MGIEasy

PCR-Free DNA 文库制备试剂套装使用说明书

货号：1000013452（16 RXN），1000013453（96 RXN）

试剂盒版本号：V1.1

说明书版本号：5.0

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
5.0	V1.1	2022 年 3 月	◆ 更新公司 LOGO
A3	V1.1	2021 年 1 月	◆ 更新公司联系信息
A2	V1.1	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”
A1	V1.1	2019 年 12 月	◆ 更新试剂盒版本为 V1.1； ◆ 更新说明书风格； ◆ 增加产品适配测序平台； ◆ 降低基因组 DNA 起始量要求（最低至 200ng）； ◆ 增加单选纯化操作条件，对应表格编号为表 5，后续其他表格编号依次递增； ◆ 增加产品适用范围（扩增子）； ◆ 更新连接产物定量合格的标准
A0	V1.0	2019 年 4 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:

https://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.....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 DNA 打断方法和片段筛选.....7
2.3 片段选择后 DNA 的定量和质控.....8

第三章 文库构建标准流程.....9

3.1 试剂准备.....9
3.2 末端修复.....10
3.3 接头连接.....10
3.4 连接产物纯化.....11
3.5 变性.....12
3.6 单链环化.....13
3.7 酶切消化.....13
3.8 酶切消化产物纯化.....14
3.9 酶切消化产物质检.....15

附录.....16

附录 A 关于磁珠及纯化.....16
附录 B 磁珠片段筛选步骤.....18
附录 C 关于 Adapter 使用.....21
附录 D 关于接头连接反应.....26
附录 E DNA 分子质量与摩尔数之间的换算.....26

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 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纯化后的80-200 ng DNA片段制备成MGI高通量测序平台专用的文库。本试剂盒采用高质量的酶学组成，优化的接头连接技术，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）、鼠、水稻、大肠杆菌、Metagenomics和扩增子产物等。不同物种均有稳定的表现。

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/PE200/SE400)

DNBSEQ-T7RS(PE100)

1.4 试剂盒组分

MGIEasy 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 PCR-Free DNA 文库制备试剂套装 V1.1（16 RXN）（货号：1000013452）

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy PCR-Free DNA 文库 制备试剂盒 V1.1 货号：1000013456	20x Elute Enhancer	黑色	3 μL/支× 1 支
	ER Buffer	橙色	112 μL/支× 1 支
	ER Enzyme Mix	橙色	48 μL/支× 1 支
	Ad-Lig Buffer	红色	288 μL/支× 1 支
	Ad Ligase	红色	80 μL/支× 1 支
	Ligation Enhancer	棕色	32 μL/支× 1 支
	Cir Buffer	紫色	184 μL/支× 1 支
	Cir Enzyme Mix	紫色	8 μL/支× 1 支
	Exo Buffer	白色	23 μL/支× 1 支
	Exo Enzyme Mix	白色	42 μL/支× 1 支
	Exo Stop Buffer	白色	48 μL/支× 1 支
MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒 货号：1000013460	DNA Adapters	无色	5 μL/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　MGIEasy PCR-Free DNA 文库制备试剂套装 V1.1（96 RXN）（货号：1000013453）

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy PCR-Free DNA 文库 制备试剂盒 V1.1 货号：　1000013457	20x Elute Enhancer	黑色	15 μL/支× 1 支
	ER Buffer	橙色	672 μL/支× 1 支
	ER Enzyme Mix	橙色	288 μL/支× 1 支
	Ad-Lig Buffer	红色	864 μL/支× 2 支
	Ad Ligase	红色	480 μL/支× 1 支
	Ligation Enhancer	棕色	192 μL/支× 1 支
	Cir Buffer	紫色	1104 μL/支× 1 支
	Cir Enzyme Mix	紫色	48 μL/支× 1 支
	Exo Buffer	白色	135 μL/支× 1 支
	Exo Enzyme Mix	白色	250 μL/支× 1 支
	Exo Stop Buffer	白色	288 μL/支× 1 支
MGIEasy PF Adapters-96（板式）试剂盒 货号：　1000013461	DNA Adapters-96 plate	-	5 μL/孔× 96 孔
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号：1000005279	DNA Clean Beads	白色	50 mL/支× 1 支
	TE Buffer	白色	25 mL/支× 1 支

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy PCR-Free DNA 文库制备试剂盒

- 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
- 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°C~-15°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°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 3　客户自备物料清单

