

使用说明书

版本: 6.0

MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装

货号: 1000006385 (16 RXN)
1000006386 (96 RXN)
套装版本号: V2.1

关于说明书

©2024 深圳华大智造生物电子科技有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造生物电子科技有限公司（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®、Ambion®、Axygen®、Invitrogen®、Qubit®、PerkinElmer®、Advanced Analytical®、Thermo Fisher®，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	深圳华大智造生物电子科技有限公司
生产地址	深圳市盐田区盐田街道沿港社区北山道 146 号北山工业区 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	套装版本	日期	修订内容摘要
6.0	V2.1	2024 年 3 月	<ul style="list-style-type: none">变更制造商信息更新说明书风格
5.0	V2.1	2022 年 3 月	更新公司 LOGO
A3	V2.1	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A2	V2.1	2020 年 7 月	<ul style="list-style-type: none">试剂盒装量适配 MGISP-100 和 MGISP-960 自动化建库需求修改了 3.10 和 4.1 中关于样本混合的描述公司名称变更为深圳华大智造科技股份有限公司更换说明书新风格
A1	V2.0	2019 年 9 月	2.2 样本纯度要求增加 OD _{260/230}
A0	V2.0	2018 年 11 月	发布 V2.0 版试剂套装

 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 适配测序平台	1
1.4 组分	1
1.5 储存与运输	4
1.6 自备物料清单	4
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	12
3.3 反转录及二链合成	12
3.4 二链产物纯化	14
3.5 末端修复	15
3.6 接头连接	16
3.7 连接产物纯化	18
3.8 PCR	20
3.9 PCR产物纯化	21
3.10 PCR产物质检	22

4 环化消化	24
4.1 变性、单链环化	24
4.2 酶切消化	25
4.3 消化产物纯化	27
4.4 消化产物质检	28

5 附录	29
5.1 关于 Adapter 使用	29
5.2 关于低质量 FFPE 样本的建库说明	34

5.3 RNA 病原检测样本的建库说明

37

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy RNA 方向性文库制备试剂套装是为华大智造 (MGI) 高通量测序平台量身打造的 RNA 文库构建试剂盒。使用本试剂套装可以将 10 ng - 1 µg 真核 total RNA 制备成适用于 MGI 高通量测序平台的单链环状 DNA 文库。本试剂套装相比 MGIEasy RNA 文库制备试剂盒能更准确地得知转录本从 DNA 转录的方向, 并且可搭配 rRNA 去除试剂盒进行非编码 RNA 的分析。试剂套装中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。

1.2 适用范围

本试剂套装适用于所有常见的动物、植物、微生物等物种, 包括人、鼠、水稻、拟南芥、酵母、细菌等, 不同物种均有稳定的表现。

1.3 适配测序平台

构建的文库可用于以下平台及测序类型:

- BGISEQ-500 (PE50/PE100)
- MGISEQ-2000 (PE100/PE150)

不同 RNA 插入片段大小推荐的测序类型:





















- 150 bp: PE50, PE100
- 250 bp: PE100, PE150

1.4 组分

MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装有 2 个规格, 分别是 16 RXN 和 96 RXN。每个试剂套装包含 4 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 SDS 文件。

表 1 MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装 (16 RXN) (货号: 1000006385)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy RNA方向性文库制备试剂盒 货号: 1000005270	Fragmentation Buffer	 绿色	93 μ L/支 \times 1
	Directional RT Buffer 1	 绿色	88 μ L/支 \times 1
	Directional RT Buffer 2	 棕色	5 μ L/支 \times 1
	RT Enzyme Mix	 绿色	24 μ L/支 \times 1
	Directional Second Strand Buffer	 黄色	470 μ L/支 \times 1
	Second Strand Enzyme Mix	 黄色	78 μ L/支 \times 1
	ERAT Buffer	 橙色	132 μ L/支 \times 1
	ERAT Enzyme Mix	 橙色	55 μ L/支 \times 1
	Ligation Buffer	 红色	450 μ L/支 \times 1
	DNA Ligase	 红色	34 μ L/支 \times 1
	PCR Enzyme Mix	 蓝色	470 μ L/支 \times 1
	PCR Primer Mix	 蓝色	90 μ L/支 \times 1
UDG	 蓝色	21 μ L/支 \times 1	
MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒 货号: 1000005284	DNA Adapters	 白色	10 μ L/支 \times 16
MGIEasy DNA纯化磁珠 货号: 1000005278	DNA Clean Beads	 白色	8 mL/支 \times 1
	TE Buffer	 白色	4 mL/支 \times 1
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260	Splint Buffer	 紫色	186 μ L/支 \times 1
	DNA Rapid Ligase	 紫色	8 μ L/支 \times 1
	Digestion Buffer	 白色	23 μ L/支 \times 1
	Digestion Enzyme	 白色	42 μ L/支 \times 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	Digestion Stop Buffer	○ 白色	120 μL/支 × 1

