

# 使用说明书

版本: 6.0

## MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒

货号: 1000020570 (16 RXN)

1000018650 (96 RXN)

试剂盒版本号: V1.0

---

## 关于说明书

©2024 深圳华大智造生物电子科技有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造生物电子科技有限公司（以下简称华大智造）的专有保密信息，未经华大智造的书面许可，任何个人或组织不得全部或部分地对本说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本说明书的读者为终端用户。说明书作为产品的一部分，由华大智造授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本说明书。

华大智造对本说明书不做任何种类的保证，包括（但不限于）用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。华大智造已经采取措施，确保本说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本说明书和产品进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

本说明书中的所有图片均为示意图，图片内容可能与实物有细微差异，请以购买的产品为准。

Ambion<sup>®</sup>、Axygen<sup>®</sup>、Invitrogen<sup>®</sup>、Qubit<sup>®</sup>、Thermo Fisher<sup>®</sup>，以及文中涉及的其他名称及商标属于各自所有者资产。


---

## 制造商信息

生产企业	深圳华大智造生物电子科技有限公司
生产地址	深圳市盐田区盐田街道沿港社区北山道 146 号北山工业区 11 栋 2 楼
电话	4000-688-114
技术支持	MGI-service@mgi-tech.com
网址	www.mgi-tech.com

## 版本记录

说明书版本	试剂盒版本	日期	修订内容摘要
6.0	V1.0	2024 年 7 月	增加 96 RXN MGI Easy 双 Barcode 环化模块
5.0	V1.0	2024 年 5 月	<ul style="list-style-type: none"><li>更新制造商信息</li><li>更新说明书风格</li></ul>
4.0	V1.0	2022 年 3 月	更新公司 LOGO
A2	V1.0	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A1	V1.0	2020 年 6 月	新增双端独立标签接头试剂盒适配
A0	V1.0	2020 年 3 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

---

<b>1 产品信息</b>	<b>1</b>
1.1 产品描述	1
1.2 适用范围	1
1.3 适用测序平台	1
1.4 组分	1
1.5 储存与运输	2
1.6 自备物料清单	3
1.7 注意事项	4
1.8 流程	5

---

<b>2 样本要求及处理</b>	<b>6</b>
2.1 样本要求	6

---

<b>3 标准流程</b>	<b>8</b>
3.1 变性及单链环化	8
3.2 酶切消化	9
3.3 消化产物纯化	10
3.4 文库质控	11

# 1 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 标准产物”(见《DNBSEQ 平台双 barcode 序列说明》), 将其制备成单链环化文库并用于 MGI 高通量测序。

## 1.3 适用测序平台

依据所使用的 MGI 高通量测序平台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 组分

MGIEasy Barcode 环化模块有 2 个规格, 分别是 16 RXN 和 96 RXN。试剂盒、货号、组分信息见下表。

- 16 RXN 为 MGIEasy Barcode 双环化试剂盒, 包含 2 个独立试剂盒。
- 96 RXN 为 MGIEasy Barcode 环化模块, 只含 1 个独立试剂盒。

试剂盒中包含信息卡片, 客户可通过卡片信息登录 MGI 官网, 下载相应说明书及 SDS 文件。

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














试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 双 Barcode 环化模块 货号: 1000018649	Dual Barcode Splint Buffer	 紫色	186 μL/支 × 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μL/支 × 1
	Digestion Buffer	 白色	23 μL/支 × 1
	Digestion Enzyme	 白色	42 μL/支 × 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	120 μL/支 × 1
MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 货号: 1000007325	DNA Clean Beads	 白色	1600 μL/支 × 2
	TE Buffer	 白色	1600 μL/支 × 1

表 2 MGIEasy 双 Barcode 环化模块 (96 RXN) (货号: 1000018650)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 双 Barcode 环化模块 货号: 1000018650	Dual Barcode Splint Buffer	 紫色	1114 μL/支 × 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	48 μL/支 × 1
	Digestion Buffer	 白色	135 μL/支 × 1
	Digestion Enzyme	 白色	250 μL/支 × 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	720 μL/支 × 1

 提示 使用 96 RXN 时, 建议根据实际样本需求选择不同规格的 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒。试剂盒货号可参考第 3 页“表 4 MGI 产品订购信息”。

## 1.5 储存与运输

表 3 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	储存温度	运输温度
MGIEasy 双 Barcode 环化模块	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	2 °C ~ 8 °C	

 提示

- 效期见试剂盒标签。
- 若使用冰袋或干冰进行运输, 请在收到货物后检查是否有剩余的冰或干冰。

- 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 自备物料清单

表 4 MGI 产品订购信息

货号	试剂盒	组分信息	规格及数量
1000005279	MGEasy DNA 纯化 磁珠试剂盒	DNA Clean Beads	50 mL/支 × 1
		TE Buffer	25 mL/支 × 1
DNA Clean Beads		15 mL/支 × 1	
TE Buffer		17 mL/支 × 1	
940-001174-00			


-  提示
- 上表的 DNA Clean Beads 所需数量及规格可根据 3.3.2 步骤 1 中实际样本数 (N) 和所用 DNA clean beads 体积计算得出。
  - 计算 DNA clean beads 用量的推荐样本数为 (N+2)。

表 5 设备清单

名称	推荐品牌
漩涡混匀仪	/
小型离心机	/
移液器	/
PCR仪	/
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D
Qubit 3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器

