

Hieff NGS[®] Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for MGI[®]
双模式 mRNA 建库试剂盒 (for MGI[®])

Cat No.13330

使用说明书
Product Manual



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 片段化效果展示	8
附录二：分选条件说明	8

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS [®] Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for MGI [®] 双模式 mRNA 建库试剂盒	13330ES08	8 T
	13330ES24	24 T
	13330ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS[®] Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for MGI[®]是针对 MGI[®]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 10 ng-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华大平台测序的文库。

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 dscDNA 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	13330ES08	13330ES24	13330ES96	
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	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

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子置于室温解冻。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。
6. 本产品仅做科研用途！

二、应用范围

本试剂盒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 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. 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×TE buffer，稀释过的接头可在 4℃ 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

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. 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。

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 质控：Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico Chip 或其他等效产品。
- 3.Adapters：详情请咨询华大智造或本公司。
- 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

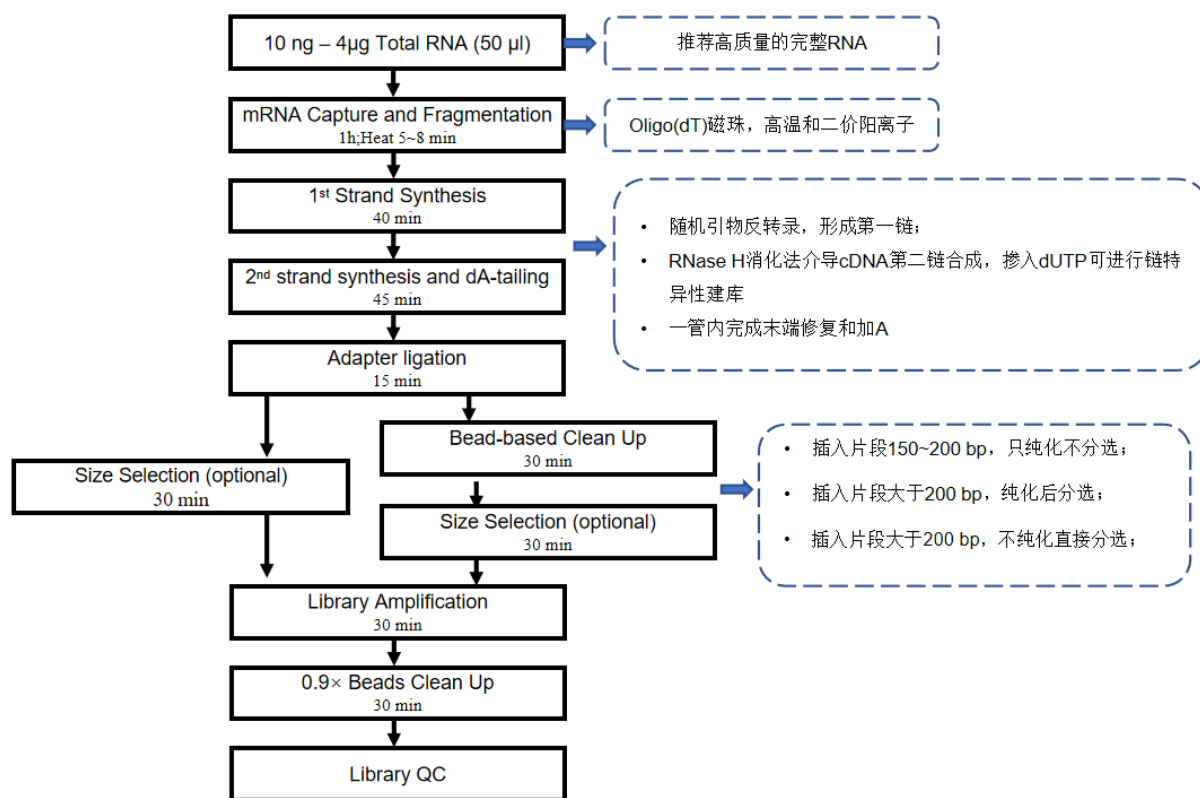


图 1 mRNA 建库试剂盒操作流程

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 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;

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 (Part 2-Step 1)。

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 (μ 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 (μ L)
1st Strand cDNA	25 μ L
2nd Strand Buffer (dNTP or dUTP)*	30 μ L
2nd Strand Enzyme Master Mix	5 μ 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 MGI®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*
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 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

3.5 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 磁珠从冰箱中取出，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 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。
9. 吸取 40 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.8×, 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。
10. 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。

11. 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。
12. 重复步骤 11，总计漂洗两次。
13. 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）。
14. 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。

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。

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。

1. 将表 10 中的试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 10 所示反应体系。

表 10 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

3. 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。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 11 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 11 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	11~15cycles*
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°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，详见注意事项五。

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

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 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。
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 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。