表 2 MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装 (96 RXN) (货号: 1000006386)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy RNA方向性文库制备 试剂盒 货号: 1000005272	Fragmentation Buffer	● 绿色	608 μL/支 × 1
	Directional RT Buffer 1	● 绿色	608 μL/支 × 1
	Directional RT Buffer 2	● 棕色	20 μL/支 × 1
	RT Enzyme Mix	● 绿色	136 μL/支 × 1
	Directional Second Strand Buffer	● 黄色	1496 μL/支 × 2
	Second Strand Enzyme Mix	● 黄色	448 μL/支 × 1
	ERAT Buffer	● 橙色	872 μL/支 × 1
	ERAT Enzyme Mix	● 橙色	325 μL/支 × 1
	Ligation Buffer	● 红色	1300 μL/支 × 2
	DNA Ligase	● 红色	173 μL/支 × 1
	PCR Enzyme Mix	● 蓝色	1340 μL/支 × 2
	PCR Primer Mix	● 蓝色	448 μL/支 × 1
UDG	● 蓝色	108 μL/支 × 1	
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282	DNA Adapters	--	10 μL/孔 × 96
MGIEasy DNA纯化磁珠 货号: 1000005279	DNA Clean Beads	○ 白色	50 mL/支 × 1
	TE Buffer	○ 白色	25 mL/支 × 1
MGIEasy 环化模块 货号: 1000005260	Splint Buffer	● 紫色	186 μL/支 × 1
	DNA Rapid Ligase	● 紫色	8 μL/支 × 1
	Digestion Buffer	○ 白色	23 μL/支 × 1

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	Digestion Enzyme	○ 白色	42 μL/支 × 1
	Digestion Stop Buffer	○ 白色	120 μL/支 × 1

1.5 储存与运输

表 3 试剂盒储存与运输条件

试剂盒	储存温度	运输温度
MGIEasy RNA方向性文库制备试剂盒	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C
MGIEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒		
MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒		
MGIEasy 环化模块		
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 4 MGI 产品订购信息

货号	规格	名称
1000005953	32 RXN	MGIEasy rRNA 去除试剂盒

表 5 设备清单

名称	推荐品牌
ThermoMixer	Eppendorf
漩涡混匀仪	/
小型离心机	/
移液器	/
PCR仪	/
96 孔板磁力架	ALPAQUA, Cat. No. A00400
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D

名称	推荐品牌
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 6 试剂耗材清单



名称	推荐品牌
Nuclease free (NF) water	Ambion, Cat. No. AM9937
1x TE buffer, pH 8.0	Ambion, Cat. No. AM9858
无水乙醇 (分析纯)	/
RNase Zap 杂交液	Ambion, Cat. No. AM9780
rRNA 去除试剂盒 (与 mRNA 富集试剂盒二选其一)	/
Agencourt RNAClean XP 40 mL Kit	Agencourt, Cat. No. A63987 或同功能试剂
Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads	Vazyme, Cat. No. N401-01/02
Dynabeads mRNA Purification Kit (for mRNA Purification from Total RNA Preps)	Invitrogen, Cat. No. 61006
Qubit ssDNA Assay Kit	Invitrogen, Cat. No. Q10212
Qubit dsDNA HS Assay Kit	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
移液器吸头及无 RNA 酶吸头	/
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。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	15 min	7 min
3.3	反转录及二链合成 	2 h 10 min	15 ~ 20 min
3.4	二链产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.5	末端修复	50 min	15 min
3.6	接头连接	40 min	10 min
3.7	连接产物纯化 	30 ~ 60 min	20 ~ 30 min
3.8	PCR	50 min	10 min
3.9	PCR产物纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.10	PCR产物质检 	15 ~ 60 min	10 ~ 20 min
4.1	变性及单链环化	45 ~ 50 min	15 min
4.2	酶切消化	35 ~ 40 min	10 min
4.3	消化产物纯化 	50 min	10 ~ 15 min
4.4	消化产物质检 	15 ~ 20 min	10 ~ 15 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、拟南芥、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 μ g - 2.5 μ g。

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。
- 对于低质量 FFPE 样本的文库制备，请参考第 34 页“关于低质量 FFPE 样本的建库说明”。
- RNA纯度：OD_{260/280} = 1.8~2.0，OD_{260/230} ≥ 2 。
- 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

本标准实验流程所使用的 Input RNA 是 200 ng total RNA, RIN值 ≥ 7 。

对于低质量 FFPE 样本的文库制备, 请参考第 34 页“关于低质量 FFPE 样本的建库说明”。

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 11 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, 见第 12 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 7 试剂准备

试剂名称	要求
磁珠	提前 30 min 取出平衡至室温, 每次使用前充分涡旋混匀
Binding Buffer	涡旋混匀、离心, 室温暂存
Washing Buffer	

