 调整将 50 μ L 酶切打断反应体系中 EDTA 终浓调整为 0.7 mM。
- 若样本 DNA 提取过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响打断步骤的效率及片段大小。

2.2 文库插入大小要求

- 测序时，随着文库片段弥散度增大，测序质量可能会略微下降。推荐使用片段选择文库进行测序，请根据不同的测序类型选择不同插入片段进行建库。若进行 PE100 测序，推荐片选 DNA 主峰 350 bp~475 bp；若进行 PE150 测序，推荐片选 DNA 主峰 400 bp~660 bp。



注意：片段主峰若小于 330 bp，会引起接头投入量不足，影响接头连接效率；片段主峰若大于 660 bp，测序质量可能下降。

第三章 文库构建标准流程

本试剂盒推荐标准建库流程如下：

取50~1000 ng gDNA进行打断纯化，取不多于200 ng 打断纯化DNA逐步进行末端修复，接头连接，单链环化等步骤，完成文库构建。具体参考表4进行：

表 4 不同起始量 gDNA 推荐操作方法

gDNA 总量 (N)	gDNA 起始量	打断纯化方法
N>1000 ng	1000 ng	两步法磁珠片选
1000 ng≥N≥800 ng	800~1000 ng (全部投入)	两步法磁珠片选
800 ng>N>200 ng	200 ng	一步法磁珠片选
200 ng≥N≥50 ng	50~200 ng (全部投入)	一步法磁珠片选



注意：因一步法磁珠片选的方法插入片段较两步法磁珠片选方法弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低。800 ng>N≥500 ng，也可采用 500 ng~800 ng gDNA 起始打断，两步法磁珠片选，但存在产量偏低的风险。



注意：50~200ng gDNA 起始建库，ssCir 文库产量偏低，通常不足以单独上机 1 次，需与其他 PCR-free 文库混合测序。

3.1 试剂准备

3.1.1 按照表 5 配方准备 1x Elute Enhancer，室温存储条件下，7 天内可用。

表 5 1x Elute Enhancer 的配制

组分	体积
20x Elute Enhancer	1 μL
Nuclease-Free Water	19 μL
Total	20 μL

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

表 6 En-TE 的配制

组分	体积
1x Elute Enhancer	2.4 μL
TE Buffer	1197.6 μL
Total	1200 μL

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

表 7 En-Beads 的配制

组分	体积
1x Elute Enhancer	15 μL
DNA Clean Beads	1485 μL
Total	1500 μL



注意: 表 6-表 7 试剂满足 6 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置。

3.1.4 按照表 8 配方准备 35 mM EDTA, 室温存储条件下, 7 天内可用。

表 8 35 mM EDTA 的配制

组分	体积
0.5 M EDTA	3.5 μL
Nuclease-Free Water	46.5 μL
Total	50 μL



注意: 表 8 试剂满足 50 个非 1 \times TE buffer (如 H₂O、10 mM Tris、0.1 \times TE 等) 溶解样本均一化的需求, 若有更多样本, 可按试剂需求等比例放大配制。若基因组 DNA 为 1 \times TE buffer 溶解, 则无需配制表 8 试剂, 也无需按表 11 进行基因组 DNA 均一化。

3.2 DNA 酶切打断



注意: 下述酶切打断条件适合于人, 动物, 植物, 细菌基因组 DNA 样本。打断得到的基因组 DNA 片段大小在 150 bp ~ 1000 bp, 主带范围在 300 bp ~ 500 bp。如样本不在涵盖范围内, 建议参考下述条件, 缩短或延长 32 $^{\circ}\text{C}$ 反应时间, 进行酶切打断条件测试, 以达到最佳的打断效果。

3.2.1 提前取出 FS Buffer 溶解并涡旋混匀, FS Enzyme Mix 上下颠倒 5-10 次至充分混匀后置于冰上备用 (禁止涡旋);

3.2.2 提前设置 PCR 程序并运行。按照表 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 $^{\circ}\text{C}$, Hold)**, 反应体积 50 μL 。

表 9 酶切打断反应条件

温度	时间
热盖 (70 $^{\circ}\text{C}$)	On
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold
32 $^{\circ}\text{C}$	16 min
65 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

