

编号: SOP-013-B02-126



使用说明书

版本: 7.0

MGIEasy PCR-Free DNA文库制备试剂套装

货号: 1000013452 (16 RXN)
1000013453 (96 RXN)
套装版本号: V1.1

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。

ALPAQUA®、Agilent®、Ambion®、Axygen®、Advanced Analytical®、Covaris®、Invitrogen®、PerkinElmer®、Qubit®、Thermo Fisher®，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
7.0	V1.1	2024 年 4 月	变更 1.4 组分中 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒的货号
6.0	V1.1	2024 年 3 月	<ul style="list-style-type: none">变更制造商信息更新说明书风格删除附录关于磁珠纯化、关于接头连接
5.0	V1.1	2022 年 3 月	更新公司 LOGO
A3	V1.1	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A2	V1.1	2020 年 7 月	变更公司名称
A1	V1.1	2019 年 12 月	<ul style="list-style-type: none">更新试剂盒版本为 V1.1更新说明书风格增加产品适配测序平台降低基因组 DNA 起始量要求 (最低至 200 ng)增加单选纯化操作条件增加产品适用范围 (扩增子)更新连接产物定量合格的标准
A0	V1.0	2019 年 4 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	3
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 DNA打断方法和片段筛选	7
2.3 片段选择后 DNA 的定量和质控	8

3 文库构建标准流程	9
3.1 试剂配制	9
3.2 末端修复	10
3.3 接头连接	11
3.4 连接产物纯化	13
3.5 连接产物质检	14

4 环化消化	15
4.1 变性及单链环化	15
4.2 酶切消化	16
4.3 消化产物纯化	17
4.4 消化产物质检	18

5 附录	20
5.1 磁珠片段筛选	20
5.2 关于 Adapter 使用	23

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 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纯化后的 80 - 200 ng DNA 片段制备成 MGI高通量测序平台专用的文库。本试剂盒采用高质量的酶学组成, 优化的接头连接技术, 显著提高文库转化率。试剂盒中提供的所有试剂均经过严格的质量控制和功能验证, 可最大程度上保证文库制备的稳定性和重复性。

1.2 适用范围

本试剂套装适用于动物、植物、真菌、细菌等物种, 例如小鼠、人 (血液、唾液)、水稻以及长片段扩增子等类型样本。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:

- BGISEQ-500RS (PE100)
- MGISEQ-200RS (PE100)
- MGISEQ-2000RS (PE100/PE150/PE200/SE400)
- DNBSEQ-T7RS (PE100)

1.4 组分

本试剂套装包含有 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。不同规格的套装中包含试剂盒、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 PCR-Free DNA文库制备试剂套装 V1.1 (16 RXN) (货号: 1000013452)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy PCR-Free DNA文库制备试剂盒 V1.1 货号: 1000013456	20 × Elute Enhancer	 黑色	3 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	 本色	5 μL/支× 16
MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 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 V1.1 (96 RXN) (货号: 1000013453)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy PCR-Free DNA文库制备试剂盒 V1.1 货号: 1000013457	20 × Elute Enhancer	 黑色	15 μL/支× 1
	ER Buffer	 橙色	672 μL/支× 1
	ER Enzyme Mix	 橙色	288 μL/支× 1
	Ad-Lig Buffer	 红色	864 μL/支× 1
	Ad Ligase	 红色	480 μL/支× 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	Ligation Enhancer	● 棕色	192 μL/支× 1
	Cir Buffer	● 紫色	1104 μL/支× 1
	Cir Enzyme Mix	● 紫色	48 μL/支× 1
	Exo Buffer	○ 白色	135 μL/支× 1
	Exo Enzyme Mix	○ 白色	250 μL/支× 1
	Exo Stop Buffer	○ 白色	288 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纯化磁珠试剂盒 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	组分	储存温度	运输温度
MGIEasy PCR-Free DNA 文库制备试剂盒	20 × Elute Enhancer	2 °C~30 °C	-25 °C~-15 °C
	Exo Stop Buffer		
	Ligation Enhancer	2 °C~30 °C 避光	
	其他试剂		
MGIEasy PF Adapters-16 (管式)试剂盒		-25 °C~-15 °C	
MGIEasy PF Adapters-96 (板式)试剂盒			
MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒		2 °C~8 °C	2 °C~8 °C



- 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。

- MGIEasy PCR-Free DNA文库制备试剂盒中，20 × Elute Enhancer 、Exo Stop Buffer 和 Ligation Enhancer 首次使用后需室温储存，避免反复冻融。其中 Ligation Enhancer 需注意避光储存。

1.6 自备物料清单

表 4 设备清单

名称	推荐品牌
Covaris 打断仪	/
漩涡混匀仪	/
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
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D
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

