

编号: H-940-000883-00



# 使用说明书

版本: 1.0

## MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装

---

货号: 940-000886-00 (16 RXN)  
940-000884-00 (96 RXN)  
940-000882-00 (384 RXN)  
试剂盒版本号: V2.0

## 关于说明书

©2023 深圳华大智造科技股份有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造科技股份有限公司（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。


DNBSEQ™、MGISEQ™、ALPAQUA®、Agilent®、Ambion®、Axygen®、Invitrogen®、Qubit®、PerkinElmer®、Advanced Analytical®、Thermo Fisher®，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	深圳华大智造科技股份有限公司
生产地址	中国深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼
客服电话	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
1.0	V2.0	2023 年 6 月	首次发布

 提示 请使用最新版本说明书，并对照相应版本试剂盒进行使用。

# 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	2
1.4 组分	2
1.5 储存与运输	5
1.6 自备物料清单	6
1.7 注意事项	7
1.8 流程	8

---

<b>2 样本要求及处理</b>	<b>9</b>
2.1 样本类型	9
2.2 样本完整度	9
2.3 样本起始量	9
2.4 样本储存条件	10
2.5 文库插入片段大小要求	10

---

<b>3 文库构建标准流程</b>	<b>11</b>
3.1 试剂配制	12
3.2 DNA 酶切打断	13
3.3 打断产物片段筛选	16
3.4 接头连接	19
3.5 连接产物纯化	20
3.6 连接产物质检	21

---

<b>4 DNB 制备流程</b>	<b>22</b>
4.1 常规环化及 DNB 制备 (可选)	22
4.2 搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 制备 DNB (可选)	27
4.3 搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒制备 DNB (可选)	30

---


<b>5 附录</b>	<b>31</b>
5.1 关于磁珠及纯化	31
5.2 关于 Adapter 使用	33


5.3 单 Barcode 文库构建使用说明	43
------------------------	----

# 1 产品信息

## 1.1 产品描述

MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 V2.0 是为华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的 WGS PCR-free 文库构建试剂套装。采用高质量快速打断酶，流程简单，可快速将 25 ~ 900 ng 基因组 DNA (gDNA) 制备成 MGI 高通量测序平台专用文库，文库构建时间短。试剂盒中提供的所有试剂均经过严格的质量控制和功能验证，最大程度保证了文库制备的稳定性和重复性。

-  提示
- MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 V2.0 构建的文库为双 Barcode 文库。已构建好的文库可搭配 MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒 (货号: 1000020570) 进行环化成为环状文库 (ssCir) 后再进行 DNB 制备; 或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB, 货号: 940-000036-00) 或 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB, 货号: 1000026466) 进行快速 DNB 制备。
  - 本试剂套装中的 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 也可搭配单 Barcode 接头 MGIEasy PF Adapters-16 (管式) 试剂盒 (货号: 1000013460) 或 MGIEasy PF Adapters-96 (板式) 试剂盒 (货号: 1000013461), 构建单 Barcode 文库。已构建好的文库可搭配 MGIEasy 环化试剂盒 (货号: 1000005259) 进行环化成为环状文库后再进行 DNB 制备; 或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-SB, 货号: 940-000035-00) 进行快速 DNB 制备。单 Barcode 建库相关操作见第 43 页“单 Barcode 文库构建使用说明”。

 注意 环状文库可搭配所有测序仪和测序类型; 一步法 DNB 制备试剂盒制备的 DNB, 仅可搭配部分测序仪和测序类型。

## 1.2 适用范围

本试剂套装适用于常见的人、动物、植物、真菌、细菌等物种, 例如人 (血液、唾液、口腔拭子)、鼠、拟南芥、水稻、Meta、大肠杆菌等类型样本。此外, 还可适用于长扩增子 DNA 片段。

## 1.3 适用测序平台

根据应用需求，选择合适的 DNB 制备试剂盒、测序平台和测序类型：

表 1 测序平台及测序类型推荐

试剂盒	测序平台及测序类型推荐	推荐应用场景
MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒	MGISEQ-2000RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T7RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T10x4RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T20x2RS (PE100)	人（血液、唾液、口腔拭子）、动物、植物、微生物等类型样本
	MGISEQ-200RS (PE100)	简单基因组（扩增子 DNA 片段，微生物等类型样本）
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB)	MGISEQ-2000RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T7RS (PE100)	人（血液、唾液、口腔拭子）、动物、植物、微生物等类型样本
	DNBSEQ-E25RS (SE100) DNBSEQ-G99RS(PE100) MGISEQ-200RS (PE100)	简单基因组（扩增子 DNA 片段，微生物类型样本）
	DNBSEQ-G99RS (PE100/SE100) MGISEQ-200RS (PE100/SE100)	简单基因组（扩增子 DNA 片段，微生物等类型样本）






 提示 使用 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒制备 DNB 后，请勿再使用测序试剂盒套装中的试剂制备 DNB。

## 1.4 组分

MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装有 3 个规格：16 RXN、96 RXN 和 384 RXN。每个试剂套装包含 3 种独立试剂盒。不同规格的套装中所包含的试剂盒、货号、组分信息见下表。

 提示 16 RXN 套装适配 MGISP-100 自动化平台，96 RXN 和 384 RXN 套装适配 MGISP-960 自动化平台。

表 2 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 V2.0 (16 RXN) (货号：940-000886-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 货号：940-000885-00	Fast FS Buffer II	 绿色	215 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	105 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	450 μL/支 × 1
	Ad Ligase	 红色	100 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	55 μL/支 × 1



试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	20x Elute Enhancer	 黑色	7 μL/支 × 1
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 货号: 940-000018-00	UDB Adapters	 蓝色	5 μL/支 × 16
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001176-00	DNA Clean Beads	 白色	3.2 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	3.2 mL/支 × 1

表 3 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 V2.0 (96 RXN) (货号: 940-000884-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备 模块 V2.0 货号: 940-000883-00	Fast FS Buffer II	 绿色	1440 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	660 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	1440 μL/支 × 3
	Ad Ligase	 红色	600 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	360 μL/支 × 1
	20x Elute Enhancer	 黑色	25 μL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	4 mL/支 × 2
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A 货号: 940-000023-00	DNA Adapters-96 plate	-	5 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001174-00	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支 × 1

表 4 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装 V2.0 (384 RXN) (货号: 940-000882-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 × 4 货号: 940-000883-00	Fast FS Buffer II	 绿色	1440 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	660 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	1440 μL/支 × 3
	Ad Ligase	 红色	600 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	360 μL/支 × 1
	20x Elute Enhancer	 黑色	25 μL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	4 mL/支 × 2
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A 货号: 940-000023-00	UDB Adapters A	-	5 μL/孔 × 96
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 B 货号: 940-000022-00	UDB Adapters B	-	5 μL/孔 × 96
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 C 货号: 940-000025-00	UDB Adapters C	-	5 μL/孔 × 96
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 D 货号: 940-000024-00	UDB Adapters D	-	5 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 1000005279	DNA Clean Beads	 白色	50 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	25 mL/支 × 1



## 1.5 储存与运输

表 5 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	货号	储存及运输温度
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0	940-000885-00	-25 °C ~ -15 °C
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0	940-000883-00	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒	940-000018-00	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A	940-000023-00	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 B	940-000022-00	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 C	940-000025-00	
MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 D	940-000024-00	
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	940-001176-00	2 °C ~ 8 °C
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	940-001174-00	
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	1000005279	



- 提示**
- 有效期见试剂盒标签。
  - 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。
  - MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 中，TE Buffer 需 2 ~ 8 °C 保存，20x Elute Enhancer 和 Ligation Enhancer 首次使用后需室温储存，避免反复冻融。其中 Ligation Enhancer 需注意避光储存。

