

MGIEasy

微生物快速 RNA 文库制备套装说明书

货号：940-000107-00 (16 RXN), 940-000108-00 (96 RXN)

说明书版本号：2.0

版本历史

| 说明书 版本 | 试剂盒 版本 | 修订 日期 | 修订内容摘要 |
|-----------|-----------|-------------|-----------|
| 2.0 | / | 2022年 3月 | 更新公司 LOGO |
| 1.0 | / | 2021年 7月 | 首次发布 |

提示：请按照最新版说明书，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：www.mgi-tech.com/download/files

目录

| | |
|--------------------------|----|
| 第一章 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 组合产品的试剂盒组分 | 1 |
| 1.5 试剂盒储存条件及有效期 | 4 |
| 1.6 客户自备物料清单 | 5 |
| 1.7 注意事项 | 6 |
| 第二章 样本要求及处理 | 7 |
| 2.1 适用样本类型及投入量要求 | 7 |
| 2.2 样本质量要求及说明 | 7 |
| 第三章 文库构建标准流程 | 8 |
| 3.1 样本 DNA 消化 (选做) | 8 |
| 3.2 rRNA 去除 (选做) | 9 |
| 3.3 RNA 片段化 | 12 |
| 3.4 反转录及二链合成 | 12 |
| 3.5 二链产物纯化 | 13 |
| 3.6 末端修复&添加 dA 尾 | 14 |
| 3.7 接头连接 | 15 |
| 3.8 连接产物纯化 | 16 |
| 3.9 PCR 扩增 | 17 |
| 3.10 PCR 产物纯化 | 17 |
| 3.11 PCR 产物质检 | 18 |
| 3.12 DNB 制备 | 19 |
| 3.13 DNB 浓度测定 | 21 |
| 3.14 DNB 加载、准备测序试剂槽及上机测序 | 21 |
| 附录 | 22 |
| 附录 A 关于磁珠及纯化 | 22 |
| 附录 B 关于 Adapter 使用 | 23 |
| 附录 C 关于接头连接和 PCR 反应 | 28 |

第一章 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy 微生物快速RNA文库制备套装配合MGIEasy rRNA去除试剂盒,可对肺泡灌洗液、咽拭子和痰液等样本中的RNA进行宏转录组文库构建,从而进行微生物RNA的检测。

MGIEasy rRNA去除试剂盒适用于人、小鼠及大鼠total RNA样品中rRNA(包括细胞质5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA,线粒体12S rRNA,16S rRNA,前体45S rRNA)的去除,保留mRNA以及其它的非编码RNA,用于后续分析。该试剂盒适用于完整的和部分降解的total RNA样品,可与MGIEasy 微生物快速RNA文库制备套装搭配使用,用于RNA定量、转录组或非编码RNA等相关领域的研究。

MGIEasy 微生物快速RNA文库制备套装是为华大智造(MGI)高通量测序平台量身打造的RNA文库构建试剂盒套装。本套装包含的DNBSEQ 一步法DNB制备试剂盒可以将10 ng-1 μg total RNA制备成适用于MGI高通量测序平台的DNA纳米球(DNB)。本套装适合待检样本中微生物RNA的检测。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

本套装试剂适用于肺泡灌洗液、鼻咽拭子和痰液等样本的宏转录组文库制备。

1.3 适配测序平台

构建的文库可使用以下平台及测序类型测序:

MGISEQ-200RS (SE50, PE100)

MGISEQ-2000RS (SE50, PE100)

DNBSEQ-T7RS (SE50, PE100)

1.4 组合产品的试剂盒组分

MGIEasy rRNA去除试剂盒规格为32 RXN(货号:1000005953),其组分信息如表1-1。

MGIEasy 微生物快速RNA文库制备套装分为16 RXN(货号:940-000107-00)和96 RXN(货号:940-000108-00),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、组分信息如表其组分信息如表1-2,1-3。

表 1-1 MGEasy rRNA 去除试剂盒 (32 RXN) (货号: 1000005953) 组分信息

| 试剂盒种类与货号 | 组分信息 | 管盖颜色 | 规格及数量 |
|-------------------------------------|----------------------|------|-------------------------|
| MGEasy rRNA 去除试剂盒 货号: 1000005953 | Probe Mix | 白色 | 76.8 μL × 1 |
| | Hybridization Buffer | 白色 | 192 μL × 1 |
| | RNase H Buffer | 白色 | 115.2 μL × 1 |
| | RNase H | 白色 | 76.8 μL × 1 |
| | DNase I Buffer | 白色 | 576 μL × 1 |
| | DNase I | 白色 | 192 μL × 1 |