表 6 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
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
移液器吸头	/
1.5 mL 离心管	/
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen, Cat. No. PCR-02-C 或 Axxygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C

名称	推荐品牌
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen, Cat. No. Q32856 或 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。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 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。如果 PCR 仪无法设置热盖温度，也可保持在 105 °C。
- 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。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- 若有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@mgi-tech.com



## 1.8 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	变性及单链环化	45 ~ 50 min	15 min
3.2	酶切消化	35 ~ 40 min	10 min
3.3	消化产物纯化 	50 min	10~15 min
3.4	消化产物质检 	15 ~ 20 min	10 ~ 15 min

-  提示
- 总时长：指 8 个反应理论时长，单次建库样本数增多，时间将延长。
  - 手工操作时长：指该流程累计手工操作的总时长。
  - ：停止点。

# 2 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，最少可降低至 0.5 pmol 投入量。
- 若文库构建试剂盒有特殊的环化投入量需求，则按照文库构建试剂盒的要求投入所需的 Input DNA 量。
- 双 Barcode 接头长度为 132 bp，不同片段大小 DNA 1 pmol 分子对应不同的质量，可根据下表或公式 1 选择所需的 Input DNA 量。

**公式 1** 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} = \text{PCR 产物主带大小 (bp)} \times 0.66$$

**表 7** 不同 PCR 产物片段大小 1 pmol 对应产量

插入片段主带大小 (bp)	PCR 产物主带大小 (bp)	1 pmol 对应产量 (ng)
150	282	187
200	332	220
250	382	253
300	432	286
350	482	319
400	532	352
450	582	385
500	632	418

### 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《MGIEasy 双分子标签通用文库制备试剂套装使用说明书》或《MGIEasy 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** 混合样品中单个样品所需质量的计算

$$\text{单个样本所需的质量 (ng)} = \frac{1 \text{ pmol Input DNA 对应的质量 (ng)}}{\text{混合的样本个数}}$$

- 单个样本或混合后样本用于环化时，体积应为 48  $\mu\text{L}$ 。若体积不足 48  $\mu\text{L}$ ，则用 TE Buffer 补足。

# 3 标准流程

## 3.1 变性及单链环化

 提示 操作前请仔细阅读第二章样本要求及处理。

### 3.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 8 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	室温暂存
Dual Barcode Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

### 3.1.2 变性

1. 根据 Input DNA 片段长度，吸取 **1 pmol PCR 产物**至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer 补足至总体积 48  $\mu$ L。
2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 9 变性反应条件（体系：48  $\mu$ L）

温度	时间
105 °C热盖	On
95 °C	3 min

3. 反应结束后，**立即**将 PCR 管置于冰上，静置 2 min，瞬时离心后置于冰上。

### 3.1.3 单链环化

1. 根据反应数，在冰上配制单链环化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 10 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.6 $\mu$ L
DNA Rapid Ligase	0.5 $\mu$ L
Total	12.1 $\mu$ L

2. 吸取 **12.1  $\mu$ L 单链环化反应液**至各样本管中（3.1.2 节步骤 3），涡旋混匀 3~6 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 11 单链环化反应条件（体系：60.1  $\mu$ L）

温度	时间
45 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上，立即进入下步反应。

## 3.2 酶切消化

### 3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 12 试剂准备

试剂名称	要求
Digestion Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Digestion Enzyme	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Digestion Stop Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存

### 3.2.2 酶切消化

1. 根据反应数，在冰上配制酶切消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 13 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 $\mu\text{L}$


2. 吸取 4  $\mu\text{L}$  酶切消化反应液至样本管中（3.1.3 节步骤 4），涡旋混匀 3~6 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 14 酶切消化反应条件（体系：64.1  $\mu\text{L}$ ）

温度	时间
45 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，立即加入 7.5  $\mu\text{L}$  Digestion Stop Buffer，涡旋混匀 3~6 次，每次 3 s。瞬时离心后吸取全部液体至新的 1.5 mL 离心管。

## 3.3 消化产物纯化

-  提示
- 请使用试剂盒配套的 DNA Clean beads（参考表 1 和表 4），不同货号、不同批次磁珠不可混用。如果使用其他品牌磁珠，纯化条件需重新摸索。
  - 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

### 3.3.1 准备

表 15 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

### 3.3.2 消化产物纯化

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 170  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至各样本管中（3.2.2 节步骤 4），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管中。或涡旋混匀。

 提示 如样本需要其他体积 DNA Clean Beads，请参考相应的文库制备说明或提前通过测试确定。

2. 室温孵育 10 min。

3. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。

4. 保持离心管固定于磁力架上，加入 500  $\mu\text{L}$  80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。

5. 重复步骤 4 一次。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，用小量程移液器将管底液体吸干。

6. 保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 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 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。

8. 室温孵育 10 min。

9. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 20  $\mu\text{L}$  上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 酶切消化产物纯化后产物可置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱储存 1 个月。

## 3.4 文库质控

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。

要求最终产物摩尔产量  $\geq 80\text{ fmol}$ 。可参考下表或公式 3 计算。

**公式 3** 单链环摩尔数与质量间的换算

$$80\text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.08 \times \text{PCR 产物主带大小 (bp)} \times 0.33$$

Table 16 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	282	7.5
200	332	8.8
250	382	10.1
300	432	11.4
350	482	12.8
400	532	14.1
450	582	15.4
500	632	16.7