

使用说明书

版本: 1.0

MGIEasy rRNA 去除试剂盒

货号: 940-001751-00 (16 RXN)
940-001752-00 (96 RXN)
试剂盒版本号: V1.3

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。

Agilent®, Agilent Technologies™, Ambion®, Axygen®, Beckman Coulter™, Bio-Rad™, DynaMag™, Invitrogen®, NEB™, Qubit®, Thermo Fisher®, 以及文中涉及的其它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
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	试剂盒版本	日期	修订内容摘要
1.0	V1.3	2023 年 11 月	- 更新试剂盒版本 - 更新联系电话 - 更新说明书风格、文档编码及版本
A6	V1.2	2022 年 3 月	更新公司LOGO
A5	V1.2	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A4	V1.2	2020 年 7 月	- 变更试剂盒组分装量 - 变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司” - 更新说明书风格
A3	V1.1	2019 年 10 月	- 产品描述中去除的 rRNA 类型增加了16 S rRNA - RNA 纯度要求中增加 OD_{260/230} 的要求 - 表 FFPE 样本建库的推荐条件中增加了RNA纯化磁珠的使用量
A2	V1.1	2018 年 10 月	- 修改样品起始量，对于常规样本（RIN≥7）最低可 10 ng 起始；total RNA 样本质量要求中增加了 RIN 值为 N/A 的说明 - 去掉测序平台限制 - 增加了产物质控步骤 - 增加了附录，附录中增加 total RNA 样本的 DNase I 的消化反应条件、FFPE 样本的适用条件、DV₂₀₀的计算方法以及磁珠的使用注意事项 - 变更货号以及效期表述修改
A1	V1.1	2017 年 12 月	- 修改步骤2.2中的反应体系，由 5 μL 修改为 25 μL - 修改步骤2.2中的 Probe Mix 用量，由 1 μL 修改为 2 μL - 修改步骤4.2中的反应体系，由 40 μL 修改为 50 μL - 修改步骤5.2中的磁珠用量，由 60 μL 修改为75 μL
A0	V1.0	2017 年 6 月	首次发布

 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	组分	1
1.4	储存与运输	2
1.5	自备物料清单	2
1.6	注意事项	3
1.7	流程	4
2	样本要求及处理	5
2.1	样本类型及投入量	5
2.2	Total RNA 样本质量要求	5
3	文库构建标准流程	6
3.1	探针杂交	6
3.2	RNase H 消化	7
3.3	DNase I 消化	8
3.4	RNA 的纯化	9
3.5	产物质检	10
4	附录	12
4.1	关于 RNA 样本的 DNase I 消化	12
4.2	关于 FFPE 样本	14

--- 此页有意留白 ---

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy rRNA 去除试剂盒适用于 10 ng ~ 1μg 的人、小鼠及大鼠 total RNA 样品中 rRNA（包括细胞质 5 S rRNA、5.8 S rRNA、18 S rRNA、28 S rRNA，线粒体 12 S rRNA，16 S rRNA，前体 45 S rRNA）的去除，保留 mRNA 以及其它的非编码 RNA，用于后续分析。本试剂盒适用于完整的和部分降解的 total RNA 样品（例如 FFPE RNA），可与 MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂盒搭配使用，用于 RNA 定量、转录组或非编码 RNA 等相关领域的研究。

1.2 适用范围

本试剂盒适用于人、小鼠及大鼠的 total RNA 样本。

1.3 组分

本试剂盒有 2 个规格，分别是 16 RXN 及 96 RXN。货号、组分信息见下表。
试剂盒装中包含信息卡片，客户可通过卡片信息登录 MGI 官网，下载相应说明书及 SDS 文件。

表 1 MGIEasy rRNA 去除试剂盒 (16 RXN) (货号：940-001751-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy rRNA 去除试剂盒 货号: 940-001751-00 规格: 16 RXN	rRNA Probe Mix	 白色	32 μL/支 × 1
	Hybridization Buffer	 白色	80 μL/支 × 1
	RNase H Buffer	 橙色	48 μL/支 × 1
	RNase H	 橙色	32 μL/支 × 1
	DNase I Buffer	 蓝色	280 μL/支 × 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	DNase I	 蓝色	40 µL/支 × 1

