

# MGIEasy

## 外显子组酶切文库制备试剂套装使用说明书

---

货号：1000009658（16 RXN）

试剂盒版本号：V2.0

说明书版本号：B0

## 版本历史

说明书版本	试剂盒版本	修订日期	修订内容摘要
B0	V2.0	2019年 8月	<ul style="list-style-type: none"><li>• 试剂盒版本 V1.0 升级成 V2.0</li><li>• 更改打断酶的组分(货号不同)及打断方式(体积、温度、时间)</li><li>• 增加 PE150 建库条件</li></ul>
A0	V1.0	2019年 7月	<ul style="list-style-type: none"><li>• 首次发布</li></ul>

**提示：请下载最新版的说明书，对照相应的试剂盒使用。**

## 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	- 3 -
1.6 客户自备物料清单	- 4 -
1.7 注意事项	- 5 -
第二章 样本要求及处理	- 6 -
2.1 样本基因组 DNA 类型	- 6 -
2.2 基因组 DNA 完整度	- 6 -
2.3 基因组 DNA 起始量	- 6 -
2.4 基因组 DNA 储存条件	- 6 -
第三章 文库构建标准流程	- 7 -
3.1 酶切打断	- 7 -
3.2 磁珠片段筛选/纯化(二选一)	- 9 -
3.3 末端修复&添加 dA 尾	- 11 -
3.4 接头连接	- 12 -
3.5 连接产物纯化	- 13 -
3.6 PCR	- 13 -
3.7 PCR 产物纯化	- 15 -
3.8 PCR 产物质检	- 15 -
3.9 杂交前准备	- 16 -
3.10 杂交捕获	- 17 -
3.11 杂交后 PCR	- 18 -
3.12 杂交后 PCR 产物纯化及定量	- 19 -
3.13 变性	- 20 -
3.14 单链环化	- 20 -
3.15 酶切消化	- 20 -
3.16 酶切消化产物纯化	- 21 -
3.17 酶切消化产物质检	- 22 -
附录	- 23 -
附录 A 关于磁珠及纯化	- 23 -
附录 B 关于 Adapter 使用	- 24 -

## 第一章 产品信息

### 1.1 产品描述

MGIEasy 外显子组酶切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的外显子文库制备试剂套装, 包括 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装和 MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒。

本试剂套装可快速将 50-400 ng 人基因组 DNA 制备成 MGI 高通量测序平台专用的文库, 并提供多款探针产品在 MGI 平台的捕获适配方案。本试剂盒采用高质量的酶学组成, 改进型接头连接技术以及具有强扩增效率的高保真酶, 显著提高文库转化率与扩增效率; 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

**▲** 若使用 **MGI Exome V4 Probe** 或 **MGI Exome V5 Probe**, 请按照《MGIEasy 外显子组捕获 V4 探针试剂套装使用说明书》或《MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装使用说明书》要求进行建库和捕获操作。

### 1.2 适用范围

本试剂套装适用于对人源样本进行文库构建, 并辅助商业探针产品进行外显子区域捕获。

### 1.3 适配测序平台

构建的文库可使用以下测序平台进行测序:

BGISEQ-500RS (PE100)

DNBSEQ-T7RS (PE150)、DNBSEQ-G400RS (PE100/PE150)、DNBSEQ-G50RS (PE100)、

MGISEQ-2000RS (PE100/PE150)、MGISEQ-200RS (PE100)

## 1.4 试剂盒组分

本试剂套装包含 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装和 MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒，套装中包含试剂盒、货号、组分信息如下：

表 1 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装 ( 16 RXN ) ( 货号: 1000006987 )

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 DNA 文库 制备试剂盒 货号: 1000005254	Frag Buffer	绿色	32 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Frag Enzyme	绿色	64 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Buffer	橙色	114 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	47 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Ligation Buffer	红色	375 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Ligase	红色	26 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	400 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Primer Mix	蓝色	96 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
MGIEasy DNA Adapters-16 ( 管式 ) 试剂盒 货号: 1000005284	DNA Adapters	白色	10 $\mu$ L/支 $\times$ 16 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 $\times$ 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 $\times$ 1 支
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260	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 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
	Block 4	黄色	160 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支

## 1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂盒

- 储存温度: -25℃~-18℃
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA Adapters 试剂盒

