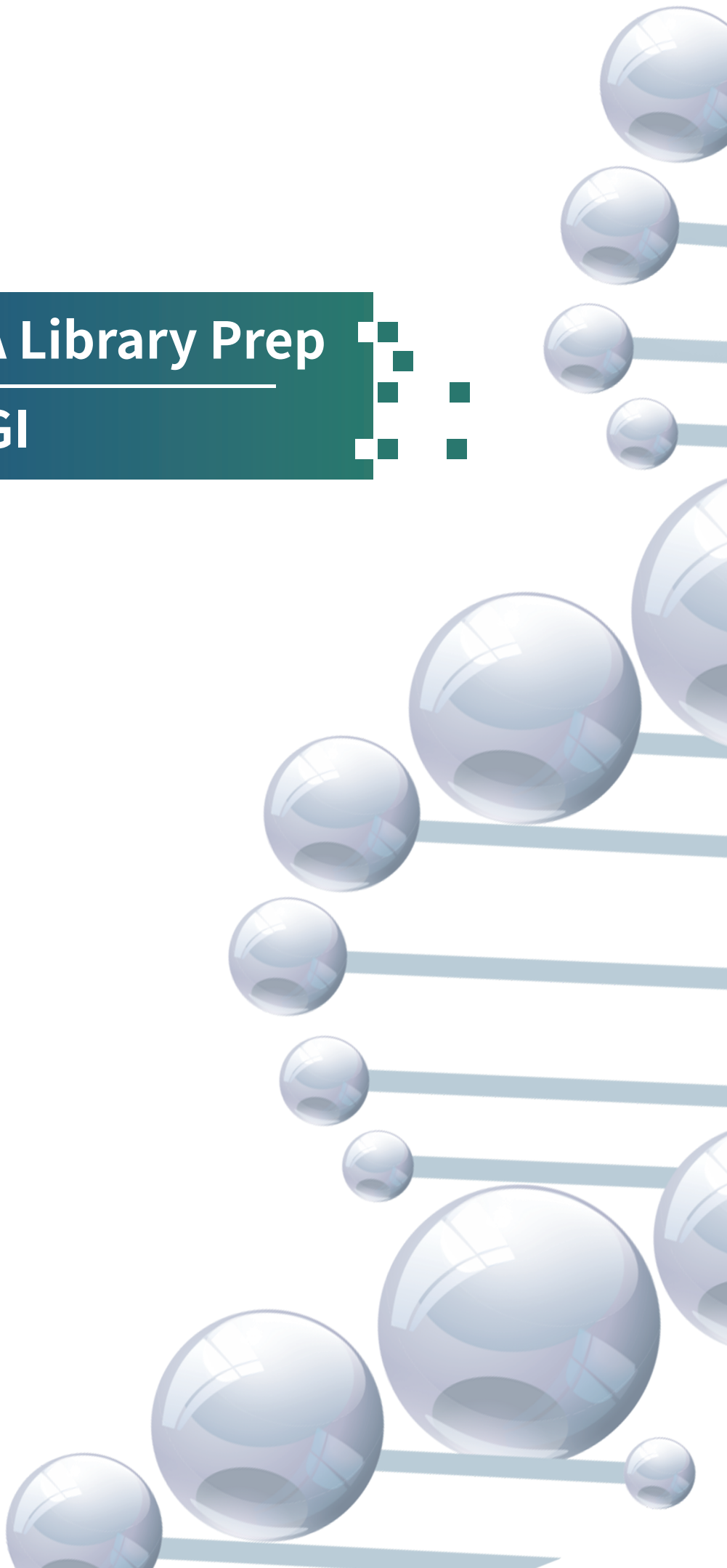


# MagicSeq DNA Library Prep Plus Kit for MGI

Magicbio # M320



## 产品简介

MagicSeq DNA Library Prep Plus Kit for MGI是针对华大测序平台开发的DNA文库构建试剂盒。试剂盒包含片段化模块,利用时间依赖型酶促反应的原理将双链DNA随机切割成200~500 bp的片段,并通过优化的末端修复、接头连接、文库扩增等步骤,可将20ng-300ng的dsDNA转化为DNA文库,具有较高的文库转化率和扩增文库产出。适用于各种样本类型和物种来源,包括各原核真核基因组、动植物基因组、人基因组等。