表 2 MGIEasy rRNA 去除试剂盒 (96 RXN) (货号: 940-001752-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy rRNA 去除试剂盒 货号: 940-001752-00 规格: 96 RXN	rRNA Probe Mix	 白色	192 µL/支 × 1
	Hybridization Buffer	 白色	480 µL/支 × 1
	RNase H Buffer	 橙色	288 µL/支 × 1
	RNase H	 橙色	192 µL/支 × 1
	DNase I Buffer	 蓝色	840 µL/支 × 2
	DNase I	 蓝色	240 µL/支 × 1

1.4 储存与运输

MGIEasy rRNA 去除试剂盒

- 储存温度: -25 °C~ -15 °C
- 运输温度: -80 °C~ -15 °C
- 有效期: 见试剂盒标签



提示

- 若使用干冰进行运输, 请在收到货物后检查是否有剩余的干冰。
- 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。

1.5 自备物料清单

实验开始前, 需自备的物料清单如下列表格所示。其中, “可选” 物料是根据具体的实验操作而定, 若 RNA 样本需要进行 DNA 污染的消化, 且消化后需要定量, 则需要自备“Qubit 3.0 荧光定量仪”及对应试剂和试管; 若去除核糖体之后的 RNA 样本需要进行条带分布检测, 则需要自备“Agilent 2100 Bioanalyzer”及对应试剂。

表 3 MGI 产品订购信息

货号	规格	名称
940-000890-00	16 RXN	MGIEasy Fast RNA 建库试剂套装
940-000889-00	96 RXN	MGIEasy Fast RNA 建库试剂套装

货号	规格	名称
940-000961-00	192 RXN	MGIEasy Fast RNA 建库试剂套装

表 4 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	Bio-Rad, 或可梯度降温功能仪器
96 孔板磁力架	ALPAQUA, Part#A00400
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D
Qubit 3.0 荧光定量仪 (可选)	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyze (可选)	Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA 或同等功能仪器

表 5 试剂耗材清单

名称	推荐品牌
Nuclease free water (NF water)	Ambion, Cat. No. AM9937或 Transgen, Cat. No. GI101-03
RNase Zap	Ambion, Cat. No. AM9780
Agencourt RNA Clean XP 40 mL Kit	Agencourt, Cat. No. A63987 或同功能 RNA 纯化磁珠
无水乙醇 (分析纯)	/
DNase I (可选)	NEB, Cat. No. M0303S
Qubit RNA HS Assay Kit (可选)	Invitrogen, Cat. No. Q32852
Agilent RNA 6000 Pico Kit (可选)	Agilent, Cat. No. 5067-1513
无 RNA 酶的移液器吸头	/
1.5 mL无核酸酶不粘管	Ambion, Cat. No. AM12450
0.2 mL PCR 管	Axygen, Cat. No. PCR-02-C 或无核酸酶同款耗材
96 孔板	Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C 或无核酸酶同款耗材
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管 (可选)	Invitrogen, Cat. No. Q32856 或 Axxygen, Cat. No. PCR-05-C

1.6 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。
- RNA 操作前需戴好口罩手套，用 RNase Zap 杂交液喷洒并擦拭移液器、试管架及桌面。
- 使用 RNase-Free 的吸头，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。
- 本实验过程中会涉及到梯度降温的步骤，需使用带梯度降温功能的PCR 仪。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℃。
- 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

1.7 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	探针杂交	30 min	5 ~ 8 min
3.2	RNase H 消化	35 ~ 40 min	5 min
3.3	DNase I 消化	35 ~ 40 min	5 min
3.4	RNA 的纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.5	产物质检 	15 ~ 60 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 样本类型及投入量

本试剂盒适用于人、小鼠及大鼠的 total RNA 样本进行核糖体 RNA 的去除，同样适用于 FFPE 等低质量的样本（第 14 页“关于 FFPE 样本”）。

