

# MGIEasy

## RNA Exome 建库操作指南

---

指南版本号: 1.0

试剂盒及版本号:

MGIEasy RNA 方向性文库制备试剂套装 (1000006385) V2.1

MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装 (940-000187-00) V1.0

MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒 (1000007743) V1.0

## 版本历史

说明书 版本	修订 日期	修订内容摘要
1.0	2021年 12月	<ul style="list-style-type: none"><li>• 变更试剂产品货号信息</li></ul>

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](http://www.mgi-tech.com/download/files)

# 目录

<b>第一章 应用信息</b> .....	<b>1</b>
1.1 应用描述.....	1
1.2 适用范围.....	1
1.3 适配测序平台.....	1
1.4 所需试剂.....	2
1.5 试剂盒运输及储存条件.....	4
1.6 客户自备物料清单.....	5
1.7 注意事项.....	6
<b>第二章 样本要求及处理</b> .....	<b>7</b>
2.1 适用样本类型及投入量要求.....	7
2.2 total RNA 样本质量要求.....	7
<b>第三章 文库构建标准流程</b> .....	<b>9</b>
3.1 RNA 片段化.....	9
3.2 反转录及二链合成.....	9
3.3 二链产物纯化.....	11
3.4 末端修复&添加 dA 尾.....	12
3.5 接头连接.....	12
3.6 连接产物纯化.....	13
3.7 PCR 扩增.....	14
3.8 PCR 产物纯化.....	15
3.9 PCR 产物质检.....	15
3.10 杂交前准备.....	16
3.11 杂交捕获.....	17
3.12 洗脱前准备.....	18
3.13 洗脱.....	19
3.14 杂交后 PCR.....	20
3.15 杂交后 PCR 产物纯化及定量.....	20
3.16 变性.....	21
3.17 单链环化.....	22
3.18 酶切消化.....	22
3.19 酶切消化产物纯化.....	23

3.20 酶切消化产物质检.....	24
附录.....	25
附录 A 关于 RNA 样本的 DNase I 消化.....	25
附录 B 关于磁珠及纯化.....	27
附录 C 关于 Adapter 使用.....	28
附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算.....	30

# 第一章 应用信息

## 1.1 应用描述

MGIEasy RNA Exome应用是基于华大智造（MGI）高通量测序平台开发的捕获RNA编码区的建库方法，完成RNA捕获建库所需试剂包括MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装、MGIEasy 外显子组捕获V5探针试剂套装和MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒。

本操作指南主要针对降解的total RNA样本提供一种RNA编码区捕获建库的方法，可将10-100 ng降解的人源total RNA制备成MGI高通量测序平台专用的文库。

## 1.2 适用范围

本操作指南适用于人源total RNA样本编码区域杂交捕获建库。

## 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-2000RS(PE100)

## 1.4 所需试剂

本操作指南需订购的试剂包含MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装, MGIEasy 外显子组捕获V5探针试剂套装和MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒, 其包含的试剂盒、货号、组分信息如下:

表 1 MGIEasy RNA 方向性文库制备试剂套装 ( 16 RXN ) ( 货号: 1000006385 )

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy RNA 方向性 文库制备试剂盒 货号: 1000005270	Fragmentation Buffer	绿色	93 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Directional RT Buffer 1	绿色	88 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Directional RT Buffer 2	棕色	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	RT Enzyme Mix	绿色	24 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Directional Second Strand Buffer	黄色	470 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Second Strand Enzyme Mix	黄色	78 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Buffer	橙色	132 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	55 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Ligation Buffer	红色	450 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Ligase	红色	34 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	470 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Primer Mix	蓝色	90 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	UDG	蓝色	21 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	MGIEasy DNA Adapters-16 ( 管式 ) 试剂盒 货号: 1000005284	DNA Adapters	白色
MGIEasy DNA 纯化磁 珠试剂盒 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 $\times$ 1 支
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260	TE Buffer	白色	4 mL/支 $\times$ 1 支
	Splint Buffer	紫色	186 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

表2 MGI Easy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装 (16 RXN) (货号: 940-000187-00)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGI Easy 外显子组捕获 V5 探针试剂盒	MGI Exome V5 Probe	黑	80 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
货号: 1000007741			
MGI Easy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 1)	Block 1	黄	40 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Block 2	黄	40 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Block 5	黄	8 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
货号: 940-000168-00	Hyb Buffer 3	绿	64 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Hyb Buffer 1	绿	160 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Hyb Buffer 2	绿	7 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Hyb Buffer 4	绿	90 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
MGI Easy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 2)	Binding Buffer	白	12800 $\mu$ L/瓶 $\times$ 1 瓶
	Wash Buffer I	白	8000 $\mu$ L/瓶 $\times$ 1 瓶
货号: 940-000169-00	Wash Buffer II	白	24000 $\mu$ L/瓶 $\times$ 1 瓶