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

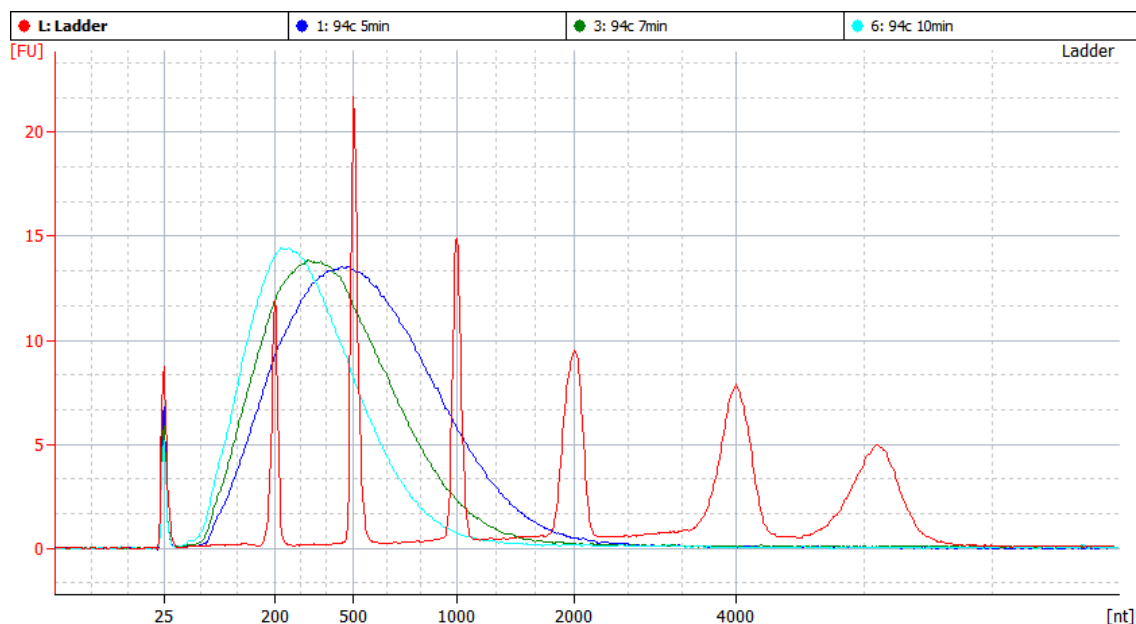


图2. mRNA 不同打断时间对应的 RNA 片段范围。分别以 94°C, 10 min、94°C, 7min 和 94°C, 5 min 处理。打断后 mRNA 进行进行 2.2X 磁珠纯化, 通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

【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× Hiief NGS® DNA Selection Beads 接头连接产物的纯化

1. 准备工作：将 Hiief 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 Hiief 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 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。

★ 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 12, 在上述 100 μL DNA 中加入第一轮分选磁珠 65 μL (0.65×), 涡旋或移液器吹打 10 次混匀。
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。

- 参考表 12 向上清中加入第二轮分选磁珠 15 μL (0.15 \times)。
- 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 3 min），小心移除上清。
- 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。
- 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 3 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 3 min），小心转移 20 μL 上清至干净管中。

表 12 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 $^{\circ}\text{C}$ 10min	94 $^{\circ}\text{C}$ 7min	94 $^{\circ}\text{C}$ 7min	94 $^{\circ}\text{C}$ 5min
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)

【注】：此表推荐的双轮分选比例适用于 HiSeq[®] 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 $0.15 \times 100 \mu\text{L} = 15 \mu\text{L}$ 。

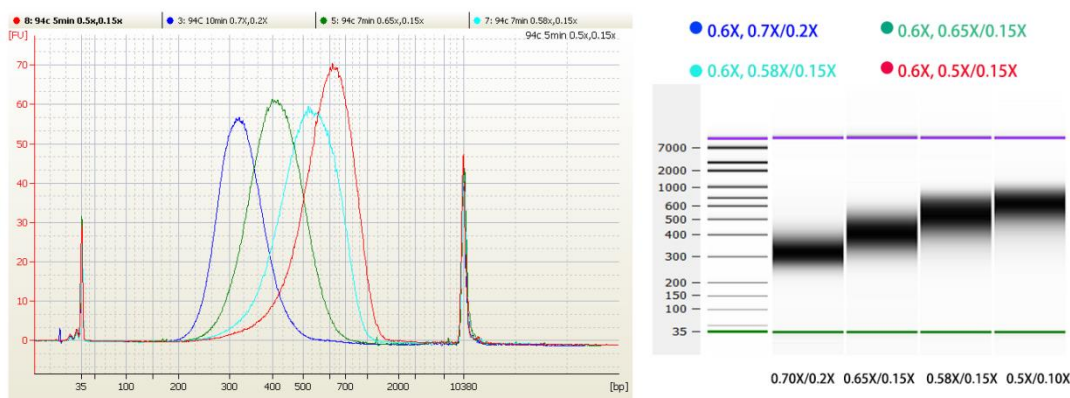


图 3. *lug 293* total RNA，在 94 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min、94 $^{\circ}\text{C}$ ，7min 和 94 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min 片段化后，根据表 12 推荐的磁珠比例得到的文库大小。