试剂名称	要求
10 mM Tris-HCl	涡旋混匀、离心，室温暂存
NF Water	

3.1.2.2 磁珠清洗

- 根据所需反应数，清洗磁珠。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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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，置于 80 $^{\circ}$ 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 8 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
Beads Wash Buffer	涡旋混匀、离心，室温暂存
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 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. 将样本管从磁力架上取下，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. 重复步骤 6 一次。
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。

3.2.1 准备

表 9 试剂准备

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

3.2.2 RNA片段化


1. 吸取 4 μL Fragmentation Buffer 至各样本管中（RNA 富集产物），移液器**吹打** 10 次混匀，瞬时离心使液体收集至管底。
2. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，根据插入片段大小的需要，选择相对应的片段化条件。

表 10 片段化条件推荐（体系：14 μL ）

插入片段	片段化温度	片段化时间
150 bp	94 $^{\circ}\text{C}$	8 min
250 bp	87 $^{\circ}\text{C}$	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 反转录及二链合成

 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

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 11 试剂准备

试剂名称	要求
Directional RT Buffer 2	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
NF Water	室温

试剂名称	要求
Directional RT Buffer 1	室温解冻，颠倒混匀、离心，冰上暂存
RT Enzyme Mix	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
Directional Second Strand Buffer	步骤 4 时取出，室温解冻，颠倒混匀、离心，冰上暂存
Second Strand Enzyme Mix	步骤 4 时取出，轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

3.3.2 反转录及二链合成

1. 根据所需反应数（每反应 1 μL ），用 NF Water 将 Directional RT Buffer 2 稀释 17 倍，涡旋混匀、瞬时离心后置于冰上。现配现用。

表 12 Directional RT Buffer 2 的稀释

组分	单个反应体积
NF Water	16 μL
Directional RT Buffer 2	1 μL
Total	17 μL

2. 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 13 反转录反应液的配制

组分	单个反应体积
Directional RT Buffer 1	4 μL
Directional RT Buffer 2 稀释液	1 μL
RT Enzyme Mix	1 μL
Total	6 μL

3. 吸取 6 μL 反转录反应液至各样本管中（3.2.2 节步骤 3），移液器吹打 10 次混匀，瞬时离心后置于冰上。
4. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 14 反转录反应条件（体系：20 μL ）

温度	时间
75 °C 热盖	On
25 °C	10 min
42 °C	30 min
70 °C	15 min
4 °C	Hold

5. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心 10 s，置于冰上。
6. 根据所需反应数，在冰上配制二链合成反应液，涡旋混匀 3 次，每次 3 s，瞬时离心后置于冰上。

表 15 二链合成反应液的配制

组分	单个反应体积
Directional Second Strand Buffer	26 μ L
Second Strand Enzyme Mix	4 μ L
Total	30 μ L

7. 吸取 30 μ L 二链合成反应液至各反转录产物中(步骤 5)，移液器吹打 10 次混匀，瞬时离心后置于冰上。
8. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 16 二链合成反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
25 $^{\circ}$ C 热盖	On
16 $^{\circ}$ C	60 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

9. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心 10 s，置于冰上。
- ||** 停止点 二链合成产物可放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存不超过 16 h。

3.4 二链产物纯化

- 💡** 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。

3.4.1 准备

表 17 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，现配现用
TE Buffer	室温暂存
DNA Clean Beads	提前 30 min 取出置于室温平衡，每次使用前充分混匀

3.4.2 二链产物纯化

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

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 75 μL DNA Clean Beads 至各样本管中（3.3.2节步骤 9），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 μL 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。
7. 将离心管从磁力架上取下，加入 42 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 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 40 μL 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

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

3.5 末端修复

3.5.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 18 试剂准备

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

3.5.2 末端修复

1. 根据所需反应数，在冰上配制末端修复反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 19 末端修复反应液的配制


组分	单个反应体积
ERAT Buffer	7.1 μ L
ERAT Enzyme Mix	2.9 μ L
Total	10 μ L

2. 吸取 10 μ L 末端修复反应液至各样本管中（3.4.2节步骤 9），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 20 末端修复反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
70 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
65 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底。

 **注意** 不建议在此处停止，请继续完成接头连接。如果必须停止，末端修复产物可置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20% 左右。

3.6 接头连接

Adapter的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请按照下表和实际基因组 total RNA 用量确定相应的接头稀释倍数。需要稀释接头时，请使用试剂盒中的 TE Buffer 对接头进行稀释。

表 21 不同 total RNA 投入量推荐的 Adapter 稀释倍数

样本 RNA (ng)	MGI Adapter 稀释倍数	稀释后投入量 (μ L)
201~2500	5	5
51~200	10	5
10~50	20	5


对于其它的 total RNA 样本投入量，可根据需求适当调整 Adapter 使用量。

3.6.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 22 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	室温
Adapters	冰上解冻, 涡旋混匀、离心, 冰上暂存
Ligation Buffer	室温解冻, 涡旋混匀、离心, 冰上暂存
DNA Ligase	轻弹底部混匀, 离心, 冰上暂存

