

MGIEasy

RNA 文库制备试剂套装使用说明书

货号：1000006383 (16 RXN) , 1000006384 (96 RXN)

试剂盒版本号：V3.1

说明书版本号：A4

版本历史

说明书版本	试剂盒版本	修订日期	修订内容摘要
A4	V3.1	2021年 1月	<ul style="list-style-type: none"> 更新公司联系信息
A3	V3.1	2020年 7月	<ul style="list-style-type: none"> 试剂盒装量适配 MGISP-100 和 MGISP-960 自动化建库需求 修改了 3.10 和 3.11 中关于样本混合的描述 公司名称修改为深圳华大智造科技股份有限公司 更换说明书新模板
A2	V3.0	2019年 9月	<ul style="list-style-type: none"> 1.3 增加测序平台 SE100 的测序读长 2.2 样本纯度要求增加 $OD_{260/230}$
A1	V3.0	2018年 12月	<ul style="list-style-type: none"> 1.1 产品描述, 增加了“以及待检样本中病原微生物 RNA 的检测” 2.1 增加病原应用 2.2 增加参考目录 F 附录 F, 将病原检测内容作为附录添加
A0	V3.0	2018年 11月	<ul style="list-style-type: none"> 发布 V3.0 版试剂套装

提示：请下载最新版说明书，对照相应版本的试剂盒使用。

搜索货号或产品名，下载说明书：www.mgi-tech.com/download/files

目录

第一章 产品信息.....	1
1.1 产品描述.....	1
1.2 适用范围.....	1
1.3 适配测序平台.....	1
1.4 试剂盒组分.....	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期.....	4
1.6 客户自备物料清单.....	5
1.7 注意事项.....	6
第二章 样本要求及处理.....	7
2.1 适用样本类型及投入量要求.....	7
2.2 样本质量要求及说明.....	7
第三章 文库构建标准流程.....	8
3.1 RNA 富集.....	8
3.2 RNA 片段化.....	10
3.3 反转录及二链合成.....	10
3.4 二链产物纯化.....	11
3.5 末端修复&添加 dA 尾.....	12
3.6 接头连接.....	13
3.7 连接产物纯化.....	14
3.8 PCR 扩增.....	16
3.9 PCR 产物纯化.....	16
3.10 PCR 产物质检.....	17
3.11 变性.....	18
3.12 单链环化.....	19
3.13 酶切消化.....	19
3.14 酶切消化产物纯化.....	20
3.15 消化产物质检.....	21
附录.....	22
附录 A 关于磁珠及纯化.....	22
附录 B 关于 Adapter 使用.....	23
附录 C 关于接头连接和 PCR 反应.....	28

附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算	28
附录 E 关于低质量 FFPE 样本的建库说明	29
附录 F RNA 病原检测样本的建库说明	32

第一章 产品信息

产品描述

MGIEasy RNA文库制备试剂套装是为华大智造（MGI）高通量测序平台量身打造的RNA文库构建试剂盒。使用本试剂套装可以将10 ng -1 μg total RNA制备成适用于MGI高通量测序平台的单链环状DNA文库。本试剂套装适合于针对mRNA高通量测序的基因表达定量及转录组分析，以及待检样本中病原微生物RNA 的检测。试剂套装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构建的稳定性和重复性。

适用范围

本试剂套装适用于所有常见的动物、植物、微生物等物种，包括人、鼠、水稻、拟南芥、酵母、细菌等，不同物种均有稳定的表现。此外，本试剂套装还适用于人全血、肠道等样本中病原微生物 RNA 的检测。

适配测序平台

构建的文库可使用以下平台及测序类型测序：

BGISEQ-500 (SE50/PE50/PE100)

MGISEQ-2000 (SE50/PE100/PE150)

MGISEQ-200 (SE50/SE100) 等

试剂盒组分

MGIEasy RNA 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 4 个独立试剂盒。不同规格的套装中所包含的试剂盒、货号、组分信息如下：

表 1 MGIEasy RNA 文库制备试剂套装 (16 RXN) (货号: 1000006383)

试剂盒种类与货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy RNA 文库制备试剂 盒 货号: 1000005274	Fragmentation Buffer	绿色	93 μ L/支 \times 1 支
	RT Buffer	绿色	88 μ L/支 \times 1 支
	RT Enzyme Mix	绿色	24 μ L/支 \times 1 支
	Second Strand Buffer	黄色	470 μ L/支 \times 1 支
	Second Strand Enzyme Mix	黄色	78 μ L/支 \times 1 支
	ERAT Buffer	橙色	132 μ L/支 \times 1 支
	ERAT Enzyme Mix	橙色	55 μ L/支 \times 1 支
	Ligation Buffer	红色	450 μ L/支 \times 1 支
	DNA Ligase	红色	34 μ L/支 \times 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	470 μ L/支 \times 1 支
	PCR Primer Mix	蓝色	90 μ L/支 \times 1 支
MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒 货号: 1000005284	DNA Adapters	白色	10 μ L/支 \times 16 支
MGIEasy DNA 纯化磁珠 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	白色	8 mL/支 \times 1 支
	TE Buffer	白色	4 mL/支 \times 1 支
MGIEasy 环化 模块 货号: 1000005260	Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 \times 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Buffer	白色	23 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Enzyme	白色	42 μ L/支 \times 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	120 μ L/支 \times 1 支

表2 MGEasy RNA文库制备试剂套装(96 RXN)(货号: 1000006384)

