

MGI Easy

Pa-SNPs 分型试剂盒使用说明书

货号：1000016270 (96 RXN)

试剂盒版本号：V1.0

说明书版本号：A2

版本历史

说明书版本	试剂盒版本	修订日期	修订内容摘要
A2	V1.0	2021年 1月	<ul style="list-style-type: none"> 更新公司联系信息
A1	V1.0	2020年 7月	<ul style="list-style-type: none"> 变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”
A0	V1.0	2019年 10月	<ul style="list-style-type: none"> 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.mgi-tech.com/download/files

目录

第一章 产品信息.....	1
1.1 产品描述.....	1
1.2 适用范围.....	1
1.3 适配测序平台.....	1
1.4 试剂盒组分.....	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期.....	2
1.6 客户自备物料清单.....	3
1.7 注意事项.....	4
第二章 样本要求及处理.....	5
2.1 样本要求.....	5
2.2 样本的保存和运输.....	5
第三章 文库构建标准流程.....	6
3.1 第一轮 PCR 反应.....	6
3.2 第一轮 PCR 产物纯化.....	7
3.3 第二轮 PCR 反应.....	7
3.4 第二轮 PCR 产物纯化.....	8
3.5 第二轮 PCR 产物质检.....	9
3.6 变性.....	10
3.7 单链环化.....	10
3.8 酶切消化.....	11
3.9 酶切消化产物纯化.....	11
3.10 酶切消化产物质检.....	12
第四章 测序.....	13
附录.....	14
附录 A 关于磁珠及纯化.....	14
附录 B 关于 PCR Barcode Primer Mix (01-96)的使用.....	15

第一章 产品信息

1.1 产品描述

“MGIEasy Pa-SNPs分型试剂盒”是基于华大智造（MGI）高通量测序平台定制化打造的多重PCR扩增试剂盒。本试剂盒采用两步PCR法，能够在同一管内完成2010个高频核苷酸多态性位点（SNP）的扩增，适用于不同类型样本的基因组DNA以及血浆游离DNA样本进行多重PCR操作，将DNA制备成兼容华大智造测序平台矩阵式纳米芯片的单链环状DNA文库，通过高通量测序得到样本的SNP分型数据。试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库制备的稳定性和重复性。

1.2 适用范围

本试剂盒适用对血浆游离DNA (cfDNA)和血细胞、组织、干血片、唾液、口腔拭子、精液、毛发和指甲等样本来源的基因组DNA (gDNA)进行操作。

1.3 适配测序平台

构建的文库可用于以下高通量测序试剂盒的“SE50”测序：

MGISEQ-2000RS

MGISEQ-200RS

BGISEQ-500RS

1.4 试剂盒组分

MGIEasy Pa-SNPs分型试剂盒为96 RXN，每个试剂盒包含3个独立包装盒，其货号、组分信息如下：

表 1 MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (96 RXN) (货号: 1000016270)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (Box1)	PCR Primer Pool	蓝色	384 μL /支 \times 1 支
	PCR Primer A	蓝色	192 μL /支 \times 1 支
	PCR Enzyme Mix	白色	4800 μL /瓶 \times 1 瓶
	PCR Clean Enzyme	蓝色	96 μL /支 \times 1 支
	PCR Additive	蓝色	96 μL /支 \times 1 支
	Splint Buffer	紫色	186 μL /支 \times 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μL /支 \times 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 μL /支 \times 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 μL /支 \times 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 μL /支 \times 1 支
	MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (Box2)	PCR Barcode Primer Mix (01-96)	/
DNA Clean Beads		白色	4960 μL /支 \times 3 支
MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (Box 3)	Short Fragment ssDNA Clean Beads	白色	1440 μL /支 \times 1 支
	Elution Buffer	白色	4800 μL /支 \times 2 支

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (Box 1)

- 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (Box 2)

- 储存温度: $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签

- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy Pa-SNPs 分型试剂盒 V1.0 (Box 3)

- 储存温度: 2°C ~8°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 冰袋运输

*干冰运输, 请注意检查收到产品时是否有干冰剩余。

*当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性。

1.6 客户自备物料清单

表 2 客户自备物料清单

设备	漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 96 孔板磁力架 (ALPAQUA, Part#A00400) 1.5 mL 管磁力架 (Thermo Fisher, Cat. No. 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (Thermo Fisher, Cat. No. Q33216) Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA) 或同等 功能仪器
试剂	Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 1x TE buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) 无水乙醇 (分析纯) Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212) Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854) DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-1504) 或同等功能仪器配套的分析试 剂
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) Qubit® Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或 0.5mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C)

1.7 注意事项

- 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 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。
- 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。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。