## 1.6 自备物料清单

表 6 MGI 产品订购信息

货号	规格	名称
1000020570	16 RXN	MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒
1000018650	96 RXN	MGIEasy 双 Barcode 环化模块（定制化）
1000005259	16 RXN	MGIEasy 环化试剂盒
1000017573	96 RXN	MGIEasy 环化模块（定制化）
940-000035-00	OS-SB, 4 RXN	DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0
940-000036-00	OS-DB, 4 RXN	DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0
1000026466	OS-DB, 4 RXN	DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒
1000013460	16 RXN	MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒
1000013461	96 RXN	MGIEasy PF Adapters-96（板式）试剂盒
1000005279	50 mL	MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒

 提示 根据应用需求选择性准备。

表 7 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（可调节热盖温度）	/
96 孔板磁力架（推荐）	ALPAQUA（货号：A00400）或同等功能仪器
Qubit3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher（货号：Q33216）或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyze	Agilent Technologies（货号：G2939AA）或同等功能仪器

表 8 试剂耗材清单



名称	推荐品牌
Nuclease Free water (NF water)	Ambion (货号: AM9937)
1x TE Buffer, pH 8.0	Ambion (货号: AM9858) 或 生工 (货号: B548401-1000)
无水乙醇 (分析纯)	/
Qubit ssDNA Assay Kit	Invitrogen (货号: Q10212) 或 YEASEN (货号: 12645ES60/12645ES76)
Qubit dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen (货号: Q32854) 或 YEASEN (货号: 12640ES60/12640ES76)
安捷伦高灵敏度DNA分析试剂盒	Agilent (货号: 5067-4626) 或同等功能仪器配套的分析试剂
移液器吸头	/
1.5 mL 离心管	/
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen (货号: PCR-02-C 或 PCR-96M2-HS-C)
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen (货号: Q32856) 或 Axxygen (货号: 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。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。
- 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，将涉及酶相关的试剂上下颠倒，轻弹底部混匀，瞬时离心后置于冰上待用。其他试剂室温解冻后涡旋充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- 配制各步骤反应液时，反应液推荐采用涡旋混匀以保证组分充分混匀。
- 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。
- 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。
- 为避免因转管操作造成建库产量的损失，磁珠纯化步骤不推荐转管操作。
- 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。
- 若有其他疑问，请联系 MGI 技术支持: [MGI-service@mgi-tech.com](mailto:MGI-service@mgi-tech.com)。

## 1.8 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	基因组 DNA 酶切打断	27 min	2 min
3.2	打断产物片段筛选（单、双选）	7~ 13 min	1 ~ 2 min
3.3	接头连接	12 min	2 min
3.4	连接产物纯化 	23 ~ 36 min	5 ~ 10 min
3.5	连接产物质检 	4 min	2 min

-  提示
- 总时长：指样本起始量  $\geq 200$  ng时，单个反应理论时长，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参考总时长。操作人员的熟练程度不同，手工操作实际时间会有一定波动。
  - ：停止点。

由连接产物文库（dsDNA）到 DNB 可通过三种方法进行：

1. 使用 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒（货号：1000020570）将 dsDNA 文库进行环化成为单链环状文库（ssCir）后，使用测序试剂盒中自带试剂制备为 DNB。详细操作见第 22 页“常规环化及 DNB 制备（可选）”。
2. 使用 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-DB，货号：940-000036-00），可直接将 dsDNA 文库制备为 DNB，详细操作见第 27 页“搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 制备 DNB（可选）”。
3. 使用 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒（OS-DB，货号：1000026466），可直接将 dsDNA 文库制备为 DNB，详细操作见第 30 页“搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒制备 DNB（可选）”。

## 2 样本要求及处理

### 2.1 样本类型

本试剂套装适用于常见的人、动物、植物、真菌、细菌等物种，例如人（血液、唾液、口腔拭子）、鼠、拟南芥、水稻、Meta、大肠杆菌等类型样本。此外，还可适用于长扩增子 DNA 片段。

不同类型样本在建库之前需进行酶切打断条件测试，以达到最佳打断效果。

### 2.2 样本完整度

推荐使用完整度较好（无明显降解）且纯度良好 ( $1.8 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$ ,  $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$ ) 高质量的基因组 DNA 进行打断。

 提示 若样本纯度不满足推荐标准或存在酶反应抑制剂，其文库产量存在偏低风险，影响测序结果。

### 2.3 样本起始量

本试剂套装可对 25 ~ 900 ng gDNA 进行文库制备。若基因组 DNA 量足够，优先推荐使用高起始量基因组 DNA 进行文库构建，以达到最优效果。其中样本浓度测定推荐使用 Qubit 或 BMG。

表 9 样本起始量范围推荐

样本类型	起始量范围 (ng)	推荐起始量 (ng)	推荐浓度 (ng/ $\mu$ L)
复杂基因组	50 ~ 900	500	$\geq 12$
简单基因组	25 ~ 900	200	$\geq 4.5$
微生物基因组	25 ~ 900	200	$\geq 4.5$
Meta 样本基因组	25 ~ 900	200	$\geq 4.5$

## 2.4 样本储存条件

由于溶解 gDNA 的 Buffer 会影响 Fast FS Enzyme II 反应效果，推荐使用 TE Buffer (pH 8.0) 溶解 gDNA。


若溶解 Buffer 为 AE Buffer (pH 8.5)，10 mM Tris (pH 6.8 ~ 8.0)，0.1 × TE (pH 8.0) 或其他 Buffer，建议进行酶切打断条件测试。通过调整“表 19 酶切打断反应条件（体系：60 μL）”中 30 °C 反应时长进行测试，反应时间推荐 7.5 ~ 15 min。

若样本含杂质及抑制剂较多，建议将样本 DNA 用 1.8 × 体积的磁珠纯化后用 TE buffer (pH 8.0) 溶解，然后再进行酶切打断条件测试。


## 2.5 文库插入片段大小要求

随着文库片段弥散度增大，测序质量可能会略微下降，推荐使用磁珠双选方式构建文库。

- 磁珠单选纯化后的文库主峰在 600 ~ 850 bp 范围。
- 磁珠双选纯化后的文库主峰在 400 ~ 600 bp 范围。

 **注意** 单选文库的插入片段较双选文库弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低，不推荐将单选文库和双选文库混合测序。

# 3 文库构建标准流程

 **注意** 本章节内容仅针对双 Barcode 接头文库构建，单 Barcode 接头文库构建使用说明及相关试剂见第 43 页“单 Barcode 文库构建使用说明”。

本试剂套装标准建库流程如下：

25 ~ 900 ng gDNA 经过打断修复，打断产物纯化（单、双选），接头连接，纯化后可得到连接产物文库。已构建好的连接产物可以搭配 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒（货号：1000020570）进行环化成为环状文库后再进行 DNB 制备；或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-DB，货号：940-000036-00）进行快速 DNB 制备。具体参见下表进行方案选择：

表 10 搭配 MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒（货号：1000020570）

gDNA 总量 (N ng)	推荐 gDNA 起始量 (ng)	打断产物纯化方法
$N \geq 900$	900	磁珠双选
$500 < N < 900$	500	磁珠单选
$200 \leq N \leq 500$	200 ~ 500（全部投入）	磁珠单选



-  **提示**
- 单选文库的插入片段较双选片选文库弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低，不推荐将单选文库和双选文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 200 ng 时建库，ssCir 文库产量存在偏低风险，通常不足以单独上机 1 次，需与其他 Fast PCR-free 文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 900 ng 时建库，若进行磁珠双选建库，其文库产量存在偏低风险。

表 11 搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-DB，货号：940-000036-00）

gDNA 总量 (N ng)	推荐 gDNA 起始量 (ng)	打断产物纯化方法
$N \geq 500$	500	磁珠双选
$200 < N < 500$	200	磁珠单选
$25 \leq N \leq 200$	25 ~ 200（全部投入）	磁珠单选

-  **提示**
- 单选文库的插入片段较双选片选文库弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低，不推荐将单选文库和双选文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 50 ng 时建库，文库产量存在偏低风险，通常不足以单独上机 1 次，需与其他 Fast PCR-free 文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 500 ng 时建库，若进行磁珠双选建库，其文库产量存在偏低风险。