表 1-2 MGEasy 微生物快速 RNA 文库制备套装 (16 RXN) (货号: 940-000107-00)

| 试剂盒种类与货号 | 组分信息 | 管盖颜色 | 规格及数量 |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| MGEasy RNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005274 数量: 1 盒 | Fragmentation Buffer | 绿色 | 93 μL /支 × 1 支 |
| | RT Buffer | 绿色 | 88 μL /支 × 1 支 |
| | RT Enzyme Mix | 绿色 | 24 μL /支 × 1 支 |
| | Second Strand Buffer | 黄色 | 470 μL /支 × 1 支 |
| | Second Strand Enzyme Mix | 黄色 | 78 μL /支 × 1 支 |
| | ERAT Buffer | 橙色 | 132 μL /支 × 1 支 |
| | ERAT Enzyme Mix | 橙色 | 55 μL /支 × 1 支 |
| | Ligation Buffer | 红色 | 450 μL /支 × 1 支 |
| | DNA Ligase | 红色 | 34 μL /支 × 1 支 |
| | PCR Enzyme Mix | 蓝色 | 470 μL /支 × 1 支 |
| PCR Primer Mix | 蓝色 | 90 μL /支 × 1 支 | |
| MGEasy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒 货号: 1000005284 数量: 1 盒 | DNA Adapters | 白色 | 10 μL /支 × 16 支 |
| MGEasy DNA 纯化磁珠 货号: 1000005278 数量: 1 盒 | DNA Clean Beads | 白色 | 8 mL/支 × 1 支 |
| DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 货号: 1000020563 数量: 1 盒 | TE 缓冲液 | 绿色 | 300 μL × 1 支 |
| | DNB 制备缓冲液 (OS) | 黄色 | 80 μL × 1 支 |
| | DNB 聚合酶混合液 I (OS) | 黑色 | 160 μL × 1 支 |
| | DNB 聚合酶混合液 II (OS) | 橙色 | 16 μL × 1 支 |
| | DNB 终止缓冲液 | 蓝色 | 100 μL × 1 支 |

表 1-3 MGIeasy 微生物快速 RNA 文库制备套装 (96 RXN) (货号: 940-000108-00)

| 试剂盒种类与货号 | 组分信息 | 管盖颜色 | 规格及数量 |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------|------|------------------------------------|
| MGIeasy RNA 文库制备试剂盒 货号: 1000005276 数量: 1 盒 | Fragmentation Buffer | 绿色 | 608 μL /支 \times 1 支 |
| | RT Buffer | 绿色 | 760 μL /支 \times 1 支 |
| | RT Enzyme Mix | 绿色 | 136 μL /支 \times 1 支 |
| | Second Strand Buffer | 黄色 | 1496 μL /支 \times 2 支 |
| | Second Strand Enzyme Mix | 黄色 | 448 μL /支 \times 1 支 |
| | ERAT Buffer | 橙色 | 872 μL /支 \times 1 支 |
| | ERAT Enzyme Mix | 橙色 | 325 μL /支 \times 1 支 |
| | Ligation Buffer | 红色 | 1300 μL /支 \times 2 支 |
| | DNA Ligase | 红色 | 173 μL /支 \times 1 支 |
| | PCR Enzyme Mix | 蓝色 | 1340 μL /支 \times 2 支 |
| | PCR Primer Mix | 蓝色 | 448 μL /支 \times 1 支 |
| MGIeasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒 货号: 1000005282 数量: 1 盒 | DNA Adapters | 白色 | 10 μL /孔 \times 96 孔 |
| MGIeasy DNA 纯化磁珠 货号: 1000005279 数量: 1 盒 | DNA Clean Beads | 白色 | 50 mL/支 \times 1 支 |
| | TE Buffer | 白色 | 25 mL/支 \times 1 支 |
| DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 货号: 1000020563 数量: 4 盒 | TE 缓冲液 | 绿色 | 300 μL \times 1 支 |
| | DNB 制备缓冲液 (OS) | 黄色 | 80 μL \times 1 支 |
| | DNB 聚合酶混合液 I (OS) | 黑色 | 160 μL \times 1 支 |
| | DNB 聚合酶混合液 II (OS) | 橙色 | 16 μL \times 1 支 |
| | DNB 终止缓冲液 | 蓝色 | 100 μL \times 1 支 |

1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy rRNA 去除试剂盒

- 储存温度: -25°C ~ -15°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy RNA 文库制备试剂盒

- 储存温度: -25°C ~ -15°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA Adapters 试剂盒

- 储存温度: -25°C ~ -18°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy DNA 纯化磁珠

- 储存温度: 2°C ~ 8°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 冰袋运输

DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒

- 储存温度: -25°C ~ -15°C
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

*干冰运输, 请注意检查收到产品时是否有干冰剩余。

*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 客户自备物料清单

表 1-4 客户自备仪器和物料清单

| | |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 仪器 | 漩涡混匀仪 小型离心机 移液器 PCR 仪 磁力架 (ThermoFisher, Cat. No. 12321D) Qubit® 3.0 荧光定量仪 (ThermoFisher, Cat. No. Q33216) Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA) |
| 试剂 | RNase Zap 杂交液 (Ambion, Cat. No. AM9780) Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32852) DNase I (NEB, Cat. No. M0303S) RNA 纯化磁珠 (Vazyme, Cat. No. N412-02) Nuclease free water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937) 无水乙醇, 100%乙醇 (分析纯) Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q10212) Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854) Agilent 2100 High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Cat. No. 5067-4626) 或 Agilent 2100 DNA 1000 Kit (Agilent, Cat. No. 5067-1504) |
| 耗材 | 移液器吸头及无 RNA 酶吸头 1.5 mL 不粘管 (Ambion, Cat. No. AM12450) 1.5 mL 离心管 (Axygen, Cat. No. MCT-150-C) 0.2 mL PCR 管 (Axygen, Cat. No. PCR-02-C) 或 96 孔板 (Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C) Qubit® Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或 0.5mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C) 200 μ L 阔口吸头 (Axygen, Cat. No. T-205-WB-C) |