方案二：接头连接产物直接分选（以 94 $^{\circ}\text{C}$ ，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）

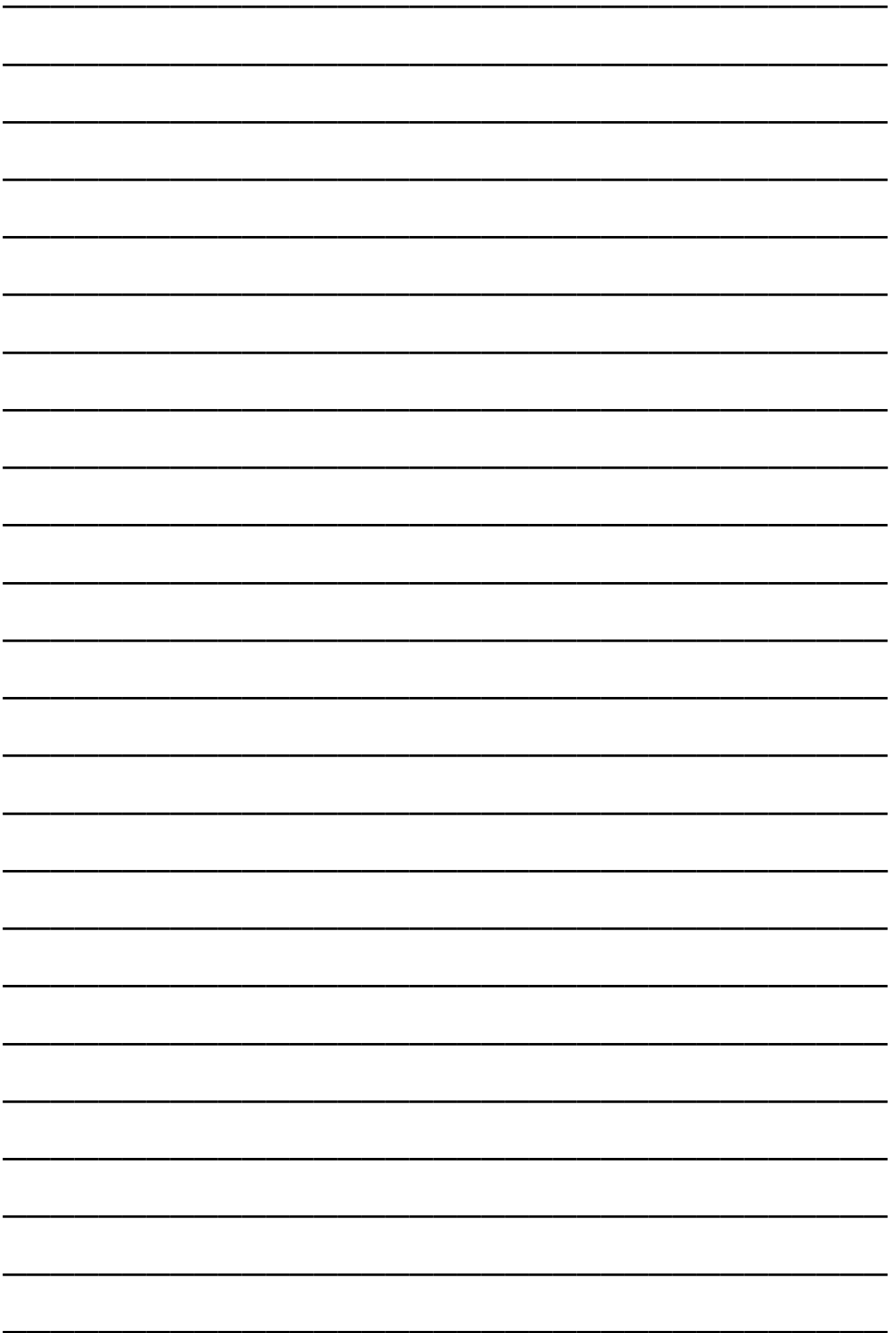
500 ng 以上的总 RNA 做 mRNA 抓取后建库，推荐直接分选，体系比较粘稠，需要小心添加，RNA 质量略差样本可能会有接头残留。

- 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 13，在上述 100 μL 的 DNA 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。
- 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。
- 参考表 13 向上清中加入第二轮分选磁珠 10 μL (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 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。
- 重复步骤 7。
- 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 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。
- 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 13 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×)	20 (0.2×)	15 (0.15×)	15 (0.15×)
第二轮磁珠体积 (μL)	10 (0.1×)	10 (0.1×)	10 (0.1×)	10 (0.1×)

【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 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。



Good science

Good products

翌圣生物科技（上海）股份有限公司

服务电话:400-6111-883

咨询邮箱:marketing@yeasen.com

网 址:www.yeasen.com

地 址:上海市浦东新区国际医学园区天雄路166号1号楼402室