## 试剂盒组成

产品成分	M3201 (24 rxn)	M3202 (96 rxn)
FEA buffer	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
FEA Enzyme Mix	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L
Ligation Mix	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L
DNA Adapter*	720 $\mu$ L	2 $\times$ 1.5 mL
Adapter Dilution Buffer	1 mL	2 $\times$ 1.5 mL
2 $\times$ HiFi Amplification Mix	600 $\mu$ L	2 $\times$ 1.2 mL
Index Primer Mix	24 $\times$ 5 $\mu$ L	96 $\times$ 5 $\mu$ L

\*本试剂盒所提供接头为双端接头,两端index在引物上,通过PCR扩增得到完整文库。

**保存条件** -20 $^{\circ}$ C保存

## 注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书,确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用无核酸酶的枪头、EP管进行试验。
4. 样本DNA总量最低不可低于5ng,最高不可高于300ng。推荐DNA上样量100ng。
5. DNA浓度需使用Qubit等染料法测定,起始DNA量测定不准确,会影响文库得率;
6. 实验所用磁珠应提前30分钟自4 $^{\circ}$ C环境中取出,平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
7. 80%乙醇需现配现用,用其清洗磁珠后,需清除干净,避免对后续反应产生影响。

## 需自备材料

无水乙醇;Nuclease-Free H<sub>2</sub>O; Magic DNA Select Beads (DNA片段分选纯化磁珠) 或效果相同的磁珠;  
 200 $\mu$ L PCR管;1.5mL离心管;磁力架;PCR仪

## 操作步骤

### 1 片段化、末端修复及加A:

1) 将试剂置于冰上融解并充分混匀、离心,在PCR管中冰上配制如下反应体系:

组分	体积
gDNA样品	X $\mu$ L
FEA buffer	10 $\mu$ L
FEA Enzyme Mix	5 $\mu$ L
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	(35-X) $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

- 2) 涡旋震荡混匀后离心,放入PCR仪运行程序:37°C 10 min\*;75°C 10 min,4°C Hold;热盖On;  
 \*注:按照该时间片段化所得片段主峰在300~400bp,如Input DNA质量不佳或片段化大小不在预期范围,建议以2-5 min的幅度上下调整片段化时间。
- 3) 反应结束后立即进行下一步;

## 2 接头连接

根据原始DNA样本投入量参考下表准备接头。

接头用Adapter Dilution Buffer稀释,不可用水或其他溶液稀释。

Input DNA	Adapter稀释倍数
100ng-300ng	不稀释
25ng-100ng	1:2
5ng-25ng	1:10

- 1) 取Ligation Mix 5 $\mu$ L加入加A完成的样本中。
- 2) 再分别加入30 $\mu$ L准备好的接头(加入接头后立即吹吸混匀),注意避免交叉污染。
- 3) 充分混匀后离心,在PCR仪中进行如下反应:20°C 25 min,75°C 5 min,4°C Hold;
- 4) 反应结束后取出,立即进行下一步。

## 3 根据是否需要片段筛选选择步骤3.1或3.2.

### 3.1 纯化(不筛选)

- 1) 将室温放置30min后的Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀,吸取85 $\mu$ L加入连接产物,吹打混匀,室温静置5min。
- 2) 放到磁力架上直至液体澄清,吸弃上清。
- 3) 加入200 $\mu$ L新鲜配制的80%乙醇,静置30s,吸弃上清。
- 4) 重复一次上一步,并弃尽上清,室温晾干。
- 5) 加入22 $\mu$ L Nuclease-Free H<sub>2</sub>O,吹打混匀,室温孵育2min。
- 6) 放到磁力架上直至液体澄清,吸取20 $\mu$ L上清至一个新的PCR管。

### 3.2 片段大小筛选

磁珠用量需根据目标文库片段大小调整,具体用量参照下表:

文库平均总长度	~280 bp	~380 bp	~480 bp	~560 bp
文库平均插入长度	~150 bp	~250 bp	~350 bp	~430 bp
文库总长度分布范围	200~350 bp	250~550 bp	300~650 bp	400~900 bp
第一轮磁珠用量	R1=40 $\mu$ L	R1=30 $\mu$ L	R1=20 $\mu$ L	R1=10 $\mu$ L
第二轮磁珠用量	R2=20 $\mu$ L	R2=15 $\mu$ L	R2=15 $\mu$ L	R2=15 $\mu$ L

