

MGIEasy

游离 DNA 文库制备试剂套装使用说明书

货号: 1000007037 (48 RXN), 1000012701 (96 RXN)

试剂盒版本号: V1.0

说明书版本号: A4

版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
A4	V1.0	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A3	V1.0	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”
A2	V1.0	2019 年 5 月	第四章测序增加产物投入量描述
A1	V1.0	2019 年 3 月	- 增加表 2 96RXN 套装 - 修改 3.1.2 末端修复反应混合液配制比例
A0	V1.0	2019 年 2 月	变更试剂套装名称为“MGIEasy 游离 DNA 文库制备试剂套装”

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	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	6
第三章 文库构建标准流程	7
3.1 末端修复反应	7
3.2 接头连接反应	8
3.3 连接产物纯化	8
3.4 PCR 扩增反应	9
3.5 PCR 产物纯化	10
3.6 PCR 产物质检	11
3.7 变性	11
3.8 单链环化	11
第四章 测序	13
附录	14
附录 A 关于 Adapter 的使用	14
附录 B 关于磁珠及纯化	19
附录 C DNA 分子质量与摩尔数之间的换算	20

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 游离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游离DNA文库制备试剂, 可广泛应用于游离DNA的研究。使用MGIEasy 游离DNA文库制备试剂盒可以对游离DNA及片段大小为150 bp~250 bp的片段化DNA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, 制备得到兼容华大智造测序平台的单链环状DNA文库。试剂套装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

本试剂套装适用于游离DNA、150 bp~250 bp片段化的DNA。可用于血浆游离DNA研究及病原微生物检测等应用场景。

1.3 适配测序平台

本试剂盒套装构建的文库可用于BGISEQ-500RS、 BGISEQ-50RS、MGISEQ-2000RS及MGISEQ-200RS高通量测序试剂盒的“SE”或“PE”测序。

1.4 试剂盒组分

MGIEasy 游离DNA文库制备试剂套装包含有2个规格, 分别是48 RXN和96 RXN。每个试剂套装包含2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 游离 DNA 文库制备试剂套装 (48 RXN) (货号: 1000007037)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 游离 DNA 文库 制备试剂盒 (Box 1) 货号: 1000003988	ERAT Buffer Mix	无色	200 μ L/支 $\times$ 3 支
	ERAT Enzyme Mix	无色	15 μ L/支 $\times$ 3 支
	Ligation Buffer Mix	红色	450 μ L/支 $\times$ 3 支
	Ligation Enzyme	红色	30 μ L/支 $\times$ 3 支
	Adapter Mix (Barcode 01-48)	无色	15 μ L/孔 $\times$ 48 孔
	PCR Enzyme Mix	蓝色	475 μ L/支 $\times$ 3 支
	PCR Primer Mix	蓝色	80 μ L/支 $\times$ 3 支
	DNA Control	黄色	15 μ L/支 $\times$ 1 支
MGIEasy 游离 DNA 文库 制备试剂盒 (Box 2) 货号: 1000003988	Elution Buffer	白色	1800 μ L/支 $\times$ 3 支
	Purification Beads	白色	1800 μ L/支 $\times$ 3 支
MGIEasy 快速环化模块 货号: 1000005258	Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μ L/支 $\times$ 1 支

表 2 MGIEasy 游离 DNA 文库制备试剂套装 (96 RXN) (货号: 1000012701)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 游离 DNA 文库 制备试剂盒 (Box 1) 货号: 1000012700	ERAT Buffer Mix	无色	1200 μ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Enzyme Mix	无色	72 μ L/支 $\times$ 1 支
	Ligation Buffer Mix	红色	1440 μ L/支 $\times$ 2 支
	Ligation Enzyme	红色	116 μ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	1400 μ L/支 $\times$ 2 支
	PCR Primer Mix	蓝色	432 μ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Control	黄色	10 μ L/支 $\times$ 1 支
MGIEasy 游离 DNA 文库 制备试剂盒 (Box 2) 货号: 1000012700	DNA Adapters-96 (1pmol/ μ L)	无色	10 μ L/孔 $\times$ 96 孔
MGIEasy 游离 DNA 文库 制备试剂盒 (Box 3) 货号: 1000012700	Elution Buffer	白色	6100 μ L/支 $\times$ 2 支
	Purification Beads	白色	5500 μ L/支 $\times$ 2 支
MGIEasy 快速环化模块 货号: 1000005258	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

MGIEasy 游离 DNA 文库制备试剂盒 48RXN (Box1)

- 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 游离 DNA 文库制备试剂盒 48RXN (Box2)

- 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 游离 DNA 文库制备试剂盒 96RXN (Box1)

- 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 游离 DNA 文库制备试剂盒 96RXN (Box2)

