

NGS Ultima Dual-mode RNA Library Prep Kit (兼容 illumina 平台和 MGI 平台 RNA 建库试剂盒)

K0402

产品简介

NGS Ultima Dual-mode RNA Library Prep Kit 是兼容 Illumina 和 MGI 双平台的 total RNA 测序文库构建试剂盒，包含 RNA 片段化试剂，反转录试剂，常规和链特异性 ds-cDNA 合成试剂，以及文库扩增试剂。可以衔接 mRNA 纯化试剂盒或 rRNA 去除试剂盒构建测序文库。二链合成模块配有两种 Buffer，可根据需要进行常规建库或链特异性建库。其中链特异性二链合成 Buffer 中将 dTTP 替换为 dUTP，使 cDNA 第二链中掺入 dUTP，而本试剂盒使用的高保真 DNA 聚合酶无法扩增含尿嘧啶的 DNA 模板，实现链特异性。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。

产品应用

兼容 Illumina 和 MGI 双平台的 total RNA 测序文库构建。

储存条件

-25~-15℃保存，有效期 1 年。

产品信息

组分编号	组分名称	规格 8 T	规格 24 T	规格 96 T
K0402-1	2×Frag/Prime Buffer	80 µL	250 µL	930 µL
K0402-2	1st Strand Enzyme Mix	16 µL	48 µL	192 µL
K0402-3	Strand Specificity Reagent	50 µL	150 µL	580 µL
K0402-4	2nd Strand Buffer (dNTP)	240 µL	720 µL	2×1440 µL
K0402-5	2nd Strand Buffer (dUTP)	240 µL	720 µL	2×1440 µL
K0402-6	2nd Strand Enzyme Master Mix	40 µL	120 µL	480 µL
K0402-7	Ligation Enhancer	240 µL	720 µL	2×1440 µL
K0402-8	Novel T4 DNA Ligase	40 µL	120 µL	480 µL
K0402-9	2 × Super Canace II High-Fidelity Mix	200 µL	600 µL	2×1200 µL

K0402-10	Nuclease Free H ₂ O	100 µL	300 µL	1000 µL
----------	--------------------------------	--------	--------	---------

注意事项

1. 请于使用前将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
2. 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。
3. 请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清理。PCR 产物因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。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；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁，以保证实验环境的洁净度。
4. 本产品仅作科研用途，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

一、建库前的准备工作。

1. 接头连接 (Adapter Ligation):

- a. 建议选用高质量的商业化接头。如客户使用自制接头，请委托具有 NGS 引物合成经验的公司，并备注需进行严格的防污染控制。进行接头退火操作时，请在超净台完成。每次只操作一种接头，防止交叉污染。
- b. 使用接头时，请提前将接头取出放在 4°C 或冰盒上解冻；在室温操作时，实验室温度最好不要超过 25°C，防止接头解链。
- c. 建库过程中，接头浓度过高或过低都会导致建库成功率变低。本试剂盒操作方案中，所加入的接头体积固定为 5 µL，请根据初始的 RNA 投入量，参考表 1 对接头进行稀释。接头稀释液请选择 0.1×TE buffer，稀释过的接头可在 4°C 保存 48 h。

表 1-1 Input Total RNA 量与 Illumina 接头使用浓度推荐表

Input Total RNA	Illumina Adapter stock concentration
10 ng	1 µM
100 ng	1.5 µM
500 ng	3 µM
≥1 µg	5 µM

表 1-2 Input Total RNA 量与 MGI 接头使用浓度推荐表

Input Total RNA	MGI Adapter stock concentration
100–499 ng	2 µM
500–4000 ng	5 µM

注：可根据不同类型 total RNA 样本及投入量，按需求适当调整 Adapter 使用量

2. 文库扩增 (Library Amplification):

- 文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、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 2 列举了使用本试剂盒进行文库扩增，Input Total RNA 量与相应扩增循环数的推荐。
- 表 2 中推荐的循环数可满足绝大多数建库需求，若您的样本质量较差（如降解严重的 FFPE 样本），可根据实际情况适当增加循环数。mRNA 建库时请特别注意，由于不同物种和组织所提取的 Total RNA 中，mRNA 的含量差异较大，实验中需根据建库起始量、物种类型及样本处理情况适当调整扩增循环数。

表 2 Input Total RNA 量与扩增循环数推荐表

Input Total RNA	Number of cycles	
	Non-stranded	Stranded
10 ng	15	15
100 ng	14	14
500 ng	12	13
1 µg	11	12

注：由于文库产量不仅与投入量和扩增循环数相关，样本质量、片段化条件、分选条件等都会影响产量。建库过程中请根据实际情况综合考虑，选择最合适的建库条件。

3. DNA 磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection):

- 建库过程中有多个步骤需要使用 DNA 纯化磁珠，我们推荐使用 NGS DNA Selection Beads 或 AMPure XP 磁珠进行 DNA 纯化和分选。
- 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
- 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
- 转移上清时，请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量。
- 磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
- 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。
- DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 0.1×TE Buffer 洗脱，产物于 4℃ 可保存 2 天，-20℃ 可保存 1 个月。

4. 文库质检 (Library Quality Analysis):

- 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。
- 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit、PicoGreen 等；基于 qPCR 绝对定量的方法。
- 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit 等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或两端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。
- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop 等。
- 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

5. 自备材料 (Other Material):

- mRNA 富集试剂盒：如 NGS mRNA Isolation Master Kit V2。
- rRNA 去除试剂盒：如 NGS MaxUp Human rRNA Depletion Kit (rRNA&ITS/ETS) 或其他 rRNA 去除试剂盒。
- RNA 纯化磁珠：如 NGS RNA Cleaner 或其他等效产品。
- DNA 纯化磁珠：如 NGS DNA Selection Beads 或 AMPure XP Beads 或其他等效产品。
- RNA 质检：如 Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano/PicoChip 或其他等效产品。
- Adapters：如 Complete Adapter for Illumina 或 Complete Adapter for MGI（或其他等效产品）。
- 文库质检：如 Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/High Sensitivity Chip 或其他等效产品；文库定量试剂。
- 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

建库流程图

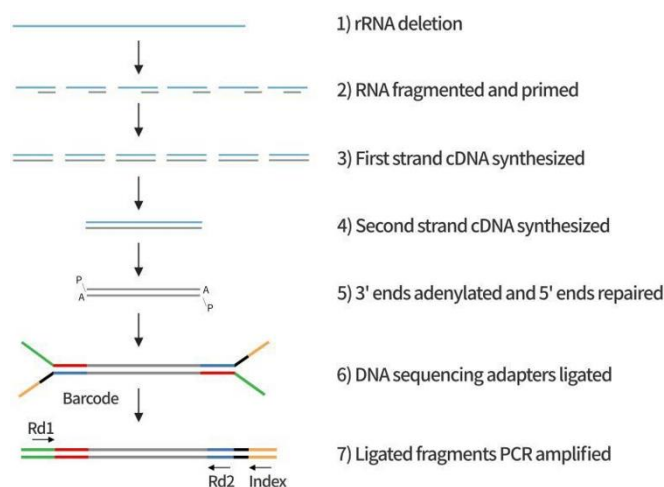


图 1 RNA 建库流程图

二、建库前的目标 RNA 制备。

根据建库需求可选择 Poly (A) mRNA Isolation 方案 (方案 A) 或 rRNA Depletion 方案 (方案 B)。本建库模块不包含该步骤所用试剂, 请根据建库需要自备相应的试剂。

