

# MGIEasy

## Small RNA 文库制备试剂盒使用说明书

---

货号：940-000196-00 (24 RXN)

试剂盒版本号：V2.0

说明书版本号：1.0

## 版本历史

说明书版本	试剂盒版本	修订日期	修订内容摘要
1.0	V2.0	2022年 3月	<ul style="list-style-type: none"><li>• 变更试剂产品货号信息</li></ul>

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：[www.mgi-tech.com/download/files](http://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 试剂盒组分.....	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期.....	3
1.6 客户自备物料清单.....	3
1.7 注意事项.....	5
第二章 样本要求及处理.....	6
2.1 适用样本类型及投入量要求.....	6
2.2 样本质量要求及说明.....	6
第三章 文库构建标准流程.....	7
3.1 3'接头连接.....	7
3.2 3'接头消化.....	8
3.3 5'接头连接.....	8
3.4 反转录.....	9
3.5 PCR 扩增.....	10
3.6 PCR 扩增产物片段筛选.....	12
3.7 PCR 产物质检.....	15
3.8 变性.....	16
3.9 单链环化.....	17
3.10 酶切消化.....	17
3.11 酶切消化产物纯化.....	18
3.12 酶切消化产物质检.....	19
第四章 测序.....	20
附录.....	21
附录 A 关于磁珠.....	21
附录 B 关于使用 RT Primer 的推荐组合方案.....	22
附录 C 6% TBE PAGE 胶配制.....	23
附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算.....	24

附录 E 10 bp DNA Ladder.....24

# 第一章 产品信息

## 1.1 产品描述

MGIEasy Small RNA文库制备试剂盒是针对华大智造（MGI）测序平台量身打造的small RNA快速文库构建试剂盒。使用本试剂盒可以将10 ng – 1 μg 真核 total RNA制备成适用于华大智造（MGI）测序平台的单链环状DNA文库。本试剂盒适合于全面快速的分析鉴定 small RNA的种类，预测新的miRNA及靶基因，样品间差异表达分析等应用。试剂盒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

本试剂盒适用于所有常见的人、动物、植物等真核物种的 total RNA，不同物种均有稳定的表现。

## 1.3 适配测序平台

构建的文库可使用BGISEQ-500、MGISEQ-2000进行测序。

## 1.4 试剂盒组分

MGIEasy Small RNA文库制备试剂盒为24 RXN。每个试剂盒包含2个独立盒子，所包含的试剂、货号、组分信息如下：

表 1 MGEasy Small RNA 文库制备试剂盒 (24 RXN) (货号: 940-000196-00)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGEasy Small RNA 文库制备试剂 (Box 1) 货号: 940-000179-00	3' Adapter	绿色	24 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	RNAse Inhibitor	绿色	108 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	3' Ligation Enzyme	绿色	48 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	3' Ligation Buffer Mix	绿色	240 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Adapter Depletion Enzyme I	无色	60 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Adapter Depletion Enzyme II	无色	41 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Adapter Depletion Buffer	无色	20 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	5' Adapter	红色	24 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	5' Ligation Enzyme	红色	48 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	5' Ligation Buffer Mix	红色	96 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	RT Primer (1-4,13-16)	无色	3 $\mu$ L/支 $\times$ 8 支
	RT Primer (25-32)	无色	3 $\mu$ L/支 $\times$ 8 支
	RT Primer (97-104)	无色	3 $\mu$ L/支 $\times$ 8 支
	FS Reaction Buffer Mix	黑色	300 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	RT Enzyme	黑色	24 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Enzyme Mix	蓝色	1200 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Block oligo	蓝色	24 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	PCR Primer Mix(HC)	蓝色	96 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Splint Buffer	紫色	93 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	DNA Rapid Ligase	紫色	5 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
Digestion Buffer	白色	12 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	
Digestion Enzyme	白色	21 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	
MGEasy Small RNA 文库制备试剂 (Box 2) 货号: 940-000180-00	Stop Buffer(HC)	蓝色	144 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Loading Buffer	黄色	240 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	10 bp DNA Ladder	黄色	72 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	10x TNE Buffer	黄色	960 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Library Purification Beads	白色	864 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	Digestion Stop Buffer	白色	60 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
	TE Buffer	白色	600 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支
Nuclease-Free Water	紫色	1100 $\mu$ L/支 $\times$ 1 支	