注意：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、PCR1 产物纯化区和 PCR2 产物纯化检测区进行物理隔离；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。

- 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。
- 若您有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

第二章 样本要求及处理

2.1 样本要求

2.1.1 DNA 类型

本试剂盒适用于多种类型样本提取的DNA，包括血浆、血细胞、血斑、唾液、口腔拭子、精液、毛发和指甲等样本DNA。

2.1.2 DNA 起始量

DNA: 投入体积 $\leq 20.5 \mu\text{L}$ ，推荐样本浓度 $\geq 0.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (采用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 进行定量)，投入总量 8–20 ng。如果是血浆样本，推荐起始提取体积为 1mL。



注意：对于血浆样本，推荐提取 cfDNA 的血浆投入量 $\geq 1 \text{ mL}$ ，更低投入量可能导致建库失败或不可靠的测序数据。

2.2 样本的保存和运输

血浆样本在干冰条件下运输，置于 -70°C 以下冰箱中保存，避免反复冻融。其它类型样本，置于 -20°C 冰箱中保存。

第三章 文库构建标准流程

样本 DNA 通过两轮 PCR 扩增和 PCR 产物单链环化、酶切消化、纯化及质检完成文库制备。

3.1 第一轮 PCR 反应

- 3.1.1 根据样本浓度，取 8–20 ng cfDNA 或 gDNA 至新的 0.2 mL PCR 管，用 Elution Buffer 补充至总体积 20.5 μL 。
- 3.1.2 根据所需反应数，按照表 3 配方在冰上配制第一轮 PCR 反应液。

表 3 第一轮 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Clean Enzyme	0.5 μL
PCR Primer Pool	4 μL
Total	29.5 μL



注意：PCR Primer Pool 使用前务必充分混匀，涡旋震荡 5–6 次，每次 3–5 s。

- 3.1.3 用移液器吸取 29.5 μL 配制好的第一轮 PCR 反应液加入步骤 3.1.1 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3s，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.1.4 将步骤 3.1.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 4 中的条件进行反应。

表 4 第一轮 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
37°C	5 min	1 循环
95°C	10 min	
95°C	15 s	
60°C	5 min	12 循环*
72°C	30 s	
72°C	2 min	1 循环
4°C	Hold	

*若 DNA 投入量低于推荐量，可根据实际情况增加 1–2 个循环数

- 3.1.5 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 EP 管中。


3.2 第一轮 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。


- 3.2.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 3.2.2 用移液器吸取 80 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.1.5 中的 PCR 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。
- 3.2.3 室温孵育 5 min。
- 3.2.4 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。
- 3.2.5 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，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.2.6 重复步骤 3.2.5，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，置于磁力架上，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.2.7 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。
- 3.2.8 将离心管从磁力架上取下，加入 18 μL Elution 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。
- 3.2.9 室温下孵育 5 min。
- 3.2.10 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 16.5 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

 **停止点：**第一轮 PCR 产物纯化后可置 -20°C 冰箱储存。

3.3 第二轮 PCR 反应

 **注意：**操作前请仔细阅读附录 B 关于 PCR Barcode Primer Mix 使用。

- 3.3.1 用移液器吸取 5 μL 对应的 PCR Barcode Primer Mix 加入步骤 3.2.10 的 PCR 管中，并记录对应的 Barcode 信息。

 **注意：**PCR Barcode Primer Mix 有 96 种，每一种都含有一种不同的 Barcode。然后根据不同测序策略混合文库，建议最终混合后的文库保证含有至少一套 Barcode，具体使用规则详见附录 B。

- 3.3.2 根据所需反应数，按照表 5 配方在冰上配制 PCR 反应液。

表 5 第二轮 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Clean Enzyme	0.5 μL
PCR Additive	1 μL
PCR Primer A	2 μL
Total	28.5 μL



注意：PCR Primer A 使用前务必充分混匀，涡旋震荡 5-6 次，每次 3-5 s。

- 3.3.3 用移液器吸取 28.5 μL 配制好的第二轮 PCR 反应液加入步骤 3.3.1 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.3.4 将步骤 3.3.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 6 的条件进行 PCR 反应。

表 6 第二轮 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
37°C	5 min	1 循环
95°C	10 min	
95°C	15 s	
60°C	2 min	16 循环
72°C	30 s	
72°C	2 min	1 循环
4°C	Hold	

- 3.3.5 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。

3.4 第二轮 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。

- 3.4.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。
- 3.4.2 吸取 75 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.3.5 的 50 μL 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。
- 3.4.3 室温孵育 5 min。
- 3.4.4 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。

