

编号: H-940-000890-00



使用说明书

版本: 1.0

MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装

货号: 940-000890-00 (16 RXN)
940-000889-00 (96 RXN)
940-000961-00 (192 RXN)
套装版本号: V1.0

关于说明书

©2023 深圳华大智造科技股份有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造科技股份有限公司（以下简称华大智造）的专有保密信息，未经华大智造的书面许可，任何个人或组织不得全部或部分地对本说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本说明书的读者为终端用户。说明书作为产品的一部分，由华大智造授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本说明书。

华大智造对本说明书不做任何种类的保证，包括（但不限于）用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。华大智造已经采取措施，确保本说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本说明书和产品进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

本说明书中的所有图片均为示意图，图片内容可能与实物有细微差异，请以购买的产品为准。


DNBSEQ™、MGISEQ™、ALPAQUA®、Agilent®、Agilent Technologies®、Ambion®、Axygen®、Advanced Analytical®、Invitrogen®、PerkinElmer®、Qubit®、Thermo Fisher®、Transgen™、Vazyme™、YEASEN™以及文中涉及的其他名称及商标属于各自所有者资产。

制造商信息

生产企业	深圳华大智造科技股份有限公司
生产地址	中国深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼
客服电话	4000-688-114
技术支持	MGI-service@mgi-tech.com
网址	www.mgi-tech.com

版本记录

说明书版本	套装版本	日期	修订内容摘要
1.0	V1.0	2023 年 6 月	<ul style="list-style-type: none">初版发布

 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: <https://www.mgi-tech.com/download/files>

目录

1 产品信息	1
1.1 产品描述	1
1.2 适用范围	1
1.3 适用测序平台	1
1.4 组分	2
1.5 储存与运输	4
1.6 自备物料清单	5
1.7 注意事项	6
1.8 流程	7

2 样本要求及处理	8
2.1 适用样本类型及投入量要求	8
2.2 样本质量要求及说明	8

3 文库构建标准流程	9
3.1 RNA富集	9
3.2 RNA片段化	11
3.3 反转录	12
3.4 二链合成及末端修复	13
3.5 接头连接	15
3.6 连接产物纯化	16
3.7 PCR	18
3.8 PCR产物纯化	20
3.9 PCR产物质检	21


4 附录	22
4.1 关于双端独立标签引物试剂盒使用说明	22
4.2 常规环化及DNB 制备（可选）	25
4.3 一步法 DNB 制备（可选）	29
4.4 关于低质量 FFPE 样本的建库说明	31
4.5 RNA 病原检测样本的建库说明	34

--- 此页有意留白 ---

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂套装是针对于华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的快速 RNA 文库构建试剂套装。本试剂盒套装可快速将 10-1000 ng 不同来源真核 total RNA 制备成 MGI 高通量测序平台专用的文库。本试剂盒采用优化的高质量酶及 buffer 体系, 将 cDNA 二链合成及末端修复进行合并, 极大地缩短了建库时间。二链合成部分搭配有两种 buffer, 用户可根据使用需求选用进行常规或方向性建库。本套装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制备的稳定性和重复性。

-  提示
- MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装搭配双 Barcode 进行文库构建。
 - 已构建好的文库可搭配 MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒 (货号: 1000020570) 将 dsDNA 进行变性、环化成为单链环状文库再进行 DNB 制备, 具体操作流程参考第 25 页“常规环化及DNB 制备 (可选)”;
 - 或搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0 (货号: 940-000036-00) 直接将 dsDNA 进行快速 DNB 制备, 具体操作流程参考第 29 页“一步法 DNB 制备 (可选)”。

1.2 适用范围


本试剂套装适用于常见的动物、植物、真菌、细菌等物种, 例如人 (血液、唾液、新鲜组织)、鼠、水稻、大肠杆菌等。

1.3 适用测序平台

根据应用需求, 选择合适的 DNB 制备试剂盒、测序平台和测序类型:

表 1 测序平台及测序类型推荐

试剂盒选择	测序平台及测序类型推荐
MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒	MGISEQ-200RS (SE50/PE100/PE150) MGISEQ-200ORS (SE50/PE100/PE150) DNBSEQ-G99 (SE50/PE100/PE150) DNBSEQ-T7RS (SE50/PE100/PE150) DNBSEQ-T10x4RS (SE50/PE100/PE150)
DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0	MGISEQ-200ORS (PE100/PE150) DNBSEQ-T7RS (PE100) DNBSEQ-G99 (SE50/PE100/PE150) MGISEQ-200RS (PE100)










 提示 当文库插入片段为 200 bp 时，建议采用测序读长为 PE100 或 SE50；当文库插入片段为 270 bp 时，建议采用测序读长为 PE150。

1.4 组分

MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装有 3 个规格，分别是 16 RXN，96 RXN及 192 RXN。每个试剂套装包含 3 个独立试剂盒。不同规格的套装中所包含的试剂盒、货号、组分信息见下表。

套装中包含信息卡片，客户可通过卡片信息登录 MGI 官网，下载相应说明书及 MSDS 文件。

表 2 MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装 (16 RXN) (货号：940-000890-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒 货号：940-000887-00 规格：16 RXN	Fragmentation Buffer	 绿色	80 μL/支× 1
	RT Buffer	 棕色	64 μL/支× 1
	RT Enzyme Mix	 绿色	16 μL/支× 1
	Second Strand Buffer (with dNTP)	 黄色	405 μL/支× 1
	Directional Second Strand Buffer (with dUTP)	 橙色	405 μL/支× 1
	Second Strand Enzyme Mix	 黄色	76 μL/支× 1
	Ligation Buffer	 红色	375 μL/支× 1
	DNA Ligase	 红色	26 μL/支× 1
PCR Enzyme Mix	 蓝色	400 μL/支× 1	





试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 货号：1000022800 规格：16 RXN	UDB Adapter	 白色	80 μL/支×1
	UDB PCR Primer Mix-57-64, 89-96	 蓝色	12 μL/支×16
MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 货号：940-001176-00 规格：3.2 mL	DNA Clean Beads	 白色	3.2 mL/支×1
	TE Buffer	 白色	3.2 mL/支×1

表 3 MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装 (96 RXN) (货号：940-000889-00)














试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒 货号：940-000888-00 规格：96 RXN	Fragmentation Buffer	 绿色	480 μL/支×1
	RT Buffer	 棕色	384 μL/支×1
	RT Enzyme Mix	 绿色	96 μL/支×1
	Second Strand Buffer (with dNTP)	 黄色	1215 μL/支×2
	Directional Second Strand Buffer (with dUTP)	 橙色	1215 μL/支×2
	Second Strand Enzyme Mix	 黄色	452 μL/支×1
	Ligation Buffer	 红色	1124 μL/支×2
	DNA Ligase	 红色	154 μL/支×1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μL/支×2
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒B 货号：1000022802 规格：96 RXN	UDB Adapter	 白色	480 μL/支×1
	UDB PCR Primer Mix-97-192	 无色	12 μL/孔×96
MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 货号：940-001174-00 规格：15 mL	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支×1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支×1

