

# VAHTS® Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina

NR604-01/02



**Vazyme Biotech Co., Ltd.**

Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Tel: 400-600-9335

Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



ISO 9001: 2015



[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Vazyme biotech co., ltd.

**使用说明书**

Version 9.2

# 目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	03
06/注意事项	04
07/实验流程概要	05
08/ Poly(A)法构建普通mRNA文库	07
09/ Poly(A)法构建链特异mRNA文库	12
10/ rRNA Depletion法构建链特异转录组文库	18
附录一：分选方案	25
附录二：FFPE样本或其他降解样本处理说明	27
附录三：常见问题及解决方案	29

## 01/产品概述

VAHTS® Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina是针对Illumina高通量测序平台定向开发的转录组文库构建专用试剂盒。试剂盒包含两种类型的cDNA二链合成Buffer，可根据需要选择进行普通转录组或链特异转录组建库。

试剂盒将二链合成、末端修复和dA-Tailing合并为一步，中间不需要纯化步骤，极大的简化了操作流程，缩短了建库时间。优化的反应体系，提高了文库转化效率，能兼容更低起始投入量，对不同起始量的RNA都有均一的覆盖度。

本试剂盒利用磁珠分选的方式，可以快速获得特定长度的文库，能够满足不同实验的个性化需求。试剂盒包含的所有酶和缓冲液都经过了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。

## 02/产品组分

组分	NR604-01 (24 rxn)	NR604-02 (96 rxn)
■ Frag/Prime Buffer	468 µl	2 × 936 µl
■ Actinomycin D (5mg/ml)	24 µl	96 µl
■ 1st Strand Buffer 2	144 µl	576 µl
■ 1st Strand Enzyme Mix 2	48 µl	192 µl
■ 2nd Strand Buffer 2 (with dNTP)	600 µl	4 × 600 µl
■ 2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)	600 µl	4 × 600 µl
■ 2nd Strand Enzyme Super Mix	360 µl	2 × 720 µl
■ Rapid Ligation Buffer 3	600 µl	4 × 600 µl
■ Rapid DNA Ligase 2	120 µl	480 µl
■ PCR Primer Mix 3	120 µl	480 µl
■ VAHTS HiFi Amplification Mix	600 µl	4 × 600 µl
■ Heat-labile UDG	24 µl	96 µl

## 03/保存条件

-30 ~ -15°C保存；-20 ~ 0°C运输。

## 04/适用范围

VAHTS® Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina适用于完整度良好的动、植物及真菌等真核生物总RNA经Poly(A)法富集mRNA或总RNA经rRNA去除后的RNA文库构建。不同样品的总RNA中mRNA的含量差异较大，若总RNA起始投入量过低，则不能确保得到足够的mRNA用于后续文库构建实验。起始量与mRNA富集模块有关：

VAHTS® mRNA Capture Beads (Vazyme #N401): 0.05 - 4 µg

Ribo-off® rRNA Depletion Kit (H/M/R) (Vazyme #N406): 0.05 - 1 µg

Ribo-off® rRNA Depletion Kit (Bacteria) (Vazyme #N407): 1 - 5 µg

Ribo-off® rRNA Depletion Kit (Plant) (Vazyme #N409): 1 - 5 µg

Total RNA样本可用Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer进行质检, 检测其完整度, 使用VAHTS® mRNA Capture Beads (Vazyme #N401)进行mRNA富集必须为高质量的RNA样本 (RIN ≥ 7), 降解的样本会发生RNA断裂, 建库会引入3'偏好。针对RIN值 < 7的RNA样本可使用Ribo-off的方法(Vazyme #N406/407/409)进行rRNA去除。

针对RNA的分析主要包括以下几个方面:

- ◇ 基因表达(gene expression analysis);
- ◇ 单核苷酸变异(single nucleotide variation calling);
- ◇ 可变剪切(alternative splicing detection);
- ◇ 融合基因(gene fusion detection);
- ◇ 目标转录组分析(target transcriptome analysis)。

## 05/自备材料

- ◇ RNA评价:
  - Equalbit® RNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ211);
  - Equalbit® RNA BR Assay Kit (Vazyme #EQ212);
  - Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent #5067-1513);
- ◇ mRNA富集:
  - VAHTS® mRNA Capture Beads (Vazyme #N401)
  - Ribo-off® rRNA Depletion Kit (H/M/R) (Vazyme #N406)
  - Ribo-off® rRNA Depletion Kit (Bacteria) (Vazyme #N407)
  - Ribo-off® rRNA Depletion Kit (Plant) (Vazyme #N409)
- ◇ 纯化磁珠:
  - VAHTS® DNA Clean Beads (Vazyme #N411)或Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman #A63880/A63881/A63882);
  - VAHTS® RNA Clean Beads (Vazyme #N412)或Agencourt RNAClean XP Beads (Beckman #A63987);
- ◇ 连接接头:
  - VAHTS® RNA Adapters set 1/2 for Illumina (Vazyme #N803/N804)
  - 或VAHTS® RNA Adapters set 3 - set 6 for Illumina (Vazyme #N809/N810/N811/N812)
  - 或VAHTS® RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324);
- ◇ 文库质检:
  - Equalbit® dsDNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ111);
  - Agilent DNA 1000 Kit (Agilent #5067-1504)或Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent #5067-4626)

- ◇ 其他材料:
  - 80%乙醇(现配)、Nuclease-free H<sub>2</sub>O; 低吸附Nuclease-free PCR管及吸头、离心管;
  - PCR仪、磁力架、Qubit、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品。

## 06/注意事项

### 06-1/RNA样品质检

为保证建库质量, 在实验开始前必须对RNA样品进行质检, RNA样品总量、纯度须满足以下条件:

- ◇ 总RNA模板的起始投入量应≥ 50 ng, 若起始投入量过低, 不能确保得到足够的mRNA用于后续文库构建。
- ◇ OD260/OD280比值应介于1.8 - 2.1之间, 若比值 > 2.1则RNA样品中可能有基因组污染, 若比值 < 1.8则可能有蛋白质污染; OD230/OD260比值应介于0.4 - 0.5之间, 若比值 > 0.5则可能RNA样品中有盐或小分子杂质污染, 比值 < 0.4可能有基因组污染。

### 06-2/RNA样品准备

- ◇ 混匀含RNA样品的溶液时应小心操作, 轻柔吹打, 切勿涡旋振荡, 否则会使RNA断裂, 影响文库片段大小;
- ◇ 经Poly(A)法富集的mRNA或去除rRNA后的RNA应尽快进行后续操作, 避免RNA降解。
- ◇ 如果RNA的初始浓度较低时, 可使用冻干、乙醇沉淀、过柱回收或VAHTS® RNA Clean Beads (Vazyme #N412)磁珠纯化等方法浓缩RNA。

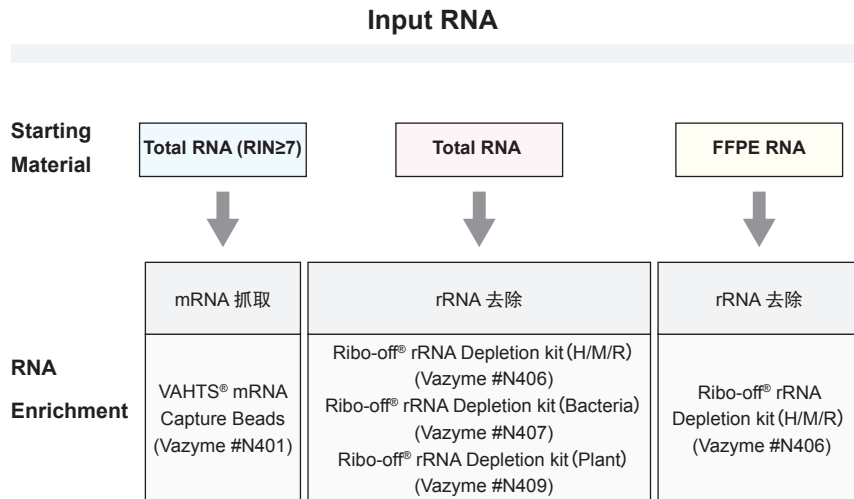
### 06-3/DNA纯化磁珠的注意事项

- ◇ 磁珠从2 ~ 8°C取出后应平衡至室温, 否则影响磁珠的抓取效率。
- ◇ 每次吸取磁珠前都应将其涡旋振荡充分混匀。
- ◇ 样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 待溶液彻底澄清后再吸取上清, 吸取上清时应预留2 - 3 µl。若不慎吸到磁珠, 会造成得率下降、分选效果不佳等问题, 甚至影响后续酶反应, 此时可将磁珠混匀重新置于磁力架上再次分离即可。由于磁力架吸力不同等原因, 默认分离时间有时可能需要延长, 以彻底分离磁珠和液体。
- ◇ 使用新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 久置的80%乙醇会导致杂质残留以及文库产出降低。漂洗过程中EP管应始终置于磁力架中, 请勿扰动磁珠。
- ◇ 第二遍80%乙醇漂洗磁珠操作, 应尽量吸干上清, 减少杂质残留。
- ◇ 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应; 过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下, 室温干燥5 - 10 min足以让磁珠充分干燥, 请勿加热干燥(如置于37°C烘箱干燥)。