- 1) 向连接后的样本中加入15 $\mu$ L Nuclease-Free H<sub>2</sub>O,补足体积到100 $\mu$ L。
- 2) 将室温放置30min后的Magic DNA Select Beads涡旋震荡混匀,吸取R1体积的Magic DNA Select Beads加入上步产物中,吹打10次充分混匀,室温放置5min;
- 3) 将样品管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体,待溶液澄清转移上清至干净离心管中,丢弃磁珠;
- 4) 向上清中加入R2体积的Magic DNA Select Beads,吹打10次充分混匀,室温孵育5min;
- 5) 短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体约5min,待溶液澄清移除上清;
- 6) 保持样品管始终处于磁力架上,加入200 $\mu$ L 80%乙醇漂洗磁珠,室温静置30s后移除上清;

- 7) 重复步骤5, 总计漂洗两次; 短暂离心, 用10 $\mu$ L移液器吸去剩余乙醇;
- 8) 保持样品管始终处于磁力架上, 开盖干燥磁珠;
- 9) 将样品管从磁力架中取出, 加入22 $\mu$ L Nuclease-Free H<sub>2</sub>O洗脱, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置2min;
- 10) 将样品管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清, 吸取20 $\mu$ L上清至干净的0.2mL PCR管中;

#### 4 文库扩增

- 1) 将试剂于冰上融解, 配制以下反应体系:

组分	体积
上步反应产物	20 $\mu$ L
2 $\times$ HiFi Amplification Mix	25 $\mu$ L
Index Primer Mix	5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

- 2) 充分混匀后在PCR仪中, 进行如下反应:

温度	时间	循环数
98 $^{\circ}$ C	2min	
98 $^{\circ}$ C	20s	} 6-12Cycles*
60 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	1min	
4 $^{\circ}$ C	$\infty$	

\* 注: 请根据 DNA 的质量和上样量确定 PCR 循环数。一般对于 100 ng、10ng 文库起始 DNA, 在进行 PCR 富集时分别需要扩增 6、10 个循环获得约 1 $\mu$ g 产出, 可根据具体情况调整。如果在 PCR 富集之前经过片段长度筛选步骤, 则建议在原有基础上再增加 2~4 个循环; 如果 DNA 质量较差 (比如提取于 FFPE 样品), 则建议在原有基础上再增加 1~3 个循环。

- 3) 将室温放置 30min 后的 Magic DNA Select Beads 涡旋震荡混匀, 吸取 50  $\mu$ L 体积的 Magic DNA Select Beads 加入 PCR 产物中, 吹打 10 次充分混匀, 室温放置 5min;
- 4) 短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体约 5min, 待溶液澄清后移除上清;
- 5) 保持样品管始终处于磁力架上, 加入 200 $\mu$ L 80% 乙醇漂洗磁珠, 室温静置 30s 后移除上清;
- 6) 重复步骤 5, 总计漂洗两次; 短暂离心, 用 10 $\mu$ L 移液器吸去剩余乙醇;
- 7) 保持样品管始终处于磁力架上, 开盖空气干燥磁珠;
- 8) 将离心管从磁力架中取出, 加入 22 $\mu$ L Nuclease-Free H<sub>2</sub>O 或 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 洗脱, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置 2min;
- 9) 将离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清, 吸取 20 $\mu$ L 上清至干净的 PCR 管中;

