

MGIEasy

双分子标签通用文库制备试剂套装使用说明书

货号: 1000018643(16RXN); 1000018644(96RXN)

试剂盒版本号: V1.0

说明书版本号: A0

版本历史

说明书 版本	试剂盒 版本	修订 日期	修订内容摘要
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：www.mgitech.cn/download/files

Doc. #: B02-186-A0

目录

第一章 产品信息	5
1.1 产品描述	5
1.2 适用范围	5
1.3 适配 MGI 测序平台	5
1.4 试剂盒组分	6
1.5 试剂盒储存条件及有效期	8
1.6 客户自备物料清单	9
1.7 注意事项	10
第二章 样本要求及处理	11
2.1 样本要求	11
2.2 DNA 打断方法和片段筛选	11
2.3 样本 DNA 的定量和质控	12
第三章 文库构建标准流程	13
3.1 末端修复&添加 dA 尾	13
3.2 接头连接	14
3.3 连接产物纯化	15
3.4 PCR	15
3.5 PCR 产物纯化	16
3.6 PCR 产物质检	17
3.7 杂交前准备	17
3.8 杂交捕获	19
3.9 杂交后 PCR	19
3.10 杂交后 PCR 产物纯化和定量	20
3.11 变性	21
3.12 单链环化	21
3.13 酶切消化	22
3.14 酶切消化产物纯化	23
3.15 酶切消化产物质检	23
附录	24
附录 A 打断条件	24
附录 B 关于磁珠及纯化	26

附录 C 磁珠片段筛选步骤	27
附录 D 关于 MGIEasy 双分子标签接头试剂盒使用说明.....	28
附录 E 关于 PCR.....	30
附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算	30
附录 G 关于 FFPE 样本的文库制备	31
附录 H 测序说明	32

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 双分子标签通用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捕获类文库制备试剂套装, 包括MGIEasy 通用DNA文库制备模块, MGIEasy 双分子标签接头试剂盒, MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒和MGIEasy 双barcode环化试剂盒。

本试剂套装可将10-1000ng片段化的人基因组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; 当使用本试剂盒所构建文库进行多样本混合测序时可利用双端Barcode进行校正, 有效减少标签跳跃 (Barcode hopping), 从而降低样本之间的污染; 也可利用接头中的UMI分子元件对样品中的原始分子进行标记, 利用其校正作用减少PCR扩增错误和测序错误; 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; 若使用其它商家捕获探针, 请参照相应的使用说明书要求进行建库和捕获操作。注意完成杂交捕获需要单独购买 MGIEasy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒 V1.0 (MGI, Cat. No. 1000018647 1000018648,)

1.2 适用范围

试剂盒适用于对人源样本进行文库构建, 兼容的样本类型包括cfDNA, FFPE, gDNA等。并辅助商业探针产品进行目标区域液相捕获。

1.3 适配 MGI 测序平台

构建的文库可使用MGISEQ/DNBSEQ-T7平台进行PE 100/PE 150测序。

1.4 试剂盒组分

本试剂套装包含 MGIEasy 通用 DNA 文库制备模块, MGIEasy 双分子标签接头试剂盒, MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒和 MGIEasy 双 Barcode 环化模块, 其包含的试剂盒、货号、组分信息如下:

表 1 MGIEasy 双分子标签通用文库制备套装 V1.0 (16 RXN) (货号: 1000018643)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 通用 DNA 文库制备模块 (16RXN) 货号: 1000019376	ERAT Buffer	橙色	96 μ L/支 \times 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	72 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Buffer	红色	336 μ L/支 \times 1 支
	DNA Ligase	红色	64 μ L/支 \times 1 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005278	PCR Enzyme Mix	蓝色	800 μ L/支 \times 1 支
	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1 支
MGIEasy 双分子标签接头试剂盒(16RXN) 货号: 1000018645	Dual UMI_Adapter Mix	白色	80 μ L/支 \times 1 支
	UDB PCR Primer Mix-57-64, 89-96	白色	12 μ L/支 \times 16 支
MGIEasy 双 Barcode 环化模块(16RXN) 货号: 1000018649	Dual Barcode Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 \times 1 支
	DNA Rapid ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 μ L/支 \times 1 支

