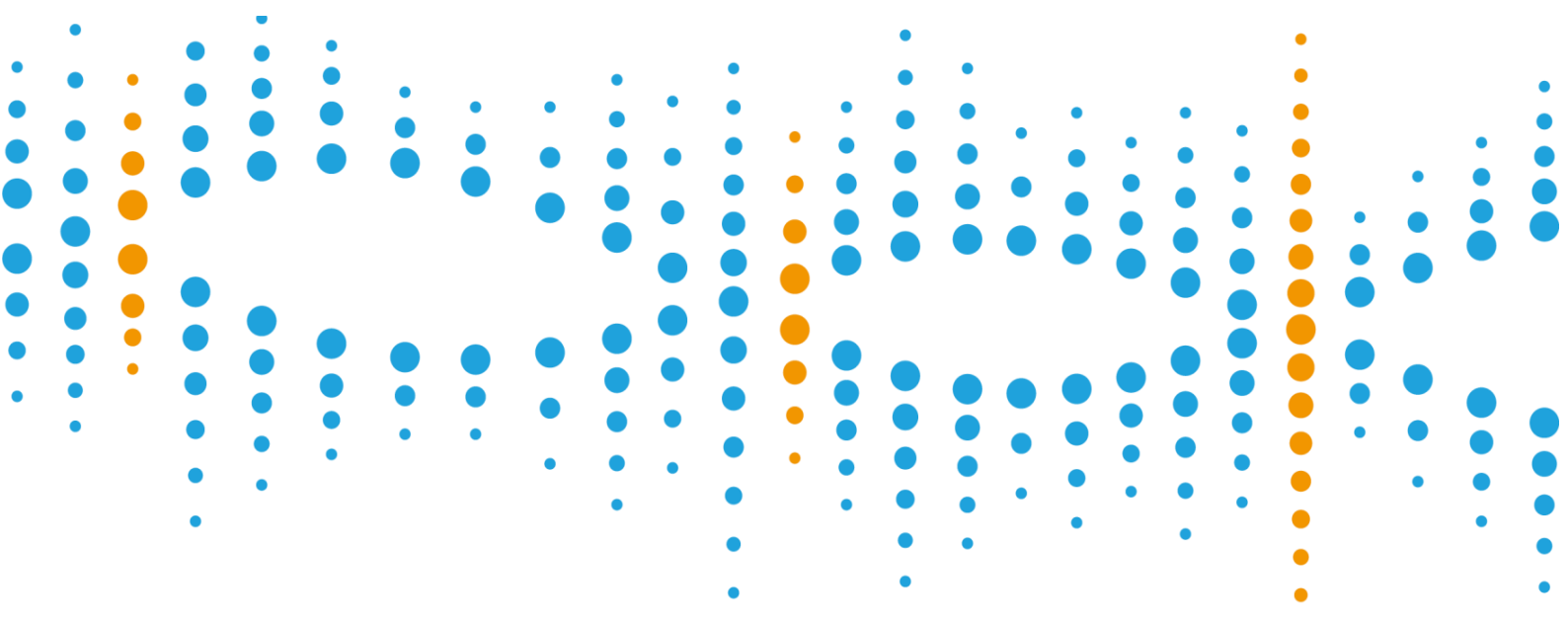


Hieff NGS[®] Ultima Dual-mode RNA Library Prep Kit for MGI[®]

13333ES08/24/96

双模式 RNA 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 -
建库流程图	- 3 -
使用方法	- 3 -
Part 1: 目标 RNA 的富集和片段化.....	- 3 -
方案 A: mRNA 纯化和片段化 (mRNA Purification and Fragmentation)	- 3 -
方案 B: rRNA 去除与 RNA 片段化 (rRNA Depletion and RNA Fragmentation)	- 4 -
Part 2: RNA 文库构建.....	- 6 -
附录一: mRNA 片段化效果展示	- 9 -
附录二: 分选条件说明.....	- 9 -
附录三: FFPE 样本建库说明.....	- 11 -

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® Ultima Dual-mode RNA Library Prep Kit for MGI® 双模式 RNA 建库试剂盒	13333ES08	8 T
	13333ES24	24 T
	13333ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® Ultima Dual-mode RNA Library Prep Kit for MGI®是用于 MGI®测序平台的 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 dscDNA 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，客户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。