表 4 MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装 (192 RXN) (货号: 940-000961-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒 货号: 940-000888-00 规格: 96 RXN ×2	Fragmentation Buffer	 绿色	480 μL/支× 1
	RT Buffer	 棕色	384 μL/支× 1
	RT Enzyme Mix	 绿色	96 μL/支× 1
	Second Strand Buffer (with dNTP)	 黄色	1215 μL/支× 2
	Directional Second Strand Buffer (with dUTP)	 橙色	1215 μL/支× 2
	Second Strand Enzyme Mix	 黄色	452 μL/支× 1
	Ligation Buffer	 红色	1124 μL/支× 2
	DNA Ligase	 红色	154 μL/支× 1
PCR Enzyme Mix	 蓝色	1200 μL/支× 2	
MGIEasy 双端独立标签引物接头 试剂盒A 货号: 1000022801 规格: 96 RXN	UDB Adapter	 白色	480 μL/支× 1
	UDB PCR Primer Mix-01- 96	 无色	12 μL/孔× 96
MGIEasy 双端独立标签引物接头 试剂盒B 货号: 1000022802 规格: 96 RXN	UDB Adapter	 白色	480 μL/支× 1
	UDB PCR Primer Mix-97- 192	 无色	12 μL/孔× 96
MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒 货号: 940-001174-00 规格: 15 mL ×2	DNA Clean Beads	 白色	15 mL/支 × 1
	TE Buffer	 白色	17 mL/支 × 1

1.5 储存与运输

表 5 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	储存温度	运输温度
MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒		
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 A		

试剂盒	储存温度	运输温度
MGIEasy 双端独立标签引物接头试剂盒 B	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy DNA纯化磁珠	2 °C ~ 8 °C	



提示

- 有效期见试剂盒标签。
- 若使用冰袋或干冰进行运输，请在收到货物后检查是否有剩余的冰或干冰。
- 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。

1.6 自备物料清单

表 6 MGI 产品订购信息

货号	规格	名称
1000005953	32 RXN	MGIEasy rRNA 去除试剂盒
1000020570	16 RXN	MGIEasy 双 Barcode 环化试剂盒
940-000036-00	OS-DB, 4 RXN	DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0

表 7 设备清单

名称	推荐品牌
漩涡混匀仪	/
小型离心机	/
移液器	/
PCR仪	/
96 孔板磁力架	ALPAQUA, Part#A00400
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D
Qubit3.0 荧光定量仪	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyze	Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA 或同等功能仪器

表 8 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
Dynabeads mRNA Purification Kit	Invitrogen, Cat. No. 61006
Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads	Vazyme, Cat. No. N403-02
Nuclease free water (NF water)	Ambion, Cat. No. AM9937 或 Transgen, Cat. No. GI101-03
1x TE buffer, pH 8.0	Ambion, Cat. No. AM9858



名称	推荐品牌
无水乙醇 (分析纯)	/
Qubit ssDNA Assay Kit	YEASEN, Cat. No.12645ES60/12645ES76 或 Invitrogen, Cat. No. Q10212
Qubit dsDNA HS Assay Kit	YEASEN, Cat. No.12640ES60/12640ES76 或 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 或同等功能仪器配套的分析试剂
移液器吸头	/
1.5 mL 离心管	/
0.2 mL PCR 管或 96 孔板	Axygen, Cat. No. PCR-02-C 或 Axxygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管	Invitrogen, Cat. No. Q32856 或 Axxygen, Cat. No. PCR-05-C

1.7 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。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 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。如果 PCR 仪无法设置热盖温度，也可保持在 105 °C。
- PCR产物如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；不同功能区使用其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。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- 若有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

1.8 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	RNA富集 (三选一)	1 h ~ 2 h 20 min	20 ~ 50 min
3.2	RNA片段化	11 min	5 min
3.3	反转录	50 ~ 55 min	10 ~ 15 min
3.4	二链合成及末端修复	55 ~ 60 min	10 ~ 15 min
3.5	接头连接	25 min	10 min
3.6	连接产物纯化 	30 ~ 50 min	20 ~ 40 min
3.7	PCR 	50 min	10 min
3.8	PCR产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.9	PCR产物质检 	30 ~ 40 min	10 ~ 20 min

-  提示
- 总时长：指 8 个反应理论时长，单次建库样本数增多，时间将延长。
 - 手工操作时长：指该流程累计手工操作的总时长。
 - ：停止点。

2 样本要求及处理

2.1 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、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 去除试剂盒进行去 rRNA 处理，所使用样本的 Input total RNA 量为 200 ng。

2.2 样本质量要求及说明

- 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对提取的 total RNA 样本进行质控，要求 RIN 值 ≥ 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。
- RNA 纯度：OD_{260/280} = 1.8 ~ 2.0，OD_{260/230} ≥ 2 。
- 对于 FFPE 样本提取的 RNA，可以参考第 31 页“关于低质量 FFPE 样本的建库说明”。
- 对于病原 RNA 样本，可以参考第 34 页“RNA 病原检测样本的建库说明”。
- 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。

3 文库构建标准流程

3.1 RNA富集

根据需求，选择下面三种方法中的一种进行 RNA 富集。

- 第 9 页 “rRNA去除试剂盒”
- 第 9 页 “Dynabeads mRNA Purification Kit ”
- 第 10 页 “Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads”

3.1.1 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 RNA 片段化步骤，第 11 页 “RNA片段化”

3.1.2 Dynabeads mRNA Purification Kit

 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 准备

表 9 试剂准备

试剂名称	要求
磁珠	提前 30 min 取出置于室温，每次使用前充分涡旋混匀
Binding Buffer	室温平衡、暂存，涡旋混匀、离心
Washing Buffer	
10 mM Tris-HCl	
NF Water	

3.1.2.2 重悬磁珠

- 根据所需反应数，重悬磁珠。如下操作为 1 个反应所需量。
 - 1) 将试剂盒自带磁珠涡旋混匀 1 min 后，吸取 **50 μ L 磁珠**至新的 1.5 mL 不粘管中，于磁力架上静置 2 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
 - 2) 将不粘管从磁力架上取下，加入 **50 μ L Binding Buffer**，用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，再置于磁力架上静置 2 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
 - 3) 重复步骤 2 一次。
 - 4) 加入 **25 μ L Binding Buffer** 重悬磁珠，吹打 10 次混匀，备用。