## 06-4/操作过程注意事项

- ◇ 使用前请将试剂盒各组份置于冰上解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
- ◇ 建议使用带滤芯的吸头，在吸取不同样品时更换吸头。
- ◇ 在二链合成前使用的耗材必须为RNase-free，二链合成及之后为DNase-free。
- ◇ 实验过程中务必使用新鲜的Nuclease-free H<sub>2</sub>O，建议分装至小管中逐个取用，用后弃去。
- ◇ 务必佩戴手套操作，接触RNase-free空间外设备或其他工作区间后，请更换手套。
- ◇ 所有的试剂使用后务必立即盖上盖子，避免污染。
- ◇ 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。
- ◇ PCR产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，我们推荐将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，以保证实验环境的洁净度。
- ◇ 实验过程中如需暂停，请严格按照使用方法中注明的可停放点将样品放置于合适的温度下保存，不正确存放可能会降低建库成功率。

## 07/实验流程概要



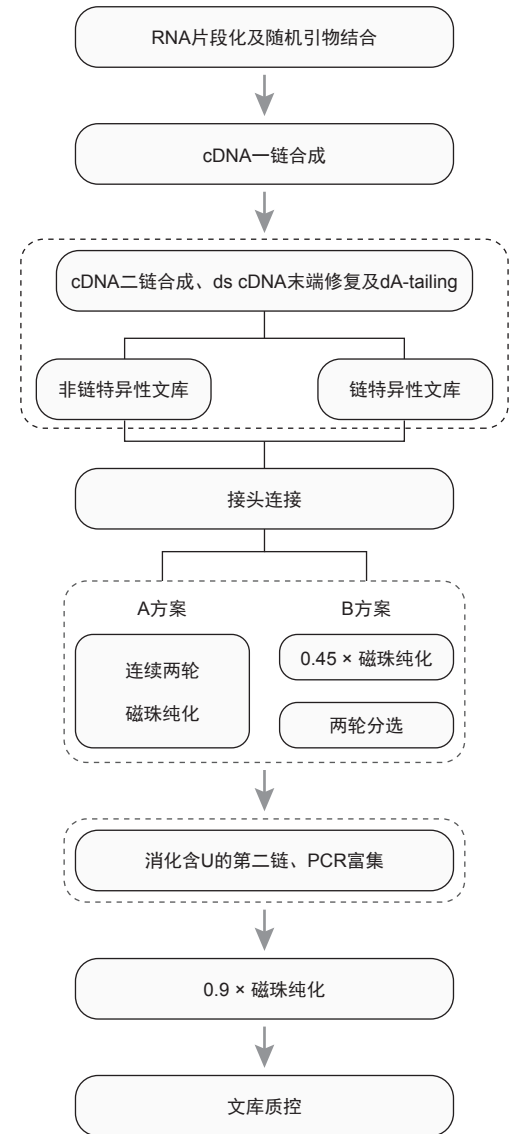
## cDNA Library Preparation

- ◆ cDNA二链合成、ds cDNA末端修复及dA-tailing整合为一步，大大缩短建库时长；同时提供链特异性和非链特异性文库构建方案。

- ◆ 片段分选
  - A方案：连续两轮纯化，获得150 - 200 bp插入片段。
  - B方案：先纯化，再进行两轮分选，插入片段长度可以个性化选择。

- ◆ 链特异性文库使用UDG酶消化含U的第二链，然后进行PCR扩增富集文库；非链特异性文库直接进行PCR扩增富集文库。

- 🕒 同时构建8个文库，完成全部操作总耗时约4 - 5 h。



## 08/Poly (A) 法构建普通mRNA文库

以使用VAHTS® mRNA Capture Beads (Vazyme #N401)进行mRNA富集为例, 本方案适用于起始模板量为0.05 - 4 µg完整度良好的动、植物及真菌等真核生物的总RNA的普通转录组文库构建。

### 08-1/mRNA分离与片段化

1. 提前将mRNA Capture Beads, Beads Wash Buffer, Tris Buffer, Beads Binding Buffer从2 ~ 8°C取出, 静置使其平衡至室温。
2. 准备RNA样品: 将0.05 - 4 µg总RNA溶解于Nuclease-free H<sub>2</sub>O至总体积50 µl, 冰上放置备用。
3. 缓慢颠倒使mRNA Capture Beads充分混匀, 吸取50 µl加入到准备好的RNA样品中, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。  
▲ mRNA Capture Beads、Beads Wash Buffer和Beads Binding Buffer含去污剂, 混匀时请勿高速涡旋或剧烈振荡, 使用移液器吸打时避免起泡。
4. 在PCR仪中运行如下程序, 使mRNA与磁珠进行第一次结合:
 

温度	时间
65°C	5 min
25°C	5 min
5. 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
6. 将样品从磁力架上取出, 加入200 µl Beads Wash Buffer重悬磁珠, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀并置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。  
▲ 步骤4-6为第一轮mRNA分离纯化, 步骤7-12为第二轮mRNA分离纯化, 以保证rRNA的去除效率。  
▲ 对于某些特殊样本, 为保证rRNA的去除效率, 可重复步骤6再清洗一次。
7. 将样品从磁力架上取下, 加入50 µl Tris Buffer用移液器轻轻吸打10次将磁珠充分混匀。
8. 在PCR仪中运行如下程序, 洗脱mRNA:
 

温度	时间
80°C	2 min
25°C	Hold
9. 加入50 µl Beads Binding Buffer, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
10. 室温放置5 min, 使mRNA结合到磁珠上。
11. 将样品置于磁力架上, 使mRNA与总RNA分离, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
12. 将样品从磁力架上取出, 加入200 µl Beads Wash Buffer重悬磁珠, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀并置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。  
▲ 务必保证将残留液体吸干净, Beads Wash Buffer移除不彻底将影响mRNA片段化效果。

13. 将样品从磁力架上取出, 加入19.5 µl Frag/Prime Buffer重悬磁珠, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。将样品置于PCR仪中, 根据插入片段大小的需要, 选择片段化条件:

插入片段大小(bp)	温度	时间
150 - 200	94°C	8 min, 4°C hold
200 - 300	94°C	5 min, 4°C hold
250 - 450	85°C	6 min, 4°C hold
450 - 550	85°C	5 min, 4°C hold

▲ 从片段化到第一链cDNA合成过程中不可停留, mRNA在该体系下容易降解。

▲ 可提前将08-2 (步骤1)需要的组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上放置备用。

14. 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心吸取17 µl上清至一个新的Nuclease-free PCR管中, 立刻进行第一链cDNA合成反应。

### 08-2/双链cDNA合成

1. 将双链cDNA合成所需组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上溶解, 上下颠倒混匀, 短暂离心收集于管底, 按下表配制第一链cDNA合成反应体系:
 

组分	体积
Fragmented mRNA	17 µl
1st Strand Buffer 2	6 µl
1st Strand Enzyme Mix 2	2 µl
Total	25 µl
2. 将移液器调至20 µl量程, 并轻轻吸打10次充分混匀。  
▲ 如同时进行多个样品的操作, 可选择先在大小合适的离心管中预配制1st Strand Buffer 2和1st Strand Enzyme Mix 2的混合液再分装到各PCR管中, 建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。
3. 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应:

温度	时间
热盖105°C	On
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	Hold

▲ 结束后立刻进行第二链cDNA合成反应。

▲ 可提前将步骤4需要的组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上放置备用。

4. 按下表配制第二链cDNA合成反应体系:

组分	体积
1st Strand cDNA	25 µl
2nd Strand Buffer 2 (with dNTP)*	25 µl
2nd Strand Enzyme Super Mix	15 µl
Total	65 µl

▲ 做普通转录组时, 所使用的为2nd Strand Buffer 2 (with dNTP), 勿使用2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)。

▲ 如同时进行多个样品的操作, 可选择先在大小合适的离心管中预配制2nd Strand Buffer 2 (with dNTP)和2nd Strand Enzyme Super Mix的混合液再分装到各PCR管中, 建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

- 将移液器调至50  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。
- 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应：

温度	时间
热盖 105°C	On
16°C	30 min
65°C	15 min
4°C	Hold

▲可提前将步骤08-3需要的组分从-30 ~ -15°C取出，冰上放置备用。

### 08-3/接头连接

- 按下表中配制如下连接体系：

组分	体积
ds cDNA	65 $\mu$ l
Rapid Ligation buffer 3	25 $\mu$ l
Rapid DNA Ligase 2	5 $\mu$ l
RNA Adapter*	x $\mu$ l
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	To 100 $\mu$ l

▲ Rapid Ligation buffer 3与Rapid DNA ligase 2预混后，可于2 ~ 8°C存放不超过24 h。

▲建议先将RNA adapter加入到ds cDNA中，充分混匀，再加入Rapid Ligation Buffer 3与Rapid DNA Ligase 2的混合液。

▲若使用VAHTS® RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324)，则RNA adapter都为其中配套的RNA adapter-S for Illumina组分。

接头使用量如下表所示：

Total RNA起始量	接头体积
1 - 4 $\mu$ g	5 $\mu$ l
100 - 999 ng	2 $\mu$ l
50 - 99 ng	0.8 $\mu$ l

- 将移液器调至80  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。
- 在PCR仪中进行连接反应：

温度	时间
热盖 105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

▲可提前将08-4需要的VAHTS DNA Clean Beads从2 ~ 8°C取出，室温放置备用。

 连接产物可在2 ~ 8°C暂存1 h。

### 08-4/产物纯化

本方案适用于mRNA片段化条件为94°C 8 min，获得插入片段长度约150 - 200 bp的文库。

▲若需得到200 bp以上的不同插入片段的方案，参考附录一的分选方案

- 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8°C取出，静置使其平衡至室温。
- 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取45  $\mu$ l (0.45  $\times$ )加入到连接产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
- 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
- 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠)，室温孵育30 sec，小心移除上清。
- 重复步骤5一次。
- 保持样品处于磁力架上，在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。  
▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。  
▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。  
▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
- 将样品从磁力架上取出，加入52.5  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取50  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
- 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取50  $\mu$ l (1  $\times$ )加入到上一步纯化产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
- 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
- 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
- 重复步骤12一次。
- 保持样品始终处于磁力架上，在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。  
▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。  
▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。  
▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
- 将样品从磁力架上取出，加入22.5  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取20  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，立刻进行PCR。  
▲转移上清时切勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库产量。  
▲可提前将08-5 (步骤1)需要的组分从-30 ~ -15°C取出，冰上放置备用。



## 08-5/文库扩增

### 1. 按下表配制PCR反应体系:

组分	体积
纯化过的接头连接产物	20 $\mu$ l
PCR Primer Mix 3	5 $\mu$ l
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

▲本反应体系适用于VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 1/2 for Illumina (Vazyme #N803/N804) 或VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 3 - set 6 for Illumina (Vazyme #N809/N810/N811/N812)。

▲当使用VAHTS<sup>®</sup> RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324)时, 则引物需使用其中配套的 i5 PCR Primer RM5XX和i7 PCR Primer RM7XX, 每种引物使用量为2.5  $\mu$ l。

▲如同时进行多个样品的操作, 可选择先在大小合适的离心管中预配制混合液再分装到各PCR管中, 建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

### 2. 将移液器调至30 $\mu$ l量程, 并轻轻吸打10次充分混匀。

### 3. 将样品置于PCR仪中, 进行文库扩增反应:

步骤	温度	时间	循环数
热盖	105 $^{\circ}$ C	On	
预变性	98 $^{\circ}$ C	30 sec	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10 sec	10 - 17
退火	60 $^{\circ}$ C	30 sec	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 sec	
完全延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1
	4 $^{\circ}$ C	Hold	

从不同物种和个体提取的等量总RNA中, mRNA的含量有较大差异。根据物种实际情况, 可适当调整PCR循环数, 一般为10 - 17个循环。

Total RNA起始量	扩增循环数
2 - 4 $\mu$ g	10 - 12
1 - 2 $\mu$ g	12 - 13
100 - 999 ng	14 - 15
50 - 99 ng	16 - 17

### 4. PCR产物纯化:

- 1/ 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8 $^{\circ}$ C取出, 静置使其平衡至室温。
- 2/ 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀, 吸取45  $\mu$ l (0.9  $\times$ )加入到PCR产物中, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 3/ 室温孵育10 min, 使DNA结合到磁珠上。
- 4/ 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
- 5/ 保持样品处于磁力架上, 加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育30 sec, 小心移除上清。
- 6/ 重复步骤5/一次。

### 7/ 保持样品处于磁力架上, 在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。

- ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
- ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
- ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。

### 8/ 将样品从磁力架上取出, 加入25 $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀, 室温静置2 min后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心吸取22.5 $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。

- ▲转移上清时请勿吸取磁珠, 即使微量残留都将影响后续文库质量的分析。

### 5. 用Agilent 2100 Bioanalyzer评价文库质量

取1  $\mu$ l纯化后的PCR产物, 用Agilent DNA 1000 kit (Agilent, Cat.No.5067-1504)分析。良好的文库应在预计大小的位置有一个较窄的峰, 如图1-A/B所示。如果在128 bp左右出现峰, 则提示文库中有adapter-dimer污染。此时, 将文库用Nuclease-free H<sub>2</sub>O稀释至50  $\mu$ l, 重复步骤08-5 (步骤4)再次纯化PCR产物。

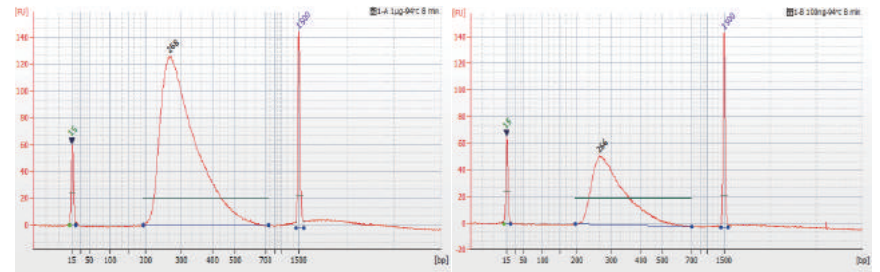


图1-A/B 1  $\mu$ g/100 ng 293T细胞RNA, 片段化条件为94 $^{\circ}$ C 8 min, 并用0.45  $\times$ 1.0  $\times$  VAHTS DNA Clean Beads两轮纯化。

## 09/Poly(A) 法构建链特异mRNA文库

以使用VAHTS<sup>®</sup> mRNA Capture Beads (Vazyme #N401)进行mRNA富集为例, 本方案适用于起始模板量为0.05 - 4  $\mu$ g完整性良好的动、植物及真菌等真核生物的总RNA的链特异转录组文库构建。

### 09-1/mRNA分离与片段化

1. 提前将mRNA Capture Beads, Beads Wash Buffer, Tris Buffer, Beads Binding Buffer从2 ~ 8 $^{\circ}$ C取出, 静置使其平衡至室温。
2. 准备RNA样品: 将0.05 - 4  $\mu$ g总RNA溶解于Nuclease-free H<sub>2</sub>O至总体积50  $\mu$ l, 冰上放置备用。
3. 缓慢颠倒使mRNA Capture Beads充分混匀, 吸取50  $\mu$ l加入到准备好的RNA样品中, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。