产品组分

组分编号和名称	13333ES08	13333ES24	13333ES96
13333-A ● Frag/Prime Buffer	150 μL	450 μL	2×900 μL
13333-B ● 1st Strand Enzyme Mix	16 μL	48 μL	192 μL
13333-C ● Strand Specificity Reagent	50 μL	150 μL	580 μL
13333-D ● 2nd Strand Buffer (dNTP)	240 μL	720 μL	2×1440 μL
13333-E ● 2nd Strand Buffer (dUTP)	240 μL	720 μL	2×1440 μL
13333-F ● 2nd Strand Enzyme Master Mix	40 μL	120 μL	480 μL
13333-G ● Ligation Enhancer	240 μL	720 μL	2×1440 μL
13333-H ● Novel T4 DNA Ligase	40 μL	120 μL	480 μL
13333-I (○) 2×Super Canace® II High-Fidelity Mix	200 μL	600 μL	2×1200 μL
13333-J (○) Primer Mix For MGI®	40 μL	120 μL	480 μL

运输与保存方法

干冰运输。-20°C保存。有效期 1 年。

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、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 目前华大智造有 2 种序号的接头: 1-128 和 501-596。关于其使用要求, 请详见华大智造“关于 Adapter 使用”有关说明或咨询本公司。此外, 华大智造申明: 2 种接头由于设计工艺不同, 禁止混用, 否则测序数据无法拆分!
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. 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 \times TE buffer, 稀释过的接头可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 48 小时。

表 1 Input Total RNA 量与接头使用浓度推荐表

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

*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

三、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. 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
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。

四、DNA 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 \times TE Buffer 洗脱, 产物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 2 天, -20 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 1 个月。

五、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），可排除单端或两端都不连接 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。

六、自备材料 (Other Material)

1. mRNA 富集试剂盒：Hieff NGS® mRNA Isolation Master Kit (Yeasen Cat#12603)。
2. rRNA 去除试剂盒：Hieff NGS® MaxUp rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (Yeasen Cat#12253)。
3. RNA 纯化磁珠：Hieff NGS® RNA Cleaner (Yeasen Cat#12602) 或其他等效产品。
4. DNA 纯化磁珠：Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601) 或 AMPure® XP Beads (A63880) 或其他等效产品。
5. RNA 质检：Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico Chip 或其他等效产品。
6. Adapters：详情请咨询华大智造或本公司。
7. 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。
8. 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