试剂盒种类与货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
MGEasy RNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005276	Fragmentation Buffer	绿色	608 μ L/支 \times 1 支	
	RT Buffer	绿色	760 μ L/支 \times 1 支	
	RT Enzyme Mix	绿色	136 μ L/支 \times 1 支	
	Second Strand Buffer	黄色	1496 μ L/支 \times 2 支	
	Second Strand Enzyme Mix	黄色	448 μ L/支 \times 1 支	
	ERAT Buffer	橙色	872 μ L/支 \times 1 支	
	ERAT Enzyme Mix	橙色	325 μ L/支 \times 1 支	
	Ligation Buffer	红色	1300 μ L/支 \times 2 支	
	DNA Ligase	红色	173 μ L/支 \times 1 支	
	PCR Enzyme Mix	蓝色	1340 μ L/支 \times 2 支	
	PCR Primer Mix	蓝色	448 μ L/支 \times 1 支	
	MGEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282	DNA Adapters	白色	10 μ L/孔 \times 96 孔
	MGEasy DNA 纯化磁珠 货号: 1000005279	DNA Clean Beads	白色	50 mL/支 \times 1 支
		TE Buffer	白色	25 mL/支 \times 1 支
MGEasy 环化模块 货号: 1000005260	Splint Buffer	紫色	186 μ L/支 \times 1 支	
	DNA Rapid Ligase	紫色	8 μ L/支 \times 1 支	
	Digestion Buffer	白色	23 μ L/支 \times 1 支	
	Digestion Enzyme	白色	42 μ L/支 \times 1 支	
	Digestion Stop Buffer	白色	120 μ L/支 \times 1 支	

试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy RNA 文库制备试剂盒

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

MGIEasy DNA Adapters 试剂盒

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

MGIEasy DNA 纯化磁珠

- 储存温度: 2°C ~ 8°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 冰袋运输

MGIEasy 环化模块

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

*干冰运输, 请注意检查收到产品时是否有干冰剩余。

*当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性。

客户自备物料清单

表 3 客户自备仪器和物料清单

仪器	ThermoMixer (Eppendorf) 漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 磁力架 (ThermoFisher, Cat. No. 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216) Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA)
试剂	RNase Zap 杂交液 (Ambion, Cat. No. AM9780) mRNA 富集试剂盒, 推荐 Dynabeads® mRNA Purification Kit (for mRNA Purification from Total RNA Preps) (Invitrogen, Cat. No. 61006) 或 Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads (Vazyme, Cat. No. N401-01/02) MGIEasy rRNA 去除试剂盒 V1.1 (MGI, Cat. No. 1000005953) 或其他品牌 rRNA 去除试剂盒。(与 mRNA 富集试剂盒二选一) RNA 纯化磁珠 (Agencourt RNAClean XP 40 mL Kit, Agencourt, Cat. No. A63987) (选择 rRNA 去除方法时所需物料) Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 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)
耗材	移液器吸头及无 RNA 酶吸头 1.5 mL 不粘管 (Ambion, Cat. No. AM12450) 1.5 mL 离心管 (Axygen, Cat. No. MCT-150-C) 0.2 mL PCR 管 (Axygen, Cat. No. PCR-02-C) 或 96 孔板 (Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C) Qubit® Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或 0.5mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C)

注意事项

- ◆ 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- ◆ 文库制备流程推荐根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行调整和优化。本说明书提供的实验流程是通用流程，可根据需要调整反应参数，以优化性能、效率。
- ◆ 试剂套装各组分使用前提前取出，将Enzyme瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻，解冻后上下颠倒数次充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- ◆ 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打至少十次混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
- ◆ 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样品时请更换吸头。
- ◆ 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应，使用前应预热PCR仪至反应温度附近。若无特殊说明，热盖温度设置为105°C。
- ◆ PCR产物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；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用0.5%次氯酸钠或10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
- ◆ 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- ◆ 若您有其他疑问，请联系MGI技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

第二章 样本要求及处理

适用样本类型及投入量要求

本试剂套装适用于所有常见的动物、植物、微生物等，包括人、鼠、水稻、拟南芥、酵母、细菌等。推荐使用的 Input total RNA 量为 10 ng - 1 μ g。对于如水稻、拟南芥等植物 mRNA 丰度较低的物种，建议提高 Input total RNA 量至 1-2.5 μ g。

对于病原微生物的检测，人全血样本及肠道样本需要用 MGIEasy rRNA 去除试剂盒 V1.1 进行去 rRNA 处理，所使用样本的 Input total RNA 量为 200 ng。

样本质量要求及说明

- 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对提取的 total RNA 样本进行质检，要求 RIN 值 \geq 7，当 RIN $<$ 7 时，可适当提高投入量并提高 PCR cycles，总投入量不超过 2.5 μ g。对于低质量 FFPE 样本的文库制备，请参考附录 E。对于病原微生物的样本的文库制备，请参考附录 F。
- RNA 纯度：OD_{260/280}=1.8~2.0，OD_{260/230} \geq 2.0。
- 若 RNA 中 DNA 污染较多，需先用 DNase I 去除 DNA 并纯化后再开始后续实验。

第三章 文库构建标准流程

本标准实验流程所使用的Input RNA是 200 ng total RNA, RIN值 ≥ 7 。若Input RNA量不同, 请参考附录C推荐的接头连接及PCR条件进行调整。对于低质量FFPE样本的文库制备, 请参考附录E。对于病原微生物的样本的文库制备, 请参考附录F。

RNA 富集

根据需求, 下面三种方法选择一种进行RNA富集。

2.1.1 rRNA 去除试剂盒

采用rRNA去除方法时, 按照rRNA去除试剂盒的操作说明富集RNA后, 直接进入步骤3.2 RNA片段化。

2.1.2 Dynabeads® mRNA Purification Kit

使用Dynabeads® mRNA Purification Kit进行mRNA的富集, 操作步骤如下:



注意: mRNA 富集时需使用不粘管。以下操作步骤中, 样品切忌涡旋混匀, 用吸头混匀即可。

- 3.1.2.1 mRNA 富集试剂盒的磁珠涡旋震荡 1 min 混匀后吸取 50 μL 至一新的 1.5 mL 不粘管中, 在磁力架上静置 2 min, 弃去上清。
- 3.1.2.2 把管子从磁力架上取下, 吸取 50 μL Binding Buffer 加入含磁珠的不粘管, 用移液器将磁珠从管壁吹到管底, 再上下吹打 10 次混匀, 置于磁力架上 2 min, 弃去上清。
- 3.1.2.3 重复步骤 3.1.2.2 一次。
- 3.1.2.4 用 25 μL Binding Buffer 将磁珠吹至管底, 上下吹打 10 次混匀备用。
- 3.1.2.5 提前将 ThermoMixer 调至 65°C。
- 3.1.2.6 取 200 ng total RNA 样品至 1.5 mL 不粘管中, 用 NF Water 补足体积至 25 μL 。
- 3.1.2.7 将样品放入 65°C 加热变性 5 min 后取出, 立即把准备好的 25 μL 磁珠加入样品中, 移液器上下吹打 10 次混匀, 室温静置 5 min。此时把 ThermoMixer 调至 80°C。
- 3.1.2.8 将样品磁珠混合管在磁力架上静置 2 min, 弃去上清。
- 3.1.2.9 把管子从磁力架上取下, 吸取 50 μL Washing Buffer 加入含磁珠的不粘管, 用移液器将磁珠从管壁吹到管底, 再上下吹打 10 次混匀, 置于磁力架上 2 min, 弃去上清。
- 3.1.2.10 重复步骤 3.1.2.9 一次。
- 3.1.2.11 用 25 μL 10 mM Tris-HCl 将磁珠吹打混匀, 80°C 加热 2 min 将 mRNA 从磁珠上洗脱。

3.1.2.12 立即向磁珠悬液中加入 25 μ L Binding Buffer, 用移液器吹打 10 次混匀, 室温静置 5 min, 置于磁力架上 2 min, 弃去上清。

3.1.2.13 重复步骤 3.1.2.9 两次。

3.1.2.14 用 12 μ L 10 mM Tris-HCl 重悬磁珠, 80°C 加热 2 min 将 mRNA 从磁珠上洗脱, 立即置于磁力架上静置 1-2 min, 吸取 10 μ L 上清转入 PCR 管中。

2.1.3 Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads 试剂盒

使用 Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads 试剂盒进行 mRNA 富集, 操作步骤如下:

3.1.3.1 将 mRNA Capture Beads 从 4°C 取出, 静置使其温度平衡至室温。

3.1.3.2 取 200 ng total RNA 样品至 1.5 mL 不粘管中, 用 NF Water 补足体积至 50 μ L。

3.1.3.3 旋涡振荡使 mRNA Capture Beads 充分混匀, 吸取 50 μ L 加入到 total RNA 样品中, 用移液器吹打 10 次以彻底混匀。

3.1.3.4 将样品管置于 ThermoMixer 中, 65°C 加热变性 5 min。

3.1.3.5 室温放置 5 min, 使 mRNA 结合到磁珠上。此时把 ThermoMixer 调至 80°C。

3.1.3.6 将样品置于磁力架 5 min, 使 mRNA 与 total RNA 分离, 小心移除上清。

3.1.3.7 将样品管从磁力架上取出, 用 200 μ L Beads Wash Buffer 吹打 10 次以彻底混匀, 在磁力架上静置 5 min, 小心移除上清。

3.1.3.8 将样品从磁力架上取出, 用 50 μ L Tris Buffer 重悬磁珠, 用移液器吹打 10 次以彻底混匀。80°C 加热 2 min 将 mRNA 洗脱下来。

3.1.3.9 立即加入 50 μ L Beads Binding Buffer, 用移液器吹打 10 次以彻底混匀。室温放置 5 min, 使 mRNA 结合到磁珠上。

3.1.3.10 将样品置于磁力架 5 min, 使 mRNA 与 total RNA 分离, 小心移除上清。

3.1.3.11 将样品从磁力架上取出, 用 200 μ L Beads Wash Buffer 吹打 10 次以彻底混匀, 在磁力架上静置 5 min, 小心移除全部上清。

3.1.3.12 用 12 μ L Tris Buffer 重悬磁珠, 80°C 加热 2 min 将 mRNA 从磁珠上洗脱, 立即置于磁力架上静置 5 min, 吸取 10 μ L 上清转入 PCR 管中。

RNA 片段化



注意：以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

- 3.2.1 向步骤 3.1 的 10 μ L 洗脱液中加入 4 μ L Fragmentation Buffer，吹打 10 次混匀，瞬时离心后放入 PCR 仪中。根据插入片段大小的需要，选择相对应的片段化条件。

表 4 片段化条件推荐

插入片段	片段化温度	片段化时间
150 bp	94°C	8min
250 bp	87°C	6min

- 3.2.2 反应结束后立即置于冰上 2 min，瞬时离心 10 s，立刻进入反转录反应。

反转录及二链合成



注意：以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

- 3.3.1 将 RT Buffer 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制反转录反应液（见表 5）：

表 5 反转录反应液

组分	体积
RT Buffer	5 μ L
RT Enzyme Mix	1 μ L
Total	6 μ L

- 3.3.2 用移液器吸取 6 μ L 配制好的反转录反应液加入步骤 3.2.2 的片段化后产物中，吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.3.3 将步骤 3.3.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 6 中的条件进行反应：

表 6 反转录反应条件

温度	时间
热盖	On
25°C	10 min
42°C	30 min
70°C	15 min
4°C	Hold

- 3.3.4 反应结束后，将产物置于冰上，瞬时离心 10 s。

- 3.3.5 将 Second Strand Buffer 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制二链合成反应液（见表 7）：