1.7 注意事项

- 文库制备流程推荐根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行调整和优化。本说明书提供的实验流程是通用流程，可根据需要调整反应参数，以优化性能、效率。
- 试剂套装各组分使用前提前取出，将 Enzyme 瞬时离心后置于冰上待用。其他组分于室温解冻，解冻后上下颠倒数次充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打至少十次混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。
- 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样品时请更换吸头。
- 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。若无特殊说明，热盖温度设置为 105°C。
- PCR 产物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；使用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。
- 若您有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

第二章 样本要求及处理

2.1 适用样本类型及投入量要求

本套装试剂适用于微生物RNA测序，样本类型为肺泡灌洗液、鼻咽拭子和痰液等。

2.2 样本质量要求及说明

- 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。

第三章 文库构建标准流程

核酸提取后产物，先用 Qubit™ RNA HS Assay Kit 进行定量，投入适量样本进行文库制备。

若 Total RNA > 10 ng，需要按照附录 B 修改 Adapter 稀释倍数，附录 C 修改 PCR 扩增循环数；

若 Total RNA ≤ 10 ng 或无法定量，则按照说明书标准流程操作。

3.1 样本 DNA 消化 (选做)



注意：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。

3.1.1 DNA 消化

3.1.1.1 取适量 RNA 样本于无核酸酶的 0.2 mL PCR 管中，用 NF water 补足体积至 42.5 μL，在冰上配制消化反应混合液（见表 3-1，**试剂需客户自备**）：

表 3-1 消化反应混合液

| 组分 | 体积 |
|--------------------|---------|
| total RNA | 42.5 μL |
| DNase I | 2.5 μL |
| 10× DNase I Buffer | 5 μL |
| Total | 50 μL |

3.1.1.2 将上述反应混合液轻轻吹打混匀后，置于 PCR 仪上，如表 3-2 条件进行反应：

表 3-2 消化反应条件

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 (45°C) | on |
| 37°C | 20 min |
| 4°C | Hold |

3.1.1.3 反应结束后，瞬时离心，将液体全部转移到新的 1.5 mL 不粘管中，用 90 μL RNA 纯化磁珠对产物进行纯化。

3.1.2 RNA 纯化



注意：此步的 RNA 纯化必须使用不粘管。

3.1.2.1 提前 30 min 从 4°C 冰箱取出 RNA 纯化磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

- 3.1.2.2 用移液器吸取 90 μL 磁珠至步骤 3.1.1.3 中的 DNase I 消化后产物中，并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入不粘管中。
- 3.1.2.3 室温孵育 5 min。
- 3.1.2.4 瞬时离心，将不粘管置于磁力架，静置 2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.1.2.5 保持不粘管固定于磁力架上，加入 200 μL 用 NF water 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 3.1.2.6 重复步骤 3.1.2.5 一次，尽量吸干管底液体，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.1.2.7 保持不粘管固定于磁力架上，打开不粘管管盖，室温干燥直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.1.2.8 将不粘管从磁力架上取下。若样本后续需进行 rRNA 去除（见 3.2），移液器取 20 μL 的 NF water 进行 RNA 洗脱，并用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀；若样本后续直接进行 RNA 片段化（见 3.3），移液器取 12 μL 的 NF water 进行 RNA 洗脱，并用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。
- 3.1.2.9 室温下孵育 5 min。
- 3.1.2.10 瞬时离心，将不粘管置于磁力架上，静置 2~5 min 至液体澄清。若样本后续需进行 rRNA 去除（见 3.2），吸取 18 μL 上清液转移到新的无核酸酶的 PCR 管中，进行后续的“探针杂交”反应。若样本后续直接进行 RNA 片段化（见 3.3），吸取 10 μL 上清液转移到新的无核酸酶的 PCR 管中，进行后续的“RNA 片段化”反应。

3.2 rRNA 去除（选做）

3.2.1 探针杂交

- 3.2.1.1 根据 total RNA 浓度，取适量样本至 0.2 mL PCR 管中，用 NF water 补足体积至 18 μL 。或直接使用 3.1.2.10 样本。将 Probe Mix 和 Hybridization Buffer 从 -20°C 取出，冰浴解冻后涡旋混匀，备用。



注意：Probe Mix 使用前务必充分混匀，涡旋震荡 5~6 次，每次 3~5 s；试剂配制时，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。

3.2.1.2 在冰上配制杂交反应混合液（见表3-3）。

表 3-3 杂交反应混合液

| 组分 | 体积 |
|----------------------|------------|
| Total RNA | 18 μ L |
| Hybridization Buffer | 5 μ L |
| Probe Mix | 2 μ L |
| Total | 25 μ L |

3.2.1.3 将上述反应混合液用移液器轻轻吹打至少10次混匀后，置于PCR仪上，按表3-4条件进行反应。

表 3-4 杂交反应条件

| 温度 | 时间 |
|---------------------------------|---------------------|
| 热盖 | On |
| 95 $^{\circ}$ C | 2 min |
| 95 $^{\circ}$ C-22 $^{\circ}$ C | 0.1 $^{\circ}$ C /s |
| 22 $^{\circ}$ C | 5 min |

3.2.1.4 约20 min可以完成反应，反应结束后，立即置于冰上2 min，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.2 RNase H 消化

3.2.2.1 将RNase H Buffer从-20 $^{\circ}$ C取出，冰浴解冻后涡旋混匀，备用。

3.2.2.2 在冰上配制RNase H消化反应混合液（见表3-5）。

表 3-5 RNase H 消化反应混合液

| 组分 | 体积 |
|----------------|------------|
| 上步产物 | 25 μ L |
| RNase H | 2 μ L |
| RNase H Buffer | 3 μ L |
| Total | 30 μ L |