- 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 游离 DNA 文库制备试剂盒 96RXN (Box3)

- 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 3 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)
试剂	Qubit® 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216)
	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)
耗材	Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854)
	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 Enzyme 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，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
- 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。
- PCR 产物因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 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

- 用于提取血浆游离 DNA 样本的外周血需保存在 EDTA 抗凝管中，不适用于肝素钠抗凝管；建议 200 μ L 血浆起始提取 DNA；
- 若样本为片段化后的 DNA，该 DNA 样本的片段主峰在 150 bp~250 bp 之间，范围集中；
- 建库 DNA 样本投入量在 2 ng~6 ng 之间；
- DNA 样本建议使用 TE buffer 洗脱，若样本 DNA 制备过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复步骤的效率。

第三章 文库构建标准流程

3.1 末端修复反应

- 3.1.1 取适量待检的血浆游离 DNA 样本至 0.2 mL PCR 管，并补充 Nuclease-free Water 至总体积为 40 μL ；每批次建库可选择加入一个 DNA Control 试剂作为质控品，用于对建库试剂、建库和测序操作的质控，DNA Control 取用量为 1.5 μL 并补充 38.5 μL 的 Nuclease-free Water 至总体积为 40 μL ；加入样品后需充分混匀，瞬时离心。

备注：DNA Control 为打断后经过片段筛选的大小为 150 bp~250 bp 人基因组 DNA，DNA Control 构建的文库和同一批待检的文库一起上机测序，DNA Control 的文库浓度和上机测序结果应均符合质控标准。

- 3.1.2 在冰上配制末端修复反应混合液（见表 4）。

表 4 末端修复反应混合液

组分	单个反应体积
ERAT Buffer Mix	9.4 μL
ERAT Enzyme Mix	0.6 μL
Total	10 μL

- 3.1.3 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 3.1.1 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。
- 3.1.4 将步骤 3.1.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 5 中的条件进行反应。

表 5 末端修复反应条件

温度	时间
热盖	85°C
37°C	10 min
65°C	15 min
4°C	Hold

- 3.1.5 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 3.2。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。

3.2 接头连接反应



注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于 Adapter 的使用。

3.2.1 在冰上配制接头连接反应混合液（见表 6）。

表 6 接头连接反应混合液

组分	单个反应体积
Ligation Buffer Mix	24 μ L
Ligation Enzyme	1 μ L
Total	25 μ L

3.2.2 参照 Adapters Mix (Barcode 01-48)或 DNA Adapters-96 (1 pmol/ μ L)使用规则(参见附录 A)，在步骤 3.1.5 的 PCR 管中加入 5 μ L 对应的 Adapters Mix (Barcode 01-48)或 DNA Adapters-96 (1 pmol/ μ L)，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.3 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 3.2.2 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。

3.2.4 将步骤 3.2.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 7 中的条件进行反应。

表 7 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	Off
23°C	20 min
4°C	Hold

3.2.5 瞬时离心将反应液收集至管底，转移至新的 1.5 mL 离心管中。



注意：不建议在此处停止，请继续操作步骤 3.3。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。

3.3 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。

3.3.1 提前 30 min 取出 Purification Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.3.2 用移液器吸取 40 μ L Purification Beads 至步骤 3.2.5 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。

- 3.3.2 室温孵育 5 min。
- 3.3.3 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。
- 3.3.4 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。
- 3.3.5 重复步骤 3.3.4，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。
- 3.3.6 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。
- 3.3.7 将离心管从磁力架上取下，加入 23 μL Elution Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.3.8 室温下孵育 5 min。
- 3.3.9 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 0.2 mL PCR 管中。

✓ **停止点：**连接产物纯化后可置-20℃冰箱储存。

3.4 PCR 扩增反应

- 3.4.1 在冰上配制 PCR 反应混合液（见表 8）。

表 8 PCR 反应混合液

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Primer Mix	4 μL
Total	29 μL

- 3.4.2 用移液器吸取 29 μL 配制好的 PCR 反应液加入步骤 3.3.9 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。
- 3.4.3 将步骤 3.4.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 9 的条件进行 PCR 反应。

表 9 PCR 扩增反应条件

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

3.4.4 瞬时离心将反应液收集至管底，转移至新的 1.5 mL 离心管中。

3.5 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。

- 3.5.1 提前 30 min 取出 Purification Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.5.2 吸取 50 μ L Purification Beads 至步骤 3.4.4 的 50 μ L 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。
- 3.5.3 室温孵育 5 min。
- 3.5.4 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。
- 3.5.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200 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。
- 3.5.6 重复步骤 3.5.5，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。
- 3.5.7 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。
- 3.5.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32 μ L Elution Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.5.9 室温下孵育 5 min。
- 3.5.10 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 μ L 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。