#### 5 文库质检

推荐使用凝胶电泳或者 Agilent 生物分析仪等检测文库片段分布、使用 qPCR 进行浓度检测。

**附表 Index 序列**
**Set2**

Index Primer 编号	Index F	Index R	Index Primer 编号	Index F	Index R
Index Primer 01	TAGAGGACAA	CATCACTCAC	Index Primer 49	AGATCTTGCG	CATCACTCAC
Index Primer 02	TAGAGGACAA	CAGCTGACTC	Index Primer 50	AGATCTTGCG	CAGCTGACTC
Index Primer 03	TAGAGGACAA	TTCGCAGACA	Index Primer 51	AGATCTTGCG	TTCGCAGACA
Index Primer 04	TAGAGGACAA	TTGTACCAAT	Index Primer 52	AGATCTTGCG	TTGTACCAAT
Index Primer 05	TAGAGGACAA	ACCACAATCG	Index Primer 53	AGATCTTGCG	ACCACAATCG
Index Primer 06	TAGAGGACAA	GGAAGTCTGT	Index Primer 54	AGATCTTGCG	GGAAGTCTGT
Index Primer 07	TAGAGGACAA	AGAGTGTTGA	Index Primer 55	AGATCTTGCG	AGAGTGTTGA
Index Primer 08	TAGAGGACAA	GCTTGTGGTG	Index Primer 56	AGATCTTGCG	GCTTGTGGTG
Index Primer 09	CCTAGCGAAT	CATCACTCAC	Index Primer 57	CGCTATCGGC	CATCACTCAC
Index Primer 10	CCTAGCGAAT	CAGCTGACTC	Index Primer 58	CGCTATCGGC	CAGCTGACTC
Index Primer 11	CCTAGCGAAT	TTCGCAGACA	Index Primer 59	CGCTATCGGC	TTCGCAGACA
Index Primer 12	CCTAGCGAAT	TTGTACCAAT	Index Primer 60	CGCTATCGGC	TTGTACCAAT
Index Primer 13	CCTAGCGAAT	ACCACAATCG	Index Primer 61	CGCTATCGGC	ACCACAATCG
Index Primer 14	CCTAGCGAAT	GGAAGTCTGT	Index Primer 62	CGCTATCGGC	GGAAGTCTGT
Index Primer 15	CCTAGCGAAT	AGAGTGTTGA	Index Primer 63	CGCTATCGGC	AGAGTGTTGA
Index Primer 16	CCTAGCGAAT	GCTTGTGGTG	Index Primer 64	CGCTATCGGC	GCTTGTGGTG
Index Primer 17	GTAGTCATCG	CATCACTCAC	Index Primer 65	GCAACGATGG	CATCACTCAC
Index Primer 18	GTAGTCATCG	CAGCTGACTC	Index Primer 66	GCAACGATGG	CAGCTGACTC
Index Primer 19	GTAGTCATCG	TTCGCAGACA	Index Primer 67	GCAACGATGG	TTCGCAGACA
Index Primer 20	GTAGTCATCG	TTGTACCAAT	Index Primer 68	GCAACGATGG	TTGTACCAAT
Index Primer 21	GTAGTCATCG	ACCACAATCG	Index Primer 69	GCAACGATGG	ACCACAATCG
Index Primer 22	GTAGTCATCG	GGAAGTCTGT	Index Primer 70	GCAACGATGG	GGAAGTCTGT
Index Primer 23	GTAGTCATCG	AGAGTGTTGA	Index Primer 71	GCAACGATGG	AGAGTGTTGA
