

MGIEasy

全基因组甲基化文库制备试剂盒说明书

货号：1000005251（16 RXN）

试剂盒版本号：V2.0

说明书版本号：B2

版本历史

说明书版本	试剂盒版本	修订日期	修订内容摘要
B2	V2.0	2021年 1月	<ul style="list-style-type: none"> 更新公司联系信息
B1	V2.0	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” 更新说明书风格
B0	V2.0	2019年 11月	<ul style="list-style-type: none"> 试剂盒升级为 V2.0, 说明书升版为 B0; 将 ERAT 的未修改为 ER 和 AT 两步, 并且在中间加入淬灭的过程; 将单链环化的过程全部更改为升级后双链环化的过程; 升级后只推荐 DNB pooling, 并提供 WGBS Make DNB 的特别说明和 Pooling 指导。
A1	V1.0	2018年 8月	<ul style="list-style-type: none"> 更新货号; 修改 1.4 WGBS Adapter 用量; 增加 2.1 样本浓度要求; 详细描述 3.3 和 3.4 操作; 删除原附录 D:QIAquick PCR Purification Kit 说明书; 删除表 21 摩尔比, 修改稀释倍数的描述; 修改 1.7.3 和第四章的 pooling 方式; 更新表 18 单链环的质量; 修改表 1,6,14 连接酶的表述。
A0	V1.0	2018年 6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 试剂盒存储条件及有效期.....	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 DNA 打断方法和片段筛选.....	5
2.3 样本 DNA 的定量和质控.....	6
第三章 文库构建标准流程	7
3.1 末端修复&添加 dA 尾.....	7
3.2 接头连接.....	8
3.3 连接产物纯化.....	9
3.4 Bisulfite 处理和纯化.....	10
3.5 PCR 扩增.....	12
3.6 PCR 产物纯化.....	13
3.7 PCR 产物质检.....	13
3.8 双链酶切.....	14
3.9 双链环化.....	15
3.10 双链环化产物纯化.....	16
第四章 DNB 制备与测序注意事项	17
4.1 WGBS 与 WGS 文库 pooling.....	17
4.2 WGBS DNB 的制备.....	17
4.3 DNB 的加载.....	18
附录	19
附录 A 打断条件.....	19
附录 B 关于磁珠及纯化.....	21

附录 C 磁珠片段筛选步骤	22
附录 D 关于 WGBS Adapter 使用	23
附录 E 关于接头连接和 PCR 反应	26
附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算	26

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 全基因组甲基化文库制备试剂盒是针对华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的全基因组甲基化文库 (WGBS文库) 制备试剂盒。本试剂盒可以将10~100 ng 片段化DNA制备成MGI高通量测序平台专用的文库。本试剂盒由高质量的酶学组成, 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。

1.2 适用范围

本试剂盒为通用试剂盒, 适用于参考基因组完整的动物、植物、真菌等物种, 包括人、拟南芥、酵母等。不同物种均有稳定的表现。

1.3 适配测序平台

构建的文库可使用以下平台及测序类型测序:

MGISEQ-2000RS (PE100)

BGISEQ-500RS (PE100)

1.4 试剂盒组分

MGIEasy 全基因组甲基化文库制备试剂盒规格为16 RXN, 其货号 and 组分信息如下 (见表1):

表 1 MGI Easy 全基因组甲基化文库制备试剂盒 (16 RXN)

试剂盒名称和货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGI Easy 全基因组 甲基化文库制备试剂 盒 货号: 1000005251	Lambda DNA	黄色	18 μ L/支 \times 1 支
	ER Buffer Mix	橙色	117 μ L/支 \times 1 支
	ER Enzyme Mix	橙色	44 μ L/支 \times 1 支
	ER Stop Buffer	白色	100 μ L/支 \times 1 支
	AT Buffer Mix	橙色	65 μ L/支 \times 1 支
	AT Enzyme Mix	橙色	4 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Buffer Mix	红色	375 μ L/支 \times 1 支
	DNA Ligase	红色	26 μ L/支 \times 1 支
	WGBS Adapter Mix (16 barcode)	无色	5 μ L/支 \times 16 支
	WGBS PCR Enzyme Mix	蓝色	400 μ L/支 \times 1 支
	PCR Primer Mix	蓝色	80 μ L/支 \times 1 支
	DS Digestion Buffer	紫色	150 μ L/支 \times 1 支
	DS Digestion Enzyme Mix	紫色	16 μ L/支 \times 1 支
	DS Ligation Buffer	紫色	800 μ L/支 \times 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支
	WGBS Make DNB Buffer	白色	320 μ L/支 \times 1 支