3.1.2.3 RNA富集

1. 提前将 Thermomixer 调至 65 °C。根据样本浓度，取 **200 ng total RNA** 样本至新的 1.5 mL 不粘管，用 **NF Water** 补足至总体积 25 μ L。
2. 将样本放入 65 °C 加热变性 5 min 后取出，立即加入 **25 μ L 已重悬磁珠**（混匀），用移液器轻轻吹打 10 次混匀。
3. 室温静置 5 min。同时把 Thermomixer 调至 80 °C。
4. 将不粘管置于磁力架上静置 2 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
5. 将不粘管从磁力架上取下，各加入 **50 μ L Washing Buffer**，用移液器轻轻吹打至少 10 次混匀，再置于磁力架上静置 2 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 吸取 **25 μ L 10 mM Tris-HCl** 至各样本管中，吹打混匀后，置于 80 °C 加热 2 min 将 mRNA 从磁珠上洗脱。
8. 立即加入 **25 μ L Binding Buffer**，用移液器吹打 10 次混匀，室温静置 5 min，再置于磁力架上静置 2 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
9. 重复步骤 5 两次。
10. 吸取 **12 μ L 10 mM Tris-HCl** 至各样本管中，吹打混匀后，置于 80 °C 加热 2 min。
11. 立即置于磁力架上静置 1~2 min 至液体澄清，小心吸取 **10 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

3.1.3 Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads

 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。

3.1.3.1 准备

表 10 试剂准备


试剂名称	要求
mRNA Capture Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

试剂名称	要求
Beads Wash Buffer	室温平衡、暂存，涡旋混匀、离心
Tris Buffer	
Beads Binding Buffer	
NF Water	

3.1.3.2 RNA 富集

1. 提前将 Thermomixer 调至 65 °C。根据样本浓度，取 **200 ng total RNA** 样本至新的 1.5 mL 不粘管，用 **NF Water** 补足至总体积 50 μ L。
2. 将 mRNA Capture Beads 涡旋混匀 1 min 后，吸取 **50 μ L 磁珠**至各样本管中，用移液器轻轻吹打 10 次混匀。
3. 将样本管置于 Thermomixer 中，65°C 加热变性 5 min。
4. 室温静置 5 min。同时把 Thermomixer 调至 80 °C。
5. 将不粘管置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
6. 将不粘管从磁力架上取下，各加入 **200 μ L Beads Wash Buffer**，用移液器轻轻吹打 10 次混匀，再置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
7. 各加入 **50 μ L Tris Buffer**，用移液器轻轻吹打 10 次混匀，再置于 Thermomixer 中 80 °C 加热 2 min。
8. 立即加入 **50 μ L Beads Binding Buffer**，用移液器轻轻吹打 10 次混匀。室温静置 5 min。
9. 将不粘管置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
10. 将不粘管从磁力架上取下，各加入 **200 μ L Beads Wash Buffer**，用移液器轻轻吹打 10 次混匀，再置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
11. 吸取 **12 μ L Tris Buffer** 至各样本管中，吹打混匀后，置于 80 °C 加热 2 min 将 mRNA 从磁珠上洗脱。
12. 立即置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清，小心吸取 **10 μ L** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

3.2 RNA片段化

-  提示
- 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。
 - RNA 片段化、反转录、二链合成&末端修复及接头连接步骤建议连续操作。


3.2.1 准备

表 11 试剂准备

试剂名称	要求
Fragmentation Buffer	室温解冻、暂存，涡旋混匀、离心

3.2.2 RNA片段化

1. 吸取 **5 μ L Fragmentation Buffer** 至各样本管中（RNA 富集产物，3.1节），**移液器吹打** 至少5次混匀，瞬时离心后置于冰上。

 **注意** 请勿涡旋混匀。最后一次吹打时，可将枪头轻提至液面附近，缓慢打入所有液体，确保枪头无液体残留。

2. 当 PCR 仪达到反应温度时，将 PCR 管置于 PCR 仪上，根据插入片段大小选择相对应的片段化条件（105 $^{\circ}$ C 热盖）。

 **注意** 提前将 PCR 仪预热至相应温度，再将样本放入 PCR 仪中。

表 12 片段化条件推荐（体系：15 μ L）

插入片段	片段化温度	片段化时间
200 bp	94 $^{\circ}$ C	6 min
270 bp	87 $^{\circ}$ C	6 min

3. 反应结束后，立即将 PCR 管置于冰上静置 2 min，瞬时离心 10 s 后置于冰上，**立刻**进入反转录反应。

3.3 反转录

 **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 准备

表 13 试剂准备

试剂名称	要求
RT Buffer	室温解冻，混匀离心，冰上暂存
RT Enzyme Mix	混匀离心，冰上暂存

3.3.2 反转录

1. 根据所需反应数，在冰上配制反转录反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 14 反转录反应液的配制

组分	单个反应体积
RT Buffer	4 μ L
RT Enzyme Mix	1 μ L
Total	5 μ L

2. 吸取 **5 μ L 反转录反应液**至各样本管中（3.2.2 节步骤 3），**移液器吹打**至少 5 次混匀，瞬时离心后置于冰上。

 **注意** 请勿涡旋混匀。最后一次吹打时，可将枪头轻提至液面附近，缓慢打入所有液体，确保枪头无液体残留。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。


表 15 反转录反应条件（体系：20 μ L）

温度	时间
75 $^{\circ}$ C 热盖	On
25 $^{\circ}$ C	10 min
42 $^{\circ}$ C	15 min
70 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 **提示** 可在此步提前配制二链合成及末端修复反应液。见第 13 页“二链合成及末端修复”。

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心 5 s，置于冰上。


3.4 二链合成及末端修复

 **注意** 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.4.1 准备

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
Second Strand Buffer (with dNTP) 或 Directional Second Strand Buffer (with dUTP)	提前取出，室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Second Strand Enzyme Mix	提前取出，混匀离心，冰上暂存

 **注意** 可根据实际使用需求选择二链 Buffer: 如构建普通 RNA 文库, 请使用含 dNTP 的 Buffer; 如构建链特异性 RNA 文库, 请使用含 dUTP 的 Buffer。


3.4.2 二链合成及末端修复

1. 根据所需反应数, 在冰上配制二链合成及末端修复反应液, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。

表 17 二链合成及末端修复反应液的配制

组分	单个反应体积
Second Strand Buffer (with dNTP) 或 Directional Second Strand Buffer (with dUTP)	25.3 μ L
Second Strand Enzyme Mix	4.7 μ L
Total	30 μ L

2. 吸取 **30 μ L 二链合成及末端修复反应液**至各反转录产物中 (3.3.2节步骤 4), **移液器吹打**至少 10 次混匀, 瞬时离心后置于冰上。

 **注意** 请勿涡旋混匀。将移液器调至 40 μ L 进行混匀, 每次混匀不要将所有液体打出, 避免出现气泡。最后一次吹打时, 可将枪头轻提至液面附近, 缓慢打入所有液体, 确保枪头无液体残留。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 按下表的条件进行反应。

表 18 二链合成及末端修复反应条件 (体系: 50 μ L)