- 对于 RIN 值（RNA Integrity Number） ≥ 7 的样本，推荐的 input RNA 量为 10 ng - 1 μ g 的 total RNA，样本总投入体积 ≤ 18 μ L。
- 对于低质量的 RNA 样本（RIN < 7 ），建议投入量不低于 200 ng。

2.2 Total RNA 样本质量要求

- 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对提取的 total RNA 样本进行质控，要求 RIN 值 ≥ 7 。若 RIN < 7 ，总投入量建议不超过 1 μ g。在后续二代测序文库构建时，可适当增加投入量并提高 PCR cycles。若 RIN 为 N/A，则不建议使用此类样本进行文库构建。
- RNA 纯度：OD_{260/280} = 1.8 ~ 2.0，OD_{260/230} ≥ 2 。OD_{260/230} < 2 时会显著影响 rRNA 去除效果。若 OD_{260/230} < 2 ，建议使用 RNA 纯化磁珠先对 total RNA 样本进行纯化后再进行后续实验，具体操作可参考第 9 页“RNA 的纯化”。
- 需保证 RNA 样本无基因组 DNA 污染，否则会影响 rRNA 的去除效果。若有污染（可用琼脂糖凝胶电泳检测），需先用 DNase I 进行消化，具体操作参见第 12 页“关于 RNA 样本的 DNase I 消化”。
- 若样本量不足，可尝试使用较低的投入量，可能会导致后续二代测序文库构建时的 PCR 产量较低、分析结果中比对率较低等结果。

3 文库构建标准流程

3.1 探针杂交

本标准实验流程 input RNA 来源: 200 ng total RNA (UHRR, Universal Human Reference RNA), RIN值 ≥ 7 。

 提示 以下操作步骤中, 样品切忌涡旋混匀, 用吸头混匀即可。

3.1.1 准备

试剂: 试剂用前混匀, 使用后请尽快放回冰箱储存。

表 6 试剂准备

试剂名称	要求
NF water	自备物料, 室温
rRNA Probe Mix	室温解冻, 涡旋混匀、离心, 冰上暂存
Hybridization Buffer	

3.1.2 探针杂交

1. 根据 total RNA 浓度, 取适量样本 (推荐 200 ng) 至新的 0.2 mL PCR 管中, 用 **NF water** 补足至总体积 18 μL 。
2. 分别吸取 rRNA Probe Mix 和 Hybridization Buffer 至各样本管中。

 提示 rRNA Probe Mix 和 Hybridization Buffer 需要分开加到 RNA 样品中, 避免将二者配成混合液之后使用。

表 7 杂交反应体系

组分	体积
Total RNA + NF water	18 μL
Hybridization Buffer	5 μL
rRNA Probe Mix	2 μL
Total	25 μL

3. 移液器吹打 15-20 次混匀，瞬时离心使液体收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

 注意 移液器吹打后，请确保枪头无残留；请确定吹打次数足够，以保证杂交反应体系混合均匀，否则可能会影响最终去除效率。

表 8 杂交反应条件（体系：25 μL）

温度	时间
105 °C 热盖	On
95 °C	2 min
95 °C ~ 22 °C	0.1 °C/s
22 °C	5 min

4. 约 20 min 可以完成反应。反应结束后，立即将 PCR 管置于冰上静置 2 min，瞬时离心使反应液收集至管底。

3.2 RNase H 消化

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 9 试剂准备

试剂名称	要求
RNase H	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
RNase H Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存

3.2.2 RNase H 消化

1. 根据所需反应数，在冰上配制 RNase H 消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 10 RNase H 消化反应液

组分	单个反应体积
RNase H	2 μ L
RNase H Buffer	3 μ L
Total	5 μ L

2. 吸取 5 μ L RNase H 消化反应液至各样本管中（3.1.2 节步骤 4）。移液器吹打 15-20 次混匀，瞬时离心后置于冰上。

 注意 移液器吹打后，请确保枪头无残留；请确定吹打次数足够，以保证 RNase H 消化体系混合均匀，否则可能会影响最终去除效率。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 11 RNase H 消化反应条件（体系：30 μ L）