## 1.5 试剂盒储存条件及有效期

MGIEasy Small RNA文库制备试剂 ( Box 1 )

- 储存温度:  $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 干冰运输

MGIEasy Small RNA文库制备试剂 ( Box 2 )

- 储存温度:  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$
- 有效期: 见试剂盒标签
- 运输条件: 冰袋运输

\*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 2 客户自备物料清单

通用	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 )
仪器	Agilent 2100 Bioanalyzer ( Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA )
	高速冷冻离心机 ( Eppendorf, Cat. No. 5417R )
	ThermoMixer ( Eppendorf )
	PowerEase® 300W Power Supply (230 VAC) ( Invitrogen, Cat. No. PS0301 )
	PAGE 胶纯化
	凝胶成像系统
PAGE 胶纯化	XCell Sure Lock® Mini-CE mark ( Invitrogen, Cat. No. EI0001 )
	Dark Reader transilluminator ( Clare Chemical Research, Cat. No. D195M )

	SureCast™ Gel Handcast Bundle B – Hardware Only (Invitrogen, Cat. No. HC1000S)
试剂	通用 RNase Zap 杂交液 (Ambion, Cat. No. AM9780) Nuclease free water (Ambion, Cat. No. AM9937) 无水乙醇 (分析纯) 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)
	磁珠纯化 Agencourt® AMPure® XP Beads (Agencourt, Cat. No. A63881) 或者 MGIEasy DNA 纯化磁珠 (MGI, Cat. No. 1000005278 或 1000005279)
	PAGE 胶纯化 糖原 (Ambion, Cat. No. AM9510) GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Cat. No. 50535)
耗材	通用 移液器吸头及无 RNA 酶吸头 1.5 mL 离心管 (Axygen, Cat. No. MCT-150-C) Qubit® Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或者 0.5 mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C) 0.2 mL PCR 管 (Axygen, Cat. No. PCR-02-C)
	PAGE 胶纯化 Spin-X® Centrifuge Tube Filters (Corning, Cat. No. 8162) Novex® 6% TBE PAGE gel 1.0 mm (Invitrogen, Cat. No. EC6265BOX) 2 mL 离心管 (Axygen, Cat. No. MCT-200-C) 保鲜膜 刀片 打火机 酒精灯 绣花针

## 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。
- ◆ 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。
- ◆ 试剂盒各组分使用前取出，将 Enzyme 瞬时离心后置于冰上待用。Buffer Mix 提前取出置于室温解冻。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，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
- ◆ 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。
- ◆ 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(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。
- ◆ 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- ◆ 若您有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：[MGI-service@mgi-tech.com](mailto: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

本试剂盒适用于常见的人、动物、植物等真核物种 total RNA，包括人，鼠，水稻，拟南芥等物种。推荐使用 Input total RNA 量为 10 ng – 1 μg。对于组织样本，推荐使用的 Input total RNA 量  $\geq 100$  ng。

### 2.2 样本质量要求及说明

- RNA 完整度：RIN 值  $\geq 7.5$ ，28 S/18 S  $\geq 1.5$ ，5.8 S rRNA  $\leq 50\%$ 。

用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对 total RNA 样本进行质控。

- RNA 纯度：OD<sub>260/280</sub> = 1.8 – 2.0。

## 第三章 文库构建标准流程

### 3.1 3'接头连接



**注意 1:** 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用枪头混匀即可。



**注意 2:** 因不同的投入量对应不同的 3' Adapter 使用量，请根据表 3 用 Nuclease-Free Water 对 3' Adapter 进行稀释。

表 3 3' Adapter 稀释

Total RNA 投入量	3' Adapter 稀释比例
1000 ng	不稀释
500 ng	不稀释
100 ng	1:1
10 ng	1:5

3.1.1 在冰上配制变性反应液（见表 4）：

表 4 变性反应液

组分	单个反应体积
Input RNA	x $\mu\text{L}$
3' Adapter	1 $\mu\text{L}$
Nuclease-Free Water	(6-x) $\mu\text{L}$
Total	7 $\mu\text{L}$

