编号：SOP-013-B02-128

华大智造
MGI

使用说明书

版本：9.0

MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA文库制备试剂套装

货号：1000013454 (16 RXN, V1.2)
1000013455 (96 RXN, V1.3)

仅供科研使用

创新智造
引领生命科技

关于说明书

©2024 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®、Agilent Technologies®、Ambion®、 Axygen®、BIOWEST®、Invitrogen®、Qubit® 、 TRANSGEN™、Thermo Fisher®，以及文中涉及的其它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
9.0	V1.2 (16 RXN) V1.3 (96 RXN)	2024 年 3 月	变更制造商信息
8.0	V1.2 (16 RXN) V1.3 (96 RXN)	2023 年 11 月	• 更改 1.4 组分的表 1 和表 2 中MGIEasy DNA纯化磁珠的货号 • 更新联系电话、更新说明书风格 • 删除附录“关于磁珠及纯化”“关于接头连接” • 增加1.8流程
A6	V1.2 (16 RXN) V1.3 (96 RXN)	2022 年 2 月	• 更改步骤 3.2 酶切打断的操作说明 • 优化部分语句表述
A5	V1.2 (16 RXN) V1.3 (96 RXN)	2021 年 4 月	• 更改适用范围,删除 WGA 样本和人组织样本 • 新增适配测序平 DNBSEQ-T10 × 4 RS (PE100) • 更改样本要求为 2.0 ≥ $OD_{260/280}$ ≥ 1.8，$OD_{260/230}$ ≥1.7 • 更改打断酶的名称为 FS Buffer II 和 FS Enzyme Mix II • 更新 16 RXN 试剂盒版本为 V1.2，96 RXN 试剂盒版本为 V1.3 • 更改 3.2 部分的 gDNA 均一化方法、打断反应条件、打断产物磁珠双选条件
A4	V1.1 (16 RXN) V1.2 (96 RXN)	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A3	V1.1 (16 RXN) V1.2 (96 RXN)	2020 年 7 月	变更公司名称
A2	V1.1 (16 RXN) V1.2 (96 RXN)	2020 年 5 月	• 更新 96 RXN 试剂盒版本为 V1.2 • 更新 96 RXN MGIEasy 酶切PCR-Free DNA文库制备试剂盒中各组分的规格

说明书版本	试剂盒版本	日期	修订内容摘要
A1	V1.1	2019 年 12 月	• 更新试剂盒版本为 V1.1 • 降低基因组DNA起始量要求 (最低至 50ng) • 增加产品适用范围 (WGA DNA) • 增加 DNA 打断产物磁珠单选条件，对应步骤3.3.2 • 增加产品适配测序平台 (MGISEQ-200RS PE100、DNBSEQ-T7RS PE100) • 更改 DNA 酶切打断、接头连接、单链环化步骤的 PCR 反应时间 • 更改试剂准备步骤 En-TE 的配制体积 • 更改酶切消化产物纯化步骤低起始量文库 elute 体积 • 更新连接产物定量合格的标准
A0	V1.0	2019 年 5 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 适配测序平台 1
1.4 组分 1
1.5 储存与运输 4
1.6 自备物料清单 4
1.7 注意事项 5
1.8 流程 6

2 样本要求及处理 7

2.1 样本要求 7
2.2 文库插入大小要求 7
2.3 起始量与片选方法 8

3 文库构建标准流程 9

3.1 试剂配制 9
3.2 酶切打断 10
3.3 打断产物片段筛选 12
3.4 末端修复 16
3.5 接头连接 17
3.6 连接产物纯化 18

4 环化消化 20

4.1 变性、单链环化 20
4.2 酶切消化 21
4.3 消化产物纯化 22
4.4 消化产物质检 23

5 附录 25

5.1 关于 Adapter 使用 25

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂套装是针对华大智造（MGI）高通量测序平台量身打造的 WGS PCR-free 文库构建试剂套装。本试剂套装可快速将 50 ng ~ 1000 ng 基因组 DNA 制备成 MGI 高通量测序平台专用的文库。本试剂盒采用高质量的快速打断酶，改进接头连接技术，显著提高文库转化率。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

本试剂套装适用于常见的动物、植物、真菌、细菌等物种，例如小鼠、人（血液、唾液）、水稻、光滑念珠菌、大肠杆菌等。

不同类型样本在建库之前需进行酶切打断条件测试，以达到最佳打断效果。

1.3 适配测序平台

构建的文库可用于以下平台及测序类型：

- MGISEQ-200RS (PE100/PE150)
- MGISEQ-2000RS (PE100/PE150)
- DNBSEQ-T7RS (PE100/PE150)
- DNBSEQ-T10 ×4RS (PE100)

1.4 组分

MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA 文库制备试剂套装有 2 个规格，分别是 16 RXN 和 96 RXN。每个试剂套装包含 3 个独立试剂盒。不同规格的套装中所包含的试剂盒、货号、组分信息见下表。

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 1 MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA文库制备试剂套装V1.2（16 RXN）（货号：1000013454）