- 3.2.3 使用不同溶解液的基因组 DNA 样本分别参考表 10 及表 11 进行 DNA 均一化。根据 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 测定的 DNA 浓度计算得到所需加入的样本体积 X μL ，用移液器吸取 X μL 基因组 DNA 至新的 0.2 mL PCR 管中，并按照表 10 或表 11 加入相应的试剂，使溶液总体积达到 35 μL ，将 PCR 管涡旋振荡 3 次，每次 3 s，离心后置于冰上备用。

表 10 1×TE buffer 溶解的基因组 DNA 的均一化

组分	单个反应体积
1×TE buffer	35-X μL
基因组 DNA (50 - 1000 ng)	X μL
Total	35 μL

 表 11 H₂O, 10 mM Tris 或 0.1×TE 溶解基因组 DNA 的均一化

组分	单个反应体积
Nuclease-Free Water	34-X μL
基因组 DNA (50 - 1000 ng)	X μL
35 mM EDTA	1 μL
Total	35 μL



注意：请严格按照溶解 buffer 类型进行基因组 DNA 均一化。若 DNA 为其他特殊 buffer 溶解，请使用 35 mM EDTA 调整 50 μL 酶切打断反应体系中 EDTA 终浓度为 0.7 mM。

- 3.2.4 在冰上配置酶切打断反应液（表 12）。用移液器吹打表 12 混合液 10 次以上至充分混匀（**禁止涡旋**），快速离心后至于冰上。

表 12 酶切打断反应液的配制

组分	体积
FS Buffer	5 μL
FS Enzyme Mix	10 μL
Total	15 μL

- 3.2.5 用移液器吸取 15 μL 配制好的酶切打断反应液加入步骤 3.2.3 的 PCR 管中。用 50 μL 移液器调至 40 μL ，吹打混匀 10 次（**禁止涡旋**），瞬时离心将反应液收集至管底置于冰上。
- 3.2.6 确保 3.2.2 设置的 PCR 仪已降至 4°C，将样本置于 PCR 仪中，跳过第一步（4°C Hold），开始 32°C 反应。
- 3.2.7 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。向样本中加入 30 μL En-TE 至总体积 80 μL ，将 PCR 管涡旋振荡 3 次，每次 3 s，离心后置于冰上备用。



注意：初次进行样本酶切打断时，建议从 3.2.7 80 μL 体系中取 5 μL 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳确定酶切打断效果，正常的打断片段大小应在 150 bp~1000 bp，主峰在 300 bp~500 bp（图 1）。如片段过大或过小，建议重新调整 32 $^{\circ}\text{C}$ 反应时长，进行酶切打断条件测试。对于含杂质及抑制剂较多样品，按上述调试后仍无法获得理想打断效果，建议将样本 DNA 用 1.5 倍体积磁珠纯化后用 Nuclease-Free Water 溶解，重新调试打断时间（推荐 32 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 min~10 min 时间梯度测试）。

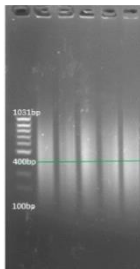


图 1 标准实验流程 DNA 打断后产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果

3.3 DNA 打断产物片段纯化

打断后 DNA 分布范围较宽，为了保证文库片段的集中度，推荐在 gDNA 投入量在 800 – 1000 ng 的样品按照方案 3.3.1 使用两步法磁珠片选方法，插入片段的磁珠筛选方案如表 13 所示；gDNA 投入量在 50–200 ng 的样品，推荐按照方案 3.3.2 使用一步法磁珠片选方法。

表 13 两步法磁珠片选：75 μ L 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠使用量关系表

片选主峰片段 (bp)	350	475
第一轮加入磁珠 (μ L)	50.3	45.0
第二轮加入磁珠 (μ L)	15.0	11.3
测序方案	PE100	PE100/PE150

注：表 13 片段选择条件可供参考。针对不同样品，片段选择 DNA 主峰可能有 ± 50 bp 偏差。

3.3.1 DNA 打断产物的两步法磁珠片选

- 3.3.1.1 提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 3.3.1.2 吸取 75 μ L 打断产物至新的 0.2 mL PCR 管中，若体积不足 75 μ L，须用 En-TE 补足。
- 3.3.1.3 吸取 45 μ L En-Beads 至含有 75 μ L 打断产物的新的 0.2 mL PCR 管中，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样本管中；或涡旋混匀。
- 3.3.1.4 室温孵育 10 min。
- 3.3.1.5 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，静置 2–5 min 至液体澄清，吸取上清至新的 0.2 mL PCR 管中。