3.1.2 PCR 仪中 70°C 反应 2 min，立即置于冰上冷却 1 min。

3.1.3 将 3' Ligation Buffer Mix 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，瞬时离心置于冰上，在冰上配制 3' 接头连接反应液（见表 5）：

表 5 3'接头连接反应液

组分	单个反应体积
3' Ligation Buffer Mix	10 $\mu\text{L}$
RNase Inhibitor	1 $\mu\text{L}$
3' Ligation Enzyme	2 $\mu\text{L}$
Total	13 $\mu\text{L}$

3.1.4 用移液器缓慢吸取 13  $\mu\text{L}$  配制好的 3' 接头连接反应液加入步骤 3.1.2 的 PCR 管中，用移液器吹打 10 次，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.1.5 将 PCR 管置于 PCR 仪上，25°C 反应 2 h，降温至 4°C。

3.1.6 反应结束后瞬时离心 3 s，立即进行下一步反应。

### 3.2 3'接头消化



**注意：**以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用枪头混匀即可。

3.2.1 将 Adapter Depletion Buffer 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，瞬时离心置于冰上，在冰上配制 3' 接头消化反应液（见表 6）：

表 6 3'接头消化反应液

组分	单个反应体积
Adapter Depletion Enzyme I	2.5 $\mu$ L
Adapter Depletion Enzyme II	1.7 $\mu$ L
RNAse Inhibitor	1 $\mu$ L
Adapter Depletion Buffer	0.8 $\mu$ L
Total	6 $\mu$ L

3.2.2 用移液器吸取 6  $\mu$ L 配制好的 3' 接头消化反应液加入步骤 3.1.6 的产物中，用移液器吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.2.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 7 中的条件进行反应：

表 7 3'接头消化反应条件

温度	时间
热盖	On
30°C	30 min
37°C	30 min
70°C	20 min
4°C	Hold

3.2.4 反应结束后瞬时离心 3 s，**立刻**进入下一步反应。

### 3.3 5'接头连接



**注意：**以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用枪头混匀即可。

3.3.1 将 5' Adapter 从 -20°C 取出，解冻后颠倒混匀，瞬时离心置于冰上，根据不同 total RNA 的起始量用 Nuclease-Free Water 对 5' Adapter 进行稀释，详见（表 8）：

表 8 5' Adapter 稀释

Total RNA 投入量	5' Adapter 稀释比例
1000 ng	不稀释
500 ng	不稀释
100 ng	1:1
10 ng	1:5

- 3.3.2 取 (N+1)  $\mu$ L 的 5' Adapter, 70°C 反应 2 min, 立即置于冰上冷却 1 min 后, 在 3.2.4 的反应液中加入 1  $\mu$ L 变性的 5' Adapter (N 为反应个数)。
- 3.3.3 将 5' Ligation Buffer Mix 从 -20°C 取出, 解冻后颠倒混匀, 瞬时离心置于冰上, 在冰上配制 5' 接头连接反应液 (见表 9):

表 9 5'接头连接反应液

组分	单个反应体积
5' Ligation Buffer Mix	4 $\mu$ L
RNAse Inhibitor	1 $\mu$ L
5' Ligation Enzyme	2 $\mu$ L
Total	7 $\mu$ L

- 3.3.4 用移液器吸取 7  $\mu$ L 配制好的 5' 接头连接反应液加入步骤 3.3.2 的产物中, 吹打 10 次混匀, 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.3.5 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 25°C 反应 1 h, 降温至 4°C。
- 3.3.6 反应结束后瞬时离心 3 s, 立即进行下步反应。

### 3.4 反转录

- 3.4.1 将 RT Primer 从 -20°C 取出, 解冻后瞬时离心置于冰上, 根据不同 total RNA 的起始量用 Nuclease-Free Water 对 RT Primer 进行稀释, 详见表 10:

表 10 RT Primer 稀释

Total RNA 投入量	RT Primer 稀释比例
1000 ng	不稀释
500 ng	不稀释
100 ng	1:1
10 ng	1:5



**注意:** RT Primer 带有 barcode, 要混合测序不同的样品需加不同的 barcode。试剂盒提供 24

种含有 barcode 的 RT Primer, 建议 4 种组合方案, 分别为 8、12、16 或 24 个样品的混合测序, 用户可根据具体情况选择不同的 barcode 组合方案进行后续的混合测序, 具体方案详见附录 B。