表 2 MGIEasy 双分子标签通用文库制备试剂套装 V1.0 (96 RXN) (货号: 1000018644)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 通用 DNA 文库 制备模块(96RXN) 货号: 1000019377	ERAT Buffer	橙色	576 μ L/支 \times 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	432 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Buffer	红色	2016 μ L/支 \times 1 支
	DNA Ligase	红色	384 μ L/支 \times 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	1200 μ L/支 \times 4 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005279	DNA Clean Beads	白色	50 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	25 mL/支 \times 1 支
MGIEasy 双分子标签接头试剂盒 (96RXN) 货号: 1000018646	Dual UMI_Adapter Mix	白色	480 μ L/支 \times 1 支
	UDB PCR Primer Mix-01-96	--	12 μ L/孔 \times 96 孔
MGIEasy 双 Barcode 环化模块 (16RXN) 货号: 1000018649	Dual Barcode Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 \times 1 支
	DNA Rapid ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 μ L/支 \times 1 支

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy 通用 DNA 文库制备模块

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

MGIEasy 双分子标签接头试剂盒

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

MGIEasy 双 Barcode 环化模块

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

MGIEasy DNA 纯化磁珠

- 储存温度: $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$
- 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 3 客户自备物料清单

仪器	Covaris 打断仪
	漩涡混匀仪
	小型离心机
	移液器
	PCR 仪
	磁力架 (ThermoFisher, Cat. No. 12321D)
	Qubit® 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216)
试剂	Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA)
	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
	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	商业探针杂交所需的试剂盒及探针结合磁珠
	MGI Easy 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒 V1.0 (MGI, Cat. No. 1000018647 1000018648,)
	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)
	2.0 mL 离心管 (Axygen, Cat. No. MCT-200-C) 或同类产品

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

第二章 样本要求及处理

2.1 样本要求

本试剂盒适用于对人类样品提取的基因组DNA（包括血样样本、新鲜或冷冻组织样本、FFPE样本，cfDNA样本）进行文库制备。推荐使用完整度较好，A260/A280=1.8~2.0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 打断至所需主带范围：PE100 推荐主带约 280 bp，PE150 推荐主带约 330 bp，或者打断至所用探针推荐的片段范围；cfDNA 无需打断，直接进入建库流程。
- 附录 A 打断条件 列举各 Covaris 型号 55 μL 打断条件参数。若需要其他体积（15 μL 、130 μL 或 200 μL 等）打断条件，请至 Covaris 官网查询。
- 若采用其他耗材打断，推荐设计梯度打断实验摸索最适打断条件。

2.2.2 片段筛选

- 打断后 DNA 分布范围若较宽，通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。推荐使用磁珠片段筛选方案（如表 4），也可通过切胶纯化的方式进行片段筛选。



注意：若使用 FFPE 样本提取的基因组 DNA 进行打断后，可以省略该片段筛选步骤，具体调整请参考附录 G；cfDNA 样本无需打断，也无需进行片段筛选过程，具体操作指南请参考附录 H。

表 4 80 μL 打断后样本用不同磁珠体积片段筛选的理论 DNA 主带

主带片段 (bp)	180	230	280	335	420
文库片段 (bp)	264	314	364	419	504
第一轮 (μL)	80	72	64	56	48
第二轮 (μL)	40	16	16	16	16

- 磁珠片段筛选具体操作可参考附录 B 关于磁珠及纯化，提供了 500 ng 基因组 DNA 打断后（体积为 80 μL ），在末端修复之前进行 64 μL +16 μL 磁珠片段筛选的详细步骤，最终得到主带 280 bp 的目的片段。
- 进行磁珠片段筛选，DNA 损失量约为 60%~95%。若样本较珍贵，可选择回收第一轮磁珠，80%乙醇漂洗两次，晾干后 TE Buffer 洗脱，保存备份。



注意：若使用 MGI Exome V4 Probe 或 MGI Exome V5 Probe，请按照相关说明书要求进行建库和捕获操作；若使用其它商业探针，请参考相关说明书要求进行建库和捕获操作。