温度	时间
70 $^{\circ}$ C 热盖	On
16 $^{\circ}$ C	30 min
65 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 **提示** 可在此步提前配制连接反应液。见第 15 页“接头连接”。

4. 反应结束后, 将 PCR 管瞬时离心 10 s, 置于冰上。


3.5 接头连接

-  提示
- 操作前请仔细阅读第 22 页“关于 UDB Adapter 使用说明”。
 - UDB Adapter 的用量直接影响建库效率和文库的质量。请根据样本实际情况选择相应的接头稀释倍数。

3.5.1 准备

表 19 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	客户自备物料，室温暂存
UDB Adapter	提前取出，室温解冻，混匀离心，冰上暂存
Ligation Buffer	提前取出，室温解冻，混匀离心，冰上暂存
DNA Ligase	颠倒混匀离心后，冰上暂存

-  注意
- UDB Adapter 使用前须充分涡旋混匀，且不可直接与接头连接反应液混合。
 - Ligation Buffer 溶液较粘稠，使用前涡旋混匀 6 次，每次 3 s，离心 10 s 以确保管盖不沾粘液体。如发现管盖内部有白色析出，需盖上管盖后上下颠倒使管盖无白色残留，并充分震荡混匀使白色析出溶解。

3.5.2 接头连接

- 根据投入量，用 TE Buffer 将 UDB Adapter 稀释相应倍数（见下表），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 20 不同 total RNA 投入量推荐 UDB Adapter 使用量

total RNA (ng)	UDB Adapter	
	稀释倍数	稀释后投入量 (μL)
-	不稀释	5
201-2500	5	5
51-200	10	5


-  提示 上表列举了当投入不同质量的高质量样本 total RNA 时，所对应的 UDB Adapter 稀释倍数。对于不同降解程度的样本可参考第 31 页“FFPE RNA 样本的推荐使用量”。

- 吸取 5 μL UDB Adapter 或稀释后的 UDB Adapter 至对应的样本管中（3.4.2 节步骤 4），涡旋混匀 3 次，每次 3 秒，瞬时离心后置于冰上。
- 根据所需反应数，在冰上配制接头连接反应液，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 21 接头连接反应液的配制

组分	单个反应体积
Ligation Buffer	23.4 μ L
DNA Ligase	1.6 μ L
Total	25 μ L

4. 缓慢吸取 25 μ L 接头连接反应液至各样本管中，涡旋混匀 6 次，每次 3 s，瞬时离心使液体收集至管底后置于冰上。

 注意 接头连接反应液较粘稠，吸取时，注意枪头不要过多伸入液面以下，避免枪壁沾取过多；加液时，注意放慢速度，枪头中不应有液体残留。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。


表 22 接头连接反应条件（体系：80 μ L）

温度	时间
30 $^{\circ}$ C 热盖	On
23 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

6. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。

 提示 不建议在此处停止，请继续完成接头连接产物纯化。如果必须停止，请放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱不超过 16 h，但是会有产量下降或性能降低的风险。

3.6 连接产物纯化

 提示

- 插入片段为 200 bp 的，选择 3.6.2 步骤纯化；插入片段为 270 bp 的，选择 3.6.3 步骤纯化。
- 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

3.6.1 准备

表 23 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.6.2 连接产物纯化（插入片段为 200 bp）

1. 吸取 **40 μL TE Buffer** 至各样本管中（3.5.2 节步骤 6）至总体积 **120 μL** 。



- 注意**
- 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，在步骤 1 后用移液器吹打混匀，再将全部液体转移至 1.5 mL 离心管进行后续操作。需注意转移液体时不应有残留，否则可能会出现产量及片段异常。
 - 添加 TE Buffer 及磁珠时，应采用单枪添加，加液时需操作缓慢，以保证移液准确，否则可能会影响最终产物产量及片段大小。

2. 吸取**30 μL DNA Clean Beads** 至各样本管中。涡旋混匀，轻微瞬时离心，注意保持磁珠均匀分散状态。

3. 室温孵育 5 min。

4. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。



- 注意** 如液体较难澄清，可将样本管在磁力架上轻轻转动，可使磁珠吸附更为集中。

5. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **200 μL 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。

6. 重复步骤 5 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。

7. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

8. 将样本管从磁力架上取下，加入 **23 μL TE Buffer** 进行 DNA 洗脱。涡旋混匀，轻微瞬时离心，注意保持磁珠均匀分散状态。

9. 室温孵育 5 min。

10. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **21 μL** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。



- 停止点** 产物纯化后可置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

3.6.3 连接产物片选（插入片段为 270 bp）

1. 吸取 **60 μL TE buffer** 至样本管中（3.5.2 节步骤 6）至总体积 **140 μL** 。



- 注意**
- 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，在步骤 1 后用移液器吹打混匀，再将全部液体转移至 1.5 mL 离心管进行后续操作。需注意转移液体时不应有残留，否则可能会出现产量及片段异常。
 - 添加 TE Buffer 及磁珠时，可采用单枪添加，加液时需操作缓慢，以保证移液准确，否则可能会影响最终产物产量及片段大小。

2. 吸取**23 μL DNA Clean Beads** 至各样本管中。涡旋混匀，轻微瞬时离心，注意保持磁珠均匀分散状态。

3. 室温孵育 5 min。

4. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **153 μL** 上清液至新的 PCR 管或离心管。

 提示 此步保留上清，丢弃磁珠。

5. 吸取**15 μL DNA Clean Beads** 至各样本管中（步骤 4，含**153 μL** 上清）。涡旋混匀，轻微瞬时离心，注意保持磁珠均匀分散状态。

 注意 添加磁珠时，需注意移液准确，否则可能会影响最终产物产量及片段大小。

6. 室温孵育 5 min。

7. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。

8. 保持样本管固定于磁力架上，加入 **200 μL 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。

9. 重复步骤 8 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。

10. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

11. 将样本管从磁力架上取下，加入 **23 μL TE Buffer** 进行 DNA 洗脱。涡旋混匀，轻微瞬时离心，注意保持磁珠均匀分散状态。

12. 室温孵育 5 min。

13. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **21 μL** 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。

3.7 PCR

3.7.1 准备

表 24 试剂准备

试剂名称	要求
PCR Enzyme Mix	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
UDB PCR Primer Mix	

3.7.2 PCR 操作

1. 吸取 **25 μL PCR Enzyme Mix** 至样本管中（3.6.2 节步骤 10 或 3.6.3 节步骤 13）。

2. 按照第 23 页“UDB PCR Primer Mix 混合指南”加入 4 μL 相对应的 **UDB PCR Primer Mix**，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

表 25 PCR反应体系

组分	单个反应体积
3.6.2 节步骤 10 或 3.6.3 节步骤 13 产物	21 μ L
PCR Enzyme Mix	25 μ L
相对应的 UDB PCR Primer Mix	4 μ L
Total	50 μ L


