MGIEasy

外显子组捕获辅助试剂盒使用说明书

货号：1000007743（16 RXN）

试剂盒版本号：V1.0

说明书版本号：A2

仅供科研使用

深圳华大智造科技股份有限公司 版权所有

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	◆ 更新公司联系信息
A1	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” ◆ 步骤 3.4：增加定量步骤 ◆ 增加附录 A 接头使用规则
A0	V1.0	2019 年 2 月	◆ 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......2
1.5 试剂盒储存条件及有效期......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 样本准备......4
2.2 样本定量和质控......4
2.3 试剂准备......4

第三章 实验操作标准流程......5

3.1 杂交前样本制备......6
3.2 杂交捕获......6
3.3 杂交后 PCR......6
3.4 杂交后 PCR 产物纯化和定量......7

附录......9

附录 A MGIEasy DNA Adapters-16 （管式）试剂盒使用规则......9

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy外显子组捕获辅助试剂盒作为通用捕获辅助试剂盒，可以灵活搭配DNA文库制备试剂盒和各类商业探针及杂交洗脱试剂盒使用，用于MGI高通量测序平台外显子文库的构建和杂交。其中DNA文库制备试剂盒可以选择MGIEasy酶切DNA文库制备试剂套装（16RXN）或MGIEasy通用DNA文库制备试剂套装（16RXN），商业探针及杂交洗脱试剂盒可以选择MGIEasy外显子组捕获V4探针试剂套装或MGIEasy外显子组捕获V5探针试剂套装，或其他商业探针及其配套的杂交试剂。

建库和杂交全流程可参考使用如下推荐组合套装：

表 1 MGIEasy 系列文库制备试剂套装汇总

<table>
<tr><th>组合方式</th><th>DNA 文库制备试剂盒</th><th>探针及杂交洗脱试剂盒</th><th>捕获辅助试剂盒</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="3">MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装 （16RXN）(1000006987)</td><td>MGIEasy 外显子组捕获 V4 探针试剂套装（1000007745)</td><td rowspan="6">MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒 (1000007743)</td></tr>
<tr><td>2</td><td>MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装（1000007746)</td></tr>
<tr><td>3</td><td>其他商业探针及杂交洗脱试剂盒</td></tr>
<tr><td>4</td><td rowspan="3">MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装 （16RXN）(1000006985)</td><td>MGIEasy 外显子组捕获 V4 探针试剂套装（1000007745)</td></tr>
<tr><td>5</td><td>MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装（1000007746)</td></tr>
<tr><td>6</td><td>其他商业探针及杂交洗脱试剂盒</td></tr>
</table>

1.2 适用范围

本试剂盒用于辅助人源样本外显子区域的杂交捕获，适用于 Roche/IDT 等公司的 DNA 探针产品，MGI/Agilent 等公司的 RNA 探针产品，基于 MGI 高通量测序平台进行外显子文库的构建。

1.3 适配测序平台

构建的文库可使用以下测序仪及测序平台进行测序：

MGISEQ-2000RS(PE100/PE150)

BGISEQ-500RS(PE100/PE150)

1.4 试剂盒组分

MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒规格为 16 RXN。每个试剂盒包含 4 个组分。其货号、组分信息如下：

表 2　MGIEasy 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
MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒 货号：1000007743	Post-PCR Enzyme Mix	蓝	800 μL/支× 1 支
	PCR Primer Mix	蓝	96 μL/支× 1 支
	Block 3	黄	16 μL/支× 1 支
	Block 4	黄	160 μL/支× 1 支

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒：

- 储存温度：-25°C~-18°C
- 运输条件：干冰运输
- 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 3　客户自备物料清单

仪器	移液器 漩涡混匀仪 小型离心机 磁力架 DynaMag^{TM-2}（Thermo Fisher, Cat. No. 12321D）或同类产品 96 孔磁力架（BioMag, Cat. No. BMB-96）或同类产品 PCR 仪 Thermomixer 或水浴锅等恒温设备 Nutator 或其他可旋转混匀设备 真空离心浓缩仪（离心 pendorf, Cat. No. 5305000398）
试剂	NF water，Nuclease free water（Ambion, Cat. No. AM9937） M-280 磁珠（Invitrogen, Cat. No. 112.06D） 其他探针试剂盒所需试剂
耗材	0.2 mL PCR 管 (Axygen, Cat. No. PCR-02-C) 或同类产品