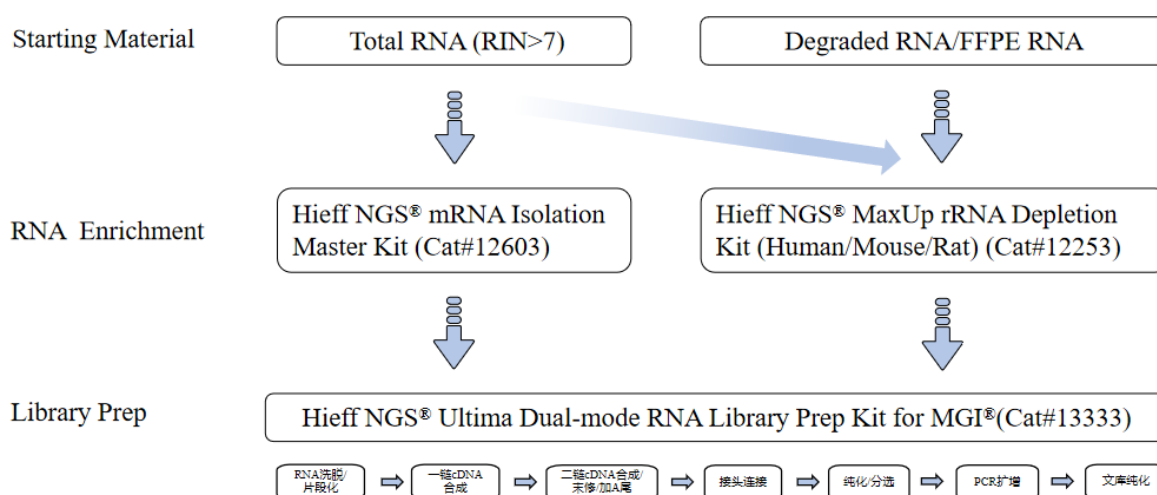


图 1 RNA 建库操作流程

使用方法

Part 1: 目标 RNA 的富集和片段化

该步骤是建库前的目标 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）。Yeasen Cat#13333 建库模块不包含该步骤所用试剂，请客户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 Hieff NGS® mRNA Isolation Master Kit (Yeasen Cat#12603) 进行 mRNA 富集。适用于起始模板量为 10 ng-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 (Yeasen Cat#12602) 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。

操作步骤

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 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; 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 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。
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 µL 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 µL 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 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。

14. 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 (预设为 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, 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。使用 Agilent 2100 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;
300-400	94°C, 7 min;
400-500	94°C, 5 min;

14. 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 µL 上清至一个新的 Nuclease Free 离心管中, 立刻进入第一链合成反应 (Part 2-Step 1)。

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

样本要求

该方案使用 Hieff NGS® MaxUp rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (Yeasen Cat#12253) 去除 Total RNA 中的 rRNA。适用于人、小鼠、大鼠来源的 1 ng~1 µg (体积≤11 µL) 总 RNA 样品; 适用于完整或部分降解 RNA (如 FFPE RNA) 样品。

操作步骤

Step 1 探针杂交

1. 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。
2. 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 μL。
3. 按照表 4 于 200 μL PCR 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 (μL)
Hybridization Buffer	3
Probe Mix(H/M/R)	1
Total RNA	11 (1 ng~1 μg)
Total	15

4. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬间将反应液离心至管底。
5. 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

Step 2 RNase H 消化

1. 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 (μL)
RNase H Buffer	3
RNase H	2
上步产物	15
Total	20

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

Step 3 DNase I 消化

1. 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 (μL)
DNase I Buffer	27.5
DNase I	2.5
上一步产物	20
Total	50

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬间将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，设置反应程序：37°C，30min； 4°C，hold，进行 DNase I 消化反应。

Step 4 RNA 纯化

1. 准备工作：将 Hieff NGS[®] RNA Cleaner (Yeasen Cat#12602) 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。用 Nuclease free H₂O 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 110 μL Hieff 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。
4. 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。
5. 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 30 sec 后，小

心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。用 10 μ L 移液器吸干净残留液体。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，室温下开盖干燥磁珠（5~10 min）。
8. RNA 洗脱：将 PCR 管从磁力架上取下，加入 18.5 μ L Frag/Prime buffer，使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。
9. 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 μ L 上清至新的 Nuclease free PCR 管中，进行 RNA 片段化。
10. 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，客户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。
11. 片段化结束请立即置于冰上，进入一链合成反应（Part 2-Step 1）。

表 8 FFPE RNA 片段化条件推荐

DV ₂₀₀ *	片段化程序
>70%	94°C, 7 min;
50%~70%	94°C, 5 min;
20%~50%	85°C, 8 min;
<20% (风险建库)	65°C, 8 min

*降解 RNA 的样本质量使用 DV₂₀₀ 指标判断，详见附录三说明

Part 2: RNA 文库构建

Step 1 第一链 cDNA 的合成 (1st Strand Synthesis)

该步骤将已经富集/片段化的目标 RNA 合成一链 cDNA。目标 RNA 的富集可根据实验需求和样本情况选择 Poly(A) mRNA isolation 方案或 rRNA Depletion 方案，详见 Part 1。

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

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 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

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

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

【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 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

Step 3 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 MGI®接头。

1. 参考注意事项二中的表 1，根据 Input RNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 13 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 13 所示反应体系。

表 13 Adapter Ligation 体系

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

【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 μM，请根据注意事项二表 1 的提示，根据投入量对接头进行稀释，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 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

Step4 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，参照附录二的分选方案，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)

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。

- 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 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 52 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 50 μL 上清至新 PCR 管中，再进行一轮纯化。
- 吸取 40 μL Hieff 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 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 11，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 PCR 扩增。

Step 5 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 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 接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μL)
2 \times Super Canace [®] II High-Fidelity Mix	25
Primer Mix for MGI [®]	5
Adapter Ligated DNA	20