方案 A: mRNA 纯化和片段化 (mRNA Purification and Fragmentation)

样本要求该方案使用 NGS mRNA Isolation Master Kit V2 进行 mRNA 富集。适用于起始模板量为 10ng-4 μ g (体积 $\leq$ 50 μ L) 的高质量动物、植物和真菌等真核生物的总 RNA。如初始 RNA 浓度偏低, 体积超过 50 μ L, 可使用 NGS RNA Cleaner 磁珠进行浓缩。RNA 需通过 Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico 芯片检测, RIN 值要求 > 7 , 以保证 mRNA 有完整的 poly (A) 尾结构。本试剂盒的 mRNA 分离模块使用的是 oligo (dT) 磁珠, 只有带 poly (A) 尾的 mRNA 才能被提取; 其他不具 poly (A) 尾的 RNA, 如非编码 RNA、无 poly (A) 尾的 mRNA 等不能适用本试剂盒。此外, FFPE 样本中的 mRNA 降解严重, 通常无完整的 poly (A) 尾结构, 故亦无法使用本试剂盒进行建库。

1. 将 mRNA Capture Beads 从 2-8°C 取出, 静置使其温度平衡至室温, 约 30 min。
2. 准备一个 Nuclease free 离心管, 取 10 ng-4 μ g 总 RNA, 用 Nuclease Free 水将体积补至 50 μ L, 冰上放置备用。
3. 颠倒或旋涡振荡混匀磁珠, 吸取 50 μ L 磁珠悬液加入至 50 μ L 总 RNA 样品中, 用移液器吹打 6 次, 使其充分混匀。
4. 将磁珠与 RNA 的混合物置于 PCR 仪中, 65°C, 5 min; 25°C, 5 min; 25°C, hold, 完成 RNA 与捕获磁珠的结合。
5. 将样品置于磁力架中, 室温静置 5 min, 使 mRNA 与总 RNA 分离, 小心移除上清。
6. 将样品从磁力架上取出, 用 200 μ L Beads Wash Buffer 重悬磁珠, 移液器反复吹打 6 次以彻底混匀。将样品置于磁力架中, 室温静置 5 min, 小心移除上清。
7. 重复步骤 6, 共洗涤两次。
8. 将样品从磁力架上取出, 加入 50 μ L Tris Buffer 重悬磁珠, 用移液器反复吹打 6 次以彻底混匀。
9. 将样品置于 PCR 仪中, 80°C, 2 min; 25°C, hold, 将 mRNA 洗脱下来。
10. 将样品从 PCR 仪中取出, 加入 50 μ L Beads Binding Buffer, 用移液器反复吹打 6 次以彻底混匀。
11. 室温放置 5 min, 使 mRNA 结合到磁珠上。
12. 将样品置于磁力架中, 室温静置 5 min, 小心移除上清。
13. 将样品从磁力架上取出, 用 200 μ L Beads Wash Buffer 重悬磁珠, 移液器反复吹打 6 次以彻底混匀, 将样品重新放回至磁力架中, 室温静置 5min, 吸掉全部上清。

注: 最后需要用 10 μ L 移液器吸干净残留液体。提前准备 1 $\times$ Frag/Prime Buffer (用 Nuclease Free H₂O 等

体积混匀配置，如配置一个反应体系：9.5 μ L 2 $\times$ Frag/Prime Buffer+9.5 μ L Nuclease Free H₂O)。

14. 将样品从磁力架上取出，用 19 μ L Frag/Prime Buffer 重悬磁珠，用移液器吹打 6 次以彻底混匀；将样品置于 PCR 仪中（预设 94°C），可参考表 3 选择片段化程序，但不同物种片段化的效果有差异，可先根据自己的情况，做个片段化时间的梯度，比如 94°C，5min。使用 Agilent2100 分析 mRNA 纯化产物大小。

表 3 mRNA 片段化程序推荐

插入片段大小 (bp)	打断程序
200-300	94°C, 10 min, 4°C hold
300-400	94°C, 7 min, 4°C hold
400-500	94°C, 5 min, 4°C hold

15. 片段化程序结束后，为防止 poly (A) 尾 RNA 与磁珠结合，请立即将样品置于磁力架中，待溶液澄清后，转移 17 μ L 上清至一个新的 Nuclease Free 离心管中，立刻进入第一链合成反应（三/四-1）。

方案 B: rRNA 去除与 RNA 片段化 (rRNA Depletion and RNA Fragmentation)

1. 样本要求：

该方案使用 NGS MaxUp rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) 去除 Total RNA 中的 rRNA。适用于人、小鼠、大鼠来源的 100 ng~1 μ g (体积 $\leq$ 11 μ L) 总 RNA 样品；适用于完整或部分降解 RNA (如 FFPERNA) 样品。

2. 探针杂交：

- a. 将探针和杂交 Buffer 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
- b. 准备 RNA 样品：根据投入量和样品浓度，计算 RNA 取样体积，用 Nuclease Free H₂O 稀释至 11 μ L。
- c. 按照表 4 于 200 μ LPCR 管中配制 rRNA 去除反应体系。

表 4 探针杂交反应体系

名称	体积 (15 μ L)
Hybridization Buffer	3
Probe Mix (H/M/R)	1
Total RNA	11 (100 ng~1 μ g)

- d. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
- e. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪（可设置梯度降温）中，按照表 5 所示反应程序，进行探针杂交反应。

表 5 探针杂交反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
95°C	2 min
95°C-22°C	0.1°C/s
22°C	5 min
4°C	hold

3. RNase H 消化:

- 将 RNase H 消化试剂从 -20 °C 取出, 解冻后颠倒混匀, 置于冰上备用。按照表 6 所示, 配制 RNase H 消化反应体系。

表 6 RNase H 消化反应体系

名称	体积 (20 μL)
RNase H Buffer	3
RNase H	2
上步产物	15

注: RNase H Buffer 及 RNase H 需单独添加, 若因样本量较多需配置 mix, 请现配现用, 否则会影响去除效果。

- 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。
- 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 设置反应程序: 热盖 50°C; 37°C, 30 min; 4°C, hold, 进行 RNase H 消化反应。