	96 孔 PCR 板（Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C）或同类产品 1.5 mL 离心管（Axygen, Cat. No. MCT-150-C)或同类产品 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 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） 其他探针试剂盒所需耗材
DNA 文库制备试剂盒	MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装（MGI, Cat. No. 1000009658) 或 MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装（MGI, Cat. No. 1000009657)
探针及杂交洗脱试剂盒	MGIEasy 外显子组捕获 V4 探针试剂套装（MGI, Cat. No. 1000007745) 或 MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装（MGI, Cat. No. 1000007746) 或其他商业探针杂交所需的试剂盒

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。
- 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 产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，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

第二章 样本要求及处理

2.1 样本准备

样本指杂交前用“MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装（16RXN）”或“MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装（16RXN）”所制备的，用于进行杂交反应的 PCR 产物。

2.2 样本定量和质控

样本的定量和片段分布检测可参考样本制备的对应说明书中的“PCR 产物质检”步骤。

2.3 试剂准备

- 杂交捕获前，取出试剂盒中 Block 3/Block 4，室温或者冰上融化后备用，参考步骤 3.2 进行杂交捕获，Block 3/Block 4 为 MGI 高通量测序平台专用的接头 Block 序列，适配 Adapter 01-04，13-16，97-104，用于替换其他测序平台的接头 Block。
- 杂交捕获后，取出试剂盒中 Post-PCR Enzyme Mix/PCR Primer Mix，室温或者冰上融化后参考步骤 3.3 进行探针杂交洗脱后的扩增。

第三章 实验操作标准流程

⚠ **注意：若使用 MGI Exome V4 Probe 或 MGI Exome V5 Probe，则需分别搭配 MGIEasy 外显子组捕获 V4 探针试剂套装或 MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装，并参考对应套装的使用说明书完成杂交捕获流程；**

⚠ **注意：若使用其他商业探针，则需参考其对应的杂交捕获流程，将其中针对非 MGI 高通量测序平台所用的接头封闭序列替换为本试剂盒中的 Block 3 和 Block 4，推荐体积和替换方案如下：**

表 4　针对主流商业探针推荐 Block3 和 Block4 使用体积和替换方案

商业探针	Block 3 体积 (μL)	Block 4 体积 (μL)	商业探针杂交试剂盒中需替换的组份
MGI Exome V4 Probe	1 μL	10 μL	无
MGI Exome V5 Probe	1 μL	10 μL	无
SureSelect Human All Exon V6 等同类 SureSelect 系列探针	1 μL	10 μL	SureSelect Indexing Block #3
SeqCap® EZ Human Exome Probes v3.0	1 μL	10 μL	SeqCap HE Universal Oligo; SeqCap HE Index 2 Oligo; SeqCap HE Index 4 Oligo; SeqCap HE Index 6 Oligo; SeqCap HE Index 8 Oligo
xGen® Exome Research Panel	1 μL	10 μL	xGen® Universal Blocking Oligo (1); xGen® Universal Blocking Oligo (2); xGen® Universal Blocking Oligo (3)

⚠ **注意：不同主流类型探针的杂交后 PCR 循环数推荐如下:**

表 5　针对主流商业探针推荐杂交后 PCR 循环数

商业探针	杂交后 PCR 循环数
MGI Exome V4 Probe	12~13
MGI Exome V5 Probe	12~13
SeqCap® EZ Human Exome Probes v3.0	12~13
xGen® Exome Research Panel	8 (12 pool)–12 (1 pool)
SureSelect Human All Exon V6 等同类 SureSelect 系列探针	12~13

以 NimbleGen® SeqCap EZ 捕获流程为例，实验操作标准流程如下：

3.1 杂交前样本制备

3.1.1 参考 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装使用说明书或 MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装使用说明书，进行杂交前样本制备。根据杂交所需要的样本投入量，按照对应说明书推荐的 PCR cycle 数进行扩增，并根据其附录的接头使用规则合理选择建库接头。然后根据 RSS_SeqCap_EZ_UGuide_v5.4 说明书中要求的需求量投入制备好的 PCR 产物进行杂交。