表 7 二链合成反应液

组分	体积
Second Strand Buffer	26 μL
Second Strand Enzyme Mix	4 μL
Total	30 μL

- 3.3.6 用移液器吸取 30 μL 配制好的二链合成反应液加入步骤 3.3.4 的反转录产物中，吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

- 3.3.7 将步骤 3.3.6 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 8 中的条件进行反应：

表 8 二链合成反应条件

温度	时间
热盖	On
16 $^{\circ}\text{C}$	60 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

- 3.3.8 反应结束后，瞬时离心 10 s，将二链产物转移至新的 1.5 mL 离心管中，置于冰上待下一步反应。

✓ **停止点：二链产物可置 -20°C 冰箱过夜储存不超过 16 h。**

二链产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A。

- 3.4.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.4.2 用移液器吸取 75 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.3.8 中的二链产物中，并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL 离心管中。
- 3.4.3 室温孵育 5 min。
- 3.4.4 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.4.5 保持 1.5 mL 离心管置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 3.4.6 重复步骤 3.4.5，第二次漂洗后尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在

磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。

- 3.4.7 保持 1.5 mL 离心管固定于磁力架上，打开 1.5 mL 离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.4.8 将 1.5 mL 离心管从磁力架上取下，加入 42 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，瞬时离心。
- 3.4.9 室温下孵育 5 min。
- 3.4.10 将 1.5 mL 离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 40 μ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

✓ **停止点：二链产物纯化后，可置-20°C 冰箱储存。**

末端修复&添加 dA 尾

- 3.5.1 在冰上配制末端修复&添加 dA 尾反应液（见表 9）：

表 9 末端修复&添加 dA 尾反应液

组分	体积
ERAT Buffer	7.1 μ L
ERAT Enzyme Mix	2.9 μ L
Total	10 μ L

- 3.5.2 用移液器吸取 10 μ L 配制好的末端修复&添加 dA 尾反应液加入步骤 3.4.10 的纯化后二链产物中，并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.5.3 将步骤 3.5.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 10 中的条件进行反应：

表 10 末端修复反应&添加 dA 尾反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
65°C	15 min
4°C	Hold

- 3.5.4 瞬时离心将反应液收集至管底。



注意：不建议在此处停止，请继续做步骤 3.6。如果必须停止，末端修复产物可以放在-20°C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20%左右。

接头连接



注意：因不同的投入量对应不同的 Adapter 使用量，操作前请仔细阅读附录 B。

3.6.1 将 Adapter 按照表 11 稀释 10 倍，混匀离心，待用。

表 11 Adapter 稀释

组分	体积
Adapter	1 μL
TE Buffer	9 μL
Total	10 μL

3.6.2 参照 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则（参见附录 B），在步骤 3.5.4 的 PCR 管中加入 5 μL 对应的稀释后的 Adapter，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.6.3 在冰上配制接头连接反应液（见表 12）：

表 12 接头连接反应液

组分	体积
Ligation Buffer	23.4 μL
DNA Ligase	1.6 μL
Total	25 μL

3.6.4 用移液器缓慢吸取 25 μL 配制好的接头连接反应液加入步骤 3.6.2 的 PCR 管中，涡旋震荡 6 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.6.5 将步骤 3.6.4 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 13 中的条件进行反应：

表 13 接头连接反应条件

温度	时间
热盖	On
23°C	30 min
4°C	Hold

3.6.6 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.6.7 加入 20 μL TE Buffer 至总体积 100 μL ，全部转移到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ 停止点：接头连接后产物可放置 -20°C 冰箱过夜储存，不超过 16 h。

连接产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A。

若插入片段为 150bp (RNA 片段化条件为 94°C 8 min)，则按照以下方法进行纯化：

- 3.7.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.7.2 用移液器吸取 50 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.6.7 的接头连接产物中，并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL 离心管中。
- 3.7.3 室温孵育 5 min。
- 3.7.4 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.7.5 保持 1.5 mL 离心管置于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 3.7.6 重复步骤 3.7.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.7.7 保持 1.5 mL 离心管固定于磁力架上，打开 1.5 mL 离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.7.8 将 1.5 mL 离心管从磁力架上取下，加入 23 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.7.9 室温下孵育 5 min。
- 3.7.10 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 21 μ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。



停止点：连接产物纯化后，可置-20°C 冰箱储存。

若插入片段为 250bp (RNA 片段化条件为 87°C 6min), 则按照以下方法进行的操作:

3.7.11 按照步骤 3.7.1 到 3.7.7 完成后, 在步骤 3.7.8 中用 52 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱, 步骤 3.7.10 中吸取 50 μ L 上清到新的 1.5 mL 离心管中。

3.7.12 用移液器吸取 32.5 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.7.11 中的 50 μ L 上清产物中, 并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀, 最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL 离心管中。

3.7.13 室温孵育 5 min。



注意: 此步结束后保留上清, 丢弃磁珠。

3.7.14 瞬时离心, 将 1.5 mL 离心管置于磁力架, 静置 2-5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取上清转移到新的 1.5 mL 离心管中。

3.7.15 用移液器吸取 10 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.7.14 的上清中, 并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀, 最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL 离心管中。

3.7.16 室温孵育 5 min。

3.7.17 瞬时离心, 将 1.5 mL 离心管置于磁力架, 静置 2-5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.7.18 保持 1.5 mL 离心管置于磁力架上, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁, 静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。

3.7.19 重复步骤 3.7.18, 最后一次漂洗后尽量吸干管内液体, 有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程的移液器将管底液体吸干。

3.7.20 保持 1.5 mL 离心管固定于磁力架上, 打开 1.5 mL 离心管管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.7.21 将 1.5 mL 离心管从磁力架上取下, 加入 23 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。