仪器	Covaris 打断仪 旋涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 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)
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 1x TE buffer，pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) 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）
耗材	Covaris 打断管 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提前取出，将每步对应的 Enzyme Mix 涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻，解冻后涡旋混匀或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，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。
- 在末端修复反应时若使用升温速度慢的 PCR 仪时，推荐在使用前应先预热 PCR 仪至反应温度附近。
- 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 3.8 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@mgi-tech.com

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，包括人（血液、唾液、新鲜组织）、鼠、水稻、大肠杆菌、meta等样本提取的基因组DNA和扩增子产物进行文库制备。推荐使用200-1000 ng完整度较好，OD_{260}/OD_{280}=1.8 ~ 2.0，OD_{260}/OD_{230}>2.0的高质量基因组DNA进行打断。

2.2 DNA 打断方法和片段筛选

2.2.1 打断

- 请将基因组 DNA 打断至 150-1000 bp 之间，主带 300-500 bp。
- 如若使用 Covaris 仪器进行打断，具体打断条件可到 Covaris 官网查询，推荐设计梯度打断实验，摸索最适打断条件后，方可正式开始打断。

2.2.2 片段筛选

- 打断后 DNA 分布范围较宽（打断产物片段分布在 150-1000 bp 之间，主带 300-500 bp），通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。
- 若起始打断的样本 gDNA 总量充足，推荐使用 500-1000 ng gDNA 进行打断，然后使用两步法磁珠片段筛选方案（如表 4）。

表 4　两步法磁珠片选：75 μL 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠使用量关系表

主带片段（bp）	350	400	560
第一轮（μL）	50	45	41.25
第二轮（μL）	15	15	15
测序方案	PE100/PE150	PE100/PE150	PE200/SE400

注：片选条件可供参考。针对不同样品，片选主带片段可能有±50 bp 偏差。

- 若起始打断的样本珍贵，gDNA 总量不足 500 ng，可尝试使用 200-500 ng gDNA 进行打断，然后使用一步法磁珠纯化方案（如表 5）。

表 5　75 μL 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠使用量关系表

主带片段（bp）	400	560
磁珠用量（μL）	60	52.5
测序方案	PE100/PE150	PE200/SE400

注：片选条件可供参考。针对不同样品，片选主带片段可能有±50 bp 偏差。

注意：若选择 200ng gDNA 起始打断构建文库的方案，对应的 ssCir 产量通常只满足单文库上机 1 次。因一步法纯化获得的插入片段较弥散，测序质量和测序数据产出量会有轻微下降。

- 下面为两种不同磁珠片选的实施例，详见附录 B:

  实施例 1：1000 ng gDNA 打断后，取 75 μL 打断产物在末端修复之前进行 45 μL +15 μL 磁珠片段筛选的详细步骤，最终得到主带 400 bp 的目的片段。如果打断产物体积不到 75 μL，则需用 En-TE buffer 补足 75 μL 后进行片段选择。

  实施例 2：200 ng gDNA 打断后，取 75 μL 打断产物在末端修复之前进行 60 μL 磁珠纯化的详细步骤，最终得到主带 400 bp 的目的片段。如果打断产物体积不到 75 μL，则需用 En-TE buffer 补足 75 μL 后进行片段选择。

- 因两步法磁珠片段筛选的 DNA 损失量约为 60%－95%，故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。

2.3 片段选择后 DNA 的定量和质控

- 片段选择后 DNA（片选 DNA）指投入末端修复步骤中的 DNA 量。本试剂盒兼容片选 DNA 量范围为 80-200 ng。如果片选 DNA 在 60-80 ng，则可尝试风险建库。

- 本试剂盒片段筛选条件支持一定长度的片段主带 （见表 4 和表 5）。测序时，随着片段增大，测序质量可能会略微下降。推荐片段主带在 350-450 bp，片段范围在主带 200 bp 左右。

- 若打断 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

本试剂盒推荐的标准建库流程如下：

80-200 ng 400 bp片段选择后的DNA片段通过末端修复、连接、环化完成文库构建。

3.1 试剂准备

3.1.1 按照表 6 配方准备 1x Elute Enhancer，室温存储条件下，7 天内可用。

表 6 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 7 配方准备 En-TE，4°C 存储条件下，7 天内可用。

