Hieff NGS® Single Cell/Low Input RNA Library Prep Kit
单细胞/低投入量 RNA 建库试剂盒

12502ES

产品使用说明书

Ver. CN20230727

目录

产品简介 1

产品信息 1

组分信息 1

储存条件 1

使用说明 2

操作步骤 2

附录 6

注意事项 8

产品简介

Hieff NGS® Single Cell/Low Input RNA Library Prep Kit 是兼容 Illumina®和 MGI®双平台，可以对 1~1000 个细胞或者 10 pg~10 ng 的总 RNA 进行测序文库构建的试剂盒。本试剂盒是以 Oligo (dT) Primer 为引物，利用逆转录酶的末端转移酶活性即 Template-switching 活性在 cDNA 的 3’端添加接头序列，PCR 扩增以这个接头序列进行全长 cDNA 的合成，完成全长 cDNA 的富集，然后对获得的全长 cDNA 扩增产物进行酶切法文库构建，与传统的建库方法比较，本品采用高质量的片段化酶，同时简化操作流程，将片段化模块与末端修复模块合二为一，极大的降低了建库的时间和成本，来进行基因表达差异、可变剪接、融合基因等遗传调控信息分析。

产品信息

货号	12502ES08 / 12502ES24/ 12502ES96
规格	8 T / 24 T / 96 T

组分信息

组分编号		组分名称	12502ES08	12502ES24	12502ES96
12502-A	🟢	Cell Lysis Buffer	150 μL	450 μL	2×900 μL
12502-B	🟢	RNase Inhibitor	16 μL	48 μL	192 μL
12502-C	🟢	Oligo (dT) Primer	8 μL	24 μL	96 μL
12502-D	🔴	5×RT Buffer	32 μL	96 μL	384 μL
12502-E	🔴	TSO Primer	8 μL	24 μL	96 μL
12502-F	🔴	1st Strand Enzyme Master Mix	16 μL	48 μL	192 μL
12502-G	🔵	2×Hifi Amplification Mix	200 μL	600 μL	2×1200 μL
12502-H	🔵	PCR Primer	40 μL	120 μL	480 μL
12502-I	🟡	Smearase® Buffer	80 μL	240 μL	960 μL
12502-J	🟡	Smearase® Enzyme	40 μL	120 μL	480 μL
12502-K	🟣	Ligation Enhancer	240 μL	720 μL	2×1440 μL
12502-L	🟣	Novel T4 DNA Ligase	40 μL	120 μL	480 μL
12502-M	⚪	Canace® Pro Amplification Mix	200 μL	600 μL	2×1200 μL
*		Primer Mix*	40 μL	120 μL	480 μL

注：*标注表示该成分不包含在本试剂盒，需要额外配置，本试剂盒组分兼容 Illumina®和 MGI®双平台，但需要额外配置专属于 Illumina®或者 MGI®的 primer mix(Cat# 13334 Primer Mix for MGI®以及 Cat# 13335 Primer Mix for Illumina®)。