2.3 样本 DNA 的定量和质控

- 样本 DNA 量指投入末端修复步骤中的 DNA 量，本试剂盒兼容样本 DNA 量范围为 10~1000 ng，体积 <40 μ L。



注意：针对 FFPE 样本，可兼容范围 50~1000 ng 基因组 DNA，体积应 <40 μ L，具体要求请参考附录 G。

- 应尽可能保证样本 DNA 片段集中度，样本 DNA 片段越集中，测序质量越好；反之，测序质量会有所下降。
- 本试剂盒片段筛选条件支持一定长度的片段主带（见表 4）。测序时，随着片段增大，测序质量可能会略微下降。请根据不同的测序类型选择不同插入片段进行建库，针对 PE100 测序，推荐片段主带在 250~300 bp，PE150 测序，推荐片段主带在 330 bp 左右。注意：不同长度的样本 DNA 不建议混合测序。

第三章 文库构建标准流程

本标准实验流程样本DNA来源：500 ng血液或组织样本提取的高质量基因组DNA进行Covaris打断，打断体积是80 μL ，使用64 μL +16 μL 磁珠片段筛选，得到50 ng主带为280 bp的样本DNA。

若样本DNA量不同，样本DNA主带不同，请根据2.2样本要求中表6、附录D 关于Adapter使用中表24以及附录E 关于PCR中表25对片段大小、接头用量、PCR循环数进行调整。



注意：若使用 FFPE 样本提取的基因组 DNA 进行文库制备，请参考附录 G 对相关操作步骤进行调整；若使用 cDNA 样本进行文库制备，直接从本步开始进行建库无需进行样本打断和片段筛选步骤。

3.1 末端修复&添加 dA 尾

3.1.1 根据样本浓度，取适量样本（推荐 50 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer 补充至总体积 39.5 μL 。

3.1.2 取出 MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂盒，在冰上配制末端修复反应液（见表 5）：

表 5 末端修复反应&添加 dA 尾反应液的配制

组分	单个反应体积
ERAT Buffer	6 μL
ERAT Enzyme Mix	4.5 μL
Total	10.5 μL

3.1.3 用移液器吸取 10.5 μL 配制好的末端修复反应液加入步骤 3.1.1 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.4 将步骤 3.1.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照 6 中的条件进行反应：

表 6 末端修复反应&添加 dA 尾反应条件

温度	时间
热盖	On
20°C	30 min
65°C	15 min
4°C	Hold

3.1.5 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 3.2。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。

3.2 接头连接



注意：操作前请仔细阅读附录 D 关于 Adapter 使用。

3.2.1 在步骤 3.1.5 的 PCR 管中加入 5 μ L Dual UMI Adapter Mix，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.2 在冰上配制接头连接反应液（见表 7）：

表 7 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Ligation Buffer	21 μ L
DNA Ligase	4 μ L
Total	25 μ L

3.2.3 用移液器缓慢吸取 25 μ L 配制好的接头连接反应液加入步骤 3.2.1 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；涡旋震荡多次确保所有磁珠悬浮。

3.2.4 将步骤 3.2.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 8 中的条件进行反应：

表 8 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	On
23°C	30 min
4°C	Hold

3.2.5 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.6 加入 20 μ L TE Buffer 至总体积 100 μ 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，不超过 16 h。

3.3 连接产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。

- 3.3.1 参考附录 B 关于磁珠及纯化 步骤，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。

- 3.3.2 用移液器吸取 50 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.2.6 中的接头连接产物中，并轻轻吹打至少 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。
- 3.3.3 室温孵育 5 min。
- 3.3.4 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。
- 3.3.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200 μ 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。
- 3.3.6 重复步骤 3.3.5，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。
- 3.3.7 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。
- 3.3.8 将离心管从磁力架上取下，加入 42 μ 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。
- 3.3.9 室温下孵育 5 min。
- 3.3.10 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 38 μ 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。

3.4 PCR



注意：操作前请仔细阅读附录 D2, E 关于 PCR 及附录 G 关于 FFPE 样本的文库制备。

- 3.4.1 上步产物置于冰上每管按照下表所示体积加入 PCR Enzyme Mix (见表 9):

表 9 加入 PCR 反应液

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	50 μ L

3.4.2 完成上步加液操作后每管反应液按照附录 D2 UDB PCR Primer Mix 使用规则加入相对应的 UDB PCR Primer mix 12 μ L, 即终体积为 100 μ L, 涡旋震荡 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底。;