-  **注意** 1. Adapters 使用前须充分涡旋混匀、离心。Adapters 不可直接与接头连接反应液混合。
2. Ligation Buffer 溶液较粘稠, 使用前涡旋混匀 6 次, 每次 3 s, 瞬时离心。吸取时请慢吸慢放, 确保加液量正确。

3.6.2 接头连接

1. 参考 Adapter 使用规则, 用 TE Buffer 将相应的 Adapter 稀释 10 倍或其他倍数, 涡旋混匀 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心后置于冰上。

表 23 Adapter 稀释

组分	体积
TE Buffer	9 μL
Adapter	1 μL
Total	10 μL

2. 吸取 5 μL 稀释后的 Adapter(s) 至对应的样本管中 (3.5.2 节步骤 4), 涡旋混匀 3 次, 每次 3 秒, 瞬时离心后置于冰上。
3. 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 24 接头连接反应液的配制

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

4. 缓慢吸取 25 μL 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。

 **提示** 接头连接反应液较粘稠, 吸取时请慢吸慢放, 确保加液量正确。

5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 按下表的条件进行反应。

表 25 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	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

- 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心，置于冰上。
- 加入 20 μ L TE Buffer 至总体积 100 μ L。涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

II 停止点 接头连接后产物可放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存不超过 16 h。

3.7 连接产物纯化

- 提示**
- 插入片段为 150 bp 的，选择 3.7.2 步骤纯化；插入片段为 250 bp 的，选择 3.7.3 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。

3.7.1 准备

表 26 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

3.7.2 操作（插入片段为 150 bp）

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

- 混匀 DNA Clean Beads，吸取 50 μ L DNA Clean Beads 至样本管中（3.6.2节步骤 7），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。
- 室温孵育 5 min。
- 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。
- 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。
- 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。

 提示 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 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 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 20 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。

3.7.3 操作（插入片段为 250 bp）

1. 先完成插入片段为 150 bp 的 1~6 步骤。

2. 将离心管从磁力架上取下，加入 52 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。

3. 室温孵育 5 min。

4. 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 50 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 提示 此步保留上清，丢弃磁珠。

5. 吸取 32.5 μL DNA Clean Beads 至各样本管中（含 50 μL 上清），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。

6. 室温孵育 5 min。

7. 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，小心吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 提示 此步保留上清，丢弃磁珠。

8. 吸取 10 μL DNA Clean Beads 至各样本管中（含约 80 μL 上清），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。


9. 室温孵育 5 min。

10. 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。

11. 保持离心管固定于磁力架上，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。

12. 重复步骤 11 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。

13. 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。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

14. 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。

15. 室温孵育 5 min。

16. 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 μ L 上清液至新的 0.2 mL PCR 管。

|| 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.8 PCR

PCR步骤需要严格控制扩增循环数。

- 循环数不足，会导致文库产出不足。
- 循环数过多，可能会导致过度扩增、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。

下表列举了当使用 10 ~ 1000 ng 高质量样本 total RNA (150 bp 主带) 时，所需要的扩增循环数，当样本 RNA 质量较差、主带较长时，需适当提高循环数以获取足量文库。

表 27 推荐的扩增循环数

Total RNA (ng)	对应产量所需循环数 \geq 200 ng
10	17-18
50	15-16
200	13-14
1000	11-12

3.8.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 28 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
PCR Primer Mix	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存
UDG	

3.8.2 PCR

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

表 29 PCR 反应液的配制

组分	单个反应体积
PCR Enzyme Mix	25 μ L
PCR Primer Mix	4 μ L
UDG	1 μ L
Total	30 μ L

- 吸取 30 μ L PCR 反应液至各样本管中（3.7 节步骤 9 或 16），涡旋混匀 3 次，每次 3 s，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。

表 30 PCR 反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}$ C 热盖	on	-
37 $^{\circ}$ C	20 min	1
95 $^{\circ}$ C	3 min	1
95 $^{\circ}$ C	30 s	14*
56 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	1 min	
72 $^{\circ}$ C	5 min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	-

 提示 *：Total RNA 投入量不同，可根据表 27 调整循环数。

- 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心。

3.9 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。

3.9.1 准备

表 31 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

试剂名称	要求
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

3.9.2 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，请先分别将各样本全部反应液转移至新的 1.5 mL 离心管。

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 60 μ L DNA Clean Beads 至样本管中（3.8.2 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。

 提示 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 1.5 mL 离心管。

 停止点 产物纯化后可置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存。

3.10 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 32 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 pmol
电泳分离法	Tapestation (Agilent Technologies)、 Bioanalyzer、LabChip GX、GXII、 GX Touch (PerkinElmer)、 Fragment Analyzer (Advanced Analytical) 等	插入片段为 150 bp 主带分布： 230 bp
		插入片段为 250 bp 主带分布： 330 bp

1 pmol 不同片段大小的双链 DNA 样本分子对应不同的质量，可根据公式计算所需的 DNA 量。

公式 1 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量 (ng)} = \text{PCR 产物主带大小 (bp)} \times 0.66$$

