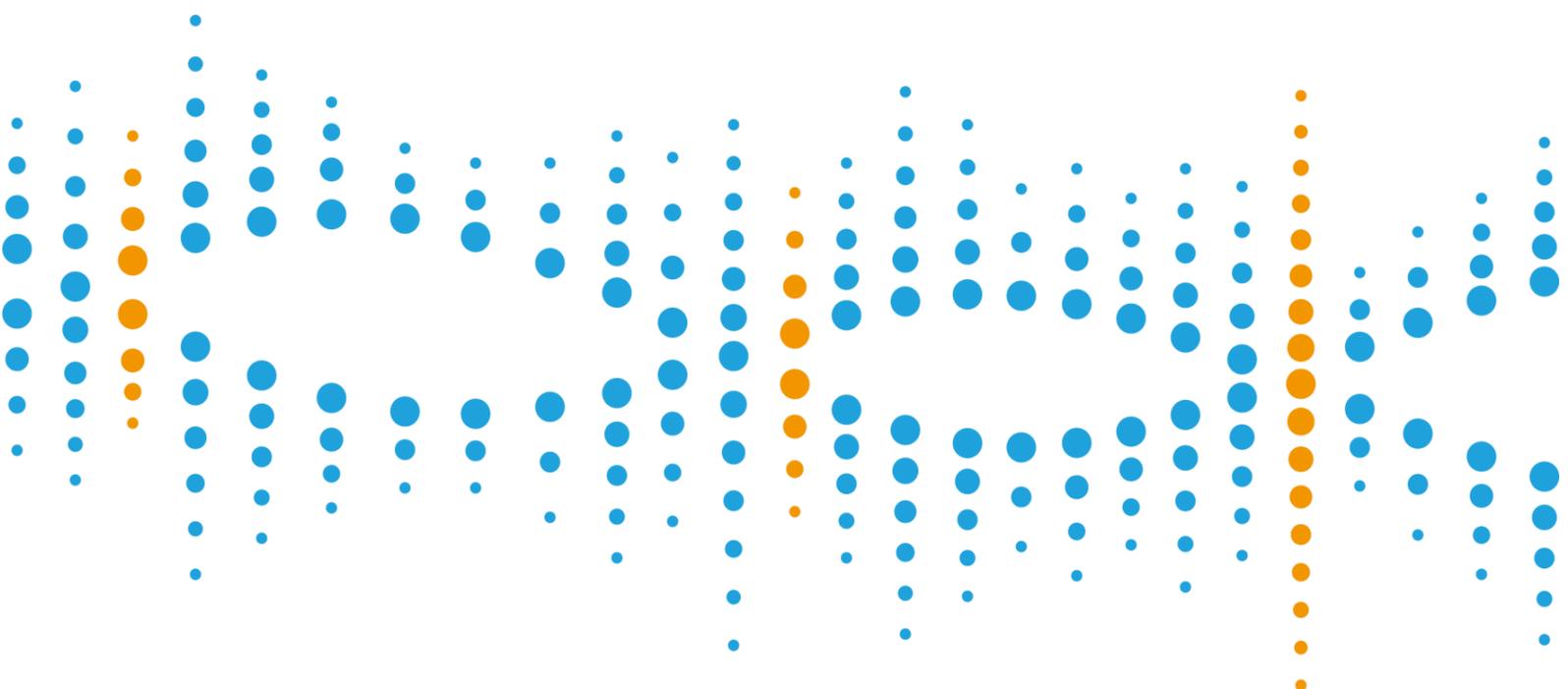


Hieff NGS<sup>®</sup> MaxUp<sup>™</sup> II Dual-mode  
mRNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup>

MaxUp<sup>™</sup> II 双模式 mRNA 建库试剂盒



Yeasen Biotech Co., Ltd.