温度	时间
45 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使反应液收集至管底。

3.3 DNase I 消化

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.3.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 12 试剂准备

试剂名称	要求
DNase I	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNase I Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存

3.3.2 DNase I 消化

1. 根据所需反应数，在冰上配制 DNase I 消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 13 DNase I 消化反应液

组分	单个反应体积
DNase I	2.5 μL
DNase I Buffer	17.5 μL
Total	20 μL

2. 吸取 **20 μL DNase I 消化反应液**至各样本管 (3.2.2 节步骤 4)。**移液器吹打 15-20 次**混匀，瞬时离心后置于冰上。

 **注意** 移液器吹打后，请确保枪头无残留；请确定吹打次数足够，以保证 DNase I 消化体系混合均匀，否则可能会影响最终去除效率。

 **提示** 混匀过程中如出现气泡，为正常现象，可以瞬时离心后轻弹去除气泡。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 14 DNase I 消化反应条件（体系：50 μL）

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	30 min
4 °C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使反应液收集至管底。

3.4 RNA 的纯化

 **提示**

- 添加试剂、吸弃上清过程中请勿触碰、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。
- 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

试剂：自备 Agencourt RNA Clean XP 40 mL Kit

表 15 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料， NF water 新鲜配制

试剂名称	要求
NF water	室温暂存
RNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀

3.4.2 RNA 的纯化

 提示 RNA纯化应采用**无 RNA 酶** 1.5 mL 不粘管。

1. 涡旋混匀 RNA Clean Beads，吸取 **75 μ L RNA Clean Beads** 至1.5 mL 不粘管样本管中。
2. 将所有样本（3.3.2 节步骤 4）分别转移至已分装好的 RNA Clean Beads 中，用移液器**轻轻吹打**至少 15-20 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。
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。
5. 保持样本管固定于磁力架上，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。
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。

 提示 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，加入适量 **NF water** 进行 DNA 洗脱，用移液器**轻轻吹打**至少 10 次至所有磁珠悬浮。

 提示 从磁珠上洗脱 RNA 样品时，需根据后续操作要求取适量体积的 **NF water** 进行洗脱。例如，后续使用“MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装”进行二代测序文库构建，则加入 **12 μ L NF water** 洗脱，洗脱后吸取 10 μ L 上清进行后续的 RNA 片段化反应。

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，小心吸取上清液至新的无核酸酶 0.2 mL PCR 管。

 停止点 产物纯化后可置冰上继续进行二代测序文库构建或其他分析反应。也可置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存不超过 16 h；-80 $^{\circ}$ C 冰箱储存不超过 1 周。建议立即进行后续反应。

3.5 产物质检

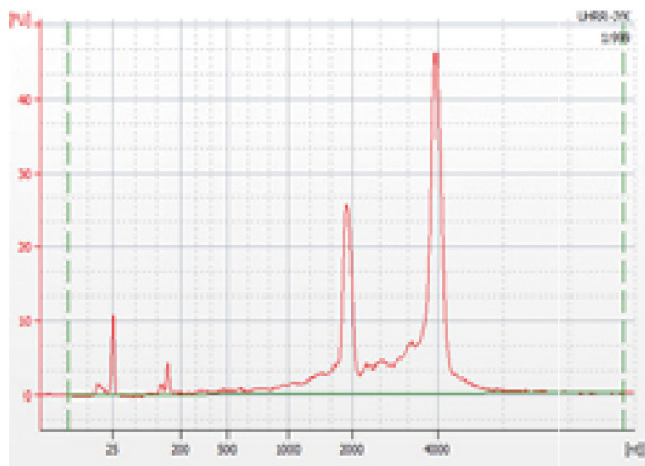
 提示 此步质控为可选操作，若去除后的 RNA 产物直接用于二代测序的文库构建，建议免去此步中间质控环节。