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
Covaris 打断管	/
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 Axxygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C

名称	推荐品牌
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 °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，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	末端修复	60 ~ 70 min	5 ~ 10 min
3.3	接头连接	40 min	10 min
3.4	连接产物纯化 	35 ~ 40 min	10 ~ 15 min
3.5	连接产物质检 	15 ~ 60 min	10 ~ 20 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 	40 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

本试剂盒适用于常见的动物、植物、真菌、细菌等物种，包括人（血液、唾液、新鲜组织）、鼠、水稻、大肠杆菌、meta 等样本提取的基因组 DNA 和扩增子产物进行文库制备。

推荐使用 200-1000 ng 完整度较好， $OD_{260/280}=1.8 \sim 2.0$ ， $OD_{260/230}>2.0$ 的高质量基因组 DNA 进行打断。

2.2 DNA打断方法和片段筛选

2.2.1 打断

- 请将基因组 DNA 打断至 150-1000 bp 之间，主带 300-500 bp。
- 如若使用 Covaris 仪器进行打断，具体打断条件可到 Covaris 官网查询，推荐设计梯度打断实验，摸索最适打断条件后，方可正式开始打断。

2.2.2 片段筛选

- 打断后 DNA 分布范围较宽（打断产物片段分布在 150-1000 bp 之间，主带 300-500 bp），通常需要进行片段筛选以控制最终文库片段集中度。
- 若起始打断的样本 gDNA 总量充足，推荐使用 500-1000 ng gDNA 进行打断，然后使用下表磁珠双选方案。

表 6 磁珠双选：75 μ L 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠用量关系表

主带片段 (bp)	350	400	560
第一轮 (μ L)	50	45	41.25
第二轮 (μ L)	15	15	15
测序方案	PE100/PE150	PE100/PE150	PE200/SE400

 提示 片选条件供参考。针对不同样品，片选主带片段可能有 ± 50 bp偏差。

- 若起始打断的样本珍贵，gDNA 总量不足 500 ng，可尝试使用 200-500 ng gDNA 进行打断，然后使用下表磁珠单选方案。

表 7 磁珠单选：75 μ L 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠用量关系表

主带片段 (bp)	400	560
第一轮 (μ L)	60	52.5
测序方案	PE100/PE150	PE200/SE400

 提示 片选条件供参考。针对不同样品，片选主带片段可能有 ± 50 bp 偏差。

 注意 若选择 200ng gDNA 起始打断构建文库的方案，对应的 ssCir 产量通常只满足单文库上机 1 次。因磁珠单选获得的插入片段较弥散，测序质量和测序数据产出量会有轻微下降。

下面为两种不同磁珠片选的示例，详见第 20 页“磁珠片段筛选”。

- **示例 1 磁珠双选：**1000 ng gDNA 打断后，取 75 μ L 打断产物在末端修复之前进行 45 μ L + 15 μ L 磁珠片段筛选的详细步骤，最终得到主带 400 bp 的目的片段。如果打断产物体积不到 75 μ L，则需用 En-TE buffer 补足 75 μ L 后进行片段选择。
- **示例 2 磁珠单选：**200 ng gDNA 打断后，取 75 μ L 打断产物在末端修复之前进行 60 μ L 磁珠纯化的详细步骤，最终得到主带 400 bp 的目的片段。如果打断产物体积不到 75 μ L，则需用 En-TE buffer 补足 75 μ L 后进行片段选择。

2.3 片段选择后 DNA 的定量和质控

- 片段选择后 DNA（片选 DNA）指投入末端修复步骤中的 DNA 量。本试剂盒兼容片选 DNA 量范围为 80 - 200 ng。如果片选 DNA 在 60 - 80 ng，则可尝试风险建库。
- 本试剂盒片段筛选条件支持一定长度的片段主带（见表 6 和表 7）。测序时，随着片段增大，测序质量可能会略微下降。推荐片段主带在 350 - 450 bp，片段范围在主带 200 bp 左右。
- 若打断 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。

3 文库构建标准流程

3.1 试剂配制

3.1.1 准备

表 8 试剂准备

试剂名称	要求
Nuclease-Free Water	自备物料，常温
TE Buffer	
20× Elute Enhancer	混匀，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 9 1× 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 °C 存储条件下 7 天内可用。

表 10 En-TE 的配制

组分	体积
1× Elute Enhancer	2 μL
TE Buffer	998 μL
Total	1000 μL

3. 配制 En-Beads, 4 $^{\circ}\text{C}$ 存储条件下 7 天内可用。

表 11 En-Beads 的配制

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

3.2 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。

3.2.1 准备

试剂: 试剂用前混匀, 使用后尽快放回冰箱储存。

表 12 试剂准备

试剂名称	要求
En-TE	详见 3.1 试剂准备, 室温暂存
ER Buffer	室温解冻, 混匀离心, 冰上暂存
ER Enzyme Mix	瞬时离心, 冰上暂存