- 储存温度: -25℃~-18℃
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy 环化模块

- 储存温度: -25℃~-18℃
- 有效期: 见试剂盒标签
- 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℃~-18℃
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA 纯化磁珠

- 储存温度: 2℃~8℃
- 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	移液器
	漩涡混匀仪
	小型离心机
	磁力架 DynaMag <sup>TM</sup> 2 ( Thermo Fisher, Cat. No. 12321D ) 或同类产品
	PCR 仪
	Qubit <sup>®</sup> 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216)
Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA)	
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
	无水乙醇, 100% 乙醇 (分析纯)
	Qubit <sup>®</sup> ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212)
	Qubit <sup>®</sup> 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)
	或 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-1504)
	商业探针杂交所需的试剂盒
探针结合磁珠	
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 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
	Qubit <sup>®</sup> Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或
0.5 mL Thin Wall PCR Tubes (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 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。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。
- 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污染物处理。
- 若您有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：[MGI-service@genomics.cn](mailto:MGI-service@genomics.cn)



## 第二章 样本要求及处理

### 2.1 样本基因组DNA类型

本试剂盒适用于人类样品提取的基因组 DNA 进行文库制备。

### 2.2 基因组DNA完整度

推荐使用完整度较好（无明显降解或轻微降解）且纯度良好（ $OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$ ， $OD_{260}/OD_{230}>2.0$ ）的高质量基因组 DNA

### 2.3 基因组DNA起始量

本试剂盒适用的人基因组 DNA 起始量范围是 50-400 ng。随着基因组 DNA 量的减少，成功转换成含有接头的 DNA 片段比例会下降，若基因组 DNA 量足够，优先推荐使用 200 ng 及以上基因组 DNA（推荐浓度  $\geq 15\text{ ng}/\mu\text{L}$ ）进行文库构建，以达到最优效果。

### 2.4 基因组DNA储存条件

本酶切试剂盒兼容的 DNA 储存 buffer 有：水、EB、 $0.1\times\text{TE}$ 、buffer AE、TE 等常见提取溶解 buffer，不同的 EDTA 含量需要打断时间不同（见表 4）。

为了防止过多的 EDTA、EGTA 等抑制剂对打断时效的影响，建议样品提取时溶于水、EB 或  $0.1\times\text{TE}$  中，以确保打断结果一致性：

- 若 DNA 提取过程中带入其他成分复杂（高盐离子/蛋白/二价阳离子/EDTA/EGTA），建议在酶切打断之前使用 2 倍体积磁珠进行纯化，用水、EB 或  $0.1\times\text{TE}$  洗脱，回收率约 90%。关于 DNA Clean Beads 的使用注意事项及纯化步骤，请参照本说明书附录 A 及步骤 3.5 或步骤 3.7。
- 若基因组 DNA 较珍贵，建议使用 50 ng 投入量，同等提取条件及溶解 buffer 的非珍贵 DNA，参考步骤 3.1 进行打断测试，取 3-5 ng 使用 Agilent 2100 对其片段分布进行检测，根据结果适当调整 32℃ 反应时间使打断主带符合预期。

### 第三章 文库构建标准流程

本流程使用 200 ng 人基因组 DNA，酶切打断后 30  $\mu$ L+10  $\mu$ L 磁珠片段筛选，最终得到插入片段主带约 350 bp 的 DNA 文库，用于 PE150 测序。

针对 PE100 测序，推荐插入片段主带约 280 bp，请根据步骤 3.1 酶切打断中的表 4 对实验细节进行调整。

若样本 DNA 投入量不同，请根据步骤 3.2 磁珠片段筛选/纯化中的表 8 和步骤 3.6 PCR 中的表 13 对磁珠纯化操作和 PCR 循环数进行调整。

#### 3.1 酶切打断

**△ 注意：**本试剂盒酶切打断是通过控制 32 $^{\circ}$ C 反应时间来控制 DNA 的片段分布，因此操作过程中请尽量保证时间和温度的精确，确保样本与 Frag Enzyme 的处理全程在冰上操作；使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近，再将反应液放入 PCR 仪中。