表3 MGI Easy 外显子组捕获辅助试剂盒 (16 RXN) (货号: 1000007743)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGI Easy 外显子组捕获辅助试剂盒	Post-PCR Enzyme Mix	蓝色	800 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Primer Mix	蓝色	96 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Block 3	黄色	16 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
货号: 1000007743	Block 4	黄色	160 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

## 1.5 试剂盒运输及储存条件

MGIEasy RNA 方向性文库制备试剂盒

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA Adapters 试剂盒

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy 环化模块

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 1)

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-15^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy 外显子组捕获杂交洗脱试剂盒 (Box 2)

- 储存温度: 室温
- 运输条件: 常温运输

MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂盒

- 储存温度:  $-80^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA 纯化磁珠

- 储存温度:  $2^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$
- 运输条件: 冰袋运输

\*试剂盒有效期见试剂盒标签。

\*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 4 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 DynaMag™-2 ( Thermo Fisher, Cat. No. 12321D ) 或同类产品 Qubit® 3.0 荧光定量仪 ( ThermoFisher, Cat. No. Q33216 ) Agilent 2100 Bioanalyze ( Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA ) 真空离心浓缩仪 ( Eppendorf, Cat. No. 5305000398 ) Thermomixer 或水浴锅等恒温设备 Nutator 或其他可旋转混匀设备 96 孔磁力架 ( BioMag, Cat. No. BMB-96 ) 或同类产品
试剂	Nuclease free water ( NF water ) ( Ambion, Cat. No. AM9937 ) RNase Zap 杂交液 ( Ambion, Cat. No. AM9780 ) DNase I ( NEB, Cat. No. M0303S ) ( 可选 ) 无水乙醇, 100% 乙醇 ( 分析纯 ) Qubit™ RNA HS Assay Kit ( Invitrogen, Cat. No. Q32852 ) ( 可选 ) 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 ) 安捷伦 DNA 分析试剂盒 ( Agilent, Cat. No. 5067-1504 ) Agilent RNA 6000 Pico Kit ( Agilent, Cat. No. 5067-1513 ) ( 可选 ) M-280 磁珠 ( Invitrogen, Cat. No. 112.06D )
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 PCR 八连管 ( Axygen, Cat. No. PCR-0208-C ) 或 96 孔板 ( Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C ) 2.0 mL 离心管 ( Axygen, Cat. No. MCT-200-C ) 或同类产品 0.2 mL 八连管盖 ( Axygen, Cat. No. PCR-02CP-C ) 或同类产品 Qubit® Assay Tubes ( Invitrogen, Cat. No. Q32856 ) 或 0.5mL 透明薄壁管 ( Axygen, Cat. No. PCR-05-C ) 滤芯吸头 ( Axygen, Cat. No. TF-100 ) 或同类产品 高透光度粘性盖膜 ( ABI, Cat. No. 4306311 ) 灭菌一次性手术刀片

## 1.7 注意事项

- 本操作指南仅用于科研用途，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。
- RNA 操作前需戴好口罩手套，用 RNase Zap 杂交液喷洒并擦拭移液器、试管架及桌面。
- 试剂套装各组分使用前提前取出，将 Enzyme 和 Probe 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。
- 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样品时请更换吸头。
- 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](mailto:MGI-service@mgi-tech.com)

## 第二章 样本要求及处理

### 2.1 适用样本类型及投入量要求

本操作指南适用于人源total RNA样本编码区域杂交捕获建库，特别是FFPE及冰冻组织提取的total RNA。推荐使用的Input total RNA量为10 ng~100 ng。

### 2.2 total RNA 样本质量要求

用Agilent 2100 Bioanalyzer对提取的total RNA样本进行质检，根据DV<sub>200</sub> 评估样本质量并确定建库条件(参见表5)。DV<sub>200</sub>表示样本中大于200nt的RNA片段所占的比例，以Agilent 2100 Bioanalyzer的分析(采用RNA分析芯片)结果为例，进行DV<sub>200</sub>的计算，具体计算方法如图1所示：