- 3.4.5 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，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
- 3.4.6 重复步骤 3.4.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，置于磁力架上，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.4.7 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。
- 3.4.8 将离心管从磁力架上取下，加入 25 μL Elution Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.4.9 室温下孵育 5 min。
- 3.4.10 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 23 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ **停止点：第二轮 PCR 纯化后产物可置 -20°C 冰箱储存。**

3.5 第二轮 PCR 产物质检

- 3.5.1 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 产物的浓度 $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。
- 3.5.2 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，PCR 纯化产物片段分布范围应在 140~180 bp，主带分布范围应在 $165 \pm 10 \text{ bp}$ 。

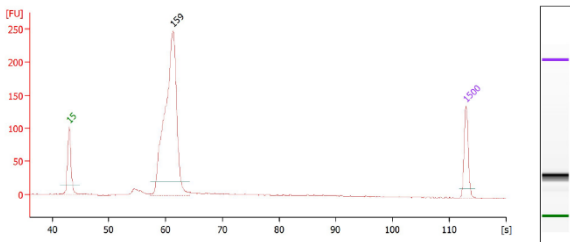


图 1 标准实验流程 PCR2 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.5.3 文库质检合格后，根据实际情况制定混合方案，文库混合后总量为 250 ng，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$ 。



例如：N 个样本文库进行混合，每个样本文库需要相同测序数据量，则将所有文库等质量混合，单个文库取样量 $(\text{ng}) = 250 \text{ ng}/N$ ，单个文库取样体积 $(\mu\text{L}) = \text{单个文库取样量}(\text{ng}) / \text{单个文库的浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})$ 。

3.6 变性

3.6.1 取 250 ng 混合的 PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 $48 \mu\text{L}$ 。

3.6.2 将步骤 3.6.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 7 的条件进行反应。

表 7 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	3 min
95°C	Hold

3.6.3 反应结束后，立即将步骤 3.6.2 所述 PCR 管置于冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

3.7 单链环化

3.7.1 根据反应数，按照表 8 的配方在冰上配制单链环化反应液。

表 8 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Splint Buffer	11.5 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12 μL

3.7.2 用移液器吸取 12 μL 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.6.3 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.7.3 将步骤 3.7.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 9 的条件进行反应。

表 9 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.7.4 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。

3.8 酶切消化

3.8.1 在步骤 3.7.3 反应时，提前按照表 10 的配方在冰上配制酶切消化反应液。

表 10 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

3.8.2 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.7.4 的 PCR 管中，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.8.3 将步骤 3.8.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 11 的条件进行反应。

表 11 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.8.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.8.5 立即向 PCR 管中加入 7.5 μL Digestion Stop Buffer，涡旋振荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底，吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

3.9 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。**

3.9.1 提前 30 min 取出 Short Fragment ssDNA Clean Beads 置于室温，使用前充分振荡混匀。

3.9.2 吸取 90 μL Short Fragment ssDNA Clean Beads 至步骤 3.8.5 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。

3.9.3 室温孵育 10 min。

3.9.4 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。

3.9.5 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，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。

3.9.6 重复步骤 3.9.5，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，置于磁力架上，

用小量程的移液器将管底液体吸干。

- 3.9.7 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。
- 3.9.8 将离心管从磁力架上取下，加入 22 μL Elution 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。
- 3.9.9 室温下孵育 10 min。
- 3.9.10 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°C 冰箱储存。**

3.10 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) ≥ 10 ng。

第四章 测序

取5 ng步骤3.10酶切消化产物，用Elution Buffer补充至总体积20 μ L，并根据具体需求选择合适的测序类型进行上机，推荐使用以下套装：

- 在 MGISEQ-2000RS 基因测序仪，使用 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装(SE50)(货号：1000012551) 进行测序；
- 在 MGISEQ-200RS 基因测序仪，使用 MGISEQ-200RS 高通量测序试剂套装 (SE50)(货号：1000004635) 进行测序。
- 在 BGISEQ-500RS 基因测序仪，使用 BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装 (SE50)(货号：1000002072) 进行测序；



注意：测序前请仔细阅读对应的说明书，并严格按照说明书的内容进行操作。

附录

附录 A 关于磁珠及纯化

本试剂盒推荐使用包装内的 DNA Clean Beads 或 Short Fragment ssDNA Clean Beads 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，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 μL 。
- 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1.5 mL离心管中下段，然后开盖。

附录 B 关于 PCR Barcode Primer Mix (01-96)的使用

- 本试剂盒提供1板PCR Barcode Primer Mix (01-96)，为 96孔板式规格。每一种PCR Barcode Primer Mix含有一种对应的Barcode。Barcode是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，挑选的最佳Barcode组合。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录B的使用规则。
- 请勿将其置于室温以上的温度，否则易发生降解，影响使用效果。
- 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于板底，用吸水纸擦拭干净铝箔膜表面；第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝箔膜直接吸取液体，使用过程中注意更换吸头，避免污染，使用完毕后，刺破孔位的剩余试剂需逐一转移到离心管中，做好标记，-20°C保存。