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

实验原理及流程

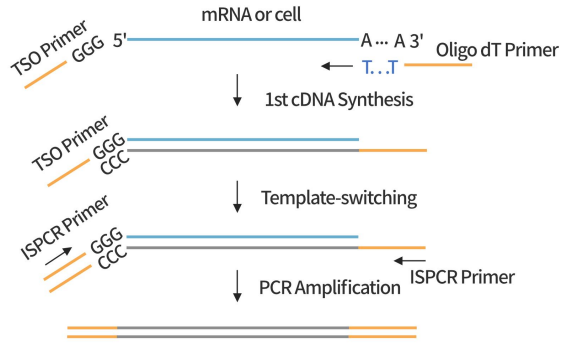

图 1 利用 Template-switching 进行全长 cDNA 合成的工作原理

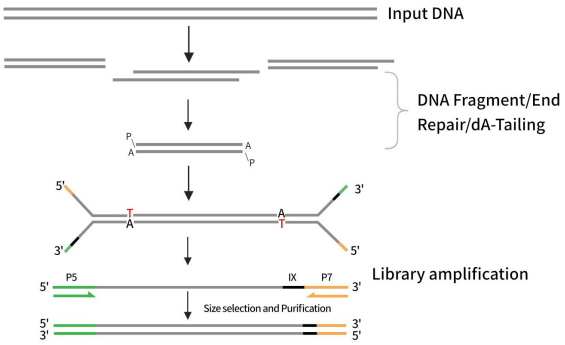

图 2 酶切法建库工作原理

操作步骤

Step 1 第一链 cDNA 的合成（超净台工作）

1、配置 Reaction Buffer

将第一链 cDNA 合成的试剂冰上解冻后，颠倒混匀，微离心于管底，置于冰上备用。按照下表 1 配置 Reaction Buffer：

注：TSO Primer 和 1st Stand Enzyme Mix 使用前轻弹管壁混匀，微离心，置于冰上使用。

表 1 Reaction Buffer 反应体系

名称	体积（μL）
Cell Lysis Buffer	18
RNase Inhibitor	2
Total	20

使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底，应避免产生气泡。

2、样品准备

对细胞样品或者 Total RNA 按照下表 2 配置样品反应体系：

表 2 Total RNA /细胞样品准备体系

名称	体积（μL）
Reaction Buffer	1
Total RNA /细胞样品	X
Nuclease Free H2O	5-X
Total	6

注:

1）需要台盼蓝或其他方法鉴定细胞活性，如果是流式细胞仪取样细胞，要观察细胞状态和进行细胞计数；

2）培养基中培养的细胞需要用 1×PBS 重悬后在进行裂解反应等；

3）如果细胞裂解后不进行后续反应可以-80°C保存备用。

3、RNA 变性

按照下表 3 配置变性体系：

表 3 RNA 变性反应体系

名称	体积（μL）
Total RNA/细胞反应液	6
Oligo (dT) Primer	1
Total	7

使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 4 所示设置反应程序，进行 RNA 变性，反应结束立即置于冰上约 3min。

表 4 RNA 变性反应程序

温度	时间
热盖 85°C	On
72°C	5 min
立即置于冰上	≥3min

4、第一链 cDNA 的合成

按照表 5 配置第一链 cDNA 合成的反应体系：

表 5 第一链 cDNA 反应体系

名称	体积（μL）
变性 RNA	7
5×RT Buffer	4
TSO Primer	1
1st Strand Enzyme Master Mix	2
Nuclease Free H2O	6
Total	20

使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 6 所示设置反应程序，进行第一链 cDNA 的合成。

表 6 第一链 cDNA 反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
42°C	90 min
70°C	15 min
4°C	Hold

待反应结束，置于冰上进行全长 cDNA 的扩增。

Step 2 全长 cDNA 的扩增（超净台工作）

1. 将全长 cDNA 扩增试剂从-20°C 取出，室温解冻，颠倒混匀后瞬离。按表 7 所示，配制全长 cDNA 扩增的反应液。

表 7 全长 cDNA 扩增反应体系

名称	体积（μL）
第一链 cDNA 反应体系	20
2×Hifi Amplification Mix	25
PCR Primer	5
Total	50

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。

3. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，按照表 8 所示设置反应程序，进行全长 cDNA 的扩增。

表 8 全长 cDNA 扩增反应程序

温度	时间	循环数
热盖 105°C	On	
98°C	3 min	1
98°C	20 s	参考注意事项四
67°C	15 s	
72°C	6 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

Step 3 全长 cDNA 扩增产物纯化（Post Ligation Clean Up）

1. 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。

2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

3. 吸取 50 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads（1.0×，Beads:DNA=1:1）至 PCR 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。

4. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。

5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。

7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 16 μL ddH2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 15 μL 上清至新 PCR 管中，进行后续反应，或者 -20°C 保存。

Step 4 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加（DNA Fragmentation/End Repair/dA-Tailing）

该步骤将全长 cDNA 片段化，同时进行末端修复及 dA 尾添加。

1. 将表 9 中各试剂从-20°C 取出，颠倒混匀后瞬离，置于冰上备用。

2. 按表 9 所示，于冰上配制 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加反应体系。

表 9　DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应体系

名称	**体积（μL）**
Input cDNA	x
Smearase® Buffer	10
Smearase® Enzyme	5
Nuclease Free H2O	Up to 60

3. 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 10 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 10　DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加 PCR 反应程序

温度	时间
热盖 105 °C	On
4 °C	1 min*
30 °C	5~20 min**
65 °C	20 min
4 °C	Hold

【注】：*DNA 片段化过程为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4 °C，待模块温度降至 4 °C 时，将 PCR 管放入 PCR 仪。

**对于酶切时间参考表 2.

Step 5 接头连接（Adapter Ligation）

该步骤可在末端修复和 dA 尾添加的产物末端，连接特定的 Illumina®或者 MGI®接头。

1. 参考注意事项六中的表 17，根据 Input cDNA 量，稀释 Adapter 至合适浓度。
2. 将表 11 中各试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
3. 于 Step 4 步骤结束后的 PCR 管中继续配制表 11 所示反应体系。