 **注意：此步保留上清，丢弃磁珠。**

- 3.3.1.6 吸取 11.3 μ L En-Beads 至 120 μ L 上清管中，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀；或涡旋混匀。
- 3.3.1.7 室温孵育 10 min。
- 3.3.1.8 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架，静置至液体澄清后继续放置 2–5 min，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.3.1.9 保持 0.2 mL 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，小心吸取并丢弃上清。
- 3.3.1.10 重复步骤 3.3.1.9，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 0.2 mL PCR 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。

- 3.3.1.11 保持 0.2 mL PCR 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。
- 3.3.1.12 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μ L En-TE 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀；或涡旋混匀。
- 3.3.1.13 室温孵育 5 min。
- 3.3.1.14 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清，将 44 μ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
- 3.3.1.15 取 2 μ L 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。



注意：两步法磁珠片段选择，DNA 损失量约为 60%~95%。若样本较珍贵，可选择回收第一轮磁珠，80%乙醇漂洗两次，晾干后 En-TE 洗脱，保存备份。对于初次片段选择，建议取 2 μ L 3.3.1.14 片段选择产物进行 Agilent 2100 高敏芯片质检，确定筛选片段主峰在 475 bp 左右（可有 \pm 50 bp 偏差）（图 2）。

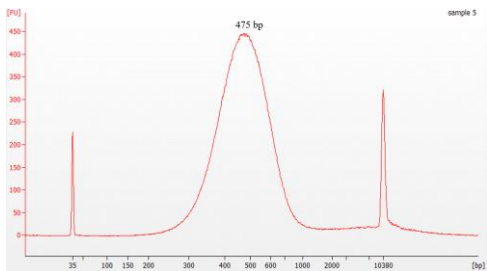


图 2 标准实验流程 DNA 两步磁珠片选后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.3.2 DNA 打断产物一步法磁珠片选



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

- 3.3.2.1 提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 3.3.2.2 吸取所有打断产物至新的 0.2 mL PCR 管中，若体积不足 75 μ L，用 En-TE 补足。
- 3.3.2.3 吸取 60 μ L En-Beads 至含有 75 μ L 打断产物的新的 0.2 mL PCR 管中，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 EP 管中；或涡旋混匀。
- 3.3.2.4 室温孵育 10 min。
- 3.3.2.5 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架，静置至液体澄清后继续放置 2-5 min，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.3.2.6 保持 0.2 mL 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，前后反转 0.2 mL PCR 管 2 次后小心吸取并丢弃上清。
- 3.3.2.7 重复步骤 3.3.2.6，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 0.2 mL PCR 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。
- 3.3.2.8 保持 0.2 mL PCR 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。
- 3.3.2.9 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μ L En-TE 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀；或涡旋混匀。
- 3.3.2.10 室温孵育 5 min。
- 3.3.2.11 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 44 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- 3.3.2.12 取 2 μ L 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。



针对不同样品，DNA 主峰可能有 \pm 140 bp 偏差。主带为纯化后 DNA 的检测结果，最终测序主带会有减小。

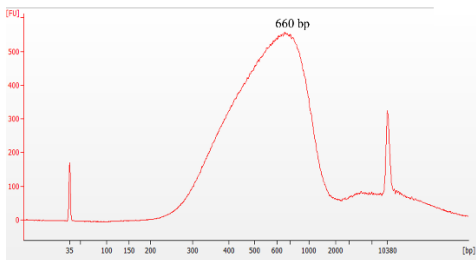


图3 200ng gDNA 一步磁珠片段选择后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.4 末端修复

- 3.4.1 根据样本浓度，取适量片段化样本 DNA（推荐 80 ng~200 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，用 En-TE 补充至总体积 40 μ L。
- 3.4.2 在冰上配制末端修复反应液（见表 14）。