**△ 注意：**当手动处理大量的样本时，酶切打断反应的控制会变得困难。推荐先在反应管中加入稀释好的样品，再使用排枪迅速加入酶切反应液，同时确保整个加样过程在冰上进行。

**△ 注意：**下述酶切打断步骤适用于溶于水、EB、0.1 $\times$ TE 的 DNA，打断得到的 DNA 片段主带在 300 bp-500 bp 之间，适用于 PE150 测序。若是其他溶解 buffer，请参照表 4 或自行摸索 32 $^{\circ}$ C 打断时长。

3.1.1 根据基因组 DNA 溶解 buffer，选择合适的打断补充 buffer 及打断时间（见表 4）：

表 4 打断条件推荐

基因组 DNA 储存 buffer	打断体系 补充 buffer	32 $^{\circ}$ C 打断时间	
		250 bp (PE100)	350 bp (PE150)
Water / EB / 0.1 $\times$ TE (0-0.1 mM EDTA)	NF water	7-8 min	4-5 min
Buffer AE (0.5 mM EDTA)	Buffer AE / 0.5 $\times$ TE	14-16 min	10-12 min
1 $\times$ TE (1 mM EDTA)	1 $\times$ TE	25-30 min	16-20 min

- 3.1.2 吸取待打断基因组 DNA 于新的 0.2 mL PCR 管中，体积应 $\leq$ 14  $\mu$ L，不足 14  $\mu$ L 部分用补充 buffer 补足（见表 5）：

表 5 DNA 样本的配制

组分	体积
DNA	X $\mu$ L
补充 buffer	14-X $\mu$ L
Total	14 $\mu$ L

- 3.1.3 取出 MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂盒，取出 Frag Buffer 溶解并涡旋混匀，取出 Frag Enzyme 上下颠倒 10 次以上至充分混匀（**禁止涡旋**），瞬时离心后置于冰上待用。
- 3.1.4 在冰上配制酶切打断反应液（见表 6），用移液器吹打 10 次以上至完全混匀（**禁止涡旋**），瞬时离心后置于冰上待用：

表 6 酶切打断反应液的配制

组分	体积
Frag Buffer	2 $\mu$ L
Frag Enzyme	4 $\mu$ L
Total	6 $\mu$ L

- 3.1.5 用移液器吸取 6  $\mu$ L 配制好的酶切打断反应液加入步骤 3.1.2 的 PCR 管中，将移液器调至 16  $\mu$ L，吹打 10 次以上至完全混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.1.6 提前按照表 7 反应条件设置 PCR 程序并运行，待温度降至 4 $^{\circ}$ C 后，将步骤 3.1.5 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，跳过第一步（4 $^{\circ}$ C Hold）开始 32 $^{\circ}$ C 反应。若 PCR 仪不能实现跳过步骤，可设置 4 $^{\circ}$ C 1 min，待温度降至 4 $^{\circ}$ C 后暂停，放入样本后开始。

表 7 酶切打断反应条件

温度	时间
热盖	On
4 $^{\circ}$ C	Hold
32 $^{\circ}$ C	5 min
65 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

- 3.1.7 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.1.8 加入 31  $\mu$ L TE Buffer，吸取 50  $\mu$ L 至新的 1.5 mL 离心管中。若体积不足 50  $\mu$ L，须用 TE Buffer 补

足。待磁珠片段筛选或纯化。

### 3.1.9 剩余样本可留样做片段检测。

△ 注意：初次进行样本酶切打断时，建议从 3.1.8 留样中取 3~5 ng 样本进行安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒分析，正常的 PE150 打断片段大小应在 100 bp~1000 bp，主峰 300 bp~500 bp（如图 1）。若片段过大或过小，建议重新调整 32℃ 反应时长，进行酶切打断条件测试。

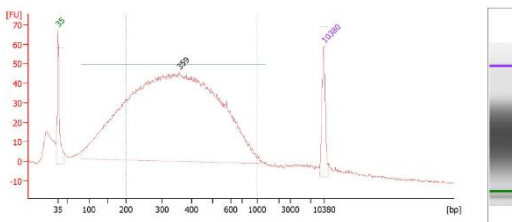


图 1 标准流程酶切打断后产物（未纯化）Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

## 3.2 磁珠片段筛选/纯化（二选一）

△ 注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

△ 注意：打断后 DNA 分布范围较宽，建议进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。若样本量  $\geq 100$  ng，建议进行磁珠片段筛选（见步骤 3.2.1）；若样本起始量较低（ $< 100$  ng）或者降解程度较高（如 FFPE 样本），推荐打断后进行磁珠纯化（见步骤 3.2.2），磁珠使用量如下表 8 所示：