注意: Lambda DNA 浓度为 200 ng/ μ L。

1.5 试剂盒存储条件及有效期

- 储存温度: -25°C -- -15°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 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

<p>仪器</p>	<p>Covaris 打断仪 漩涡混匀仪 高速离心机 (Eppendorf) 小型离心机 移液器 PCR 仪 磁架架 (ThermoFisher, Cat. No. 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216) 琼脂糖凝胶电泳设备或 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA)</p>
<p>试剂</p>	<p>Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) TE Buffer, pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858) 无水乙醇, 100% 乙醇 (分析纯) AMPure XP beads (Agencourt, Cat. No. A63882) QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Cat. No. 28104/28106) EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Cat. No. D5005/D5006) 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) 安捷伦 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-1504)</p>
<p>耗材</p>	<p>Covaris 打断管 移液器吸头 1.5 mL EP 管, Non-stick RNase-Free, 1.5 mL Microfuge Tubes (Ambion, Cat. No. AM12450) 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)</p>

1.7 注意事项

1.7.1 通用注意事项

- 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，以优化性能和效率。
- 将需要使用的组分提前取出，将Enzyme瞬时离心后置于冰上待用；其他组分于室温解冻，解冻后涡旋振荡3次，每次3s，瞬时离心后置于冰上待用。
- 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打至少十次混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出降低。
- 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产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，PCR反应体系配制区和PCR产物纯化检测区需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。
- 若您有其他疑问，请联系MGI技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

1.7.2 片段大小注意事项

- 本试剂盒标准流程适用于250 bp主带的建库。若采用其他插入片段主带大小，双选条件可见表3。
- 测序时，随着片段增大，测序质量可能会略微下降。应尽可能保证DNA片段集中度，DNA片段越集中，测序质量越好；反之，测序质量会有所下降。



注意：不同长度的 DNA 文库不建议在任何阶段 pooling 和测序。

第二章 样本要求及处理

2.1 样本要求

本试剂盒为通用试剂盒，用于参考基因组数据库完整的动物、植物、真菌等物种提取的基因组DNA进行文库制备，适用物种包括人、拟南芥、酵母等。同时适用于人的FFPE样本。本试剂盒推荐使用的样本DNA为片段化的DNA，投入量为10-100 ng，总体积小于30 μ L(如果需要加入Lambda DNA，请根据实际情况计算)。

2.1.1 基因组 DNA

- 样本 DNA 指物理打断和片段筛选后的 DNA，本试剂盒兼容该样本 DNA 量范围为 10-100 ng，用于打断的相应质量的基因组 DNA 体积不得超过 Covaris 打断体系的体积（附录 A）。
- Nanodrop 检测： $A_{260}/A_{280}=1.8 \sim 2.0$ ， $A_{260}/A_{230}>2.0$ 的高质量 gDNA；
- 琼脂糖凝胶电泳检测：主带>23 Kb，无拖尾的无降解 DNA 或者轻微拖尾的轻微降解 DNA。DNA 质量会显著影响建库和测序质量。
- DNA 样本无 RNA 污染；DNA 提取过程若引入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复的效率。

2.1.2 FFPE 样本

- 样本DNA指物理打断和片段筛选后的FFPE DNA，本试剂盒兼容该样本DNA量范围为10-100 ng，相应质量的DNA体积不得超过Covaris打断体系的体积（附录A）。
- 琼脂糖凝胶电泳检测：主带>23 Kb或者轻微降解FFPE DNA；对完全降解的FFPE DNA打断建库，可能带来低于标准的建库产量。
- DNA样本本应无RNA污染；DNA提取过程若引入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复的效率。

2.2 DNA 打断方法和片段筛选

2.2.1 打断

- 采用Covaris打断仪和说明书推荐的打断条件，将基因组/FFPE DNA打断至100-700 bp之间，主带250 bp，参考附录A。
- 若需要Covaris打断仪的其他物理打断条件，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，确定最适打断条件后，方可正式开始打断。
- 如需评估文库C至T的转化率，需要对Lambda DNA按照样本同等条件打断和双选，并在样本末端修

复体系中掺入样本量1/50的双选Lambda DNA开始建库。如：末端修复投入样本50 ng，需掺入双选后的 Lambda DNA 1 ng；末端修复投入样本20 ng，需掺入双选后的 Lambda DNA 0.4 ng。



