

使用说明书

版本: 3.0

MGIEasy 全基因组甲基 化文库制备试剂盒

货号: 940-001530-00 (16 RXN)
940-001527-00 (96 RXN)
试剂盒版本号: V3.0

关于说明书

©2025 深圳华大智造生物电子科技有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造生物电子科技有限公司（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®、NEB®，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	深圳华大智造生物电子科技有限公司
生产地址	深圳市盐田区盐田街道沿港社区北山道 146 号北山工业区 11 栋 2 楼
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
3.0	V3.0	2025 年 3 月	Control DNA 改为只打断不纯化； 增加 MGISEQ-2000RS StandardMPS 2.0 测序试剂适配；增加 DNBSEQ-T7RS StandardMPS 甲基化测序试剂适配
2.0	V3.0	2024 年 7 月	修订测序平台版本号；注意事项中补充样本起始量和末修投入量推荐表格；增加 Adapter 使用注意事项；修订流程表格；修订样本打断及片段选择；末端修复产物纯化和加 "A" 尾合并章节；修订 DNB 加载方法；附录中补充打断条件；附录中补充 Barcode 使用注意事项；修订 70 mL 磁珠的 TE Buffer 规格
1.0	V3.0	2023 年 12 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: <https://www.mgi-tech.com/download/files>

目录

1	产品信息	1
1.1	产品描述	1
1.2	适用范围	1
1.3	适用测序平台	1
1.4	组分	2
1.5	储存与运输	4
1.6	自备物料清单	4
1.7	注意事项	6
1.8	流程	8
2	样本打断及片段筛选	9
2.1	样本打断	9
2.2	打断产物片段筛选	10
2.3	片段筛选产物质控	13
3	文库构建标准流程	14
3.1	末端修复	14
3.2	末端修复产物纯化和加 "A" 尾	16
3.3	接头连接	17
3.4	连接产物纯化	19
3.5	酶促转化	21
3.6	PCR	28
3.7	PCR 产物纯化	29
3.8	PCR 产物质检	31
4	环化消化	33
4.1	变性及单链环化	33
4.2	酶切消化	35
4.3	消化产物纯化	36
4.4	消化产物质检	37
5	测序	38
5.1	MGISEQ-2000RS WGMS DNB 制备	38
5.2	MGISEQ-2000RS DNB 加载	40
5.3	DNBSEQ-T7RS 测序	42

6 附录	43
6.1 打断条件	43
6.2 PCR BC Primer 使用说明	46

1 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 V3.0 是为华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的全基因组甲基化文库构建试剂盒。该试剂盒将打断片选好的 DNA 经过末端修复、加 "A"、加接头、酶转、PCR 和环化，制备成 MGI 高通量测序平台专用的甲基化文库。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

本试剂盒可进行全基因组甲基化高通量测序文库构建，主要适用于人和常见动植物（如：小鼠、拟南芥等）的血液、新鲜组织、细胞、福尔马林固定石蜡包埋的组织样本等的全基因组 DNA，以及血浆的游离 DNA。

1.3 适用测序平台

构建的文库适用以下测序平台及测序类型：

表 1 测序平台及测序类型推荐

测序平台	测序类型	ISW 版本	Basecall 版本
MGISEQ-2000RS	PE100 / PE150 (StandardMPS)	1.8.0.2158 及以上	1.7.1.613 及以上
MGISEQ-2000RS	PE100 / PE150 (StandardMPS 2.0)	1.8.2.2293 及以上	1.7.1.658 及以上
DNBSEQ-T7RS	PE150 (StandardMPS)	1.5.0.887 及以上	BCS_1.5.0.316 及以上

1.4 组分

本试剂盒包含有 2 个规格，分别是 16 RXN 和 96 RXN。每个试剂套装包含 3 ~ 4 个独立试剂盒。不同规格试剂盒、货号、组分信息见下表。

套装中包含信息卡片，客户可通过卡片信息登录 MGI 官网，下载相应说明书及 SDS 文件。

表 2 MGIEasy 全基因组甲基化文库制备试剂盒 (16 RXN) (货号: 940-001530-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 全基因组甲基化文库制备模块 货号: 940-001529-00	ER Buffer	 橙色	144 μ L/支 $\times$ 1
	ER Enzyme	 橙色	16 μ L/支 $\times$ 1
	Purif Suppl	 无色	18 μ L/支 $\times$ 1
	AT Buffer	 绿色	152 μ L/支 $\times$ 1
	AT Enzyme	 绿色	8 μ L/支 $\times$ 1
	WGMS Adapter	 红色	80 μ L/支 $\times$ 1
	Ad-Lig Buffer	 红色	288 μ L/支 $\times$ 1
	Ligation Enhancer	 棕色	32 μ L/支 $\times$ 1
	Ad Ligase	 红色	80 μ L/支 $\times$ 1
	U-PCR Enzyme	 蓝色	400 μ L/支 $\times$ 1
	X Enhancer	 紫色	64 μ L/支 $\times$ 1
	PCR BC Primer 1-3, 18, 5-8	八连管	5 μ L/孔 $\times$ 8
	PCR BC Primer 9-16	八连管	5 μ L/孔 $\times$ 8
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260	Splint Buffer	 紫色	186 μ L/支 $\times$ 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μ L/支 $\times$ 1
	Digestion Buffer	 白色	23 μ L/支 $\times$ 1
	Digestion Enzyme	 白色	42 μ L/支 $\times$ 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	120 μ L/支 $\times$ 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
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 3 MGIEasy 全基因组甲基化文库制备试剂盒 (96 RXN) (货号: 940-001527-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 全基因组甲基化文库制备模块 货号: 940-001528-00	ER Buffer	 橙色	864 μ L/支× 1
	ER Enzyme	 橙色	96 μ L/支× 1
	Purif Suppl	 无色	106 μ L/支× 1
	AT Buffer	 绿色	912 μ L/支× 1
	AT Enzyme	 绿色	48 μ L/支× 1
	Ad-Lig Buffer	 红色	864 μ L/支× 2
	Ligation Enhancer	 棕色	192 μ L/支× 1
	Ad Ligase	 红色	480 μ L/支× 1
	U-PCR Enzyme	 蓝色	1200 μ L/支× 2
	X Enhancer	 紫色	384 μ L/支× 1
MGIEasy 甲基化接头和单端条形码引物模块 货号: 940-001531-00	WGMS Adapter	 红色	480 μ L/支× 1
	PCR BC Primer-96	/	5 μ L/孔 × 96
MGIEasy 环化模块 货号: 1000017573	Splint Buffer	 紫色	1144 μ L/支× 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	48 μ L/支× 1
	Digestion Buffer	 白色	135 μ L/支× 1
	Digestion Enzyme	 白色	250 μ L/支× 1
	Digestion Stop Buffer	 白色	720 μ L/支× 1
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001526-00	DNA Clean Beads	 白色	70 mL/支×1
	TE Buffer	 白色	35 mL/支×1

1.5 储存与运输

表 4 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	储存温度	运输温度
MGIEasy 全基因组甲基化文库制备模块	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy 甲基化接头和单端条形码引物模块		
MGIEasy 环化模块		
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒	2 °C ~ 8 °C	

-  提示
- 若使用冰袋或干冰进行运输，请在收到货物后检查是否有剩余的冰或干冰。
 - 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。
 - 文库制备模块中的 Ligation Enhancer 首次使用后需室温避光储存，避免反复冻融。

1.6 自备物料清单

表 5 MGI 产品订购信息

货号	型号	名称
1000012554	FCL PE100	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (StandardMPS)
1000012555	FCL PE150	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (StandardMPS)
940-001807-00	G400 FCL PE100	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (StandardMPS 2.0)
940-001794-00	G400 FCL PE150	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (StandardMPS 2.0)
940-002625-00	T7 Methylation FCL PE150	DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装
1000005033	V3.0	标准文库试剂*

-  提示
- * 在 DNBSEQ-T7RS V1.0 相机测序仪进行基因组 DNA 单选或者双选甲基化文库的测序时，需要额外订购 V3.0 标准文库试剂。以下几种情况不需要订购 V3.0 标准文库试剂：在 DNBSEQ-T7RS 上进行游离 DNA 测序，DNBSEQ-T7RS 测序仪为 V2.0 相机，在 MGISEQ-2000RS 上测序。

表 6 设备清单

名称	推荐品牌
Covaris 打断仪	Covaris
漩涡混匀仪	Kylin Bell, 型号: VORTEX-6 或同等功能仪器
小型离心机	佑宁仪器, 型号: Mini-7KS 或同等功能仪器
移液器	Eppendorf Research, 货号: 3120000216, 3120000224, 3120000232, 3120000240, 3120000259 以及 3120000267