3.4.3 将步骤 3.4.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 10 的条件进行 PCR 反应:

表 10 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	8 循环
72°C	30 s	
72°C	10 min	1 循环
4°C	Hold	



注意:表中的循环数以常规 50ng 建库起始为标准, 不同的起始量循环数请参考附录 E 关于 PCR 表 24; FFPE 样本的循环数请参考附录 G 表 26。

3.4.4 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。

3.5 PCR 产物纯化



注意:操作前请仔细阅读附录 B 关于磁珠及纯化。

3.5.1 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 吸取 100 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.4.4 的 100 μ L 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。

3.5.3 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 μ 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。

3.5.8 将离心管从磁力架上取下, 加入 32 μ 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。

3.5.9 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 30 μ 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。**

3.6 PCR 产物质检

3.6.1 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。

3.6.2 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 1 为标准实验流程 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果：

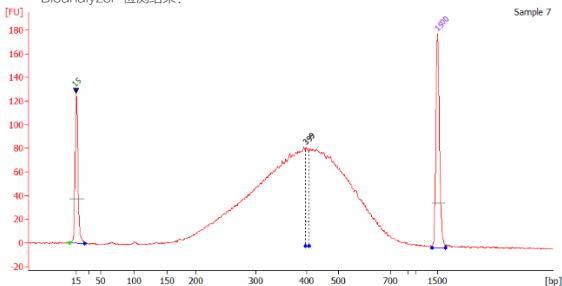


图 1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.7 杂交前准备

- 杂交捕获前，取出 MGIEasy 双 Barcode 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 双 Barcode 外显子组捕获辅助试剂盒中 Post-PCR Enzyme Mix/Dual Barcode 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 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 11 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 μ L	1 μ L	无
MGI Exome V5 Probe	1 μ L	1 μ L	无
SureSelect Human All Exon V6 等同类 SureSelect 系列探针	1 μ L	1 μ L	SureSelect Indexing Block #3
SeqCap® EZ Human Exome Probes v3.0	1 μ L	1 μ 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 μ L	1 μ L	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 12 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	13
MGI Exome V5 Probe	13
SeqCap EZ Human Exome Probes v3.0	13
xGen Exome Research Panel	6 (12 pool)-10 (1 pool)
SureSelect Human All Exon V6 等同类 SureSelect 系列探针	13

以下 3.7-3.9 步骤是以 NimbleGen® SeqCap EZ 捕获流程为例进行的标准实验操作流程：

- 3.7.1 根据杂交所需要的样本投入量，按照表 24 推荐的 PCR cycle 数进行扩增，并根据附录 D-1 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 产物需求量进行杂交。

3.8 杂交捕获

- 3.8.1 参照 RSS_SeqCap_EZ_UGuide_v5.4 Chapter 5 Step.3, 将 MGIEasy 双 Barcode 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 11。



注意：如 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。）

- 3.8.2 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 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 。

3.9 杂交后 PCR

- 3.9.1 取出 MGIEasy 双 Barcode 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 13）：

表 13 杂交后 PCR 反应液的配制

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

- 3.9.2 用移液器吸取 56 μL 配制好的杂交后 PCR 反应液加入 44 μL 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。
- 3.9.3 将步骤 3.9.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 14 的条件进行杂交后 PCR 反应：

表 14 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 12，如本例中“X”为 13。

3.9.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.5 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 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

3.10 杂交后 PCR 产物纯化和定量

3.10.1 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 MGI Easy DNA 纯化磁珠试剂盒。

3.10.2 吸取 100 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.9.5 的 100 μ L 杂交后 PCR 产物中，用移液器轻轻敲打至少 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。

3.10.3 室温孵育 5 min。

3.10.4 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。

3.10.5 保持离心管置于磁力架上，加入 200 μ 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。

3.10.6 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。

3.10.7 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。

3.10.8 将离心管从磁力架上取下，加入 32 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻敲打至少 10 次至所有磁珠悬浮。

3.10.9 室温下孵育 5 min。

3.10.10 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。

3.10.11 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 ≥ 1 pmol，请参照附录 F 公式进行计算，例如：主带 300 bp 的打断产物，PCR 产物主片段大小 420 bp，其产量应达到 250 ng。