- 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
98 $^{\circ}\text{C}$	1 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	
60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	11~15cycles*
72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	-

*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，详见注意事项三。

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

- 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠从冰箱中取出，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 45 μL Hieff 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 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 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。

Step 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五。

附录一：mRNA 片段化效果展示

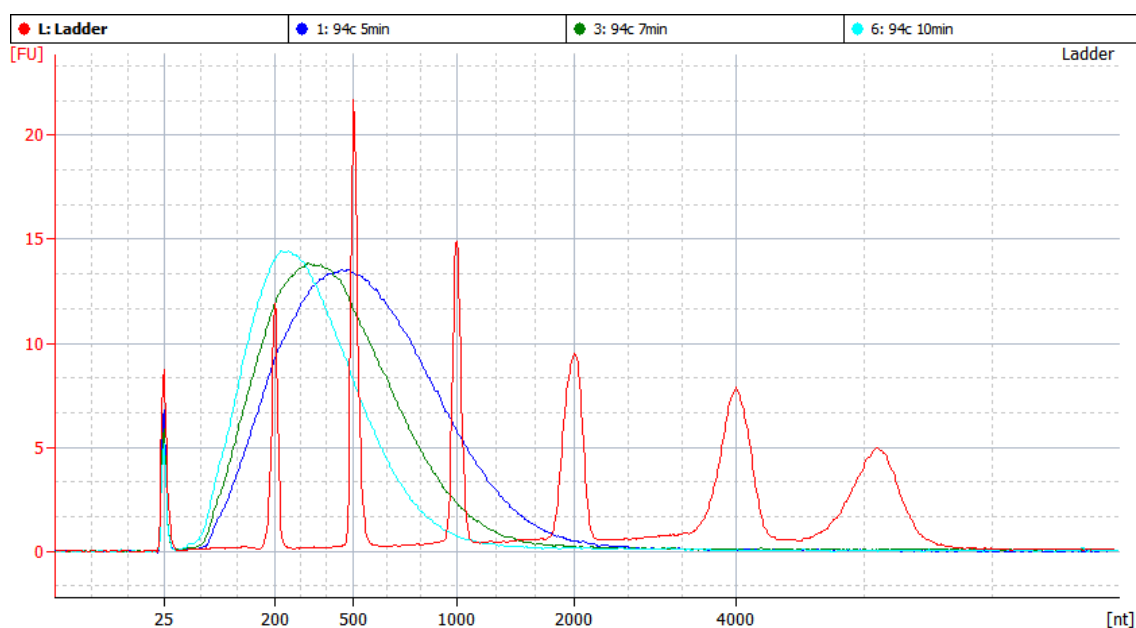


图 2. mRNA 不同打断时间对应的 RNA 片段范围。分别以 94°C，10 min、94°C，7min 和 94°C，5 min 处理。打断后 mRNA 进行进行 2.2X 磁珠纯化，通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

【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。

附录二：分选条件说明

分选方案适用于 94°C，10 min、94°C，7min 和 94°C，5 min 片段化的 RNA 建库，可以获得插入片段大于 200bp 的文库：

方案一：接头连接产物纯化后分选

★ 0.6× HiEff NGS® DNA Selection Beads 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 μ L 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 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。
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 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 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 μ 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。

★ 双轮分选（以 94° C，7min 打断，分选文库大小为 380bp~480bp 为例说明，其他文库大小按推荐比例进行磁珠分选）

1. 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
2. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 17，在上述 100 μ L DNA 中加入第一轮分选磁珠 65 μ L(0.65×)，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 HiEff NGS® 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 μ L，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.65×100 μ L=65 μ L，第二轮分选磁珠使用体积为 0.15×100 μ L=15

μL。

3. 室温孵育 5 min。
4. 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。
5. 参考表 17 向上清中加入第二轮分选磁珠 15 μL(0.15×)。
6. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min。
7. 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。
8. 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。
9. 重复步骤 8。
10. 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）。
11. 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。
12. 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 17 短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 10min	94°C 7min	94°C 7min	94°C 5min
第一轮磁珠体积(ul)	70 (0.7×)	65 (0.65×)	58 (0.58×)	50 (0.5×)
第二轮磁珠体积 (ul)	20 (0.2×)	15 (0.15×)	15 (0.15×)	15 (0.15×)