表 33 不同片段大小PCR产物1 pmol对应产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR产物主片段大小 (bp)	1 pmol对应产量 (ng)
150	230	152
250	330	218

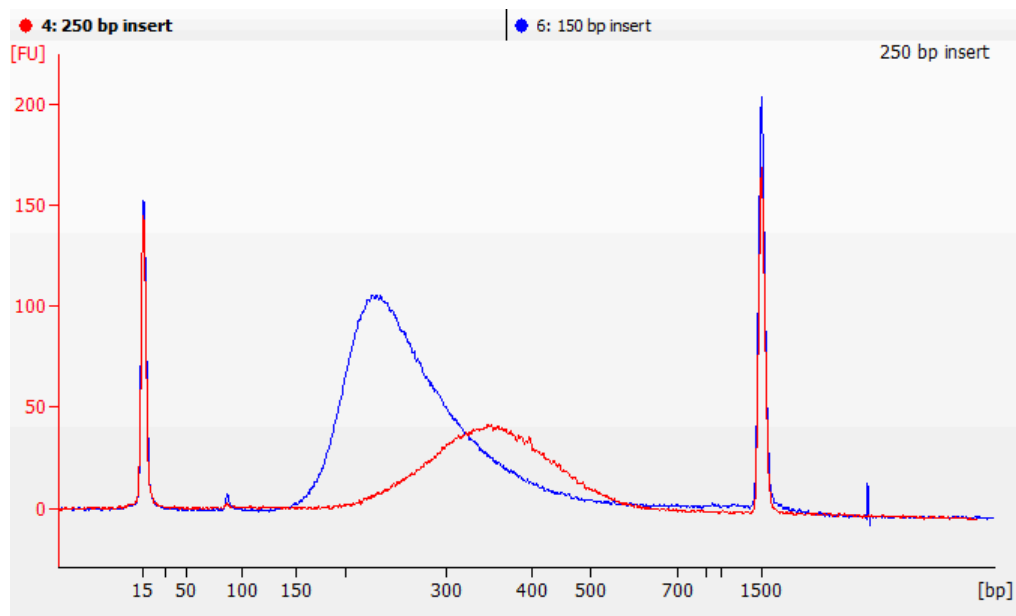



图 1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

4 环化消化

4.1 变性、单链环化

-  提示
- 操作前请根据纯化后 PCR 产物的主带分布，样本浓度，参考公式 1 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MGIEasy DNA Adapters 说明书使用规则设计混合方案，或见第 29 页“关于 Adapter 使用”，在 PCR 产物定量后进行不同 Adapters 样本混合，混合后总量为 1 pmol，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μ L。
 - 例如：构建插入片段主片段为 150 bp 的文库，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 19 ng 混合共 152 ng 至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48 μ L。

4.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 34 试剂准备

试剂名称	要求
TE Buffer	自备物料，室温暂存
Splint Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
DNA Rapid Ligase	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存

4.1.2 变性

- 吸取 1 pmol PCR 纯化产物或 PCR 纯化后混合测序产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补足至总体积 48 μ L。
- 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 35 变性反应条件（体系：48 μL ）

温度	时间
105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖	On
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min

3. 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。

4.1.3 单链环化

1. 根据反应数，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 36 单链环化反应液的配制

组分	单个反应体积
Splint Buffer	11.6 μL
DNA Rapid Ligase	0.5 μL
Total	12.1 μL

2. 吸取 12.1 μL 单链环化反应液至各样本管中（4.1.2 节步骤 3），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 37 单链环化反应条件（体系：60.1 μL ）

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

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 酶切消化

4.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 38 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

试剂名称	要求
Digestion Stop Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，室温暂存

4.2.2 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 39 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 酶切消化反应液至各样本管中（4.1.3节步骤 4），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 40 酶切消化反应条件（体系：64.1 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，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。

4.3 消化产物纯化

 **提示** 添加试剂、吸弃上清时请勿触碰、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。

4.3.1 准备

表 41 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 取出置于室温平衡，每次使用前充分涡旋混匀

4.3.2 消化产物纯化

1. 混匀 DNA Clean Beads，吸取 170 μL DNA Clean Beads 至各样本管中（4.2.2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。
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 μL 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。

 提示 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 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。
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 20 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管。

 停止点 酶切消化产物纯化后可置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存 1 个月。

4.4 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。

- 要求最终产物摩尔产量 $\geq 80\text{ fmol}$ （足够两次上机测序）。

单链环状 DNA 产物纯化后产量应达到 80 fmol 以上方足够两次上机测序的量。可根据公式计算所得单链环状 DNA 的摩尔数。

公式 2 单链环 fmol 与 ng 间的换算

$$80\text{ fmol 单链环对应的质量 (ng)} = 0.08 \times \text{PCR 产物主带大小 (bp)} \times 0.33$$