## 3.1 试剂配制

### 3.1.1 准备

表 12 试剂准备

试剂名称	要求
Nuclease-Free Water	自备物料
TE Buffer	涡旋混匀，室温暂存
20x Elute Enhancer	首次使用后室温储存
DNA Clean Beads	涡旋混匀，离心，室温暂存

### 3.1.2 操作

 注意 以下配方试剂均满足 8 个样本建库需求，若有多个样本，可按需求等比例放大配制。

1. 配制 1x Elute Enhancer，室温存储条件下 7 天内可用。

表 13 1x Elute Enhancer 的配制

组分	体积
20x Elute Enhancer	1 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	19 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

2. 配制 En-TE，4  $^{\circ}$ C 存储条件下 60 天内可用。

表 14 En-TE 的配制

组分	体积
1x Elute Enhancer	3 $\mu$ L
TE Buffer	1497 $\mu$ L
Total	1500 $\mu$ L

3. 配制 En-Beads，4  $^{\circ}$ C 存储条件下 60 天内可用。

表 15 En-Beads 的配制

组分	体积
1x Elute Enhancer	10 $\mu$ L
DNA Clean Beads	990 $\mu$ L
Total	1000 $\mu$ L



## 3.2 DNA 酶切打断

 **提示** 本试剂套装通过控制 30 °C 反应时间来控制 DNA 片段分布，操作过程中尽量保证时间和温度的精确，确保整个加样过程在冰上进行。

### 3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer (pH 8.0)	自备物料，室温暂存
Fast FS Buffer II	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Fast FS Enzyme II	冰上暂存
80% 乙醇	自备物料，现配现用
EN-TE	来自 3.1.2，室温暂存
En-Beads	来自 3.1.2，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

### 3.2.2 酶切打断


1. gDNA 样本参考下表进行均一化。根据样本浓度，取 25 ~ 900 ng 基因组 DNA 至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer (pH 8.0) 补足至总体积 45  $\mu$ L。涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上备用。

表 17 基因组 DNA 的均一化

组分	单个反应体积
TE buffer (pH 8.0)	45 - X $\mu$ L
25 ~ 900 ng 基因组 DNA	X $\mu$ L
Total	45 $\mu$ L

 **提示** 因打断酶对 DNA 溶解液的 pH 值敏感，基因组 DNA 溶解与 DNA 均一化应使用相同溶解液，以确保不同类型样本都在相同 pH 值环境下进行打断。

- 提前设置 PCR 程序并运行第一步 4 °C hold，详见“表 19 酶切打断反应条件（体系：60 μL）”。
- 将 Fast FS Enzyme II 上下颠倒，轻弹底部混匀 10 次以上，轻弹时管底无试剂残留，瞬时离心后置于冰上备用。

 **提示** Fast FS Enzyme II **禁止涡旋**，严格按操作说明进行混匀，混匀不充分将影响打断效果，使用后尽快放回冰箱储存。

- 根据所需反应数，在冰上配制酶切打断反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 18 酶切打断反应液的配制

组分	单个反应体积
Fast FS Buffer II	10 μL
Fast FS Enzyme II	5 μL
Total	15 μL


- 吸取 **15 μL 酶切打断反应液**至均一化样本中（步骤 1，体积 45 μL）。涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，跳过第一步（4 °C Hold），按下表开始反应。

表 19 酶切打断反应条件（体系：60 μL）

温度	时间
70 °C 热盖	On
4 °C	Hold
30 °C	8 min 30 s
65 °C	15 min
4 °C	Hold

 **提示** 上述酶切打断条件适合于人、动物、植物及细菌 gDNA 样本。打断后 gDNA 片段大小在 100 ~ 3000 bp，主带范围在 600 ~ 850 bp。如样本不在涵盖范围，建议缩短或延长 30 °C 反应时间，进行酶切打断条件测试，以达到最佳的打断效果。

- 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。

 **注意** 请勿在此处停止，继续完成打断产物片段筛选。

- 注意**
- 初次进行样本酶切打断条件摸索时，建议从 3.2.2 节步骤 7 中取 10  $\mu\text{L}$  打断产物，利用 0.8x 磁珠进行纯化后，溶解到 8  $\mu\text{L}$  En-TE。随后将取 1  $\mu\text{L}$  纯化产物进行 Agilent 2100 高敏芯片质检，以确定打断片段大小分布在 100 ~ 3000 bp，片段主峰范围在 600 ~ 850 bp。例如：200 ng 溶于 pH 8.0 1xTE buffer 的 gDNA 在 8.5 min 打断条件下，纯化后的打断产物 Agilent 2100 高敏芯片质检结果（图 1）。
  - 若片段过大或过小，建议重新调整 30  $^{\circ}\text{C}$  反应时长（3.2.2 步骤 6），进行酶切打断条件测试（推荐 30  $^{\circ}\text{C}$  反应在 7.5 ~ 15 min 内进行梯度测试）。

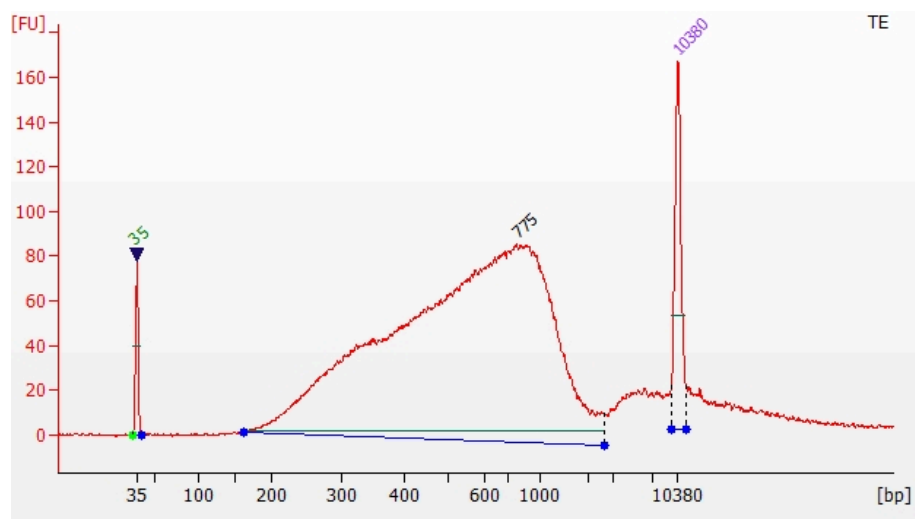



图 1 单选纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

## 3.3 打断产物片段筛选

 **提示** 操作前请仔细阅读第 10 页“文库插入片段大小要求”和第 31 页“关于磁珠及纯化”。根据不同的实验方案选择合适的片段筛选（磁珠单选或磁珠双选）方法。

### 3.3.1 磁珠单选（方案一）

#### 3.3.1.1 准备

表 20 试剂准备

试剂名称	要求
En-TE	来自 3.1.2，室温暂存
En-Beads	来自 3.1.2，提前 30 min 取出置于室温，每次使用前充分涡旋混匀

#### 3.3.1.2 磁珠单选

1. 检查 3.2.2 节步骤 7 酶切打断产物体积，若体积不足 60  $\mu\text{L}$ ，用 En-TE 补足。
2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **48  $\mu\text{L}$  En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 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。尽量吸干管内液体，若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。
5. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **47  $\mu\text{L}$  En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀后瞬时离心。

 **注意** 带磁珠进入下一步反应。请勿在此处停止，继续完成接头连接反应。

## 3.3.2 磁珠双选（方案二）


### 3.3.2.1 准备

表 21 试剂准备

试剂名称	要求
En-TE	来自 3.1.2，室温暂存
En-Beads	来自 3.1.2，提前 30 min 取出置于室温，每次使用前充分涡旋混匀


### 3.3.2.2 磁珠双选

1. 检查 3.2.2 节步骤 7 酶切打断产物体积，若体积不足 60  $\mu\text{L}$ ，用 En-TE 补足。
2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **32  $\mu\text{L}$  En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2 ~ 5 min 至液体澄清，吸取上清至新的 0.2 mL PCR 管中。