4. DNase I 消化:

- 将 DNase I 消化试剂从 -20 °C 取出, 解冻后颠倒混匀, 置于冰上备用。按照表 7 所示, 配制 DNase I 消化反应体系。

表 7 DNase I 消化反应体系

名称	体积 (50 μL)
DNase I Buffer	27.5
DNase I	2.5
上一步产物	20

- 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。

- c. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 设置反应程序: 热盖 50°C; 37°C, 30 min; 4°C, hold, 进行 DNase I 消化反应。

5. RNA 纯化:

- a. 准备工作: 将 NGS RNA Cleaner 磁珠由冰箱中取出, 室温平衡至少 30min。用 Nuclease Free H₂O 配制 80%乙醇。
- b. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- c. 吸取 110 μL NGS RNA Cleaner (2.2×, Beads: DNA=2.2:1) 至上一步产物中, 移液器充分吹打混匀, 室温孵育 5 min。
- d. 将 PCR 管置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清。
- e. 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μL Nuclease free H₂O 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30sec 后, 小心移除上清。
- f. 重复步骤 e, 总计漂洗两次。用 10 μL 移液器吸干净残留液体。
- g. 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 室温下开盖干燥磁珠 (5~10 min)。

注: 提前准备 1× Frag/Prime Buffer (用 Nuclease Free H₂O 等体积混匀配置, 如配置一个反应体系: 9.5 μL 2×Frag/Prime Buffer+9.5 μL Nuclease Free H₂O)。

- h. RNA 洗脱: 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 19 μL Frag/Prime buffer, 使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。
- i. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移取 17 μL 上清至新的 Nuclease free PCR 管中, 进行 RNA 片段化。
- j. RNA 片段化条件需根据样本质量进行调整, 高质量的 RNA 样本, 片段化条件可参考 mRNA 片段化条件 (表 3)。表 8 推荐了 FFPE 不同质量样本的片段化条件。但不同的样本片段化效果会存在一定的差异, 可根据自己的样本情况, 做不同片段化条件对比, 选择合适的片段化条件。

表 8 FFPE RNA 片段化条件推荐

DV200	片段化程序
>70%	94°C, 7 min, 4°C hold
50%~70%	94°C, 5 min, 4°C hold
20%~50%	85°C, 8 min, 4°C hold
<20% (风险建库)	65°C, 8 min, 4°C hold

注: 降解 RNA 的样本质量使用 DV200 指标判断, 详见附录 3 说明。

k. 片段化结束请立即置于冰上，进入一链合成反应（三/四-1）。

三、Illumina 平台 RNA 文库构建。

1. **第一链 cDNA 的合成 (1 st Strand Synthesis):** 将已经富集/片段化的目标 RNA 合成一链 cDNA。

a. 将第一链合成试剂从 -20°C 取出，颠倒混匀后瞬离。按表 9 所示，配制第一链 cDNA 合成的反应液。

表 9 第一链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (25 μ L)
Frag/Prime Buffer with Fragmented RNA	17
Strand Specificity Reagent	6
1st Strand Enzyme Mix	2

b. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。

c. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 10 所示设置反应程序，进行第一链 cDNA 的合成。反应结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

表 10 第一链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	Hold

2. **第二链 cDNA 的合成/末端修复/加 A (2nd Strand Synthesis/dA-Tailing):**

a. 将第二链合成试剂从 -20 °C 取出，解冻后颠倒混匀；按照表 11 所示，配制第二链 cDNA 合成/末端修复/加 A 反应液。

表 11 第二链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (60 μ L)
1st Strand cDNA	25
2nd Strand Buffer (dNTP or dUTP)	30
2nd Strand Enzyme Master Mix	5

注: 如构建普通 mRNA 文库，请使用含 dNTP 的 Buffer；如构建链特异性 mRNA 文库，请使用含 dUTP 的

Buffer。

- b. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
- c. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 12 所示设置反应程序，进行第二链 cDNA 的合成。

表 12 第二链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	on
16°C	30 min
72°C	15 min
4°C	Hold

3. 接头连接 (Adapter Ligation) : 可在末端修复和 dA 尾添加的产物末端，连接特定的 Illumina 接头。

- a. 参考表 1-1，根据 Input RNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
- b. 将表 13 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
- c. 于步骤 2 结束后的 PCR 管中继续配制表 13 所示反应体系。

表 13 Adapter Ligation 体系

名称	体积 (100 μ L)
dA-tailed DNA	60
Ligation Enhancer	30
Novel T4 DNA Ligase	5
DNA Adapter	5

注: Ligation Enhancer 使用前请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。本公司接头原始浓度为 15 μ M，请根据表 1-1 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积 DNA Adapter 固定为 5 μ L。

- d. 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- e. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 14 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 14 Adapter Ligation 反应程序

温度	时间
热盖	Off
20°C	15 min
4°C	Hold

- 4. 连接产物纯化 (Post Ligation Clean Up):** 本方案适用于片段 < 200 bp 时, 通过两次纯化去除体系中的接头残留; 当插入片段 ≥ 200 bp 时, 参照附录 2 的分选方案, 通过纯化、分选获得目标长度的文库。适用于插入片段 < 200 bp 的文库 (需进行两轮纯化)。
- 准备工作: 将 NGS DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出, 室温平衡至少 30min。配制 80%乙醇。
 - 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
 - 吸取 60 μ L NGS DNA Selection Beads (0.6 $\times$, Beads: DNA=0.6:1) 至 Adapter Ligation 产物中, 涡旋或吹打混匀, 室温孵育 5 min。
 - 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清。
 - 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec 后, 小心移除上清。
 - 重复步骤 e, 总计漂洗两次。
 - 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5 min)。
 - 将 PCR 管从磁力架中取出, 加入 52 μ L ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移取 50 μ L 上清至新 PCR 管中, 再进行一轮纯化。
 - 吸取 40 μ L NGS DNA Selection Beads (0.8 $\times$, Beads: DNA=0.8:1) 至上一步产物中, 涡旋或吹打混匀, 室温孵育 5 min。
 - 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移除上清。
 - 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30sec 后, 小心移除上清。
 - 重复步骤 k, 总计漂洗两次。
 - 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5 min)。
 - 将 PCR 管从磁力架中取出, 加入 21 μ L ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移取 20 μ L 上清至新 PCR 管中, 进行 PCR 扩增。
- 5. 文库扩增 (Library Amplification):** 将对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。
- 将表 15 中的试剂解冻后颠倒混匀, 置于冰上备用。
 - 于无菌 PCR 管中配制表 15 所示反应体系。

表 15-A 短接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 (50 μ L)
2 $\times$ Super Canace II High-Fidelity Mix	25
Universal Primer/i5 Primer*	2.5
Index Primer/i7 Primer*	2.5
Adapter Ligated DNA	20

表 15-B 长接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 (50 μ L)
2 $\times$ Super Canace II High-Fidelity Mix	25
Primer Mix**	5
Adapter Ligated DNA	20