注意：试剂盒组分中的 Lambda DNA 浓度为 200 ng/ μ L。

2.2.2 片段筛选

- 打断后DNA分布范围较宽，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（见表3）。
- 磁珠片段筛选是通过控制磁珠的使用量来进行DNA长度选择的。磁珠使用量直接影响可纯化的DNA长度下限。磁珠体积/待纯化样品体积=磁珠乘数（ \times ），乘数越高，纯化得到的DNA下限片段越短；反之，则越长。磁珠片段筛选基本原理为：第一轮磁珠结合分子量较大的DNA，通过丢弃磁珠去除这部分产物；第二轮磁珠结合剩余产物中分子量较大的DNA，通过丢弃上清去除分子量较小的DNA。最后通过洗脱第二轮磁珠，回收目标大小的DNA片段。

表 3 不同磁珠乘数片段筛选理论 DNA 主带

主带片段 (bp)	180	230	250	300	350
第一轮 (\times)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6
第二轮 (\times)	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2

- 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。
- 本试剂盒推荐 $0.8 \times + 0.2 \times$ 双选条件对基因组/FFPE DNA打断后的产物进行片段筛选，获得250 bp主带的片段化DNA，取10-100 ng产物从3.1所述步骤开始建库。

2.3 样本 DNA 的定量和质控

- 样本DNA指投入末端修复步骤中的DNA量。对于需要打断和片段筛选的样本片段筛选后应采用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit或Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit等双链DNA荧光定量试剂盒标定浓度，本试剂盒兼容样本 DNA量范围为10-100 ng。
- 本试剂盒片段筛选条件支持一定长度的片段主带（见表3）。测序时，随着片段增大，测序质量可能会略微下降。请根据测序类型选择插入片段进行建库，PE 100测序推荐的片段主带在250 bp左右。注意：不同长度的样本 DNA不建议混合测序。
- 若样本 DNA制备过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响末端修复步骤的效率。

第三章 文库构建标准流程

3.1 末端修复&添加 dA 尾



注意：操作前请仔细阅读**注意事项**和**2.1 样本要求**。如需评估文库 C 至 T 的转化率，步骤 3.1.1 取 20 ng 样本至新的 0.2 mL PCR 管后，加入 0.4 ng 同等片段大小的 Lambda DNA (见 2.2.1)，用 TE Buffer 补充至总体积 30 μ L，进行 3.1.2 和后续步骤。

该文库构建标准流程以 20 ng，250 bp 主带的样本 DNA 为例。

3.1.1 根据样本 DNA 浓度，取适量样本（推荐 20 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，用 TE Buffer 补充至总体积 30 μ L。

3.1.2 在冰上配制末端修复 ER 反应液（见表 4）：

表 4 末端修复 ER 反应液的配制

组分	一个反应标准量
ER Buffer Mix	7.3 μ L
ER Enzyme Mix	2.7 μ L
Total	10 μ L

3.1.3 用移液器吸取 10 μ L 配制好的末端修复反应液加入步骤 3.1.1 的 0.2 mL 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 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上，按照末端修复反应条件进行反应（见表 5）：

表 5 末端修复 ER 反应条件

温度	时间
热盖	On
25°C	30 min
4°C	Hold

3.1.5 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.6 用移液器吸取 6 μ L ER Stop Buffer 加入到 3.1.5 的 0.2 mL 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，静置 2 分钟。

3.1.7 将步骤 3.1.6 所述 0.2 mL PCR 管置于提前预热至 75°C 的 PCR 仪上，按照末端修复终止反应条件进行反应（见表 6）：

表 6 末端修复终止反应条件

温度	时间
热盖	On
75°C	20 min
4°C	Hold

3.1.8 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.9 在冰上配制末端修复 AT 反应液（见表 7）：

表 7 末端修复 AT 反应液的配制

组分	一个反应标准量
AT Buffer Mix	3.8 μ L
AT Enzyme Mix	0.2 μ L
Total	4 μ L

3.1.10 用移液器吸取 4 μ L 配制好的末端修复反应液加入步骤 3.1.8 的 0.2 mL 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。

3.1.11 将步骤 3.1.10 所述 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上，按照末端修复反应条件进行反应（见表 8）：

表 8 末端修复 AT 反应条件

温度	时间
热盖	On
65°C	15 min
4°C	Hold

3.1.12 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 和 E。

3.2.1 参照 WGBS Adapter（16 barcode）使用规则（见附录 D 关于 WGBS Adapter 使用），先按照 1: 4 的比例用 TE buffer 将对应的 WGBS Adapter 稀释（若起始建库使用的样本 DNA 量不同，对应的稀释倍数也不同，详见附录 D 表 4），然后在步骤 3.1.12 的 0.2 mL PCR 管中加入 5 μ L 稀释后的 WGBS Adapter，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 9）：