表 8 打断后（50  $\mu$ L）纯化条件推荐

基因组 DNA 起始量	磁珠片段筛选/纯化	PE100 磁珠用量	PE150 磁珠用量
$\geq 100$ ng	磁珠片段筛选	40 $\mu$ L+10 $\mu$ L	30 $\mu$ L+10 $\mu$ L
50~100 ng	纯化	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L

### 3.2.1 磁珠片段筛选（方案一）

下述步骤是使用 30  $\mu$ L+10  $\mu$ L 磁珠对打断产物进行片段筛选，得到主带  $\approx 350$  bp 的产物，适用于 PE150，其他筛选方案请参考表 8。

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

3.2.1.2 用移液器吸取 30  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.1.8 的 50  $\mu$ L 打断产物中，充分混匀。

3.2.1.3 室温孵育 5 min。

3.2.1.4 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取上清至新的 1.5 mL 离心管中。

**△ 注意：此步保留上清，丢弃磁珠。**

3.2.1.5 用移液器吸取 10  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.2.1.4 的 80  $\mu$ L 上清中，充分混匀。

3.2.1.6 室温孵育 5 min。

3.2.1.7 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.2.1.8 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。

3.2.1.9 重复步骤 3.2.1.8，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。

3.2.1.10 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。

3.2.1.11 将离心管从磁力架上取下，加入 43  $\mu$ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻拍打至少 10 次至完全混匀。

3.2.1.12 室温孵育 5 min。

3.2.1.13 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 41  $\mu$ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

3.2.1.14 使用 Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT<sup>™</sup> PicoGreen<sup>®</sup> 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磁珠片段筛选后产物进行定量。

**△ 注意：磁珠片段筛选的回收率大约在 10%~20%。例如，按照文库构建标准流程，投入 200 ng 人基因组 DNA 进行酶切打断，用 30  $\mu$ L+10  $\mu$ L 磁珠片段筛选后，可得到总量约 20~40 ng 的产物。若产物回收率过低，可能是片段筛选过程中的损失过多，会影响后续的建库成功率和数据表现。**

### 3.2.2 磁珠纯化（方案二）

下述步骤是使用 50  $\mu$ L 磁珠对打断产物进行纯化，得到主带 $\approx$ 350 bp 的产物，适用于 PE150 测序，其他筛选方案请参考表 8。

3.2.2.1 用移液器吸取 50  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.1.8 的 50  $\mu$ L 打断产物中，充分混匀。

3.2.2.2 室温孵育 5 min。

- 3.2.2.3 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.2.2.4 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。
- 3.2.2.5 重复步骤 3.2.2.4，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。
- 3.2.2.6 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。
- 3.2.2.7 将离心管从磁力架上取下，加入 43  $\mu$ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻拍打至少 10 次至完全混匀。
- 3.2.2.8 室温孵育 5 min。
- 3.2.2.9 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 41  $\mu$ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
- 3.2.2.10 使用 Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT<sup>™</sup> PicoGreen<sup>®</sup> 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打断纯化后产物进行定量。

**△ 注意：磁珠纯化的回收率大约在 40-60%。若产物回收率过低，可能是片段筛选过程中的损失过多，会影响后续的建库成功率和数据表现。**

**✓停止点：磁珠片段筛选/纯化后产物，可置-20℃冰箱储存。**

### 3.3 末端修复&添加dA尾

- 3.3.1 根据磁珠片段筛选/纯化后 DNA 定量结果，若总量 $\leq$  100 ng，则可全部投入进行末端修复；若总量 $\geq$  100 ng，则建议取 100 ng DNA 进行末端修复。体积应 $\leq$ 40  $\mu$ L，不足 40  $\mu$ L 部分用 TE Buffer 补足。
- 3.3.2 在冰上配制末端修复反应液（见表 9）。

表 9 末端修复反应&添加 dA 尾反应液的配制

组分	体积
ERAT Buffer	7.1 $\mu$ L
ERAT Enzyme Mix	2.9 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L

- 3.3.3 用移液器吸取 10  $\mu$ L 配制好的末端修复反应液加入磁珠片段筛选或纯化后的 40  $\mu$ L 样本中，涡旋震荡 3 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.3.4 将步骤 3.3.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 10 中的条件进行反应。