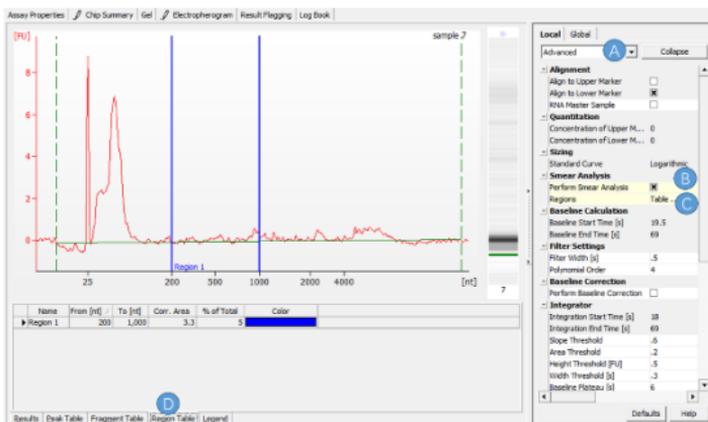


图 1 DV<sub>200</sub>的计算方法

- A: 在一个检测完成的 Agilent 2100 Bioanalyzer 结果图中，在 *Local* 下选择 *Advanced*
- B: 勾选 *Smear Analysis* 下的 *Perform Smear Analysis* 选项
- C: 双击 *Table*，输入需要计算的片段范围，图中以 From 200 bp To 1000 nt 为例
- D: 在 *Region Table* 下即可得到所选片段范围所占的比例 *% of Total*

表 5 不同质量样本建库的推荐条件

DV <sub>200</sub> 值	推荐的 total RNA 投入量	片段化条件	PCR cycles
> 70%	10 ng	94°C, 8 min	15
50~70%	20~50 ng	94°C, 8 min	15
30~50%	50~100 ng	94°C, 6 min	15
< 30%	100 ng 风险建库	不打断	16

- RNA 纯度:  $OD_{260/280} = 1.8 \sim 2.0$ 。
- 需保证 RNA 样本无基因组 DNA 污染, 否则会影响 rRNA 的去除效果。若有污染 (可用琼脂糖凝胶电泳检测), 需先用 DNase I 进行消化, 具体操作参见附录 A。
- 若样本量不足, 可尝试使用较低的投入量, 可能会导致后续二代测序文库构建时的 PCR 产量较低、分析结果中比对率较低等结果。

## 第三章 文库构建标准流程

本标准实验流程所使用的Input RNA是 50 ng total RNA， $DV_{200} > 70\%$ 。若Input RNA质量不同，请参考表5推荐的投入量和片段化条件进行调整。

### 3.1 RNA 片段化



**注意：**以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

- 3.1.1 取 50 ng total RNA 样品至 0.2 mL PCR 管中，用 NF water 补足体积至 10  $\mu$ L。
- 3.1.2 向步骤 3.1.1 的 10  $\mu$ L 样品中加入 4  $\mu$ L Fragmentation Buffer，吹打 10 次混匀，瞬时离心后放入 PCR 仪中。设置片段化条件：

表 6 片段化条件

插入片段	片段化温度	片段化时间
150 bp	94°C	8min

- 3.1.3 反应结束后立即置于冰上 2 min，瞬时离心 10 s，立刻进入反转录反应。

### 3.2 反转录及二链合成



**注意：**以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

- 3.2.1 将 Directional RT Buffer 2 从 -20°C 取出，解冻后涡旋，瞬时离心将液体收集至管底。按如下方法将 Directional RT Buffer 2 稀释 17 倍。

表 7 Directional RT Buffer 2 的稀释

组分	单个反应体积
Directional RT Buffer 2	1 $\mu$ L
NF water	16 $\mu$ L
Total	17 $\mu$ L



**注意：**稀释后的 Directional RT Buffer 2 要立即使用，未使用完的稀释液应丢弃，下次建库时再重新稀释。

- 3.2.2 将 Directional RT Buffer 1 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制反转录反应液（见表 8）：

表 8 反转录反应液

组分	单个反应体积
Directional RT Buffer 1	4 $\mu\text{L}$
Directional RT Buffer 2 稀释液	1 $\mu\text{L}$
RT Enzyme Mix	1 $\mu\text{L}$
Total	6 $\mu\text{L}$

3.2.3 用移液器吸取 6  $\mu\text{L}$  配制好的反转录反应液加入步骤 3.1.3 的片段化后产物中，吹打 10 次混匀，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 9 中的条件进行反应：

表 9 反转录反应条件

温度	时间
热盖	On
25°C	10 min
42°C	30 min
70°C	15 min
4°C	Hold

3.2.5 反应结束后，将产物置于冰上，瞬时离心 10 s。

3.2.6 将 Directional Second Strand Buffer 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制二链合成反应液（见表 10）：