使用说明书



# 目 录

产品信息 .....	1
产品描述 .....	1
产品组分 .....	1
运输与保存方法 .....	1
注意事项 .....	1
使用方法 .....	3
附录一： mRNA 片段化 .....	8

## 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® MaxUp™ II Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina®	12300ES08	8 T
MaxUp™ II 双模式 mRNA 建库试剂盒	12300ES24	24 T
	12300ES96	96 T

## 产品描述

Hieff NGS® MaxUp™ II Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina®是针对 Illumina®高通量测序平台专门研发的用于 mRNA 转录组文库构建试剂盒，本试剂盒将 cDNA 二链合成与 Endprep、dA-tailing 进行合并，极大地缩减建库时间。二链合成模块配有两种 buffer，客户可根据需要进行常规建库或链特异性建库。本产品适用于起始模板为 0.1-4 µg 不同来源真核生物总 RNA 样本。经过 mRNA 分离、片段化、双链 cDNA 合成、末端修复、加 A 尾、接头连接和文库扩增，总 RNA 样品最终转化为适用于 Illumina®平台测序的文库。

试剂盒包含两个独立模块，BOX-I 的核心为纯化 mRNA 所需的 oligo(dT)磁珠。BOX-II 包含 mRNA 片段化试剂，反转录试剂，常规和链特异性 dsDNA 合成，以及后续建库所需的所有试剂。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。

## 产品组分

组分编号和名称	12300ES08	12300ES24	12300ES96	
BOX-I	12603-A ○ mRNA Capture Beads	0.4 mL	1.2 mL	4.8 mL
	12603-B ○ Beads Binding Buffer	0.4 mL	1.2 mL	4.8 mL
	12603-C ⊙ Beads Wash Buffer	5 mL	15 mL	60 mL
	12603-D ○ Tris Buffer	0.4 mL	1.2 mL	4.8 mL
BOX-II	12251-A ● Frag/Prime Buffer	150 µL	450 µL	2×900 µL
	12251-B ● 1st Strand Enzyme Mix	16 µL	48 µL	192 µL
	12251-C ● Strand Specificity Reagent	50 µL	150 µL	580 µL
	12251-D ● 2nd Strand Buffer (dNTP)	240 µL	720 µL	2×1440 µL
	12251-E ● 2nd Strand Buffer (dUTP)	240 µL	720 µL	2×1440 µL
	12251-F ● 2nd Strand Enzyme Master Mix	40 µL	120 µL	480 µL
	12251-G ● Ligation Enhancer	240 µL	720 µL	2×1440 µL
	12251-H ● Quick T4 DNA Ligase	40 µL	120 µL	480 µL
	12251-I ○ 2×Super Canace® II High-Fidelity Mix	200 µL	600 µL	2×1200 µL
	12251-J ○ Primer Mix	40 µL	120 µL	480 µL

## 运输与保存方法

冰袋运输。效期一年。存储温度如下，切不可搞错！

Box I: 2-8°C保存; Box II: -20°C保存。

## 注意事项

### 一、关于操作

- 1.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 2.请于使用前将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
- 3.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。
- 4.请使用无RNase污染的耗材，并对实验区域定期进行清理，推荐使用ThermoFisher公司的RNAZap™高效核酸去除喷雾去除RNA酶污染。
- 5.PCR产物因操作不当极易产生气溶胶污染，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（推荐使用ThermoFisher公司的DNAZap™高效核酸去除喷雾），以保证实验环境的洁净度。

## 二、应用范围

本试剂盒适用于起始模板量为 0.1-4 µg（体积≤50 µL）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 µL，可使用 Hieff 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。

本试剂盒所制备文库可进行多种 RNA-Seq 应用，包括：

基因表达（gene expression）

单核苷酸变异检测（single nucleotide variation discovery）

基因融合鉴定（gene fusion identification）

剪切变异体分析（splice variant analysis）

## 三、关于接头连接（Adapter Ligation）

1.本公司可提供长接头（barcoded Adapter）试剂盒和短接头（也称为小 Y 接头、不完整接头）试剂盒，客户可根据实验需求进行选择。

目前有 48 种 Indexed Adapters: Hieff NGS® Complete Adapter Kit for Illumina®, Set 1~Set 4（Cat#12615~Cat#12618）；单端 96 种 Index Primers: Hieff NGS® 96 Single Index Primers Kit for Illumina®, Set 1~Set 2（Cat#12611~Cat#12612）；双端 384 种 Index Primers: Hieff NGS® 384 Dual Index Primers Kit for Illumina®, Set 1~Set 2（Cat#12613~Cat#12614）。