PCR Barcode Primer Mix 使用规则

PCR Barcode Primer Mix 分布图如图 2 所示。基于碱基平衡的设计原则，需将 PCR Barcode Primer Mix 成组使用，试剂盒中包含的 PCR Barcode Primer Mix 具备如下的分组规则：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	02	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	03	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	04	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	05	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	06	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	07	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

图 2 PCR Barcode Primer Mix 分布图及成组规则

4个PCR Barcode Primer Mix成组：01-04、05-08、09-12、13-16，共计4组；

8个PCR Barcode Primer Mix成组：17-24、25-32、33-40、41-48、49-56、57-64、65-72、73-80、81-88和89-96共计10组；

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考表 12 的推荐 Barcode 组合方案。

表 12 PCR Barcode Primer Mix 使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	需至少使用 1 组 PCR Barcode Primer Mix： 1、加一组 4 PCR Barcode Primer Mix（如 01-04），将 4 个 PCR Barcode Primer Mix 取等

	<p>体积混合成 mix 后加入样本中；</p> <p>或 2、加一组 8 PCR Barcode Primer Mix (如 17-24)，将 8 个 PCR Barcode Primer Mix 取等体积混合成 mix 后加入样本中。</p>
2	<p>需至少使用 1 组 PCR Barcode Primer Mix:</p> <p>1、加一组 4 PCR Barcode Primer Mix (如 01-04)，每个编号 PCR Barcode Primer Mix 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)；</p> <p>或 2、加一组 8 PCR Barcode Primer Mix (如 17-24)，每个编号 PCR Barcode Primer Mix 取等体积，每 4 个编号 PCR Barcode Primer Mix 混合成 1 份 mix，形成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中 (如 41-48，将 41-44 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 21-24 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中)。</p>
3	<p>需至少使用 2 组 PCR Barcode Primer Mix:</p> <p>样本 1、2 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix，样本 3 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix，注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 PCR Barcode Primer Mix。</p>
4	<p>需至少使用 1 组 PCR Barcode Primer Mix:</p> <p>1、加一组 4 PCR Barcode Primer Mix (如 01-04)，每个编号 PCR Barcode Primer Mix 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)；</p> <p>或 2、加一组 8 PCR Barcode Primer Mix (如 17-24)，每个编号 PCR Barcode Primer Mix 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 17-24，将 17-18、19-20、21-22、23-24 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)。</p>
5	<p>需至少使用 2 组 PCR Barcode Primer Mix:</p> <p>样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix，样本 5 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix，注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 PCR Barcode Primer Mix。</p>
6	<p>需至少使用 2 组 PCR Barcode Primer Mix:</p> <p>样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix，样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix，注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 PCR Barcode Primer Mix。</p>
7	<p>需使用全部 3 组 PCR Barcode Primer Mix，分三步操作:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 PCR Barcode Primer Mix; 2. 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 PCR Barcode Primer Mix; 3. 样本 7 使用一组 PCR Barcode Primer Mix，可以加该组内一个单 PCR Barcode Primer

	<p>Mix, 或者加组内所有编号 PCR Barcode Primer Mix 取等体积混合成的 PCR Barcode Primer Mix mix。</p> <p>注意样本 1~4、样本 5~6、样本 7 需使用不同组别的 PCR Barcode Primer Mix。</p>
8	<p>需至少使用 1 组 PCR Barcode Primer Mix:</p> <p>加一组 8 PCR Barcode Primer Mix (如 89~96), 每个编号 PCR Barcode Primer Mix 取等体积, 分别加入每个样本。</p>
$8n+x$ $(1 \leq n < 11,$ $x=1-8,$ 总 计 9~96 个)	<p>1. 样本 $8n+x$, 每 8 个样本分为一组, 采用上述 (8 样本数/lane) 方法加 PCR Barcode Primer Mix; 未成组样本根据 x 的数值, 各加入一个单 PCR Barcode Primer Mix, 或者采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 PCR Barcode Primer Mix, 并注意按照对应要求加不同组别的 PCR Barcode Primer Mix</p> <p>注意: 上述每组样本间需使用不同组别的 PCR Barcode Primer Mix</p>

联系我们

生产企业：深圳华大智造科技股份有限公司

生产地址：深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼

客服电话：4000-966-988

技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

网 址：www.mgi-tech.com



官方微信