表 10 二链合成反应液

组分	单个反应体积
Directional Second Strand Buffer	26 $\mu\text{L}$
Second Strand Enzyme Mix	4 $\mu\text{L}$
Total	30 $\mu\text{L}$

3.2.7 用移液器吸取 30  $\mu\text{L}$  配制好的二链合成反应液加入步骤 3.2.5 的反转录产物中，吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.8 将步骤 3.2.7 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 11 中的条件进行反应：

表 11 二链合成反应条件

温度	时间
热盖	On
16°C	60 min
4°C	Hold

3.2.9 反应结束后，瞬时离心 10 s，将二链产物转移至新的 1.5 mL 离心管中，置于冰上待下步反应。

✓ **停止点：二链产物可重-20°C 冰箱过夜储存不超过 16 h。**

### 3.3 二链产物纯化

 **注意：操作前请仔细阅读附录 B。**

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

3.3.2 用移液器吸取 100  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.2.9 中的二链产物中，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。

3.3.3 室温孵育 5 min。

3.3.4 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。

3.3.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu$ 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。

3.3.6 重复步骤 3.3.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，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。

3.3.7 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。

3.3.8 将离心管从磁力架上取下，加入 42  $\mu$ 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。

3.3.9 室温下孵育 5 min。

3.3.10 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 40  $\mu$ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

✓ **停止点：二链产物纯化后，可重-20°C 冰箱过夜储存。**

### 3.4 末端修复&添加 dA 尾

3.4.1 在冰上配制末端修复&添加 dA 尾反应液（见表 12）：

表 12 末端修复&添加 dA 尾反应液

组分	单个反应体积
ERAT Buffer	7.1 $\mu\text{L}$
ERAT Enzyme Mix	2.9 $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

3.4.2 用移液器吸取 10  $\mu\text{L}$  配制好的末端修复&添加 dA 尾反应液加入步骤 3.3.10 的纯化后二链产物中，并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，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 13 中的条件进行反应：

表 13 末端修复&添加 dA 尾反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
65°C	15 min
4°C	Hold

3.4.4 瞬时离心将反应液收集至管底。



**注意：不建议在此处停止，请继续进行步骤 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 20%左右。**

### 3.5 接头连接



**注意：因不同的投入量对应不同的 Adapter 使用量，操作前请仔细阅读附录 C。**

3.5.1 将 Adapter 按照表 14 稀释 10 倍，混匀离心，待用。

表 14 Adapter 稀释

组分	体积
Adapter	1 $\mu\text{L}$
TE Buffer	9 $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

3.5.2 参照 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则（参见附录 C），在步骤 3.4.4 的 PCR 管中加入 5  $\mu\text{L}$  对应的稀释后的 Adapters，涡旋震荡 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 15）：

表 15 接头连接反应液

组分	单个反应体积
Ligation Buffer	23.4 $\mu$ L
DNA Ligase	1.6 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

3.5.4 用移液器缓慢吸取 25  $\mu$ L 配制好的接头连接反应液加入步骤 3.5.2 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。

3.5.5 将步骤 3.5.4 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 16 中的条件进行反应：

表 16 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	On
23°C	30 min
4°C	Hold

3.5.6 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.5.7 加入 20  $\mu$ L TE Buffer 至总体积 100  $\mu$ L，全部转移到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ **停止点：**接头连接后产物可放置-20°C 冰箱过夜储存，不超过 16 h。

### 3.6 连接产物纯化



**注意：**操作前请仔细阅读附录 B。

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

3.6.2 用移液器吸取 50  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.5.7 中接头连接产物中，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。

3.6.3 室温孵育 5 min。

3.6.4 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。

3.6.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu$ 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。

3.6.6 重复步骤 3.6.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，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 将离心管从磁力架上取下，加入 22  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.6.9 室温下孵育 5 min。
- 3.6.10 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 20  $\mu\text{L}$  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°C 冰箱储存。**

### 3.7 PCR 扩增

- 3.7.1 在冰上配制 PCR 反应液（见表 17）：

表 17 PCR 反应液

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 $\mu\text{L}$
PCR Primer Mix	4 $\mu\text{L}$
UDG	1 $\mu\text{L}$
Total	30 $\mu\text{L}$

- 3.7.2 用移液器吸取 30  $\mu\text{L}$  配制好的 PCR 反应液加入步骤 3.6.10 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。
- 3.7.3 将步骤 3.7.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 18 的条件进行 PCR 反应：