3.6 PCR 产物质检

- 3.6.1 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 $\geq 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。如需将多个样本混合测序，建议根据 Adapter Mix 使用规则设计混合方案（见附录 A），在定量后进行不同 Barcode 样本混合，混合后总量为 1 pmol，根据 DNA 分子质量与摩尔数之间的换算（见附录 C）及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 $\leq 48 \mu\text{L}$ 。
- 3.6.2 混合产物可在 -20°C 冰箱储存或进行下一步环化反应。推荐使用《MGIEasy 快速环化模块》进行环化反应，制备适用于华大智造高通量测序平台的单链环状 DNA 文库，具体环化操作见步骤 3.7~3.8。

3.7 变性

- 3.7.1 根据 PCR 产物的主片段分布，取 1 pmol PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 Elution Buffer 补充至总体积 $48 \mu\text{L}$ 。
- 3.7.2 将步骤 3.7.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 10 的条件进行反应。

表 10 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	3 min

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

3.8 单链环化

- 3.8.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 11）。

表 11 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	$0.5 \mu\text{L}$
Total	$12.1 \mu\text{L}$

- 3.8.2 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 3.7.3 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。
- 3.8.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 12 的条件进行反应。

表 12 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.8.4 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。**

第四章 测序

取 20 μ L 步骤 3.8.4 环化产物，根据具体应用的要求选择合适测序类型进行上机，推荐使用以下套装：

- a) 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;
- b) 或在 MGISEQ-2000RS 基因测序仪使用 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (SE50) (货号: 1000012557) 进行测序;
- c) 或在 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 Adapter 的使用

- 试剂套装根据反应数不同提供 2 种不同规格的 Adapter，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，使用时请仔细阅读附录 D-1 和 D-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。
- 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。
- Adapter 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 Adapters 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 Adapters，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 Adapters Mix (Barcode 01-48)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 Mix 具备如下的分组规则：

4 个 Adapter 成组：01-04、05-08、09-12、13-16，共计 4 组；

8 个 Adapter 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 13 Adapters Mix (Barcode 01-48)使用规则

样本数 /lane	使用方法（举例）
1	需至少使用 1 组 Adapter： 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），将 4 个 Adapter 取等体积混合后加入样本中 或 2、加一组 8 Adapter（如 17-24），将 8 个 Adapter 取等体积混合后加入样本中
2	需至少使用 1 组 Adapter： 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 17-24), 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 Adapter: 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	需至少使用 1 组 Adapter: 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 (17-24), 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 Adapter: 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	需至少使用 2 组 Adapter: 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter
7	需使用全部 3 组 Adapter, 分三步操作: 1) 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 2) 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 3) 样本 7, 使用剩余的一组 Adapter, 可以加该组内一个单 Adapter Mix, 或者加组内所有编号 Adapter 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 Adapter
8	需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 8 Adapter (如 17-24), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本 或 2、选取两组 4 Adapter (01-04 和 13-16), 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本加 1 个 Adapter
8n+X (1≤n≤5, x=1-8, 总计	样本 8n+X, 每 8 个样本一组, 采用上述 (8 样本数/lane) 方法加 Adapter, 未成组样本根据 X 的数值, 各加入一个单 Adapter, 或者采用上述对应的 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: 上述每个样本间需使用不同的 Adapter

9-48 个)	
------------	--

A-2 DNA Adapters-96 使用规则

DNA Adapters-96 的 Adapter 分布图如图 1 所示，基于碱基平衡的设计原则，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	01	41	57	65	73	81	89	97	121	25	33	49
B	02	42	58	66	74	82	90	98	122	26	34	50
C	03	43	59	67	75	83	91	99	123	117	35	51
D	04	44	60	68	76	84	92	100	124	28	36	52
E	13	45	61	69	77	85	93	101	125	29	37	53
F	14	46	62	70	78	86	94	102	126	30	38	116
G	15	47	63	71	79	87	95	103	127	114	39	55
H	16	48	64	72	80	88	96	104	128	32	115	56

图 1 MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) Adapters 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 1 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 1 蓝色框)；

24 个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组 (图 1 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如下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

表 14 MGIEasy DNA Adapters-96(1pmol/μL)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 41-48), 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。
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 41-48, 将 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 5-6 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

$8n+x$ $(3 \leq n < 11, x=1-8, \text{总计 } 25-96 \text{ 个})$	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, 而是要使用 Adapter 01-04 或 Adapter 13-16 或其他 97-104 以外的成组 Adapter。

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 Elution Buffer 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 5~10 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 Elution 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，建议用手指固定住离心管中下段，然后开盖。

附录 C DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

不同片段大小的双链DNA样本 1 pmol分子对应不同的质量，可根据公式1计算所需的DNA量：

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算：

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

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