3.2.2.3 将上述反应混合液用移液器轻轻吹打至少10次混匀后，置于PCR仪上，按表3-6条件进行反应：

表 3-6 RNase H 消化反应条件

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



注意：若 PCR 仪热盖无法设置成 45°C，应采用靠近原则，即仪器能设置的最接近 45°C 的条件。

3.2.2.4 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.3 DNase I 消化

3.2.3.1 将DNase I Buffer从-20°C取出，冰浴解冻后涡旋混匀，备用。

3.2.3.2 在冰上配制DNase I消化反应混合液（见表3-7）：

表 3-7 DNase I 消化反应混合液

| 组分 | 体积 |
|----------------|------------|
| 上步产物 | 30 μ L |
| DNase I | 5 μ L |
| DNase I Buffer | 15 μ L |
| Total | 50 μ L |

3.2.3.3 将上述反应混合液用移液器轻轻吹打至少10次混匀后，置于PCR仪上，按表3-8条件进行反应：

表 3-8 DNase I 消化反应条件

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 (45°C) | on |
| 37°C | 30 min |
| 4°C | Hold |

3.2.3.4 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.3.5 将产物全部转移到新的1.5 mL不粘管中。

3.2.4 RNA 的纯化



注意：此步的 RNA 纯化必须使用不粘管。

3.2.4.1 提前30 min从4°C冰箱取出RNA纯化磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.2.4.2 用移液器吸取75 μ L磁珠至步骤3.2.3.5中的DNase I消化后产物中，并轻轻吹打至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入不粘管中。

3.2.4.3 室温孵育5 min。

3.2.4.4 瞬时离心，将不粘管置于磁力架，静置2-5 min至液体澄清，移液器小心吸取并丢弃上清。

3.2.4.5 保持不粘管固定于磁力架上，加入200 μ L用NF water新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静

置30 s后小心吸取并丢弃上清。

- 3.2.4.6 重复步骤3.2.4.5一次，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.2.4.7 保持不粘管固定于磁力架上，打开不粘管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.2.4.8 将不粘管从磁力架上取下，加入12 μL 的NF water进行RNA洗脱，用移液器轻轻吹打至少10次至完全混匀。
- 3.2.4.9 室温下孵育5 min。
- 3.2.4.10 瞬时离心，将不粘管置于磁力架上，静置2~5 min至液体澄清，吸取10 μL 上清液转移到新的无核酸酶的PCR管中。
- 3.2.4.11 纯化后的样品可置于冰上继续进行高通量测序文库构建或者其它分析反应，若是过夜保存，可置于 -20°C ，若是长期保存，可置于 -80°C 不超过一周（建议立即进行后续反应）。

3.3 RNA 片段化

- 3.3.1 将Fragmentation Buffer从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀。在10 μL 的RNA样本中加入4 μL Fragmentation buffer，吹打10次混匀（总体积14 μL ），瞬时离心后放入PCR仪中， 94°C 孵育8分钟。
- 3.3.2 反应结束后立即置于冰上2 min，瞬时离心10 s，立即进入反转录反应。

3.4 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。

- 3.4.1 将RT Buffer从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制反转录反应液（见表3-9）

表 3-9 反转录反应液

| 组分 | 体积 |
|---------------|-----------------|
| RT Buffer | 5 μL |
| RT Enzyme Mix | 1 μL |
| Total | 6 μL |

- 3.4.2 移液器吸取6 μL 配制好的反转录反应液加入步骤3.3.2的片段化后产物中，吹打10次混匀，瞬时离心将反应液（总体积20 μL ）收集至管底。
- 3.4.3 将步骤3.4.2所述PCR管置于PCR仪上，按照表3-10中的条件进行反应：

表 3-10 反转录反应条件

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 热盖 | On |
| 25°C | 10 min |
| 42°C | 15 min |
| 70°C | 15 min |
| 4°C | Hold |

3.4.4 反应结束后，将产物置于冰上，瞬时离心10 s。

3.4.5 将Second Strand Buffer从-20°C取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制二链合成反应液（见表3-11）：

表 3-11 二链合成反应液

| 组分 | 体积 |
|--------------------------|------------|
| Second Strand Buffer | 26 μ L |
| Second Strand Enzyme Mix | 4 μ L |
| Total | 30 μ L |

3.4.6 用移液器吸取30 μ L配制好的二链合成反应液加入步骤3.4.4的反转录产物中，吹打10次混匀，瞬时离心将反应液（总体积50 μ L）收集至管底。

3.4.7 将步骤3.4.6所述PCR管置于PCR仪上，按照表3-12中的条件进行反应：

表 3-12 二链合成反应条件

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 热盖 | On |
| 16°C | 30 min |
| 4°C | Hold |

3.4.8 反应结束后，瞬时离心10 s，将二链产物转移至新的1.5 mL离心管中，置于冰上待下步反应。

 **停止点：二链产物可置-20°C冰箱过夜储存不超过16h。**

3.5 二链产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录A。

3.5.1 提前30 min取出DNA Clean Beads置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.5.2 用移液器吸取75 μ L DNA Clean Beads至步骤3.4.8中的二链产物中，并轻轻吹打至少10次至完