表 18 PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
37°C	20 min	1 循环
95°C	3 min	1 循环
95°C	30 s	
56°C	30 s	15 循环
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 循环
4°C	Hold	

- 3.7.4 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。

### 3.8 PCR 产物纯化



**注意：操作前请仔细阅读附录 B。**

- 3.8.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.8.2 吸取 60  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至步骤 3.7.4 的 50  $\mu\text{L}$  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。
- 3.8.3 室温孵育 5 min。
- 3.8.4 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。
- 3.8.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  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。
- 3.8.6 重复步骤 3.8.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，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。
- 3.8.7 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。
- 3.8.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.8.9 室温下孵育 5 min。
- 3.8.10 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 30  $\mu\text{L}$  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。**

### 3.9 PCR 产物质检

- 3.9.1 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。要求最终 PCR 产物的产量 $\geq$ 250 ng。
- 3.9.2 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。图 2 为标准实验流程 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

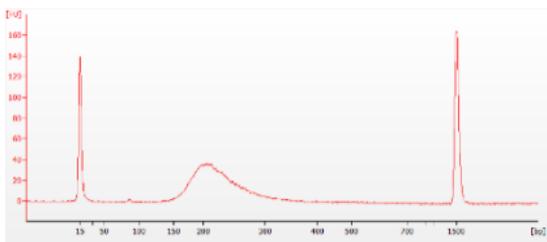


图2 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

### 3.10 杂交前准备



**注意：**杂交环节推荐用 96 孔板，其他环节根据样本数可灵活选择 PCR 管或 PCR 八连管。

3.10.1 根据 PCR 产物浓度取 250 ng PCR 产物用于杂交。若需要多样本混合杂交，每个样本至少投入 250 ng，且  $500 \text{ ng} \leq \text{PCR 产物投入总量} \leq 1000 \text{ ng}$ ，最多支持 4 样本混合杂交。**低质量 FFPE 样本建议单个样本单独杂交，避免低质量的样本影响整体的杂交效果。**样本混合需参考 MGIEasy DNA Adapters-16（管式）说明书使用规则设计混合方案（附录 C 关于 Adapter 使用）。

3.10.2 配制 Block 混合液（见表 19）：

表 19 Block 混合液的配制

组分	单个反应体积
Block 1	2.5 $\mu\text{L}$
Block 2	2.5 $\mu\text{L}$
Block 3	1 $\mu\text{L}$
Block 4	10 $\mu\text{L}$
Total	16 $\mu\text{L}$



**注意：**本组份中 Block 3、Block 4 为 MGI 测序平台专用的接头封闭序列，来自“MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒”。

3.10.3 用移液器吸取 16  $\mu\text{L}$  配制好的 Block 混合液加入步骤 3.10.1 的样本中配制成预杂交混合液，置于浓缩仪中浓缩至 9  $\mu\text{L}$ ；若体积小于 9  $\mu\text{L}$ ，则用 NF water 补至 9  $\mu\text{L}$ 。

3.10.4 将步骤 3.10.3 的 9  $\mu\text{L}$  预杂交混合液置于 PCR 仪上，按照表 20 反应条件进行预杂交：

表 20 预杂交反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	5 min
65°C	Hold

### 3.11 杂交捕获

3.11.1 在一个新的 0.2 mL PCR 管中配制杂交混合液（见表 21）：

表 21 杂交混合液的配制

组分	单个反应体积
Hyb Buffer 1	10 $\mu$ L
Hyb Buffer 2	0.4 $\mu$ L
Hyb Buffer 3	4 $\mu$ L
Hyb Buffer 4	5.6 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

3.11.2 将步骤 3.11.1 的杂交混合液置于 PCR 仪中 65°C 孵育至少 5 min，透过光源观察，确认体系中  
没有晶体沉淀才能使用。

3.11.3 取一个新的 96 孔 PCR 板（推荐），在冰上配制探针混合液（见表 22）：

表 22 探针混合液的配制

组分	单个反应体积
NF water	1.5 $\mu$ L
Block 5	0.5 $\mu$ L
MGI Exome V5 Probe	5 $\mu$ L
Total	7 $\mu$ L



**注意：MGI Exome V5 Probe 需在冰上融化，最后加入，配制成混合液。**

3.11.4 在步骤 3.11.3 的 PCR 板上盖紧 0.2 mL 八连管盖，将探针混合液置于 PCR 仪上，按照表 23 反应条件进行孵育：

表 23 探针混合液的孵育

温度	时间
热盖	On
65°C	2 min
65°C	Hold

3.11.5 保持上述各混合液于 65°C，迅速吸取 13  $\mu\text{L}$  步骤 3.11.2 的杂交混合液转移到步骤 3.10.4 的 9  $\mu\text{L}$  预杂交混合液中，用移液器吹打混匀。