名称	推荐品牌
PCR仪	Bio-Rad, 型号: C1000 或 Bioer Technology, 型号: TC-96/G/H (b) C
24 孔磁力架	NEB, 货号: S1515S 或同等功能仪器
96 孔板磁力架	ALPAQUA, 货号: A00400 或同等功能仪器
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, 货号: 12321D 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 Bioanalyzer	Agilent Technologies, 货号: G2939AA 或同等功能仪器

表 7 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
非甲基化 Lambda DNA*	Promega, 货号: D1521 或同等功能试剂
NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module	NEB, 货号: E7125S / E7125L
甲酰胺*	Diamond, 货号: A100314-0100 或同等功能试剂
2M 氢氧化钠溶液*	阿拉丁, 货号: S128511-1L 或同等功能试剂
Nuclease Free water (NF water)	Ambion, 货号: AM9937
1x TE Buffer, pH 8.0	Ambion, 货号: AM9858
无水乙醇 (分析纯)	西陇化工, 货号: 72188-01
Qubit ssDNA Assay Kit	Invitrogen, 货号: Q10212 或 YEASEN, 货号: 12645ES60/12645ES76
Qubit dsDNA HS 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
DNA 分析试剂盒	Agilent, 货号: 5067-1504 或同等功能仪器配套的分析试剂
Covaris 打断管	Covaris
移液器吸头	Axygen, 货号: T-300 10 μ L 短白吸头, T-200-Y 200 μ L 黄吸头以及 T-1000-B 1000 μ L 蓝吸头
1.5 mL 离心管	Ambion, 货号: AM12450
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen, 货号: PCR-02-C 或 Axxygen, 货号: 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

 提示 * 非甲基化 Lambda DNA 不需打断, 在氧化反应中保护连接产物, 可提前稀释至 200 ng/ μ L。

* 甲酰胺和 2M 氢氧化钠溶液是酶促转化变性时使用，二者购买其一即可。

1.7 注意事项

1.7.1 样本要求及处理

1.7.1.1 样本类型

本试剂盒适用于人（如：全血、新鲜组织、细胞、福尔马林固定石蜡包埋的组织样本、血浆等）、常见动植物（如：小鼠、拟南芥等）的提取 DNA。

1.7.1.2 样本完整度

- 基因组 DNA 推荐使用完整度良好，琼脂糖凝胶电泳主带 ≥ 23 Kb，无明显拖尾的样本进行文库构建。
- 游离 DNA 推荐使用主峰分布在 160 ~ 180 bp 的样本进行文库构建。

1.7.1.3 样本纯度

推荐使用纯度良好（吸光度检测 $1.8 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$, $OD_{260}/OD_{230} \geq 1.7$ ，琼脂糖凝胶电泳无明显蛋白和 RNA 条带）的样本进行文库构建。如果 DNA 中含有高浓度蛋白或多糖类物质等杂质，建议将 DNA 用 2 × 体积的磁珠纯化后溶解于 TE Buffer。

1.7.1.4 基因组 DNA 起始量

本试剂盒可对 100 ~ 1000 ng 基因组 DNA 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。

打断起始量应结合基因组 DNA 总量、片选方式一起考虑。具体参见下表进行方案选择。

表 8 基因组 DNA 打断起始量范围推荐

最低起始量 (ng)	起始量范围 (ng)	片选方式
100	100 ~ 500	磁珠单选
	500 ~ 1000	磁珠单选或磁珠双选

 提示 磁珠单选回收效率需 $\geq 30\%$ ，磁珠双选回收效率需 $\geq 10\%$ ，否则需要适当调整起始量范围或/和 PCR 循环数。

- 磁珠单选纯化后的文库主片段分布在 300 ~ 700 bp 范围，主峰分布在 350 ~ 480 bp。
- 磁珠双选纯化后的文库主片段分布在 300 ~ 500 bp 范围，主峰分布在 350 ~ 450 bp。
- 相关实验操作，见第 10 页“打断产物片段筛选”。

1.7.1.5 游离 DNA 起始量

本试剂盒可对 5 ~ 20 ng 游离 DNA 进行文库制备，不需要打断和片选，可直接进行末端修复。游离 DNA 建议使用 TE Buffer 洗脱，若提取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。

1.7.1.6 末端修复样本投入量

表 9 末端修复样本投入量

样本类型	末端修复 DNA 推荐投入量 (ng)
片选后 gDNA	10 ~ 50
游离 DNA	5 ~ 20

1.7.2 关于 Adapter 使用

由于设计工艺不同，只能使用本试剂盒 WGMS Adapter，不能使用其他试剂盒 Adapter，否则会导致文库构建失败。

1.7.3 其他注意事项

- 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。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 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。如果 PCR 仪无法设置热盖温度，也可保持在 105 °C。
- PCR 产物如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，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；不同功能区使用其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。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 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

1.8 流程

表 10 建库流程

序号	流程	手工操作时长 (单个反应)	总时长 (单个反应)
2.1	样本打断 	2 min	10 min
2.2	打断产物片段筛选 	5 min	20 min
2.3	片段筛选产物质控 	2 min	5 min
3.1	末端修复	2 min	32 min
3.2	末端修复产物纯化和加 "A" 尾	5 min	25 min
3.3	接头连接	3 min	18 min
3.4	连接产物纯化 	5 min	18 min
3.5.1	氧化 	5 min	1 h 35 min
3.5.2	氧化产物纯化 	5 min	18 min
3.5.3	变性	2 min	17 min
3.5.4	脱氨 	2 min	3 h 2 min
3.5.5	脱氨产物纯化 	5 min	28 min
3.6	PCR	2 min	30 min
3.7	PCR产物纯化 	5 min	18 min
3.8	PCR产物质检 	2 min	5 min
4.1	变性及单链环化	5 min	45 min
4.2	酶切消化	2 min	12 min
4.3	消化产物纯化 	5 min	28 min
4.4	消化产物质检 	2 min	5 min
总计		66 min	10 h 11 min



提示

- 总时长：单个反应的理论时长，单次建库样本数增多，时间将延长。
- 手工操作时长：手工操作流程的累计时长。操作人员熟练度不同，手工操作时间会有一定波动。
- ：停止点。

2 样本打断及片段筛选

2.1 样本打断

2.1.1 准备

表 11 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	室温暂存

表 12 样本准备

样本名称	用途	来源	要求
DNA	待甲基化建库的样本	客户自备	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Control DNA CpG unmethylated Lambda (2 ng/μL)	评估文库非甲基化 C 的转化率	客户自备，NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module 或其他同等功能试剂	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Control DNA CpG methylated pUC19 (0.1 ng/μL)	评估 TET2 酶的氧化效率	客户自备，NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module 或其他同等功能试剂	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存



提示

- Control DNA CpG unmethylated Lambda 的 FASTA 文件网址为 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J02459>
- Control DNA CpG methylated pUC19 的 FASTA 文件网址为 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L09137>

2.1.2 样本打断

1. 本试剂盒只适配采用机械打断的方法获得的片段化DNA，不适配采用酶打断的方法获得的片段化DNA。
2. 请将基因组 DNA 打断至 100 bp ~ 1000 bp 之间，主带 300 ~ 700 bp。
3. 附录第 43 页“打断条件”列举了 Covaris 各型号打断仪 55 μL 体积的打断条件参数。若需要其他体积（15 μL 、130 μL 或 200 μL 等）打断条件，请参考 Covaris 官网 https://www.covaris.com/wp-content/uploads/resources_pdf/pn_010308.pdf。
4. 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。
5. Control DNA 的打断条件可以与基因组 DNA 保持一致。
6. 将 Control DNA CpG unmethylated Lambda 和 Control DNA CpG methylated pUC19 混合在同一管中打断，以 55 μL 打断体系为例：分别取 27.5 μL (55 ng) Control DNA CpG unmethylated Lambda 和 27.5 μL (2.75 ng) Control DNA CpG methylated pUC19 到同一打断管中，混匀离心后再打断。**也可以使用具有同等功能的其他品牌 Control DNA 作为替代。**



- 注意**
- Control DNA 可以只打断不纯化。
 - 打断后产物可置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

2.2 打断产物片段筛选



- 提示**
- 操作前请仔细阅读第 6 页“表 8 基因组 DNA 打断起始量范围推荐”。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。
 - 打断后的基因组 DNA，需使用 TE Buffer 将体积补至 100 μL 后，再进行片段筛选。

2.2.1 磁珠单选



- 提示**
- 下述步骤使用 80 μL (0.8 $\times$) 磁珠对 100 μL 打断产物进行片段筛选。
 - 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

2.2.1.1 准备

试剂：需使用本试剂盒中的 DNA Clean Beads。

表 13 试剂准备

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

2.2.1.2 磁珠单选

 提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本全部反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