全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入1.5 mL离心管中。

- 3.5.3 室温孵育5 min。
- 3.5.4 瞬时离心，将1.5 mL离心管置于磁力架，静置2-5 min至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.5.5 保持1.5 mL离心管置于磁力架上，加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置30 s后小心吸取并丢弃上清。
- 3.5.6 重复步骤3.5.5，第二次漂洗后尽量吸干管内液体，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.5.7 保持1.5 mL离心管固定于磁力架上，打开1.5 mL离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.5.8 将1.5 mL离心管从磁力架上取下，加入42 μ L TE Buffer进行DNA洗脱，用移液器轻轻吹打至少10次至完全混匀，瞬时离心。
- 3.5.9 室温下孵育5 min。
- 3.5.10 将1.5 mL离心管置于磁力架上，静置2-5 min至液体澄清，将40 μ L上清液转移到新的0.2 mL PCR管中。

✓ **停止点：二链产物纯化后，可置-20°C冰箱储存。**

3.6 末端修复&添加 dA 尾

- 3.6.1 在冰上配制末端修复&添加dA尾反应液（见表3-13）：

表 3-13 末端修复&添加 dA 尾反应液

| 组分 | 体积 |
|-----------------|-------------|
| ERAT Buffer | 7.1 μ L |
| ERAT Enzyme Mix | 2.9 μ L |
| Total | 10 μ L |

- 3.6.2 用移液器吸取10 μ L配制好的末端修复&添加dA尾反应液加入步骤3.5.10的纯化后二链产物中，并轻轻吹打至少10次至完全混匀，瞬时离心将反应液（总体积50 μ L）收集至管底。
- 3.6.3 将步骤3.6.2所述PCR管置于PCR仪上，按照表3-14中的条件进行反应：

表 3-14 末端修复反应&添加 dA 尾反应条件

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 热盖 | On |
| 37°C | 15 min |
| 65°C | 15 min |
| 4°C | Hold |

3.6.4 瞬时离心将反应液收集至管底。



注意：不建议在此处停止，请继续做步骤 3.7。如果必须停止，末端修复产物可以放在-20°C 冰箱过夜，但产量可能会下降 20%左右。

3.7 接头连接



注意：因不同的投入量对应不同的 Adapter 使用量，操作前请仔细阅读附录 B

3.7.1 将Adapter按照表3-15稀释100倍，混匀离心，待用。

表 3-15 Adapter 稀释

| 组分 | 体积 |
|-----------|-------------------|
| Adapter | 1 μL |
| TE Buffer | 99 μL |
| Total | 100 μL |

3.7.2 在步骤3.6.4的PCR管中加入5 μL 对应的稀释后的Adapter，涡旋震荡3次，每次3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.7.3 在冰上配制接头连接反应液（见表3-16）：

表 3-16 接头连接反应液

| 组分 | 体积 |
|-----------------|--------------------|
| Ligation Buffer | 23.4 μL |
| DNA Ligase | 1.6 μL |
| Total | 25 μL |

3.7.4 用移液器缓慢吸取25 μL 配制好的接头连接反应液加入步骤3.7.2的PCR管中，涡旋震荡6次，每次3 s，瞬时离心将反应液（总体积80 μL ）收集至管底。

3.7.5 将步骤3.7.4所述PCR管置于PCR仪上，按照表3-17中的条件进行反应：

表 3-17 接头连接反应条件

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 热盖 | On |
| 23°C | 15 min |
| 4°C | Hold |

- 3.7.6 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.7.7 加入20 μ L TE Buffer至总体积100 μ L，全部转移到新的1.5 mL离心管中。

✓ **停止点：接头连接后产物可放置-20°C冰箱过夜储存，不超过16 h。**

3.8 连接产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录A。

- 3.8.1 提前30 min取出DNA Clean Beads置于室温，使用前充分震荡混匀。
- 3.8.2 用移液器吸取50 μ L DNA Clean Beads至步骤3.7.7的接头连接产物中，并轻轻吹打至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入1.5 mL离心管中。
- 3.8.3 室温孵育5 min。
- 3.8.4 瞬时离心，将1.5 mL离心管置于磁力架，静置2~5 min至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
- 3.8.5 保持1.5 mL离心管置于磁力架上，加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置30 s后小心吸取并丢弃上清。
- 3.8.6 重复步骤3.8.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.8.7 保持1.5 mL离心管固定于磁力架上，打开1.5 mL离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.8.8 将1.5 mL离心管从磁力架上取下，加入23 μ L TE Buffer进行DNA洗脱，用移液器轻轻吹打至少10次至完全混匀。室温下孵育5 min。
- 3.8.9 瞬时离心，将1.5 mL离心管置于磁力架上，静置2~5 min至液体澄清，将21 μ L上清液转移到新的0.2 mL PCR管中。

✓ **停止点：连接产物纯化后，可置-20°C冰箱储存。**

3.9 PCR 扩增



注意：因不同的投入量对应不同的 PCR 循环数，操作前请仔细阅读附录 C。

3.9.1 在冰上配制PCR反应液（见表3-18）：

表 3-18 PCR 反应液

| 组分 | 体积 |
|----------------|------------|
| PCR Enzyme Mix | 25 μ L |
| PCR Primer Mix | 4 μ L |
| Total | 29 μ L |