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA文库制备试剂盒 V1.2 货号：1000013458	20 × Elute Enhancer	黑色	3 μL/支 × 1
	FS Buffer II	绿色	160 μL/支 × 1
	FS Enzyme Mix II	绿色	80 μL/支 × 1
	ER Buffer	橙色	112 μL/支 × 1
	ER Enzyme Mix	橙色	48 μL/支 × 1
	Ad-Lig Buffer	红色	288 μL/支 × 1
	Ad Ligase	红色	80 μL/支 × 1
	Ligation Enhancer	棕色	32 μL/支 × 1
	Cir Buffer	紫色	184 μL/支 × 1
	Cir Enzyme Mix	紫色	8 μL/支 × 1
	Exo Buffer	白色	23 μL/支 × 1
	Exo Enzyme Mix	白色	42 μL/支 × 1
	Exo Stop Buffer	白色	48 μL/支 × 1
MGIEasy PF Adapters-16（管式）试剂盒 货号：1000013460	DNA Adapters	无色	5 μL/支 × 16
MGIEasy DNA纯化磁珠 货号：940-001596-00	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 × 1
	TE Buffer	白色	4 mL/支 × 1

表 2 MGIEasy PCR-Free DNA文库制备试剂套装V1.3（96 RXN）（货号：1000013455）

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA文库制备试剂盒 V1.3 货号：1000013459	20 × Elute Enhancer	黑色	20 µL/支 × 1
	FS Buffer II	绿色	1120 µL/支 × 1
	FS Enzyme Mix II	绿色	640 µL/支 × 1
	ER Buffer	橙色	896 µL/支 × 1
	ER Enzyme Mix	橙色	352 µL/支 × 1
	Ad-Lig Buffer	红色	1108 µL/支 × 1
	Ad Ligase	红色	560 µL/支 × 1
	Ligation Enhancer	棕色	304 µL/支 × 1
	Cir Buffer	紫色	1456 µL/支 × 1
	Cir Enzyme Mix	紫色	60 µL/支 × 1
	Exo Buffer	白色	1280 µL/支 × 1
	Exo Enzyme Mix	白色	374 µL/支 × 1
	Exo Stop Buffer	白色	512 µL/支 × 1
MGIEasy PF Adapters-96（板式）试剂盒 货号：1000013461	DNA Adapters-96 plate	-	5 µL/孔 × 96
MGIEasy DNA纯化磁珠 货号：940-001594-00	DNA Clean Beads	白色	50 mL/支 × 1
	TE Buffer	白色	25 mL/支 × 1

1.5 储存与运输

表 3 试剂盒储存与运输条件

试剂盒		储存温度	运输温度
MGIEasy 酶切 PCR-Free DNA文库制备试剂盒	20 × Elute Enhancer	2 ℃~30 ℃	-80 ℃~-15 ℃
	Exo Stop Buffer		
	Ligation Enhancer	2 ℃~30 ℃ 避光	
	其他试剂	-25 ℃~-15 ℃	
MGIEasy PF Adapters-16 (管式)试剂盒			
MGIEasy PF Adapters-96 (板式)试剂盒			
MGIEasy DNA 纯化磁珠		2 ℃~8 ℃	2 ℃~8 ℃

提示
- 有效期见试剂盒标签。
- 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。
- 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 自备物料清单

表 4 设备清单

名称	推荐品牌
旋涡混匀仪	/
小型离心机	/
移液器	/
PCR仪（可调节热盖温度）	/
96 孔板磁力架	ALPAQUA, Part#A00400 或同等功能仪器
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher，Cat. No. 12321D 或同等功能仪器
Qubit3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA 或同等功能仪器
水平电泳槽	/
凝胶成像仪	/
电泳仪	/

表 5 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
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
安捷伦高灵敏度DNA分析试剂盒	Agilent, Cat. No. 5067-4626
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
REGULAR AGAROSE G-10	BIOWEST, Cat. No. CB005-100G
GelStain (10000x)	TRANSGEN, Cat. No. GS101-01
移液器吸头	/
1.5 mL 离心管	/
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen, Cat. No. PCR-02-C 或 Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen，Cat. No. Q32856 或 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。
- 为避免因转管操作造成建库产量的损失，在磁珠纯化步骤时不推荐转管操作，尤其是 4.3 酶切消化产物纯化步骤。
- 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 ℃。
- PCR产物如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，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，切勿吞咽样本及试剂，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

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	试剂准备	10 min	10 min
3.2	DNA 酶切打断	35 - 45 min	5 - 10 min
3.3	打断产物片段筛选 ⏸	30 - 45 min	10 - 15 min
3.4	末端修复	65 min	10 min
3.5	接头连接	20 min	10 min
3.6	连接产物纯化 ⏸	30 min	10 - 15 min
4.1	变性及单链环化	45 min	15 min
4.2	酶切消化	40 min	10 min
4.3	消化产物纯化 ⏸	50 min	10 - 15 min
4.4	消化产物质检 ⏸	15 - 20 min	10 - 15 min

提示
- 总时长：指 8 个反应理论时长，单次建库样本数增多，时间将延长。
- 手工操作时长：指该流程累计手工操作的总时长。
- ⏸：停止点。

2 样本要求及处理

2.1 样本要求

试剂盒适用于常见的动物、植物、真菌、细菌等物种，例如人（血液、唾液）、水稻、光滑念珠菌、大肠杆菌等样本提取的基因组 DNA 进行文库制备。

推荐使用完整度较好（无明显降解或轻微降解）且纯度良好（2.0≥$OD_{260/280}$ ≥ 1.8，$OD_{260/230}$ ≥ 1.7）的高质量基因组DNA进行打断。