表 9 接头连接反应液的配制

组分	一个反应标准量
Ligation Buffer Mix	23.4 μ L
DNA Ligase	1.6 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 0.2 mL 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。

3.2.4 将步骤 3.2.3 所述 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上，按照接头连接反应条件进行反应（见表 10）：

表 10 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	40°C
23°C	30 min
4°C	Hold

3.2.5 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.6 将 80 μ L 产物转移到新的 1.5 mL EP 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：操作前请仔细阅读注意事项。推荐使用 QIAquick PCR Purification Kit 进行连接产物纯化，详细注意事项需参考官网说明书（<https://www.qiagen.com/cn/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/#resources>）。Buffer PE 使用前需按照瓶子标签所示加入正确体积的 96-100%乙醇，混匀，方可使用。该纯化在室温下进行（20°C~25°C）。

3.3.1 将 3.2.6 的接头连接产物转移到新的 1.5 mL 离心管中，再加入 5 倍体积（400 μ L）Buffer PB，涡旋震荡 6 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。


3.3.2 把 QIAquick column 放入 2 mL collection tube，将混合液转移至 QIAquick column，13000 rpm 离心 1 min，弃废液，将 QIAquick column 放回 collection tube。


3.3.3 向 QIAquick column 加入 750 μ L 已加入乙醇配制好的 Buffer PE，13000 rpm 离心 1 min，弃废液，将 QIAquick column 放回 collection tube。

3.3.4 13000 rpm 空转离心 1 min，弃废液。

3.3.5 将 QIAquick column 转移至新 1.5 mL EP 管中, 打开 QIAquick column 管盖, 室温干燥 2 min, 至 QIAquick column 内外壁无液滴。


3.3.6 缓慢在 QIAquick column 滤膜中央加入 21 μ L Buffer EB, 静置 1 min, 13000 rpm 离心 1 min, 纯化后的连接产物即被收集在 1.5 mL EP 管中。

 **注意: 不能用磁珠纯化或 MinElute PCR Purification Kit (纯化范围 70 bp-4 kb) 代替 QIAquick PCR Purification Kit (纯化范围 100 bp-10 kb)。**

 **注意: 建议 Buffer PB 中不加 pH Indicator I, 如果加, 请严格按照 QIAquick PCR Purification Kit 说明书使用 pH Indicator I。**

 **停止点: 连接产物纯化后, 可置-20°C 冰箱储存。**

3.4 Bisulfite 处理和纯化

 **注意: 操作前请仔细阅读注意事项。推荐使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 对接头连接产物进行 Bisulfite 处理和纯化, 详细注意事项需参考官网说明书 (<https://www.zymoresearch.eu/ez-dna-methylation-gold-kit>)。**

3.4.1 依次吸取 900 μ L NF water, 300 μ L M-Dilution Buffer 和 50 μ L M-Dissolving Buffer 到一管 CT Conversion Reagent 粉末 (开盖前需瞬时离心), 在室温下频繁涡旋震荡 10 min, 完成 CT Conversion Reagent 的配制。CT Conversion Reagent 应减少曝光, 最好现配现用。CT Conversion Reagent 在室温下可最多保存 1 d, 在 4°C 下可最多保存 1 周, 在-20°C 下可最多保存 1 个月, 非现配的 CT Conversion Reagent 使用前应预热到 37°C, 在室温下频繁涡旋震荡 10 min 方可使用。

3.4.2 M-Wash Buffer 第一次开盖使用前需按照瓶子标签所示加入正确体积的无水乙醇, 混匀, 方可使用。

3.4.3 在室温下, 将以下成分加入新的 0.2 mL PCR 管中 (见表 11), 其中 Lambda DNA 不需打断, 浓度为 200 ng/ μ L:

表 11 Bisulfite 处理反应液的配制

组分	一个反应标准量
CT Conversion Reagent	130 μ L
连接后纯化产物	19 μ L
Lambda DNA	1 μ L
Total	150 μ L

3.4.4 将步骤 3.4.3 所述 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上, 按照 Bisulfite 处理条件进行反应 (见表 12):