去除核糖体RNA的样本经纯化后，用如下方法进行质控检测：

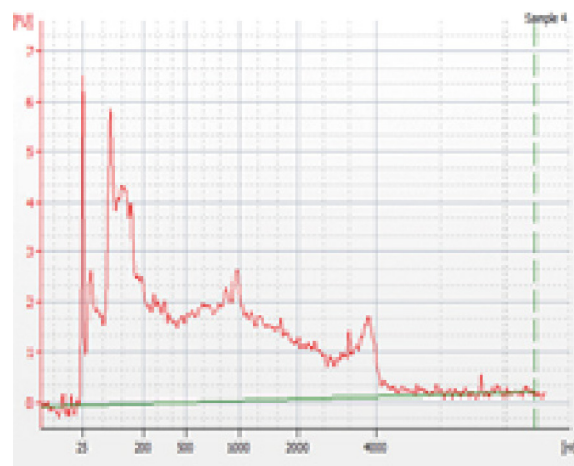
- 取 1 μ L 纯化后的样本，采用 Agilent RNA 6000 Pico 芯片（需自备，见第 2 页“自备物料清单”，具体操作步骤见该产品的操作说明），用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。如图 1 A，在未去除核糖

体 RNA 的 total RNA 样本 2100 图中，有明显的 18 S 和 28 S 峰；如图 1 B，在去除核糖体 RNA 后的 RNA 样本 2100 图中，18 S 和 28 S 峰消失，去除效果较好。

 提示 Agilent RNA Nano 芯片达不到检测的灵敏度要求。



A



B

图 1 RNA 样本使用 Agilent RNA 6000 Pico 芯片检测结果

A. 标准品UHRR total RNA的检测结果

B. 经“MGIEasy rRNA去除试剂盒”去除核糖体RNA之后的UHRR样本检测结果

4 附录

4.1 关于 RNA 样本的 DNase I 消化

若 RNA 样本中有基因组 DNA 污染，可先用 DNase I（需自备，见第 2 页“自备物料清单”）对样本进行消化。

因 DNase I 消化的操作会造成一定的 RNA 样本损失，建议该步骤 total RNA 投入量要比预期投入量（本试剂盒所需的 RNA 投入量）适当增加 20%~30%。

例如，若需要投入 200 ng total RNA 样本进行核糖体 RNA 的去除，那么在此步的 DNase I 消化时，需要投入 250 ~286 ng total RNA 样本进行消化，具体消化步骤如下。

4.1.1 受污染 RNA 样本消化

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

4.1.1.1 准备

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
NF water	自备物料，常温
DNase I	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNase I Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存

4.1.1.2 操作

1. 取适量的 RNA 样本至新的无核酸酶 0.2 mL PCR 管中，用 **NF water** 补足至总体积 42.5 μL 。
2. 用 NF water 将 DNase I Buffer 稀释 10 倍（满足每反应 5 μL ）。
3. 根据所需反应数，在冰上配制 DNase I 消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 17 消化反应体系

组分	体积
DNase I	2.5 μL
10 × DNase I Buffer	5 μL
Total	7.5 μL

4. 吸取 **7.5 μL 消化反应液**至各样本管中（步骤 1）。移液器吹打 10 次混匀，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 18 消化反应条件（体系：50 μL）

温度	时间
45 °C 热盖	On
37 °C	20 min
4 °C	Hold

6. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底。

4.1.2 样本纯化

- 提示
- 添加试剂、吸弃上清过程中请勿触碰、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。
 - 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

4.1.2.1 准备

试剂：自备 Agencourt RNAClean XP 40 mL Kit

表 19 试剂准备

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

4.1.2.2 操作

- 提示
- 若使用 1.5 mL 不粘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 **无 RNA 酶** 1.5 mL 不粘管。
1. 混匀 RNA Clean Beads，吸取 **90 μL RNA Clean Beads** 至样本管中（4.1.1.2 节步骤 6），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。
 2. 室温孵育 5 min。

3. 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。
4. 保持样本管固定于磁力架上，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。
6. 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。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。
7. 将样本管从磁力架上取下，加入适量 **NF water** 进行 DNA 洗脱，用**移液器轻轻吹打**至少 10 次至所有磁珠悬浮。