由于 DNA 的溶解 buffer pH 值和成分会影响 FS Enzyme Mix II 的反应时效，推荐使用 1 × TE Buffer（pH8.0）或 H_2O 进行 DNA 溶解。

- 若 DNA 使用 AE buffer(pH 8.5)，10 mM Tris（pH6.8-8.0）或 0.1xTE（pH8.0）溶解，请参考第 10 页“酶切打断”进行小试测试。若 DNA 为其他特殊 buffer 溶解，请先做小试。
- 如若打断效果不理想或文库产量异常，请重新纯化样本 gDNA，并用 1 × TE Buffer（pH 8.0）或 H_2O 溶解。
- 若有不同 buffer 溶解的 DNA 样本同时进行打断和磁珠单选建库测序，请先将 DNA 样本统一重新纯化并溶于 H_2O。
- 若样本 DNA 提取过程中带入高浓度金属离子螯合剂或其他盐，可能会影响打断步骤的效率及片段大小。

2.2 文库插入大小要求

测序时，随着文库片段弥散度增大，测序质量可能会略微下降。

- 磁珠双选文库的主峰 450 bp ~ 600 bp。
- 磁珠单选文库的主峰 600 bp ~ 750 bp。

⚠ 注意 不要将磁珠双选文库和磁珠单选文库混合测序。

2.3 起始量与片选方法

表 6 不同起始量 gDNA 推荐片选方法

gDNA 总量（N）	gDNA 起始量	打断片选方法	打断片选后DNA投入量
1000 ng ＜ N	1000 ng	磁珠双选	80 - 200 ng
800 ng ≤ N ≤ 1000 ng	800 - 1000 ng（全部投入）	磁珠双选	80 - 200 ng
200 ng ＜ N ＜ 800 ng	200 ng	磁珠单选	全部投入
50 ng ≤ N ≤ 200 ng	50 - 200 ng（全部投入）	磁珠单选	全部投入

提示

- 磁珠单选方法的插入片段较磁珠双选方法弥散，上机测序质量和有效 reads 数会偏低。
- 当 500 ng ≤ N ＜ 800 ng 时，也可采用 500 ng ~ 800 ng gDNA 全部投入起始打断，片选方法选磁珠双选，但存在产量偏低的风险。
- 50 ng ~ 200 ng gDNA 起始建库，ssCir 文库产量偏低，通常不足以单独上机 1 次，需与其他酶切 PCR-free 文库混合测序。

3 文库构建标准流程

3.1 试剂配制

3.1.1 准备

表 7 试剂准备

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

3.1.2 操作

⚠注意 以下配方试剂均满足 6 个样本建库需求，若有多个样本，可按需求等比例放大配制。

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

表 8 1 x Elute Enhancer 的配制

组分	体积
20× Elute Enhancer	1 μL
Nuclease-Free Water	19 μL
Total	20 μL

2. 配制 En-TE，4 ℃ 存储条件下 7 天内可用。

表 9 En-TE 的配制

组分	体积
1× Elute Enhancer	2.4 μL
TE Buffer	1197.6 μL
Total	1200 μL

3. 配制 En-Beads，4 ℃ 存储条件下 7 天内可用。

表 10 En-Beads 的配制

组分	体积
1× Elute Enhancer	15 μL
DNA Clean Beads	1485 μL
Total	1500 μL

3.2 酶切打断

提示
- 下述酶切打断条件适合于人，动物，植物，细菌基因组 DNA 样本。打断得到的基因组 DNA 片段大小在 100 bp ~ 2000 bp，主带范围在 450 bp ~ 600 bp。
- 如样本不在涵盖范围内，建议参考下述条件，缩短或延长表 13 酶切打断反应条件 30 ℃ 反应时间，进行酶切打断条件测试，以达到最佳的打断效果。

3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 11 试剂准备

试剂名称	要求
1×TE buffer (pH 8.0)	自备物料，室温
En-TE	3.1 试剂准备，室温暂存
FS Buffer II	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
FS Enzyme Mix II	冰上暂存

注意 请勿涡旋 FS Enzyme Mix II。 FS Enzyme Mix II 上下颠倒并轻弹底部混匀 10 次以上，轻弹时保证管底无试剂残留（禁止涡旋），瞬时离心后置于冰上。混匀不充分会影响打断效果，请严格按照说明操作。

3.2.2 酶切打断

1. 根据样本浓度，取适量样本（50 ng ~ 1000 ng）至新的 0.2 mL PCR 管，用 1×TE buffer (pH 8.0) 补足至总体积 45 μL。混匀后置于冰上。

表 12 基因组 DNA 的均一化

组分	单个反应体积
1×TE buffer (pH 8.0)	45 - X μL
50~1000 ng 基因组 DNA	X μL
Total	45 μL

提示
- 因打断酶对 DNA 溶解液的 pH 值敏感，pH 值越低，打断主带越小。原则上，基因组 DNA 溶解液应与 DNA 均一化溶解液保持一致，以确保不同类型样本都在一样的 pH 值环境下进行打断。
- 若同一批次构建的基因组 DNA 溶于不同类型的 DNA 溶解液（pH 值范围为 6.8-8.5）。
  1) 当采用打断后磁珠双选方案时，建议 DNA 均一化溶解液采用 1x TE buffer（pH 8.0）或 H_2O。
  2) 当采用打断后磁珠单选方案时，建议重新纯化基因组 DNA 之后溶于 1x TE buffer（pH 8.0）或 H_2O 中。