2.我们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。此外，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。

3.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。

4.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 小时。

表 1 Input Total RNA 量与接头浓度推荐表

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

## 四、关于磁珠纯化与分选（Bead-based Clean Up and Size Selection）

1.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 Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601)或 AMPure® XP 磁珠(Beckman Cat#A63880)进行 DNA 纯化和分选。

2.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。

3.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。

- 4.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。
- 5.磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
- 6.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。
- 7.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°C 可保存 2 天，-20°C 可保存 1 个月。

## 五、关于文库扩增 (Library Amplification)

- 1.本试剂盒中的文库扩增组分由本公司第二代高保真 DNA 聚合酶所组成，在第一代的基础上，大大增强了扩增的均一性，即使是低拷贝的基因，也能进行无偏好性地扩增。
- 2.如果您使用 Indexed Adapter (也称为长接头、大 Y 接头)，可使用本试剂盒提供的引物 Primer mix 进行扩增；如果使用的是“短接头”或者叫“小 Y 接头”，则需要使用 index primers 进行扩增，加上相应的 barcodes。
- 3.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 Input Total RNA 量与扩增循环数推荐表\*

Input Total RNA	Number of cycles	
	Non-stranded	Stranded
100 ng	12-14	14-16
1000 ng	10-12	12-14
≥2000 ng	8-10	10-12

【注】：\*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。

## 六、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

- 1.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。
- 2.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。
- 3.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），可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。
- 4.文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 5.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。

## 使用方法

### 一、自备材料

- 1.纯化磁珠：Hieff NGS® DNA Selection Beads (Cat#12601) 或 AMPure XP Beads (Cat#A63880) 或其他等效产品。
- 2.RNA 质检：Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico Chip 或其他等效产品。
- 3.Adapters: barcoded adapter (长接头) 或者无 barcode 的短接头试剂盒。
- 4.文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品；文库定量试剂。
- 5.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。