注：*如果使用的是无 Index 的接头，俗称短接头（小 Y 接头），请使用短接头试剂中配备的 Index primer 进行扩增。**如果使用的是 Indexed Adapter，俗称长接头（大 Y 接头），可用 NGS Primer Mix for Illumina 进行扩增。

- 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 16 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 16 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	on	
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	11~15
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	-

注：文库扩增循环数需根据样本质量、投入量等建库条件进行调整，详见注意事项 2。

6. 扩增产物磁珠纯化 (Post Amplification Clean Up):

- 准备工作：将 NGS DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
- 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

- c. 吸取 45 μL NGS DNA Selection Beads (0.9 $\times$, Beads: DNA=0.9:1) 至 Adapter Ligation 产物中, 涡旋或吹打混匀, 室温孵育 5 min。
 - d. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清。
 - e. 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec 后, 小心移除上清。
 - f. 重复步骤 e, 总计漂洗两次。
 - g. 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5 min)。
 - h. 将 PCR 管从磁力架中取出, 加入 21 μL ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中, 进行文库定量、质检。
- 7. 文库质量控制:** 通常情况下, 构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价, 具体请参见注意事项 3。

四、MGI 平台 RNA 文库构建。

1. 第一链 cDNA 的合成 (1st Strand Synthesis): 将已经富集/片段化的目标 RNA 合成一链 cDNA。

- a. 将第一链合成试剂从 -20°C 取出, 颠倒混匀后瞬离。按表 17 所示, 配制第一链 cDNA 合成的反应液。

表 17 第一链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (25 μL)
Frag/Prime Buffer with Fragmented RNA	17
Strand Specificity Reagent	6
1st Strand Enzyme Mix	2

- b. 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。
- c. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照表 18 所示设置反应程序, 进行第一链 cDNA 的合成。反应结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

表 18 第一链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min

4°C	Hold
-----	------

2. cDNA 的合成/末端修复/加 A (2nd Strand Synthesis/dA-Tailing):

- 将第二链合成试剂从-20 °C 取出，解冻后颠倒混匀；按照表 19 所示，配制第二链 cDNA 合成/末端修复/加 A 反应液。

表 19 第二链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (60 µL)
1st Strand cDNA	25
2nd Strand Buffer (dNTP or dUTP)	30
2nd Strand Enzyme Master Mix	5

注：如构建普通 mRNA 文库，请使用含 dNTP 的 Buffer；如构建链特异性 mRNA 文库，请使用含 dUTP 的 Buffer。

- 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
- 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 20 所示设置反应程序，进行第二链 cDNA 的合成。

表 20 第二链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	on
16°C	30 min
72°C	15 min
4°C	Hold

3. 接头连接 (Adapter Ligation): 可在末端修复和 dA 尾添加的产物末端，连接特定的 MGI 接头。

- 参考表 1-2，根据 Input RNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
- 将表 21 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
- 于步骤 2 步结束后的 PCR 管中继续配制表 21 所示反应体系。

表 21 Adapter Ligation 体系

名称	体积 (100 µL)
dA-tailed DNA	60
Ligation Enhancer	30
Novel T4 DNA Ligase	5

DNA Adapter	5
-------------	---

注：Ligation Enhancer 使用前请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。本公司接头原始浓度为 10 μ M，请根据表 1-2 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头 DNA Adapter 添加体积固定为 5 μ L。

- d. 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- e. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 22 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 22 Adapter Ligation 反应程序

温度	时间
热盖	Off
20°C	15 min
4°C	Hold

4. 连接产物纯化 (Post Ligation Clean Up)：本方案适用于片段 < 200 bp 时，通过两次纯化去除体系中的接头残留；当插入片段 $\geq$ 200 bp 时，参照附录 3 的分选方案，通过纯化、分选获得目标长度的文库。适用于插入片段 < 200 bp 的文库（需进行两轮纯化）

- a. 准备工作：将 NGS DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min，同时配制 80%乙醇。
- b. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- c. 吸取 60 μ L NGS DNA Selection Beads (0.6 $\times$, Beads: DNA=0.6:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
- d. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
- e. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
- f. 重复步骤 e，总计漂洗两次。
- g. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。
- h. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 52 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 50 μ L 上清至新 PCR 管中，再进行一轮纯化。
- i. 吸取 40 μ L NGS DNA Selection Beads (0.8 $\times$, Beads: DNA=0.8:1) 至上一步产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
- j. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 3 min），小心移除上清。

- k. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
 - l. 重复步骤 k，总计漂洗两次。
 - m. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。
 - n. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 20 μ L 上清至新 PCR 管中，进行 PCR 扩增。
- 5. 文库扩增 (Library Amplification):** 对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。
- a. 将表 23 中的试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
 - b. 于无菌 PCR 管中配制表 23 所示反应体系。

表 23 接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μ L)
2×Super Canace II High-Fidelity Mix	25
Primer Mix for MGI	5
Adapter Ligated DNA	20

注: primer mix for MGI 不含在本试剂盒中，可用 NGS Primer Mix for MGI 进行扩增。

- c. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- d. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 24 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 24 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	on	
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	11~15
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	-

注: 文库扩增循环数需根据样本质量、投入量等建库条件进行调整，详见注意事项 2。

6. 扩增产物磁珠纯化 (Post Amplification Clean Up):

- 准备工作：将 NGS DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30min，同时配制 80%乙醇。
 - 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
 - 吸取 45 μL NGS DNA Selection Beads ($0.9\times$, Beads: DNA=0.9:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
 - 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
 - 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
 - 重复步骤 e，总计漂洗两次。
 - 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。
 - 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中，进行文库定量、质检。
- 7. 文库质量控制：**通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项 3。