2. 提前设置 PCR 程序并运行第 1 步 4 ℃ hold。

表 13 酶切打断反应条件（体系：60 μL）

温度	时间
70 ℃ 热盖	On
4 ℃	Hold
30 ℃	11 - 18 min
65 ℃	15 min
4 ℃	Hold

3. 将 FS Enzyme Mix II 上下颠倒并轻弹底部混匀 10 次以上，轻弹时保证管底无试剂残留，瞬时离心后置于冰上。

提示 请勿涡旋 FS Enzyme Mix II。混匀不充分会影响打断效果，请严格按照说明操作。

4. 根据所需反应数，在冰上配制酶切打断反应液，吹打 10 次混匀，或涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 14 酶切打断反应液的配制

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

5. 吸取 15 μL 酶切打断反应液至各样本管中（步骤 1），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
6. 确保 PCR 仪已经降至 4 ℃。将 PCR 管置于 PCR 仪上，跳过第一步（4 ℃ Hold），开始30 ℃反应。

7. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。加入 20 μL En-TE 至总体系 80 μL，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

提示
- 初次进行样本酶切打断条件摸索时，建议从 80 μL 打断产物中取 40 μL 打断产物利用 1.8x 磁珠进行纯化，后溶解到 25 μL En-TE。然后取 1 μL 纯化产物进行 Agilent 2100 高敏芯片质检，确定筛选片段主峰范围在 300 bp~800 bp，打断片段大小分布应在100 bp~2000 bp，见下图。
- 如片段过大或过小，建议重新调整 30 ℃ 反应时长，进行酶切打断条件测试。对于含杂质及抑制剂较多样品，按上述调试后仍无法获得理想打断效果，建议将样本 DNA 用 1.8 倍体积磁珠纯化后用 1 × TE buffer（pH 8.0）或 Nuclease-Free Water 溶解，重新调试打断时间（推荐 30 ℃ 反应 10 min~20 min 时间梯度测试）。

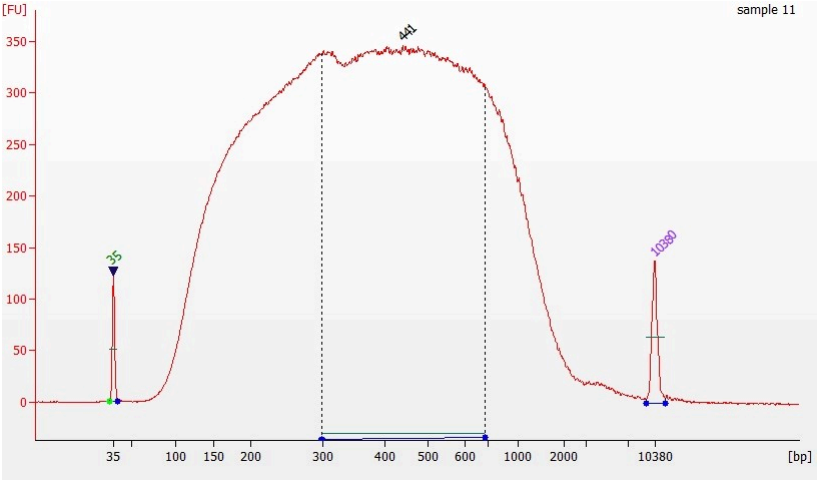

图 1 1000 ng 溶于 pH 8.0 1xTE buffer 的 gDNA 打断 (30 ℃ 打断时间11 min) 1.8x 磁珠片选后结果

3.3 打断产物片段筛选

打断后 DNA 分布范围较宽，为了保证文库片段的集中度，gDNA 投入量在 800 ng∽1000 ng 的样品推荐使用磁珠双选方案。gDNA 投入量在 50 ng~200 ng 的样品，推荐使用磁珠单选方案。

表 15 磁珠双选：75 μL 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠使用量关系表

主带片段（bp）	450 - 600
第一轮（μL）	40
第二轮（μL）	12
测序方案	PE100/PE150

提示 上表的片段选择条件供参考。推荐理想的片选回收率范围为 15%-20%，客户可根据实际情况进行片选条件微调以达到理想的效果。

3.3.1 磁珠双选

提示
- 磁珠双选方案筛选的 DNA 损失量约为 75% ~ 90%，若样本较珍贵，可选择回收第一轮磁珠，操作步骤 8~13 回收 DNA，保存备份。
- 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。

3.3.1.1 准备

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	来自3.1 试剂准备，室温暂存
En-Beads	来自3.1 试剂准备，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.3.1.2 磁珠双选

1. 吸取 75 μL 打断产物至新的 0.2 mL PCR 管，若体积不足 75 μL，用 En-TE 补足。
2. 混匀 En-Beads，吸取 40 μL En-Beads 至各样本管中，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管中。或涡旋混匀。
3. 室温孵育 10 min。
4. 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取全部上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