- 3.4.2 在步骤 3.3.6 反应液中加入 1  $\mu\text{L}$  RT Primer, 吹打 10 次混匀, 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.4.3 65°C 反应 3 min, 立即置于冰上冷却 1 min。
- 3.4.4 将 FS Reaction Buffer Mix 从 -20°C 取出, 解冻后颠倒混匀, 瞬时离心置于冰上, 在冰上配制反转录反应液 (见表 11):

表 11 反转录反应液

组分	单个反应体积
FS Reaction Buffer Mix	12.5 $\mu\text{L}$
RNAse Inhibitor	1.5 $\mu\text{L}$
RT Enzyme	1 $\mu\text{L}$
Total	15 $\mu\text{L}$

- 3.4.5 用移液器吸取 15  $\mu\text{L}$  配制好的反转录反应液加入步骤 3.4.3 的产物中, 吹打 10 次混匀, 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 3.4.6 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 12 中的条件进行反应:

表 12 反转录反应条件

温度	时间
热盖	On
42°C	60 min
70°C	15 min
4°C	Hold

- 3.4.7 反应结束后瞬时离心 3 s, 将反应液收集至管底。

### 3.5 PCR 扩增



**注意 1:** PCR 反应体系共提供 2 种规格, 分别为 100  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$ , 反应体系的选用主要取决于后续片段筛选的方法。



**注意 2:** 对于人、大鼠、小鼠样本, 主要推荐磁珠片段筛选方法, 对应 100  $\mu\text{L}$  反应体系; 同时 6% TBE PAGE 胶回收方法也适用。其他样本, 主要推荐 6% TBE PAGE 胶回收片段筛选方法, 对应 50  $\mu\text{L}$  反应体系。请参考表 13:

表 13 片段筛选方法及对应 PCR 反应体系

片段筛选方法	PCR 反应体系
磁珠筛选	100 $\mu$ L
6% TBE PAGE 胶回收	50 $\mu$ L

### 3.5.1 100 $\mu$ L PCR 反应体系

将 PCR Primer Mix( HC ) , PCR Enzyme Mix 和 Block oligo 从  $-20^{\circ}\text{C}$  取出, 解冻后颠倒混匀, 瞬时离心置于冰上, 在冰上配制 100  $\mu$ L PCR 反应体系 ( 见表 14 ):

表 14 100  $\mu$ L PCR 反应体系

组分	单个反应体积
cDNA	23 $\mu$ L
PCR Primer Mix( HC )	4 $\mu$ L
PCR Enzyme Mix	50 $\mu$ L
Block oligo	1 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	22 $\mu$ L
Total	100 $\mu$ L

### 3.5.2 50 $\mu$ L PCR 反应体系

将 PCR Primer Mix( HC ) , PCR Enzyme Mix 从  $-20^{\circ}\text{C}$  取出, 解冻后颠倒混匀, 瞬时离心置于冰上, 在冰上配制 50  $\mu$ L PCR 反应体系 ( 见表 15 ):

表 15 50  $\mu$ L PCR 反应体系

组分	单个反应体积
cDNA	23 $\mu$ L
PCR Primer Mix( HC )	2 $\mu$ L
PCR Enzyme Mix	25 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

3.5.3 将上述 100  $\mu$ L 或者 50  $\mu$ L 的 PCR 反应混合液, 涡旋震荡 3 次, 每次 3 s, 瞬时离心将反应液收集至管底。

3.5.4 将步骤 3.5.3 所述 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照表 16 的条件进行 PCR 反应:

表 16 PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	
95°C	3 min	1 循环
98°C	20 s	
56°C	15 s	N 循环
72°C	15 s	
72°C	10 min	1 循环
4°C	Hold	