1. 检查打断后样本体积，若体积不足 100 μ L，用 TE Buffer 补足。
2. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 **80 μ L DNA Clean Beads** 至各样本管中，涡旋混匀至所有磁珠悬浮。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将样本管瞬时离心，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. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **150 μ 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样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
7. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

8. 将样本管从磁力架上取下，加入 **32 μ L TE Buffer** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀至所有磁珠悬浮。

 提示 也可根据实际需求，适当减少洗脱体积。

9. 室温孵育 5 min。
10. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **30 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

2.2.2 磁珠双选

-  提示
- 下述步骤使用 55 μ L (0.55 $\times$) + 20 μ L (0.2 $\times$) 磁珠对打断产物进行片段筛选。
 - 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

2.2.2.1 准备

试剂：选用 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒。

表 14 试剂准备

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

2.2.2.2 磁珠双选

 提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本全部反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

1. 检查打断后样本体积，若体积不足 100 μ L，用 TE Buffer 补足。
2. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 **55 μ L DNA Clean Beads** 至各样本管中，涡旋混匀至所有磁珠悬浮。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 150 μ L 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 提示 此步保留上清，丢弃磁珠。根据需要回收磁珠上的 DNA。

5. 吸取 **20 μ L DNA Clean Beads** 至含有上清液的样本管中，用移液器轻轻吸打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
6. 室温孵育 5 min。
7. 将样本管瞬时离心，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. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **150 μ 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，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
10. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

11. 将样本管从磁力架上取下，加入 **32 μ L TE Buffer** 进行 DNA 洗脱，涡旋混匀至所有磁珠悬浮。

 提示 也可根据实际需求，适当减少洗脱体积。

12. 室温孵育 5 min。
13. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **30 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

2.3 片段筛选产物质控

 提示 若实验流程已稳定建立，此步质控可抽样检测或省略。

1. 取 1 μL 片选产物用于定量检测。可使用 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片选产物进行定量。

• 下图为打断后 0.8 $\times$ 磁珠单选产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

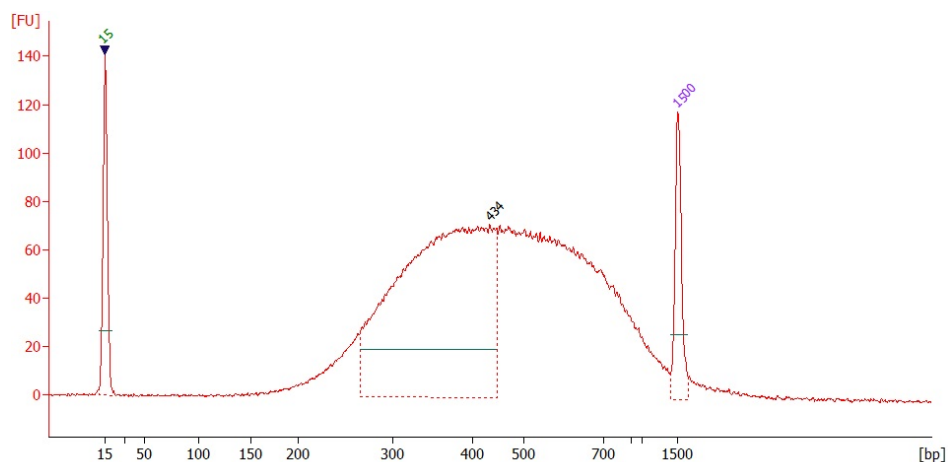


图 1 打断后 0.8 $\times$ 单选 2100 片段分布

• 下图为打断后 0.55 $\times$ + 0.2 $\times$ 磁珠双选产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

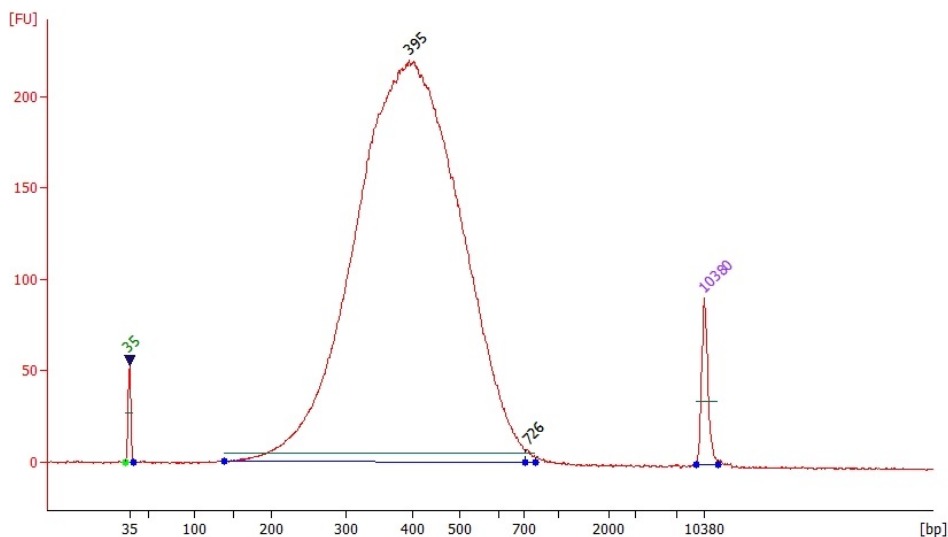


图 2 打断后 0.55 $\times$ + 0.2 $\times$ 双选 2100 片段分布

3 文库构建标准流程

3.1 末端修复

-  提示
- 操作前请仔细阅读第 6 页“注意事项”。
 - 推荐使用 50 ng 片选后产物（浓度 ≥ 1.75 ng/ μ L）进行末端修复，最低可尝试使用 10 ng 片选后产物（浓度 ≥ 0.35 ng/ μ L）。
 - 对于游离 DNA，不需打断，推荐使用 20 ng（浓度 ≥ 0.69 ng/ μ L）进行末端修复，最低可尝试使用 5 ng 游离 DNA（浓度 ≥ 0.18 ng/ μ L）。
 - 样本量足够时请使用推荐末端修复起始量进行建库。当末端修复起始量降低时，可尝试建库，但会导致文库 duplication rate 升高，覆盖度降低。
 - 使用前请预热 PCR 仪至反应温度 20 °C。
 - 以下末端修复简称为 ER。

3.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 15 试剂准备

试剂名称	要求
打断好的 Control DNA	客户自备，室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
TE Buffer	室温暂存
ER Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
ER Enzyme	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Purif Suppl	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.1.2 末端修复

1. 根据样本浓度，取适量样本（打断片选后产物推荐 50 ng，游离 DNA 推荐 20 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，体积应少于 29 μL ，不足 29 μL 部分用 TE Buffer 补足。
2. 根据所需反应数，在冰上配制 ER 反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 16 ER 反应液的配制

组分	单个反应体积
打断好的 Control DNA	1 μL
ER Buffer	9 μL
ER Enzyme	1 μL
Total	11 μL

3. 吸取 11 μL ER 反应液至各样本管中（3.1.2 节步骤 1），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
4. 将 PCR 管置于提前预热到 20 $^{\circ}\text{C}$ 的 PCR 仪上，跳过第一步（20 $^{\circ}\text{C}$ Hold），按下表的条件进行反应。

表 17 ER 反应条件（体系：40 μL ）

温度	时间
35 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
20 $^{\circ}\text{C}$	Hold
20 $^{\circ}\text{C}$	30 min
20 $^{\circ}\text{C}$	Hold

 注意 ER 反应不要设置 4 $^{\circ}\text{C}$ hold，反应结束后 PCR 管不能放在冰上。

5. 在 ER 反应还剩 5 min 时，根据所需反应数，按下表配制 ER 磁珠混合液，涡旋混匀后置于室温。

表 18 ER 磁珠混合液的配制（现配现用）

组分	单个反应体积
DNA Clean Beads	60 μL
Purif Suppl	0.1 μL
Total	60.1 μL

 提示 当反应个数 ≤ 4 时，推荐按照 4-5 个反应数配置 ER 磁珠混合液。

6. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底，**立即**进行纯化。

 注意 请勿在此处停止，应继续完成末端修复产物纯化。

3.2 末端修复产物纯化和加 "A" 尾

-  提示
- 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。
 - 加 "A" 尾简称为 AT。
 - 使用前请预热 PCR 仪至反应温度 65 °C。

3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 19 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
AT Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
AT Enzyme	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.2.2 末端修复产物纯化和加 "A" 尾

- 混匀 ER 磁珠混合液，吸取 **60.1 μ L 磁珠混合液**至样本管中（3.1.2 节步骤 6），涡旋混匀至所有磁珠悬浮。
- 室温孵育 5 min，同时根据所需反应数，在冰上配制 AT 反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 20 AT 反应液的配制