▲mRNA Capture Beads、Beads Wash Buffer和Beads Binding Buffer含去污剂，混匀时请勿高速涡旋或剧烈振荡，使用移液器吸打时避免起泡。

4. 在PCR仪中运行如下程序，使mRNA与磁珠进行第一次结合：

温度	时间
65°C	5 min
25°C	5 min

5. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
6. 将样品从磁力架上取出，加入200  $\mu$ l Beads Wash Buffer重悬磁珠，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀并置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。  
▲步骤4-6为第一轮mRNA分离纯化，步骤7-12为第二次mRNA分离纯化，以保证rRNA的去除效率。  
▲对于某些特殊样本，为保证rRNA的去除效率，可重复步骤6再清洗一次。
7. 将样品从磁力架上取下，加入50  $\mu$ l Tris Buffer用移液器轻轻吸打10次将磁珠充分混匀。
8. 在PCR仪中运行如下程序，洗脱mRNA：

温度	时间
80°C	2 min
25°C	Hold

9. 加入50  $\mu$ l Beads Binding Buffer，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
10. 室温放置5 min，使mRNA结合到磁珠上。
11. 将样品置于磁力架上，使mRNA与总RNA分离，待溶液变澄清后(约5 min)，小心移除上清。
12. 将样品从磁力架上取出，加入200  $\mu$ l Beads Wash Buffer重悬磁珠，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀并置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。  
▲务必保证将残留液体吸干净，Beads Wash Buffer移除不彻底将影响mRNA片段化效果。
13. 将样品从磁力架上取出，加入18.5  $\mu$ l Frag/Prime Buffer重悬磁珠，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。将样品置于PCR仪中，根据插入片段大小的需要，选择片段化条件：

插入片段大小(bp)	温度	时间
150 - 200	94°C	8 min, 4°C hold
200 - 300	94°C	5 min, 4°C hold
250 - 450	85°C	6 min, 4°C hold
450 - 550	85°C	5 min, 4°C hold

▲从片段化到第一链cDNA合成过程中不可停留，mRNA在该体系下容易降解。

▲可提前将09-2 (步骤1)需要的组分从-30 ~ -15°C取出，冰上放置备用。

14. 将样品置于磁力架上，待溶液变澄清后(约5 min)，小心吸取16  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，立刻进行第一链cDNA合成反应。

## 09-2/双链cDNA合成

将双链cDNA合成所需组分从-30 ~ -15°C取出，冰上溶解，上下颠倒混匀，短暂离心收集于管底，并冰上放置备用。

1. 按下表将Actinomycin D (5 mg/ml)稀释至0.12 mg/ml：

组分	体积
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	48.8 $\mu$ l
Actinomycin D (5 mg/ml)	1.2 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

▲稀释的Actinomycin D溶液对光非常敏感，且会逐渐吸附在塑料和玻璃的表面。因此未用完的Actinomycin D稀释液应丢弃。

2. 按下表配制第一链cDNA合成反应体系：

组分	体积
Fragmented mRNA	16 $\mu$ l
Actinomycin D (0.12 mg/ml)	1 $\mu$ l
1st Strand Buffer 2	6 $\mu$ l
1st Strand Enzyme Mix 2	2 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

3. 将移液器调至20  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。  
▲如同时进行多个样品的操作，可选择先在大小合适的离心管中预配制1st Strand Buffer 2和1st Strand Enzyme Mix 2的混合液再分装到各PCR管中，建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。
4. 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应：

温度	时间
热盖105°C	On
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	Hold

▲结束后立刻进行第二链cDNA合成反应。

▲可提前将步骤5需要的组分从-30 ~ -15°C取出，冰上放置备用。

5. 按下表配制第二链cDNA合成反应体系：

组分	体积
1st Strand cDNA	25 $\mu$ l
2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)*	25 $\mu$ l
2nd Strand Enzyme Super Mix	15 $\mu$ l
Total	65 $\mu$ l

▲做链特异转录组时，所使用的为2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)，勿使用2nd Strand Buffer 2 (with dNTP)。

▲如同时进行多个样品的操作，可选择先在大小合适的离心管中预配制2nd Strand Buffer 2(with dUTP)和2nd Strand Enzyme Super Mix的混合液再分装到各PCR管中，建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

6. 将移液器调至50  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。



## 7. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应:

温度	时间
热盖105°C	On
16°C	30 min
65°C	15 min
4°C	Hold

▲可提前将步骤09-3需要的组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上放置备用。

## 09-3/接头连接

## 1. 按下表中配制如下连接体系:

组分	体积
ds cDNA	65 µl
Rapid Ligation buffer 3	25 µl
Rapid DNA Ligase 2	5 µl
RNA Adapter*	x µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	To 100 µl

▲Rapid Ligation buffer 3与Rapid DNA ligase 2预混后, 可于2 ~ 8°C存放不超过24 h。

▲建议先将RNA adapter加入到ds cDNA中, 充分混匀, 再加入Rapid Ligation Buffer 3与Rapid DNA Ligase 2的混合液。

▲若使用VAHTS® RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324), 则RNA adapter都为其中配套的RNA adapter-S for Illumina。

接头使用量如下表所示:

Total RNA起始投入量	接头体积
1 - 4 µg	5 µl
100 - 999 ng	2 µl
50 - 99 ng	0.8 µl

## 2. 将移液器调至80 µl量程, 并轻轻吸打10次充分混匀。

## 3. 在PCR仪中进行连接反应:

温度	时间
热盖105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

▲可提前将09-4需要的VAHTS DNA Clean Beads从2 ~ 8°C取出, 室温放置备用。



连接产物可在2 ~ 8°C暂存1 h。

## 09-4/产物纯化

本方案适用于mRNA片段化条件为94°C 8 min, 获得插入片段长度约150 - 200 bp的文库。

▲若需得到200 bp以上的不同插入片段的方案, 参考附录一的分选方案

- 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8°C取出, 静置使其平衡至室温。
- 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀, 吸取45 µl (0.45 ×)加入到连接产物中, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 室温孵育10 min, 使DNA结合到磁珠上。
- 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
- 保持样品处于磁力架上, 加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠), 室温孵育30 sec, 小心移除上清。
- 重复步骤5一次。
- 保持样品处于磁力架上, 在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10 µl移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
- 将样品从磁力架上取出, 加入52.5 µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀, 室温静置2 min后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心吸取50 µl上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
- 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀, 吸取50 µl (1 ×)加入到上一步纯化产物中, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 室温孵育10 min, 使DNA结合到磁珠上。
- 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
- 保持样品处于磁力架上, 加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育30 sec, 小心移除上清。
- 重复步骤12一次。
- 保持样品始终处于磁力架上, 在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10 µl移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
- 将样品从磁力架上取出, 加入21.5 µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀, 室温静置2 min后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心吸取19 µl上清至一个新的Nuclease-free PCR管中, 立刻进行PCR。
  - ▲转移上清时切勿吸取磁珠, 即使微量残留都将影响后续文库产量。
  - ▲可提前将09-5 (步骤1)需要的组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上放置备用。

## 09-5/文库扩增

## 1. 按下表配制PCR反应体系:

组分	体积
纯化过的接头连接产物	19 $\mu$ l
PCR Primer Mix 3	5 $\mu$ l
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 $\mu$ l
Heat-labile UDG	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

▲本反应体系适用于VAHTS® RNA Adapters set 1/2 for Illumina (Vazyme #N803/N804) 或VAHTS® RNA Adapters set 3 - set 6 for Illumina (Vazyme #N809/N810/N811/N812)。

▲当使用VAHTS® RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323 /N324)时, 则引物需使用其中配套的 i5 PCR Primer RM5XX和i7 PCR Primer RM7XX, 每种引物使用量为2.5  $\mu$ l。

▲如同时进行多个样品的操作, 可选择先在大小合适的离心管中预配制混合液再分装到各PCR管中, 建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2. 将移液器调至30  $\mu$ l量程, 并轻轻吸打10次充分混匀。

## 3. 将样品置于PCR仪中, 进行文库扩增反应:

步骤	温度	时间	循环数
热盖	105°C	On	
消化含U链	37°C	10 min	1
预变性	98°C	30 sec	1
变性	98°C	10 sec	10 - 17
退火	60°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	
完全延伸	72°C	5 min	1
	4°C	Hold	