反应循环数可参考下表：

表 17 不同投入量推荐的 PCR 扩增循环数

Total RNA 投入量	循环数
1000 ng	16-17
500 ng	17-19
100 ng	20-22
10 ng	22-25



**注意 1:** 该循环数主要是根据人脑总 RNA 及小鼠肝脏总 RNA 为测试样本得到的参考值，由于物种及细胞类型的不同会导致 small RNA 的含量有所差异，可根据具体样本优化循环数。



**注意 2:** 若 PCR 扩增结束后，有微量沉淀存在为正常现象，不影响后续实验。

3.5.5 反应结束后，瞬时离心 3 s，将反应液收集至管底。

### 3.6 PCR 扩增产物片段筛选



**注意:** 因不同的物种推荐不同的片段筛选方法，可根据样本种类选择不同的片段选择方法。

#### 3.6.1 磁珠法片段筛选



**注意 1:** 操作前请仔细阅读附录 A。



**注意 2:** 磁珠法片段筛选使用的是 AMPure® XP 磁珠或 MGIEasy DNA 纯化磁珠，其他磁珠不兼容。

3.6.1.1 提前 30 min 取出磁珠震荡混匀后置于室温，使用前再次充分震荡混匀。

3.6.1.2 吸取 180  $\mu$ L 磁珠，50  $\mu$ L 100% 无水乙醇加入到新的 1.5 mL 离心管中。

3.6.1.3 在 3.5.5 的 PCR 扩增产物中加入 6  $\mu\text{L}$  Stop Buffer(HC), 混匀后取 100  $\mu\text{L}$  产物加入到步骤 3.6.1.2 的 1.5 mL 离心管中, 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离心管中。



**注意: 确保加入到 1.5 mL 离心管中的体积为 100  $\mu\text{L}$ 。**

3.6.1.4 室温孵育 10 min, 在 5 min 时, 用移液器轻轻吹打 5 次, 防止磁珠沉淀下来。

3.6.1.5 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中。



**注意: 此步保留上清, 丢弃磁珠。**

3.6.1.6 向步骤 3.6.1.5 的 1.5 mL 离心管中加入 40  $\mu\text{L}$  磁珠, 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离心管中。

3.6.1.7 室温孵育 10 min。

3.6.1.8 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.6.1.9 保持离心管置于磁力架上, 加入 500  $\mu\text{L}$  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。

3.6.1.10 重复步骤 3.6.1.9, 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。

3.6.1.11 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.6.1.12 将离心管从磁力架上取下, 加入 16  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱, 用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。

3.6.1.13 室温下孵育 10 min。

3.6.1.14 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置 2-5 min 至液体澄清, 将 14  $\mu\text{L}$  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。**

### 3.6.2 6% TBE PAGE 电泳片段筛选

#### 3.6.2.1 准备材料

- 用保鲜膜密封 2 mL 离心管的管盖，以防污染。
- 将绣花针在酒精灯上烧热之后，从 0.5 mL 离心管的底部刺穿 6-7 次，随后将之套置在 2 mL 的离心管上。

#### 3.6.2.2 操作步骤

- 取 6% TBE PAGE 胶，卡好楔子后放置到电泳槽中，加入 1×TBE 缓冲液，拔出梳子。
- 向 50  $\mu$ L 的 PCR 产物中加入 10  $\mu$ L Loading Buffer，混匀离心后分 3 个加样孔上样，每个加样体积为 20  $\mu$ L；另取 3  $\mu$ L 10 bp DNA Ladder（见附录 E）加样于中间一孔。
- 电压 185 V 进行电泳，当蓝色染料到达胶的底部时，即可停止电泳。用 GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain 染胶 10 min，在凝胶成像系统下拍照（见图 1）。

**⚠ 注：染胶液配制：50 mL 1×TBE 缓冲液中加入 5  $\mu$ L GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain，混匀后避光染胶。此体系可染一块胶。建议独立染胶，避免交叉污染。**

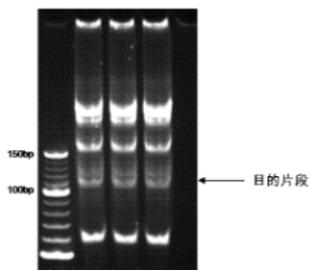


图 1 PCR 产物电泳图

- 根据 Ladder 指示，切下约 100 – 120 bp 的条带，下限比对 Ladder 的 100 bp 上沿，上限比对 Ladder 的 120 bp 下沿，将切下的胶块置于 0.5 mL 已扎孔的离心管（套在 2 mL 离心管上），13600 rpm 离心 2 min，使胶块通过小孔挤碎。
- 在碎胶中加入 400  $\mu$ L 1×TNE Buffer（10×TNE Buffer 可用 Nuclease free Water 进行稀释），随后在 ThermoMixer 上以 650 rpm 37°C 震荡至少 2 h，洗脱 DNA。
- 将碎胶和缓冲液转入 Spin-X® Centrifuge Tube Filters 内，13600 rpm 离心 3 min。