组分	单个反应体积
AT Buffer	9.5 μ L
AT Enzyme	0.5 μ L
Total	10 μ L

- 将步骤 2 样本管瞬时离心，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. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **150 μ L 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 **30 s**，小心吸取上清并丢弃。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。

5. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。



提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

6. 将样本管从磁力架上取下，加入 **40 μ L TE Buffer** 进行 DNA 洗脱。

7. 在**室温**吸取步骤 2 配制的 **10 μ L AT 反应液**至步骤 6 的样本管中，涡旋混匀 **3 次**，每次 **3 s**，**轻微**瞬时离心后将样本管置于提前预热好的 PCR 仪上，跳过第一步 (**65 $^{\circ}$ C Hold**)，按下表的条件进行反应。



注意

- 混匀离心后应确保磁珠完全悬浮。
- 添加 AT 反应液后的样本管**不能放到冰上**，应**立即**置于 PCR 仪上进行反应，。

表 21 AT 反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
70 $^{\circ}$ C 热盖	On
65 $^{\circ}$ C	Hold
65 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

8. 反应结束后，将样本管瞬时离心使液体收集至管底，并**立即**进行下一步反应。



注意 请勿在此处停止，应继续完成接头连接反应。

3.3 接头连接



提示

- 使用前请预热 PCR 仪至反应温度 **25 $^{\circ}$ C**。
- Adapter 为双链接头，请勿将其置于 **30 $^{\circ}$ C** 以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。

3.3.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 22 试剂准备

试剂名称	要求
WGMS Adapter	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Ad-Lig Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
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，避光储存
TE Buffer	室温暂存



- 提示
- WGMS Adapter 使用前充分涡旋混匀，不可直接与接头连接反应液混合。
 - Ad-Lig Buffer 较粘稠，可涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心。吸液请慢吸慢放，确保加液准确。
 - Ligation Enhancer 首次使用后，置于 10 °C ~ 30 °C 避光储存。

3.3.2 接头连接

1. 根据片选产物末端修复投入量，对接头进行稀释。



提示 Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请根据样本实际情况选择相应的接头稀释倍数。

表 23 不同片选产物末端修复投入量的 Adapter 使用量与稀释方法

片选产物末端修复投入量 (X, ng)	WGMS Adapter 稀释倍数	WGMS Adapter 体积 (μL)	TE Buffer 体积 (μL)	稀释后总体积 (μL)
25 < X ≤ 50	不稀释	5	-	-
10 < X ≤ 25	2	5	5	10
X = 10	5	2	8	10

表 24 不同游离 DNA 末端修复投入量的 Adapter 使用量与稀释方法

游离 DNA (X, ng)	WGMS Adapter 稀释倍数	WGMS Adapter 体积 (μL)	TE Buffer 体积 (μL)	稀释后总体积 (μL)
10 < X ≤ 20	不稀释	5	-	-
5 ≤ X ≤ 10	2	5	5	10



注意 AT 产物轻微瞬时离心后，加入 WGMS Adapter 并涡旋混匀至所有磁珠悬浮，轻微瞬时离心后，再加入接头连接反应液。

2. 吸取 5 μL WGMS Adapter 至对应的样本管中(3.2.2 节步骤 8)，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 25 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Ad-Lig Buffer	18 μL
Ad Ligase	5 μL
Ligation Enhancer	2 μL
Total	25 μL

 提示 推荐在加“A”尾反应剩余 5 min 时配制接头连接反应液，配制完成后置于冰上，须 30 min 内使用。

4. 缓慢吸取 **25 μL 接头连接反应液**至各样本管中，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，**轻微**瞬时离心使液体收集至管底后置于冰上。

 注意

- 接头连接反应液较粘稠，吸取时请慢吸慢放，确保加液量正确。
- 混匀离心后应确保磁珠完全悬浮。

5. 将 PCR 管置于提前预热到 25 °C 的 PCR 仪上，跳过第一步 (25 °C Hold)，按下表的条件进行反应。

表 26 接头连接反应条件 (体系: 80 μL)

温度	时间
35 °C 热盖	On
25 °C	Hold
25 °C	15 min
4 °C	Hold

6. 反应结束后，**立即**将 PCR 管瞬时离心。

7. 加入 **20 μL TE Buffer** 至总体系 100 μL。

 注意 不建议在此处停止，请继续完成接头连接产物纯化。

3.4 连接产物纯化

 提示

- 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。
- 该步纯化反应洗脱试剂为 **NF Water**。

3.4.1 准备

表 27 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
NF Water	自备物料，室温储存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.4.2 连接产物纯化

 提示 若使用 1.5 mL 样本管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本全部反应液转移至新的 1.5 mL 样本管。

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 **40 μ L DNA Clean Beads** 至样本管中 (3.3.2 节步骤 7)，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管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将样本管瞬时离心，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. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **150 μ L 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，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将样本管从磁力架上取下，加入 **30 μ L NF Water** 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **28 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.5 酶促转化

- 提示
- 在做氧化反应之前，确保连接产物纯化洗脱溶液为 **NF Water**。
 - 操作细节也可参考 NEB 官网 <https://www.neb.cn/zh-cn/products/e7125-nebnext-enzymatic-methyl-seq-conversion-module>

3.5.1 氧化

- 提示
- 使用前请预热 PCR 仪至反应温度。

3.5.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 28 试剂准备

试剂名称	来源	要求
非甲基化 Lambda DNA (未打断)	客户自备，推荐 Promega, 货号: D1521，不需打断，保护连接产物，可提前稀释至 200 ng/μL	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
NF Water	客户自备	室温储存
TET2 Reaction Buffer	客户自备试剂盒 NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
TET2 Reaction Buffer Supplement (粉末)		瞬时离心，根据标签上所示体积，使用 TET2 Reaction Buffer 溶解，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Oxidation Supplement		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DTT		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Oxidation Enhancer		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
TET2		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Fe (II) Solution		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
Stop Reagent		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.5.1.2 氧化

- 根据反应数，在冰上配制氧化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 29 氧化反应液的配制

组分	单个反应体积
非甲基化 Lambda DNA (未打断, 200 ng/μL)	0.75 μL
溶解好的 TET2 Reaction Buffer Supplement	10 μL
Oxidation Supplement	1 μL
DTT	1 μL
Oxidation Enhancer	1 μL
TET2	4 μL
Total	17.75 μL

- 吸取 **17.75 μL 氧化反应液**至样本管中 (3.4.2 节步骤 9), 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。
- 稀释 Fe (II) 溶液: 取 **1 μL Fe (II) Solution** 加入到 **1249 μL NF water** 中, 涡旋混匀 6 次, 每次 3 s, 瞬时离心后室温暂存。

表 30 Fe (II) 稀释液配置

组分	体积
Fe (II) Solution	1 μL
NF water	1249 μL
Total	1250 μL

 注意 Fe (II) 稀释液需要新鲜配制使用, 不能保存, 使用完毕后需丢弃。

- 向步骤 2 的样本管中加入 **5 μL Fe (II) 稀释液**, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。
- 将 PCR 管置于提前预热到 37 °C 的 PCR 仪上, 跳过第一步 (37 °C Hold), 按下表的条件进行反应。

表 31 氧化反应条件 (体系: 50.75 μL)

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	Hold
37 °C	60 min
4 °C	Hold

- 反应结束后, 将 PCR 管瞬时离心, 立即加入 **1 μL Stop Reagent**, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s。瞬时离心后置于冰上。
- 将 PCR 管置于提前预热到 37 °C 的 PCR 仪上, 跳过第一步 (37 °C Hold), 按下表的条件进行反应。

表 32 终止反应条件 (体系: 51.75 μL)

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	Hold
37 °C	30 min
4 °C	Hold

8. 反应结束后, 将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

II 停止点 氧化产物可放置 -20°C 冰箱, 不超过 24 h。

3.5.2 氧化产物纯化

- 提示**
- 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。
 - 该步纯化反应洗脱试剂为 **NF Water**。

3.5.2.1 准备

表 33 试剂准备

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

3.5.2.2 氧化产物纯化

提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化, 请先分别将各样本反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

- 混匀 DNA Clean Beads, 吸取 **90 μL DNA Clean Beads** 至样本管中 (3.5.1.2 节步骤 8), 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管中。或涡旋混匀。
- 室温孵育 5 min。
- 将样本管瞬时离心, 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。
- 保持样本管固定于磁力架上, 加入 **150 μL 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s, 小心吸取上清并丢弃。
- 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体, 有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程移液器将管底液体吸干。

6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将样本管从磁力架上取下，加入 **28 μL NF Water** 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。

8. 室温孵育 5 min。

9. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **26 μL** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置 -20°C 冰箱储存，不超过 24 h。