从不同物种和个体提取的等量总RNA中, mRNA含量差异较大。根据物种实际情况, 可适当调整PCR循环数, 一般为10 - 17个循环。

Total RNA起始量	扩增循环数
2 - 4 $\mu$ g	10 - 12
1 - 2 $\mu$ g	12 - 13
100 - 999 ng	14 - 15
50 - 99 ng	16 - 17

## 4. PCR产物纯化:

- 1/ 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8°C取出, 静置使其平衡至室温。
- 2/ 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀, 吸取45  $\mu$ l (0.9  $\times$ )加入到PCR产物中, 使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 3/ 室温孵育10 min, 使DNA结合到磁珠上。
- 4/ 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
- 5/ 保持样品处于磁力架上, 加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育30 sec, 小心移除上清。

## 6/ 重复步骤5/一次。

## 7/ 保持样品处于磁力架上, 在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。

- ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
- ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
- ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。

8/ 将样品从磁力架上取出, 加入25  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀, 室温静置2 min后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心吸取22.5  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。

- ▲转移上清时请勿吸取磁珠, 即使微量残留都将影响后续文库质量的分析。

## 5. 用Agilent 2100 Bioanalyzer评价文库质量

取1  $\mu$ l纯化后的PCR产物, 用Agilent DNA 1000 kit (Agilent, Cat.No.5067-1504)分析。良好的文库应在预计大小的位置有一个较窄的峰, 如图2-A/B所示。如果在128 bp左右出现峰, 则提示文库中有adapter-dimer污染。此时, 将文库用Nuclease-free H<sub>2</sub>O稀释至50  $\mu$ l, 重复步骤09-5 (步骤4)再次纯化PCR产物。

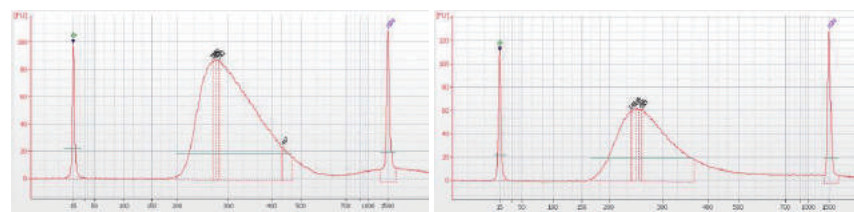


图2-A/B 1  $\mu$ g/100 ng 293T细胞RNA, 片段化条件为94°C 8 min, 并用0.45  $\times$  /1.0  $\times$ VAHTS DNA Clean Beads两轮纯化。

## 10/使用rRNA Depletion法构建链特异转录组文库

以使用Ribo-off® rRNA Depletion Kit (H/M/R) (Vazyme #N406)为例, 本方案适用于起始模板量为0.05 - 1  $\mu$ g人、小鼠、大鼠等物种Total RNA链特异全转录组文库构建。

## 10-1/rRNA去除及片段化

1. 准备总RNA样品: 在一个Nuclease-free离心管中, 用Nuclease-free H<sub>2</sub>O将0.05 - 1  $\mu$ g总RNA稀释至11  $\mu$ l, 冰上放置备用。
  - ▲可提前将步骤2需要的组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上放置备用。
2. RNA样品与探针杂交:
  - 1/ 在一个Nuclease-free微量离心管中配制如下反应液:

组分	体积
rRNA Probe (H/M/R)	1 $\mu$ l
Probe Buffer	3 $\mu$ l
总RNA	11 $\mu$ l
Total	15 $\mu$ l

将移液器调至10  $\mu$ l量程，轻轻吸打10次充分混匀。

▲如同时进行多个样品，可先在大小合适的离心管中预配制 rRNA Probe (H/M/R)和Probe Buffer的混合液，再分装到各PCR管中，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2/ 瞬时离心将样品收集至管底，将样品置于PCR仪中，进行探针杂交反应：

温度	时间
105 $^{\circ}$ C	On
95 $^{\circ}$ C	2 min
95 - 22 $^{\circ}$ C	0.1 $^{\circ}$ C/sec
22 $^{\circ}$ C	5 min

▲此步骤耗时约15 - 20 min，不同型号的PCR仪可能会有偏差。

▲可提前将步骤3需要的组分从-30 ~ -15 $^{\circ}$ C取出，冰上放置备用。

### 3. RNase H消化：

1/ 在冰上制备如下反应液：

组分	体积
RNase H Buffer	4 $\mu$ l
RNase H	1 $\mu$ l
上一步产物	15 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

将移液器调至15  $\mu$ l量程，轻轻吸打10次充分混匀。

▲如同时进行多个样品，可先在大小合适的离心管中预配制RNase H Buffer和RNase H的混合液，再分装到各PCR管中，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2/ 将样品置于PCR仪中，进行RNase H消化反应：

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

▲可提前将步骤4需要的组分从-30 ~ -15 $^{\circ}$ C取出，冰上放置备用。

### 4. DNase I消化：

1/ 在冰上制备如下反应液：

组分	体积
DNase I Buffer	29 $\mu$ l
DNase I	1 $\mu$ l
RNase H 消化产物	20 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

将移液器调至40  $\mu$ l量程，轻轻吸打10次充分混匀。

▲如同时进行多个样品，可先在大小合适的离心管中预配制DNase I Buffer和DNase I的混合液，再分装到各PCR管中，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2/ 将样品置于PCR仪中，进行DNase I消化反应：

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

瞬时离心将样品收集至管底，并置于冰上，立即进入下一步操作。

### 5. 使用VAHTS RNA Clean Beads纯化Ribosomal-depleted RNA

1/ 涡旋振荡混匀VAHTS RNA Clean Beads，吸取110  $\mu$ l (2.2  $\times$ )至上一步RNA样品中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。

2/ 冰上静置15 min，使RNA结合到磁珠上。

3/ 将样品置于磁力架5 min，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。

4/ 保持样品始终处于磁力架中，加入200  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O新鲜配置的80%乙醇漂洗磁珠。

5/ 重复步骤4/一次。

6/ 保持样品始终处于磁力架中，在室温下开盖干燥磁珠5 - 10 min。

▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。

▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。

▲应避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

6. 将样品从磁力架上取出，加入18.5  $\mu$ l Frag/Prime Buffer，用移液器吹打6次以充分混匀，室温静置2 min，在磁力架上静置5 min，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取16  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free离心管中。

将样品置于PCR仪中，根据插入片段大小的需要，选择片段化条件：

插入片段大小(bp)	温度	时间
150 - 200	94 $^{\circ}$ C	8 min, 4 $^{\circ}$ C hold
200 - 300	94 $^{\circ}$ C	5 min, 4 $^{\circ}$ C hold
250 - 450	85 $^{\circ}$ C	6 min, 4 $^{\circ}$ C hold
450 - 550	85 $^{\circ}$ C	5 min, 4 $^{\circ}$ C hold

▲从片段化到第一链cDNA合成过程中不可停留，mRNA在该体系下容易降解。

▲可提前将10-2 (步骤1)需要的组分从-30 ~ -15 $^{\circ}$ C取出，冰上放置备用。

### 10-2/双链cDNA合成

将双链cDNA所需组分从-30 ~ -15 $^{\circ}$ C取出，冰上溶解，上下颠倒混匀，短暂离心收集于管底，并冰上放置备用。

1. 按下表将Actinomycin D (5 mg/ml)稀释至0.12 mg/ml：

组分	体积
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	48.8 $\mu$ l
Actinomycin D (5 mg/ml)	1.2 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

▲稀释的Actinomycin D溶液对光非常敏感，且会逐渐吸附在塑料和玻璃的表面。因此未用完的Actinomycin D稀释液应丢弃。

2. 按下表配制第一链cDNA合成反应体系：

组分	体积
Fragmented RNA	16 $\mu$ l
Actinomycin D (0.12 mg/ml)	1 $\mu$ l
1st Strand Buffer 2	6 $\mu$ l
1st Strand Enzyme Mix 2	2 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

3. 将移液器调至20  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。

▲如同时进行多个样品的操作，可选择先在大小合适的离心管中预配制1st Strand Buffer 2和1st Strand Enzyme Mix 2的混合液再分装到各PCR管中，建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