3.9.2 用移液器吸取29 μ L配制好的PCR反应液加入步骤3.8.9的PCR管中，涡旋震荡3次，每次3 s，瞬时离心将反应液（总体积50 μ L）收集至管底。

3.9.3 将步骤3.9.2所述PCR管置于PCR仪上，按照表3-19的条件进行PCR反应：

表 3-19 PCR 扩增反应条件

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|-------|----------|
| 热盖 | on | 1 循环 |
| 95°C | 3 min | |
| 95°C | 30 s | |
| 56°C | 30 s | 18~20 循环 |
| 72°C | 30 s | |
| 72°C | 5 min | 1 循环 |
| 4°C | Hold | |

3.9.4 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.5 吸取全部反应液转移到新的1.5 mL 离心管中。

3.10 PCR 产物纯化



注意：操作前请仔细阅读附录 A。

3.10.1 提前30 min取出DNA Clean Beads置于室温，使用前充分震荡混匀。

3.10.2 吸取60 μ L DNA Clean Beads至步骤3.9.5的50 μ L PCR产物中，用移液器轻轻吹打至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入1.5 mL离心管中。

3.10.3 室温孵育5 min。

3.10.4 瞬时离心，将1.5 mL离心管置于磁力架，静置2~5 min至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上

清。

- 3.10.5 保持1.5 mL离心管置于磁力架上，加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置30 s后小心吸取并丢弃上清。
- 3.10.6 重复步骤3.10.5，最后一次漂洗后尽量吸干管内液体，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，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 3.10.7 保持1.5 mL离心管固定于磁力架上，打开1.5 mL离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- 3.10.8 将1.5 mL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次至完全混匀。
- 3.10.9 室温下孵育5 min。
- 3.10.10 瞬时离心，将1.5 mL离心管置于磁力架上，静置2~5 min至液体澄清，将30 μ L上清液转移到新的1.5 mL离心管中。

✓ **停止点：PCR 纯化后产物，可置-20°C 冰箱储存。**

3.11 PCR 产物质检

- 3.11.1 使用Qubit® dsDNA HS Assay Kit或Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit等双链DNA荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对PCR纯化后产物进行定量。要求最终PCR产物的浓度 ≥ 2.5 ng/ μ L，如需将多个样本混合测序，建议根据MGIEasy DNA Adapters说明书使用规则设计混合方案（见附录B），在定量后进行不同Adapters样本混合，混合后总量为80 fmol，总体积 ≤ 20 μ L。
- 3.11.2 通过Bioanalyzer、Tapestation（Agilent Technologies）；LabChip® GX、GXII、GX Touch（PerkinElmer）；Fragment Analyzer™（Advanced Analytical）等基于电泳分离原理的设备对PCR纯化后产物进行片段分布检测。

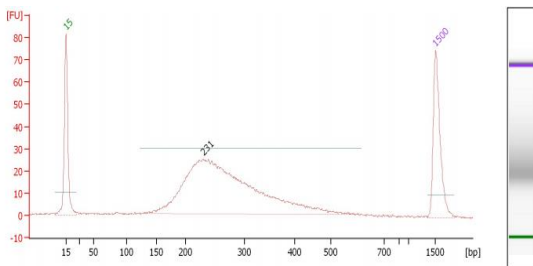


图 3-1 标准实验流程 PCR 纯化后产物 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

3.12 DNB 制备

- 3.12.1 取出文库、TE 缓冲液、DNB 制备缓冲液 (OS)、DNB 聚合酶混合液 (OS) 和 DNB 终止缓冲液，置于冰盒上约 0.5 h，待融化后，使用漩涡振荡器震荡混匀 5 s 后，短暂离心置于冰盒上备用。
- 3.12.2 初始文库 dsDNA 浓度 $\geq 2.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，然后根据下列公式换算成 ($\text{fmol}/\mu\text{L}$)：

$$C(\text{fmol}/\mu\text{L}) = \frac{c(\text{ng}/\mu\text{L}) * 10^6}{N * 2 * 327}$$

N 表示核苷酸平均数目 (文库总片段长度，包括 adaptor 序列长度)，c 表示文库浓度 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

dsDNA 文库投入量为 80 fmol，则每个 DNB 制备体系所需的文库投入量为：

$$\text{文库投入体积}(\mu\text{L}) = \frac{80 \text{ fmol}}{C(\text{fmol}/\mu\text{L})}$$

假设：

以 80 fmol 的投入量举例，如果是 250 bp 双链 DNA 产物 (插入片段+接头)，假设其浓度 c 为 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，单个脱氧核糖核苷酸的平均分子量为 327。则其物质的量浓度 C 计算如下：

$$C(\text{fmol}/\mu\text{L}) = (20 * 10^6) / (250 * 2 * 327) = 122.3 \text{ fmol}/\mu\text{L}$$

$$\text{文库投入体积}(\mu\text{L}) = 80 / 122.3 = 0.65 \mu\text{L}$$

- 3.12.3 取 80 fmol PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中，在冰上配制制备 DNB 体系 1 (见表 3-20)。

表 3-20 制备 DNB 体系 1

| 组分 | 体积 |
|----------------|--------------------|
| 文库 DNA | V μL |
| TE 缓冲液 | 20-V μL |
| DNB 制备缓冲液 (OS) | 20 μL |
| Total | 40 μL |