   注意 此步保留上清，丢弃磁珠。根据需要回收磁珠上的 DNA。
5. 吸取12 μL En-Beads 至含有上清液的 PCR 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 10 min。
7. 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置至液体澄清后继续放置 2~5 min，小心吸取上清并丢弃。
8. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 160 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
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 PCR 管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
10. 保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

    提示 磁珠过度干燥 (开裂) 将导致产量降低。
11. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μL En-TE 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。
12. 室温孵育 5 min。

13. 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 44 µL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。
14. 取 2 µL 上清液用于定量检测。使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对片段筛选产物进行定量。

提示 建议取 1 µL 上清液用 Agilent 2100 高敏芯片进行片段分布检测。确定筛选片段主峰在 450 bp ∽ 600 bp，见下图。片段主峰为纯化后 DNA 的检测结果，最终测序主带会有减小。

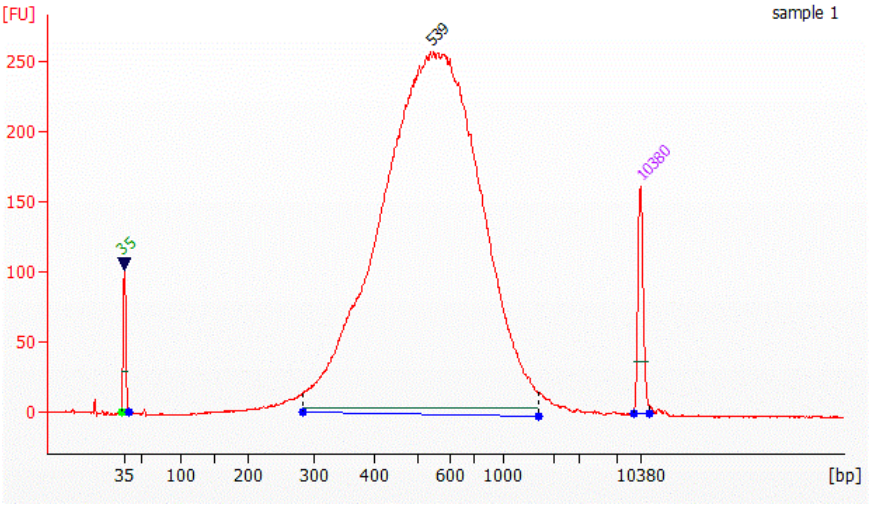

图 2 1000 ng 溶于 pH 8.0 1xTE buffer 的 gDNA 打断（30 °C 打断时间11 min）磁珠双选结果

3.3.2 磁珠单选

提示
- 磁珠单选方法筛选的 DNA 损失量约为 30% ~ 60%。
- 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。

3.3.2.1 准备

表 17 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	来自3.1 试剂准备，室温暂存
En-Beads	来自3.1 试剂准备，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.3.2.2 磁珠单选

1. 吸取 75 µL 打断产物至新的 0.2 mL PCR 管，若体积不足 75 µL，用 En-TE 补足。
2. 混匀 En-Beads，吸取 60 µL En-Beads 至各样本管中，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管中。或涡旋混匀。

3. 室温孵育 10 min。
4. 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置至液体澄清后继续放置 2~5 min，小心吸取上清并丢弃。
5. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 160 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
6. 重复步骤 5 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将PCR管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
7. 保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

   提示 磁珠过度干燥 (开裂) 将导致产量降低。

8. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 45 μL En-TE 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 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 44 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。
11. 取 2 μL 上清液用于定量检测。使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对片段筛选产物进行定量。

    提示 建议取 1 μL 上清液用 Agilent 2100 高敏芯片进行片段分布检测。确定筛选片段主峰在 600 bp ∽ 750 bp，见下图。片段主峰为纯化后 DNA 的检测结果，最终测序主带会有减小。

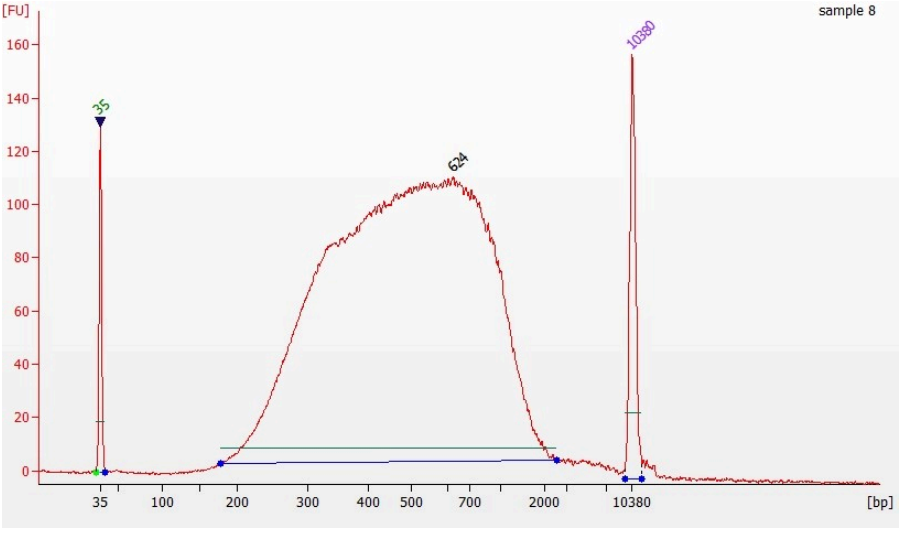

图 3 200 ng 溶于 pH 8.0 1xTE buffer 的 gDNA 打断（30°C 打断时间11 min）磁珠单选结果

3.4 末端修复

提示 若使用的 PCR 仪升温速度较慢，使用前建议预热 PCR 仪至反应温度附近。

3.4.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 18 试剂准备

试剂名称	要求
En-TE	来自3.1 试剂准备，室温暂存
ER Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
ER Enzyme Mix	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.4.2 末端修复