- g) 弃过滤柱，向洗脱液中加入 3  $\mu\text{L}$  完全融化的糖原，1200  $\mu\text{L}$  预冷的无水乙醇。混匀后  $-80^{\circ}\text{C}$  放置 30 min 或更长时间。
- h) 取出  $-80^{\circ}\text{C}$  产物， $4^{\circ}\text{C}$ ，13600 rpm 离心 30 min（离心机需提前预冷至  $4^{\circ}\text{C}$ ）。离心后小心移除上清，切勿吸取到白色沉淀。
- i) 加入 700  $\mu\text{L}$  80%预冷的乙醇， $4^{\circ}\text{C}$ ，13600 rpm 离心 3 min，离心后小心移除上清，切勿吸取到白色沉淀。
- j) 高速离心 10 s，将管壁上的酒精收集到底部，小心移除多余酒精，室温下使酒精挥发。
- k) 待酒精完全挥发后，加入 14  $\mu\text{L}$  TE Buffer 溶解。

✓ **停止点：PCR 纯化后产物，可重- $20^{\circ}\text{C}$  冰箱储存。**

### 3.7 PCR 产物质检

- 3.7.1 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit，按照定量试剂盒的操作说明对 PCR 纯化产物进行定量。要求每个样品纯化后的产量  $\geq 10$  ng。
- 3.7.2 如需将多个样本混合测序，按照测定的浓度调整下一步反应使用的样本起始量进行混合，根据每个样品所需的数据量，取适量的质量混合，混合后总量为 1 pmol，总体积  $\leq 48$   $\mu\text{L}$ ，不同片段大小的 PCR 产物对应的产量请参考表 18 及附录 D 的公式 1。

表 18 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)
22	105	70
30	113	75
50	133	88

- 3.7.3 通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 对 PCR 纯化后产物进行片段分布检测。105bp 和 116 bp 分别对应于 miRNA 和 piRNA 的大小，但是由于仪器迁移率的影响，最终文库的主峰分布可能存在几个碱基的偏差，miRNA 片段的峰在 103-109 bp。

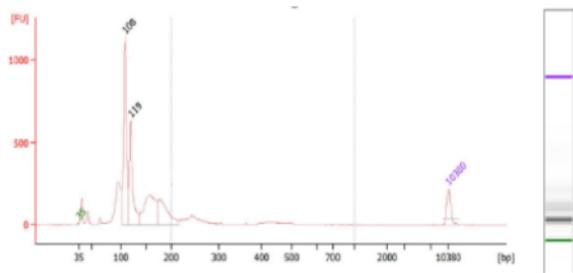


图2 人脑总 RNA 样本经磁珠筛选后 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

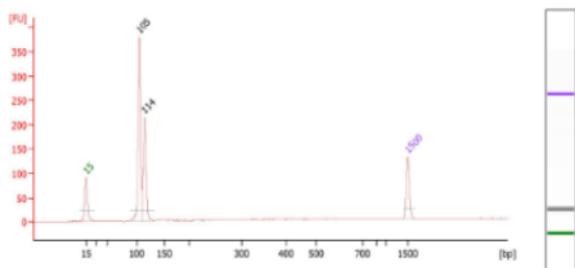


图3 人脑总 RNA 样本经 6% TBE PAGE 胶纯化后 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

### 3.8 变性



**注意：操作前请仔细阅读附录 D。**

- 3.8.1 根据 PCR 产物的主片段分布，参考附录 D 的公式 1，取 1 pmol PCR 产物至新的 0.2 mL PCR 管中，用 TE Buffer 补充至总体积 48  $\mu$ L。
- 3.8.2 将步骤 3.8.1 所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 19 的条件进行反应：