Index Primer 24	GTAGTCATCG	GCTTGTGGTG	Index Primer 72	GCAACGATGG	GCTTGTGGTG
Index Primer 25	GCTGAGCTGT	CATCACTCAC	Index Primer 73	TAATCGTTCA	CATCACTCAC
Index Primer 26	GCTGAGCTGT	CAGCTGACTC	Index Primer 74	TAATCGTTCA	CAGCTGACTC
Index Primer 27	GCTGAGCTGT	TTCGCAGACA	Index Primer 75	TAATCGTTCA	TTCGCAGACA
Index Primer 28	GCTGAGCTGT	TTGTACCAAT	Index Primer 76	TAATCGTTCA	TTGTACCAAT
Index Primer 29	GCTGAGCTGT	ACCACAATCG	Index Primer 77	TAATCGTTCA	ACCACAATCG
Index Primer 30	GCTGAGCTGT	GGAAGTCTGT	Index Primer 78	TAATCGTTCA	GGAAGTCTGT
Index Primer 31	GCTGAGCTGT	AGAGTGTTGA	Index Primer 79	TAATCGTTCA	AGAGTGTTGA
Index Primer 32	GCTGAGCTGT	GCTTGTGGTG	Index Primer 80	TAATCGTTCA	GCTTGTGGTG
Index Primer 33	AACCTAGATA	CATCACTCAC	Index Primer 81	GTTGCTCTA	CATCACTCAC
Index Primer 34	AACCTAGATA	CAGCTGACTC	Index Primer 82	GTTGCTCTA	CAGCTGACTC
Index Primer 35	AACCTAGATA	TTCGCAGACA	Index Primer 83	GTTGCTCTA	TTCGCAGACA
Index Primer 36	AACCTAGATA	TTGTACCAAT	Index Primer 84	GTTGCTCTA	TTGTACCAAT
Index Primer 37	AACCTAGATA	ACCACAATCG	Index Primer 85	GTTGCTCTA	ACCACAATCG
Index Primer 38	AACCTAGATA	GGAAGTCTGT	Index Primer 86	GTTGCTCTA	GGAAGTCTGT
Index Primer 39	AACCTAGATA	AGAGTGTTGA	Index Primer 87	GTTGCTCTA	AGAGTGTTGA
Index Primer 40	AACCTAGATA	GCTTGTGGTG	Index Primer 88	GTTGCTCTA	GCTTGTGGTG
Index Primer 41	TTGCCATCTC	CATCACTCAC	Index Primer 89	TCTCACACAT	CATCACTCAC
Index Primer 42	TTGCCATCTC	CAGCTGACTC	Index Primer 90	TCTCACACAT	CAGCTGACTC
Index Primer 43	TTGCCATCTC	TTCGCAGACA	Index Primer 91	TCTCACACAT	TTCGCAGACA
Index Primer 44	TTGCCATCTC	TTGTACCAAT	Index Primer 92	TCTCACACAT	TTGTACCAAT
Index Primer 45	TTGCCATCTC	ACCACAATCG	Index Primer 93	TCTCACACAT	ACCACAATCG
Index Primer 46	TTGCCATCTC	GGAAGTCTGT	Index Primer 94	TCTCACACAT	GGAAGTCTGT
Index Primer 47	TTGCCATCTC	AGAGTGTTGA	Index Primer 95	TCTCACACAT	AGAGTGTTGA
Index Primer 48	TTGCCATCTC	GCTTGTGGTG	Index Primer 96	TCTCACACAT	GCTTGTGGTG