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

3.11 变性



注意：操作前请仔细阅读附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算。

3.11.1 根据杂交后 PCR 产物的主片段分布，参考附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算的公式 1，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 μL 。

3.11.2 将步骤 3.11.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 15 的条件进行反应：

表 15 变性反应条件	
温度	时间
热盖	On
95°C	3 min

3.11.3 反应结束后，立即将步骤 3.11.2 所述 PCR 管转移到冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

3.12 单链环化

3.12.1 取出 MGIEasy 环化模块，在冰上配制单链环化反应液（见表 16）：

表 16 单链环化反应液的配制	
组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12.1 μL

3.12.2 用移液器吸取 12.1 μL 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.11.3 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。

3.12.3 将步骤 3.12.2 中的 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 17 的条件进行反应：

表 17 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.12.4 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。

3.13 酶切消化

3.13.1 在步骤 3.12.3 反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液（见表 18）：

表 18 酶切消化反应液的配制

组分	单个反应体积
Digestion Buffer	1.4 μL
Digestion Enzyme	2.6 μL
Total	4.0 μL

3.13.2 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.12.4 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。

3.13.3 将步骤 3.13.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 19 的条件进行反应：

表 19 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.13.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.13.5 立即向 PCR 管中加入 7.5 μL 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。

3.14 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。

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

3.14.2 吸取 170 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.13.5 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。

3.14.3 室温孵育 10 min。

3.14.4 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。

3.14.5 保持离心管置于磁力架上，加入 500 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。

3.14.6 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。

3.14.7 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。

3.14.8 将离心管从磁力架上取下，加入 22 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。

3.14.9 室温下孵育 10 min。

3.14.10 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 μL 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。

3.15 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280 bp的打断产物，PCR产物主片段大小为344 bp，投入240 ng进行环化，其酶切消化产物产量应达到16.8 ng以上。

附录

附录 A 打断条件

以下摘自Covaris官网各型号55 μL 打断条件，仅供参考。

请参考具体参数，可将基因组DNA打断至100–700 bp之间，主带约为220–300 bp

表 20 Covaris S220 将样本 DNA(55 μL)打断成 150–550 bp 的反应条件

	Vessel	microTUBE–50 AFA Fiber–Screw–Cap (PN 520166) 						
	Sample Volume	55 μL						
S220	Holder	S-Series Holder microTUBE–50 Screw–Cap (PN 500492)						
	Water Level	10						
	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	7						
	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
	Peak Incident Power (W)	100	75	75	75	75	75	50
	Duty Factor	30%	25%	20%	20%	15%	10%	10%
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	150	95	65	45	45	55	50

表 21 Covaris 不同型号仪器将样本 DNA(55 μL)打断成 150–550 bp 的反应条件

	Vessel	MicroTUBE–50 Screw–Cap (PN 520166) 	8 microTUBE–50 AFA Fiber Strip V2 (PN 520174) 8 microTUBE–50 AFA Fiber H Slit Strip V2 (PN 520240) 	96 microTUBE–50 AFA Fiber Plate (PN 520168) 96 microTUBE–50 AFA Fiber Plate Thin Foil (PN 520232) 
	Sample Volume	55 μL		
E220	Racks	Rack 24 Place microTUBE Screw–Cap (PN 500308)	Rack 12 Place 8 microTUBE Strip (PN 500444)	No Rack needed