五、附录

1. mRNA 片段化效果展示：

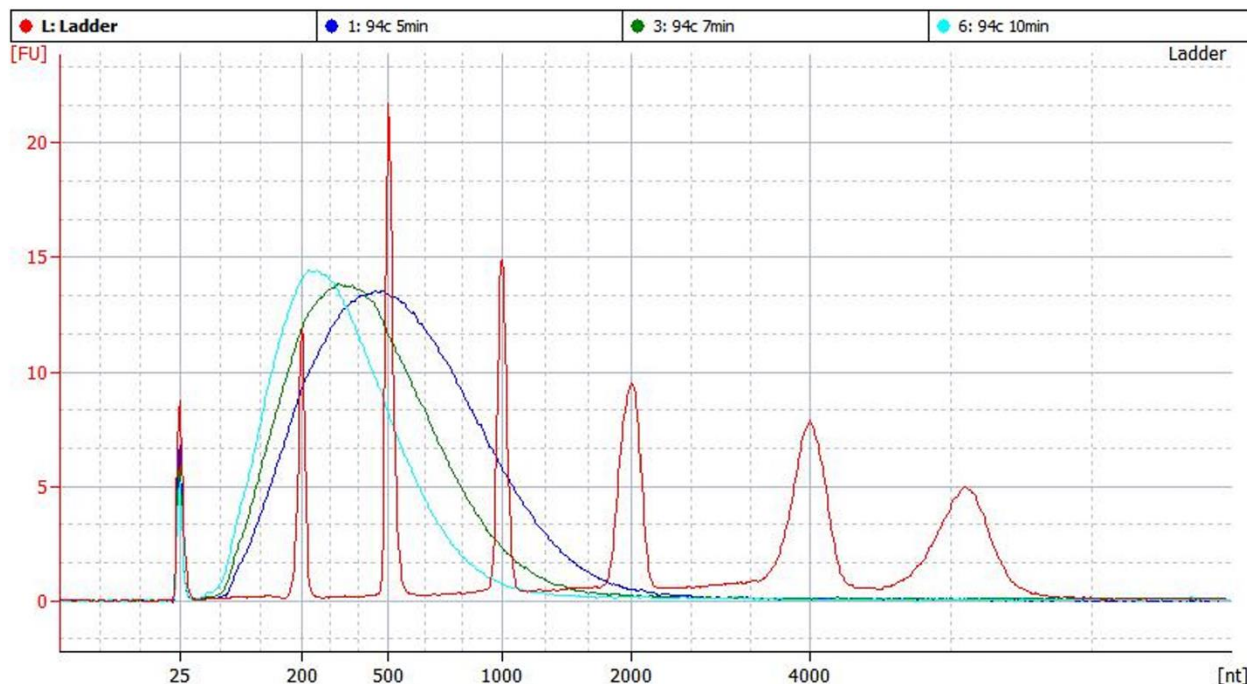


图 2 mRNA 不同打断时间对应的 RNA 片段范围。分别以 94°C，10 min、94°C，7 min 和 94°C，5 min 处理。打断后 mRNA 进行 2.2 $\times$ 磁珠纯化，通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

注：本结果使用的 RNA 是 Agilent 公司的 Universal Human Reference RNA，若使用其他来源的 RNA，最好优化打断时间。

2. Illumina 平台的分选条件：分选方案适用于 94°C, 10 min、94°C, 7 min 和 94°C, 5 min 片段化的 RNA 建库，可以获得插入片段大于 200 bp 的文库。

方案一：接头连接产物纯化后分选：0.6X NGS DNA Selection Beads 接头连接产物的纯化

- 准备工作：将 NGS DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
- 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- 吸取 60 μ L NGS DNA Selection Beads (0.6 $\times$, Beads: DNA=0.6:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
- 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移除上清。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
- 重复步骤 e，总计漂洗两次。
- 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5 min)。
- 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 102 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移取 100 μ L 上清至新 PCR 管中，准备进行双轮分选。

双轮分选 (以 94°C, 7 min 打断，分选文库大小为 410 bp~510 bp 为例说明，其他文库大小按推荐比例进行磁珠分选)

当选择短接头 (小 Y 接头) 进行连接后纯化，使用双端 384 种 Index Primers: NGS RNA 384 CDI Primer Kit for Illumina, Set 1~Set 2 进行 RNA 建库时，分选比例参照表 25 进行，当选择长接头 (大 Y 接头)，使用 Indexed Adapters: NGS Complete Adapter Kit for Illumina, Set 1~Set 4 进行连接后纯化，分选比例参照表 26 进行。

- 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
- 根据 DNA 片段长度要求，参考表 25，在上述 100 μ L DNA 中加入第一轮分选磁珠 65 μ L (0.65 $\times$)，涡旋或移液器吹打 10 次混匀。
- 室温孵育 5 min。
- 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心转移上清到干净的离心管中，残留 1-2 μ L 溶液管底。
- 参考表 25 向上清中加入第二轮分选磁珠 15 μ L (0.15 $\times$)。

- f. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
- g. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 3 min），小心移除上清。
- h. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- i. 重复步骤 h。
- j. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 3 min）。
- k. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
- l. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 3 min），小心转移 20 μL 上清至干净管中。

表 25 短接头文库分选推荐磁珠比例

插入片段长度 (bp)	200~300	250~350	350~450	450~550
文库长度 (bp)	260~360	310~410	410~510	510~610
打断条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
第一轮磁珠体积 (μL)	80 (0.8 $\times$)	75 (0.75 $\times$)	65 (0.65 $\times$)	60 (0.6 $\times$)
第二轮磁珠体积 (μL)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	10 (0.1 $\times$)

表 26 长接头文库分选推荐磁珠比例

插入片段长度 (bp)	200~300	250~350	350~450	450~550
文库长度 (bp)	320~420	370~470	470~570	570~670
打断条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
第一轮磁珠体积 (μL)	75 (0.75 $\times$)	70 (0.7 $\times$)	65 (0.65 $\times$)	60 (0.6 $\times$)
第二轮磁珠体积 (μL)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	10 (0.1 $\times$)

注：表 25、26 推荐的双轮分选比例适用于 NGS DNA Selection Beads；表中“ $\times$ ”表示样品 DNA 体积。如所需文库插入片段主峰为 300 bp 时，若在短接头连接之后分选，样品 DNA 体积为 100 μL ，则第一轮分选磁珠使用体积为 $0.65 \times 100 \mu\text{L} = 65 \mu\text{L}$ ，第二轮分选磁珠使用体积为 $0.15 \times 100 \mu\text{L} = 15 \mu\text{L}$ ；若在长接头连接之后分选，样品 DNA 体积为 100 μL ，则第一轮分选磁珠使用体积为 $0.65 \times 100 \mu\text{L} = 65 \mu\text{L}$ ，第二轮分选磁珠使用体积为 $0.15 \times 100 \mu\text{L} = 15 \mu\text{L}$ 。

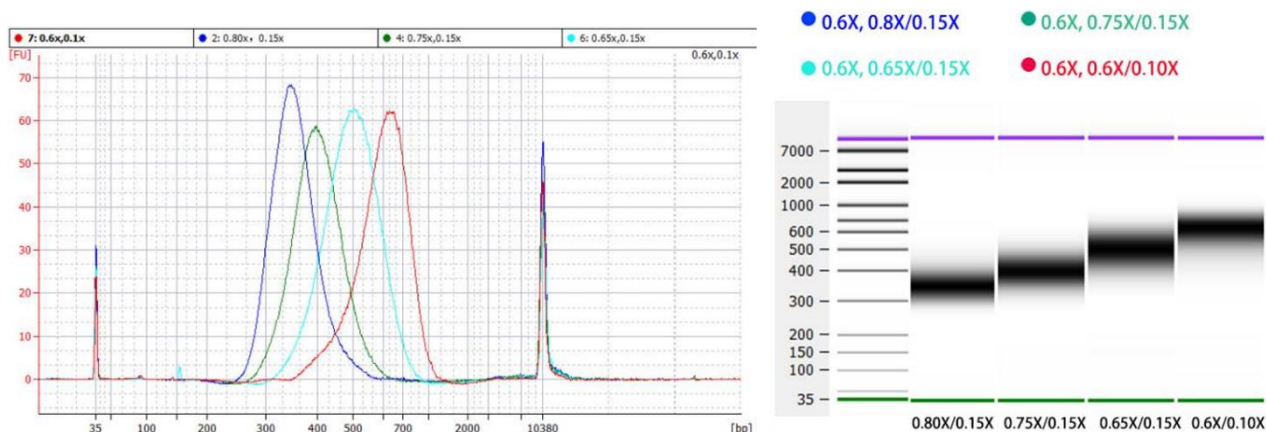


图 3 1 μ g 293 total RNA, 在 94°C, 10 min、94°C, 7 min 和 94°C, 5 min 片段化后, 根据表 25 推荐的磁珠比例得到的文库大小。