### 二、操作流程

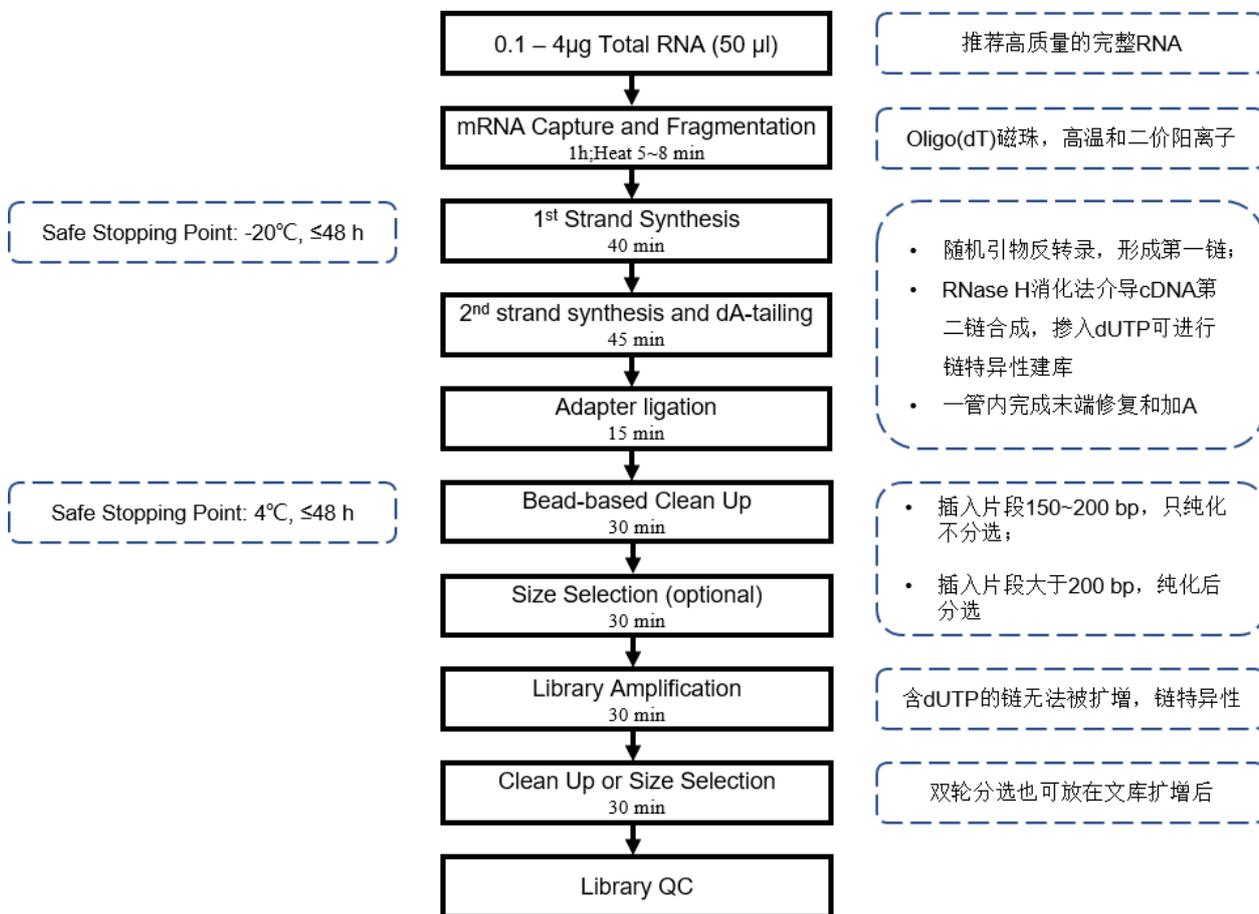


图 1 mRNA 建库试剂盒操作流程

### 三、操作步骤

#### 3.1 mRNA 纯化和片段化 (mRNA Purification and Fragmentation)

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 0.1-4 µg 总 RNA，用 Nuclease free 水将体积补至 50 µL，冰上放置备用。
3. 颠倒或旋涡振荡混匀磁珠，吸取 50 µL 磁珠悬液加入至 50 µL 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；4°C，hold，使得 RNA 变性。
5. 室温孵育 5 min，使 mRNA 与磁珠完全结合。
6. 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。
7. 将样品从磁力架上取出，用 200 µL 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。
8. 重复步骤 7，共洗涤两次。
9. 将样品从磁力架上取出，加入 50 µL Tris Buffer 重悬磁珠，用移液器反复吹打 6 次以彻底混匀。
10. 将样品置于 PCR 仪中，80°C，2 min；25°C，hold，将 mRNA 洗脱下来。
11. 将样品从 PCR 仪中取出，加入 50 µL Beads Binding Buffer，用移液器反复吹打 6 次以彻底混匀。
12. 室温放置 5 min，使 mRNA 结合到磁珠上。
13. 将样品置于磁力架中，室温静置 5 min，小心移除上清。
14. 将样品从磁力架上取出，用 200 µL 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 5 min，吸掉全部上清。

【注】：最后需要用 10 µL 移液器吸干净残留液体。

15. 将样品从磁力架上取出，用 18.5 µL 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 或 85°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，客户可先根据自己的情况，做个片段化时间的梯度，比如 94°C，5 min 或 85°C，6 min。使用 Agilent 2100 分析双链 cDNA 纯化产物大小。

表 3 mRNA 片段化程序选择

插入片段大小 (bp)	打断程序
150-200	94°C, 6 min;
200-300	94°C, 5 min;
250-450	85°C, 8 min;
400-550	85°C, 6 min;

16. 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  $\mu\text{L}$  上清至一个新的 nuclease free 离心管中, 立刻进入第一链合成反应。

### 3.2 第一链 cDNA 的合成:

1. 将第一链合成试剂从 -20°C 取出, 颠倒混匀后瞬离。按表 4 所示, 配制第一链 cDNA 合成的反应液。

表 4 第一链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 ( $\mu\text{L}$ )
Fragmented mRNA	17
Strand Specificity Reagent	6
1st Strand Enzyme Mix	2