3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 26 PCR 反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}$ C 热盖	on	-
95 $^{\circ}$ C	3 min	1
95 $^{\circ}$ C	15 s	X (详见表 27)
60 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	5 min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	-

表 27 获得 420 ng 文库推荐的扩增循环数

Total RNA (ng)	方向性扩增循环数	非方向性扩增循环数
10	17-19	16-18
50	16-17	15-16
200	14-15	13-14
1000	12-13	11-12

 提示 上表列举了当投入10-1000 ng 高质量 total RNA（高质量 total RNA 要求参考第 8 页“样本质量要求及说明”）时，所需要的扩增循环数。对于不同物种、不同降解程度的样本，需根据实际情况调整 PCR 循环数。

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心后冰上暂存。

 停止点 PCR产物可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.8 PCR产物纯化

 提示 添加试剂、转移上清时请勿触碰、吸取磁珠。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。

3.8.1 准备

表 28 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.8.2 PCR产物纯化

 提示 若使用 1.5 mL 离心管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取**40 μ L DNA Clean Beads** 至样本管中（3.7.2节步骤 4），用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持离心管固定于磁力架上，加入 **200 μ L 80% 乙醇** 漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。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，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。
7. 将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 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取 **30 μ L** 上清液至新的离心管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.9 PCR产物质检

- 使用双链荧光定量法，按照定量试剂盒的操作说明书对 PCR 纯化后产物进行定量。
- 使用电泳分离法，按照相应说明书对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。

表 29 PCR纯化后产物不同质检方法及标准

质检方法	设备/试剂	标准
双链荧光定量法	Qubit dsDNA HS Assay Kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 等	PCR产物的产量: ≥ 1.5 pmol, 可根据公式1计算
电泳分离法	Tapestation (Agilent Technologies)、 Bioanalyzer、LabChip GX、GXII、 GX Touch (PerkinElmer)、 Fragment Analyzer (Advanced Analytical) 等	插入片段 200 bp主带分布: 280 bp ~ 370 bp
		插入片段 270 bp 主带分布: 380 bp ~ 470 bp

公式 1 N pmol 对应片段大小 PCR 产物质量

$$N \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} = N \times \frac{\text{PCR 产物主带大小 (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

 提示 计算 1.5 pmol 对应片段大小 PCR 产物质量时，令公式 1 中的 N = 1.5 。

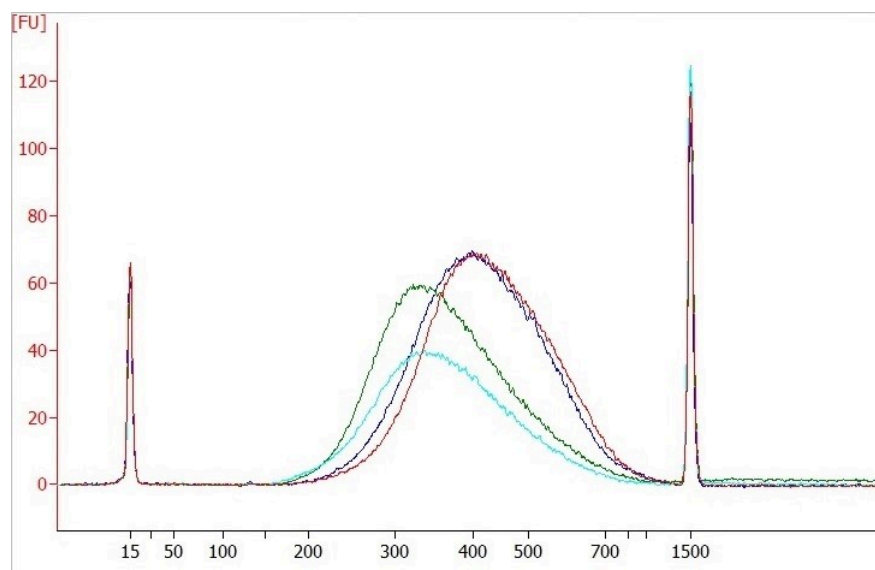


图 1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

4 附录

4.1 关于双端独立标签引物试剂盒使用说明

不同规格的试剂套装中，16 RXN 提供管式的引物，96 RXN 提供板式引物，192 RXN 提供 2 套板式引物。本试剂盒提供了 DNBSEQ / MGISEQ 测序平台双 barcode 文库构建所需的接头与 PCR 引物。试剂盒可以提供 192 种不同 Barcode 的 PCR Primer，可支持 192 个样本混合测序。

4.1.1 关于UDB Adapter 使用说明

- 请勿将 UDB Adapter 置于 30°C 以上温度，否则易发生解链，影响使用效果。
- UDB Adapter 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底，用吸水纸擦拭干净管盖表面，使用完毕后及时盖上管盖。
- UDB Adapter 接头长度 132 bp。

4.1.2 UDB PCR Primer Mix 使用注意事项

- MGI 双 barcode 文库既可进行单 barcode 测序，亦可进行双 barcode 测序，具体操作请参考对应测序说明书。
- UDB PCR Primer Mix 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底或板底。
- 对于管式 PCR Primer Mix 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 PCR Primer Mix 用 75% 酒精喷洒表面并用吸水纸擦拭干净铝膜表面。封膜是可穿透的，封膜表面不能接触尖锐物体。第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝膜直接吸取液体。使用后，刺破孔位的剩余试剂需逐一转移到离心管中，做好标记，-20 °C 保存。
- 吸取不同 PCR Primer Mix 时注意更换枪头，避免交叉污染。
- 基于碱基组成平衡的原则，UDB PCR Primer Mix 必须成组使用。请按照以下说明正确使用。

管式：共 16 管 UDB PCR Primer Mix，8 个为一组，分别是 UDB PCR Primer Mix-57 _ UDB PCR Primer Mix-64，UDB PCR Primer Mix-89 _ UDB PCR Primer Mix-96，共两组；

板式：共 2 板，每板 96 个 UDB PCR Primer Mix，一列为一组，具体的排版如下：

表 30 Set A barcode组合孔位

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB1	UDB9	UDB17	UDB25	UDB33	UDB41	UDB49	UDB57	UDB65	UDB73	UDB81	UDB89
B	UDB2	UDB10	UDB18	UDB26	UDB34	UDB42	UDB50	UDB58	UDB66	UDB74	UDB82	UDB90
C	UDB3	UDB11	UDB19	UDB27	UDB35	UDB43	UDB51	UDB59	UDB67	UDB75	UDB83	UDB91
D	UDB4	UDB12	UDB20	UDB28	UDB36	UDB44	UDB52	UDB60	UDB68	UDB76	UDB84	UDB92
E	UDB5	UDB13	UDB21	UDB29	UDB37	UDB45	UDB53	UDB61	UDB69	UDB77	UDB85	UDB93
F	UDB6	UDB14	UDB22	UDB30	UDB38	UDB46	UDB54	UDB62	UDB70	UDB78	UDB86	UDB94
G	UDB7	UDB15	UDB23	UDB31	UDB39	UDB47	UDB55	UDB63	UDB71	UDB79	UDB87	UDB95
H	UDB8	UDB16	UDB24	UDB32	UDB40	UDB48	UDB56	UDB64	UDB72	UDB80	UDB88	UDB96