表 12 Bisulfite 处理反应条件

温度	时间
热盖	On
98°C	10 min
64°C	2.5 h
4°C	Hold

- ✓ 停止点:** Bisulfite 处理后未纯化的产物, 可置 4°C PCR 仪上过夜, 或置于 4°C 冰箱储存最多 24h。
- 3.4.5 将步骤 3.4.4 的反应产物转移到新的 1.5 mL EP 管中, 加入 600 μ L M-Binding Buffer, 涡旋震荡 6 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.4.6 把 Zymo-Spin™ IC Column 放入 2 mL Collection Tube, 将混合液转移至 Zymo-Spin™ IC Column 上, 13000 rpm 离心 30 s, 弃废液, 将 Zymo-Spin™ IC Column 放回 Collection Tube。
- 3.4.7 向 Zymo-Spin™ IC Column 加入 100 μ L M-Wash Buffer, 13000 rpm 离心 30 s。
- 3.4.8 向 Zymo-Spin™ IC Column 加入 200 μ L M-Desulphonation Buffer, 迅速盖紧管盖后, 室温孵育 15~20 min, 13000 rpm 离心 30 s, 弃废液, 将 Zymo-Spin™ IC Column 放回 Collection Tube。
- 3.4.9 向 Zymo-Spin™ IC Column 加入 200 μ L M-Wash Buffer, 13000 rpm 离心 30 s, 弃废液, 将 Zymo-Spin™ IC Column 放回 Collection Tube。
- 3.4.10 向 Zymo-Spin™ IC Column 加入 200 μ L M-Wash Buffer, 13000 rpm 离心 30 s, 弃废液, 将 Zymo-Spin™ IC Column 放回 Collection Tube。13000 rpm 空转离心 30 s, 弃 Collection Tube, 用移液器将 Zymo-Spin™ IC Column 外壁液体尽量吸干, 放在新的 1.5 mL EP 管中。
- 3.4.11 打开 Zymo-Spin™ IC Column 管盖, 室温干燥 2 min, 然后将 Zymo-Spin™ IC Column 放在另一新的 1.5 mL EP 管中。
- 3.4.12 缓慢在 Zymo-Spin™ IC Column 滤膜中央加入 10 μ L M-Elution Buffer, 静置 1 min, 13000 rpm 离心 30 s, 纯化后的 Bisulfite 处理后的纯化产物即被收集在 1.5 mL EP 管中。
- ⚠ 注意:** 3.4.6~3.4.12 步骤的离心配平不佳或者 3.4.10~3.4.11 干燥不完全, 极大可能造成建库的失败。
- ⚠ 注意:** 3.4.12 步骤得到的产物应小于 10 μ L, 否则建库很可能失败。
- ✓ 停止点:** Bisulfite 处理和纯化后的产物, 可置 -20°C 冰箱储存至多 24 h。

3.5 PCR 扩增



注意：操作前请仔细阅读附录 E。

3.5.1 取全部 Bisulfite 处理和纯化后产物于新的 0.2 mL PCR 管中，加入 NF water 将总体积补至 20 μ L。

3.5.2 在冰上配制 PCR 反应液（见表 13）：

表 13 PCR 反应液的配制

组分	一个反应标准量
WGBS PCR Enzyme Mix	25 μ L
PCR Primer Mix	5 μ L
Total	30 μ L

3.5.3 用移液器吸取 30 μ L 配制好的 PCR 反应液加入步骤 3.5.1 的 0.2 mL 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。

3.5.4 将步骤 3.5.3 所述 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上，按照 PCR 反应条件进行 PCR 反应（见表 14）：

表 14 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
95°C	2 min	1 循环
98°C	20 s	
62°C	20 s	13 循环
72°C	30 s	
72°C	3 min	1 循环
4°C	Hold	

3.5.5 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.5.6 吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL EP 管中。

3.6 PCR 产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 B。

- 3.6.1 提前 30 min 取出 AMPure® XP Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.6.2 吸取 50 μL (1.0 \times) AMPure® XP Beads 至步骤 3.5.6 的 50 μL PCR 产物中，用移液器轻轻吹打 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 1.5 mL EP 管中。
- 3.6.3 室温孵育 5 min。
- 3.6.4 瞬时离心，将 1.5 mL EP 管置于磁力架，静置 5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.6.5 保持 1.5 mL EP 管置于磁力架上，沿壁加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 3.6.6 重复步骤 3.6.5，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 1.5 mL EP 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。
- 3.6.7 保持 1.5 mL EP 管固定于磁力架上，打开 1.5 mL EP 管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.6.8 将 1.5 mL EP 管从磁力架上取下，加入 32 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打 10 次至完全混匀。
- 3.6.9 室温下孵育 5 min。
- 3.6.10 瞬时离心，将 1.5 mL EP 管置于磁力架上，静置 5 min 至液体澄清，将 30 μL 上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中。