 **注意：该步骤推荐使用 100  $\mu\text{L}$  带滤芯无色吸头**

3.11.6 保持各混合液于 65°C，迅速将 22  $\mu\text{L}$  步骤 3.11.5 的液体全部转移到步骤 3.11.4 的探针混合液中，用移液器吹打混匀。

 **注意：该步骤推荐使用 100  $\mu\text{L}$  带滤芯无色吸头**

3.11.7 用高透光度粘性盖膜迅速封好 PCR 板，压紧封膜，确保所有孔完全密封，并重复该步骤一次（即封膜两次）。

3.11.8 保持 96 孔 PCR 板于 65°C，按照表 24 反应条件进行杂交反应 24 h。

表 24 杂交反应条件

温度	时间
热盖 (105°C)	On
65°C	Hold

### 3.12 洗脱前准备

3.12.1 提前至少 30 min 将 Thermomixer 调至 65°C，取 1.8 mL Wash Buffer II 于 2 mL 离心管中，置于 Thermomixer 中预热至 65°C。

3.12.2 取出 M-280 磁珠充分震荡混匀，用移液器吸取 50  $\mu\text{L}$  M-280 磁珠至新的 2.0 mL 离心管中。

3.12.3 加入 200  $\mu\text{L}$  Binding Buffer，涡旋震荡 5 s 至所有磁珠悬浮。

3.12.4 将离心管瞬时离心，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。

3.12.5 重复步骤 3.12.3 到步骤 3.12.4 两次。

3.12.6 加入 200  $\mu\text{L}$  Binding Buffer 重悬磁珠。

### 3.13 洗脱

3.13.1 步骤 3.11.8 的杂交反应液经 24 h 孵育后，继续保持在 PCR 仪上 65°C，用刀片划开封口膜，使用移液器快速吸取并估计剩余杂交液体积，然后转移到步骤 3.12.6 含有的 200  $\mu\text{L}$  磁珠的离心管中。



**注意：若剩余体积少于 19  $\mu\text{L}$  则有杂交产量低的风险。**



**注意：若进行多样本操作，为了防止样本数量过多，量取体积时间长，导致杂交液蒸发量较大的情况，可以完成 6-8 个反应后封好封口膜并盖上 PCR 仪盖，保持 10 s 后继续。**

3.13.2 将步骤 3.13.1 的离心管置于 Nutator 或类似的装置上 360° 旋转混匀，室温下旋转孵育 30 min。

3.13.3 将样本从 Nutator 中取下。

3.13.4 将离心管瞬时离心，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。

3.13.5 加入 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer I，上下颠倒至所有磁珠悬浮，室温下孵育 15 min。

3.13.6 将离心管瞬时离心，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。

3.13.7 在离心管中加入 500  $\mu\text{L}$  步骤 3.12.1 预热的 Wash Buffer II，置于 Thermomixer 中，将转速调至 1000 rpm，按住“short”模式按钮约 10 s 使得所有磁珠悬浮后将转速调至 0 rpm，保持温度 65°C 静置孵育 10 min。

3.13.8 将离心管瞬时离心，置于磁力架，静置 30s 至液体澄清，用移液器小心吸取上清并丢弃。

3.13.9 重复步骤 3.13.7 到步骤 3.13.8 两次。

3.13.10 用 100  $\mu\text{L}$  NF water 重悬磁珠，将全部重悬后的样品（包括磁珠）全部转移到新的 1.5 mL 离心管中，瞬时离心。

3.13.11 将步骤 3.13.10 的 1.5 mL 离心管置于磁力架上，静置 2 min 至液体完全澄清，小心吸取上清并丢弃，可用小量程的移液器重复吸取以尽量保证无液体残留。

3.13.12 用 44  $\mu\text{L}$  NF water 重悬磁珠，移液器吸取重悬后的样品（包括磁珠）转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

### 3.14 杂交后 PCR

3.14.1 取出 MGIeasy 外显子组捕获辅助试剂盒，在冰上配制杂交后 PCR 反应液（见表 25）：

表 25 杂交后 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
Post-PCR Enzyme Mix	50 $\mu$ L
PCR Primer Mix	6 $\mu$ L
Total	56 $\mu$ L