表 14 末端修复反应液的配制

组分	体积
ER Buffer	7 μ L
ER Enzyme Mix	3 μ L
Total	10 μ L


- 3.4.3 用移液器吸取 10 μ L 配制好的末端修复反应液加入步骤 3.4.1 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。
- 3.4.4 将步骤 3.4.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 15 中的条件进行反应，总反应体积 50 μ L。

表 15 末端修复反应条件

温度	时间
热盖 (70°C)	On
14°C	15 min
37°C	25 min
65°C	15 min
4°C	Hold

 **注意：**推荐在末端修复反应时若使用升温速度慢的 PCR 仪时，使用前应预热 PCR 仪至反应温度。

3.4.5 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 3.5。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。

3.5 接头连接

 **注意：**操作前请仔细阅读附录 B 和附录 C。

3.5.1 参照 MGIEasy PF Adapters 使用规则（参见附录 B），在步骤 3.4.5 的 PCR 管中加入 5 μL 对应的 MGIEasy PF Adapters。

3.5.2 涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.5.3 在冰上配制接头连接反应液（见表 16）。

表 16 接头连接反应液的配制

组分	体积
Ad-Lig Buffer	18 μL
Ad Ligase	5 μL
Ligation Enhancer	2 μL
Total	25 μL


3.5.4 用移液器缓慢吸取 25 μL 配制好的接头连接反应液加入步骤 3.5.2 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：**本反应液较粘稠，请充分混匀。

3.5.5 将步骤 3.5.4 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 17 中的条件进行反应，总反应体积 80 μL 。

表 17 接头连接反应条件

温度	时间
热盖 (30°C)	On
25°C	10 min
4°C	Hold

 **注意：**若 ssCir 文库产量偏低，可适当延长 25°C 反应时间至 30min。

3.5.6 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.5.7 加入 20 μL En-TE 至总体积 100 μL 。



注意：不建议在此处停止，请继续做步骤 3.6。

3.6 连接产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A。

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

3.6.2 用移液器吸取 50 μL En-Beads 至步骤 3.5.7 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离心管中；或涡旋混匀。

3.6.3 室温孵育 10 min。

3.6.4 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 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。

3.6.5 保持 0.2 mL 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，小心吸取并丢弃上清。

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，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 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.6.8 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 50 μL En-TE 进行 DNA 洗脱，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；或涡旋混匀。

3.6.9 室温下孵育 5 min。

3.6.10 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 48 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

3.6.11 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。连接产物浓度 > 1.2 ng/ μL 可用于后续建库，连接产物浓度在 0.8-1.2 ng/ μL ，则可选择风险建库，连接产物浓度 < 0.8 ng/ μL 则不建议后续建库。



停止点：连接产物纯化后，可置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

3.7 变性

3.7.1 将步骤 3.6.10 所述 PCR 管（含 48 μL 接头连接产物）置于 PCR 仪上，按照表 18 的条件进行反应，反应体积 50 μL 。

表 18 变性反应条件

温度	时间
热盖 (100°C)	On
95°C	3 min
4°C	10 min



注意：步骤 3.7.1 的操作也可采用程序：95°C 3min（热盖 100°C），反应结束后迅速放冰上 2 min，然后进行步骤 3.7.2。

3.7.2 反应结束后，瞬时离心，将反应液收集至管底。

3.8 单链环化

3.8.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 19）。

表 19 单链环化反应液的配制

组分	体积
Cir Buffer	11.5 μL
Cir Enzyme Mix	0.5 μL
Total	12 μL

3.8.2 用移液器吸取 12 μL 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.7.2 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。

3.8.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 20 的条件进行反应，总反应体积 60 μL 。

表 20 单链环化反应条件

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

3.8.4 反应结束后，瞬时离心，将 PCR 管转移到冰上，立即进入下步反应。

3.9 酶切消化

3.9.1 在步骤 3.8.3 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液(见表 21)。

表 21 酶切消化反应液的配制

组分	体积
Exo Buffer	1.4 μL
Exo Enzyme Mix	2.6 μL
Total	4 μL

3.9.2 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.8.4 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。

3.9.3 将步骤 3.9.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 22 的条件进行反应，总反应体积 64 μL 。

表 22 酶切消化反应条件

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

3.9.4 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.5 向 PCR 管中加入 3 μL Exo 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。