 **提示** 此步为取上清至新的 PCR 管，切勿丢弃上清。磁珠可保留至实验结束，如有需要可纯化回收磁珠上的 DNA。

5. 加入 **16  $\mu\text{L}$  En-Beads** 至含有上清液的 PCR 管中，涡旋混匀。
6. 室温孵育 5 min。将 PCR 管瞬时离心。
7. 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 ~ 5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。尽量吸干管内液体，若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。
8. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **47  $\mu\text{L}$  En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀后瞬时离心。

 **注意** 带磁珠进入下一步反应。请勿在此处停止，继续完成接头连接反应。

 **注意** 若需质检打断产物双选后的片段分布，可在 3.2.2.2 节步骤 6 取 10  $\mu\text{L}$  产物，进行纯化后，溶解到 5  $\mu\text{L}$  En-TE。此步纯化可在接头连接反应过程中进行。取 1  $\mu\text{L}$  双选纯化产物进行 Agilent 2100 高敏芯片质检。

例如：900 ng 溶于pH 8.0 1xTE buffer 的 gDNA在 8.5 min打断条件下，纯化后的双选产物 Agilent 2100 高敏芯片质检结果（图 2）。

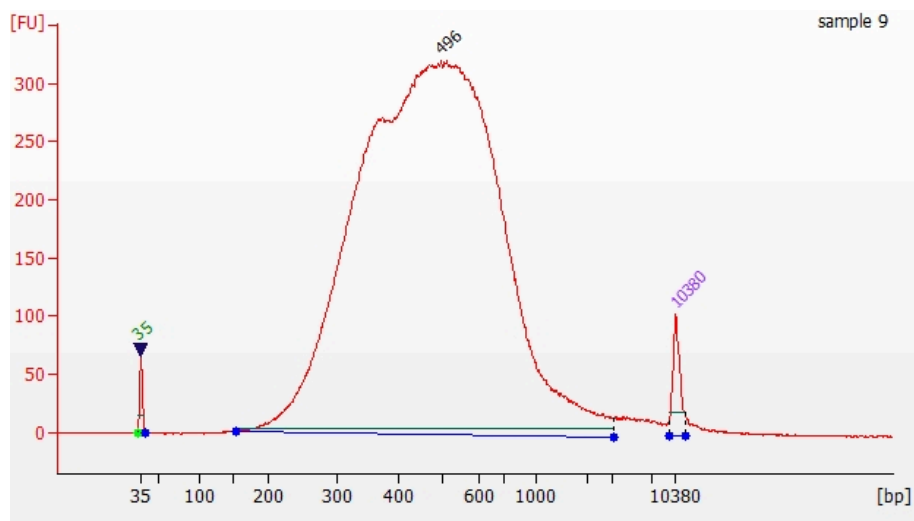


图 2 双选纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果


## 3.4 接头连接

 提示 Barcode 在接头序列上，操作前请仔细阅读附录第 33 页“关于 Adapter 使用”。

### 3.4.1 准备

表 22 试剂准备

试剂名称	要求
MGIEasy 系列接头试剂盒	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Fast Ligation Buffer	
Ad Ligase	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Ligation Enhancer	混匀离心，使用后至于室温，避光存储

-  提示
- Adapters 使用前充分涡旋混匀，不可直接与接头连接反应液混合。
  - Fast Ligation Buffer 溶液较粘稠，使用前涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心。吸取时请慢慢放，确保加液量正确。
  - Ad Ligase 上下颠倒 5 ~ 10 次至充分混匀后，瞬时离心后置于冰上备用。
  - Ligation Enhancer 首次使用后，置于 10 ~ 30 °C 避光储存。

### 3.4.2 接头连接

1. 根据样本的起始量，对接头进行稀释。

表 23 UDB PF Adapter 使用量


gDNA 起始量 (N, ng)	UDB PF Adapter 稀释倍数	稀释后使用量
$500 < X \leq 900$	不稀释	3 $\mu$ L
$200 \leq X \leq 500$	1.5 x	3 $\mu$ L
$100 \leq X < 200$	3 x	3 $\mu$ L
$25 \leq X < 100$	10 x	3 $\mu$ L

2. 吸取 **3  $\mu$ L Adapter** 至对应的样本管中（3.3.1.2 节步骤 5 或 3.3.2.2 节步骤 8 产物，体积 47  $\mu$ L），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。


3. 根据所需反应数，在冰上配制接头连接反应液，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 24 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Fast Ligation Buffer	23 $\mu$ L
Ad Ligase	5 $\mu$ L
Ligation Enhancer	2 $\mu$ L
Total	30 $\mu$ L

 提示 推荐在打断产物片段筛选等待过程中配制接头连接反应液，配制完成置于冰上，须 30 min 内使用。

4. 缓慢吸取 30  $\mu$ L 接头连接反应液至各样本管中，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心使液收集至管底后置于冰上。

 提示 接头连接反应液较粘稠，吸取时请慢慢吸慢慢放。


5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 25 接头连接反应条件（体系：80  $\mu$ L）

温度	时间
30 $^{\circ}$ C 热盖	On
25 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 提示 若文库产量偏低，可适当延长 25  $^{\circ}$ C 反应时间至 30 min。

6. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。

 注意 请勿在此处停止，继续完成连接产物纯化。

## 3.5 连接产物纯化

 提示 操作前请仔细阅读第 31 页“关于磁珠及纯化”。


### 3.5.1 准备

表 26 试剂准备


试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	来自 3.1.2，室温暂存
En-Beads	来自 3.1.2，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀



### 3.5.2 连接产物纯化

 **注意** 若应用场景为选择磁珠双选建库，且连接产物文库搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB, 货号: 940-000036-00) 进行快速 DNB 制备，连接产物需进行两次纯化，纯化方法参考第 33 页“连接产物纯化 1”和第 33 页“连接产物纯化 2”。

1. 吸取 **20  $\mu$ L En-TE** 至各样本管中 (3.4.2 节步骤 6, 体积 **80  $\mu$ L**) 。
2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **20  $\mu$ L En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
3. 室温孵育 **5 min**。
4. 将 PCR 管瞬时离心，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。尽量吸干管内液体，若有少量残留在管壁时可将 PCR 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。
5. 将 PCR 管从磁力上架取下，加入 **30  $\mu$ L En-TE** 和 **20  $\mu$ L En-Beads**，涡旋混匀。
6. 室温孵育 **5 min**。
7. 将 PCR 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。
8. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 **160  $\mu$ L 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 **30 s**，小心吸取上清并丢弃。
9. 重复步骤 8 一次。尽量吸干管内液体，若有少量残留在管壁时可将 PCR 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。
10. 保持 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。
11. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **51  $\mu$ L En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。

 **提示** 若 gDNA 起始量小于 100 ng，推荐使用 **15  $\mu$ L En-TE** 进行 DNA 洗脱。

12. 室温孵育 **5 min**。
13. 将 PCR 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 **49  $\mu$ L 上清液** 至新的 **0.2 mL PCR 管**。


 **提示** 若 gDNA 起始量小于 100 ng，吸取 **13  $\mu$ L 上清液**。

 **停止点** 连接产物纯化后，可置 **-20  $^{\circ}$ C** 冰箱储存。

### 3.6 连接产物质检

吸取 **1  $\mu$ L 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，按照操作说明对连接纯化文库定量。

- 连接产物文库浓度 **> 1 ng/ $\mu$ L** 可用于后续 DNB 制备。
- 连接产物文库浓度在 **0.8 ~ 1 ng/ $\mu$ L** 范围，进行后续 DNB 制备存在产量偏低风险。
- 连接产物文库浓度 **< 0.8 ng/ $\mu$ L** 则不建议进行后续操作。

 **注意** 为避免接头二聚物残留带来的样本间污染问题以及样本测序数据量拆分均一性问题，推荐在 DNB 阶段进行样本混合。

# 4 DNB 制备流程

构建好的连接产物文库可使用如下方式完成 DNB 制备：

- 搭配 MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒进行环化，成为 ssCir 后，使用与测序平台匹配的测序试剂套装进行 DNB 制备。
- 或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB) (货号：940-000036-00) 进行快速 DNB 制备。
- 或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 (OS-DB) (货号：1000026466) 进行快速 DNB 制备。