2. 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照表 5 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 5 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

### 3.3 第二链 cDNA 的合成/末端修复/加 A:

1. 将第二链合成试剂从 -20 °C 取出, 解冻后颠倒混匀; 按照表 6 所示, 配制第二链 cDNA 合成/末端修复/加 A 反应液。

表 6 第二链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 ( $\mu\text{L}$ )
1st Strand cDNA	25 $\mu\text{L}$
2nd Strand Buffer ( dNTP or dUTP)*	30 $\mu\text{L}$
2nd Strand Enzyme Master Mix	5 $\mu\text{L}$

【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。

2. 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照表 7 所示设置反应程序, 进行第二链 cDNA 的合成。

表 7 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

### 3.4 接头连接 (Adapter Ligation)

该步骤可在末端修复和 dA 尾添加的产物末端，连接特定的 Illumina® 接头。

1. 参考注意事项三中的表 1，根据 Input RNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 8 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 于 3.3 步骤结束后的 PCR 管中继续配制表 8 所示反应体系。

表 8 Adapter Ligation 体系

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA	60
Ligation Enhancer	30*
Quick 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 μM，请根据注意事项三表 1 的提示，用 0.1×TE buffer 对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL。

4. 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。
5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 9 所示反应程序，进行接头连接反应：

表 9 Adapter Ligation 反应程序

温度	时间
热盖	Off
20°C	15 min
4°C	Hold

【注】：当 Input DNA 量较低时，可尝试将连接时间延长一倍，这将提高连接效率。

### 3.5 连接产物纯化和片段大小分选 (Post Ligation Clean Up and Size Selection)

目前有两个方案应用于该步骤，当插入片段 < 200 bp 时，使用方案 A；当插入片段 ≥ 200 bp 时，使用方案 B。

#### 方案 A：适用于插入片段 150-200 bp 的文库（如 mRNA 打断方案为 94°C，6 min）

1. 准备工作：将 Hieff 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。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 60 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.6×, Beads:DNA=0.6:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
4. 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。
5. 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。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。
7. 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）。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH<sub>2</sub>O，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 20 μL 上清至新 PCR 管中，进行 PCR 扩增。

#### 方案 B：适用于插入片段大于 200 bp 的文库（如 mRNA 打断方案为 94°C，5 min 或 85°C，8 min）

##### 方案 B-1：接头连接产物的纯化

1. 准备工作：将 Hieff 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。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 60 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.6×, Beads:DNA=0.6:1) 至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
4. 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。
5. 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。
6. 重复步骤 5，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  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，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  $\mu\text{L}$  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。

### 方案 B-2: 双轮分选

- 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 10，在上述 100  $\mu\text{L}$  DNA 中加入第一轮分选磁珠，涡旋或移液器吹打 10 次混匀。

表 10 文库分选推荐磁珠比例

DNA 文库插入片段大小（峰值，bp）		~ 200	~ 300	~ 400	~500
打断条件		94°C, 5 min	85°C, 8 min	85°C, 8 min	85°C, 6 min
短接头连接之后分选	第一轮体积比	0.80×	0.65×	0.60×	0.54×
	第二轮体积比	0.20×	0.15×	0.15×	0.10×
长接头连接之后分选或文库扩增之后分选	第一轮体积比	0.74×	0.62×	0.56×	0.52×
	第二轮体积比	0.15×	0.15×	0.15×	0.10×

【注】：此表推荐的双轮分选比例适用于 AMPure<sup>®</sup> XP 磁珠和 Hieff NGS<sup>®</sup> DNA Selection Beads；表中“×”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  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$ ，则第一轮分选磁珠使用体积为  $0.62 \times 100 \mu\text{L} = 62 \mu\text{L}$ ，第二轮分选磁珠使用体积为  $0.15 \times 100 \mu\text{L} = 15 \mu\text{L}$ 。

- 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  $\mu\text{L}$  溶液于管底。
- 参考表 10 向上清中加入第二轮分选磁珠。
- 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 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），小心移除上清。
- 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200  $\mu\text{L}$  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 8。
- 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 5 min）。
- 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 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），小心转移 20  $\mu\text{L}$  上清至干净管中。