表 42 不同 PCR 产物片段大小对应 80 fmol 单链环产量

插入片段主片段大小 (bp)	PCR产物主片段大小 (bp)	80 fmol 对应产量 (ng)
150	230	6.07
250	330	8.71

5 附录

5.1 关于 Adapter 使用

试剂套装根据反应数不同提供 2 种不同规格的 Adapter 试剂盒：MGIEasy DNA Adapters- 16（管式）试剂盒或 MGIEasy DNA Adapters-96（板式）试剂盒。

两款试剂盒均为满足大量样本批量化建库、多样本混合测序而研发，基于碱基平衡的设计原则，经过反复实验测试，挑选了最佳的 Adapter 组合，但 Adapter 编号不连续。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读两种规格的使用规则。

- 两款 Adapter 试剂盒编号存在重叠，编号一致的 Adapter，Barcode 碱基序列相同，不能在同一条 lane 中测序。
- Adapter 为双链接头，请勿将其置于 30 °C 以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。
- Adapter 使用前必须先混匀并离心，将液体聚集于管底或板底。
- 吸取不同 Adapter 时注意更换吸头，避免交叉污染。
- 对于管式 Adapters 使用时需小心地揭开管盖，防止液体飞溅，避免交叉污染，使用后及时盖上管盖。
- 对于板式 Adapters，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。
- 若有使用 MGI 其它建库试剂盒中的 barcode 接头或引物，由于设计工艺不同，禁止混用，否则数据无法拆分。

5.1.1 DNA Adapters-16（管式）试剂使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将 Adapter 成组使用，试剂盒中包含的 Adapter 具备如下的分组规则：

- 4个 Adapter 成组：01-04、13-16，共计 2 组；
- 8个 Adapter 成组：97-104，共计 1 组。

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考如下表所示的推荐 Barcode 组合方案。

 注意 同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。

表 43 DNA Adapters-16 (管式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ul style="list-style-type: none"> 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04, 将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 97-104, 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。
2	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ul style="list-style-type: none"> 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04, 将 01 和 02 取等体积混合后加入样本 1 中, 将 03 和 04 取等体积混合后加入样本 2 中。 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 97-104, 将 97-100 取等体积混合后加入样本 1 中。将 101-104 取等体积混合后加入样本 2 中。
3	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 样本 1、2 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加 Adapter。 样本 3 采用上述 (1 样本数/lane) 方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ul style="list-style-type: none"> 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04, 将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 97-104, 将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix, 分别加入样本 1、2、3、4 中。

样本数/lane	使用方法（举例）
5	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5 采用上述（1 样本数/lane）方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<p>需至少使用 2 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<p>需使用全部 3 组 Adapter，分三步操作:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-4 采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 5-6 采用上述（2 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 7，使用剩余的一组 Adapter。加该组内任意一个编号 Adapter。或者将所有编号 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> • 加一组 8 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 97-104，将 97、98、99、100、101、102、103、104 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。 • 或选取两组 4 个 Adapter（01-04 和 13-16）。每个样本加 1 个 Adapter。
8+x (x=1~8, 总计 9~16个)	<p>分两步操作:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 8 样本 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 样本1~8 分成 1组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 ▪ 或分成 2 组，样本 1~4、5~8采用上述（4 样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 剩余样本分成 1 组，根据 X 的数值，采用上述对应的 1~8 样本数/lane方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。 <p> 提示 上述两组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

当样本数据量要求不同时，需遵循在一条 lane 中数据量要求大于 20% 的样本不得使用不成组的 Adapter。例如，有 9 个样本 pooling 于一条 lane 中，其中有 1 个样本要求数据量为 30%，此时需采用如下 Barcode 的方案：

1. 8个样本使用 Adapter 97-104。
2. 另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要使用 Adapter 01-04 或 Adapter 13-16。

5.1.2 DNA Adapters-96 (板式) 试剂使用规则

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将 Adapter 成组使用，试剂盒中包含的 Adapter 具备如下的分组规则：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	41	57	65	73	81	89	97	121	25	33	49
B	02	42	58	66	74	82	90	98	122	26	34	50
C	03	43	59	67	75	83	91	99	123	117	35	51
D	04	44	60	68	76	84	92	100	124	28	36	52
E	13	45	61	69	77	85	93	101	125	29	37	53
F	14	46	62	70	78	86	94	102	126	30	38	116
G	15	47	63	71	79	87	95	103	127	114	39	55
H	16	48	64	72	80	88	96	104	128	32	115	56

图 2 MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) Adapters 分布图及成组规则

- 4个 Adapter 成组：第 1 列 (01-04, 13-16)，共计 2 组 (上图红色框)。
- 8个 Adapter 成组：第 2-9 列 (41-48、57-64、65-72、73-80、81-88、89-96、97-104 和 121-128)，共计 8 组 (上图蓝色框)。
- 24个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组 (上图紫色框)。

当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目可参考下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