3.2.2 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, 补充 En-TE 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 13 末端修复反应液的配制

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

3. 吸取 10 μ L 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 14 末端修复反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
70 °C 热盖	On
14 °C	15 min
37 °C	25 min
65 °C	15 min
4 °C	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 °C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20% 左右。

3.3 接头连接

 **提示** 操作前请仔细阅读第 23 页“关于 Adapter 使用”。

3.3.1 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
Ad-Lig Buffer	室温解冻，混匀离心，冰上暂存
Ad Ligase	瞬时离心，冰上暂存
Ligation Enhancer	混匀离心，室温
适配样本的 Adapters	混匀离心，冰上暂存

 **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。

3.3.2 接头连接

1. 吸取 **5 μL Adapter** 至对应的样本管中（3.2.2 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 16 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 17 接头连接反应条件（体系：80 μL ）

温度	时间
30 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
25 $^{\circ}\text{C}$	30 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

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 ，混匀离心。

 注意

- 转管到 1.5 mL 离心管进行纯化可能导致建库产量降低，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。

3.4 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。
 - 由于 PEG 的存在，接头连接产物纯化磁珠乘数可以适当减少，推荐使用 50 μ L 磁珠进行纯化。若增加磁珠使用量，可能会回收部分接头二聚物。

3.4.1 准备

表 18 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	详见 3.1 试剂准备，室温
En-Beads	详见 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

3.4.2 连接产物纯化

1. 混匀 En-Beads，吸取 50 μ L En-Beads 至样本管中（3.3.2 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 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 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。

 **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 50 μ L 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 49 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 连接产物质检

取 1 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连接纯化产物进行定量。

- 连接产物浓度 $>1.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 可用于后续建库。
- 连接产物浓度在 $0.8\text{-}1.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，则可选择风险建库。
- 连接产物浓度 $<0.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 则不建议后续建库。



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 变性及单链环化

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 19 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 3.4.2 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 20 变性反应条件（体系：48 μ L）

温度	时间
100 °C热盖	On
95 °C	3 min
4 °C	10 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。现配现用。

表 21 单链环化反应液的配制

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

2. 吸取 12 μ L 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 22 单链环化反应条件（体系：60 μ L）

温度	时间
42 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	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 23 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 24 酶切消化反应液的配制

组分	单个反应体积
Exo Buffer	1.4 μ L
Exo Enzyme Mix	2.6 μ L
Total	4.0 μ L

2. 吸取 4 μ L 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 25 酶切消化反应条件（体系：64 μ L）

温度	时间
42 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，立即加入 3 μ L 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 26 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	详见 3.1 试剂准备，室温暂存
En-Beads	详见 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。
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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

- 最终产物要求摩尔产量 $\geq 75\text{ fmol}$ 。

可根据公式 1 计算 75 fmol 单链环状 DNA 对应的质量。

公式 1 单链环 fmol 与 ng 间的换算

$$75\text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.075 \times [\text{DNA 主片段大小 (bp)} + 84\text{ (bp)}] \times 0.33$$

表 27 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)	连接产物主片段大小 (bp)	75 fmol 对应产量 (ng)
350	434	10.7
400	484	12.0
560	644	16.0

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 23 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。

5 附录

5.1 磁珠片段筛选

5.1.1 磁珠双选

-  提示
- 此步骤采用 45 μL +15 μL 磁珠对打断后产物（75 μL ）进行磁珠片段筛选，最终得到主带为 400 bp 的 Input DNA。
 - 若需要筛选其它片段主带，请根据第 8 页“表 6 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”选择合适的磁珠片段筛选条件。
 - 因磁珠双选方案筛选的 DNA 损失量约为 60% - 95%。可选择回收第一轮磁珠，操作步骤 8 ~ 13 回收 DNA，保存备份。

5.1.1.1 准备

表 28 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	详见 3.1 试剂准备，室温平衡、暂存
En-Beads	详见 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

5.1.1.2 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 45 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 118 μL 上清至新的 0.2 mL PCR 管。
 ⚡ 提示 此步保留上清，丢弃磁珠。
5. 吸取 15 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 42 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。
15. 取 1 ~ 2 μL 上清液用于片段分布检测，检测方法可用 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或者琼脂糖电泳。