1. 根据样本浓度，取适量样本 (推荐 80~200 ng) 至新的 0.2 mL PCR 管，用 En-TE 补足至总体积 40 μL。
2. 根据所需反应数，在冰上配制末端修复反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 19 末端修复反应液的配制

组分	单个反应体积
ER Buffer	7 μL
ER Enzyme Mix	3 μL
Total	10 μL

3. 吸取 10 μL 末端修复反应液至各样本管中（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 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 20 末端修复反应条件（体系：50 μL）

温度	时间
70 ℃ 热盖	On
14 ℃	15 min
37 ℃	25 min
65 ℃	15 min
4 ℃	Hold

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底。

注意 不建议在此处停止，请继续完成接头连接。如果必须停止，末端修复产物可放在 -20 ℃ 冰箱过夜，但产量可能会下降。

3.5 接头连接

提示 操作前请仔细阅读第 25 页“关于 Adapter 使用”。

3.5.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 21 试剂准备

试剂名称	要求
适配样本的 Adapters	冰上解冻，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	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温。首次使用后室温避光储存

提示
- Adapters 使用前充分涡旋混匀。Adapters不可直接与接头连接反应液混合。
- Ad-Lig Buffer溶液较粘稠，使用前涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心。吸取时请慢吸慢放，确保加液量正确。

3.5.2 接头连接

1. 吸取 **5 μL Adapter**至对应的样本管中（3.4.2 节步骤 5），涡旋混匀 3 次，每次 3 秒，瞬时离心后置于冰上。
2. 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 22 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

3. 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，瞬时离心使液体收集至管底后置于冰上。

提示 接头连接反应液较粘稠，吸取时请慢吸慢放，确保加液量正确。

4. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 23 接头连接反应条件（体系：80 μL）

温度	时间
30 ℃热盖	On
25 ℃	10 min
4 ℃	Hold

提示 若 ssCir 文库产量偏低，可适当延长 25 ℃ 反应时间至 30 min。

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。
6. 加入 20 μL TE Buffer 至总体系 100 μL，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

注意
- 转管到 1.5 mL 离心管进行纯化可能导致产量降低，不建议转管。
- 不建议在此处停止，请继续完成接头连接产物纯化。

3.6 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。

3.6.1 准备

表 24 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	来自3.1 试剂准备，室温
En-Beads	来自3.1 试剂准备，提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.6.2 连接产物纯化

1. 混匀 En-Beads，吸取 50 μL En-Beads 至各样本管中（3.5.2 节步骤 6），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 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 160 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。

5. 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将 PCR 管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 50 μL En-TE 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 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 48 μL 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

停止点 产物纯化后可置-20 ℃ 冰箱储存。

注意 为避免接头二聚物残留带来的样本间污染问题，连接产物纯化之后不推荐进行不同样本的混合和用于后续单链环化反应。

4 环化消化

4.1 变性、单链环化

4.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 25 试剂准备

试剂名称	要求
Cir Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Cir Enzyme Mix	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

4.1.2 变性

1. 将 3.6.2 节步骤 9 的 PCR 管瞬时离心后置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 26 变性反应条件（体系：48 μL）

温度	时间
100 ℃热盖	On
95 ℃	3 min
4 ℃	10 min

提示 也可以采用程序：95 ℃ 3 min（热盖 100 ℃）。反应结束后**立即**放冰上 2 min。

2. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后置于冰上。

4.1.3 单链环化

1. 根据反应数，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 27 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Cir Buffer	11.5 μL
Cir Enzyme Mix	0.5 μL
Total	12 μL

2. 吸取 12 μL 单链环化反应液至各样本管中（4.1.2 节步骤 2），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 28 单链环化反应条件（体系：60 μL）

温度	时间
42 ℃热盖	On
37 ℃	10 min
4 ℃	Hold

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：下列试剂用前混匀离心，使用后尽快放回冰箱储存。

表 29 试剂准备

试剂名称	要求
Exo Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Exo Enzyme Mix	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Exo 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 30 酶切消化反应液的配制

组分	单个反应体积
Exo Buffer	1.4 μL
Exo Enzyme Mix	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 31 酶切消化反应条件（体系：64 μL）

温度	时间
42 ℃热盖	On
37 ℃	30 min
4 ℃	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，立即加入 **3 μL Exo Stop Buffer**，涡旋混匀 3 次，每次 3 s。瞬时离心使液体收集至管底。