	Plate Definitions	*E220_500308 Rack 24 Place microTUBE- 50 Screw-Cap +6.5mm offset*	*E220_500444 Rack 12 Place 8 microTUBE-50 Strip V2 -10mm offset*	*E220_520168 96 microTUBE-50 Plate -10.5mm offset* *E220_520232 96 microTUBE-50 Plate Thin Foil - 10.5mm offset*				
E220 evoluti on	Racks	Rack E220e 4 Place microTUBE Screw Cap (PN 500432) Rack E220e 8 microTUBE Strip V2 (PN 500437) Non Compatible	Rack E220e 4 Place microTUBE Screw Cap (PN 500432) Rack E220e 8 microTUBE Strip V2 (PN 500437) Non Compatible	Rack E220e 4 Place microTUBE Screw Cap (PN 500432) Rack E220e 8 microTUBE Strip V2 (PN 500437) Non Compatible				
	Plate Definitions	*500432 E220e 4 microTUBE-50 Screw Cap - 8.32mm offset* *500437 E220e 8 microTUBE- 50 Strip V2 -10mm offset* N/A	*500432 E220e 4 microTUBE-50 Screw Cap - 8.32mm offset* *500437 E220e 8 microTUBE- 50 Strip V2 -10mm offset* N/A	*500432 E220e 4 microTUBE-50 Screw Cap - 8.32mm offset* *500437 E220e 8 microTUBE- 50 Strip V2 -10mm offset* N/A				
All	Temperature (°C)	7						
	Water Level	6		-2			0	
	Intensifier (PN 500141)	Yes		Yes			Yes	
	Y-dithering	No		No			Yes (0.5 mm Y- dither at 10 mm/s)	
Screw -Cap	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
	Peak Incident Power (W)	100	75	75	75	75	75	30
	Duty Factor	30%	20%	20%	20%	20%	10%	10%
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
8- Strip	Treatment Time (s)	130	95	62	40	30	50	70
	Peak Incident Power (W)	75	75	75	75	75	75	50
	Duty Factor	15%	15%	20%	20%	20%	10%	10%
	Cycles per Burst	500	500	1000	1000	1000	1000	1000
Plate	Treatment Time (s)	360	155	75	45	35	52	50
	Peak Incident Power (W)	100	100	75	75	75	75	75
	Duty Factor	30%	30%	20%	20%	20%	10%	10%
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	145	90	70	49	34	50	32

附录 B 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吸打, 确保充分混匀。
- 磁珠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

- 若待纯化的样本因孵育蒸发导致体积减少, 应加入 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 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, 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 μL 。
- 在 1.5 mL 磁力架上开关盖应小心, 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 磁珠片段筛选步骤

本说明书中所述案例采用 64 μL + 16 μL 磁珠对打断后产物 (80 μL) 进行磁珠片段筛选, 最终得到主带为 280 bp 的样本 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 DNA Clean Beads 置于室温, 使用前充分震荡混匀。
- 2) 吸取所有打断产物至新的 1.5 mL 离心管中, 若体积不足 80 μL , 用 TE Buffer 补足。
- 3) 吸取 64 μL DNA Clean Beads 至含有 80 μL 打断产物的离心管中, 用移液器轻轻吸打至少 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。
- 4) 室温孵育 5 min。
- 5) 将离心管瞬时离心, 置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 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。

- 6) 吸取 16 μL DNA Clean Beads 至 180 μL 上清管中, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 7) 室温孵育 5 min。
- 8) 将离心管瞬时离心, 置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取上清并丢弃。
- 9) 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, 小心吸取上清并丢弃。
- 10) 重复步骤 9, 尽量吸干管内液体。
- 11) 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。
- 12) 将离心管从磁力架上取下, 加入 32 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吸打至少 10 次至所有磁珠悬浮。
- 13) 室温孵育 5 min。
- 14) 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。

附录 D 关于 MGIEasy 双分子标签接头试剂盒使用说明

本试剂套装16RXN提供MGIEasy 双分子标签接头试剂盒（管式）试剂盒，试剂套装96RXN提供MGIEasy 双分子标签接头试剂盒（板式）试剂盒。该试剂盒适用于多样本混合pooling测序，减少样本之间污染，独特的UMI分子元件，可有效校正PCR扩增错误和测序错误，有助于低频突变的检测。试剂盒最多可含有96种不同Barcode的PCR Primer Mix和一种Dual UMI Adapter Mix，最多可支持96个样本混合测序。试剂盒经过严格的质量控制和功能验证，最大程度保证了文库构建的稳定性和重复性，以及测序数据拆分的均一性和准确性，为保证最佳效果，使用时请详细阅读附录D-1的试剂盒使用规则。

D-1 关于 MGIEasy 双分子标签接头使用说明

- Dual UMI Adapter Mix 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。
- Dual UMI Adapter Mix 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底，用吸水纸擦拭干净管盖表面；
- 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 22 和实际 DNA 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 22 不同样本 DNA 量推荐 Adapter 使用量