### 3.6 文库扩增（Library Amplification）

该步骤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 11 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 11 所示反应体系。

表 11-A 短接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 ( $\mu\text{L}$ )
2×Super Canace <sup>®</sup> II High-Fidelity Mix	25
Universal Primer/ i5 Primer*	2.5
Index Primer/ i7 Primer*	2.5
Adapter Ligated DNA	20

表 11-B 长接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 ( $\mu\text{L}$ )
2×Super Canace <sup>®</sup> II High-Fidelity Mix	25
Primer mix**	5
Adapter Ligated DNA	20

【注】：\*如果使用的是无 barcode 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（Cat#12611, Hieff NGS<sup>®</sup> 96 Single Index Primers Kit for Illumina<sup>®</sup>, Set 1; Cat#12612, Hieff NGS<sup>®</sup> 96 Single Index Primers Kit for Illumina<sup>®</sup>, Set 2. Cat#12613, Hieff NGS<sup>®</sup> 384 Dual Index Primers Kit for Illumina<sup>®</sup>, Set 1; Cat#12614, Hieff NGS<sup>®</sup> 384 Dual Index Primers Kit for Illumina<sup>®</sup>, Set 2.）

\*\*如果您使用的是 barcoded adapter，俗称长接头（大 Y 接头），即 adapter 上带有 barcode 的完整接头，可用试剂盒中的 Primer Mix 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 12 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 12 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	
60°C	30 sec	参照表 2（注意事项五）
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	-

### 3.7 扩增产物磁珠纯化或分选（Post Amplification Clean Up/Size Selection）

同 3.5 步骤中纯化操作步骤。使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads（0.9×，Beads:DNA=0.9:1）纯化文库扩增产物。