表 7 En-TE 的配制

组分	体积
1x Elute Enhancer	2 μL
TE Buffer	998 μL
Total	1000 μL

3.1.3 按照表 8 配方准备 En-Beads，4°C 存储条件下，7 天内可用。

表 8 En-Beads 的配制

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

注意：以上试剂均满足 6 个样本建库需求，若有多个样本，可按试剂需求等比例放大配置。

3.2 末端修复

3.2.1 根据样本浓度，取适量片段化样本 DNA（推荐 80-200 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，用 En-TE 补充至总体积 40 μL。

3.2.2 在冰上配制末端修复反应液（见表 9）:

表 9 末端修复反应液的配制

组分	体积
ER Buffer	7 μL
ER Enzyme Mix	3 μL
Total	10 μL

3.2.3 用移液器吸取 10 μL 配制好的末端修复反应液加入步骤 3.2.1 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3s，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 10 中的条件进行反应，总反应体积 50 μL。

表 10 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。

3.2.5 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 3.3。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。

3.3 接头连接

注意：操作前请仔细阅读附录 C 和 D。

3.3.1 参照 MGIEasy PF Adapters 使用规则（参见附录 C），在步骤 3.2.5 的 PCR 管中加入 5 μL 对应的 MGIEasy PF Adapters。

3.3.2 涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.3.3 在冰上配制接头连接反应液（见表 11）:

表 11 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

3.3.4 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 3.3.2 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。

3.3.5 将步骤 3.3.4 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 12 中的条件进行反应，总反应体积 80 μL。

表 12 接头连接反应条件

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

3.3.6 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.3.7 加入 20 μL En-TE 至总体系 100 μL。

注意：不建议在此处停止，请继续做步骤 3.4。

3.4 连接产物纯化

注意：操作前请仔细阅读附录 A。

3.4.1 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。

3.4.2 用移液器吸取 50 μL En-Beads 至步骤 3.3.7 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。

3.4.3 室温孵育 10 min。

3.4.4 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。

3.4.5 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，前后反转

0.2 mL PCR 管 2 次后小心吸取并丢弃上清。

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。

3.4.8 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。

3.4.9 室温下孵育 5 min。

3.4.10 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 49μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

3.4.11 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°C 冰箱储存。**

3.5 变性

3.5.1 将步骤 3.4.10 所述 PCR 管（含 48 μL 接头连接产物）置于 PCR 仪上，按照表 13 的条件进行反应，总反应体积 50 μL。

表 13 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 3.5.1 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 3.5.2。**

3.5.2 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.6 单链环化

3.6.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 14）:

表 14 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

3.6.2 用移液器吸取 12 μL 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.5.2 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。

3.6.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 15 的条件进行反应，总反应体积 60 μL。

表 15 单链环化反应条件

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

3.6.4 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。

3.7 酶切消化

3.7.1 在步骤 3.6.3 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液(见表 16):

表 16 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

3.7.2 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.6.4 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。

3.7.3 将步骤 3.7.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 17 的条件进行反应，总反应体积 64 μL。

表 17　酶切消化反应条件

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

3.7.4　瞬时离心将反应液收集至管底。

3.7.5　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。

3.8 酶切消化产物纯化

注意：操作前请仔细阅读附录 A。

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

3.8.2　吸取 120 μL En-Beads 至步骤 3.7.5 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。

3.8.3　室温孵育 10 min。

3.8.4　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。

3.8.5　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，前后反转 0.2 mL PCR 管 2 次后小心吸取并丢弃上清。

3.8.6　重复步骤 3.8.5，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。

3.8.7　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。

3.8.8　将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 25 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 EP 管中；或涡旋混匀。

3.8.9　室温下孵育 10 min。

3.8.10　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 μL 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。

3.9 酶切消化产物质检

3.9.1 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。

3.9.2 最终产物要求摩尔产量 ≥75 fmol，可参考表 18，或参考附录 E 的公式 1 进行计算。

3.9.3 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 3.9.1 之后将不同样本的单链环按摩尔数比进行混合。但需保证混合样本对应的 barcode 须符合 MGIEasy PF Adapter 的使用规则要求 (详见附录 C)。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 18　不同插入产物片段大小对应 75 fmol 单链环产量

插入片段主片段大小（bp）	连接产物主片段大小（bp）	75 fmol 对应产量 （ng）
350	434	10.7
400	484	12.0
560	644	16.0

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品从 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 2-3 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 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 磁珠片段筛选步骤

这里将介绍两个案例供参考：①采用45 μL +15 μL磁珠对打断后产物（75 μL）进行磁珠片段筛选，最终得到主带为400 bp的Input DNA；②采用60 μL磁珠对打断后产物（75 μL）进行磁珠纯化，最终得到主带为400 bp的Input DNA。