表 19 变性反应条件

温度	时间
热盖	On
95°C	3 min

3.8.3 反应结束后，立即将 PCR 管转移到冰上，静置 2 min 后瞬时离心。

### 3.9 单链环化

3.9.1 在冰上配制单链环化反应液（见表 20）：

表 20 单链环化反应液

组分	单个反应体积
Splint Buffer	11.6 $\mu\text{L}$
DNA Rapid Ligase	0.5 $\mu\text{L}$
Total	12.1 $\mu\text{L}$

3.9.2 用移液器吸取 12.1  $\mu\text{L}$  配制好的单链环化反应液加入步骤 3.8.3 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.9.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 21 的条件进行反应：

表 21 单链环化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

3.9.4 反应结束后，瞬时离心，将 PCR 管转移到冰上，立即进入下步反应。

### 3.10 酶切消化

3.10.1 上一步反应时，提前在冰上配制酶切消化反应液(见表 22)：

表 22 酶切消化反应液

组分	单个反应体积
Digestion Buffer	1.4 $\mu\text{L}$
Digestion Enzyme	2.6 $\mu\text{L}$
Total	4 $\mu\text{L}$

3.10.2 吸取 4  $\mu\text{L}$  配制好的酶切消化反应液加入步骤 3.9.4 的 PCR 管中，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.10.3 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按照表 23 的条件进行反应

表 23 酶切消化反应条件

温度	时间
热盖	On
37°C	30 min

3.10.4 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

3.10.5 向 PCR 管中加入 7.5  $\mu\text{L}$  Digestion Stop Buffer，涡旋震荡 3 次，每次 3 s，瞬时离心将反应液收集至管底，吸取全部反应液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

### 3.11 酶切消化产物纯化

3.11.1 提前 30 min 取出 Library Purification Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。

 **注意：** Library Purification Beads 为试剂盒自带，与 AMPure® XP 磁珠或 MGIEasy DNA 纯化磁珠不兼容。

3.11.2 吸取 108  $\mu\text{L}$  Library Purification Beads 至步骤 3.10.5 的酶切消化产物中，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离心管中。

3.11.3 室温孵育 10 min。

3.11.4 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。

3.11.5 保持离心管置于磁力架上，加入 500  $\mu\text{L}$  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。

3.11.6 重复步骤 3.11.5，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。

3.11.7 保持离心管固定于磁力架上，打开离心管管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

3.11.8 将离心管从磁力架上取下，加入 16  $\mu\text{L}$  TE Buffer 进行 DNA 洗脱，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀。

3.11.9 室温孵育 10 min。

3.11.10 瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置 2-5 min 至液体澄清，将 14  $\mu\text{L}$  上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

 **停止点：** 酶切消化纯化后产物，可置  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱储存一个月。

### 3.12 酶切消化产物质检

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。最终产物要求摩尔产量  $\geq 120$  fmol（足够两次上机测序），可参考表 24 或参考附录 D 的公式 2 进行计算。

表 24 不同 PCR 产物片段大小对应 120 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)	120 fmol 对应产量 (ng)
22	105	4.16
30	113	4.47
50	133	5.27

## 第四章 测序

Small RNA文库配套专门的测序试剂套装，请根据如下说明选择具体对应的测序试剂套装：

### **若选用基因测序仪BGISEQ-500 测序：**

Small RNA文库配套专门的测序试剂：BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装（SE50）（Small RNA），测序类型为“SE50+10”，测序详细操作请参考《BGISEQ-500RS 高通量测序试剂套装（SE50）（Small RNA）说明书》。

### **若选用基因测序仪MGISEQ-2000测序：**

Small RNA文库配套专门的测序试剂：MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（SE50）（Small RNA），测序类型为“SE50+10”，测序详细操作请参考《MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装使用说明书》。

## 附录

### 附录 A 关于磁珠

PCR 扩增后片段筛选使用的磁珠，推荐使用 AMPure<sup>®</sup> XP 磁珠（Agencourt, Cat. No. A63881）或者 MGIEasy DNA 纯化磁珠试剂盒（MGI, Cat. No. 1000005278 或 1000005279）。如果使用其他来源磁珠，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。
- 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

- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请待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  $\mu$ L 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。
- 乙醇漂洗磁珠应使用新鲜配制并平衡至室温的 80%乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上，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。通常情况下，室温干燥需要 2-5 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。
- 在磁力架上开关离心管盖应小心，避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住离心管中下段，然后开盖。