## 4.1 常规环化及 DNB 制备 (可选)

选择常规环化、DNB 制备方法，需搭配 MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒 (货号：1000020570) 进行环化文库制备，形成环状文库后，使用与测序平台匹配的测序试剂套装进行 DNB 制备。


 注意 使用前请仔细核对试剂盒名称及货号。

表 27 磁珠片选与常规环化投入量关系表

打断产物纯化方法	磁珠单选	磁珠双选
连接产物文库投入量 (ng)	100 ~ 300	100 ~ 300

### 4.1.1 变性、单链环化

#### 4.1.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 28 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer (pH 8.0)	自备物料，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	冰上解冻，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

### 4.1.1.2 变性

1. 根据连接产物浓度，取 100 ~ 300 ng 连接产物至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer (pH 8.0) 补足至总体积 48  $\mu$ L。涡旋混匀，瞬时离心。

 提示 在 100 ~ 300 ng 范围内，连接产物投入量越多，ssCir文库产量越高。

1. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 29 变性反应条件（体系：48  $\mu$ L）

温度	时间
100 °C 热盖	On
95 °C	3 min
4 °C	10 min

3. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

### 4.1.1.3 单链环化

1. 根据所需反应数，在冰上配制单链环化反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 30 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.5 $\mu$ L
DNA Rapid Ligase	0.5 $\mu$ L
Total	12 $\mu$ L

2. 吸取 12  $\mu$ L 单链环化反应液至各样本管中（4.1.1.2 节步骤 3，体积 48  $\mu$ L），涡旋混匀 3 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 31 单链环化反应条件（体系：60  $\mu$ L）

温度	时间
42 °C 热盖	On
37 °C	10 min
4 °C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上，进入下步反应。

## 4.1.2 酶切消化

### 4.1.2.1 准备

试剂：下列试剂用前混匀离心，使用后尽快放回冰箱储存。

表 32 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	冰上解冻，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Digestion Stop Buffer	室温解冻，混匀后离心，冰上暂存

### 4.1.2.2 酶切消化

1. 根据所需反应数，在冰上配制酶切消化反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 33 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（4.1.1.3 节步骤 4，体积 60  $\mu\text{L}$ ），涡旋混匀 3 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 34 酶切消化反应条件（体系：64  $\mu\text{L}$ ）

温度	时间
42 °C 热盖	On
37 °C	10 min
4 °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 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

 注意 请勿在此处停止，继续完成消化产物纯化。

### 4.1.3 消化产物纯化

 提示 操作前请仔细阅读第 31 页“关于磁珠及纯化”。

#### 4.1.3.1 准备

表 35 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer (pH 8.0)	自备物料，室温暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出置于室温，每次使用前充分涡旋混匀

#### 4.1.3.2 操作

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 **130 μL DNA Clean Beads** 至各样本管中（4.1.2.2 节步骤 4，体积 71.5 μL），涡旋混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将 PCR 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 PCR 管固定于磁力架上，加入 **160 μL 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，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，若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 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。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **25 μL TE Buffer (pH 8.0)** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将 PCR 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 **24 μL 上清液** 至新的 1.5 mL 离心管或 0.2 mL PCR 管。

 停止点 酶切消化产物纯化后，产物可置 -20 °C 冰箱储存。

### 4.1.4 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消化纯化后的产物（ssCir）进行定量，其产量需  $\geq 50$  fmol（约10 ng）。可根据公式计算 50 fmol 单链环状 DNA 对应的质量。

**公式 1** 单链环 fmol 与 ng 间的换算


$$50 \text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.05 \times \frac{\text{DNA片选主峰大小 (bp)} + \text{接头长度 (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 330 \text{ ng}$$

 **提示** MGI系列接头试剂盒中，双 Barcode PCR-Free 接头长度为 131 bp，单 Barcode PCR-Free 接头长度为 84 bp。

### 4.1.5 常规 DNB 制备

参照《MGISEQ-200RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书》、《MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书》或《DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装使用说明书》制备 DNB，取 50 fmol（约 10 ng）单链环状 DNA 产物制备成适用于 MGI 基因测序仪的 DNB 文库。

如需将不同单链环状 ssCir 文库混合测序，需按摩尔数比进行混合。不同样本单链环的摩尔数比取决于客户预期得到的各个样本的数据量比。但注意，混合样本对应的 Barcode 需符合 Adapter 的使用规则。

 **提示**

- 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：采用磁珠单选纯化法的文库与采用磁珠双选法的文库混合上机）时，测序质量及有效数据量会有降低的风险。
- 若必须要混合测序时，只推荐采用插入片段的大小和集中度相似的酶切 PCR-Free 文库混合测序。

## 4.2 搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 制备 DNB (可选)

由 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装构建的文库，搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (OS-DB, 货号: 940-000036-00)，进行快速 DNB 制备。根据片选方式的不同，按下表选择对应投入量制备 DNB。

表 36 磁珠片选与一步法制备 DNB 的文库投入量关系表

打断产物纯化方法	磁珠单选	磁珠双选
Make DNB 投入量 (ng)	20	16

 提示 文库混合注意事项

- 连接产物文库定量不准或存在抑制酶反应的杂质残留，制备 DNB 将存在失败或浓度异常的风险。
- 相同样本类型、相同建库起始量的文库进行混合时，按所需测序数据量比例取相应体积的文库进行混合。
- 不同样本类型或不同建库起始量的文库进行混合时，易造成 Barcode 拆分均一性差，无法达到预期的测序数据量比例。
- 若文库构建时，基因组 DNA 起始量低于 50 ng，连接产物产量可能低于 20 ng，需要和其他文库进行混合。

### 4.2.1 准备

样本：3.5.2 步骤 13 的文库，计算制备 DNB 所需文库的体积，置于冰上备用。

试剂：下列试剂用前充分混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 37 试剂准备

试剂名称	要求
DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB)	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
分子级水	
DNB 聚合酶混合液 I (OS-V2.0)	冰上解冻，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	
DNB 终止缓冲液	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Qubit ssDNA Assay Kit	自备物料

## 4.2.2 一步法 DNB 制备

- 根据 3.5.2 节步骤 13 连接产物文库浓度，取适量文库（推荐：单选文库 20 ng / 双选文库 16 ng）至新的 0.2 mL PCR 管。按下表配制 DNB 反应体系 1，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 38 DNB 反应体系 1

组分	单个反应体积
dsDNA 文库	V $\mu$ L
分子级水	20-V $\mu$ L
DNB 制备缓冲液	20 $\mu$ L
Total	40 $\mu$ L

- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 39 DNB 反应条件 1（体系：40  $\mu$ L）

温度	时间
105 $^{\circ}$ C 热盖	On
95 $^{\circ}$ C	3 min
57 $^{\circ}$ C	3 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

- 根据所需反应数，在冰上配制 DNB 反应体系 2，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 40 DNB 反应体系 2 的配制

组分	单个反应体积
DNB 聚合酶混合液 I (OS-V2.0)	40 $\mu$ L
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	4 $\mu$ L
Total	44 $\mu$ L


- 吸取 44  $\mu$ L DNB 反应体系 2 至样本管中（步骤 2，体积 40  $\mu$ L），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。



5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 41 DNB 反应条件 2 (体系: 84  $\mu\text{L}$ )

温度	时间
35 °C 热盖	On
30 °C	25 min
4 °C	Hold


-  提示
- 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢，在热盖升降温过程中，加热模块处于室温状态，且程序未运行。对于这种类型的 PCR 仪，需提前进行热盖预热，确保在进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。
  - 热盖温度建议设置为 35 °C，或尽可能设置成接近 35 °C 的最低温度。如果由于仪器原因无法降温，也可保持 105 °C。

6. 立即加入 **20  $\mu\text{L}$  DNB 终止缓冲液**，用**阔口吸头**缓慢地吹打混匀 5 ~ 8 次，切勿震荡及剧烈吹打，可置于 4 °C 保存备用（48 小时内使用）。