停止点：PCR 纯化后产物，可置-20°C 冰箱储存。

3.7 PCR 产物质检

- 3.7.1 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 产物的摩尔产量 \geq 1 pmol，不同片段大小的 PCR 产物对应的产量见表 15。（计算方法参考附录 F）。
- 3.7.2 如需将多个样本 PCR 产物混合测序，建议根据 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案（见附录 D），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 μL 。

表 15 不同片段大小 PCR 产物 1 pmol 对应产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR 产物主片段大小 (bp)	1 pmol 对应产量 (ng)
180	264	170
230	314	210
250	334	220
300	384	250
350	434	280

3.7.3 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。标准实验流程 PCR 纯化后产物分布见图 1。

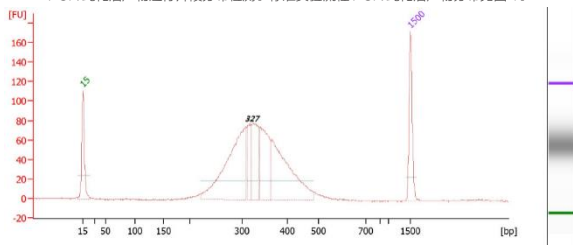


图 1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.8 双链酶切



注意：操作前请仔细阅读附录 F。

3.8.1 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 40 μ L。

3.8.2 在冰上配制双链酶切反应液（见表 16）：

表 16 双链酶切反应液的配制

组分	一个反应标准量
DS Digestion Buffer	9 μ L
DS Digestion Enzyme Mix	1 μ L
Total	10 μ L

3.8.3 用移液器吸取 10 μL 配制好的双链环化反应液加入步骤 3.8.1 的 0.2 mL 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。

3.8.4 将 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上，按照双链酶切反应条件进行反应（见表 17）：

表 17 双链酶切反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	20 min
75°C	10 min
4°C	Hold

3.8.5 反应结束后，瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管转移到冰上，立即进入下步反应。

3.9 双链环化

3.9.1 在冰上配制双链环化反应液（见表 18）：

表 18 双链环化反应液的配制

组分	一个反应标准量
DS Ligation Buffer	49.5 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	50 μL

3.9.2 用移液器吸取 50 μL 配制好的双链环化反应液加入步骤 3.8.5 的 0.2 mL 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 0.2 mL PCR 管置于 PCR 仪上，按照双链环化反应条件进行反应（见表 19）：

表 19 双链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	60 min
4°C	Hold

3.9.4 反应结束后，瞬时离心，将 0.2 mL PCR 管转移到冰上，立即进入下步反应。

3.10 双链环化产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 B。

- 3.10.1 提前 30 min 取出 AMPure® XP Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.10.2 吸取 250 μL ($\sim 2.5\times$) AMPure® XP Beads 至步骤 3.9.4 的 100 μL 环化消化产物中，用移液器轻轻吹打 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 1.5 mL EP 管中。
- 3.10.3 室温孵育 10 min。
- 3.10.4 瞬时离心，将 1.5 mL EP 管置于磁力架，静置 5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.10.5 保持 1.5 mL EP 管置于磁力架上，沿壁加入 500 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 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 1.5 mL EP 管固定于磁力架上，打开 1.5 mL EP 管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.10.8 将 1.5 mL EP 管从磁力架上取下，加入 32 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打 10 次至完全混匀。
- 3.10.9 室温下孵育 10 min。
- 3.10.10 瞬时离心，将 1.5 mL EP 管置于磁力架上，静置 5 min 至液体澄清，将 30 μL 上清液转移到新的 1.5 mL EP 管中。



停止点：双链环化产物消化纯化后产物，可置 -20°C 冰箱储存。

第四章 DNB 制备与测序注意事项

4.1 WGBS 与 WGS 文库 pooling



注意：WGBS 为碱基不平衡文库，需要和 WGS 文库 pooling 测序，推荐采用 DNB pooling。主带长度不同的 DNA 文库在 pooling 测序时，建议文库主带差异在 20bp 以内。主带长度差异较大的文库不建议作为平衡文库 pooling 测序。在采用 DNB pooling 时，推荐 WGBS DNB 和 WGS DNB 以 2: 1 的质量比进行 pooling。Pooling 前需要参考 4.2 制备 DNB。