样本 DNA (ng)	MGI Adapter 稀释倍数	MGI Adapter 稀释后投入量 (μL)
≥50	不稀释	5
25	2	5
10	5	5

- 提高 Adapter 的使用量可以在一定程度上提高文库产出，尤其当样本 DNA ≤25 ng 时。当需要优化建库效率时，可在上表推荐条件下额外尝试几个更高的 Adapter 使用量（推荐 2 - 10 倍范围内）。

D-2 关于 UDB PCR Primer Mix（管式，板式）使用规则

UDB PCR Primer Mix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或铝膜表面；对于管式PCR Primer Mix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；对于板式PCR Primer Mix使用时注意在取不同的PCR Primer Mix时注意更换枪头，避免交叉污染。基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将UDB PCR Primer Mix成组使用，试剂盒中包含的UDB PCR Primer Mix具备如下的分组规则：

管式：共16管UDB PCR Primer Mix，8个为一组，分别是UDB PCR Primer Mix-57_ UDB PCR Primer Mix-64，UDB PCR Primer Mix-89_ UDB PCR Primer Mix-96，共两组；

板式：共96个UDB PCR Primer Mix，8个为一组，具体的成组规则如下（红框内为一组）：

01 ^o	09 ^o	17 ^o	25 ^o	33 ^o	41 ^o	49 ^o	57 ^o	65 ^o	73 ^o	81 ^o	89 ^o
02 ^o	10 ^o	18 ^o	26 ^o	34 ^o	42 ^o	50 ^o	58 ^o	66 ^o	74 ^o	82 ^o	90 ^o
03 ^o	11 ^o	19 ^o	27 ^o	35 ^o	43 ^o	51 ^o	59 ^o	67 ^o	75 ^o	83 ^o	91 ^o
04 ^o	12 ^o	20 ^o	28 ^o	36 ^o	44 ^o	52 ^o	60 ^o	68 ^o	76 ^o	84 ^o	92 ^o
05 ^o	13 ^o	21 ^o	29 ^o	37 ^o	45 ^o	53 ^o	61 ^o	69 ^o	77 ^o	85 ^o	93 ^o
06 ^o	14 ^o	22 ^o	30 ^o	38 ^o	46 ^o	54 ^o	62 ^o	70 ^o	78 ^o	86 ^o	94 ^o
07 ^o	15 ^o	23 ^o	31 ^o	39 ^o	47 ^o	55 ^o	63 ^o	71 ^o	79 ^o	87 ^o	95 ^o
08 ^o	16 ^o	24 ^o	32 ^o	40 ^o	48 ^o	56 ^o	64 ^o	72 ^o	80 ^o	88 ^o	96 ^o

图 2 96 UDB PCR Primer Mix 分组及排列图

即均为8个成组，使用时的具体规则如下：



注意：为了保证最优的测序质量，建议 1lane 至少有 8 样本进行测序；若少于 8 样本进行 pooling 测序，可能会因为碱基不平衡导致拆分率较低。

表 23 UDB PCR Primer Mix 使用规则

样本数 /lane	使用方法（举例）
N ≥ 8, 且是 8 的倍数	需使用 N/8 组 UDB PCR Primer Mix：即取任意 N 组混匀过的 UDB PCR Primer Mix（1-8 或其他组，本试剂套装提供的 UDB PCR Primer Mix 按照顶盖上顺序一列即 8 个为一组）各 12ul 加入到对应的样本中，样本和 UDB PCR Primer Mix 一一对应；
N (8 < N < 96), 不是 8 的倍数	需使用 N/8 整数部分组完整的 UDB PCR Primer Mix（1-8 或 9-16 或其他组，本试剂套装提供的 UDB PCR Primer Mix 按照顶盖上顺序一列即 8 个为一组），其余 N/8 余数部分组个样本使用其他组中的 UDB PCR Primer Mix 中的 N/8 余数部分个，样本和 UDB PCR Primer Mix 一一对应；

按照以上的使用规则进行使用。



注意：当多个样本进行 pooling 测序时，至少保证有一成组的 UDB PCR Primer Mix 即 8 个；若单 lane 中所含 UDB PCR Primer Mix 的个数太少可能会影响拆分率；不可单个样本加入 1 个以上的 UDB PCR Primer Mix 进行测序，将导致拆分率的降低；