3.7.22 室温下孵育 5 min。

3.7.23 瞬时离心, 将 1.5 mL 离心管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 将 21 μ L 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。



停止点: 连接产物纯化后, 可置-20°C 冰箱储存。

PCR 扩增



注意：操作前请仔细阅读附录 C。

- 3.8.1 取 21 μL 连接纯化后产物。
- 3.8.2 在冰上配制 PCR 反应液（见表 14）：

表 14 PCR 反应液

组分	体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Primer Mix	4 μL
Total	29 μL

- 3.8.3 用移液器吸取 29 μL 配制好的 PCR 反应液加入步骤 3.8.1 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.8.4 将步骤 3.8.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 15 的条件进行 PCR 反应：

表 15 PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
95°C	3 min	1 循环
95°C	30 s	
56°C	30 s	14 循环
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 循环
4°C	Hold	

- 3.8.5 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.8.6 吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

PCR 产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A。

- 3.9.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.9.2 吸取 60 μL DNA Clean Beads 至步骤 3.8.6 的 50 μL PCR 产物中，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL 离心管中。
- 3.9.3 室温孵育 5 min。

- 3.9.4 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.9.5 保持 1.5 mL 离心管置于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 3.9.6 重复步骤 3.9.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.9.7 保持 1.5 mL 离心管固定于磁力架上，打开 1.5 mL 离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.9.8 将 1.5 mL 离心管从磁力架上取下，加入 32 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.9.9 室温下孵育 5 min。
- 3.9.10 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 30 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

✓ **停止点：PCR 纯化后产物，可置-20°C 冰箱储存。**

PCR 产物质检

- 3.10.1 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对 PCR 纯化后产物进行定量。要求最终 PCR 产物的摩尔产量 \geq 1 pmol，不同片段大小的 PCR 产物对应的产量请参考表 16。

表 16 不同片段大小 PCR 产物 1 pmol 对应产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR 产物主片段大小 (bp)	1 pmol 对应产量 (ng)
150	230	152
250	330	218

- 3.10.2 通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies); LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer); Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。

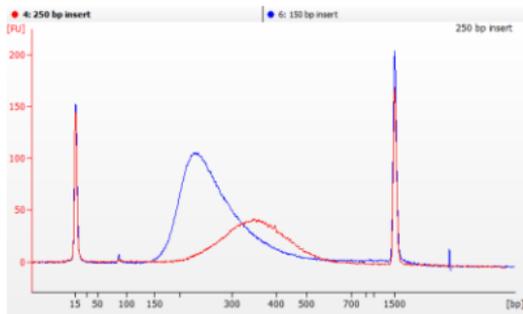


图1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

变性



注意：操作前请仔细阅读附录 B 和附录 D。

3.11.1 根据 PCR 产物的主片段分布，参考表 16 或附录 D 的公式 1，将 6–16 个样本混合环化（按照实际需求确定混合样本的数量），需根据 MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案（见附录 B），在 PCR 产物定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。例如：构建插入片段主片段为 150bp 的文库，8 个样本混合测序时每个样本需要相等的数据量，则每个样本的 PCR 产物取 19 ng 混合共 152 ng 至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

3.11.2 将步骤 3.11.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 17 的条件进行反应：

表 17 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	3 min

3.11.3 反应结束后，立即将 PCR 管转移到冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

单链环化

3.12.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 18）：

表 18 单链环化反应液

组分	体积
Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12.1 μL

3.12.2 用移液器吸取 12.1 μL 配制好的单链环化反应液加入步骤 3.11.3 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.12.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 19 的条件进行反应：

表 19 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

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

酶切消化

3.13.1 上一步反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液（见表 20）：

表 20 酶切消化反应液

组分	体积
Digestion Buffer	1.4 μL
Digestion Enzyme	2.6 μL
Total	4.0 μL

3.13.2 用移液器吸取 4 μL 配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.12.4 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.13.3 将步骤 3.13.2 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 21 的条件进行反应：

表 21 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min

3.13.4 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.13.5 反应结束后，向 PCR 管中加入 7.5 μ L Digestion Stop Buffer，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底，吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

酶切消化产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A。

3.14.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.14.2 吸取 170 μ L DNA Clean Beads 至步骤 3.13.5 的酶切消化产物中，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 1.5 mL 离心管中。

3.14.3 室温孵育 10 min。

3.14.4 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.14.5 保持 1.5 mL 离心管置于磁力架上，加入 500 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。

3.14.6 重复步骤 3.14.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。

3.14.7 保持 1.5 mL 离心管固定于磁力架上，打开 1.5 mL 离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.14.8 将 1.5 mL 离心管从磁力架上取下，加入 22 μ L TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。

3.14.9 室温下孵育 10 min。

3.14.10 瞬时离心，将 1.5 mL 离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 20 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。



停止点：酶切消化纯化后产物，可置-20°C 冰箱储存一个月。

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。要求最终产物摩尔产量 ≥ 80 fmol（足够两次上机测序），可参考表22或参考附录D的公式2进行计算。

表 22 不同 PCR 产物片段大小对应 80 fmol 单链环产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR 产物主片段大小 (bp)	80 fmol 对应产量 (ng)
150	230	6.07
250	330	8.71

附录

附录 A 关于磁珠及纯化

试剂套装推荐使用套装内的 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒 (MGI, Cat. No. 1000005278 或 1000005279) 的 DNA Clean beads 或自行购买的 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他来源磁珠, 纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前注意事项

- 磁珠使用前, 提前 30 min 从 4°C 取出, 涡旋混匀且置于室温, 使其平衡至室温, 有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前, 需振荡或用移液器上下吹打, 确保充分混匀。