表 11 Adapter Ligation 体系

名称	体积（μL）
dA-tailed DNA	60
Ligation Enhancer	30*
Novel T4 DNA Ligase	5
DNA Adapter	5**
Total	100

【注】：*Ligation Enhancer 使用前请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

**本公司 Illumina 接头原始浓度为 15 μM，请根据注意事项六表 17-A 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL。

**本公司 MGI 接头原始浓度为 10 μM，请根据注意事项六表 17-B 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL。

4. 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
5. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 12 所示反应程序，进行接头连接反应。

表 12　Adapter Ligation PCR 反应程序

温度	时间
热盖 Off	-
20 °C	15 min
4 °C	Hold

【注】：当 Input DNA 量较低，实验效果不理想时，可尝试将连接时间延长一倍。

Step 6 连接产物磁珠纯化（Post Ligation Clean Up）

该步骤使用磁珠对接头连接产物进行纯化，纯化可除去未连接的 Adapter 或 Adapter Dimer 等无效产物。

1. 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 60 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.6×，Beads:DNA=0.6:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。

5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。

6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。

7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。

8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。

【注】：如纯化产物如需保存，可使用 TE Buffer 洗脱。

9. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 5 min），小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠，用于下一步文库扩增。

Step 7 文库扩增（Library Amplification）

该步骤将对纯化的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 13 中试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。

2. 于无菌 PCR 管中配制表 13 所示反应体系。

表 13-A 短接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积（μL）
Canace® Pro Amplification Mix	25
Universal Primer/ i5 Primer*	2.5
Index Primer/ i7 Primer*	2.5
Adapter Ligated DNA	20
Total	50

表 13-B 长接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积（μL）
Canace® Pro Amplification Mix	25
Primer Mix**	5
Adapter Ligated DNA	20
Total	50

【注】：*如果使用的是无 Index 的接头，俗称短接头（小 Y 接头），请使用短接头试剂（Cat#12414-12415)中配备的 Index primer 进行扩增。

**如果您使用的是 Indexed Adapter (Cat#13519-13520)，俗称长接头（大 Y 接头），可用 Cat#13335 中的 Hieff NGS® Primer Mix for Illumina®进行扩增。

表 13-C MGI 接头连接产物 PCR 反应体系

组分名称	体积（μL）
Canace® Pro Amplification Mix	25
Primer Mix for MGI®*	5
Adapter Ligated DNA	20
Total	50

【注】：*该 primer mix for MGI 不含在本试剂盒中，可用 Cat#13334 中的 Hieff NGS® Primer Mix for MGI®进行扩增。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 14 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 14 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
98 °C	1 min	1
98 °C	10 sec	**参考注意事项八
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	1
4 °C	Hold	-

【注】：**如果使用了不完整的接头，需要扩增 1-3 个循环，形成完整的接头。建库过程中若进行片段分选，扩增时请参照较高循环数扩增。

Step 8 扩增产物磁珠纯化（Post Amplification Clean Up）

1. 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80%乙醇。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 45 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads（0.9×，Beads:DNA=0.9:1）至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂（不超过 5 min）。
8. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 32 μL ddH_2O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后（约 3 min），小心移取 30 μL 上清至新 PCR 管中，进行文库定量、质检。

Step 9 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项九。

附录

1. cDNA 扩增产物检测

使用 2100Agilent 2100 Bioanalyzer 的 High Sensitivity DNA Chip 检测取 1ul 纯化后的 cDNA 扩增产物，1 个 293 T 细胞和 10pg 的 293 Total RNA，同时扩增 18 个循环后，峰图分析如图 3，NTC 是无模板阴性对照。