4. 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应：

温度	时间
热盖105°C	On
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	Hold

▲结束后立刻进行第二链cDNA合成反应。

▲可提前将步骤4需要的组分从-30 ~ -15°C取出，冰上放置备用。

5. 按下表配制第二链cDNA合成反应体系：

组分	体积
1st Strand cDNA	25 $\mu$ l
2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)*	25 $\mu$ l
2nd Strand Enzyme Super Mix	15 $\mu$ l
Total	65 $\mu$ l

▲做链特异转录组时，所使用的为2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)，勿使用2nd Strand Buffer 2 (with dNTP)。

▲如同时进行多个样品的操作，可选择先在大小合适的离心管中预配制2nd Strand Buffer 2 (with dUTP)和2nd Strand Enzyme Super Mix的混合液再分装到各PCR管中，建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

6. 将移液器调至50  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。

7. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应：

温度	时间
热盖105°C	On
16°C	30 min
65°C	15 min
4°C	Hold

▲可提前将步骤10-3需要的组分从-30 ~ -15°C取出，冰上放置备用。

### 10-3/接头连接

1. 按下表中配制如下连接体系：

组分	体积
ds cDNA	65 $\mu$ l
Rapid Ligation buffer 3	25 $\mu$ l
Rapid DNA Ligase 2	5 $\mu$ l
RNA Adapter*	x $\mu$ l
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	To 100 $\mu$ l

▲Rapid Ligation buffer 3与Rapid DNA ligase 2预混后，可于2 ~ 8°C存放不超过24 h。

▲建议先将RNA adapter加入到ds cDNA中，充分混匀，再加入Rapid Ligation Buffer 3与Rapid DNA Ligase 2的混合液。

▲若使用VAHTS® RNA Multiplex Oligos set 1 /2 for Illumina (Vazyme #N323/N324)，则RNA adapter都为其中配套RNA adapter-S for Illumina。

接头使用量如下表所示：

Total RNA起始量	接头体积
1 $\mu$ g	5 $\mu$ l
100 - 999 ng	2 $\mu$ l
50 - 99 ng	0.8 $\mu$ l

2. 将移液器调至80  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。

3. 在PCR仪中进行连接反应：

温度	时间
热盖105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

▲可提前将10-4需要的VAHTS DNA Clean Beads从2 ~ 8°C取出，室温放置备用。

连接产物可在2 ~ 8°C暂存1 h。

### 10-4/产物纯化

本方案适用于RNA片段化条件为94°C 8 min，获得插入片段长度约150 - 200 bp的文库。

▲若需得到200 bp以上的不同插入片段的方案，参考附录一的分选方案

1. 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8°C取出，静置使其平衡至室温。
2. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取45  $\mu$ l (0.45  $\times$ )加入到连接产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
3. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
4. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
5. 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠)，室温孵育30 sec，小心移除上清。
6. 重复步骤5一次。

7. 保持样品处于磁力架上，在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
8. 将样品从磁力架上取出，加入52.5  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取50  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
9. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取50  $\mu$ l (1  $\times$ )加入到上一步纯化产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
10. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
11. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
12. 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
13. 重复步骤12一次。
14. 保持样品始终处于磁力架上，在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
15. 将样品从磁力架上取出，加入21.5  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取19  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，立刻进行PCR。
  - ▲转移上清时切勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库产量。
  - ▲可提前将10-5 (步骤1)需要的组分从-30 ~ -15 $^{\circ}$ C取出，冰上放置备用。

## 10-5/文库扩增

1. 按下表配制PCR反应体系：

组分	体积
纯化过的接头连接产物	19 $\mu$ l
PCR Primer Mix 3	5 $\mu$ l
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 $\mu$ l
Heat-labile UDG	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- ▲本反应体系适用于VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 1/2 for Illumina (Vazyme #N803/N804)或VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 3 - set 6 for Illumina (Vazyme #N809/N810/N811/N812)。
- ▲当使用VAHTS<sup>®</sup> RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324)时，则引物需使用其中配套的i5 PCR Primer RM5XX和i7 PCR Primer RM7XX，每种引物使用量为2.5  $\mu$ l。

- ▲如同时进行多个样品的操作，可选择先在大小合适的离心管中预配制混合液再分装到各PCR管中，建议按照以实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2. 将移液器调至30  $\mu$ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。
3. 将样品置于PCR仪中，进行文库扩增反应：

步骤	温度	时间	循环数
热盖	105 $^{\circ}$ C	On	
消化含U链	37 $^{\circ}$ C	10 min	1
预变性	98 $^{\circ}$ C	30 sec	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10 sec	10 - 17
退火	60 $^{\circ}$ C	30 sec	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 sec	
完全延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min	1
	4 $^{\circ}$ C	Hold	

若构建从不同物种和个体提取的等量总RNA中，mRNA的含量差异较大。根据物种实际情况，可适当调整PCR循环数，一般为12 - 17个循环。

Total RNA起始量	扩增循环数
1 $\mu$ g	12 - 13
100 - 999 ng	14 - 15
50 - 99 ng	16 - 17

4. PCR产物纯化：

- 1/ 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8 $^{\circ}$ C取出，静置使其平衡至室温。
- 2/ 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取45  $\mu$ l (0.9  $\times$ )加入到PCR产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- 3/ 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
- 4/ 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
- 5/ 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
- 6/ 重复步骤5/一次。
- 7/ 保持样品处于磁力架上，在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
- 8/ 将样品从磁力架上取出，加入25  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取22.5  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
  - ▲转移上清时请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量的分析。



## 5. 用Agilent 2100 Bioanalyzer评价文库质量

取1  $\mu$ l纯化后的PCR产物，用Agilent DNA 1000 kit (Agilent, Cat.No.5067-1504)分析。良好的文库应在预计大小的位置有一个较窄的峰，如图3-A/B所示。如果在128 bp左右出现峰，则提示文库中有adapter-dimer污染。此时，将文库用Nuclease-free H<sub>2</sub>O稀释至50  $\mu$ l，重复步骤10-5 (步骤4)再次纯化PCR产物。

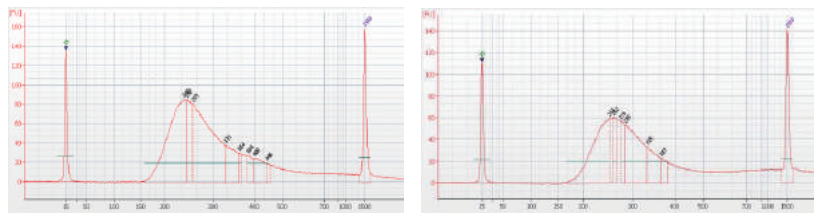


图3-A/B 1  $\mu$ g/100 ng 293T细胞RNA，片段化条件为94 $^{\circ}$ C 8 min，并用0.45  $\times$  1.0  $\times$  VAHTS DNA Clean Beads纯化。

## 附录一、分选方案

适用于RNA片段化条件为94 $^{\circ}$ C 5 min、85 $^{\circ}$ C 6 min和85 $^{\circ}$ C 5 min，获得插入片段长度大于200 bp的文库

### ▲用0.45 $\times$ VAHTS DNA Clean Beads纯化连接产物

1. 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2 ~ 8 $^{\circ}$ C取出，静置使其平衡至室温。
2. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取45  $\mu$ l (0.45  $\times$ )加入到接头连接产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
3. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
4. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
5. 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
6. 重复步骤5一次。
7. 保持样品处于磁力架上，在室温下开盖干燥磁珠约5 - 10 min。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
8. 将样品从磁力架上取出，加入102.5  $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取100  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
  - ▲用两轮VAHTS DNA Clean Beads进行片段大小分选(以85 $^{\circ}$ C 6 min打断，插入片段约350 - 450 bp为例，其他长度文库请根据表格选择相应的磁珠使用量。)

若使用VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 1/2 for Illumina (Vazyme #N803/N804)或VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 3 - set 6 for Illumina (Vazyme #N809/N810/N811/N812)时，其分选方案请参考表一选择最佳分选参数。