磁珠操作注意事项

- 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发, 应用 TE Buffer 补齐体积, 再用推荐磁珠用量进行纯化, 以保证乘数正确, 条带正确。
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 一般需要 2-3 min。但由于磁力架吸力不同等原因, 推荐分离时间有时可能需要延长, 以液体彻底澄清为准。
- 磁珠与液体分离时, 注意吸头不可碰到磁珠, 最后可余留 2-3 μ L 液体, 避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠, 可将磁珠与液体全部打回管内, 再次分离后再吸取上清。
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80%乙醇。漂洗过程中 1.5 mL 离心管应始终置于磁力架中, 请勿扰动磁珠。
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体, 有少量残留在管壁时可将 1.5 mL 离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程的移液器把管中液体吸干。
- 两次乙醇漂洗后, 应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分 (磁珠表面反光) 容易造成无水乙醇残留影响后续反应, 过分干燥 (磁珠开裂) 又会降低纯化得率。通常情况下, 室温干燥需要 5-10 min, 但由于室内温度和湿度的差异, 干燥时间可能会不同, 应随时观察, 磁珠表面无反光, 即可进行产物洗脱, 可用试剂盒附带的 TE Buffer 进行洗脱。
- 洗脱后吸取上清时, 切忌触碰磁珠, 若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应, 所以, 洗脱体积应该比最终吸取上清的体积多 2 μ L。
- 在 1.5 mL 管磁力架上开关管盖应小心, 避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出, 建议用手指固定住 1.5 mL 离心管中下段, 然后开盖。

附录 B 关于 Adapter 使用

- 本试剂盒根据反应数不同提供 2 种不同规格的 Adapter 试剂盒：MGIEasy DNA Adapters-16（管式）试剂盒或 MGIEasy DNA 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。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录 B-1 和 B-2 的使用规则。同时，两款 Adapter 试剂盒编号存在重叠，编号相同的 Adapter，Barcode 碱基序列相同，不能在同一条 lane 中测序。
- 请勿将其置于室温以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。
- Adapter 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底或板底，用吸水纸擦拭干净管盖或铝箔表面；对于管式 Adapters 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；对于板式 Adapters，第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝箔直接吸取液体，使用过程中注意更换吸头，避免污染，使用完毕后，刺破孔位的剩余试剂需逐一转移到 1.5 mL 离心管或 0.2 mL PCR 管中，做好标记，-20°C 保存。
- 若有使用 MGI 其它建库试剂盒中的序号为 501-596 的接头，由于设计工艺不同，禁止混用，否则数据无法拆分。
- Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请按照表 23 和实际 total RNA 用量确定相应的接头稀释倍数。需要稀释接头时，请使用试剂盒中的 TE Buffer 对接头进行稀释。

表 23 不同 total RNA 投入量推荐 Adapter 使用量

样本 RNA (ng)	MGI Adapter	MGI Adapter
	稀释倍数	稀释后投入量 (μL)
201-2500	5	5
51-200	10	5
10-50	20	5

- 对于其它的 total RNA 样本投入量，可根据需求适当调整 Adapter 使用量。

B-1 MGIEasy DNA Adapters-16（管式）试剂盒使用规则

- 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：

表 24 MGI Easy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒使用规则

样本数 / lane	使用方法 (举例)
1	需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中 或 2、加一组 8 Adapter (97-104), 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中
2	需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 每个编号 Adapter 取等体积, 两两组合, 混合成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如 01-04, 将 01 和 02 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 03 和 04 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中) 或 2、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix, 形成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如将 97-100 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 101-104 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中)
3	需至少使用 2 组 Adapter: 样本 1、2 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加 Adapter, 样本 3 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加 Adapter, 注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter
4	需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入 4 个样本中 (如 01-04, 将 01、02、03、04 分别依次加样本 1、2、3、4 中) 或 2、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 两两组合, 混合成 4 份等体积 mix, 分别加入 4 个样本中 (如将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix 后, 分别依次加入样本 1、2、3、4 中)
5	需至少使用 2 组 Adapter: 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加 Adapter, 样本 5 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加 Adapter, 注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter
6	需至少使用 2 组 Adapter: 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter
7	需使用全部 3 组 Adapter, 分三步操作: 1) 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 2) 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 3) 样本 7, 使用剩余的一组 Adapter, 可以加该组内一个单 Adapter, 或者加组内所有编号 Adapter 取等体积混合成的 Adapter mix

	注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter
8	需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本 或 2、选取两组 4 Adapter (01-04 和 13-16), 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本加 1 个 Adapter

- 当样本数据量要求不同时, 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。

B-2 MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒使用规则

- 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 2 MGIEasy DNA 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 (图 2 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 (图 2 蓝色框);

24 个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组（图 2 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如下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

表 25 MGI Easy DNA Adapters-96（板式）试剂盒使用规则

样本数/lane	使用方法（举例）
1	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中； 或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。
2	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如 01-04，将 01 和 02 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 03 和 04 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中）； 或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix，形成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如 41-48，将 41-44 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 45-48 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中）。
3	样本 1、2 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter，样本 3 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter，注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。
4	1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入 4 个样本中（如 01-04，将 01、02、03、04 分别依次加样本 1、2、3、4 中）； 或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 4 份等体积 mix，分别加入 4 个样本中（如 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别等体积混合成 4 份 mix 后，分别依次加入样本 1、2、3、4 中）。
5	样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter，样本 5 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter，注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。
6	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，注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。
7	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，样本 7 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter，注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。
8	加一组 8 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入每个样本。