3.5.3 变性

-  提示
- 使用前请预热 PCR 仪至反应温度。
 - DNA 变性后须置于冰上保持单链状态，否则会影响脱氨效率，进而导致转化率低于 99%。
 - 可使用甲酰胺或 0.15 M 氢氧化钠对 DNA 进行变性（二选一）。

3.5.3.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 34 试剂准备

试剂名称	来源	要求
甲酰胺	客户自备，Diamond, 货号： A100314-O100 或同等功能试剂	从 2°C ~ 8°C 拿出后，室温暂存
0.15 M 氢氧化钠	客户自备	现配现用
NF Water	客户自备	室温储存

-  提示
- 使用 NF Water 将 2 M NaOH 溶液稀释至 1.5 M，例如在 1.5 mL 离心管中添加 100 μL 2 M NaOH 溶液和 33.3 μL NF Water，充分混匀后，可分装并密封保存在 -20°C 。
 - 每次实验取出分装好的一管，稀释 10 倍到 0.15 M 用于变性。使用完毕后需丢弃，不能重复使用。

3.5.3.2 方法一：甲酰胺变性(推荐)

- 向 26 μL 氧化纯化产物中 (3.5.2.2 节步骤 9) 加入 4 μL 甲酰胺，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 (85°C Hold)，按下表的条件进行反应。

表 35 变性反应条件 (体系: 30 μ L)

温度	时间
105 $^{\circ}$ C 热盖	On
85 $^{\circ}$ C	Hold
85 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	5 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 注意 变性也可采用程序: 85 $^{\circ}$ C 10 min (热盖 105 $^{\circ}$ C), 反应结束后迅速置于冰上 2 min。

3. 反应结束后, **立即**将 PCR 管置于冰上, 并进行下步脱氨反应。

3.5.3.3 方法二: 0.15 M NaOH 变性 (可选)

1. 向 26 μ L 氧化纯化产物中 (3.5.2.2 节步骤 9) 加入 4 μ L 0.15 M NaOH, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。
2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 跳过第一步 (50 $^{\circ}$ C Hold), 按下表的条件进行反应。

表 36 变性反应条件 (体系: 30 μ L)

温度	时间
75 $^{\circ}$ C 热盖	On
50 $^{\circ}$ C	Hold
50 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	5 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 注意 变性也可采用程序: 50 $^{\circ}$ C 10 min (热盖 75 $^{\circ}$ C), 反应结束后迅速置于冰上 2 min。

3. 反应结束后, **立即**将 PCR 管置于冰上, 并进行下步脱氨反应。

3.5.4 脱氨

 提示 使用前请预热 PCR 仪至反应温度。

3.5.4.1 准备

试剂: 试剂用前混匀, 使用后请尽快放回冰箱储存。

表 37 试剂准备

试剂名称	来源	要求
NF Water	客户自备	室温储存
APOBEC Reaction Buffer	客户自备试剂盒 NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
BSA		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
APOBEC		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.5.4.2 脱氨

- 根据所需反应数，在冰上配制脱氨反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 38 脱氨反应液的配制

组分	单个反应体积
NF Water	58 μ L
APOBEC Reaction Buffer	10 μ L
BSA	1 μ L
APOBEC	1 μ L
Total	70 μ L

- 吸取 **70 μ L 脱氨反应液**至各样本管中（3.5.3 节步骤 3），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
- 将 PCR 管置于提前预热好的 PCR 仪上，跳过第一步（37 °C Hold），按下表的条件进行反应。

表 39 脱氨反应条件（体系：100 μ L）

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	Hold
37 °C	3 h
4 °C	Hold

- 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底。

II 停止点 脱氨产物可放置 -20 °C 冰箱，不超过 24 h。

3.5.5 脱氨产物纯化

-  提示
- 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。
 - 该步纯化反应洗脱试剂为 **NF Water**。

3.5.5.1 准备

表 40 试剂准备

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

3.5.5.2 脱氨产物纯化

-  提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 **100 μ L DNA Clean Beads** 至样本管中（3.5.4.2 节步骤 4），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管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 **10 min**。
3. 将样本管瞬时离心，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. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **200 μ L 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，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。



注意 乙醇要吸干净，否则将导致 PCR 产量降低。

6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。



提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将样本管从磁力架上取下，加入 **22 μ L NF Water** 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
8. 室温孵育 **10 min**。
9. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **20 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。



停止点 产物纯化后可置 **-20°C** 冰箱储存，不超过 24 h。

3.6 PCR

 **提示** • 操作前请仔细阅读第 46 页“PCR BC Primer 使用说明”，遵循碱基平衡的原则，选择合适的 Barcode。

3.6.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 41 试剂准备

试剂名称	要求
U-PCR Enzyme	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
PCR BC Primer 1-3, 18, 5-8	
PCR BC Primer 9-16	
PCR BC Primer-96	

3.6.2 PCR

1. 分别吸取 U-PCR Enzyme 和 PCR BC Primer 至各样本管中 (3.5.5.2 节步骤 9)，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心使液体收集至管底。

 **注意** U-PCR Enzyme 和 PCR BC Primer 需要分开加到样品中，避免将二者配成混合液之后使用。

表 42 PCR 反应体系

组分	单个反应体积
脱氨纯化产物	20 μL
U-PCR Enzyme	25 μL
PCR BC Primer	5 μL
Total	50 μL

2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 43 PCR 反应条件 (体系: 50 μL)

温度	时间	循环数
105 °C 热盖	on	-
95 °C	2 min	1
98 °C	20 s	N (见下表)
62 °C	20 s	
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	1
4 °C	Hold	-

表 44 不同样本末端修复投入量的 PCR 循环数

片选 DNA 末端修复投入量 (X, ng)	PCR 循环数
X = 50	10
25 ≤ X < 50	11
10 ≤ X < 25	12
游离 DNA 末端修复投入量 (X, ng)	PCR 循环数
X = 20	11
10 ≤ X < 20	12
5 ≤ X < 10	13

 提示 PCR 扩增步骤需要严格控制扩增循环数，可根据 PCR 产量适当调整 PCR 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。当基因组 DNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量产物。

3. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

3.7 PCR 产物纯化

 提示 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

3.7.1 准备

表 45 试剂准备

试剂名称	要求
80% 乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
Purif Suppl	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.7.2 PCR 产物纯化

1. 根据所需反应数，配制 PCR 磁珠混合液，涡旋混匀后置于**室温**。

表 46 PCR 磁珠混合液的配制

组分	单个反应体积
DNA Clean Beads	50 μ L
Purif Suppl	1 μ L
Total	51 μ L

 提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本全部反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

2. 混匀 PCR 磁珠混合液，吸取**51 μ L PCR 磁珠混合液**至样本管中（3.6.2 节步骤 3），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管中。或涡旋混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将样本管瞬时离心，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. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **150 μ 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样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
7. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

8. 将样本管从磁力架上取下，加入 **32 μ L TE Buffer** 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
9. 室温孵育 5 min。
10. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **30 μ L** 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.8 PCR 产物质检

- 吸取 1 μL PCR 纯化后产物，使用双链荧光定量法，按照定量试剂盒的操作说明书对 PCR 纯化后产物进行定量。
- 若需质检 PCR 纯化后产物的片选分布，可使用电泳分离法，按照相应说明书对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。

表 47 PCR 纯化后产物不同质检方法及标准

质检方法	设备/试剂	标准
双链荧光定量法	Qubit dsDNA HS Assay Kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 等	PCR 产物的产量: ≥ 1 pmol
电泳分离法	Tapestation (Agilent Technologies) Bioanalyzer、LabChip GX、GXII、 GX Touch (PerkinElmer)、 Fragment Analyzer (Advanced Analytical) 等	/

PCR 产量可参考如下公式计算。例如，PCR 产物主片段大小 425 bp，其 1 pmol PCR 产物对应的质量 (ng) 应达到 280.5 ng。

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

1 pmol PCR 产物对应的质量 (ng) = PCR 产物主带大小 (bp) × 0.66

公式 2 样本质量计算

样本质量 (ng) = 样本浓度 (ng/μL) × 样本体积 (μL)

公式 3 样本体积计算

样本体积 (μL) = 样本质量 (ng) / 样本浓度 (ng/μL)