表一：不同插入片段大小的分选条件

插入片段长度(bp)	200 - 300	250 - 350	350 - 450	450 - 550
文库长度(bp)	320 - 420	370 - 470	470 - 570	570 - 670
打断条件	94 $^{\circ}$ C 5 min	85 $^{\circ}$ C 6 min	85 $^{\circ}$ C 6 min	85 $^{\circ}$ C 5 min
第一轮磁珠体积( $\mu$ l)	70 (0.7 $\times$ )	65 (0.65 $\times$ )	60 (0.6 $\times$ )	55 (0.55 $\times$ )
第二轮磁珠体积( $\mu$ l)	10 (0.1 $\times$ )	10 (0.1 $\times$ )	10 (0.1 $\times$ )	10 (0.1 $\times$ )

若使用VAHTS<sup>®</sup> RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324)时，其分选方案请参考表二选择最佳分选参数。

表二：不同插入片段大小的分选条件

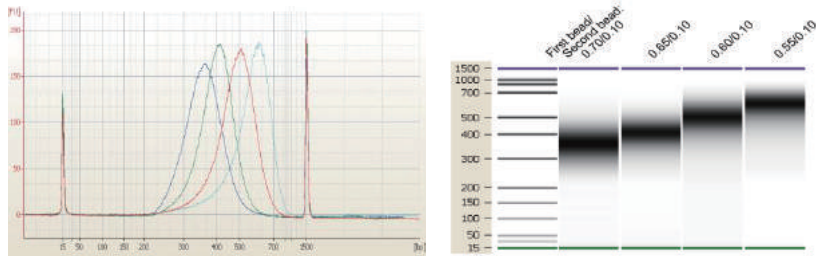
插入片段长度(bp)	200 - 300	250 - 350	350 - 450	450 - 550
文库长度(bp)	260 - 360	310 - 410	410 - 510	510 - 610
打断条件	94 $^{\circ}$ C 5 min	85 $^{\circ}$ C 6 min	85 $^{\circ}$ C 6 min	85 $^{\circ}$ C 5 min
第一轮磁珠体积( $\mu$ l)	80 (0.8 $\times$ )	65 (0.65 $\times$ )	60 (0.6 $\times$ )	55 (0.55 $\times$ )
第二轮磁珠体积( $\mu$ l)	20 (0.2 $\times$ )	20 (0.2 $\times$ )	10 (0.1 $\times$ )	10 (0.1 $\times$ )

▲此处的文库长度是插入片段长度+接头长度，分选中磁珠加样体积偏差将影响最终文库大小。分选中使用的磁珠体积比是相对于初始DNA体积，例如：初始体积100  $\mu$ l DNA溶液，第一轮磁珠体积60  $\mu$ l是100  $\mu$ l的60%，即0.6  $\times$ ，第二轮磁珠体积10  $\mu$ l是100  $\mu$ l的10%，即0.1  $\times$ ，而非吸取出的155  $\mu$ l上清的10%。

9. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取60  $\mu$ l (0.6  $\times$ )加入到纯化过的连接产物中，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
10. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
11. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，保持样品始终处于磁力架上，吸取155  $\mu$ l上清(此步骤保留上清，切勿丢弃!)至一个新的Nuclease-free PCR管中。
12. 加入10  $\mu$ l (0.1  $\times$ ) VAHTS DNA Clean Beads，使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
13. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
14. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
15. 保持样品处于磁力架上，加入200  $\mu$ l新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
16. 重复步骤15一次。
  - ▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
  - ▲最后移除上清时需要使用10  $\mu$ l移液器将残留液体吸干净。
  - ▲磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。
17. 保持样品始终处于磁力架上，在室温下干燥磁珠约5 - 10 min。

18. 将样品从磁力架上取出，加入21.5 μl Nuclease-free H<sub>2</sub>O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀，室温静置2 min置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心吸取19 μl上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。

▲转移上清时切勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库产量。



● 320 - 420 bp ● 370 - 470 bp ● 470 - 570 bp ● 570 - 670 bp

图4 200 ng 293T细胞 RNA，不同的片段化条件，一次0.45 × VAHTS DNA Clean Beads 纯化后，根据不同的比例的VAHTS DNA Clean Beads进行片段大小分选。

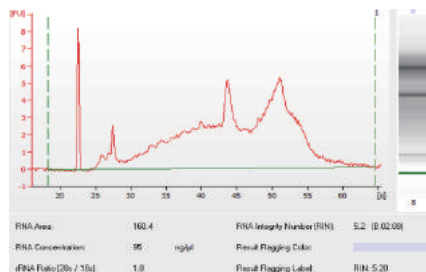
## 附录二、FFPE样本或其他降解样本处理说明

1. 该类样本中的mRNA有不同程度降解，完整度较差，建议提高起始模板投入量(>1 μg)，以保证得到质量合格的测序文库。如果样本量实在不足，当模板量 < 100 ng时，建议使用65°C 5 min的打断条件，并做不分选方案，否则文库产量会很低。
2. 该类样本得到的测序文库在下机数据mapping时，mapping rate可能会随着RNA降解程度的加剧而有所降低，这是不可避免的。
3. 对不同RIN值RNA样本的处理方案建议及案例展示如下：

RIN值 > 3.0的样品：

- ◇ 1 μg起始可以做分选和不分选方案；
- ◇ 100 ng起始不建议做分选方案，否则文库产量会较低；同时建议选择65°C 5 min作为打断条件，以保证文库产量；

案例一：小鼠肝脏FFPE样本(RIN值5.2)



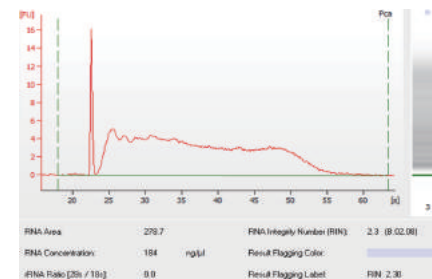
表三.小鼠肝脏FFPE样本不同条件下构建文库的结果比对

起始量	打断条件	分选条件	Peak	峰宽范围(bp)	文库浓度(ng/μl)
1 μg	65°C 5 min	0.65 ×/0.1 ×	389	389	8.33
1 μg	65°C 5 min	两轮纯化	267	267	51.28
1 μg	85°C 5 min	0.65 ×/0.1 ×	395	395	8.57
1 μg	85°C 5 min	两轮纯化	266	200 - 650	44.03
1 μg	94°C 2 min	0.7 ×/0.1 ×	370	210 - 530	7.93
1 μg	94°C 2 min	两轮纯化	266	150 - 700	36.46
100 ng	65°C 5 min	两轮纯化	268	200 - 700	15.26

RIN值 < 3.0的样品：

- ◇ 建议做不分选方案，在65°C 5 min条件下处理，以保证文库产量。

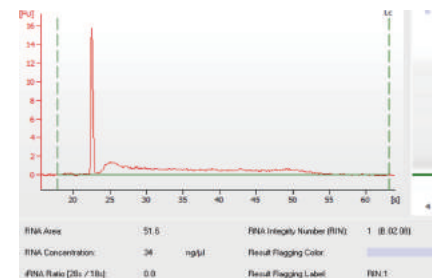
案例二：人前列腺癌组织(PCa) FFPE样本(RIN值2.3)



表四.人前列腺癌组织(PCa)FFPE样本不同条件下构建测序文库的结果比对

起始量	打断条件	分选条件	Peak	峰宽范围(bp)	文库浓度(ng/μl)
100 ng	65°C 5 min	两轮纯化	461	300 - 700	8.57
100 ng	65°C 5 min	0.65 ×/0.1 ×	482	320 - 700	6.60

案例三：人肺癌组织(LC) FFPE样本(RIN值1.0)



表五.人肺癌组织(Lc) FFPE样本不同条件下构建测序文库的结果比对

起始量	打断条件	分选条件	Peak	峰宽范围(bp)	文库浓度(ng/μl)
100 ng	65°C 5 min	两轮纯化	470	300 - 700	5.62
100 ng	65°C 5 min	0.65 ×/0.1 ×	472	350 - 700	2.22

不分选方案以及更温和的打断条件都有利于保留较高的文库产量。在以上案例中，对于RIN > 3.0 (降解程度相对较轻)的样本，分选会造成较大损失，不分选方案所得文库的浓度高于分选方案5倍左右，因此在起始模板量不足时，建议做不分选方案；对于RIN < 3.0 (降解严重)的样本，文库产量本身已经很低，因此建议做不分选方案，且选用最温和的打断条件(65°C 5 min)。