表 10 末端修复反应&amp;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

3.3.5 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 3.4。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。**

### 3.4 接头连接

**△ 注意：操作前请仔细阅读附录 B 关于 Adapter 使用。**

3.4.1 参照 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则（附录 B 关于 Adapter 使用），在步骤 3.3.5 的 PCR 管中加入 5  $\mu$ L 对应的 MGIEasy DNA Adapters，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.4.2 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
Ligation Buffer	23.4 $\mu$ L
DNA Ligase	1.6 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

3.4.3 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 3.4.1 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。

**△ 注意：接头连接反应液较粘稠，操作时请慢慢吸放，确保加液量正确；涡旋震荡多次确保完全混匀。**

3.4.4 将步骤 3.4.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 12 中的条件进行反应。

表 12 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	On
23°C	30 min
4°C	Hold

3.4.5 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

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

✓**停止点：**接头连接后产物可暂时放置-20℃冰箱，不超过 16 h。

### 3.5 连接产物纯化

⚠ **注意：**操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。

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

3.5.2 用移液器吸取 50  $\mu\text{L}$  DNA Clean Beads 至步骤 3.4.6 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。

3.5.3 室温孵育 5 min。

3.5.4 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。

3.5.5 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。

3.5.6 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。

3.5.8 将离心管从磁力架上取下，加入 21  $\mu\text{L}$  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。

3.5.9 室温下孵育 5 min。

3.5.10 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 19  $\mu\text{L}$  上清液转移到新的 0.2 mL 离心管中。

✓**停止点：**连接产物纯化后，可置-20℃冰箱储存。

### 3.6 PCR

⚠ **注意：**PCR 扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会影响后续数据性能表现。表 13 给出获得 500 ng 和 1  $\mu\text{g}$  PCR 产物推荐的扩增循环数。当基因组 DNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量产物。



表 13 获得 500 ng 和 1  $\mu$ g PCR 产物推荐的扩增循环数

基因组 DNA (ng)	打断后磁珠片段 筛选 / 纯化	对应产量所需循环数	
		500 ng	1 $\mu$ g
400 ng	磁珠片段筛选	4-6	6-8
200 ng	磁珠片段筛选	5-7	7-9
100 ng	磁珠片段筛选	6-8	8-10
50 ng	纯化	7-9	9-11

3.6.1 在冰上配制 PCR 反应液 (见表 14)。

表 14 PCR 反应液的配制

组分	体积
PCR Enzyme Mix	25 $\mu$ L
PCR Primer Mix	6 $\mu$ L
Total	31 $\mu$ L

3.6.2 用移液器吸取 31  $\mu$ L 配制好的 PCR 反应液加入步骤 3.5.10 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。

3.6.3 将步骤 3.6.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 15 的条件进行 PCR 反应。

表 15 PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
95 $^{\circ}$ C	3 min	1 循环
98 $^{\circ}$ C	20 s	8 循环
60 $^{\circ}$ C	15 s	
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	10 min	1 循环
4 $^{\circ}$ C	Hold	

**△ 注意:**表中的循环数以 200 ng 建库起始量为标准, 不同的起始量请参考表 13 进行调整。

3.6.4 反应结束后, 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。

### 3.7 PCR产物纯化

**△ 注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

- 3.7.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.7.2 吸取 50  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.6.4 的 PCR 产物中，充分震荡混匀至所有磁珠悬浮。
- 3.7.3 室温孵育 5 min。
- 3.7.4 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。
- 3.7.5 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 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.7.6 重复步骤 3.7.5，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。
- 3.7.7 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。
- 3.7.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32  $\mu$ 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。
- 3.7.9 室温下孵育 5 min。
- 3.7.10 将离心管瞬时离心，置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，将 30  $\mu$ 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℃冰箱储存，待杂交捕获。**

### 3.8 PCR产物质检

- 3.8.1 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 产物的产量达到相应商业捕获探针产品的要求。