案例 1：采用 45 μL +15 μL 磁珠对打断后产物（75 μL）进行磁珠片段筛选，最终得到主带为 400 bp 的 Input DNA。

若需要筛选其它片段主带，请根据第二章的表4选择合适的磁珠片段筛选条件。

具体步骤如下：

1. 提前 30 min 取出 En-Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
2. 吸取所有打断产物至新的 0.2 mL PCR 管中，若体积不足 75 μL，用 En-TE 补足。
3. 吸取 45 μL En-Beads 至含有 75 μL 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。
4. 室温孵育 10 min。
5. 瞬时离心，将 0.2 mLPCR 管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，吸取上清至新的 0.2mLPCR 管中。

⚠ **注意：此步保留上清，丢弃磁珠。**

6. 吸取 15 μL En-Beads 至 120 μL 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。
7. 室温孵育 10 min。
8. 瞬时离心，将 0.2 mLPCR 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。
9. 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，前后反转 0.2 mL PCR 管 2 次后小心吸取并丢弃上清。
10. 重复步骤 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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
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。
12. 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 45 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；或涡旋混匀。

13. 室温孵育 5 min。

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 42 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

15. 取 2 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。

16. 取 1- 2 μL 上清液用于片段分布检测，检测方法可用 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或者琼脂糖电泳。

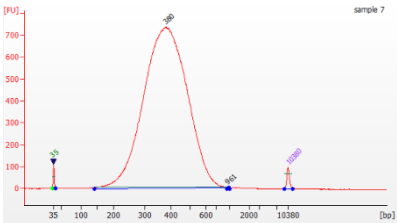

图 1 标准实验流程 DNA 片段选择后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

案例 2：采用 60 μL 磁珠对打断后产物（75 μL）进行磁珠纯化，最终得到主带为 400 bp 的 Input DNA。

若需要筛选其它片段主带，请根据第二章的表5选择合适的磁珠片段筛选条件。

具体步骤如下：

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

2. 吸取所有打断产物至新的 0.2 mL PCR 管中，若体积不足 75 μL，用 En-TE 补足。

3. 吸取 60 μL En-Beads 至含有 75 μL 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。

4. 室温孵育 10 min。

5. 瞬时离心，将 0.2 mLPCR 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。

6. 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，前后反转 0.2 mL PCR 管 2 次后小心吸取并丢弃上清。

7. 重复步骤 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。

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。

9. 将 0.2 mL PCR 管从磁力架上取下，加入 45 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；或涡旋混匀。

10. 室温孵育 5 min。

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 42 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

12. 取 2 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。

13. 取 1- 2 μL 上清液用于片段分布检测，检测方法可用 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或者琼脂糖电泳。

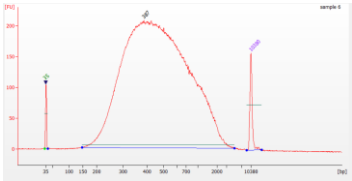

图 2　200ng gDNA 片段选择后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

附录 C 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：MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒或 MGIEasy 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 C-1 和 C-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；使用完毕后需及时盖好管盖/硅胶膜。对于板式 Adapters，如果发生意外导致硅胶膜被污染，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。

C-1 MGIEasy 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如下表所示的推荐Barcode组合方案：

表 19 MGIEasy 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。

C-2 MGIEasy 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：

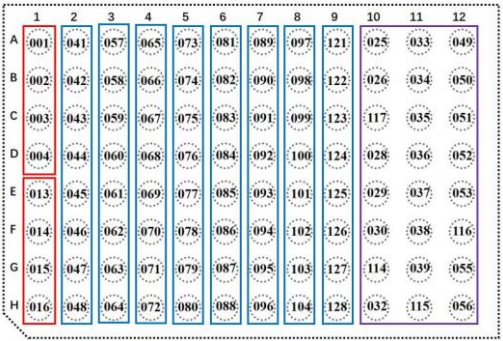

图 3　MGIEasy PF Adapters-96 （板式）Adapter 分布图及成组规则

4个Adapter成组：第1列（01-04，13-16），共计2组（图3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3 蓝色框）;

24个Adapter成组：第10-12列，共计1组（图3 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 20　MGIEasy 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； 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 41-48，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 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-	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

96 个)	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 D 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 μL 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 E 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 75 fmol 单链环状 DNA 对应的质量。

公式 1 单链环 fmol 与 ng 间的换算:

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

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

Doc. #：B02-126