- 3.12.4 将步骤3.12.3所述PCR管涡旋震荡混匀，瞬时离心将反应液收集至管底，按照表3-21的条件进行反应：

表 3-21 制备 DNB 反应条件 1

| 温度 | 时间 |
|------|-------|
| 热盖 | On |
| 95°C | 3 min |
| 40°C | 3 min |
| 4°C | Hold |

- 3.12.5 取出DNB聚合酶混合液II (OS) 置于冰盒上，短暂离心5 s，置于冰盒上备用。



注意：请勿将 DNB 聚合酶混合液 II (OS) 置于室温，请勿长时间触碰管壁。

- 3.12.6 反应结束后，将PCR管瞬时离心使得反应液收集至管底。

- 3.12.7 在冰上配制制备DNB体系2（见表3-22）。

表 3-22 制备 DNB 体系 2


| 组分 | 体积 |
|--------------------|------------------|
| DNB 聚合酶混合液 I (OS) | 40 μL |
| DNB 聚合酶混合液 II (OS) | 4 μL |
| Total | 44 μL |


- 3.12.8 用移液器缓慢吸取44 μL 配制好的制备DNB体系2加入步骤3.12.5的PCR管中，涡旋震荡混匀，瞬时离心将反应液（总体积84 μL ）收集至管底。

- 3.12.9 将步骤3.12.7所述PCR管置于PCR仪上，按照表3-23中的条件进行反应：

表 3-23 制备 DNB 反应条件 2

| 温度 | 时间 |
|-----------|--------|
| 热盖 (35°C) | On |
| 30°C | 25 min |
| 4°C | Hold |

 **注意：**部分品牌 PCR 仪的热盖升降速度慢，在热盖升降过程中，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。

 **注意：**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。

3.12.10 当PCR仪温度达到4°C后立即加入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。

3.13 DNB 浓度测定

DNB制备完成后，用Qubit® ssDNA Assay Kit和Qubit®Fluorometer仪器进行浓度检测。浓度8 ng/ μL 以上为合格，浓度不合格的需重新制备。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。如浓度超过40 ng/ μL ，需要用DNB加载缓冲液稀释至20 ng/ μL 后使用。DNB可置于4°C保存备用（48小时内使用）。


3.14 DNB 加载、准备测序试剂槽及上机测序

DNB加载、准备测序试剂槽和上机测序的相关操作请参考对应的测序试剂套装使用说明书。

《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》

《DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装使用说明书》

 **使用 DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒制备的 DNB 在制备 DNB 加载体系的过程中，无需添加 DNB 聚合酶混合液 II (LC)，其他步骤均遵循相应测序试剂套装说明书。**

附录

附录 A 关于磁珠及纯化

磁珠推荐使用套装内的MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒（MGI, Cat. No. 1000005278或1000005279）的DNA Clean beads或自行购买的AMPure® XP（Agencourt, Cat. No. A63882）进行磁珠纯化。如果使用其他来源磁珠，纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前注意事项

- 磁珠使用前，提前 30 min 从 4°C 取出，涡旋混匀且置于室温，使其平衡至室温，有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吹打，确保充分混匀。

磁珠操作注意事项

- 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发，应用 TE Buffer 补齐体积，再用推荐磁珠用量进行纯化，以保证乘数正确，条带正确。
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，一般需要 2~3 min。但由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间有时可能需要延长，以液体彻底澄清为准。
- 磁珠与液体分离时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留 2~3 μL 液体，避免吸到磁珠。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。
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80%乙醇。漂洗过程中 1.5 mL 离心管应始终置于磁力架中，请勿扰动磁珠。
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将 1.5 mL 离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管中液体吸干。
- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成无水乙醇残留影响后续反应，过分干燥（磁珠开裂）又会降低纯化得率。通常情况下，室温干燥需要 5~10 min，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察，磁珠表面无反光，即可进行产物洗脱，可用试剂盒附带的 TE Buffer 进行洗脱。
- 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应，所以，洗脱体积应该比最终吸取上清的体积多 2 μL 。
- 在 1.5 mL 管磁力架上开关管盖应小心，避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住 1.5 mL 离心管中下段，然后开盖。

附录 B 关于 Adapter 使用

- 本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。为保证最佳效果，使用时请仔细阅读附录 B-1 和 B-2 的使用规则。同时，两款 Adapter 试剂盒编号存在重叠，编号相同的 Adapter，Barcode 碱基序列相同，不能在同一条 lane 中测序。
- 请勿将其置于室温以上的温度，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，用吸水纸擦拭干净管盖或铝箔表面；对于管式 Adapters 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 Adapters，第一次使用时建议用移液器吸头刺穿铝箔直接吸取液体，使用过程中注意更换吸头，避免污染，使用完毕后，刺破孔位的剩余试剂需逐一转移到 1.5 mL 离心管或 0.2 mL PCR 管中，做好标记，-20°C 保存。
- 若有使用 MGI 其它建库试剂盒中的序号为 501-596 的接头，由于设计工艺不同，禁止混用，否则数据无法拆分。
- Adapter 的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。请按照表 B-1 和实际 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 B-1 不同 total RNA 投入量推荐 Adapter 使用量

| 样本 RNA (ng) | MGI Adapter | MGI Adapter |
|----------------|-------------|-------------|
| | 稀释倍数 | 稀释后投入量 (μL) |
| 201-1000 | 5 | 5 |
| 51-200 | 10 | 5 |
| 10-50 | 20 | 5 |
| <10 | 100 | 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。