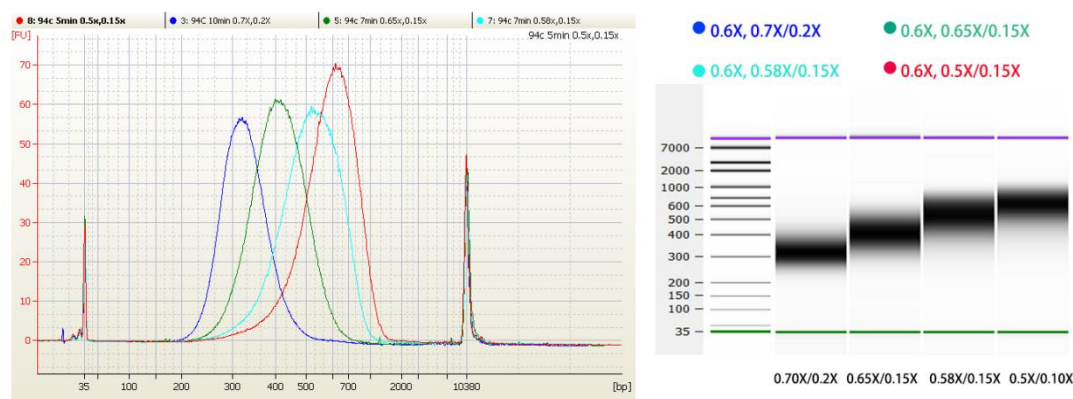


图 3. 1ug 293 total RNA，在 94°C，10 min、94°C，7min 和 94°C，5 min 片段化后，根据表 17 推荐的磁珠比例得到的文库大小。

方案二：接头连接产物直接分选（以 94° C，7min 打断，分选文库大小为 410bp~510bp 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。

1. 请涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证混匀。
2. 根据 DNA 片段长度要求，参考表 18，的连接体系中加入第一轮分选磁珠 20 μL(0.20×)，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 HiSeq NGS® 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 μL，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.20×100 μL=20 μL，第二轮分选磁珠使用体积为 0.1×100 μL=10 μL。

3. 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，。
4. 参考表 18 向上清中加入第二轮分选磁珠 10 μL(0.10×)。
5. 涡旋混匀或移液器吹打 10 次混匀，室温静置 10 min。
6. 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。
7. 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。
8. 重复步骤 7。
9. 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）。
10. 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。

11. 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 18 短接头文库分选推荐磁珠比例

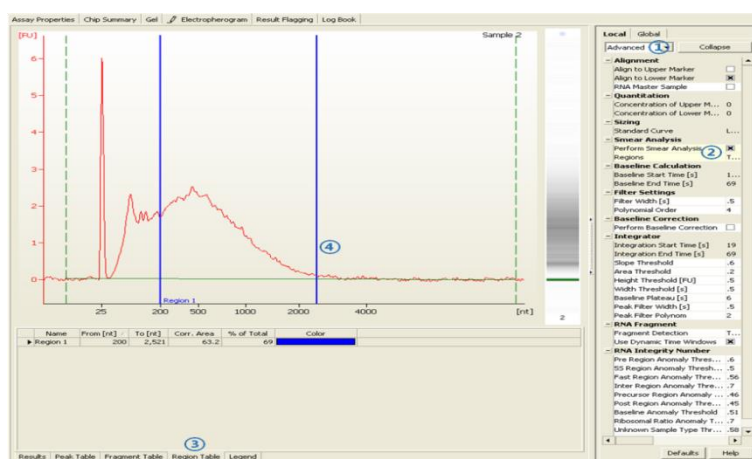
插入片段长度 (bp)	200~300	300~400	400~500	500~600
文库长度 (bp)	280~380	380~480	480~580	580~680
打断条件	94°C 10min	94°C 7min	94°C 7min	94°C 5min
第一轮磁珠体积(μl)	25 (0.25 \times)	20 (0.2 \times)	15 (0.15 \times)	15 (0.15 \times)
第二轮磁珠体积 (μl)	10 (0.1 \times)	10 (0.1 \times)	10 (0.1 \times)	10 (0.1 \times)