3.8.2 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。

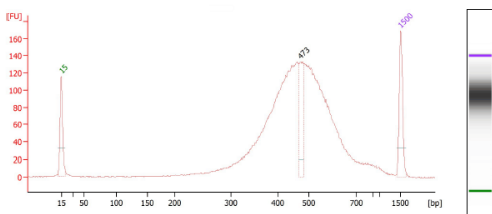


图 2 标准流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

### 3.9 杂交前准备

- 杂交捕获前，取出 MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒中 Block 3/Block 4，室温或者冰上融化后备用，参考所用探针试剂盒的操作说明进行杂交捕获，Block 3/Block 4 为 MGI 高通量测序平台专用的接头 Block，用于替换其他测序平台的接头 Block。
- 杂交捕获后，取出 MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒中 Post-PCR Enzyme Mix/PCR Primer Mix，室温或者冰上融化后参考步骤 3.9 进行探针杂交洗脱后的扩增。

△ 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《MGIEasy 外显子组捕获 V4 探针试剂套装使用说明书》或《MGIEasy 外显子组捕获 V5 探针试剂套装使用说明书》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 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 16 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	Block 4 体积	商业探针杂交试剂盒中需替换的组份
MGI Exome V4 Probe	1 $\mu$ L	10 $\mu$ L	无
MGI Exome V5 Probe	1 $\mu$ L	10 $\mu$ L	无
SureSelect Human All Exon V6 同类 SureSelect 系列探针	1 $\mu$ L	10 $\mu$ L	SureSelect Indexing Block #3
SeqCap <sup>®</sup> EZ Human Exome Probes v3.0	1 $\mu$ L	10 $\mu$ L	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 $\mu$ L	10 $\mu$ L	xGen <sup>®</sup> Universal Blocking Oligo (1); xGen <sup>®</sup> Universal Blocking Oligo (2); xGen <sup>®</sup> Universal Blocking Oligo (3)

**注意：不同主流商业探针的杂交后 PCR 循环数推荐如下：**

表 17 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
MGI Exome V5 Probe	12
SeqCap EZ Human Exome Probes v3.0	12
xGen Exome Research Panel	6 (12 pool)-10 (1 pool)
SureSelect Human All Exon V6 同类 SureSelect 系列探针	12

**以下 3.9-3.11 步骤是以 NimbleGen<sup>®</sup> SeqCap EZ 捕获流程为例进行的标准实验操作流程：**

- 3.9.1 根据杂交所需要的样本投入量，按照表 13 推荐的 PCR cycle 数进行扩增，并根据附录 B 关于 Adapter 使用的接头使用规则合理选择建库接头。然后根据 SeqCap EZ Library SR User's Guide 操作说明中要求的 PCR 产物投入量进行杂交。

### 3.10 杂交捕获

- 3.10.1 参照 SeqCap EZ Library SR User's Guide Chapter 5 Step.3，将 MGIEasy 外显子组捕获辅助试剂盒中的 Block 3 和 Block 4 组份替换 Step 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本说明书表 16。

- △ **注意:** 如果 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, 则可将这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——并进行浓缩, 控制体积。)

3.10.2 参照 RSS\_SeqCap\_EZ\_UGuide\_v5.4 Chapter 5-6 进行杂交捕获与洗脱。本说明书未提及的试剂均以探针产品说明书为准。

- △ **注意:** 洗脱后进行下一步杂交后 PCR 时要求含磁珠样品体积为 44  $\mu\text{L}$ , 如探针产品说明书中要求的扩增样品体积小于 44  $\mu\text{L}$ , 使用 NF water 将样品体积补为 44  $\mu\text{L}$ 。如探针产品说明书中要求的扩增样品体积大于 44  $\mu\text{L}$ , 需要将洗脱液体积减少为 44  $\mu\text{L}$ 。

### 3.11 杂交后 PCR

3.11.1 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 18)。

表 18 杂交后 PCR 反应液的配制

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

3.11.2 用移液器吸取 56  $\mu\text{L}$  配制好的杂交后 PCR 反应液加入 44  $\mu\text{L}$  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。

3.11.3 将步骤 3.11.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 19 的条件进行杂交后 PCR 反应。

表 19 杂交后 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖	On	
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1 循环
98 $^{\circ}\text{C}$	20 s	
60 $^{\circ}\text{C}$	15 s	X 循环
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1 循环
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