$8n+x$ $(n=1、2,$ $x=1-8, 总计$ $9-24 个)$	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、4-8 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 注意: 上述 1)、2)、3) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter
$8n+x$ $(3 \leq n < 11, x=1-$ $8, 总计 25-96$ $个)$	分三步: 1) 样本 1-24, 加一组 24 Adapter, 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本中加 1 个编号 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 注意: 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相同时, 需遵循在一条lane中数据量要求大于20%的样本不得使用不成组的Adapter。例如有9个样本pooling于一条lane中, 其中有1个样本要求数据量为30%, 此时需采用如下Barcode的方案: 8个样本使用Adapter 97-104, 另外一个样本不可使用单独的一个Adapter, 而是要使用Adapter 01-04或Adapter 13-16或其他97-104以外的成组Adapter。

附录 C 关于接头连接和 PCR 反应

- 接头连接反应液中含有较高浓度的 PEG，溶液较粘稠，移液器操作时请慢慢吸放，确保加液量正确。
- PCR 步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，可能会导致文库产出不足；循环数过多，可能会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 26 列举了当使用 10 - 1000 ng 高质量样本 total RNA (150 bp 主带) 时，所需要的扩增循环数，当样本 RNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

表 26 推荐的扩增循环数

total RNA (ng)	对应产量所需循环数
	≥300 ng
10	17-18
50	15-16
200	13-14
1000	11-12

附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

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

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算：

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

单链环状DNA产物纯化后产量应达到80 fmol以上方足够两次上机测序的量。可根据公式2计算所得单链环状DNA的摩尔数。

公式 2 单链环 fmol 与 ng 间的换算：

$$80 \text{ fmol 单链环对应的质量}(\text{ng}) = 0.08 \times \frac{\text{DNA 主片段大小}(\text{bp})}{1000 \text{ bp}} \times 330 \text{ ng}$$

附录 E 关于低质量 FFPE 样本的建库说明

本流程适用于 FFPE RNA 等低质量的 total RNA 样本进行文库构建，但由于不同 FFPE 样本的质量差距较大，因此并不能保证所有的 FFPE 样本都可以完成二代测序文库的构建。现列举不同降解程度的 FFPE 样本在文库制备过程中需要注意的问题。

E-1. 关于 FFPE 样本的质量评价

常规评价 RNA 样本质量的参数是 RIN 值，但是对于 FFPE 这种降解的样本，并不能完全用 RIN 值来准确衡量样本的质量，特别是在二代测序文库构建中，FFPE 样本的 RIN 值并不能完全反映样本质量。所以，在评价 FFPE 样本的文库构建成功率时，还需要用到 DV_{200} ， DV_{200} 表示样本中大于 200nt 的 RNA 片段所占的比例，对于降解严重的 FFPE 样本， DV_{200} 值能够更好的反映样本的质量。

DV_{200} 的计算方法

以 Agilent 2100 Bioanalyzer 的分析结果为例，进行 DV_{200} 的计算，具体计算方法如图 3 所示：

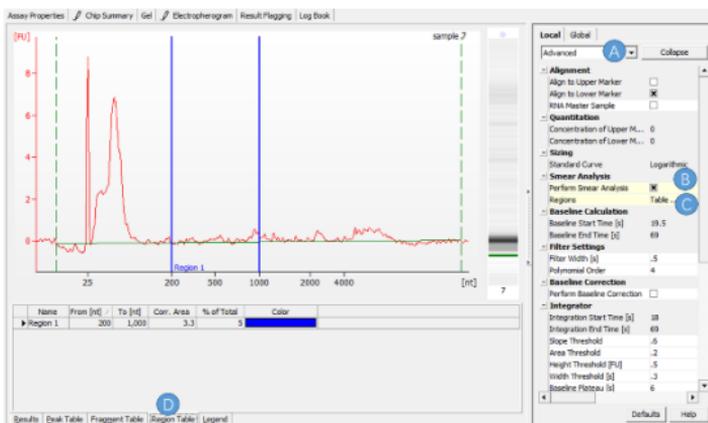


图 3 DV_{200} 的计算方法

- 在一个检测完成的 Agilent 2100 Bioanalyzer 结果图中，在 *Local* 下选择 *Advanced*
- 勾选 *Smear Analysis* 下的 *Perform Smear Analysis* 选项
- 双击 *Table*，输入需要计算的片段范围，图中以 From 200 bp To 1000 nt 为例
- 在 *Region Table* 下即可得到所选片段范围所占的比例 *% of Total*

若需要确定 FFPE 样本的 DV_{200} 参数，可以将 FFPE 样本进行 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析（采用 RNA 分析芯片）后，按照以上的方法进行计算，具体可参考文件 *DV200 determination for FFPE RNA samples* (<https://www.agilent.com/en/promotions/dv200-determination>)。

E-2. FFPE RNA 样本的推荐使用量

FFPE RNA 样本进行文库制备时, 采用 rRNA 去除方法去除核糖体 RNA 之后的样本按照本说明书进行二代测序文库的制备, 在“RNA 片段化”的步骤中需注意不同的样本使用不同的片段化条件, 在“二链产物纯化”步骤注意使用 100 μ L 的磁珠进行纯化, 在“接头连接”步骤注意 Adapter 的用量, 在“PCR 扩增”步骤注意对应不同的 PCR cycles, 具体见表 27 和表 28。

表 27 FFPE 样本建库的推荐条件

FFPE 样本 DV ₂₀₀ 值	推荐的 total RNA 投入量	RNA 片段化	二链产物纯化的磁珠	PCR cycles
> 70%	200 ng	94°C, 8 min	100 μ L 磁珠纯化	14
50-70%	200-400 ng	94°C, 8 min	100 μ L 磁珠纯化	16
30-50%	500 ng	94°C, 6 min	100 μ L 磁珠纯化	16
< 30%	0.5-1 μ g 风险建库	不片段化	100 μ L 磁珠纯化	16