## 附录 B 关于使用 RT Primer 的推荐组合方案

- 试剂盒提供 24 管 RT Primer (八连管式) (见图 4)。RT Primer 为满足样本批量化建库、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 4 种 RT Primer 组合方案, 分别为 8、12、16 和 24 个样本组合方案。但 RT Primer 的 barcode 编号不连续。为保证最佳效果, 使用时请仔细阅读表 25 的使用规则。
- 使用前必须先离心将液体聚集于管底, 轻柔地揭开管盖, 防止液体飞溅, 避免交叉污染; 使用时需用移液器吸打混匀液体; 使用完后需及时盖好管盖。
- 若有使用 MGIEasy Small RNA 建库试剂盒中序号为 501-516 的 RT Primer, 由于设计工艺不同, 禁止混用, 否则数据无法拆分。

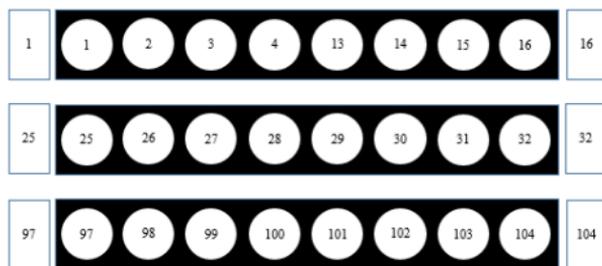


图 4 24 管 RT Primer (八连管式) 示意图

表 25 四种不同的 barcode 组合方案

方案	样品数目	RT Primer 组合
一	8	1-4, 13-16 或者 25-32 或者 97-104
二	12	1-4, 25-32 或者 1-4, 97-104
三	16	1-4, 13-16, 25-32
四	24	1-4, 13-16, 25-32, 97-104

## 附录 C 6% TBE PAGE 胶配制

若客户需要自己配制6% TBE PAGE胶，可参考表26和表27的试剂及配方：

表 26 PAGE 胶配制准备材料

仪器	通风橱
耗材	Kimwipes 低尘擦拭纸 (KIMBERLY-CLARK, Cat. No. 34120)
试剂	丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 40%溶液 (19:1) (生工, Cat. No. SD6012)
	10×TBE (Ambion, Cat. No. AM9863)
	过硫酸铵
	N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (生工, Cat. No. T0761)
	Nuclease free water (Ambion, Cat. No. AM9937)

表 27 6% TBE PAGE 胶配方

Nuclease free water	27.85 mL
10×TBE	3.75 mL
丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 40%溶液 (19:1)	5.62 mL
10%过硫酸铵	270 μL
N,N,N',N'-四甲基乙二胺	24 μL
总体积	37.5 mL
配胶数量	5.7 个



**注意：配制需在通风橱中进行。**

## 附录 D DNA 分子质量与摩尔数之间的换算

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

**公式 1** 双链 DNA 样本 pmol 与 ng 间的换算：

$$1 \text{ pmol PCR 产物对应的质量}(\text{ng}) = \frac{\text{DNA 主片段大小}(\text{bp})}{1000 \text{ bp}} \times 660 \text{ ng}$$

单链环状DNA产物纯化后产量应  $\geq 120 \text{ fmol}$ ，足够两次上机测序的量。可根据公式2计算所得单链环状DNA的摩尔数。

**公式 2** 单链环 fmol 与 ng 间的换算：

$$120 \text{ fmol 单链环对应的质量}(\text{ng}) = 0.12 \times \frac{\text{DNA 主片段大小}(\text{bp})}{1000 \text{ bp}} \times 330 \text{ ng}$$

## 附录 E 10 bp DNA Ladder

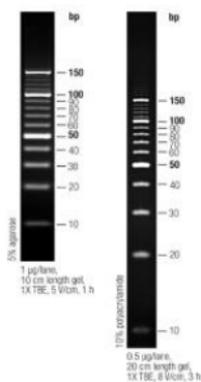


图 5 10 bp DNA Ladder

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](mailto:MGI-service@mgi-tech.com)

网 址: [www.mgi-tech.com](http://www.mgi-tech.com)



官方微信