下图为磁珠单选样本建库的 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

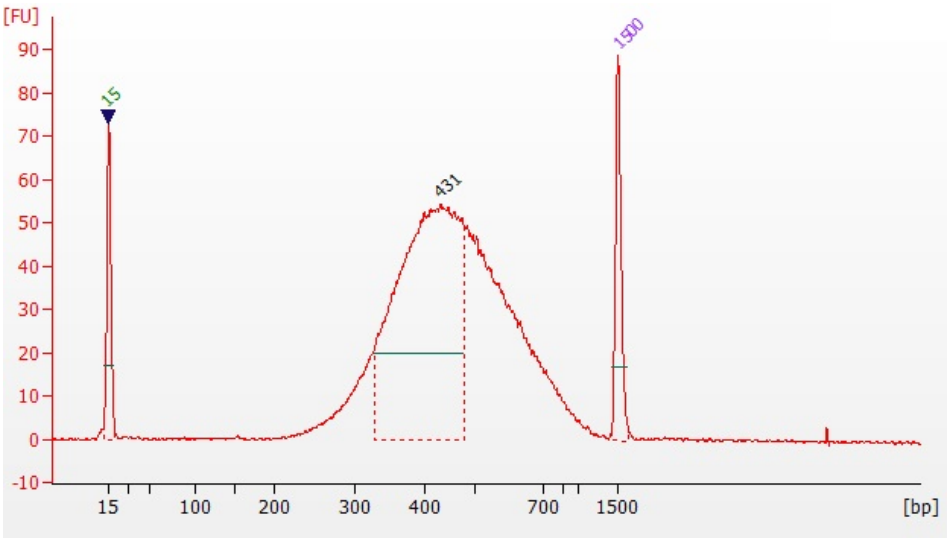


图 3 磁珠单选 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

下图为磁珠双选样本建库的 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

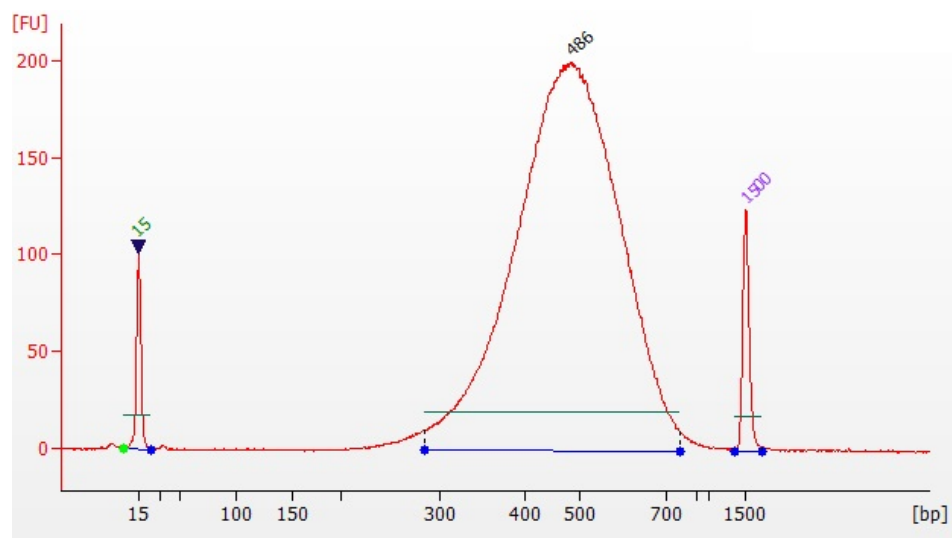


图 4 磁珠双选 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

下图为游离 DNA 建库的 PCR 纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果。

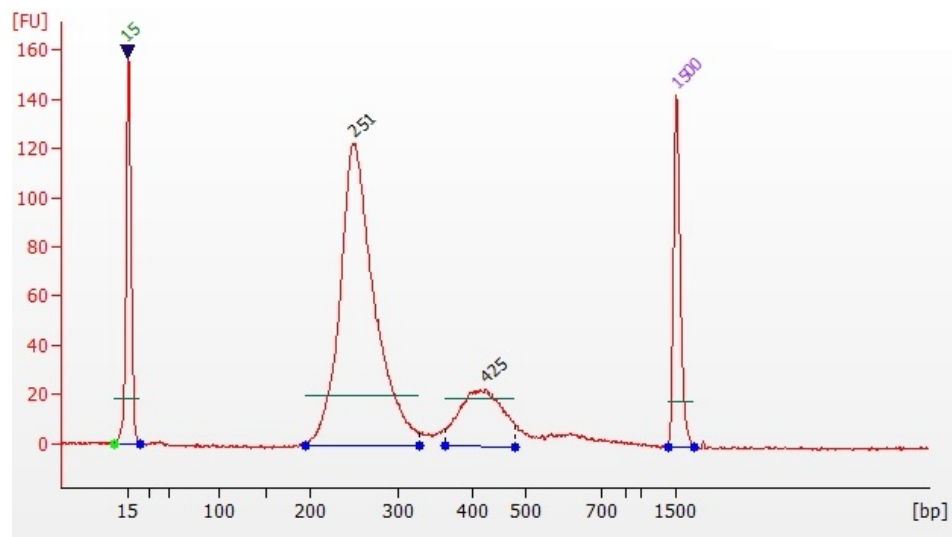


图 5 游离 DNA 建库的 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

⚠ 注意 请勿将 PCR 产物进行多样本 pooling，推荐在 DNB 制备完成后 pooling。

4 环化消化

4.1 变性及单链环化

 提示 参考第 31 页“PCR 产物质检”公式 1 和 3 计算所需样本体积。

4.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 48 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	室温暂存
Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
X Enhancer	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

4.1.2 变性

1. 吸取 **1 pmol PCR 产物**至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补至总体积 **44.5 μL**。
2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 49 变性反应条件 (体系: 44.5 μL)

温度	时间
105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min
4 $^{\circ}\text{C}$	5 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

 注意 变性也可采用程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min (热盖 105 $^{\circ}\text{C}$)，反应结束后迅速放冰上 2 min。

3. 反应结束后，置于冰上，立即进行下一步反应。

4.1.3 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，瞬时离心后置于冰上。

表 50 打断片选 DNA 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
X Enhancer	3.5 μL
Total	15.6 μL

表 51 游离 DNA 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
X Enhancer	1 μL
TE Buffer	2.5 μL
Total	15.6 μL

2. 吸取 15.6 μL 单链环化反应液至各样本管中 (4.1.2 节步骤 3)，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 52 单链环化反应条件 (体系: 60.1 μL)

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	30 min
4 °C	Hold

 提示 请在此步提前配制酶切消化反应液。

4. 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。

4.2 酶切消化

4.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 53 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	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Digestion Stop Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，室温暂存

4.2.2 酶切消化

1. 根据反应数，在冰上配制酶切消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 54 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

2. 吸取 4 μL 酶切消化反应液至样本管中 (4.1.3 节步骤 4)，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 55 酶切消化反应条件 (体系: 64.1 μL)

温度	时间
45 °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 μL Digestion Stop Buffer**, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s。瞬时离心后吸取全部液体至新的 1.5 mL 离心管。

 **注意** 不建议在此处停止, 请继续完成酶切消化产物纯化。如果必须停止, 请放置于 -20 °C 冰箱, 不超过 16 h (但产量可能会下降 20% 左右)。

4.3 消化产物纯化

 **提示** 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

4.3.1 准备

表 56 试剂准备

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

4.3.2 消化产物纯化

1. 混匀 DNA Clean Beads, 吸取 **170 μL DNA Clean Beads** 至各样本管中 (4.2.2 节步骤 4), 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管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 **10 min**。
3. 将离心管瞬时离心, 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. 保持离心管固定于磁力架上, 加入 **500 μL 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s 后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, 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. 保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将离心管从磁力架上取下，加入 **32 μL TE Buffer** 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。

8. 室温孵育 **10 min**。

9. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **30 μL** 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 酶切消化产物纯化后产物可置 -20 °C 冰箱储存。

4.4 消化产物质检

- 吸取 2 μL 单链环状 DNA，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单链环状 DNA 进行定量。
- 最终要求单链环状 DNA (ssCir DNA) ≥ 160 fmol，可根据公式 4 计算所得单链环状 DNA 的摩尔数。例如，PCR 产物主片段大小 425 bp，其单链环状 DNA 应达到 22.44 ng。

公式 4 单链环 fmol 与 ng 间的换算

$$160 \text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.16 \times \text{PCR 产物主带大小 (bp)} \times 0.33$$

单链环状 DNA 产量达到 160 fmol 以上方足够两次上机测序的量。

 注意 请勿将单链环状 DNA 进行多样本 pooling，推荐在 DNB 制备完成后 pooling。

5 测序

5.1 MGISEQ-2000RS WGMS DNB 制备

- 

提示

 - 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。
 - 不同长度的 DNA 文库不建议在任何阶段 pooling 和测序。
 - 长度接近的 DNA 文库 (± 50 bp) 可以在 DNB 制备完成后 pooling。
- 

注意

StandardMPS 和 StandardMPS 2.0 测序试剂的 DNB 制备试剂不一样，DNB 制备时需使用对应的 DNB 制备试剂。

5.1.1 准备

试剂：来自 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装。试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 57 试剂准备