方案二：接头连接产物直接分选 (以 94°C, 7 min 打断, 分选文库大小为 410 bp~510 bp 为例说明, 其他文库大小按推荐比例进行磁珠分选) 500 ng 以上的总 RNA 做 mRNA 抓取后建库, 推荐直接分选, 体系比较粘稠, 需要小心添加, RNA 质量略差样本可能会有接头残留。

当选择短接头 (小 Y 接头) 进行连接后纯化, 使用双端 384 种 Index Primers: NGS RNA 384 CDI Primer Kit for Illumina, Set 1~Set 2 进行 RNA 建库时, 分选比例参照表 27 进行, 当选择长接头 (大 Y 接头), 使用 Indexed Adapters: NGS Complete Adapter Kit for Illumina, Set 1~Set 4 进行连接后纯化, 分选比例参照表 28 进行。

- 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
- 根据 DNA 片段长度要求, 参考表 27, 在上述 100 μ L 的连接体系中加入第一轮分选磁珠 20 μ L (0.20 $\times$), 涡旋或移液器吹打 10 次混匀。室温孵育 10 min。
- 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心转移 100 μ L 上清到干净的离心管中。
- 参考表 27 向上清中加入第二轮分选磁珠 10 μ L (0.10 $\times$)。
- 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀, 室温静置 10 min。
- 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移除上清。
- 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
- 重复步骤 g。
- 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (约 3 min)。
- 将 PCR 管从磁力架中取出, 加入 21 μ L ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置 5

min。

- k. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 3min），小心转移 20 μ L 上清至干净管中。

表 27 短接头文库分选推荐磁珠比例

插入片段长度 (bp)	200~300	250~350	350~450	450~550
文库长度 (bp)	260~360	310~410	410~510	510~610
打断条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
第一轮磁珠体积 (μ L)	25 (0.25 $\times$)	25 (0.25 $\times$)	20 (0.2 $\times$)	18 (0.18 $\times$)
第二轮磁珠体积 (μ L)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)

表 28 长接头文库分选推荐磁珠比例

插入片段长度 (bp)	200~300	250~350	350~450	450~550
文库长度 (bp)	320~420	370~470	470~570	570~670
打断条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
第一轮磁珠体积 (μ L)	25 (0.25 $\times$)	20(0.2 $\times$)	18 (0.18 $\times$)	18 (0.18 $\times$)
第二轮磁珠体积 (μ L)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)

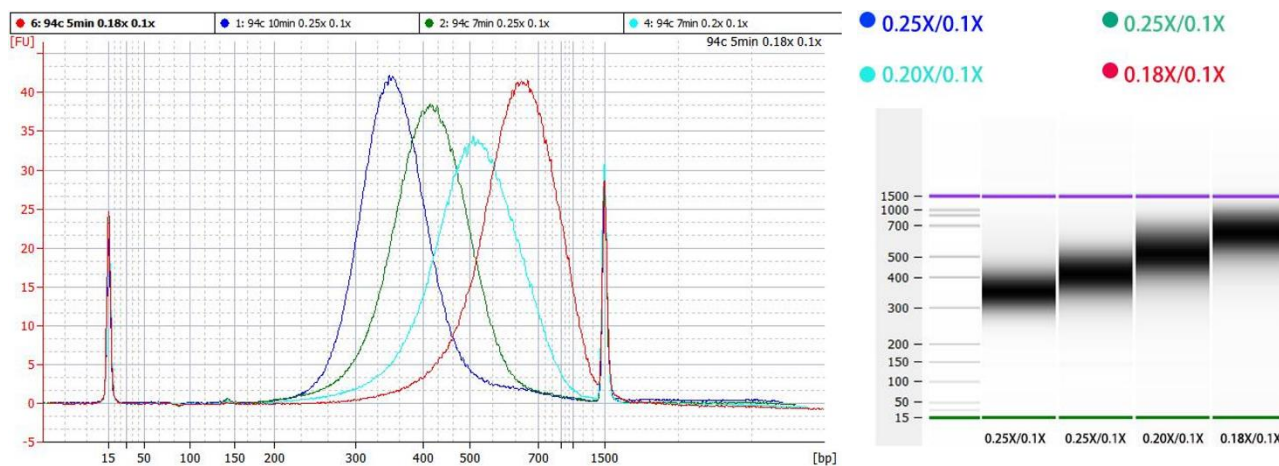


图 4-1 μ g 293 total RNA，在 94°C，10 min、94°C，7 min 和 94°C，5 min 片段化后，根据表 27 推荐的磁珠比例得到的文库大小。

3. **MGI 平台分选条件说明：**分选方案适用于 94°C，10 min、94°C，7 min 和 94°C，5 min 片段化的 RNA 建库，可以获得插入片段大于 200 bp 的文库。

方案一：接头连接产物纯化后分选：0.6 $\times$ NGS DNA Selection Beads 接头连接产物的纯化

- a. 准备工作：将 NGS DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

- b. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
- c. 吸取 60 μL NGS DNA Selection Beads (0.6 $\times$, Beads: DNA=0.6:1) 至 Adapter Ligation 产物中, 涡旋或吹打混匀, 室温孵育 5 min。
- d. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移除上清。
- e. 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec 后, 小心移除上清。
- f. 重复步骤 e, 总计漂洗两次。
- g. 保持 PCR 管始终置于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂 (不超过 5 min)。
- h. 将 PCR 管从磁力架中取出, 加入 102 μL ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀, 室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心移取 100 μL 上清至新 PCR 管中, 准备进行双轮分选。

注: Ligation Enhancer 中含有的高浓度 PEG 会对磁珠双轮分选产生影响, 所以必须经过一轮纯化后再进行双轮分选。

双轮分选 (以 94 $^{\circ}\text{C}$, 7 min 打断, 分选文库大小为 380 bp~480 bp 为例说明, 其他文库大小按推荐比例进行磁珠分选)。