**注意：**Post-PCR Enzyme Mix 与 PCR Primer Mix 来自“MGIeasy 外显子组捕获辅助试剂盒”。

3.14.2 用移液器吸取 56  $\mu$ L 配制好的杂交后 PCR 反应液加入步骤 3.13.12 的带有磁珠的 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。

3.14.3 将步骤 3.14.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 26 的条件进行杂交后 PCR 反应：

表 26 杂交后 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
95°C	3 min	1 循环
98°C	20 s	
60°C	15 s	13 循环
72°C	30 s	
72°C	10 min	1 循环
4°C	Hold	

3.14.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.14.5 将 PCR 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器吸取 100  $\mu$ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

### 3.15 杂交后 PCR 产物纯化及定量

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

3.15.2 吸取 120  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.14.5 的 100  $\mu$ L 杂交后 PCR 产物中，用移液器轻轻吹打至少 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。

3.15.3 室温孵育 5 min。

- 3.15.4 将离心管瞬时离心，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。
- 3.15.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  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。
- 3.15.6 重复步骤 3.15.5，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。
- 3.15.7 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。
- 3.15.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 3.15.9 室温下孵育 5 min。
- 3.15.10 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器吸取 30  $\mu\text{L}$  上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- 3.15.11 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杂交后 PCR 纯化后产物进行定量，要求最终 PCR 产物的摩尔产量 $\geq 1$  pmol，请参照附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算公式进行计算，例如：主带 150 bp 的打断产物，杂交后 PCR 产物主片段大小 234 bp，其产量应达到 154 ng。

✓ **停止点：**杂交后 PCR 纯化后的产物可置-20°C 冰箱储存，待变性环化。

### 3.16 变性



**注意：**操作前请仔细阅读附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算。

- 3.16.1 根据杂交后 PCR 产物的主片段分布，参考附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算公式，取 1 pmol PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48  $\mu\text{L}$ 。
- 3.16.2 将步骤 3.16.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 27 的条件进行反应：

表 27 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	3 min

- 3.16.3 反应结束后，立即将步骤 3.16.2 所述 PCR 管转移到冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

### 3.17 单链环化

3.17.1 取出 MGIEasy 环化模块，在冰上配制单链环化反应液（见表 28）：

表 28 单链环化反应液的配制

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 $\mu\text{L}$

3.17.2 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 3.16.3 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。

3.17.3 将步骤 3.17.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 29 的条件进行反应：

表 29 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.17.4 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上，立即进入下一步反应。

### 3.18 酶切消化

3.18.1 在步骤 3.17.3 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液（见表 30）：

表 30 酶切消化反应液的配制

组分	单个反应体积
Digestion Buffer	1.4 $\mu\text{L}$
Digestion Enzyme	2.6 $\mu\text{L}$
Total	4.0 $\mu\text{L}$

3.18.2 用移液器吸取 4  $\mu\text{L}$  配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.17.4 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。

3.18.3 将步骤 3.18.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 31 的条件进行反应：

表 31 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.18.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.18.5 立即向 PCR 管中加入 7.5  $\mu$ L Digestion Stop Buffer，涡旋震荡 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。

### 3.19 酶切消化产物纯化



**注意：操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。**

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

3.19.2 吸取 170  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.18.5 的酶切消化产物中，用移液器轻轻吹打至少 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。

3.19.3 室温孵育 10 min。

3.19.4 将离心管瞬时离心，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。

3.19.5 保持离心管置于磁力架上，加入 500  $\mu$ 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。

3.19.6 重复步骤 3.19.5，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。

3.19.7 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。

3.19.8 将离心管从磁力架上取下，加入 22  $\mu$ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。

3.19.9 室温下孵育 10 min。

3.19.10 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器吸取 20  $\mu$ 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°C 冰箱储存。**

### 3.20 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。最终要求酶切消化产物产量（ssDNA）/PCR投入量（dsDNA） $\geq 7\%$ 。例如：主带150 bp的打断产物，PCR产物主片段大小为234 bp，投入154 ng进行环化，其酶切消化产物产量应达到10.8 ng以上。

## 附录

### 附录 A 关于 RNA 样本的 DNase I 消化

若 RNA 样本中有基因组 DNA 污染，可先用 DNase I（需自备，见“客户自备物料清单”）对样本进行消化。因 DNase I 消化的操作会造成一定的 RNA 样本损失，所以该步骤 total RNA 投入量需要比预期投入量（本试剂盒所需的 RNA 投入量）适当增加 20%~30%，例如，若需要投入 50 ng total RNA 样本进行建库，那么在此步的 DNase I 消化时，需要投入 60~70 ng total RNA 样本进行消化，具体消化步骤如下：

