

MGIEasy

双 Barcode 环化试剂盒说明书

货号：1000020570 (16 RXN)

试剂盒版本号：V1.0

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	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 6月	<ul style="list-style-type: none"> 新增双端独立标签接头试剂盒适配
A0	V1.0	2020年 3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.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 试剂盒运输条件.....	2
1.6 客户自备物料清单.....	2
1.7 注意事项.....	3
第二章 样本要求及处理.....	4
2.1 样本要求.....	4
2.2 文库质控.....	5
第三章 文库构建标准流程.....	6
3.1 变性.....	6
3.2 单链环化.....	6
3.3 酶切消化.....	7
3.4 环化产物纯化.....	7
3.5 环化产物质检.....	8

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 双Barcode环化试剂盒是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的模块化试剂盒。使用本试剂盒可以将连接后的MGI-双 Barcode 标准PCR产物制备成适用于MGI高通量测序仪专用的单链环状DNA文库。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

本试剂盒适用于使用MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒/ MGIEasy 双分子标签接头试剂盒制备的PCR产物及“MGI-双 Barcode 标准PCR产物”(见《DNBSEQ平台建库接头说明文档》), 将其制备成单链环化文库并用于二代测序。

1.3 适配测序平台

依据所使用的文库制备试剂盒所适用的高通量测序平台而定, 本试剂盒不限定测序平台。

1.4 试剂盒组分

环化试剂盒规格为16 RXN, 包含Box1和Box2, 货号组分如下:

表 1 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒 (16 RXN) (货号: 1000020570)

试剂盒种类与货号	组分信息	瓶盖颜色	规格及数量
MGIEasy 双 Barcode 环化模块 货号: 1000018649	Dual Barcode Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 \times 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 μ L/支 \times 1 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000007325	DNA Clean Beads	白色	1600 μ L/支 \times 2 支
	TE Buffer	白色	1600 μ L/支 \times 1 支

1.5 试剂盒运输条件

MGIEasy双 Barcode环化模块

- 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 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，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 2 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 磁力架 (ThermoFisher, Cat. No. 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216)
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 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 EP 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。
- ◆ 试剂盒各组分使用前提前取出，将 Enzyme 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。
- ◆ 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打至少十次混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
- ◆ 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ◆ 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。
- ◆ 实验区域需定时进行清洁（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。
- ◆ 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 样本量要求

- 本试剂盒推荐 Input DNA 量为 1 pmol。若 PCR 产物不足，最少 Input 量可降低至 0.5 pmol 投入量。
- 若文库制备试剂盒有特殊的环化投入量需求，则按照文库制备试剂盒的要求投入所需的 Input DNA 量。
- 不同片段大小 DNA 1 pmol 分子对应不同的质量，可根据公式 1 计算或参考表 3 选择所需的 Input DNA 量：

公式 1 PCR 产物摩尔数与质量间的换算

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量}(\text{ng}) = \frac{\text{DNA 主片段大小}(\text{bp})}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

表 3 不同 PCR 产物片段大小 1pmol 对应产量

插入片段主带大小 (bp)	PCR 产物主带大小 (bp)	1pmol 对应产量 (ng)
150	234	150
200	284	190
250	334	220
300	384	250
350	434	290
400	484	320
450	534	350
500	584	390

2.1.2 样本混合要求

- Input DNA 可以是单个样本，也可以是多个带有不同 Barcodes 的样本的混合物。
- 对样本进行混合时需满足 Barcodes 混合的要求，可参考《双分子标签接头试剂盒使用说明书》或《双端独立标签引物接头试剂盒使用说明书》选择合适的 Barcodes 进行混合。
- 混合的样本总量推荐为 1 pmol，若每个样本所需数据量相同，则等量混合，每个样本所需的质量按照公式 2 进行计算：

公式 2 混合样本中单个样本所需质量的计算

单个样本所需的质量(ng)=1 pmol Input DNA 对应的质量 (ng) /混合的样本个数 N

- 单个样本或混合后样本用于环化时，体积应为 48 μ L，若不足 48 μ L，则用 TE 补足体积至 48 μ L。

2.2 文库质控

- 单链环产物纯化后推荐使用 Qubit® ssDNA Assay Kit 单链 DNA 荧光染料试剂对纯化后产物进行定量。
- 针对华大智造高通量测序平台，单链环产物纯化后产量应达到 80 fmol 以上方足够两次上机测序的量。可根据公式 3 计算或参考表 4。

公式 3 单链环摩尔数与质量间的换算

$$80 \text{ fmol 单链环对应的质量(ng)} = 0.08 \times \frac{\text{DNA 主片段大小(bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 330 \text{ ng}$$

表 4 不同 PCR 产物片段大小 80 fmol 单链环对应产量

插入片段主带大小 (bp)	PCR 产物主带大小 (bp)	80 fmol 对应产量 (ng)
150	234	6.2
200	284	7.5
250	334	8.8
300	384	10.1
350	434	11.5
400	484	12.8
450	534	14.1
500	584	15.4

第三章 文库构建标准流程

3.1 变性



注意：操作前请仔细阅读样本要求及处理。

- 3.1.1 根据 Input DNA 的片段长度，取 1 pmol DNA 至 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。
- 3.1.2 将步骤 3.1.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 5 中的条件进行反应：

表 5 变性反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
95°C	3 min

- 3.1.3 反应结束后，立即将 PCR 管转移至冰上，放置 2 min。

3.2 单链环化

- 3.2.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 6）：

表 6 单链环化反应液的配制

组分	体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12.1 μL

- 3.2.2 将上述 12.1 μL 单链环化反应液加入步骤 3.1 反应后的 PCR 管中，涡旋震荡 6 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，按照表 7 中的条件进行反应：

表 7 单链环化反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
37°C	30 min
4°C	Hold

- 3.2.4 反应结束后，取出 PCR 管，立即进入下一步反应。

3.3 酶切消化

3.3.1 在冰上配制酶切消化反应液（见表 8）：

表 8 酶切消化反应液的配制

组分	体积
Digestion Buffer	1.4 μL
Digestion Enzyme	2.6 μL
Total	4 μL

3.3.2 将上述 4 μL 酶切消化反应液加入步骤 3.2 反应后的 PCR 管中，涡旋震荡 6 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.3.3 将步骤 3.3.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 9 中的条件进行反应：

表 9 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.3.4 反应结束后，向每个反应中加入 7.5 μL Digestion Stop Buffer，涡旋震荡 6 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。所有反应液转移到新的 1.5 mL EP 管中。

3.4 环化产物纯化

3.4.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.4.2 吸取 170 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.3.4 的产物中，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 1.5 mL EP 管中。

3.4.3 室温孵育 10 min。

3.4.4 瞬时离心，将 1.5 mL EP 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。

3.4.5 保持 1.5 mL EP 管置于磁力架上，加入 500 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，小心吸取并丢弃上清。

3.4.6 重复步骤 5，尽量吸干管内液体。

- 3.4.7 保持 1.5 mL EP 管固定于磁力架上，打开 1.5 mL EP 管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.4.8 将 1.5 mL EP 管从磁力架上取下，加入 22 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。
- 3.4.9 室温下溶解 10 min。
- 3.4.10 瞬时离心，将 1.5 mL EP 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 20 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中。

✓ **停止点：环化纯化后的产物，可置-20°C 冰箱储存一个月。**

3.5 环化产物质检

使用Qubit® ssDNA Assay Kit单链DNA荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对环化纯化后产物进行定量。最终环化产物要求摩尔产量 ≥ 80 fmol，可参考表4或按公式3进行计算。

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