- a. 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
- b. 根据 DNA 片段长度要求, 参考表 29, 在上述 100 μL DNA 中加入第一轮分选磁珠 65 μL (0.65 $\times$), 涡旋或移液器吹打 10 次混匀。

注: 此表推荐的双轮分选比例适用于 NGS DNA Selection Beads; 表中 “ $\times$ ” 表示样品 DNA 体积。如所需文库插入片段主峰为 300 bp 时, 若在短接头连接之后分选, 样品 DNA 体积为 100 μL , 则第一轮分选磁珠使用体积为 $0.65 \times 100 \mu\text{L} = 65 \mu\text{L}$, 第二轮分选磁珠使用体积为 $0.15 \times 100 \mu\text{L} = 15 \mu\text{L}$ 。

- a. 室温孵育 5min。
- b. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 5 min), 小心转移上清到干净的离心管中, 残留 1-2 μL 溶液管底。
- c. 参考表 29 向上清中加入第二轮分选磁珠 15 μL (0.15 $\times$)。
- d. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀, 室温静置 5 min。
- e. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中, 待溶液澄清后 (约 3 min), 小心移除上清。
- f. 保持 PCR 管始终处于磁力架中, 加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
- g. 重复步骤 f。

- h. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 3 min）。
- i. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
- j. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 3min），小心转移 20 μL 上清至干净管中。

表 29 长接头文库分选推荐磁珠比例

插入片段长度 (bp)	200~300	300~400	400~500	500~600
文库长度 (bp)	280~380	380~480	480~580	580~680
打断条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
第一轮磁珠体积 (μL)	70 (0.7 $\times$)	65 (0.65 $\times$)	58 (0.58 $\times$)	50 (0.5 $\times$)
第二轮磁珠体积 (μL)	20 (0.2 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)

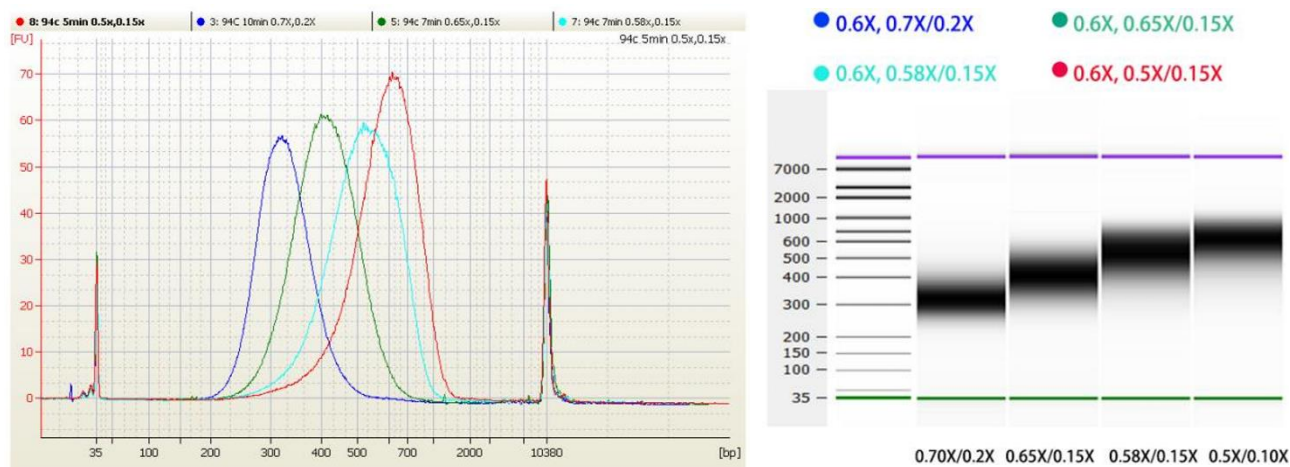


图 5 1 μg 293 total RNA，在 94°C，10 min、94°C，7 min 和 94°C，5 min 片段化后，根据表 29 推荐的磁珠比例得到的文库大小。

方案二：接头连接产物直接分选（以 94°C，7 min 打断，分选文库大小为 410 bp~510 bp 为例说明，其他文库大小按推荐比例进行磁珠分选）。

500 ng 以上的总 RNA 做 mRNA 抓取后建库，推荐直接分选，体系比较粘稠，需要小心添加，RNA 质量略差样本可能会有接头残留。

- a. 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
- b. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 30 的连接体系中加入第一轮分选磁珠 20 μL (0.20 $\times$)，涡旋或移液器吹打 10 次混匀。室温孵育 10 min。

注：此表推荐的双轮分选比例适用于 NGS DNA Selection Beads；表中“ $\times$ ”表示样品 DNA 体积。如所需文

库插入片段主峰为 300 bp 时，若在短接头连接之后分选，样品 DNA 体积为 100 μL ，则第一轮分选磁珠使用体积为 $0.20 \times 100 \mu\text{L} = 20 \mu\text{L}$ ，第二轮分选磁珠使用体积为 $0.1 \times 100 \mu\text{L} = 10 \mu\text{L}$ 。

- c. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 5 min），小心转移 100 μL 上清到干净的离心管中。
- d. 参考表 26 向上清中加入第二轮分选磁珠 10 μL (0.10 $\times$)。
- e. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 10 min。
- f. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后（约 3 min），小心移除上清。
- g. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- h. 重复步骤 g。
- i. 保持 PCR 管始终处于磁力架中，开盖干燥磁珠至刚刚出现龟裂（约 3 min）。
- j. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5min。
- k. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清后（约 3 min），小心转移 20 μL 上清至干净管中。