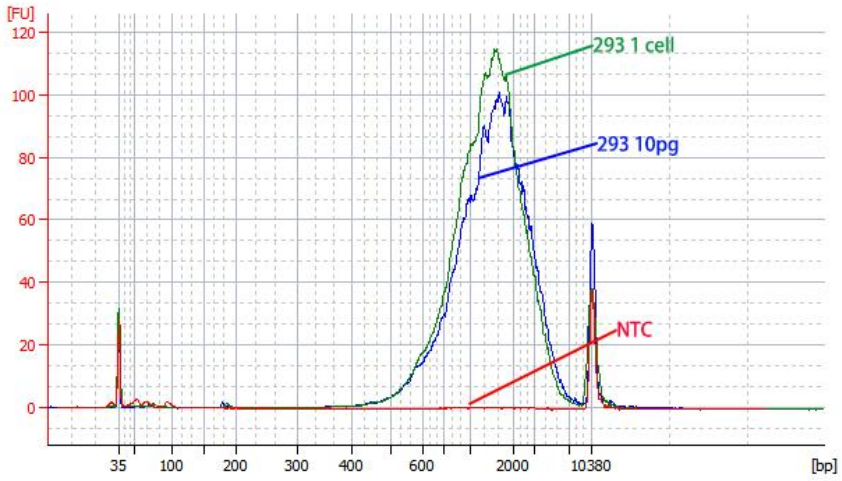

图 3 cDNA 扩增产物检测

2. 测序数据分析

	cDNA 模板	cDNA 投入量	Clean Reads	Clean Q30 (%)	Clean GC (%)	rRNA (%)	Map Ratio (%)	Dup (%)	Gene Count (FPKM>0)	Gene Count (FPKM>1)	Transcript Count (FPKM>0)	Transcript Count (FPKM>1)
MGI 平台	10 个 cell 投入制备的全长 cDNA	500 pg	4924506	93.54	49.13	0.32	96.1	2.81	26166	13667	66442	24699
		1 ng	3339833	92.64	49.43	0.29	96.91	2.18	18353	12335	50910	23207
		5 ng	3845591	93.68	48.8	0.34	96.6	2.10	19268	12518	53828	23455
	100pg RNA 投入制备的全长 cDNA	500 pg	4533991	93.51	48.84	0.99	95.56	2.88	22833	15266	64238	28538
		1 ng	4056351	93.42	49.17	1.02	97.17	2.38	22874	15577	63507	29045
		5 ng	3956755	93.62	49.04	1.01	95.22	2.09	22367	15271	62007	28631
Illumina 平台	10 个 cell 投入制备的全长 cDNA	500 pg	4024979	91.13	49.71	0.37	97.75	21.38	18035	12358	49996	23077
		1 ng	4159540	91.68	49.58	0.36	97.95	22.97	18085	12251	50750	23082
		5 ng	4203454	90.92	49.18	0.36	98.05	22.80	18263	12319	51100	23168
		20 ng	3654161	91.51	49.44	0.41	97.55	20.52	17824	12321	47951	22870
	1 ngRNA投入制备的全长 cDNA	500 pg	4040114	91.20	49.69	1.26	98.1	21.67	22495	15225	62071	28501
		1 ng	4558664	91.17	49.56	1.26	98.32	22.91	23127	15335	64366	28720
		5 ng	4321430	91.41	49.50	1.31	98.3	21.39	22805	15347	63075	28814
		20 ng	4177620	91.90	49.42	1.4	97.67	22.309	22528	15374	61445	28687

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 请于使用前将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
3. 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。
4. 请使用无RNase污染的耗材，并对实验区域定期进行清理，推荐使用ThermoFisher公司的RNA*Zap*™高效核酸去除喷雾去除RNA酶污染。
5. 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。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；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁（推荐使用ThermoFisher公司的DNA*Zap*™高效核酸去除喷雾），以保证实验环境的洁净度。
6. 本产品仅用作科研用途!

二、适用范围

本产品是以 Oligo (dT) Primer 为引物进行全长 cDNA 合成以及文库构建，所以扩增模板需要带有 poly（A），兼容的样本类型如下：

1. 1~1000 个哺乳动物或者没有细胞壁的真核生物细胞。
2. 10 pg~10 ng 纯化后的带有 poly（A）的总 RNA。
3. 本品不适合原核生物总 RNA 和有降解的 RNA，如 FFPE RNA。

三、样品准备

1. Total RNA

本产品可以对最低 10pg total RNA 进行文库构建，但是如果样本足够多的话，可以做更高投入量 total RNA 的全长 cDNA 的合成并建库。纯化的总 RNA 尽可能溶解到 Nuclease Free H2O 中。进行反应操作前需要使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit 评估 RNA 的完整性。降解的 RNA 作为起始模板，会造成 cDNA 的产出偏低，片段长度变小，并可能导致反应失败。

2. 细胞准备

该产品可以直接从细胞开始完成全长 cDNA 的合成以及文库构建，因此对细胞样品需要做一定的准备：

- 细胞培养基或样品中某些成分可能会对反应产生抑制作用，建议细胞裂解前先用 1×PBS 重悬，再进行反应；
- 细胞状态决定 RNA 的质量，实验前需要用台盼蓝或其他方式鉴定细胞活性，死亡的细胞，RNA 降解严重会导致反应失败；
- 如果不进行后续实验，需要将细胞裂解后进行-80°C保存。

四、关于全长 cDNA 扩增

全长 cDNA 的扩增循环数是根据样本投入量、需要的 cDNA 产量调整循环数，cDNA 产量在 1~20 ng 的循环数可以根据表 15 进行推荐选择，如果需要 100 ng~1 μg 的 cDNA 产量，需要在推荐的基础上增加 3~5 个循环数。