 注意 DNB 一定要用阔口吸头缓慢吹打混匀，切勿离心、震荡及剧烈吹打。

7. DNB 制备完成后，用 Qubit ssDNA Assay Kit 进行浓度检测。

- DNB 文库浓度小于 6 ng/ $\mu\text{L}$ ，浓度不合格需重新制备。
- DNB 文库浓度在 6 ~ 8 ng/ $\mu\text{L}$  范围，进行后续上机测序存在数据量偏低风险。
- DNB 文库浓度在大于等于 8 ng/ $\mu\text{L}$  范围，浓度合格。

 注意 因 DNB 较粘稠，建议取 2  $\mu\text{L}$  进行检测，如样品数量多时，建议分批定量，避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准确。

### 4.3 搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒制备 DNB（可选）

根据连接产物浓度，取 20 ng 连接产物文库，参照说明书《H-T-003 4.0 DNBSEQ DNB制备试剂盒使用说明书》进行操作。

 注意 当搭配 DNBSEQ-G99RS 测序时，DNB 反应条件2 中“30 °C”的反应时间为 20 min。

# 5 附录

## 5.1 关于磁珠及纯化

推荐使用套装内的 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒的 DNA Clean beads 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠，纯化条件需重新摸索。

### 5.1.1 磁珠使用前注意事项

1. 磁珠使用前，提前 30 min 从 4 °C 冰箱取出，涡旋混匀且平衡至室温，有利于保证回收效率。
2. 磁珠每次使用前，需涡旋或用移液器上下吸打，确保充分混匀。
3. 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段的下限长度。用量越高，纯化得到的 DNA 片段的下限越小。

### 5.1.2 纯化操作注意事项

- 推荐使用 96 孔板磁力板或其他 0.2 mL PCR 管磁力板进行磁珠纯化。若使用 1.5 mL 离心管磁力架，需在纯化前将反应液从 0.2 mL PCR 管转移至 1.5 mL 离心管中。此步骤会造成纯化损失，尤其在酶切消化产物纯化过程中，此操作会使产量损失 20% 左右。
- 样本体积：如果待纯化样本体积因孵育温度高导致蒸发，体积减少，应加入 TE Buffer 或 En-TE 补齐体积，再用推荐磁珠用量纯化。
- 孵育时间：磁珠与样本在室温下孵育，若需充分保障磁珠与样本结合效果，可适当增加室温孵育时间。
- 开盖：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 1.5 mL 离心管中下段再开盖。
- 吸取上清

样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离，请于液体彻底澄清后再吸取上清。

吸取上清时，离心管应始终置于磁力架上，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，吸头不可碰到磁珠。由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间可能延长，以液体彻底澄清为准。

为避免吸到磁珠，最后可余留 2 ~ 3  $\mu$ L 液体。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。

- 漂洗

应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇漂洗磁珠。液体高度应没过磁珠。

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，用小量程移液器将管底液体吸干。

- 干燥

1. 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。

- 磁珠开裂：**过分干燥，会降低纯化得率。**
- 磁珠表面反光：干燥不充分，容易造成无水乙醇残留影响后续反应。
- 磁珠表面无反光：干燥充分。

2. 磁珠干燥一般需要 3 ~ 5 min。由于室内温度、湿度的差异，干燥时间可能不同，应随时观察。

- 洗脱

用 TE Buffer 或 3.1 节自配的 En-TE 进行洗脱。


为避免触碰、吸取磁珠，洗脱体积应比最终吸取上清的体积多 2  $\mu\text{L}$ 。

### 5.1.3 连接产物纯化 1

1. 吸取 **20  $\mu$ L En-TE** 至各样本管中（3.4.2 节步骤 6，体积 80  $\mu$ L）。
2. 将 En-Beads 充分涡旋混匀，吸取 **20  $\mu$ L En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 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。
5. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 **160  $\mu$ L 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
6. 重复步骤 5 一次。尽量吸干管内液体，若有少量残留在管壁时可将 PCR 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。
7. 保持 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。
8. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **32  $\mu$ L En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。
9. 室温孵育 5 min。
10. 将 PCR 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 **30  $\mu$ L 上清液**至新的 0.2 mL PCR 管。

### 5.1.4 连接产物纯化 2

1. 确认待纯化连接产物的体积（如样本体积为 30  $\mu$ L）。
2. 将 En-Beads 或 DNA Clean Beads充分涡旋混匀，吸取 **0.7 x  $\mu$ L（如 21  $\mu$ L） En-Beads 或 DNA Clean Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 管瞬时离心，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。
5. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 **160  $\mu$ L 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
6. 重复步骤 5 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 PCR 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。
7. 保持 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。
8. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **30  $\mu$ L En-TE 或 TE buffer** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀。
9. 室温孵育 5 min。
10. 将 PCR 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 **28  $\mu$ L 上清液**至新的 0.2 mL PCR 管。

 提示 连接产物的质检方法参考第 21 页“连接产物质检”。

## 5.2 关于 Adapter 使用

- 该试剂盒适配两种 Barcode 类型的接头，请根据接头类型选择正确的使用规则。双 Barcode 接头使用规则请参考 5.2.1，5.2.2 和 5.2.3。单 Barcode 接头使用规则请参考 5.2.4 和 5.2.5。

- 单 Barcode 接头根据反应数不同有 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。
- 双 Barcode 接头根据反应数不同提供 3 种不同规格的双 Barcode Adapter 试剂盒: MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 (16 RXN)、MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A (96 RXN) 或 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A/B/C/D (384 RXN)。请勿与 MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒中的 UDB Adapter (不带 Barcode) 混合使用。
- 两种类型的接头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。部分 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 均为双链接头, 请勿将其置于室温以上 (30 °C) 的温度, 否则易发生解链, 影响使用效果。
- 吸取不同 Adapter 时注意更换吸头, 避免交叉污染。
- 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/可穿刺膜。对于板式 Adapters, 如果发生意外导致可穿刺膜被污染, 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。

### 5.2.1 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 (16 RXN) 介绍

管式: 共 16 管 UDB Adapters, 8 个为一组碱基平衡的 Barcode 组合。

- 第一组为 UDB Adapter-393 ~ UDB Adapter-400 (下图蓝色框)。
- 第二组为 UDB Adapter-401 ~ UDB Adapter-408 (下图红色框)。

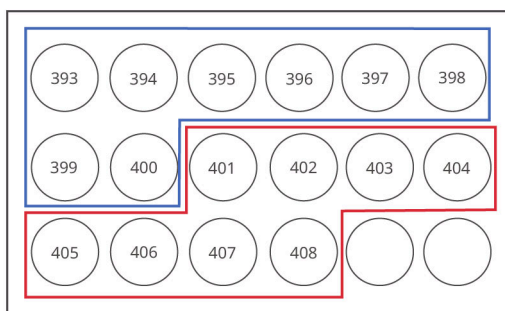


图 3 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 (16 RXN) 孔位

### 5.2.2 MGIEasy 双端独立标签 PF 接头试剂盒 A/B/C/D (96 RXN) 介绍

板式: 共 4 板, 每板 96 个 UDB Adapters

UDB Adapters A/B: 每列 8 个为一组碱基平衡的 Barcode 组合, 每板各 12 列, A、B 各 1 板, 共 2 板。

UDB Adapters C/D: 每板 96 个为一组碱基平衡的 Barcode 组合, C、D 各 1 板, 共 2 板。

表 42 UDB Adapters A 孔位表

Adapter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	385	393	401	409	417	425	433	441	449	457	465	473
B	386	394	402	410	418	426	434	442	450	458	466	474
C	387	395	403	411	419	427	435	443	451	459	467	475
D	388	396	404	412	420	428	436	444	452	460	468	476
E	389	397	405	413	421	429	437	445	453	461	469	477
F	390	398	406	414	422	430	438	446	454	462	470	478
G	391	399	407	415	423	431	439	447	455	463	471	479
H	392	400	408	416	424	432	440	448	456	464	472	480