表 31 Set B barcode组合孔位

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDB97	UDB105	UDB113	UDB121	UDB129	UDB137	UDB145	UDB153	UDB161	UDB169	UDB177	UDB185
B	UDB98	UDB106	UDB114	UDB122	UDB130	UDB138	UDB146	UDB154	UDB162	UDB170	UDB178	UDB186
C	UDB99	UDB107	UDB115	UDB123	UDB131	UDB139	UDB147	UDB155	UDB163	UDB171	UDB179	UDB187
D	UDB100	UDB108	UDB116	UDB124	UDB132	UDB140	UDB148	UDB156	UDB164	UDB172	UDB180	UDB188
E	UDB101	UDB109	UDB117	UDB125	UDB133	UDB141	UDB149	UDB157	UDB165	UDB173	UDB181	UDB189
F	UDB102	UDB110	UDB118	UDB126	UDB134	UDB142	UDB150	UDB158	UDB166	UDB174	UDB182	UDB190
G	UDB103	UDB111	UDB119	UDB127	UDB135	UDB143	UDB151	UDB159	UDB167	UDB175	UDB183	UDB191
H	UDB104	UDB112	UDB120	UDB128	UDB136	UDB144	UDB152	UDB160	UDB168	UDB176	UDB184	UDB192

4.1.3 UDB PCR Primer Mix 混合指南

在 DNBSEQ、MGISEQ 测序仪平台测序时，推荐每 lane 的 barcode 保证碱基平衡。双端独立标签引物接头试剂盒 16 管式及 96 板式中是 **8 个为一组预设平衡碱基 Barcode 组合**。当样本数据量要求相同时，推荐按照下表混合规则进行双 Barcode 混合。

表 32 双Barcode 混合规则

混合数	使用方法
8X	使用 X 列 Barcode
8X+1	使用 X 列 Barcode+其他列任意 1 个 Barcode
8X+2	使用 X 列 Barcode+其他列任意 2 个 Barcode
8X+3	使用 X 列 Barcode+其他列任意 3 个 Barcode

混合数	使用方法
8X+4	使用 X 列 Barcode+其他列任意 4 个 Barcode
8X+5	使用 X 列 Barcode+其他列任意 5 个 Barcode
8X+6	使用 X 列 Barcode+其他列任意 6 个 Barcode
8X+7	使用 X 列 Barcode+其他列任意 7 个 Barcode

如遇到特殊情况（如 1 个孔位的试剂不足），以至于无法满足常规混合至少有 1 组 Barcode 组合的要求。或当样本数据量要求不不同时，则需要通过对每测序 cycle 下各碱基含量进行计算来确定混合方案。需遵循在一条 lane 中每个测序位置均保证单个碱基含量**不低于 12.5%，不高于 62.5%**。

表 33 成组的 8 个 Barcode（各碱基含量符合要求）


Sample1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	A
Sample2	C	T	G	A	A	C	C	G	A	A
Sample3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample6	C	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample7	T	T	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample8	G	G	A	T	G	C	T	A	C	C
各碱基占比 (%)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0

表 34 不成组的 9 个 Barcode（各碱基含量不符合要求）

Sample1	A	G	G	A	C	G	T	A	G	T
Sample2	A	C	G	A	A	G	G	T	C	C
Sample3	G	A	A	C	G	T	G	T	C	G
Sample4	T	C	C	G	T	G	A	C	T	C
Sample5	A	A	T	T	C	A	C	T	G	T
Sample6	G	C	T	G	A	A	G	G	A	T
Sample7	T	G	C	C	T	T	A	C	T	G
Sample8	G	G	A	T	G	A	T	A	C	C
Sample9	G	A	C	G	G	T	C	G	A	G
A碱基占比 (%)	33.3	33.3	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	22.2	22.2	0
T碱基占比 (%)	22.2	0	22.2	22.2	22.2	33.3	22.2	33.3	22.2	33.3
C碱基占比 (%)	0	33.3	33.3	22.2	22.2	0	22.2	22.2	33.3	33.3
G碱基占比 (%)	44.4	33.3	22.2	33.3	33.3	33.3	33.3	22.2	22.2	33.3

4.2 常规环化及DNB 制备（可选）

4.2.1 变性及单链环化

-  **提示**
- 操作前请仔细阅读，根据纯化后 PCR 产物的主带分布，样本浓度，参考公式 1（令 $N = 1.5$ ）计算所需纯化后 PCR 产物体积。
 - 如需将多个样本混合测序，建议参考第 23 页“UDB PCR Primer Mix 混合指南”，在 PCR 产物定量后进行不同 UDB 样本混合，混合后总量为 1.5 pmol，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。
 - 例如：构建插入片段主片段为 200 bp 的文库（双 barcode 接头为 132 bp，PCR 产物片段为 332 bp），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 41.1 ng 混合共 328.7 ng 至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μL 。

4.2.1.1 准备

样本：3.8.2 步骤 9 的文库

表 35 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	自备物料，室温暂存
Dual Barcode Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	瞬时离心，冰上暂存

4.2.1.2 变性

- 吸取 1.5 pmol PCR 纯化产物或 PCR 纯化后混合产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 **TE Buffer** 补足至总体积 48 μL 。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 36 变性反应条件（体系：48 μL ）

温度	时间
105 °C 热盖	On
95 °C	3 min

- 反应结束后，**立即**将 PCR 管置于冰上，静置 2 min，瞬时离心后置于冰上。

4.2.1.3 单链环化

- 根据反应数，按照下表在冰上配制单链环化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。


表 37 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Dual Barcode Splint Buffer	11.5 μ L
DNA Rapid Ligase	0.5 μ L
Total	12.0 μ L

2. 吸取 **12.0 μ L 单链环化反应液**至各样本管中，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 38 单链环化反应条件（体系：60.0 μ L）

温度	时间
42 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	10 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

 提示 可在此步提前配制酶切消化反应液。见第 26 页“酶切消化”

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心并置于冰上，**立即**进入下步反应。

4.2.2 酶切消化

4.2.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 39 试剂准备

试剂名称	要求
Digestion Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Digestion Enzyme	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Digestion Stop Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存

4.2.2.2 酶切消化

1. 根据反应数，在冰上配制酶切消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 40 酶切消化反应液的配制


组分	单个反应体积
Digestion Buffer	1.4 μ L
Digestion Enzyme	2.6 μ L
Total	4.0 μ L

2. 吸取 **4 μ L 酶切消化反应液**至单链环化反应后的样本管中，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。