3.2 杂交捕获

3.2.1 参照 RSS_SeqCap_EZ_UGuide_v5.4 Chapter 5 St 离心.3，使用该试剂盒中的 Block 3 和 Block 4 组份替换 St 离心 4 中 SeqCap HE Universal Oligo 和 SeqCap HE Index 2/4/6/8 Oligo。Block3 和 Block4 使用体积和替换方案参考表 4。

⚠ **注意：若 Block 3 与 Block 4 的使用体积高于探针试剂盒说明书中被替换试剂的使用体积，则可将该两个组份在样品浓缩前加入，通过浓缩控制反应体系的体积。（如本例中，RSS_SeqCap_EZ_UGuide_v5.4 要求将 Multiplex Hybridization Enhancing Oligo Pool 加入样品中一并进行浓缩，控制体积。）**

3.2.2 参照 RSS_SeqCap_EZ_UGuide_v5.4 Chapter 5-6 进行杂交捕获。本说明书未提及的试剂均以探针产品说明书为准。

⚠ **注意：洗脱后进行下一杂交后 PCR 时要求含磁珠样品体积要求为 44 μL， 如探针产品说明书中要求的扩增样品体积小于 44 μL，使用 NF water 将样品体积补为 44 μL。如探针产品说明书中要求的扩增样品体积大于 44 μL，需要将洗脱液体积减少为 44 μL。**

3.3 杂交后 PCR

3.3.1 在冰上配制杂交后 PCR 反应液（见表 6）：

表 6 杂交后 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
Post-PCR Enzyme Mix	50 μL
PCR Primer Mix	6 μL
Total	56 μL

3.3.2 用移液器吸取 56 μL 配制好的杂交后 PCR 反应液加入 44μL 含有磁珠捕获样品的 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。

3.3.3　将步骤 3.3.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 7 的条件进行杂交后 PCR 反应：

表 7　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	X 循环
72°C	30 s	
72°C	10 min	1 循环
4°C	Hold	

注意：　表中“X”处 cycle 数可参考本说明书表 5。如本例中“X”为 12 或 13。

3.3.4　反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.3.5　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 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

3.4 杂交后 PCR 产物纯化和定量

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。

注意：DNA Clean Beads 来自 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 (MGI, Cat. No. 1000005278)；或者可用 AMPure® XP （Agencourt, Cat. No. A63882）代替。

3.4.2　吸取 100 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.3.5 的 100 μL 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。

3.4.3　室温孵育 5 min。

3.4.4　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。

3.4.5　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。

3.4.6　重复步骤 3.4.5，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。

3.4.7　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。

3.4.8　将离心管从磁力架上取下，加入 32 μL 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　。

3.4.9 室温下孵育 5 min。

3.4.10 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 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

3.4.11 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。如需每个杂交后 PCR 产物样本单独环化测序，则建议最终 PCR 产物的摩尔产量≥1 pmol，请参照公式 1 进行计算，例如：主带 300 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小 384 bp，其产量应达到 250 ng；如需将多个杂交后 PCR 产物样本混合测序，建议根据 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案（参照附录 A），在定量后进行带有不同 UDB PCR Primer Mix 的样本混合，混合后总量为 1 pmol，总体积≤48 μL。

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DNA量：

公式 1 DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

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

✔ 停止点：PCR 纯化后产物可置-20°C 冰箱储存，待变性环化。

⚠ **注意：后续文库构建步骤可参照“MGIEasy 通用 DNA 文库制备套装使用说明书”第三章“3.7 变性”步骤开始完成文库构建，或参考“MGIEasy 酶切 DNA 文库制备套装使用说明书”第三章“3.9 变性”步骤开始完成文库构建。**

附录

附录 A 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 8　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	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（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）
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（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）

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，或者加组内所有编号 Adapter 取等体积混合成的 Adapter mix 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（97-104），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

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。

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

Doc. #：B02-087