附录三：FFPE 样本建库说明

1. FFPE RNA 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：

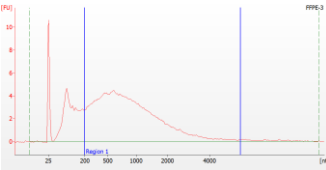
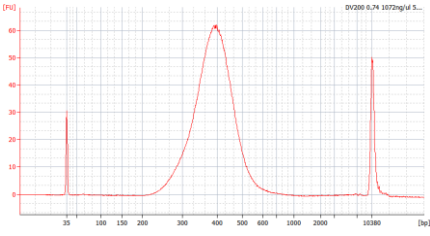
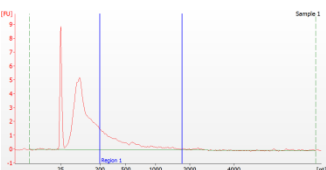
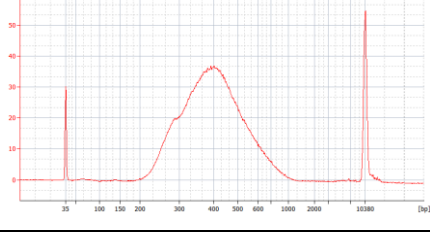
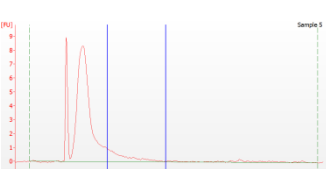
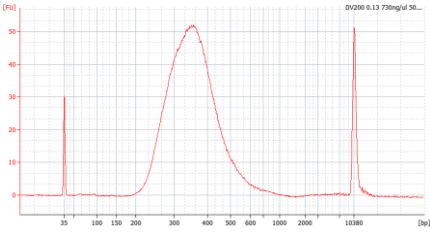

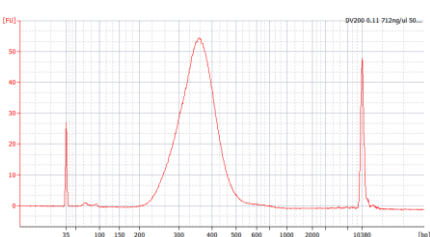




- ① 在一个检测完成的 Agilent 2100 Bioanalyzer 结果图中，在 Local 下选择 Advanced
- ② 勾选 Smear Analysis 下的 Perform Smear Analysis 选项
- ③ 选择 Region Table 页面，鼠标右击，选择 Add Region
- ④ 调整指示线的范围即可得到所选片段范围 所占的比例 % of Total