表 41 酶切消化反应条件（体系：64.0 μ L）

温度	时间
45 °C热盖	On
37 °C	10 min
4 °C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，立即加入 **7.5 μ L Digestion Stop Buffer**，涡旋混匀 3 次，每次 3 s。瞬时离心后吸取全部液体至新的 1.5 mL 离心管。

 **注意** 不建议在此处停止，请继续完成酶切消化产物纯化。如果必须停止，请放置于 -20°C 冰箱，不超过 16 h。（但产量可能会下降20%左右。）

4.2.3 消化产物纯化

 **提示** 添加试剂、吸弃上清过程中请勿用吸头触碰、吸取磁珠。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。

4.2.3.1 准备

表 42 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，新鲜配制
TE Buffer	室温暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

4.2.3.2 消化产物纯化

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 **170 μ L DNA Clean Beads** 至各 1.5 mL 样本管中（4.2.2.2 节步骤 4），用移液器轻轻吹打至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入管中。或涡旋混匀。
2. 室温孵育 10 min。
3. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持离心管固定于磁力架上，加入 **500 μ L 80% 乙醇**漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。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，用小量程移液器将管底液体吸干。

6. 保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。磁珠过分干燥（开裂）将降低纯化得率。
 7. 将离心管从磁力架上取下，加入 **22 μL TE Buffer** 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 **10** 次至所有磁珠悬浮。或涡旋混匀。
 8. 室温孵育 **10 min**。
 9. 将离心管瞬时离心，再置于磁力架上静置 **2~5 min** 至液体澄清，小心吸取 **20 μL** 上清液至新的 **1.5 mL** 离心管。
- II** 停止点 酶切消化产物纯化后产物可置 **-20 $^{\circ}\text{C}$** 冰箱储存。

4.2.4 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。

单链环状 DNA 产物纯化后产量应达到 **120 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 M pmol 单链环对应的质量 (ng)


$$M \text{ pmol 单链环对应的质量 (ng)} = M \times \frac{\text{PCR 产物主带大小 (bp)}}{1000 \text{ bp}} \times 330 \text{ ng}$$

 **提示** 计算 120 fmol 对应片段大小单链环产物质量时，令公式 2 中的 **M=0.12**。

4.2.5 常规 DNB 制备

参照《MGISEQ-200RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书》、《MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书》或《DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装使用说明书》制备 DNB，取 **60 fmol**（对应质量参考公式 2 计算，令 **N=0.06**）单链环状 DNA 产物制备成适用于 MGI 基因测序仪的 DNB 文库。

如需将不同单链环状 DNA 文库混合测序，需按摩尔数比进行混合。不同样本单链环的摩尔数比取决于客户预期得到的不同样本的数据量比。但注意，混合样本对应的 UDB 需符合第 23 页“UDB PCR Primer Mix 混合指南”。

-  **提示**
- 因插入片段的大小和集中度会影响测序质量，故不同插入片段的文库混合测序及不同磁珠纯化方法文库混合测序（如：采用磁珠单选纯化法的文库与采用磁珠双选去除小片段的文库混合上机）时，测序质量及有效数据量会有降低的风险。
 - 若必须要混合测序时，只推荐采用插入片段的大小和集中度相似的文库混合测序。

4.3 一步法 DNB 制备（可选）

由 MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装所构建好的 dsDNA 文库，可搭配 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 V2.0（OS-DB，货号：940-000036-00），进行快速 DNB 制备。

 提示 文库混合注意事项

- 相同样本类型、相同建库起始量的文库进行混合时，按所需测序数据量比例取相应质量的水库进行混合。
- 不同样本类型或不同建库起始量的文库进行混合时，易造成 Barcode 拆分均一性差，无法达到预期的测序数据量比例。如需混合，可在制备 DNB 之后，按照数据量需求取相应质量 DNB 进行混合。

4.3.1 准备

样本：3.8.2 步骤 9 的水库，计算制备 DNB 所需 dsDNA 文库的体积，置于冰上备用。

试剂：下列试剂用前充分混匀，使用后尽快放回冰箱储存。

表 43 试剂准备

试剂名称	要求
分子级水	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存
DNB 制备缓冲液 (OS-V2.0-DB)	
DNB 聚合酶混合液 I (OS-V2.0)	冰上解冻，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	
DNB 终止缓冲液	室温解冻，涡旋混匀，离心，冰上暂存

4.3.2 一步法 DNB 制备

1. 根据 3.8.2 节步骤 9 PCR 产物文库浓度，取 100 fmol 文库（**根据公式 1 计算所对应的质量，令 N = 0.1**）至新的 0.2 mL PCR 管。按下表配制 DNB 反应体系 1，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 44 DNB 反应体系 1

组分	单个反应体积
dsDNA 文库	V μ L
分子级水	20 - V μ L
DNB 制备缓冲液	20 μ L
Total	40 μ L

2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 45 DNB 反应条件 1 (体系: 40 μL)

温度	时间
105 °C 热盖	On
95 °C	3 min
57 °C	3 min
4 °C	Hold

3. 根据所需反应数, 在冰上配制 DNB 反应体系 2, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。

表 46 DNB 反应体系 2 的配制


组分	单个反应体积
DNB 聚合酶混合液 I (OS-V2.0)	40 μL
DNB 聚合酶混合液 II (OS)	4 μL
Total	44 μL

4. 吸取 44 μL DNB 反应体系 2 至样本管中 (步骤 2, 体积 40 μL), 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 按下表的条件进行反应。

表 47 DNB 反应条件 2 (体系: 84 μL)


温度	时间
35 °C 热盖	On
30 °C	25 min
4 °C	Hold

-  提示
- 部分品牌 PCR 仪的热盖升降温速度慢, 在热盖升降温过程中, 加热模块处于室温状态, 且程序未运行。对于这种类型的 PCR 仪, 需提前进行热盖预热, 确保在进行 DNB 反应时热盖处于工作温度。
 - 热盖温度建议设置为 35 °C, 或尽可能设置成接近 35 °C 的最低温度。如果由于仪器原因无法降温, 也可保持 105 °C。

6. 立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液, 用阔口吸头缓慢地吹打混匀 5 ~ 8 次, 切勿震荡及剧烈吹打, 可置于 4 °C 保存备用 (48 小时内使用)。

 注意 DNB 一定要用阔口吸头缓慢吹打混匀, 切勿离心、震荡及剧烈吹打。

7. DNB 制备完成后, 用 ssDNA Assay Kit 进行浓度检测。DNB 浓度 $\geq 8\text{ng}/\mu\text{L}$ 为合格, 可进行后续上机。

 注意 因 DNB 较粘稠, 建议取 2 μL 进行检测, 如样品数量多时, 建议分批定量, 避免荧光猝灭导致 DNB 浓度定量不准确。

4.4 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。

4.4.1 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 DV₂₀₀，DV₂₀₀ 表示样本中大于 200 nt 的 RNA 片段所占的比例，对于降解严重的 FFPE 样本，DV₂₀₀ 值能够更好的反映样本的质量。