表 28 FFPE 样本建库的 Adapter 使用推荐

FFPE 样本 DV ₂₀₀ 值	推荐的 total RNA 投入量	MGI Adapter	
		稀释倍数	稀释后投入量 (μ L)
> 70%	200 ng	5	5
50-70%	200-400 ng	10	5
30-50%	500 ng	20	5
< 30%	0.5-1 μ g 风险建库	50	5

E-3. FFPE 样本文库构建流程

E-3.1 RNA 富集

采用 rRNA 去除方法进行富集, 按照相关 rRNA 去除试剂盒的操作说明富集 RNA。

E-3.2 RNA 片段化

参照表 27 的推荐, 不同降解程度的样本使用不同的片段化条件。对于不需要进行片段化的样本, 在富集完成之后, 直接将样本进行 65°C 5 min 变性处理, 反应结束后立即置于冰上 2 min, 瞬时离心 10 s 备用。同时, 取 4 μ L Fragmentation Buffer 到一个新的 0.2 mL PCR 管中, 与样本一起进行 65°C 5 min 处理, 反应结束后立即置于冰上 2 min, 瞬时离心 10 s, 然后将 4 μ L Fragmentation Buffer 转移到含有样本的 PCR 管中, 立刻进入下一步的反转录反应。

E-3.3 反转录及二链合成

同步步骤 3.3。

E-3.4 二链产物纯化

参照步骤 3.4。

参照表 27，用 100 μ L 磁珠纯化，42 μ L TE Buffer 洗脱 DNA，最终取 40 μ L 上清至新的 0.2 mL PCR 管中。

E-3.5 末端修复&添加 dA 尾

同步步骤 3.5。

E-3.6 接头连接

参照步骤 3.6。

参照表 28，不同的 FFPE 样本选择不同的 Adapter 使用量。

E-3.7 连接产物纯化

同步步骤 3.7.1 至 3.7.10。

E-3.8 PCR 扩增

参照步骤 3.8。

参照表 27，不同的 FFPE 样本选择不同的 PCR cycles。

E-3.9 PCR 产物纯化至酶切消化产物质检

同步步骤 3.9-3.15。

附录 F RNA 病原检测样本的建库说明

F-1. 关于 RNA 病原微生物样本的适用类型

适用于人全血、肠道样本的 RNA 病原微生物的检测。

F-2. RNA 病原微生物样本的推荐投入量

人全血样本及肠道样本需要用 MGIEasy rRNA 去除试剂盒 V1.1 进行去 rRNA 处理，推荐 total RNA 起始量为 200 ng。

F-3. RNA 病原微生物样本文库构建流程

F-3.1 RNA 富集

人全血样本及肠道样本，按照 MGIEasy rRNA 去除试剂盒 V1.1 的操作说明进行 RNA 富集。

F-3.2 RNA 片段化

按照 3.2 表 4 中插入片段 150bp 条件，即 94°C 孵育 8min 将样本 RNA 片段化。

F-3.3 反转录及二链合成

同步步骤 3.3。

F-3.4 二链产物纯化

参照步骤 3.4。

F-3.5 末端修复&添加 dA 尾

同步步骤 3.5。

F-3.6 接头连接

参照步骤 3.6

F-3.7 连接产物纯化

同步步骤 3.7.1 至 3.7.10。

F-3.8 PCR 扩增

参照步骤 3.8。去 rRNA 样本 PCR 扩增 15 个循环。

F-3.9 PCR 产物纯化

同步步骤 3.9。

F-3.10 PCR 产物质检

使用Qubit® dsDNA HS Assay Kit或Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit等双链DNA荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对PCR纯化后产物进行定量。要求最终PCR产物的摩尔产量 ≥ 1 pmol，PCR产物对应的产量请参考表16。如需将多个样本混合测序，建议根据MGIEasy DNA Adapters说明书使用规则设计混合方案（见附录B），在定量后进行不同Adapters样本混合，混合后总量为1 pmol，总体积 ≤ 48 μL 。

通过Bioanalyzer、Tapestation（Agilent Technologies）；LabChip® GX、GXII、GX Touch（PerkinElmer）；Fragment Analyzer™（Advanced Analytical）等基于电泳分离原理的设备对PCR纯化后产物进行片段分布检测。

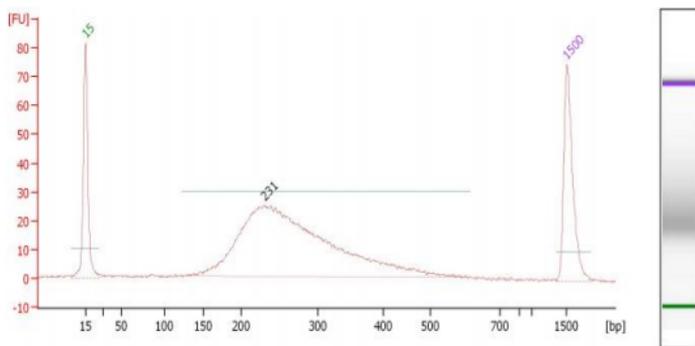


图4 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

文库质检标准见表 29，符合质检标准的为合格文库，不符合质检标准的文库上机存在一定失败的风险。

表 29 文库合格质检标准

质控指标	MGIEasy RNA 文库制备试剂盒	质控标准
PCR 产物产量	Qubit dsDNA HS 定量	≥ 200 ng
PCR 产物片段大小	Agilent 2100 普通芯片检测	主带 210-250 bp，条带分布 150-500bp
接头剩余量	Agilent 2100 普通芯片检测	肉眼观察，80bp 左右无明显接头峰

F-3.11 变性至酶切消化产物质检

同步步骤 3.11-3.15。

联系我们

生产企业: 深圳华大智造科技股份有限公司

生产地址: 深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区 11 栋 2 楼, 518083

客服电话: 4000-966-988

技术支持: MGI-service@mgi-tech.com

网 址: www.mgi-tech.com



官方微信