试剂名称	测序试剂套装货号	要求
TE 缓冲液	1000012554 或 1000012555 (StandardMPS)	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 制备缓冲液		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 聚合酶混合液 I		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 聚合酶混合液 II (LC)		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNB 终止缓冲液		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
TE 缓冲液	940-001807-00 或 940-001794-00 (StandardMPS 2.0)	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 制备缓冲液		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 高效聚合酶混合液 I		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 聚合酶混合液 II (LC)		轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

试剂名称	测序试剂套装货号	要求
DNB 终止缓冲液		室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存

5.1.2 退火

1. 吸取 **80 fmol ssCir DNA 产物**至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE 缓冲液补足至总体积 10 μ L，再向其中加入 10 μ L DNB 制备缓冲液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心使液体收集至管底。

表 58 退火反应体系

组分	单个反应体积
ssCir DNA 文库	X μ L
TE 缓冲液	10-X μ L
DNB 制备缓冲液	10 μ L
Total	20 μ L

2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 59 退火反应条件 (体系: 20 μ L)

温度	时间
105 $^{\circ}$ C 热盖	On
95 $^{\circ}$ C	1 min
65 $^{\circ}$ C	1 min
40 $^{\circ}$ C	1 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

3. 反应结束后，瞬时离心，将反应液收集至管底。

5.1.3 DNB 制备

1. 根据所需反应数，在冰上配制 DNB 制备反应液。涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 60 DNB 制备反应液的配制 (StandardMPS)

组分	单个反应体积
DNB 聚合酶混合液 I	20 μ L
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	2 μ L
Total	22 μ L

表 61 DNB 制备反应液的配制 (StandardMPS 2.0)

组分	单个反应体积
DNB 高效聚合酶混合液 I	20 μ L
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	2 μ L
Total	22 μ L

- 吸取 **22 μ L DNB 制备反应液**至各样本管中 (5.1.2 节步骤 3)，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，按下表的条件进行反应。

表 62 DNB 制备反应条件 (体系: 42 μ L)

温度	时间
35 $^{\circ}$ C 热盖	On
30 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

-  **注意**
- DNB 制备反应时间同常规测序不同，仅为 **15 min**。
 - 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 $^{\circ}$ C，或尽可能设置成接近 35 $^{\circ}$ C 的最低温度。
- 当 PCR 仪温度达到 4 $^{\circ}$ C 后立即加入 **10 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 $^{\circ}$ C 保存备用 (24 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。
- DNB 制备完成后，吸取 2 μ L DNB，使用 ssDNA Assay Kit for Qubit 和 Qubit Fluorometer 仪器进行浓度检测。浓度 ≥ 8 ng/ μ L 合格，浓度低于 8 ng/ μ L 的需重新制备。
-  **注意** 因 DNB 较粘稠，建议取 2 μ L 进行检测。

5.2 MGISEQ-2000RS DNB 加载

-  **提示**
- 甲基化文库只建议 DNB pooling，可以视文库数据量情况决定是否 pooling 测序。

- 为保证取样体积的准确性，建议使用正常吸头取样，用阔口吸头混匀。



注意 StandardMPS 和 StandardMPS 2.0 测序试剂的 DNB 加载体系不一样，DNB 加载时需使用对应的加载体系。

5.2.1 DNB 加载 (StandardMPS)

5.2.1.1 准备

试剂：来自 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装。试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 63 试剂准备

试剂名称	要求
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNB 加载缓冲液 II	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存

5.2.1.2 加载体系制备

1. 按照下表配制 DNB 加载体系：

表 64 DNB 加载体系 (StandardMPS)

组分	单个反应体积
DNB	25 μ L
DNB 加载缓冲液 II	8 μ L
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	0.25 μ L
Total	33.25 μ L

2. 使用阔口枪头混匀后，具体加载步骤请参考 MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装说明书第 6 章加载 DNB。

5.2.2 DNB 加载 (StandardMPS 2.0)

5.2.2.1 准备

试剂：来自 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装。试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 65 试剂准备

试剂名称	要求
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

试剂名称	要求
DNB 加载缓冲液 II	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存

5.2.2.2 加载体系制备

- 按照下表配制 DNB 加载体系：

表 66 DNB 加载体系 (StandardMPS 2.0)

组分	单个反应体积
DNB	16.5 μ L
DNB 加载缓冲液 II	16.5 μ L
DNB 聚合酶混合液 II (LC)	0.25 μ L
Total	33.25 μ L

- 使用阔口枪头混匀后，具体加载步骤请参考 MGISEQ-2000RS 系统操作指南 (StandardMPS 2.0) 加载 DNB 章节。

5.3 DNBSEQ-T7RS 测序

 提示 本试剂盒构建的甲基化文库在 DNBSEQ-T7RS 上需使用 DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装 (货号: 940-002625-00) 进行测序。

- 请根据下表选择合适的测序策略。

表 67 甲基化文库测序策略

DNBSEQ-T7RS 相机	样本类型	片选方式	平衡文库	平衡文库比例
V1.0	游离 DNA	不需片选	不需要	0%
V1.0	基因组 DNA	单选或双选	V3.0 标准文库试剂	30%
V2.0	游离 DNA	不需片选	不需要	0%
V2.0	基因组 DNA	单选或双选	不需要	0%

- DNB 制备和 DNB pooling 具体操作步骤请参考 DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装使用说明书第 6 章。
- DNB 加载具体操作步骤请参考 DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装使用说明书第 7 章。
- 测序具体操作步骤请参考 DNBSEQ-T7RS 甲基化高通量测序试剂套装使用说明书第 8 章和第 9 章。

6 附录

6.1 打断条件

下图为 Covaris 官网各型号打断仪 55 μL 体积打断条件，仅供参考。请根据具体参数，将基因组 DNA 打断至 100 bp ~ 1000 bp 之间，主带 300 ~ 700 bp。

表 68 Covaris S220 将基因组 DNA (55 μL) 打断至 150-550 bp 的条件

S220	Vessel	microTUBE-50 AFA Fiber-Screw-Cap (PN 520166)						
								
	Sample Volume	55 μL						
	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 69 不同型号 Covaris 打断仪将基因组 DNA (55 μ L) 打断至 150-550 bp 的条件

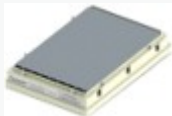
E220	Vessel	MicroTUBE-50 Screw-Cap (PN 520166)	8 microTUBE-50 AFA Fiber Strip V2 (PN 520174) 8 microTUBE-50 AFA Fiber H Slit Strip V2 (PN 520240)	96 microTUBE-50 AFA Fiber Plate (PN 520168) 96 microTUBE-50 AFA Fiber Plate Thin Foil (PN 520232)
				
	Sample Volume	55 μ L		
	Racks	Rack 24 Place microTUBE 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 +6.5 mm 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 evolution	Racks	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
All	Temperature ($^{\circ}$ 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)

表 70 不同型号 Covaris 打断仪将基因组 DNA (55 µL) 打断至 150-550 bp 的条件 (续)

All	Target BP (Peak)	150	200	250	300	350	400	550
Screw-Cap	Peak Incident Power (W)	75	75	75	75	75	75	30
	Duty Factor (%)	15	15	20	20	20	10	10
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	340	145	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)	75	75	75	75	75	75	75
	Duty Factor (%)	15	15	20	20	20	10	10
	Cycles per Burst	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Treatment Time (s)	360	155	70	49	34	50	32

6.2 PCR BC Primer 使用说明

1. 本试剂盒 Barcode 为单 Barcode，且所设计的 Barcode 序列位于引物上。
2. 本试剂盒引物有 2 个规格：16 RXN 和 96 RXN。
- 16 RXN 引物存放在 MGIEasy 全基因组甲基化文库制备模块（货号：940-001529-00），共 2 条八连管引物。
- 96 RXN 引物存放在 MGIEasy 甲基化接头和单端条形码引物模块（货号：940-001531-00），共提供 1 套板式引物。
3. 各规格所搭配引物具体 Barcode 编码信息，见第 46 页“图 6 文库制备模块中 16 RXN Barcode 孔位排列”和第 49 页“图 7 甲基化接头和单端条形码引物模块 PCR BC Primer-96 孔位排列”。

6.2.1 Barcode 引物使用注意

1. 相同 Barcode 编号的文库不可在同一条 lane 中测序。
2. 吸取不同 Barcode 引物时注意更换吸头，避免交叉污染。
3. 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。
4. 对于板式 Barcode 引物，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。
5. 由于设计工艺不同，禁止使用 MGI 其它建库试剂盒中的 Barcode 引物，否则会导致文库构建失败。

6.2.2 Sample Barcode 使用规则 (16 RXN)

1. 对于八连管式 PCR BC Primer，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。
2. 基于碱基组成平衡的原则，PCR BC Primer 必须成组使用。请按照以下说明正确使用。