DV₂₀₀的计算方法：

以 Agilent 2100 Bioanalyzer 的分析结果为例，进行 DV₂₀₀ 的计算，具体计算方法如下图所示：

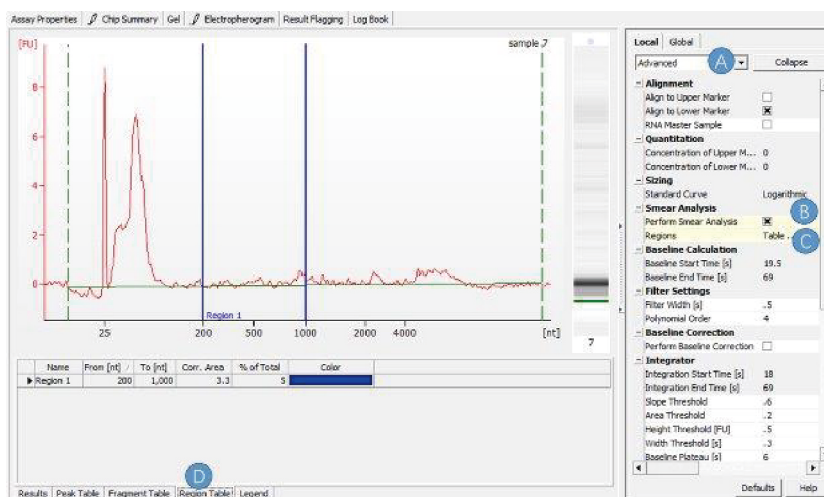


图 2 DV₂₀₀ 的计算方法

- 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 DV₂₀₀ 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>)。

4.4.2 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”步骤需注意不同的样本使用不同的片段化条件。
- 在“接头连接”步骤注意 Adapter 的稀释倍数和用量。
- 在“PCR”步骤注意对应不同的 PCR cycles，具体见下表。

表 48 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	PCR cycles
>70%	200 ng	94°C, 5 min	15
50-70%	200~400 ng	94°C, 4 min	16
30-50%	500 ng	不片段化	16
<30%	0.5-1 µg 风险建库	不片段化	16

表 49 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	MGI Adapter稀释后投入量 (µL)
>70%	200 ng	10	5
50-70%	200-400 ng	10	5
30-50%	500 ng	20	5
<30%	0.5-1 µg 风险建库	50	5

4.4.3 FFPE样本文库构建流程

4.4.3.1 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。

4.4.3.2 RNA片段化

- 需要进行片段化的样本，参考表 FFPE 样本建库的推荐条件，不同降解程度的样本使用不同的片段化条件。参考 3.2 节 RNA 片段化操作第 11 页“RNA片段化”。
- 对于不需要进行片段化的样本：
 - 1) 根据反应数，吸取 5 (n+1) µL Fragmentation Buffer 至新的 0.2 mL PCR 管中。
 - 2) 将富集后的样本和装有 Fragmentation Buffer 的 PCR 管进行 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。
 - 3) 吸取 5 µL Fragmentation Buffer 至各样本管中，吹打 10 次混匀，瞬时离心后立即进入下一步反应。

4.4.3.3 反转录

同 3.3 节。

4.4.3.4 二链合成及末端修复

同 3.4 节。

4.4.3.5 接头连接

参考 3.5 节。参考第 31 页“关于低质量 FFPE 样本的建库说明”表不同的 FFPE 样本选择不同的 Adapter 稀释倍数和使用量。

4.4.3.6 连接产物纯化

参考 3.6 节 200 bp 片段纯化条件。

4.4.3.7 PCR

参考 3.7 节。参考第 31 页“关于低质量 FFPE 样本的建库说明”表 FFPE 样本建库的推荐条件，不同的 FFPE 样本选择不同的 PCR cycles。

4.4.3.8 PCR产物纯化及质检

同 3.8~3.9 节。

4.5 RNA 病原检测样本的建库说明

4.5.1 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。

4.5.2 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 去除试剂盒进行去 rRNA 处理，推荐 total RNA 起始量为 200 ng。

4.5.3 RNA病原微生物样本文库构建流程

4.5.3.1 RNA富集

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

4.5.3.2 RNA片段化

参考 3.2 节操作。选择插入片段 200 bp 条件，即 94 °C 孵育 6 min 将样本 RNA 片段化。

4.5.3.3 反转录~连接产物纯化

同 3.3~3.6 节。

连接产物纯化选择 200 bp 片段纯化条件。

4.5.3.4 PCR

参考 3.7 节。去 rRNA 样本 PCR 扩增 15 个循环。

4.5.3.5 PCR产物纯化

同 3.8 节。

4.5.3.6 PCR产物质检

文库质检标准见下表，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 50 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	≥ 420 ng
PCR产物片段大小	Agilent 2100普通芯片检测	主带 280-370 bp, 条带分布 200-700 bp
接头剩余量	Agilent 2100普通芯片检测	130 bp 左右无明显接头峰

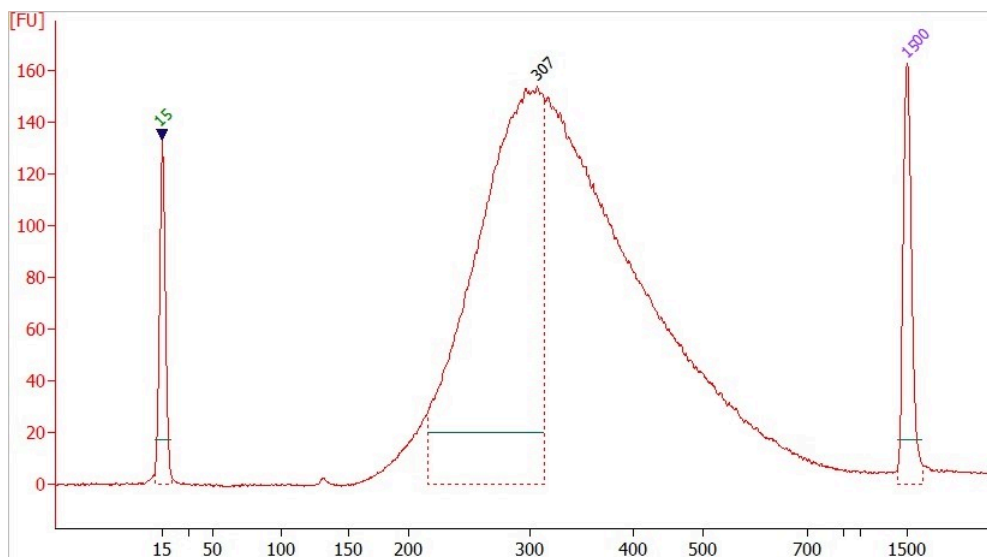


图 3 PCR纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

--- 此页有意留白 ---