4.2 WGBS DNB 的制备



注意：双链环化的 WGBS 产物在制备 DNB 必须使用优化后的 WGBS Make DNB Buffer 替代测序试剂盒中的 Make DNB Buffer。

4.2.1 取用 0.2 mL 八连管或者 PCR 管，在冰上按如下体系配制反应 Mix（见表 20）

表 20 WGBS 制备 DNB 反应液的配制

组分	一个反应标准量
双链环化文库	4 μ L
Low TE Buffer	16 μ L
WGBS Make DNB Buffer	20 μ L
Make DNB Enzyme Mix I	40 μ L
Make DNB Enzyme Mix II	4 μ L
Total	84 μ L



注意：请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (LC) 置于室温，请勿长时间触碰管壁

4.2.2 反应混合液涡旋震荡混匀，瞬时离心将反应液收集至管底，即刻置于 PCR 仪中，反应条件如下（见表 21）

表 21 WGBS 制备 DNB 反应条件

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



注意 1：部分品牌 PCR 仪的热盖升降温度慢，在热盖升降过程中，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。

 **注意 2:** 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

4.2.3 当 PCR 仪温度达到 4°C 后立即加入 20 μ 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。

4.2.4 采用 DNB pooling, 当 WGBS 和 WGS 的 DNB 浓度均大于 5 ng/ μ L, 可按照 4.3 的方式加载 DNB。


4.3 DNB 的加载

本操作流程推荐的最优化 DNB 投入量见表 22, 并用 DNB Loading Buffer 1 补足 50 μ L 体系上机所需的 DNB 体积:

表 22 上机测序推荐的 DNB 投入量

测序平台	DNB pooling	
	每 lane 混合文库 DNB 质量	每 lane WGS DNB 质量
MGISEQ-2000	450 ng	300 ng
BGISEQ-500	660 ng	440 ng

 **注意:** 具体的操作步骤请参考 MGI 测序试剂盒说明书。

 **注意:** DNB pooling 时, 当 WGBS DNB 与 WGS DNB 浓度均大于 5 ng/ μ L, 按照表 22 混合后 DNB 体积仍超过上机所需的 DNB 体积, 可以在保持 2:1 的质量比的前提下, 适当降低 WGBS DNB 和 WGS DNB 的投入量。如果使用其它体系的 DNB 体积上机, 应该按比例增加每 lane 混合文库 DNB 质量。

 **注意:** 为保证混合比例的准确性, 建议使用正常枪头取样, 用扩口枪头混匀。


附录

附录 A 打断条件

以下摘取Covaris各型号55 μL 打断条件，仅供参考。

请根据具体参数，将基因组DNA打断至100-700 bp之间，主带250 bp左右以适用于PE100测序。

表 23 Covaris 各型号 55 μL 打断条件

	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

	Vessel	MicroTUBE-50 Screw-Cap (PN 520166)	8 microTUBE-50 AFA Fiber Strip V2 (PN 520174)	96 microTUBE-50 AFA Fiber Plate (PN 520168)
			8 microTUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2 (PN 520240)	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)	
	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
Screw -Cap	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
	Treatment Time (s)	130	95	62	40	30	50	70
8- Strip	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
	Treatment Time (s)	360	155	75	45	35	52	50
Plate	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

推荐使用MGEasy DNA纯化磁珠试剂盒（MGI, Cat. No.940-200073-00或940-200074-00）的DNA Clean beads 或者AMPure® XP（Agencourt, Cat. No. A63882）进行磁珠纯化。如果使用其他来源磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前注意事项

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 磁珠的使用量通常用乘数“ \times ”来表示，即磁珠的体积相对于样本原始体积的比例。例如，若样本的原始体积为50 μL ，使用1 \times 磁珠进行纯化时，所用的磁珠体积为1 \times 50 μL =50 μL ；若用0.8 \times +0.2 \times 的条件筛选特定大小的DNA片段，第一轮磁珠用量为0.8 \times 50 μL =40 μL ，第二轮磁珠用量为0.2 \times 50 μL =10 μL 。
- 4) 磁珠使用量直接影响纯化到的DNA片段的下限长度。乘数越高，可纯化的DNA片段的下限越小。例如，1 \times 磁珠进行纯化时，能够有效纯化到大于200 bp 的DNA片段；2 \times 磁珠进行纯化时，能够有效纯化到大于100 bp 的DNA片段。

磁珠操作注意事项

- 1) 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，以保证乘数正确，条带正确。
- 2) 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。
- 3) 磁珠与液体分离时，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。
- 4) 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇。漂洗过程中不粘管应始终置于磁力架中，请勿扰动磁珠。
- 5) 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不粘管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管中液体吸干。
- 6) 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。
- 7) 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 。