3.10 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。

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

3.10.2 吸取 120 μL En-Beads 至步骤 3.9.5 的 67 μL 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；或涡旋混匀。

3.10.3 室温孵育 10 min。

3.10.4 瞬时离心，0.2 mL PCR 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。

3.10.5 保持 0.2 mL 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，小心吸取并丢弃上清。

3.10.6 重复步骤 3.10.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 0.2 mL PCR 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。

3.10.7 保持 0.2 mL PCR 管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.10.8 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 25 μ L En-TE 进行 DNA 洗脱，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 EP 管中；或涡旋混匀。



注意：若 gDNA 起始量为 50–100 ng，推荐使用 12 μ L En-TE 进行 DNA 洗脱，并在 3.10.10 步骤吸取 11 μ L 上清液。

3.10.9 室温下孵育 10 min。

3.10.10 瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，静置 2–5 min 至液体澄清，将 24 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL EP 管或 0.2 mL PCR 管中。



停止点：酶切消化纯化后产物，可置-20°C 冰箱储存。

3.11 酶切消化产物质检

3.11.1 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。

3.11.2 最终产物要求：1) 200ng–1 μ g 起始，单链环产量 \geq 75fmol；2) 100–200ng 起始，单链环产量 \geq 60fmol；3) 50–100ng 起始，单链环产量 \geq 30fmol。可参考表 23，或参考附录 D 的公式 1 进行计算。

3.11.3 每次上机测序的单链环的投入量为 75 fmol，如需将不同样本混合上机测序，可在步骤 3.11.1 之后将不同样本的单链环按摩尔数比进行混合。但需保证混合样本的对应的 barcode 须符合 MGIEasy PF Adapter 的使用规则要求（详见附录 B）。此外，不同样本单链环的摩尔数比取决于客户预期得到的不同样本的数据量比。



注意：因插入片段的大小和集中度会影响测序质量，故不同插入片段的文库混合测序及不同磁珠纯化方法文库混合测序(如：采用两步磁珠纯化法的文库与采用一步法磁珠去除小片段的文库混合上机)时，测序质量及有效数据量会有降低的风险。

表 23 不同插入产物片段大小对应 75 fmol 单链环产量

插入片段主峰大小 (bp)	单链环文库大小 (bp)	75 fmol 对应产量 (ng)
330	364	9.0
350	384	9.5
400	434	10.7
450	484	12.0
475	509	12.6
500	534	13.2
600	634	15.7
660	694	17.2

附录

附录 A 关于磁珠及纯化

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或1000005279）的DNA Clean Beads进行磁珠纯化。如果使用其他来源磁珠，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。加入磁珠越多，可纯化的 DNA 片段的下限越小。

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 1.5 mL 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，应用 En-TE 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 μ L ~3 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 EP 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 EP 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 5~10 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 En-TE 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。

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 Adapter 试剂盒: MGI Easy PF Adapters-16 (管式) 试剂盒或 MGI Easy PF Adapters-96 (板式) 试剂盒。两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, 但 Adapter 编号不连续。为保证最佳效果, 使用时请详细阅读附录 B-1 和 B-2 的使用规则。同时, 两款 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。

附录 B-1 MGI Easy PF Adapters-16 (管式) 试剂盒使用规则

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 具备如下的分组规则:

4 个 Adapter 成组: 01-04、13-16, 共计 2 组;

8 个 Adapter 成组: 97-104 共计 1 组;

当每个样本数据量要求相同时, 不同样本数目可参考表 24 所示的推荐 Barcode 组合方案:

表 24 MGI Easy PF Adapters-16 (管式) 试剂盒使用规则

样本数 /lane	使用方法 (举例)
1	1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中; 或 2、加一组 8 Adapter (如 97-104), 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 或 3、如果样本不需要测 Barcode 时, 可只使用一个 1 Adapter (如 01)。
2	1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 每个编号 Adapter 取等体积, 两两组合, 混合成 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 Adapter (如 97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix, 形成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如 97-104, 将 97-100 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 101-104 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中)。