### 附录三、常见问题及解决方案

#### ◇错误操作及补救措施

步骤	正确操作	错误操作	补救措施
08-1 步骤6	加入200 µl Beads Wash Buffer重悬和漂洗mRNA Capture Beads	误加为200 µl 80%乙醇	弃尽乙醇，并晾干，重新用200 µl Beads Wash Buffer重悬磁珠，并继续后续操作
08-1 步骤7	加入50 µl Tris Buffer重悬mRNA Capture Beads	误加为Beads Binding Buffer	若未做80°C 2 min处理，可以用磁力架吸附，弃掉上清后，重新加Tris Buffer
08-1 步骤9	加入50 µl Beads Binding Buffer使mRNA与mRNA Capture Beads再结合	误加为Tris Buffer	放大反应体系，再补加与Tris Buffer等体积的Beads Binding Buffer
08-1 步骤12	加入200 µl Beads Wash Buffer重悬mRNA Capture Beads	未加入Wash Buffer重悬而直接加入Frag/Prime Buffer	若还未加热打断，可重新放上磁力架，将Frag/Prime Buffer丢弃后，重新加Wash Buffer
08-1 步骤13	加入Frag/Prime Buffer 打断mRNA	误加为Nuclease-free H <sub>2</sub> O	若条件允许，加入等体积2 × Frag/Prime Buffer，之后反应体系均放大，直至做到纯化步骤，恢复体系
		丢弃Wash Buffer后，发现Frag/Prime Buffer仍未融化	再加入Beads Wash Buffer浸泡mRNA Capture Beads，至Frag/Prime buffer融化，弃尽Wash Buffer，继续实验
	对加过Frag/Prime Buffer的样品做高温打断处理	片段化条件与最初设置不符，如将85°C 6 min处理为94°C 8 min	后续分选步骤必须选择与此处打断条件对应的操作，否则会建库失败。最终得到的文库插入片段大小也会相应改变
08-1 步骤14	打断mRNA后，转移上清至新管中(17 µl)	体积不足	可加入Nuclease-free H <sub>2</sub> O补足
09-2 步骤2	一链合成	Actinomycin D未稀释，或加错试剂	可加3.0 × RNA Clean Beads进行纯化，用Frag/Prime Buffer洗脱继续实验
09-4	连接产物纯化和片段分选	没有纯化，直接分选	实际片段会略偏小，文库峰型及产量均受影响，根据2100结果判断文库大小是否符合要求
09-4	不分选条件	第一轮纯化中，洗脱水体积加错	可相应调整后面的磁珠用量，保证比例

#### ◇如果文库浓度过低，可以从哪些角度去寻找原因并如何改进？

以高质量的RNA样品为模板构建得到的文库浓度都能达到上机测序要求，如果无法提供合格的RNA样品，可尝试使用以下方法弥补：

- ① 起始量：提高样品起始量；
- ② 做几个重复的样品，到片段化步骤合并在一起，或做到PCR前合并在一起；
- ③ 做不分选方案：94°C 8 min打断条件下RNA片段虽然偏小，但是分布会很集中，均一性也好，有些个性化样品会出现打断不均一、某些大小的片段较多等问题，经过PCR后更明显，出现刺峰，这种情况在不分选方案中出现很少。

#### ◇rRNA残留较高的问题

注意mRNA获取方法的不同，其兼容的起始量有所不同，请选择规格范围内的起始总RNA投入。

- ① Poly(A)法富集法，例如VAHTS<sup>®</sup> mRNA Capture Beads (Vazyme #N401)兼容起始量为0.05 - 4 µg；
- ② 使用Ribo-off<sup>®</sup> rRNA Depletion Kit (H/M/R) (Vazyme #N406)去除rRNA兼容的起始量为0.05 - 1 µg；
- ③ 使用Ribo-off<sup>®</sup> rRNA Depletion Kit (Bactria) (Vazyme #N407)去除rRNA兼容的起始量为1 - 5 µg；
- ④ 使用Ribo-off<sup>®</sup> rRNA Depletion Kit (Plant) (Vazyme #N409)去除rRNA兼容的起始量为1 - 5 µg；

#### ◇文库定量常见问题

文库定量有两种方式：Qubit和qPCR分别测定文库质量浓度和文库摩尔浓度。其中由于qPCR利用成簇反应引物进行扩增定量，较为真实的反映出文库中可用于上机测序的DNA片段的数量，所以qPCR得到的文库定量结果较为可信，但在qPCR过程单链能够被有效测定，而在Qubit测定时，单链部分不计入有效浓度，因此表现为Qubit测定浓度低于qPCR定量浓度约10% - 50%。一般可同时使用两种方式定量文库，相互校正。

#### ◇关于选择接头的说明

目前，该试剂盒适用接头分为三套组合：

组合一：VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 1/2 for Illumina (Adapter 1 - 27, Vazyme #N803/N804)共包括24个不同接头，分为两个单独包装，依序号各含有12个不同接头；

组合二：VAHTS<sup>®</sup> RNA Adapters set 3 - set 6 for Illumina (Adapter 1 - 96, Vazyme #N809/N810/N811/N812)共包括96个不同接头，分为四个单独包装，依序号各含有24个不同接头；

以上两套接头可在同批测序样品中混合使用，可参考以下建议：

◇同批测序样品数 < 24时，建议选择组合一；当样品数 < 12时，可选择该组合的单独包装；

◇24 < 同批测序样品数 < 96时，建议选择组合二；也可根据具体样品数选择该组合的单独包装。

组合三：VAHTS<sup>®</sup> RNA Multiplex Oligos set 1/2 for Illumina (Vazyme #N323/N324)分别包含含VAHTS RNA Adapter-S for Illumina、8种VAHTS i5 PCR Primers以及12种VAHTS i7 PCR Primers，共同配合使用可用于构建多至384种不同组合的双端Index标记文库。

#### ◇本试剂盒是否适用于Small RNA文库制备?

不适用。因为Small RNA的长度仅为22 nt左右，而本试剂盒中磁珠抓取片段最低为100 bp以上，无法有效富集到Small RNA片段。

#### ◇FFPE样本是否可以用该试剂盒建库?

FFPE样本中的mRNA会有一定降解，完整度较差，建议与Ribo-off® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (Vazyme #N406)试剂盒搭配使用，进行文库构建。

#### ◇使用说明书方案进行分选，分选插入片段偏大，为什么?

使用磁珠分选过程中，磁珠未平衡至室温、未混匀、移液器不准、枪头挂壁严重等均会导致磁珠加入量少于规定值，导致所分选的插入片段偏大。

#### ◇文库扩增最高可以使用多少循环?

可根据起始量来调整循环数；如果不确定，建议取1 µl进行Qubit检测后酌情再补1 - 2个循环，最多不超过17个循环。

#### ◇文库进行Agilent 2100 Bioanalyzer质检，发现产生双峰，产生的原因?

- ① RNA有杂质残留，建库过程中发生降解，到PCR步骤前的有效模板量低，PCR时由于模板不足发生了非特异性扩增。建议将RNA样品在65°C条件下加热15 min，检测是否降解，如果确实为RNA的问题则需要重新提取RNA。
- ② 物种本身比较特殊，RNA打断后片段不是连续且均一的分布，做分选方案时可能分选到了两个范围的片段。
- ③ 文库浓度较高时使用高敏芯片检测。建议使用Agilent DNA 1000 kit检测，或将文库稀释到适当的浓度后用Agilent DNA HS kit检测。

#### ◇关于在进行Agilent 2100 Bioanalyzer、Qubit及qPCR检测时，高产量文库出现过度扩增的解释。

高产量文库通常会出现不同程度的过度扩增现象。因为在文库扩增后期，通常引物被最先耗尽，大量文库片段在无法结合到引物的情况下，片段之间通过不完全匹配关系退火结合，从而形成部分双链+部分单链的杂合链，且片段更大。根据不同检测方式的对应原理，过度扩增产物在Agilent 2100 Bioanalyzer峰型中表现为upper marker之后有轻微翘尾；但以上现象均属正常，不影响文库测序和数据分析。