附录 E 关于 PCR

- PCR 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，会影响后续数据性能表现。
- 表 24 列举了当使用 10–500 ng 高质量样本 DNA（280 bp）时，获得 500 ng 和 1 μg 文库推荐的扩增循环数，当样本 DNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

• 表 24 获得 500 ng 和 1 μg 文库推荐的扩增循环数

样本 DNA（ng）	对应产量所需循环数	
	500 ng	1 μg
10	9–11	10–12
25	8–10	9–11
50	7–9	8–10
100	6–8	7–9
200	5–7	6–8
400	4–6	5–7
600	3–5	4–6
1000	3–4	3–5

附录 F 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：

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

附录 G 关于 FFPE 样本的文库制备

该附录总结了针对FFPE样本提取的基因组DNA（以下简称FFPE DNA）如何进行文库制备流程的调整。

G-1 FFPE DNA 的质量判定

考虑到FFPE DNA存在不同程度的降解，会影响打断所需时间和文库制备的产量，所以对提取后的基因组DNA进行质量评估。可以采用以下两种方法中的其中一种评估DNA完整性：

方法1：使用琼脂糖凝胶电泳检测样本主带的片段分布情况。

方法2：使用商业FFPE QC试剂盒通过qPCR的方法检测Q值，例如 KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kits (KK9460)。

G-2 FFPE DNA 的投入量和打断

该试剂套装兼容FFPE DNA的起始量为50~1000 ng，根据定量结果，取兼容范围内的DNA量进行打断；根据FFPE的质量判定结果，对于打断时间可进行相应调整（见表 25）。

表 25 FFPE DNA 打断时间推荐

打断参数	非 FFPE DNA	FFPE DNA	
		主带>13000 bp,有明显主带;或 Q 值>0.9	主带弥散<13000;或 Q 值<0.9
打断时间	常规推荐值	打断时间减 1/3	打断时间减 1/2



注意：请将打断体积控制在 55 μ L 以内。建议第一次打断可先取少量 DNA 摸索打断条件，以免片段主带与预期大小偏离较远。

G-3 FFPE DNA 的文库制备

用FFPE DNA进行文库构建，可参考第三章标准文库构建流程，根据下表26的推荐对相应步骤进行调整。

表 26 FFPE DNA 文库制备参数调整汇总

建库流程	非 FFPE DNA	FFPE DNA		
		有明显主带且>13000 bp;或 Q 值>0.9	主带弥散>500 bp;或 0.9>Q 值>0.6	主带弥散<500 bp;或 Q 值<0.6
打断后纯化	推荐片段筛选	无需纯化	无需纯化	无需纯化
建库投入量	10~1000 ng 片段化 DNA	40 μ L 打断产物直接投入建库	40 μ L 打断产物直接投入建库	40 μ L 打断产物直接投入建库
PCR 循环数(获得 500 ng 产物)	参考表 26	相应增加 1 cycle	相应增加 2 cycle	相应增加 3 cycle

附录 H 测序说明

H-1 关于测序时暗反应设置

双分子标签通用文库制备试剂套装所制备的文库在进行测序时要设置2个暗反应，由于该试剂套装中接头独特的设计，使得文库最终结构中含有固定碱基的存在，为保证测序质量推荐在测序时将Reads的6-7bp设置为暗反应，此步骤为强力推荐，若不设置暗反应将影响测序质量；具体操作请参照MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装使用说明书中相关内容。

H-2 关于双 Barcode 拆分

利用该套装制备的文库进行双Barcode测序时，需测序仪上软件版本为ECR3.0或ECR4.0，即可实现机器内拆分，建议测序前核对测序仪软件版本；若客户使用本套装所提供的96对UDB PCR Primer Mix之外的其他的Barcode引物组合进行建库测序时，需要按照实际使用的Barcode组合重新导入Barcode列表，若省略导入步骤会导致拆分失败；

联系我们

生产企业：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 146 号北山工业区 11 栋 2 楼，518083

客服电话：4000-966-988

技术支持：MGI-service@genomics.cn

网 址：www.mgitech.cn



官方微信