⚠ 注意 同一条 lane 上各样本间加的 barcode 不能重复。

表 44 DNA Adapters-96 (板式) 试剂使用规则

样本数/lane	使用方法 (举例)
1	<ul style="list-style-type: none"> • 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 01-04，将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 • 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 8 个 Adapter。 例如 41-48，将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。

样本数/lane	使用方法（举例）
2	<ul style="list-style-type: none"> 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 01-04，将 01 和 02 取等体积混合成 mix 后加入样本 1 中。将 03 和 04 取等体积混合成 mix 后加入样本 2 中。 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 4 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-44 取等体积混合成 mix，加入样本 1 中。将 45-48 取等体积混合成 mix，加入样本 2 中。
3	<ol style="list-style-type: none"> 样本 1、2 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 样本 3 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> 加一组 4 个 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 01-04，将 01、02、03、04 分别加入样本 1、2、3、4 中。 或加一组 8 个 Adapter。每个样本加 2 个 Adapter。 例如 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别取等体积混合成 mix，分别加入样本 1、2、3、4 中。
5	<ol style="list-style-type: none"> 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 样本 5 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。</p>
6	<ol style="list-style-type: none"> 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。</p>
7	<ol style="list-style-type: none"> 样本 1-4 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 样本 5-6 采用上述（2样本数/lane）方法加 Adapter。 样本 7 采用上述（1样本数/lane）方法加 Adapter。 <p> 提示 样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。</p>
8	<ul style="list-style-type: none"> 加一组 8 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 例如 41-48，将 41、42、43、44、45、46、47、48 编号 Adapter 分别加入样本 1、2、3、4、5、6、7、8 中。

样本数/lane	使用方法（举例）
8n+x (n=1、2 x=1~8, 总计 9~24个)	<p>分三步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-8 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 分成 1 组，采用上述（8样本数/lane）方法加 Adapter。 ▪ 或分成 2 组，样本 1-4、5-8 采用上述（4样本数/lane）方法加 Adapter。 2. 样本 9-8n，每 8 个样本一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。 <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>
8n+x (3≤n<11 x=1~8, 总计 25~96个)	<p>分三步：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 样本 1-24，加一组 24 Adapter。每个样本加 1 个 Adapter。 2. 样本 25-8n，每 8 个样本分为一组，采用上述（8 样本数/lane）方法加 Adapter。 3. 样本 8n+1 ~ 8n+X，根据 X 的数值，采用上述对应的 1-8 样本数/lane 方法加 Adapter，并注意按照对应要求加不同组别的 Adapter。 <p> 提示 上述 1、2、3 每组样本间需使用不同组别的 Adapter。</p>

当样本数据量要求不同时，需遵循在一条 lane 中数据量要求大于 20% 的样本不得使用不成组的 Adapter。例如，有 9 个样本 pooling 于一条 lane 中，其中有 1 个样本要求数据量为 30%，此时需采用如下 Barcode 的方案：

1. 8 个样本使用 Adapter 41-48；
2. 另外一个样本不可使用单独的一个 Adapter，而是要使用 Adapter 01-04 或 Adapter 13-16 或其他 41-48 以外的成组 Adapter。

5.2 关于低质量 FFPE 样本的建库说明

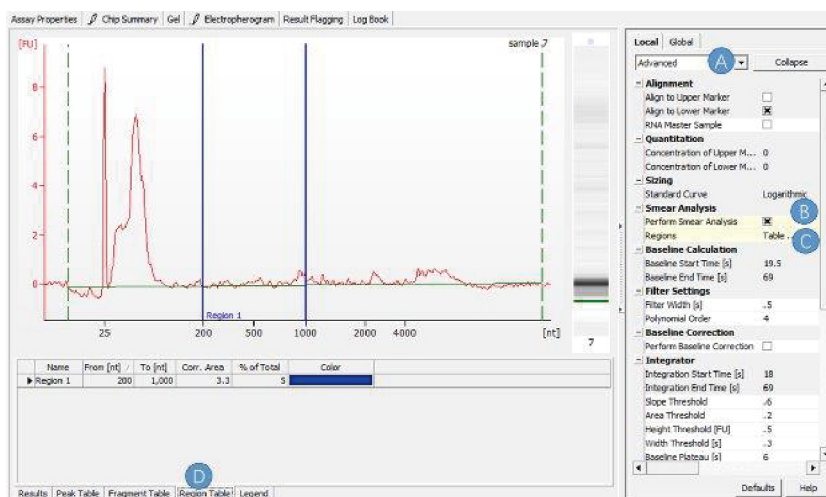
本流程适用于 FFPE RNA 等低质量的 total RNA 样本进行文库构建，但由于不同 FFPE 样本的质量差距较大，因此并不能保证所有的 FFPE 样本都可以完成二代测序文库的构建。现列举不同降解程度的 FFPE 样本在文库制备过程中需要注意的问题。

5.2.1 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 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 3 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>）。