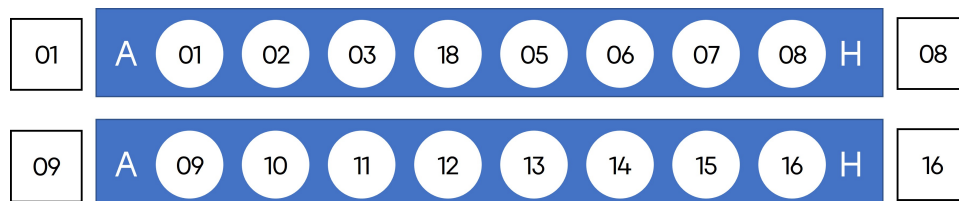


图 6 文库制备模块中 16 RXN Barcode 孔位排列

- 4 个 Barcode 成一组：05-08、09-12、13-16，共计 3 组；
 - 8 个 Barcode 成一组：01-03、18、05-08，共计 1 组。
3. 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。

表 71 Sample Barcode 使用规则 (16 RXN)

样本数/lane	使用方法（举例）
1	需至少使用 1 组 Barcode： 加一组 4 个 Barcode。每个样本加 4 个 Barcode。 例如 13-16，将 4 个 Barcode 取等体积混合成 mix 后加入样本中
2	需至少使用 1 组 Barcode： 加一组 4 个 Barcode。每个样本加 2 个 Barcode。 例如 13-16，将 13 和 14 取等体积混合后加入样本 1 中，将 15 和 16 取等体积混合后加入样本 2 中
3	需至少使用 2 组 Barcode： - 样本 1、2 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Barcode。 - 样本 3 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Barcode。  提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Barcode。
4	需至少使用 1 组 Barcode： 加一组 4 个 Barcode。每个样本加 1 个 Barcode。 例如 13-16，将 13、14、15、16 分别加入样本 1、2、3、4 中
5	需至少使用 2 组 Barcode： - 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Barcode。 - 样本 5 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Barcode。  提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Barcode。
6	需至少使用 2 组 Barcode： - 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Barcode。 - 样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Barcode。  提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Barcode。
7	需使用全部 3 组 Barcode，分三步操作： - 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Barcode。 - 样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Barcode。 - 样本 7，使用剩余的一组 Barcode。加该组内任意一个编号 Barcode。或者将所有编号 Barcode 取等体积混合成 mix 后加入样本中。  提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Barcode。
8	选取两组 4 个 Barcode（09-12 和 13-16）。每个样本加 1 个 Barcode。

样本数/lane	使用方法（举例）
8+x (x=1~8, 总计 9~16个)	分两步操作： 1. 8 样本 ■ 样本1~8 分成 1 组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Barcode。 2. 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 Barcode，并注意按照对应要求加不同组别的 Barcode。  提示 上述两组样本间需使用不同组别的 Barcode。

4. 当样本数据量不同时，一条 lane 中数据量占比大于 20% 的样本不能使用不成组的 Barcode。

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 Barcode 09-16。另外一个样本不可使用单独的一个 Barcode，而是要使用 Barcode 05-08。

6.2.3 Sample Barcode 使用规则 (96 RXN)

1. 对于板式 PCR BC Primer-96，用 75% 酒精喷洒表面并用吸水纸擦拭干净铝膜表面。封膜是可穿透的，封膜表面不能接触尖锐物体。第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝膜直接吸取液体。使用后，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。
2. 基于碱基组成平衡的原则，PCR BC Primer 必须成组使用。请按照以下说明正确使用。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	41	57	65	73	81	89	05	121	25	33	49
B	2	42	58	66	74	82	90	06	120	26	34	50
C	3	43	59	107	75	83	91	07	123	109	35	51
D	18	44	60	68	76	84	92	08	124	28	36	52
E	13	45	61	69	77	85	93	09	125	29	37	53
F	14	46	62	70	78	86	94	10	126	30	38	116
G	15	47	63	71	79	87	95	11	127	114	39	55
H	16	48	64	72	80	88	96	12	128	32	115	56

图 7 甲基化接头和单端条形码引物模块 PCR BC Primer-96 孔位排列

3. PCR BC Primer-96 是每列 A 到 H 8 个为一组预设平衡碱基的 Barcode 组合（13-16、05-08、09-12 为 4 个 Barcode 成一组）。
4. 样本数 < 8，数据量相同，参考附录 第 47 页“表 71 Sample Barcode 使用规则 (16 RXN)”选择 Barcode。
5. 样本数 ≥ 8，数据量相同，可按照下表选择 Barcode。



提示 X 的含义为正整数。例如：8X = 8 乘以 X，代表有 8X 个样本。

表 72 PCR BC Primer-96 混合规则

样本数 / lane	使用方法（举例）
8X	使用 X 组成组的 Barcode，每个样本加 1 个 Barcode
8X+1	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 1 个 Barcode
8X+2	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 2 个 Barcode
8X+3	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 3 个 Barcode
8X+4	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 4 个 Barcode
8X+5	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 5 个 Barcode
8X+6	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 6 个 Barcode
8X+7	使用 X 组成组的 Barcode+其他列任意 7 个 Barcode

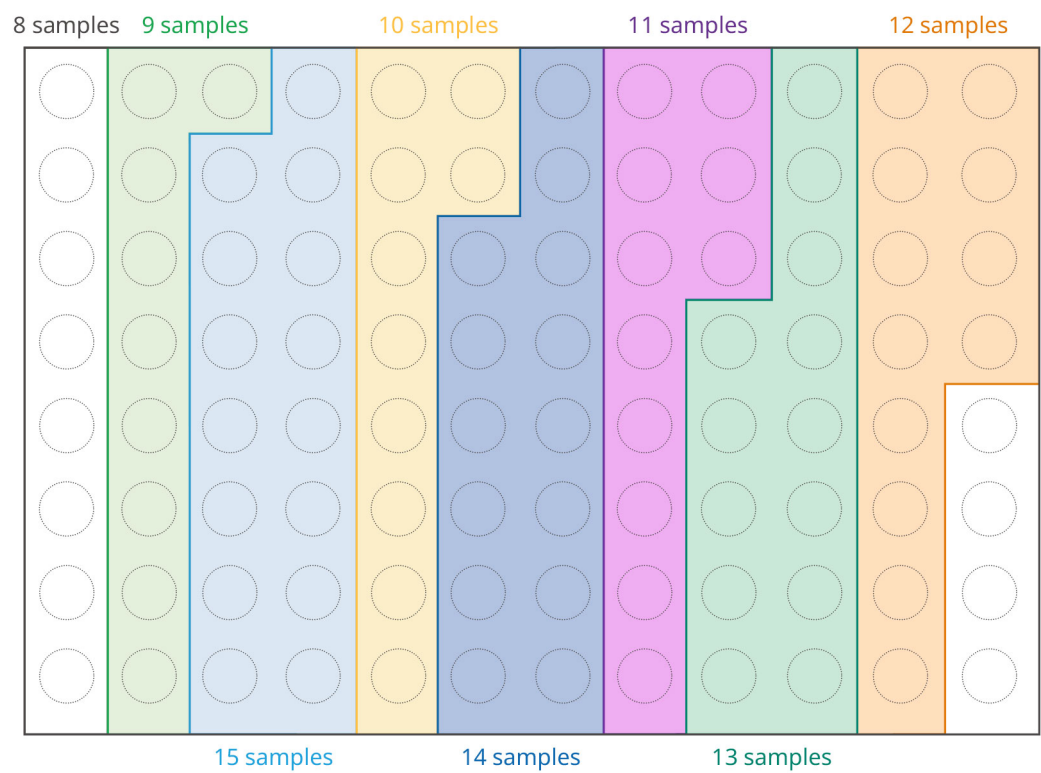


图 8 样本数量 8 到 15 个混合示例

6. 如遇到特殊情况（如 1 个孔位 Barcode 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相同，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 73 成组的 8 个 Barcode (各碱基含量符合要求)

Sample1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	A
Sample2	C	T	G	A	A	C	C	G	A	A
Sample3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample6	C	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample7	T	T	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample8	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 74 不成组的 9 个 Barcode (各碱基含量不符合要求)

Sample1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	T
Sample2	A	C	G	A	A	G	G	T	C	C
Sample3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample6	G	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample7	T	G	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample8	G	G	A	T	G	A	T	A	C	C
Sample9	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	<u>0</u>
T碱基占比 (%)	22.2	<u>0</u>	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	33.3	22.2	33.3
C碱基占比 (%)	<u>0</u>	33.3	33.3	22.2	22.2	<u>0</u>	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

--- 此页有意留白 ---