注意 转管到 1.5 mL 离心管进行纯化可能导致产量降低，不建议转管。

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 32 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	来自3.1 试剂准备，室温暂存
En-Beads	来自3.1 试剂准备，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 En-Beads，吸取 120 µL En-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 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持 PCR 管固定于磁力架上，加入 160 µL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体，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 PCR 管从磁力架上取下，加入 25 µL En-TE 进行 DNA 洗脱，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。

   提示 若 gDNA 起始量为 50 ng~100 ng，推荐使用 12 µL En-TE 进行 DNA 洗脱，并在步骤 9 吸取 11 µL 上清液。

8. 室温孵育 10 min。
9. 将 PCR 管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 24 µL 上清液至新的 1.5 mL 离心管或 0.2 mL PCR 管。

   停止点 酶切消化产物纯化后产物可置 -20 ℃ 冰箱储存。

4.4 消化产物质检

- 使用 Qubit ssDNA Assay Kit 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对酶切消化纯化后产物进行定量。最终产物要求如下：

  1) 200 ng~1000 ng gDNA 起始，单链环产量 ≥75 fmol。

  2) 100 ng~200 ng gDNA 起始，单链环产量 ≥60 fmol。

  3) 50 ng~100 ng gDNA 起始，单链环产量 ≥30 fmol。

- 可根据公式 1 计算 75 fmol 单链环状 DNA 对应的质量。或参考下表。

公式 1 单链环 fmol 与 ng 间的换算

75 fmol 单链环对应的质量 (ng) = 0.075 × DNA 主片段大小 (bp) × 0.33

表 33 不同插入产物片段大小对应 75 fmol 单链环产量

插入片段主片段大小 (bp)	75 fmol 对应产量 (ng)
360	9
400	10
490	12.2
530	13.2

- 每次上机测序的单链环的投入量为 75 fmol。
- 如需将不同样本混合上机测序，可在酶切产物质检后将不同样本的单链环按摩尔数比进行混合。但需保证混合样本对应的 barcode 须符合MGIEasy PF Adapter 的使用规则要求 ，详见第 25 页“关于 Adapter 使用”。此外，不同样本单链环的摩尔数比取决于客户预期得到的不同样本的数据量比。

注意
- 因插入片段的大小和集中度会影响测序质量，故不同插入片段的文库混合测序及不同磁珠纯化方法文库混合测序（如: 采用磁珠双选方案的文库与采用磁珠单选方案去除小片段的文库混合上机）时，测序质量及有效数据量会有降低的风险。
- 若必须要混合测序时，只推荐采用插入片段的大小和集中度相似的酶切 PCR-Free 文库混合测序。

5 附录

5.1 关于 Adapter 使用

试剂套装根据反应数不同提供 2 种不同规格的 Adapter 试剂盒：MGIEasy PF Adapters- 16 （管式）试剂盒或 MGIEasy PF Adapters-96 （板式）试剂盒。

两款试剂盒均为满足大量样本批量化建库、多样本混合测序而研发，基于碱基平衡的设计原则，经过反复实验测试，挑选了最佳的 Adapter 组合，但 Adapter 编号不连续。为保证最佳效果，使用时请详细阅读两种规格的使用规则。

- 两款 Adapter 试剂盒编号存在重叠，编号一致的 Adapter，Barcode 碱基序列相同，不能在同一条 lane 中测序。
- Adapter 为双链接头，请勿将其置于 30 ℃以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。
- Adapter使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底或板底。
- 吸取不同 Adapter 时注意更换吸头，避免交叉污染。
- 对于管式 Adapters 使用时需小心地揭开管盖，防止液体飞溅，避免交叉污染，使用后及时盖上管盖。
- 对于板式 Adapters，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。使用完毕后盖住封膜。如果发生意外导致封膜污染，应弃去，用新的 PCR 封板膜重新封装。
- 若有使用 MGI 其它建库试剂盒中的 barcode 接头或引物，由于设计工艺不同，禁止混用，否则数据无法拆分。

5.1.1 PF Adapters-16 （管式）试剂使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将 Adapter 成组使用，试剂盒中包含的 Adapter 具备如下的分组规则：

- 4个 Adapter 成组：01-04、13-16，共计 2 组；
- 8个 Adapter 成组：97-104，共计 1 组。

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

⚠注意 **同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。**

表 34 PF Adapters-16 （管式）试剂使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04，将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 97-104，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 • 或如果样本不需要测 Barcode 时，可只使用一个 1 Adapter（如 01）。
2	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04，将 01 和 02 取等体积混合后加入样本 1 中，将 03 和 04 取等体积混合后加入样本 2 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 97-104，将 97-100 取等体积混合后加入样本 1 中。将 101-104 取等体积混合后加入样本 2 中。
3	1. 样本 1、2 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 3 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 97-104，将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix，分别加入样本 1、2、3、4 中。
5	1. 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	1. 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。
7	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，采用上述（1样本数/lane）方法加一组 Adapter。 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	• 加一组 8 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 97-104，将 97、98、99、100、101、102、103、104 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、 6、7、8 中。 • 或选取两组 4 个 Adapter（01-04 和 13-16）。每个样本加 1 个 Adapter。

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 Adapter。 ■ 或分成 2 组，样本 1~4、5~8采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 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 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。 提示 上述两组样本间需使用不同组别的 Adapter。