 提示
 - 若纯化后的样本需定量，洗脱时加入 21 μ L NF water，洗脱后转移 19 μ L 上清液到新的无核酸酶的 PCR 管中，取 1 μ L 产物用“Qubit RNA HS Assay Kit”（见“客户自备物料清单”）进行定量。
 - 若纯化后的产物不定量，洗脱时加入 20 μ L NF water，洗脱后转移 18 μ L 上清液到新的无核酸酶的 PCR 管中进行后续的“探针杂交”反应。
8. 室温孵育 5 min。
9. 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，小心吸取上清液至新的无核酸酶 0.2 mL PCR 管。进入下一步反应 第 6 页“探针杂交”。

4.2 关于 FFPE 样本

本操作流程适用于 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，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。现以本试剂盒搭配使用“MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒”进行二代测序文库构建为例，列举不同质量的 FFPE 样本在二代测序文库构建中需要注意的问题。

4.2.1 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 DV_{200} ， DV_{200} 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， DV_{200} 值能够更好的反映样本的质量。

● DV_{200} 的计算方法

以 Agilent 2100 Bioanalyzer 的分析结果为例，进行 DV_{200} 的计算，具体计算方法如下图所示：

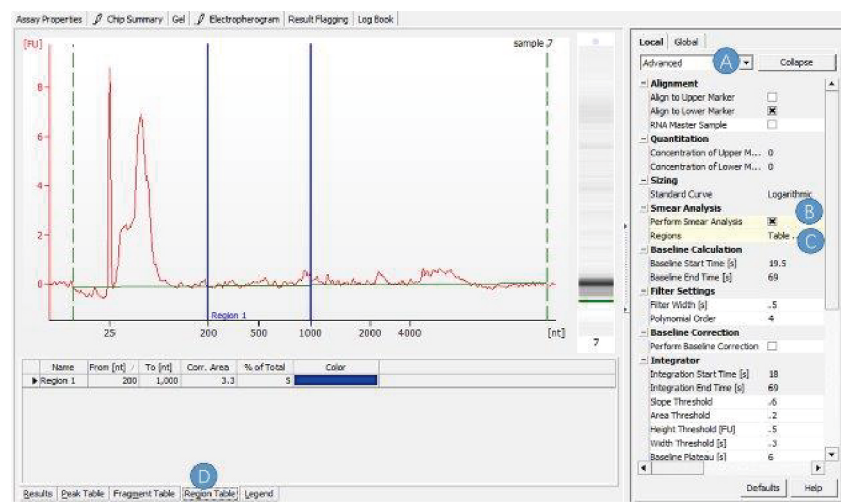


图 2 DV₂₀₀ 的计算方法

- A. 在一个检测完成的 Agilent 2100 Bioanalyzer 结果图中，在 *Local* 下选择 *Advanced*。
- B. 勾选 *Smear Analysis* 下的 *Perform Smear Analysis* 选项。
- C. 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。
- D. 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>）。

4.2.2 FFPE RNA样本的推荐使用量

对于 FFPE 样本，在进行核糖体去除时建议根据不同 DV₂₀₀ 的样本使用不同的 total RNA 投入量。另外，去除核糖体 RNA 之后的样本，若需要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“PCR”步骤注意对应不同的 PCR cycles，具体见下表。

表 20 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	RNA纯化磁珠用量	PCR cycles
> 70%	200 ng	94℃, 5 min	75 μL 磁珠纯化	15
50-70%	200 ~ 400 ng	94℃, 4 min	100 μL 磁珠纯化	16
30-50%	500 ng	不片段化	100 μL 磁珠纯化	16
< 30%	0.5-1 μg 风险建库	不片段化	100 μL 磁珠纯化	16

注：a. 上表中的“RNA 片段化”是指“MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒”中“RNA片段化”步骤中的打断条件；

b. 上表中的“PCR cycles”是指“MGIEasy Fast RNA文库制备试剂盒”中“PCR”步骤中的 PCR cycles。



提示 来源于不同组织的 **FFPE** 样本可能会有不同的表现，此表仅作为参考，具体文库构建策略可视样本情况进行调整。