3	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，注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 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 Adapter（如 97-104），每个编号 Adapter 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 97-104，将 97-98、99-100、101-102、103-104 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	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，注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	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，注意样本 1-4 与样本 6-7 需使用不同组别的 Adapter。
7	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，注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	1、使用两组 4 Adapter（如 01-04，13-16），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入 4 个样本中（如 01-04，将 01、02、03、04、13、14、15、16 分别依次加样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中）； 或 2、加一组 8 Adapter（如 97-104），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入每个样本。
8n+x (n=1, x=1-8, 总计 9-16 个)	分三步： 1) 样本 1-8，分成 1 组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter，或分成 2 组，样本 1-4、4-8 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter 2) 样本 9- 8+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 注意：上述 1)、2) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter

当样本数据量要求不相同时，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 97-104，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。

附录 B-2 MGI Easy PF Adapters-96（板式）试剂盒使用规则

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 具备如下的分组规则：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	001	041	057	065	073	081	089	097	121	025	033	049
B	002	042	058	066	074	082	090	098	122	026	034	050
C	003	043	059	067	075	083	091	099	123	117	035	051
D	004	044	060	068	076	084	092	100	124	028	036	052
E	013	045	061	069	077	085	093	101	125	029	037	053
F	014	046	062	070	078	086	094	102	126	030	038	116
G	015	047	063	071	079	087	095	103	127	114	039	055
H	016	048	064	072	080	088	096	104	128	032	115	056

图4 MGI Easy PF Adapters-96 (板式) Adapter 分布图及成组规则

4个Adapter成组：第1列（01-04，13-16），共计2组（图4红色框）；

8个Adapter成组：第2-9列（41-48、57-64、65-72、73-80、81-88、89-96、97-104和121-128），共计8组（图4 蓝色框）；

24个Adapter成组：第10-12列，共计1组（图4 紫色框）。

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考表25所示的推荐Barcode组合方案：

表 25 MGI Easy PF Adapters-96 (板式) 试剂盒使用规则

样本数 /lane	使用方法（举例）
1	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中； 2、或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 或 3、如果样本不需要测 Barcode 时，可只使用一个 1 Adapter（如 01）。
2	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 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 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix，形成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如 41-44 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 45-48 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中）。

3	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，注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 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 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 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 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 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	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，注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	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，注意样本 1-4 与样本 6-7 需使用不同组别的 Adapter。
7	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，注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	加一组 8 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入每个样本。
8n+x (n=1、2、 x=1-8、 总计 9-24 个)	分三步： 1) 样本 1-8，分成 1 组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter，或分成 2 组，样本 1-4、4-8 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter 2) 样本 9-8n，每 8 个样本一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter 3) 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 注意：上述 1)、2)、3) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter
8n+x (3≤n<11, x=1-8、 总计 25- 96 个)	分三步： 1) 样本 1-24，加一组 24 Adapter，每个编号 Adapter 取等体积，每个样本中加 1 个编号 Adapter 2) 样本 25-8n，每 8 个样本分为一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter 3) 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 注意：上述 1)、2)、3) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter

当样本数据量要求不相同时，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 97-104，另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要 1 使用 Adapter 01-04 或 Adapter 13-16 的成组 Adapter。

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 50 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。
- 为避免接头二聚物残留带来的样本间污染问题，禁止接头纯化之后进行不同样本的混合和用于后续单链环化反应。

附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

- 单链环状 DNA 产物纯化后产量应达到 75 fmol 以上方足够一次上机测序的量。可根据公式 1 计算所得单链环状 DNA 的摩尔数。

公式 1 单链环 fmol 与 ng 间的换算：

$$75 \text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.075 \times \frac{\text{DNA 主片段大小 (bp)} + 84 \text{ (bp)} - 50 \text{ (bp)}}{1000 \text{ (bp)}} \times 330 \text{ ng}$$

说明：公式内“+ 84 (bp)”表示 Adapter 接头长度，“- 50 (bp)”表示打断 DNA 从片段选择后主峰到单链环文库主峰会有约 50 bp 减小。

联系我们

生产企业: 深圳华大智造科技有限公司

生产地址: 深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区 11 栋 2 楼, 518083

客服电话: 4000-966-988

技术支持: MGI-service@genomics.cn

网 址: www.mgitech.cn



官方微信