- 8) 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，建议用手指固定住不粘管中下段，然后开盖。

附录 C 磁珠片段筛选步骤

本案例采用 $0.8\times+0.2\times$ 磁珠对打断后产物(100 μL)进行磁珠片段筛选，最终得到主带为250 bp的样本 DNA。若需要筛选其它片段主带，请根据第二章的表3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AMPure® XP 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 EP 管中，若体积不足100 μL ，用TE Buffer补足。
- 3) 吸取80 μL (0.8 \times) AMPure® XP Beads至含有100 μL 打断产物的1.5 mL EP管中，用移液器轻轻吹打至少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EP 管中。
- 4) 室温孵育5 min。
- 5) 瞬时离心，将EP 管置于磁力架上，静置2-5 min至液体澄清，吸取上清至新的1.5 mL EP 管中。
- 6) 注意：此步保留上清，丢弃磁珠。
- 7) 吸取20 μL (0.2 \times) AMPure® XP Beads至上清管中，用移液器轻轻吹打至少10次至完全混匀。
- 8) 室温孵育5 min。
- 9) 瞬时离心，将EP 管置于磁力架，静置2-5 min至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 10) 保持EP 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，小心吸取并丢弃上清。
- 11) 重复步骤9，尽量吸干管内液体。
- 12) 保持EP 管固定于磁力架上，打开EP 管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 13) 将EP 管从磁力架上取下，加入一定体积 TE Buffer进行DNA洗脱，用移液器轻轻吹打至少10次至完全混匀。
- 14) 室温孵育5 min。
- 15) 瞬时离心，将EP 管置于磁力架上，静置2-5 min至液体澄清，将适量上清液转移到新的1.5 mL EP 管中。

附录 D 关于 WGBS Adapter 使用

该试剂盒提供16管WGBS Adapter（八连管式）（见图2）。WGBS Adapter为满足样本批量化建库、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WGBS Adapter组合，但WGBS Adapter编号不连续。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录D-1的使用规则。

WGBS Adapter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。

使用前必须先离心将液体聚集于管底，轻柔地揭开管盖，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。

禁止使用MGI Easy DNA Adapters-16（管式）试剂盒和MGI Easy DNA Adapters-96（板式）试剂盒，以及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，会导致建库失败。

WGBS Adapter的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。推荐WGBS Adapter：样本DNA摩尔比为10:1。Adapter投入量过高可能会导致Adapter或Adapter Dimer残留；投入量不足会影响连接效率进而导致文库产出降低。

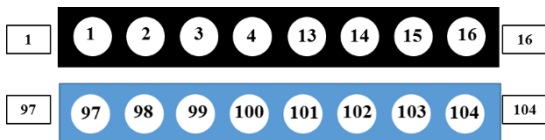


图2 16管WGBS Adapter（八连管式）示意图

表24 不同样本DNA量（250 bp）推荐Adapter使用量

样本DNA (ng)	WGBS Adapter	
	稀释倍数	WGBS Adapter 稀释后投入量 (μL)
100	不稀释	5
75	1.33	5
50	2	5
25	5	5
10	10	5

公式 1 样本 DNA 摩尔数可根据下述公式粗略计算：

$$\text{样本 DNA 摩尔数 (pmol)} \approx \text{样本 DNA 质量 (ng)} / [0.66 \times \text{DNA 平均长度 (bp)}]$$

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，可在表24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）。如Adapter原液浓度限制无法提高使用量，可通过提高Adapter使用体积来尝试。

D-1 WGBS Adapters-16（八连管式）使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将WGBS Adapter成组使用，WGBS 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 针对不同样本数推荐的 Barcode 组合方案

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。

附录 E 关于接头连接和 PCR 反应

接头连接反应液中含有较高浓度的PEG，溶液较粘稠，移液器操作时请慢吸慢放，确保加液量正确。

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，又会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表6列举了当使用10~100 ng高质量样本 DNA（250 bp）时，获得300 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 26 获得 300 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	
	300 ng	1 μg
10	13-15	15-17
25	12-14	14-16
50	11-13	13-15
75	10-12	12-14
100	10-12	12-14

附录 F DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

不同片段大小的双链DNA样本 1 pmol分子对应不同的质量，可根据公式2计算所需的DNA量：

公式 2 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算：

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

单链环状DNA产物纯化后产量应达到108 fmol以上方足够两次上机测序的量。可根据公式3计算所得单链环状DNA的量。

公式 3 单链环 fmol 与 ng 间的换算：

$$108 \text{ fmol 单链环对应的质量}(\text{ng}) = 0.108 \times \frac{\text{DNA 主片段大小}(\text{bp})}{1000 \text{ bp}} \times 330 \text{ n}$$

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