**Set3**

Index Primer 编号	Index F	Index R	Index Primer 编号	Index F	Index R
Index Primer97	TAGAGGACAA	TTGTCCTCTA	Index Primer145	AGATCTTGCG	TTGTCCTCTA
Index Primer98	TAGAGGACAA	ATTCGCTAGG	Index Primer146	AGATCTTGCG	ATTCGCTAGG
Index Primer99	TAGAGGACAA	CGATGACTAC	Index Primer147	AGATCTTGCG	CGATGACTAC
Index Primer100	TAGAGGACAA	ACAGCTCAGC	Index Primer148	AGATCTTGCG	ACAGCTCAGC
Index Primer101	TAGAGGACAA	TATCTAGGTT	Index Primer149	AGATCTTGCG	TATCTAGGTT
Index Primer102	TAGAGGACAA	GAGATGGCAA	Index Primer150	AGATCTTGCG	GAGATGGCAA
Index Primer103	TAGAGGACAA	CGCAAGATCT	Index Primer151	AGATCTTGCG	CGCAAGATCT
Index Primer104	TAGAGGACAA	GCCGATAGCG	Index Primer152	AGATCTTGCG	GCCGATAGCG
Index Primer105	CCTAGCGAAT	TTGTCCTCTA	Index Primer153	CGCTATCGGC	TTGTCCTCTA
Index Primer106	CCTAGCGAAT	ATTCGCTAGG	Index Primer154	CGCTATCGGC	ATTCGCTAGG
Index Primer107	CCTAGCGAAT	CGATGACTAC	Index Primer155	CGCTATCGGC	CGATGACTAC
Index Primer108	CCTAGCGAAT	ACAGCTCAGC	Index Primer156	CGCTATCGGC	ACAGCTCAGC
Index Primer109	CCTAGCGAAT	TATCTAGGTT	Index Primer157	CGCTATCGGC	TATCTAGGTT
Index Primer110	CCTAGCGAAT	GAGATGGCAA	Index Primer158	CGCTATCGGC	GAGATGGCAA
Index Primer111	CCTAGCGAAT	CGCAAGATCT	Index Primer159	CGCTATCGGC	CGCAAGATCT
Index Primer112	CCTAGCGAAT	GCCGATAGCG	Index Primer160	CGCTATCGGC	GCCGATAGCG
Index Primer113	GTAGTCATCG	TTGTCCTCTA	Index Primer161	GCAACGATGG	TTGTCCTCTA
Index Primer114	GTAGTCATCG	ATTCGCTAGG	Index Primer162	GCAACGATGG	ATTCGCTAGG
Index Primer115	GTAGTCATCG	CGATGACTAC	Index Primer163	GCAACGATGG	CGATGACTAC
Index Primer116	GTAGTCATCG	ACAGCTCAGC	Index Primer164	GCAACGATGG	ACAGCTCAGC
Index Primer117	GTAGTCATCG	TATCTAGGTT	Index Primer165	GCAACGATGG	TATCTAGGTT
Index Primer118	GTAGTCATCG	GAGATGGCAA	Index Primer166	GCAACGATGG	GAGATGGCAA
Index Primer119	GTAGTCATCG	CGCAAGATCT	Index Primer167	GCAACGATGG	CGCAAGATCT
Index Primer120	GTAGTCATCG	GCCGATAGCG	Index Primer168	GCAACGATGG	GCCGATAGCG
Index Primer121	GCTGAGCTGT	TTGTCCTCTA	Index Primer169	TAATCGTTCA	TTGTCCTCTA
Index Primer122	GCTGAGCTGT	ATTCGCTAGG	Index Primer170	TAATCGTTCA	ATTCGCTAGG
Index Primer123	GCTGAGCTGT	CGATGACTAC	Index Primer171	TAATCGTTCA	CGATGACTAC
Index Primer124	GCTGAGCTGT	ACAGCTCAGC	Index Primer172	TAATCGTTCA	ACAGCTCAGC
Index Primer125	GCTGAGCTGT	TATCTAGGTT	Index Primer173	TAATCGTTCA	TATCTAGGTT
Index Primer126	GCTGAGCTGT	GAGATGGCAA	Index Primer174	TAATCGTTCA	GAGATGGCAA
Index Primer127	GCTGAGCTGT	CGCAAGATCT	Index Primer175	TAATCGTTCA	CGCAAGATCT
Index Primer128	GCTGAGCTGT	GCCGATAGCG	Index Primer176	TAATCGTTCA	GCCGATAGCG
Index Primer129	AACCTAGATA	TTGTCCTCTA	Index Primer177	GTTTCGCTCTA	TTGTCCTCTA
Index Primer130	AACCTAGATA	ATTCGCTAGG	Index Primer178	GTTTCGCTCTA	ATTCGCTAGG
Index Primer131	AACCTAGATA	CGATGACTAC	Index Primer179	GTTTCGCTCTA	CGATGACTAC
Index Primer132	AACCTAGATA	ACAGCTCAGC	Index Primer180	GTTTCGCTCTA	ACAGCTCAGC
Index Primer133	AACCTAGATA	TATCTAGGTT	Index Primer181	GTTTCGCTCTA	TATCTAGGTT
Index Primer134	AACCTAGATA	GAGATGGCAA	Index Primer182	GTTTCGCTCTA	GAGATGGCAA
Index Primer135	AACCTAGATA	CGCAAGATCT	Index Primer183	GTTTCGCTCTA	CGCAAGATCT
Index Primer136	AACCTAGATA	GCCGATAGCG	Index Primer184	GTTTCGCTCTA	GCCGATAGCG
Index Primer137	TTGCCATCTC	TTGTCCTCTA	Index Primer185	TCTCACACAT	TTGTCCTCTA
Index Primer138	TTGCCATCTC	ATTCGCTAGG	Index Primer186	TCTCACACAT	ATTCGCTAGG
Index Primer139	TTGCCATCTC	CGATGACTAC	Index Primer187	TCTCACACAT	CGATGACTAC
Index Primer140	TTGCCATCTC	ACAGCTCAGC	Index Primer188	TCTCACACAT	ACAGCTCAGC
Index Primer141	TTGCCATCTC	TATCTAGGTT	Index Primer189	TCTCACACAT	TATCTAGGTT
Index Primer142	TTGCCATCTC	GAGATGGCAA	Index Primer190	TCTCACACAT	GAGATGGCAA
Index Primer143	TTGCCATCTC	CGCAAGATCT	Index Primer191	TCTCACACAT	CGCAAGATCT
Index Primer144	TTGCCATCTC	GCCGATAGCG	Index Primer192	TCTCACACAT	GCCGATAGCG