当样本数据量要求不同时，需遵循在一条lane中数据量要求大于20%的样本不得使用不成组的Adapter。例如，有 9 个样本 pooling 于一条 lane 中，其中有 1 个样本要求数据量为 30%，此时需采用如下 Barcode 的方案：

1. 8个样本使用 Adapter 97-104。
2. 另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要使用 Adapter 01-04 或 Adapter 13-16。

5.1.2 PF Adapters-96 （板式）试剂使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将 Adapter 成组使用，试剂盒中包含的 Adapter 具备如下的分组规则：

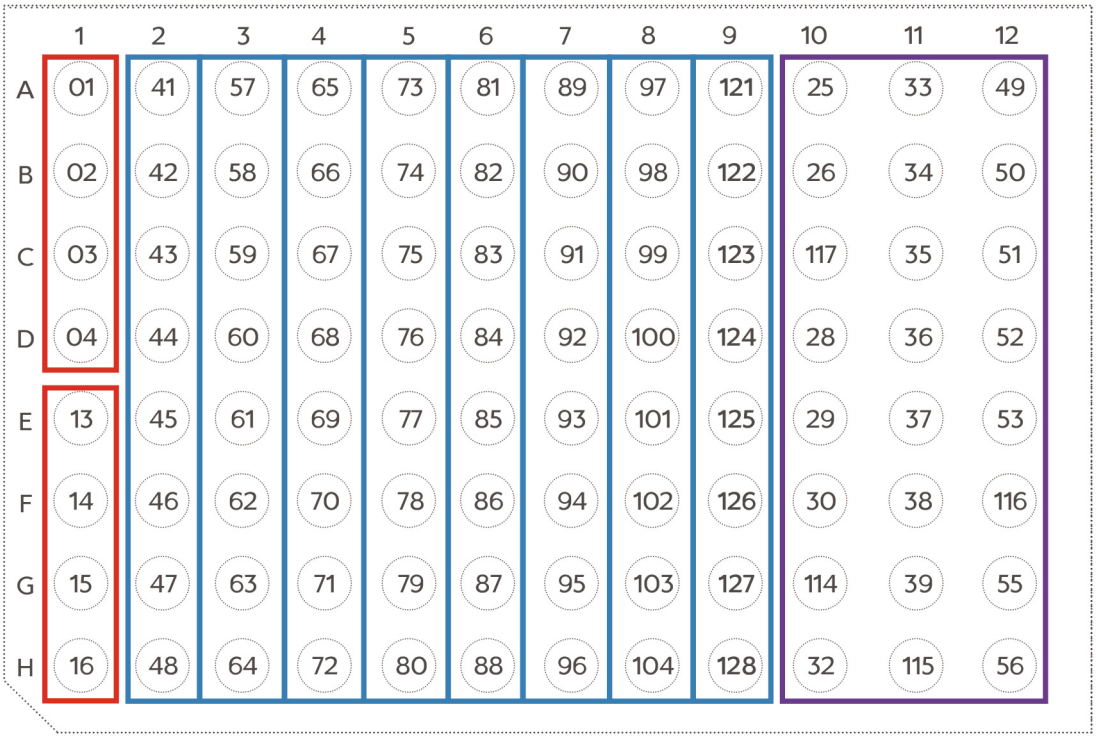

图 4 PF Adapters-96 （板式）Adapters 分布图及成组规则

- 4个 Adapter 成组：第 1 列（01-04，13-16），共计 2 组（上图红色框）。
- 8个 Adapter 成组：第 2-9 列（41-48 、57-64 、65-72 、73-80 、81-88 、89-96 、97-104 和 121-128），共计 8 组（上图蓝色框）。
- 24个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组（上图紫色框）。

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

注意 **同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。**

表 35 PF Adapters-96 （板式）试剂使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04，将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 41-48，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 • 或如果样本不需要测 Barcode 时，可只使用一个 1 Adapter（如 01）。
2	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04，将 01 和 02 取等体积混合成 mix 后加入样本 1 中。将 03 和 04 取等体积混合成 mix 后加入样本 2 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-44 取等体积混合成 mix，加入样本 1 中。将 45-48 取等体积混合成 mix，加入样本 2 中。
3	1. 样本 1、2 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 3 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	• 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别取等体积混合成 mix，分别加入样本 1、2、3、4 中。

样本数/lane	使用方法（举例）
5	1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。
7	1. 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 7 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	• 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 41-48，将 41、42、43、44、45、46、47、48 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。
8n+x (n=1、2 x=1~8，总计 9~24个)	分三步： 1. 样本 1-8 ▪ 分成 1 组，采用上述（8样本数/lane）方法加 Adapter。 ▪ 或分成 2 组，样本 1-4、5-8 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 9-8n，每 8个样本一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。
8n+x (3≤n＜11 x=1~8，总计 25~96个)	分三步： 1. 样本 1-24，加一组 24 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 2. 样本 25-8n，每 8 个样本分为一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。

当样本数据量要求不同时，需遵循在一条lane中数据量要求大于20%的样本不得使用不成组的Adapter。例如，有 9 个样本 pooling 于一条 lane 中，其中有 1 个样本要求数据量为 30%，此时需采用如下 Barcode 的方案：

1. 8个样本使用 Adapter 41-48；
2. 另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要使用 Adapter 01-04或 Adapter 13-16 或其他 41-48 以外的成组 Adapter。