- △ **注意:** 表中“X”处 cycle 数可参考本说明书表 17, 如本例中“X”为 12。

3.11.4 反应结束后, 瞬时离心将反应液收集至管底。

- 3.11.5 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。

### 3.12 杂交后 PCR 产物纯化及定量

**△ 注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

- 3.12.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.12.2 吸取 100  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.11.5 的 100  $\mu$ L 杂交后 PCR 产物中，充分震荡混匀至所有磁珠悬浮。
- 3.12.3 室温孵育 5 min。
- 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 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 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.12.6 重复步骤 3.10.5，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。
- 3.12.7 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。
- 3.12.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32  $\mu$ 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。
- 3.12.9 室温下孵育 5 min。
- 3.12.10 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  $\mu$ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- 3.12.11 使用 Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT<sup>™</sup> PicoGreen<sup>®</sup> 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，要求最终杂交后 PCR 产物的摩尔产量 $\geq$ 1 pmol，请参照如下公式 1 进行计算，例如：主带 350 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小 430 bp，其产量应达到 280 ng。如需将多个样本混合测序，建议根据 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案（参照附录 B），在定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，总体积 $\leq$ 48  $\mu$ L。

公式 1 双链 DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

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

**√停止点：PCR 纯化后产物可置-20℃冰箱储存，待变性环化。**

### 3.13 变性

3.13.1 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 TE Buffer 补充至总体积 48  $\mu$ L。

3.13.2 将步骤 3.13.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 20 的条件进行反应：

表 20 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95 $^{\circ}$ C	3 min

3.13.3 反应结束后，立即将步骤 3.13.2 所述 PCR 管转移到冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

### 3.14 单链环化

3.14.1 取出 MGIEasy 环化模块，在冰上配制单链环化反应液（见表 21）。

表 21 单链环化反应液的配制

组分	体积
Splint Buffer	11.6 $\mu$ L
DNA Rapid Ligase	0.5 $\mu$ L
Total	12.1 $\mu$ L

3.14.2 用移液器吸取 12.1  $\mu$ L 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.13.3 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。

3.14.3 将步骤 3.14.2 中的 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 22 的条件进行反应。之后，提前准备表 19 的酶切消化反应液。

表 22 单链环化反应条件

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

3.14.4 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。

### 3.15 酶切消化

3.15.1 在步骤 3.14.3 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液（见表 23）。

表 23 酶切消化反应液的配制

组分	体积
Digestion Buffer	1.4 $\mu$ L
Digestion Enzyme	2.6 $\mu$ L
Total	4.0 $\mu$ L

3.15.2 用移液器吸取 4  $\mu$ L 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.14.4 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。

3.15.3 将步骤 3.15.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 24 的条件进行反应。

表 24 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.15.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.15.5 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。

### 3.16 酶切消化产物纯化

**△ 注意：操作前请仔细阅读附录 A 关于磁珠及纯化。**

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

3.16.2 吸取 170  $\mu$ L DNA Clean Beads 至步骤 3.15.5 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，最后一次确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。

3.16.3 室温孵育 10 min。

3.16.4 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。

3.16.5 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。

3.16.6 重复步骤 3.16.5，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。



- 3.16.7 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。
- 3.16.8 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。
- 3.16.9 室温下孵育 10 min。
- 3.16.10 将离心管瞬时离心，置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 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℃冰箱储存。**

### 3.17 酶切消化产物质检

使用 Qubit<sup>®</sup> 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 /酶切消化反应投入量 $\geq$ 7%。例如：主带 350 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小为 430 bp，投入 280 ng 进行环化，其酶切消化产物产量应达到 19.5 ng。

## 附录

### 附录A 关于磁珠及纯化

本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) 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, 纯化磁珠比例可能需要重新摸索。

#### 磁珠使用前注意事项

- 磁珠使用前, 提前 30 min 从 4℃ 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。
- 磁珠与液体分离时, 注意吸头不可碰到磁珠, 最后可残留 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, 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 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, 建议用手指固定住离心管中下段, 然后开盖。

## 附录B 关于Adapter使用

- 本试剂套装提供 MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒。该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 B-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, 将液体聚集于管底或板底, 用吸水纸擦拭干净管盖; 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。

### B-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表 25 所示的推荐 Barcode 组合方案:

表 25 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。



MGI 微信官网

#### ■ 基本信息

---

生产企业名称：深圳华大智造科技有限公司

生产地址：深圳市盐田区北山路 136 号北山工业区 11 栋 2 楼，518083

客服电话：4000-966-988

网 址：[www.mgitech.cn](http://www.mgitech.cn)