### 3.8 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六。

## 附录一：mRNA 片段化

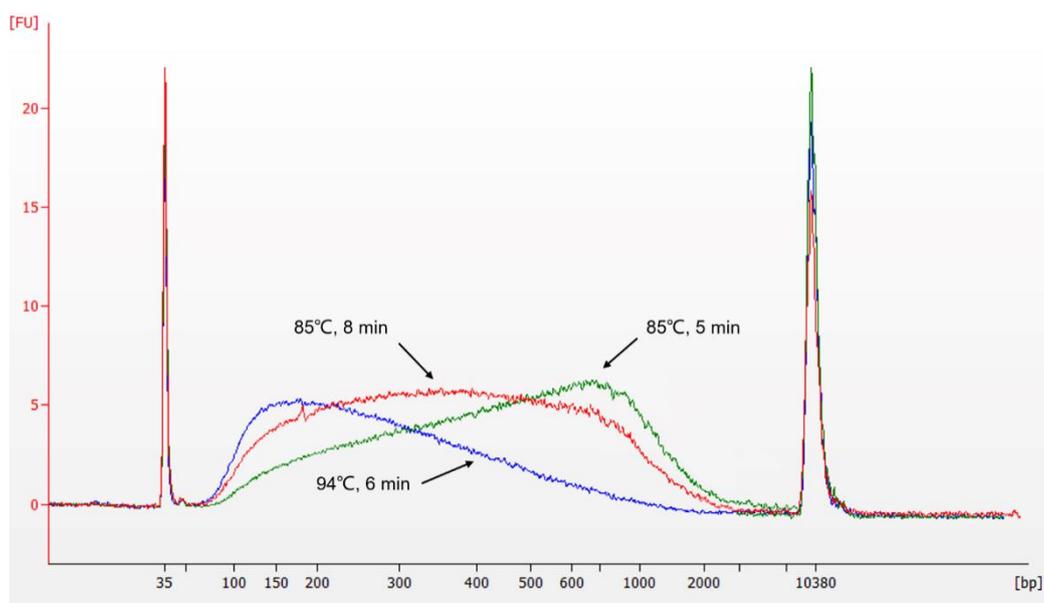
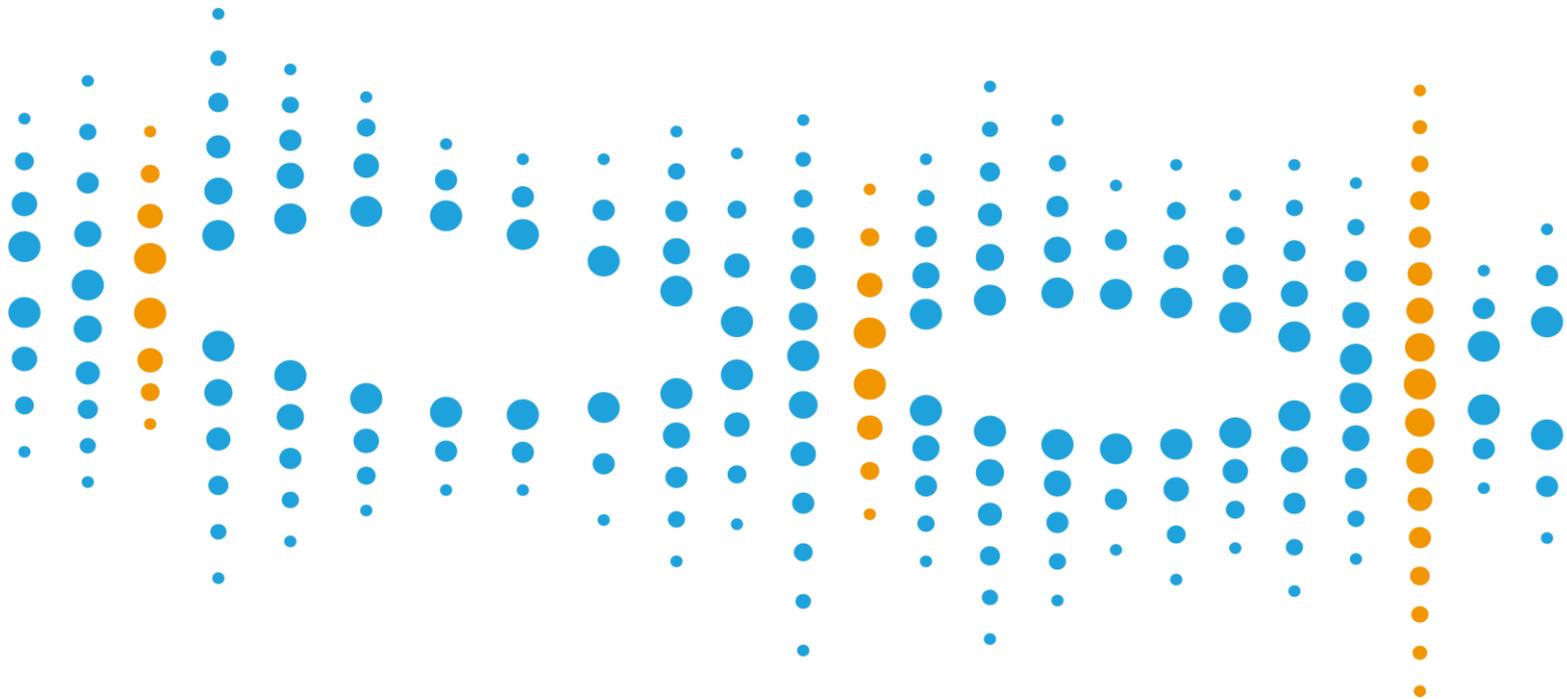


图 2. mRNA 不同打断时间对应的双链 cDNA 片段范围。取 1 μg Universal Human Reference RNA，经 mRNA 提取试剂盒提取后，分别以 94°C，6 min、85°C，8 min 和 85°C，5 min 处理。打断后 mRNA 进行双链 cDNA 的合成，经过 1.8×磁珠回收后，通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

【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。

Good science

Good products



**Yeasen Biotech Co., Ltd.**

Service call: 400-6111-883

Email: [order@yeasen.com](mailto:order@yeasen.com)

Web: [www.yeasen.com](http://www.yeasen.com)

Add: Floor 3, Building 1, No.166 Tianxiong Road,  
International Medical Zone(SIMZ) ,Shanghai,China