表 43 UDB Adapters B 孔位表

Adapter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	481	489	497	505	513	521	529	537	545	553	561	569
B	482	490	498	506	514	522	530	538	546	554	562	570
C	483	491	499	507	515	523	531	539	547	555	563	571
D	484	492	500	508	516	524	532	540	548	556	564	572
E	485	493	501	509	517	525	533	541	549	557	565	573
F	486	494	502	510	518	526	534	542	550	558	566	574
G	487	495	503	511	519	527	535	543	551	559	567	575
H	488	496	504	512	520	528	536	544	552	560	568	576

表 44 UDB Adapters C 孔位表

Adapter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	577	585	593	601	609	617	625	633	641	649	657	665
B	578	586	594	602	610	618	626	634	642	650	658	666
C	579	587	595	603	611	619	627	635	643	651	659	667
D	580	588	596	604	612	620	628	636	644	652	660	668
E	581	589	597	605	613	621	629	637	645	653	661	669
F	582	590	598	606	614	622	630	638	646	654	662	670
G	583	591	599	607	615	623	631	639	647	655	663	671
H	584	592	600	608	616	624	632	640	648	656	664	672

表 45 UDB Adapters D 孔位表

Adapter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	673	681	689	697	705	713	721	729	737	745	753	761
B	674	682	690	698	706	714	722	730	738	746	754	762
C	675	683	691	699	707	715	723	731	739	747	755	763
D	676	684	692	700	708	716	724	732	740	748	756	764
E	677	685	693	701	709	717	725	733	741	749	757	765
F	678	686	694	702	710	718	726	734	742	750	758	766
G	679	687	695	703	711	719	727	735	743	751	759	767
H	680	688	696	704	712	720	728	736	744	752	760	768



## 5.2.3 UDB Adapters 混合指南

在 DNBSEQ、MGISEQ 测序仪平台测序时，推荐每 lane 的 barcode 保证碱基平衡。双端独立标签 PF 接头试剂盒和双端独立标签 PF 接头试剂盒 A/B 的板位中是 8 个为一组预设平衡碱基 Barcode 组合。当样本数据量要求相同时，推荐按照下表混合规则进行双 Barcode 混合。

表 46 双Barcode 混合规则

混合数	使用方法
8X	使用 X 列 Barcode
8X+1	使用 X 列 Barcode+其他列任意 1 个 Barcode
8X+2	使用 X 列 Barcode+其他列任意 2 个 Barcode
8X+3	使用 X 列 Barcode+其他列任意 3 个 Barcode
8X+4	使用 X 列 Barcode+其他列任意 4 个 Barcode
8X+5	使用 X 列 Barcode+其他列任意 5 个 Barcode
8X+6	使用 X 列 Barcode+其他列任意 6 个 Barcode
8X+7	使用 X 列 Barcode+其他列任意 7 个 Barcode

双端独立标签PF接头试剂盒 C/D 推荐整板 96 个为一组进行混合。

如遇到特殊情况（如 1 个孔位的试剂不足），以至于无法满足常规混合至少有 1 组 Barcode 组合的要求。或当样本数据量要求不不同时，则需要通过对每测序 cycle 下各碱基含量进行计算来确定混合方案。需遵循在一条 lane 中每个测序位置均保证单个碱基含量不低于 12.5%，不高于 62.5%。

表 47 成组的 8 个 Barcode（各碱基含量符合要求）

Sample 1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	A
Sample 2	C	T	G	A	A	C	C	G	A	A
Sample 3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample 4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample 5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample 6	C	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample 7	T	T	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample 8	G	G	A	T	G	C	T	A	C	C
各碱基占比 (%)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0

表 48 不成组的 9 个 Barcode (各碱基含量不符合要求)

Sample 1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	T
Sample 2	A	C	G	A	A	G	G	T	C	C
Sample 3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample 4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample 5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample 6	G	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample 7	T	G	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample 8	G	G	A	T	G	A	T	A	C	C
Sample 9	G	A	C	G	G	T	C	G	A	G
A 碱基占比 (%)	33.3	33.3	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	22.2	22.2	0
T 碱基占比 (%)	22.2	0	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	33.3	22.2	33.3
C 碱基占比 (%)	0	33.3	33.3	22.2	22.2	0	22.2	22.2	33.3	33.3
G 碱基占比 (%)	44.4	33.3	22.2	33.3	33.3	33.3	33.3	22.2	22.2	33.3

## 5.2.4 PF Adapters-16 (管式) 试剂使用规则

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：

 注意 同一条 lane 上各样本间的 barcode 不能重复。

表 49 PF Adapters-16 (管式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	任选一种方法： <ul style="list-style-type: none"> <li>• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04，将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。</li> <li>• 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 97-104，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。</li> <li>• 或如果样本不需要测 Barcode 时，可只使用一个 1 Adapter (如 01)。</li> </ul>

样本数/lane	使用方法（举例）
2	<p>任选一种方法：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04，将 01 和 02 取等体积混合后加入样本 1 中，将 03 和 04 取等体积混合后加入样本 2 中。</li> <li>或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 97-104，将 97-100 取等体积混合后加入样本 1 中。将 101-104 取等体积混合后加入样本 2 中。</li> </ul>
3	<ol style="list-style-type: none"> <li>样本 1、2 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>样本 3 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<p>任选一种方法：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。</li> <li>或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 97-104，将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix，分别加入样本 1、2、3、4 中。</li> </ul>
5	<ol style="list-style-type: none"> <li>样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>样本 5 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<ol style="list-style-type: none"> <li>样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<ol style="list-style-type: none"> <li>样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加一组 Adapter。</li> <li>样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加一组 Adapter。</li> <li>样本 7，采用上述（1 样本数/lane）方法加一组 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>加一组 8 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 97-104，将 97、98、99、100、101、102、103、104 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。</li> <li>或选取两组 4 个 Adapter（01-04 和 13-16）。每个样本加 1 个 Adapter。</li> </ul>
8+x (x=1~8, 总计 9~16个)	<ol style="list-style-type: none"> <li>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、5~8采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>剩余样本分成 1 组，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。</li> </ol> <p> 提示 上述两组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

当样本数据量要求不同时，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。

## 5.2.5 PF Adapters-96（板式）试剂使用规则

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：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	41	57	65	73	81	89	97	121	25	33	49
B	02	42	58	66	74	82	90	98	122	26	34	50
C	03	43	59	67	75	83	91	99	123	117	35	51
D	04	44	60	68	76	84	92	100	124	28	36	52
E	13	45	61	69	77	85	93	101	125	29	37	53
F	14	46	62	70	78	86	94	102	126	30	38	116
G	15	47	63	71	79	87	95	103	127	114	39	55
H	16	48	64	72	80	88	96	104	128	32	115	56

图 4 PF Adapters-96（板式）Adapters 分布图及成组规则

- 4个 Adapter 成组：第 1 列（01-04，13-16），共计 2 组（上图红色框）。
- 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（上图蓝色框）。
- 24个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组（上图紫色框）。

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

 注意 同一条 lane 上各样本间的 barcode 不能重复。

表 50 PF Adapters-96 (板式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04, 将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。</li> <li>或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 41-48, 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。</li> <li>或如果样本不需要测 Barcode 时, 可只使用一个 1 Adapter (如 01)。</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04, 将 01 和 02 取等体积混合成 mix 后加入样本 1 中。将 03 和 04 取等体积混合成 mix 后加入样本 2 中。</li> <li>或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 41-48, 将 41-44 取等体积混合成 mix, 加入样本 1 中。将 45-48 取等体积混合成 mix, 加入样本 2 中。</li> </ul>
3	<ol style="list-style-type: none"> <li>样本 1、2 采用上述 (2样本数/lane) 方法加 Adapter。</li> <li>样本 3 采用上述 (1样本数/lane) 方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04, 将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。</li> <li>或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 41-48, 将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别取等体积混合成 mix, 分别加入样本 1、2、3、4 中。</li> </ul>