表 15 不同投入量细胞/Total RNA 的循环数推荐

Input Total RNA	Input Cell Number	Number of cycles
10 pg	1 cell	17~18
100 pg	10 cells	14~15
1 ng	100 cells	10~11
10 ng	1000 cells	7~8

五、关于全长 cDNA 片段化

1. 本试剂盒兼容范围为 500 pg~20 ng 全长 cDNA 的片段化。

2. 对于常规的高质量全长 cDNA，酶切时间参考表 16，针对不同样本，需客户在自己的实验体系中进行微调，以达到最佳效果。

4. 为保证优质精确的片段化效果，片段化反应配制过程请于冰上操作。

5. 该试剂可与片段化末修加 A 过程同时进行，无需额外的操作。

表 16 常规 cDNA 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
600 bp	8 min	6~12 min
350 bp	10 min	8~14 min
250 bp	12 min	10~15 min
200 bp	15 min	13~18 min
150 bp	20 min	15~25 min

六、关于接头连接（Adapter Ligation）

1.本公司可提供 Illumina®或者 MGI®长接头(Barcoded Adapter)试剂盒和短接头试剂盒，客户可根据实验需求进行选择。

2.我们建议选用高质量的商业化接头，如客户使用自制接头，请委托具有 NGS 引物合成经验的公司，并备注需进行严格的防污染控制。此外，进行接头退火操作时，请在超净台完成。每次只操作一种接头，防止交叉污染。

3.使用接头时，请提前将接头取出放在 4°C 或冰盒上解冻；室温操作时，实验室温度最好不要超过 25°C，防止接头解链。

4.建库过程中，接头浓度过高或过低都会导致建库成功率变低。本试剂盒操作方案中，所加入的接头体积固定为 5 μL，请根据全长 cDNA 的投入量，参考表 3 对接头进行稀释。接头稀释液请选择 0.1×TE buffer，稀释过的接头可在 4°C 保存 48 h。

表 17-A 500 pg~20 ng 全长 cDNA 量与 Illumina ®接头浓度推荐表

Input 全长 cDNA	Illumina® Adapter stock concentration
≤1 ng	1.5 μM
5 ng	3 μM
10 ng	5 μM
20 ng	5 μM

表 17-B 500 pg~20 ng 全长 cDNA 量与 MGI®接头浓度推荐表

Input 全长 cDNA	MGI® Adapter stock concentration
≤1ng	1 μM
5ng	2 μM
10ng	5 μM
20ng	5 μM

七、关于磁珠纯化与分选（Bead-based Clean Up and Size Selection）

1. 建库过程中有多个步骤需要使用 DNA 纯化磁珠，我们推荐使用 Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601)或 AMPure® XP 磁珠(Beckman Cat#A63880)进行 DNA 纯化和分选。

2. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。

3. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。

4. 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。

5. 磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。

6. 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 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。

7. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 0.1×TE Buffer 洗脱，产物于 4°C 可保存 2 天，-20°C 可保存 1 个月。

八、关于文库扩增（Library Amplification）

文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足，将导致文库产量低；循环数过多，又将导致文库偏好性增加、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 18 列举了使用本试剂盒，获得 1 μg 文库的推荐循环数。

表 18　500 pg~20 ng 全长 cDNA 获得 1 μg 产物扩增循环数推荐表

Input cDNA (ng)	Number of cycles required to generate 1 μg*
500pg	13~14
1ng	12~13
5ng	10~11
20ng	8~9

【注】：*如果使用了不完整的接头，需要扩增 1-3 个循环，形成完整的接头。建库过程中若进行片段分选，扩增时请参照较高循环数扩增。

九、关于文库质检（Library Quality Analysis）

1. 通常情况下，构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

2. 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit®、PicoGreen®等；基于 qPCR 绝对定量的方法。

3. 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。

4. 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit®、PicoGreen®等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物以及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或双端都不连接 Adapter 的不可测序文库干扰。

5. 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

十、自备材料

1. DNA 纯化磁珠：Hieff NGS® DNA Selection Beads（Yeasen Cat#12601）或 AMPure® XP Beads（A63880）或等效产品。

2. RNA 质检：Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico Kit 质检 RNA 的质量度。

3. Adapters：Complete Adapter for Illumina®使用（Cat#13519-13520 或其他等效产品）或 Complete Adapter for MGI® 使用 （Cat#13536-13539 或其他等效产品）。

4. 文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品；文库定量试剂。

5. 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等

备忘录：

帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