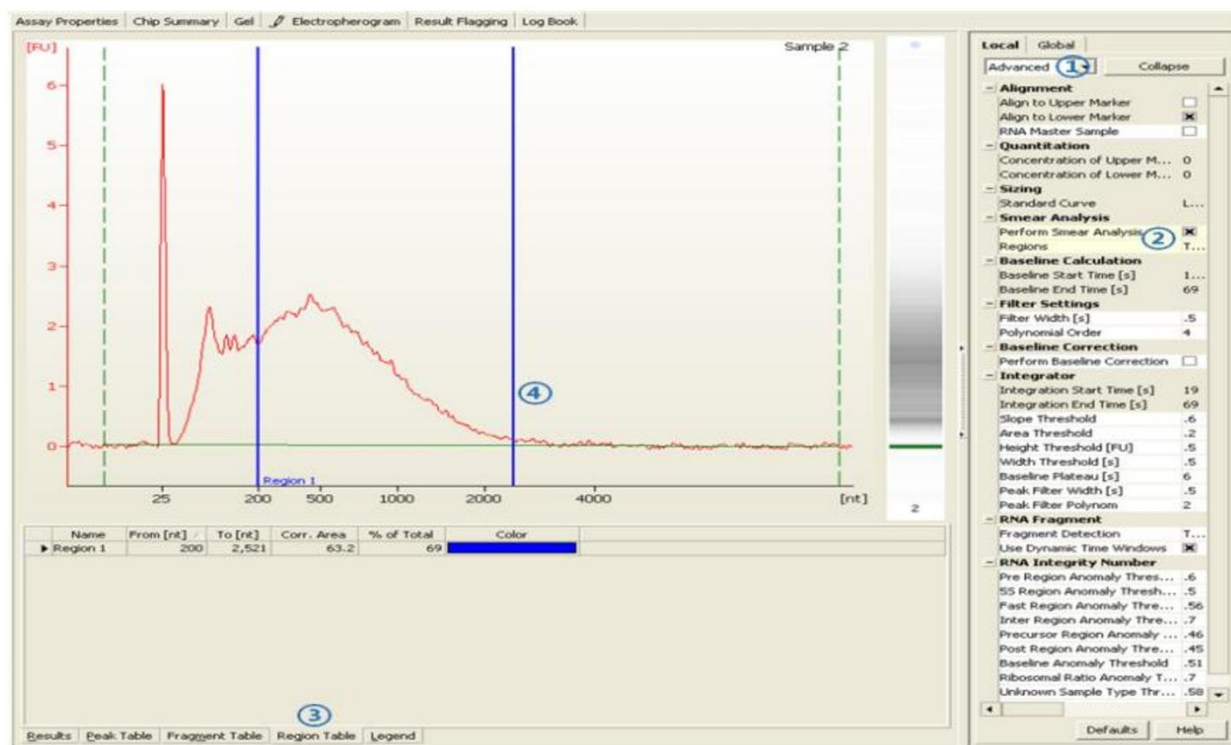
表 30 长接头文库分选推荐磁珠比例

插入片段长度 (bp)	200~300	300~400	400~500	500~600
文库长度 (bp)	280~380	380~480	480~580	580~680
打断条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
第一轮磁珠体积 (μL)	25 (0.25 $\times$)	20 (0.2 $\times$)	15 (0.15 $\times$)	15 (0.15 $\times$)
第二轮磁珠体积 (μL)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)	10 (0.1 $\times$)

4. FFPE 样本建库说明

- a. **FFPERNA 质量评价：**rRNA 去除建库方案可用于 FFPE 等低质量的 Total RNA 样本，但由于不同 FFPE 样本的质量差距较大，需要根据样本情况调整建库条件。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，此时还需要用到 DV200 指标。DV200 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，DV200 值能够更好的反应样本的质量。

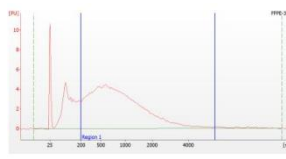
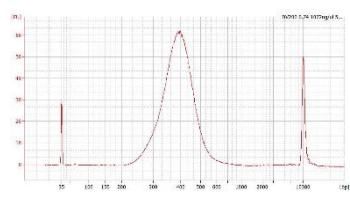
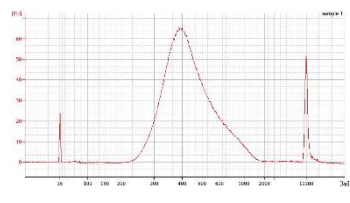
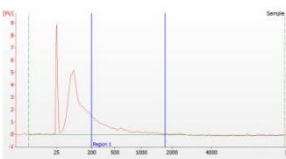
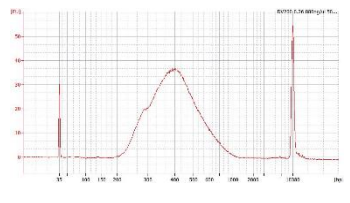
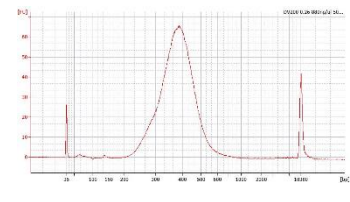
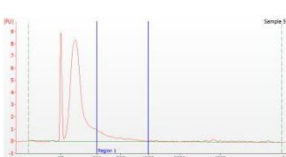
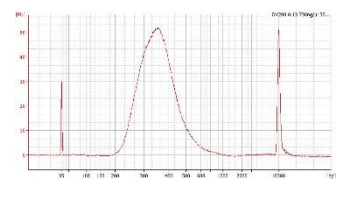
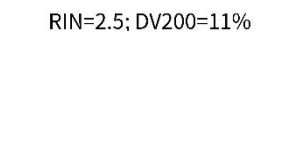
DV200 计算方法如下：



- 1) 在一个检测完成的 Agilent 2100 Bioanalyzer 结果图中，在 Local 下选择 Advanced。
- 2) 勾选 Smear Analysis 下的 Perform Smear Analysis 选项。
- 3) 选择 Region Table 页面，鼠标右击，选择 Add Region。
- 4) 调整指示线的范围即可得到所选片段范围所占的比例 % of Total。

b. FFPERNA 建库示例：下表展示了不同质量 FFPE 样本在不同建库条件下的文库分布，以供参考。对于降解严重的 FFPERNA (DV200<50%) 和起始量低的文库构建，我们推荐接头连接后采用两次纯化方案，以减少文库损失。

RNA 样本质控	建库条件	文库分布质控
	投入量：500 ng 片段化条件：94℃, 7 min 接头连接后进行两次纯化：0.6×；0.8× 链特异建库扩增：12 cycles 文库产量：717.2 ng	

 RIN=2.2; DV200=74%	投入量: 500 ng 片段化条件: 94°C, 7 min 接头连接后进行纯化/分选: 0.6×; 0.7×/0.15× 链特异建库扩增: 13 cycles 文库产量: 437.8 ng	
	投入量: 100 ng 片段化条件: 94°C, 7 min 接头连接后进行两次纯化: 0.6×; 0.8× 链特异建库扩增: 15 cycles 文库产量: 206.8 ng	
 RIN=2.5; DV200=26%	投入量: 500 ng 片段化条件: 85°C, 8 min 接头连接后进行两次纯化: 0.6×; 0.8× 链特异建库扩增: 12 cycles 文库产量: 207 ng	
 RIN=2.5; DV200=26%	投入量: 500 ng 片段化条件: 85°C, 8 min 接头连接后进行纯化、分选: 0.6×; 0.70×/0.15× 链特异建库扩增: 13 cycles 文库产量: 98.56 ng	
 RIN=2.5; DV200=11%	投入量: 500 ng 片段化条件: 65°C, 8 min 接头连接后进行两次纯化: 0.6×; 0.8× 链特异建库扩增: 12 cycles 文库产量: 354.2 ng	
 RIN=2.5; DV200=11%	投入量: 500 ng 片段化条件: 65°C, 8 min 接头连接后进行两次纯化: 0.6×; 0.70×/0.15× 链特异建库扩增: 13 cycles 文库产量: 172.48 ng	