1. 取适量的 RNA 样本于无核酸酶的 0.2 mL PCR 管中，用 NF water 补足体积至 42.5  $\mu$ L，在冰上配制消化反应混合液（见表 32）：

表 32 DNase I 消化反应混合液

组分	单个反应体积
total RNA	42.5 $\mu$ L
DNase I	2.5 $\mu$ L
10 $\times$ DNase I Buffer	5 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

2. 将上述反应混合液轻轻吹打混匀后，置于 PCR 仪上，如表 33 条件进行反应：

表 33 DNase I 消化反应条件

温度	时间
热盖（45 $^{\circ}$ C）	on
37 $^{\circ}$ C	20 min
4 $^{\circ}$ C	$\infty$

3. 反应结束后，瞬时离心，将液体全部转移到新的 1.5 mL 管中，用 90  $\mu$ L RNA 纯化磁珠对产物进行纯化，纯化过程如下：



**注意：操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。**

- 3.1 提前 30 min 从 4 $^{\circ}$ C 冰箱取出 RNA 纯化磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.2 用移液器吸取 90  $\mu$ L 磁珠至步骤 3 中的 DNase I 消化后产物中，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 1.5 mL 管中。
- 3.3 室温孵育 5 min。
- 3.4 瞬时离心，将 1.5 mL 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。

- 3.5 保持 1.5 mL 管固定于磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  用 NF water 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。
  - 3.6 重复步骤 3.5 一次，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
  - 3.7 保持 1.5 mL 管固定于磁力架上，打开 1.5 mL 管管盖，室温干燥直至磁珠表面无反光、无开裂。
  - 3.8 将 1.5 mL 管从磁力架上取下，移液器取适量体积的 NF water 进行 RNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
-  **注意：若纯化后的样本需定量，洗脱时加入 13  $\mu\text{L}$  NF water，洗脱后转移 11  $\mu\text{L}$  上清液到新的无核酸酶的 PCR 管中，取 1  $\mu\text{L}$  产物用“Qubit™ RNA HS Assay Kit”（见“客户自备物料清单”）进行定量；若纯化后的产物不定量，洗脱时加入 12  $\mu\text{L}$  NF water，洗脱后转移 10  $\mu\text{L}$  上清液到新的无核酸酶的 PCR 管中进行后续的“RNA 片段化”反应。**
- 3.9 室温下孵育 5 min。
  - 3.10 瞬时离心，将 1.5 mL 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，吸取上清液转移到新的无核酸酶的 PCR 管中，进行后续的“RNA 片段化”反应。

## 附录 B 关于磁珠及纯化

本建库指南推荐使用套装内的 MGIeasy DNA 纯化磁珠试剂盒 (MGI, Cat. No. 1000005278) 的 DNA Clean beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 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。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段的下限长度。磁珠用量越高, 纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

### 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 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 2-3  $\mu\text{L}$  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, 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  $\mu\text{L}$ 。
- 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 C 关于 Adapter 使用

- 本试剂套装提供 MGIEasy DNA Adapters-16( 管式 )试剂盒。本试剂盒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 C-1 的试剂盒使用规则。
- 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；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。
- 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。
- Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请按照表 34 和实际 total RNA 用量确定相应的接头稀释倍数。需要稀释接头时，请使用试剂盒中的 TE Buffer 对接头进行稀释。

表 34 不同 total RNA 投入量推荐 Adapter 使用量

total RNA (ng)	MGI Adapter	MGI Adapter
	稀释倍数	稀释后投入量 (μL)
51-100	5	5
10-50	10	5

- 对于其它的样本 RNA 投入量，可根据需求适当调整 Adapter 使用量。

### C-1 MGIEasy DNA 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如下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

表 35 MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒使用规则

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 取等体积混合成 mix 后加入样本中 或 2、加一组 8 Adapter (97-104)，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中

2	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <p>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)</p> <p>或 2、加一组 8 Adapter (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)</p>
3	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <p>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</p>
4	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <p>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)</p> <p>或 2、加一组 8 Adapter (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 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)</p>
5	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <p>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</p>
6	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <p>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</p>
7	<p>需使用全部 3 组 Adapter, 分三步操作:</p> <p>1) 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 Adapter,</p> <p>2) 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter,</p> <p>3) 样本 7, 使用剩余的一组 Adapter, 可以加该组内一个单 Adapter, 或者加组内所有编号 Adapter 取等体积混合成的 Adapter mix</p> <p>注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter</p>
8	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <p>1、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本</p> <p>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</p>

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 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

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

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

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