B-1 MGIEasy DNA Adapters-16（管式）试剂盒使用规则

- 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：

表 B-2 MGI Easy DNA Adapters-16 (管式) 试剂盒使用规则

| 样本数 /lane | 使用方法 (举例) |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中 或 2、加一组 8 Adapter (97-104), 将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中 |
| 2 | 需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 每个编号 Adapter 取等体积, 两两组合, 混合成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如 01-04, 将 01 和 02 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 03 和 04 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中) 或 2、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix, 形成 2 份等体积 mix, 分别加入 2 个样本中 (如将 97-100 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中, 将 101-104 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中) |
| 3 | 需至少使用 2 组 Adapter: 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, 注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter |
| 4 | 需至少使用 1 组 Adapter: 1、加一组 4 Adapter (如 01-04), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入 4 个样本中 (如 01-04, 将 01、02、03、04 分别依次加样本 1、2、3、4 中) 或 2、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 两两组合, 混合成 4 份等体积 mix, 分别加入 4 个样本中 (如 将 97-98、99-100、101-102、103-104 分别等体积混合成 4 份 mix 后, 分别依次加入样本 1、2、3、4 中) |
| 5 | 需至少使用 2 组 Adapter: 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, 注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter |
| 6 | 需至少使用 2 组 Adapter: 样本 1-4 采用上述 (4 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter |

| | |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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) 方法加一组 Adapter, 2) 样本 5-6 采用上述 (2 样本数/lane) 方法加一组 Adapter, 3) 样本 7, 使用剩余的一组 Adapter, 可以加该组内一个单 Adapter, 或者加组内所有编号 Adapter 取等体积混合成的 Adapter mix <p>注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter</p> |
| 8 | <p>需至少使用 1 组 Adapter:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、加一组 8 Adapter (97-104), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本 或 2、选取两组 4 Adapter (01-04 和 13-16), 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本加 1 个 Adapter |

- 当样本数据量要求不相同时, 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: 8 个样本使用 Adapter 97-104, 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。

B-2 MGIEasy DNA Adapters-96 (板式) 试剂盒使用规则

- 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 B-1 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（图 B-1 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（图 B-1 蓝色框）；

24 个 Adapter 成组：第 10-12 列，共计 1 组（图 B-1 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如下表所示的推荐 Barcode 组合方案：

表 B-3 MGI Easy DNA Adapters-96（板式）试剂盒使用规则

| 样本数/lane | 使用方法（举例） |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），将 4 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中； 或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），将 8 个 Adapter 取等体积混合成 mix 后加入样本中。 |
| 2 | 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如 01-04，将 01 和 02 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 03 和 04 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中）； 或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，每 4 个编号 Adapter 混合成 1 份 mix，形成 2 份等体积 mix，分别加入 2 个样本中（如 41-48，将 41-44 等体积混合成 mix 后加入样本 1 中，将 45-48 等体积混合成 mix 后加入样本 2 中）。 |
| 3 | 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，注意样本 1、2 与样本 3 需使用不同组别的 Adapter。 |
| 4 | 1、加一组 4 Adapter（如 01-04），每个编号 Adapter 取等体积，分别加入 4 个样本中（如 01-04，将 01、02、03、04 分别依次加样本 1、2、3、4 中）； 或 2、加一组 8 Adapter（如 41-48），每个编号 Adapter 取等体积，两两组合，混合成 4 份等体积 mix，分别加入 4 个样本中（如 41-48，将 41-42、43-44、45-46、47-48 分别等体积混合成 4 份 mix 后，分别依次加入样本 1、2、3、4 中）。 |
| 5 | 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，注意样本 1-4 与样本 5 需使用不同组别的 Adapter。 |
| 6 | 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，注意样本 1-4 与样本 5-6 需使用不同组别的 Adapter。 |
| 7 | 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，注意样本 1-4、样本 5-6、样本 7 需使用不同组别的 Adapter。 |

| | |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8 | 加一组 8 Adapter (如 41-48), 每个编号 Adapter 取等体积, 分别加入每个样本。 |
| 8n+x (n=1、2、 x=1-8, 总 计 9-24 个) | 分三步: 1) 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、4-8 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 注意: 上述 1)、2)、3) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter |
| 8n+x (3≤n<11, x=1-8, 总 计 25-96 个) | 分三步: 1) 样本 1-24, 加一组 24 Adapter, 每个编号 Adapter 取等体积, 每个样本中加 1 个编号 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 注意: 上述 1)、2)、3) 每组样本间需使用不同组别的 Adapter |

- 当样本数据量要求不相同, 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: 8 个样本使用 Adapter 97-104, 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 97-104 以外的成组 Adapter。

附录 C 关于接头连接和 PCR 反应

- 接头连接反应液溶液较粘稠，移液器操作时请慢吸慢放，确保加液量正确。
- PCR 步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，可能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。表 C-1 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 C-1 推荐的扩增循环数

| total RNA (ng) | 对应产量所需循环数 |
|----------------|-----------|
| | ≥ 300 ng |
| <10 | 19~20 |
| 10 | 17~18 |
| 50 | 15~16 |
| 200 | 13~14 |
| 1000 | 11~12 |

联系我们

生产企业: 深圳华大智造科技股份有限公司

生产地址: 深圳市盐田区北山工业区综合楼及 11 栋 2 楼

客服电话: 4000-966-988

技术支持: MGI-service@mgi-tech.com

网 址: www.mgi-tech.com



官方微信