样本数/lane	使用方法（举例）
5	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>2. 样本 5 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>2. 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>2. 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>3. 样本 7 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。</li> </ol> <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。</li> </ul> <p>例如 41-48，将 41、42、43、44、45、46、47、48 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。</p>
8n+x (n=1、2 x=1~8, 总计 9~24个)	<ol style="list-style-type: none"> <li>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、5-8 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>2. 样本 9-8n，每 8 个样本为一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。</li> <li>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。</li> </ol> <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>
8n+x (3≤n<11 x=1~8, 总计 25~96个)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 样本 1-24，加一组 24 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol> <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

当样本数据量要求不同时，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 41-48；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 或其他 41-48 以外的成组 Adapter。

## 5.3 单 Barcode 文库构建使用说明

### 5.3.1 单 Barcode 文库构建试剂盒组合

MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 也可兼容单 Barcode 文库构建，但需搭配 MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒（货号：1000013460，需自备）或 MGIEasy PF Adapters-96（板式）试剂盒（货号：1000013461，需自备）。

单 Barcode 建库所需试剂盒及组分信息见下表：

表 51 单 Barcode MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂盒组合 1 (16 RXN)



















试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 货号：940-000885-00	Fast FS Buffer II	 绿色	215 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	105 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	450 μL/支 × 1
	Ad Ligase	 红色	100 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	55 μL/支 × 1
	20x Elute Enhancer	 黑色	7 μL/支 × 1
MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒 货号：1000013460	DNA Adapters	 无色	5 μL/支 × 16
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号：940-001176-00	DNA Clean Beads	 白色	3.2 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	3.2 mL/支 × 1

表 52 单 Barcode MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂盒组合 2 (96 RXN)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 货号: 940-000883-00	Fast FS Buffer II	 绿色	1440 μL/支 × 1
	Fast FS Enzyme II	 绿色	660 μL/支 × 1
	Fast Ligation Buffer	 红色	1440 μL/支 × 3
	Ad Ligase	 红色	600 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	 棕色	360 μL/支 × 1
	20x Elute Enhancer	 黑色	25 μL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	4 mL/支 × 2
MGIEasy PF Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000013461	DNA Adapters-96 plate	-	5 μL × 96
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001174-00	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支 × 1



### 5.3.2 单 Barcode 文库适配测序平台

已构建好的文库可搭配 MGIEasy 环化试剂盒（货号：1000005259，需自备）进行环化，成为环状文库再进行 DNB 制备；或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-SB，货号：940-000035-00，需自备）进行快速 DNB 制备。可根据后续方案选择合适的测序平台及测序类型，具体推荐见下表。

表 53 测序平台及测序类型推荐

试剂盒选择	测序平台及测序类型推荐	推荐应用场景
MGIEasy 环化试剂盒	MGISEQ-2000RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T7RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T10x4RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T20x2RS (PE100)	人（血液、唾液、口腔拭子）、动物、植物、微生物等类型样本
	MGISEQ-200RS (PE100)	简单基因组（扩增子 DNA 片段，微生物等类型样本）
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0	MGISEQ-2000RS (PE100/PE150) DNBSEQ-T7RS (PE100)	人（血液、唾液、口腔拭子）、动物、植物、微生物等类型样本
	DNBSEQ-E25RS (SE100)	简单基因组（扩增子 DNA 片段，微生物等类型样本）

### 5.3.3 单 Barcode 文库构建流程

单 Barcode 构建文库流程如下：

25 ~ 900 ng gDNA 经过打断修复，打断产物纯化（单、双选），接头连接，纯化后可得到连接产物文库。已构建好的文库可搭配 MGIEasy 环化试剂盒（货号：1000005259，需自备）进行环化，成为环状文库再进行 DNB 制备；或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-SB，货号：940-000035-00，需自备）进行快速 DNB 制备。具体参考下表进行不同方案选择：

表 54 方案一：搭配 MGIEasy 环化试剂盒(货号：1000005259)

gDNA 总量 (N ng)	推荐 gDNA 起始量 (ng)	打断产物纯化方法
$200 \leq N \leq 500$	200 ~ 500（全部投入）	磁珠单选
$200 < N < 900$	500	磁珠单选
$N \geq 900$	900	磁珠双选



-  提示
- 单选文库的插入片段较双选片选文库弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低，不推荐将单选文库和双选文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 200 ng 时建库，ssCir 文库产量存在偏低风险，通常不足以单独上机 1 次，需与其他 Fast PCR-free 文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 900 ng 时建库，若进行磁珠双选建库，其文库产量存在偏低风险。

表 55 方案二：搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0(货号：940-000035-00)

gDNA 总量 (N ng)	推荐 gDNA 起始量 (ng)	打断产物纯化方法
$25 \leq N \leq 200$	25 ~ 200 (全部投入)	磁珠单选
$200 < N < 500$	200	磁珠单选
$N \geq 500$	500	磁珠双选

-  提示
- 单选文库的插入片段较双选片选文库弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低，不推荐将单选文库和双选文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 50 ng 时建库，文库产量存在偏低风险，通常不足以单独上机1次，需与其他 Fast PCR-free 文库混合测序。
  - gDNA 起始量 < 500 ng 时建库，若进行磁珠双选建库，其文库产量存在偏低风险。

#### ● 单 Barcode建库使用说明-操作如下：

##### 1. 试剂配制

同第 12 页“试剂配制”。

##### 2. 基因组DNA酶切打断

同第 13 页“DNA 酶切打断”。

##### 3. 打断产物片段筛选磁珠


参考第 16 页“打断产物片段筛选”：

- 若选择磁珠单选进行纯化，参考：3.3.1 磁珠单选（方案一），其中 3.3.1.2 节步骤 5，更改为：将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **45  $\mu$ L En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀后瞬时离心。其他操作不变。
- 若选择磁珠双选进行纯化，参考：3.3.2 磁珠双选（方案二），其中 3.3.2.2 节步骤 8，更改为：将 PCR 管从磁力架上取下，加入 **45  $\mu$ L En-TE** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀后瞬时离心，其他操作不变。

##### 4. 接头连接

 提示 单barcode接头不用稀释，即不同 gDNA 起始量文库构建，接头用量统一为 5  $\mu$ L。

参考第 19 页“接头连接”。其中 3.4.2 节步骤 2，更改为：吸取 **5  $\mu$ L Adapter** 至对应的样本管中（3.3.1.2 节步骤 5 或 3.3.2.2 步骤 8 产物，体积 45  $\mu$ L），涡旋混匀 3 次，每次 3 sec，瞬时离心后置于冰上。其他操作不变。

 提示 接头类型有所不同，单 Barcode 接头试剂盒为 MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒（货号：1000013460，需自备）或 MGIEasy PF Adapters-96（板式）试剂盒（货号：1000013461，需自备）。

##### 5. 连接产物纯化

 提示 不同 gDNA 起始量文库构建的连接产物纯化操作一样。

参考第 20 页“连接产物纯化”。其中 3.5.2 节步骤 1 和步骤 2 需按如下更改：

- 3.5.2 节步骤 1，更改为：吸取 **15  $\mu$ L En-TE** 至各样本管中（3.4.2 节步骤 6，体积 80  $\mu$ L）。其他操作不变。
- 3.5.2 节步骤 2，更改为：将 En-Beads 充分涡旋混匀，加入 **35  $\mu$ L En-Beads** 至各样本管中，涡旋混匀。其他操作不变。

##### 6. 连接产物质检

同第 21 页“连接产物质检”。

- **单 Barcode 文库制备 DNB 使用操作如下：**

- 1. 常规环化 DNB 制备（可选）**

由 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备模块 V2.0 构建好的文库，可搭配 MGIEasy 环化试剂盒（货号：1000005259）进行环化文库制备，形成环状文库后使用测序试剂盒中自带试剂制备为 DNB。参考第 22 页“常规环化及 DNB 制备（可选）”。除所使用的环化试剂盒发生改变，其余操作不变。

- 2. DNBSEQ一步法 DNB制备V2.0（可选）**

由 MGIEasy Fast PCR-FREE 酶切文库制备试剂套装所构建好的文库，可搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-SB，货号：940-000035-00），进行快速 DNB 制备。参考第 27 页“搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 制备 DNB（可选）”。除使用的 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 试剂盒发生改变，其余操作不变。