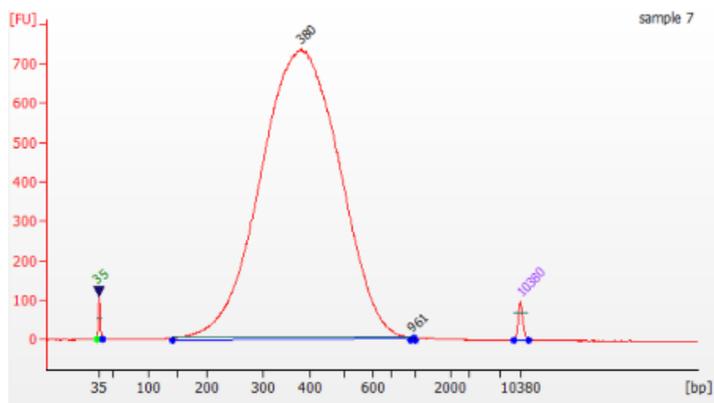


图 1 标准实验流程 DNA 片段磁珠双选后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

5.1.2 磁珠单选

- ⚡ 提示 此步骤采用 60 μL 磁珠对打断后产物（75 μL ）进行磁珠片段筛选，最终得到主带为 400 bp 的 Input DNA。

若需要筛选其它片段主带，请根据第 8 页“表 7 磁珠单选：75 μ L 打断产物的 DNA 片段选择理论主带与磁珠使用量关系表”选择合适的磁珠片段筛选条件。

5.1.2.1 准备

表 29 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
En-TE	详见 3.1 试剂准备，室温平衡、暂存
En-Beads	详见 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

5.1.2.2 磁珠单选

1. 吸取 75 μ L 打断产物至新的 0.2 mL PCR 管，若体积不足 75 μ L，用 En-TE 补足。
2. 混匀 En-Beads，吸取 60 μ L 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 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 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 μ L 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 42 μ L 上清液至新的 1.5 mL 离心管。
11. 取 2 μ L 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。
12. 取 1 ~ 2 μ L 上清液用于片段分布检测，检测方法可用 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或者琼脂糖电泳。

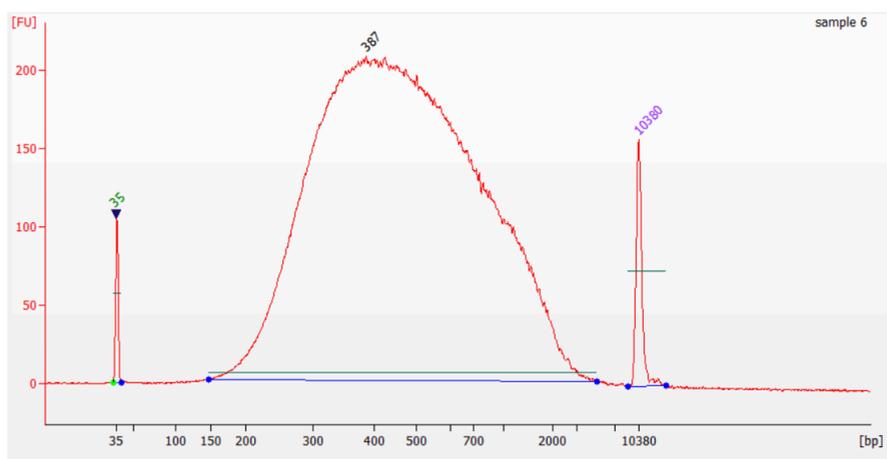


图 2 标准实验流程 DNA 片段磁珠单选后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

5.2 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，使用时请仔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 °C 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。

5.2.1 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 30 PF Adapters-16 (管式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<ol style="list-style-type: none"> 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加 Adapter。 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<ol style="list-style-type: none"> 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。 样本 7, 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加一组 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> 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： <ol style="list-style-type: none"> 8 样本 <ul style="list-style-type: none"> 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。 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。 <p> 提示 上述两组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

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：

- 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。

5.2.2 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：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	41	57	65	73	81	89	97	121	25	33	49
B	02	42	58	66	74	82	90	98	122	26	34	50
C	03	43	59	67	75	83	91	99	123	117	35	51
D	04	44	60	68	76	84	92	100	124	28	36	52
E	13	45	61	69	77	85	93	101	125	29	37	53
F	14	46	62	70	78	86	94	102	126	30	38	116
G	15	47	63	71	79	87	95	103	127	114	39	55
H	16	48	64	72	80	88	96	104	128	32	115	56

图 3 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 31 PF Adapters-96（板式）试剂使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> • 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 <p>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。</p>
8n+x (n=1、2 x=1~8, 总计 9~24个)	<p>分三步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-8 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 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。 <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>
8n+x (3≤n < 11 x=1~8, 总计 25~96个)	<p>分三步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

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。