5.2.2 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“二链产物纯化”步骤注意使用 100 μL 的磁珠进行纯化。
- 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 45 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	二链产物纯化的磁珠	PCR cycles
>70%	200 ng	94°C, 8 min	100 μL 磁珠纯化	14
50-70%	200~400 ng	94°C, 8 min	100 μL 磁珠纯化	16
30-50%	500 ng	94°C, 6 min	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

表 46 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	5	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

5.2.3 FFPE样本文库构建流程

5.2.3.1 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。

5.2.3.2 RNA片段化

- 需要进行片段化的样本，参考第 35 页的表 45 样本文库的推荐条件，根据文库的降解程度，用不同的片段化条件。参考 3.2 节 RNA 片段化操作。
- 对于不需要进行片段化的样本：
 - 1) 根据反应数，吸取 4 (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 4 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。

5.2.3.3 反转录及二链合成

同 3.3 节。

5.2.3.4 二链产物纯化

参考 3.4 节。参考第 35 页“表 45 FFPE样本建库的推荐条件”，用 100 μL 磁珠纯化，42 μL TE Buffer 洗脱 DNA，最终取 40 μL 上清至新的 0.2 mL PCR 管中。

5.2.3.5 末端修复

同 3.5 节。

5.2.3.6 接头连接

参考 3.6 节。参考第 36 页“表 46 FFPE 样本建库的 Adapter 使用推荐”，不同的 FFPE 样本选择不同的 Adapter 稀释倍数和使用量。

5.2.3.7 连接产物纯化

参考 3.7 节 150 bp 片段纯化条件。

5.2.3.8 PCR

参考 3.8 节。参考第 35 页“表 45 FFPE 样本建库的推荐条件”，不同的 FFPE 样本选择不同的 PCR cycles。

5.2.3.9 PCR产物纯化至酶切消化产物质检

同 3.9~4.4 节。

5.3 RNA 病原检测样本的建库说明

5.3.1 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。

5.3.2 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。

5.3.3 RNA病原微生物样本文库构建流程

5.3.3.1 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。

5.3.3.2 RNA片段化

参考 3.2 节操作。选择插入片段 150 bp 条件，即 94 °C 孵育 8 min 将样本 RNA 片段化。

5.3.3.3 反转录及二链合成~连接产物纯化

同 3.3~3.7 节。

连接产物纯化选择 150 bp 片段纯化条件。

5.3.3.4 PCR

参考 3.8 节。去 rRNA 样本 PCR 扩增 15 个循环。

5.3.3.5 PCR产物纯化

同 3.9 节。

5.3.3.6 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 47 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	≥ 200 ng
PCR产物片段大小	Agilent 2100普通芯片检测	主带 210-250 bp, 条带分布150-500 bp
接头剩余量	Agilent 2100普通芯片检测	肉眼观察, 80 bp左右无明显接头峰

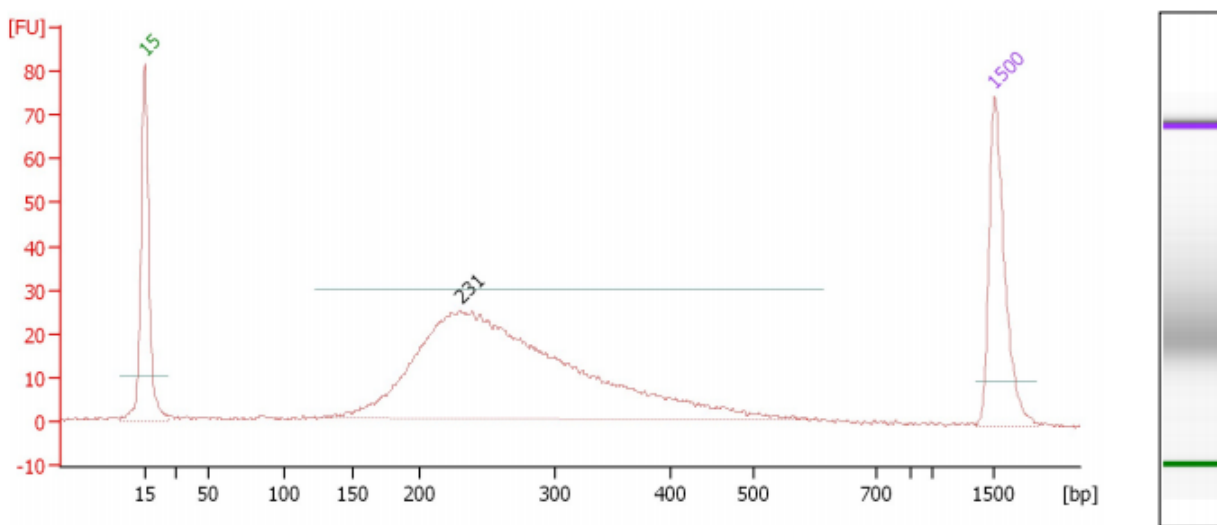


图 4 PCR纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

5.3.3.7 变性至酶切消化产物质检

同 4.1~4.4 节。

--- 此页有意留白 ---