2. FFPE RNA 建库示例

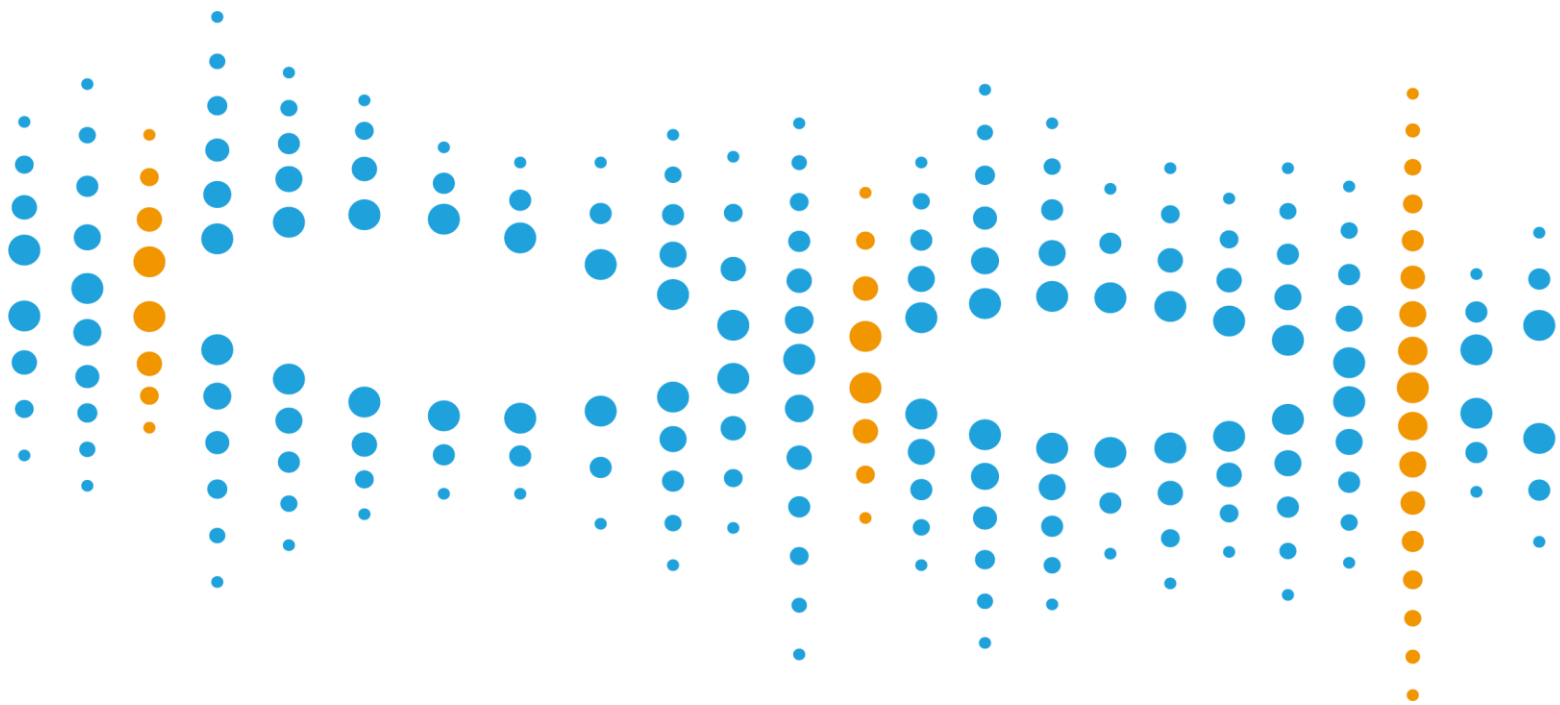
下表展示了不同质量 FFPE 样本在不同建库条件下的文库分布，以供参考。对于降解严重的 FFPE RNA (DV₂₀₀<50%) 和起始量低的水库构建，我们推荐接头连接后采用两次纯化方案，以减少文库损失。

RNA 样本质控	建库条件	文库分布质控
<p>RIN=2.2; DV₂₀₀=74%</p>	<p>投入量: 500 ng</p> <p>片段化条件: 94°C, 7 min</p> <p>接头连接后进行两次纯化: 0.6\times; 0.8\times</p> <p>链特异建库扩增: 12cycles</p> <p>文库产量: 717.2 ng</p>	<p>DV₂₀₀ 0.71 1572ng/ul 5...</p>

 <p>RIN=2.2; DV₂₀₀=74%</p>	<p>投入量: 500 ng 片段化条件: 94°C, 7min 接头连接后进行纯化/分选: 0.6×; 0.7×/0.15× 链特异建库扩增: 13cycles 文库产量: 437.8 ng</p>	
 <p>RIN=2.2; DV₂₀₀=74%</p>	<p>投入量: 100 ng 片段化条件: 94°C, 5 min 接头连接后进行两次纯化: 0.6×; 0.8× 链特异建库扩增: 15cycles 文库产量: 206.8ng</p>	
 <p>RIN=2.5; DV₂₀₀=26%</p>	<p>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: 12cycles 文库产量: 207 ng</p>	
 <p>RIN=2.5; DV₂₀₀=26%</p>	<p>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: 13cycles 文库产量: 98.56 ng</p>	
 <p>RIN=2.5; DV₂₀₀=11%</p>	<p>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: 12cycles 文库产量: 354.2 ng</p>	
<p>RIN=2.5; DV₂₀₀=11%</p>	<p>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: 13cycles 文库产量: 172.48 ng</p>	

Good science

Good products



Yeasen Biotech Co., Ltd.

Service call: 400-6111-883

Email: order@yeasen.com

Web: www.yeasen.com

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

