ICS 07.080
CCS C 04

团　　体　　标　　准

T/CI XXXX—XXXX

RNA 定量测序技术规程

The technical procedure of RNA quantitative sequencing

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国国际科技促进会　　发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　缩略语 1
5　质量控制要求 2
6　RNA 核酸样品采集方法 3
7　总 RNA 核酸样品完整度检测 4
8　RNA 建库 4
9　高通量测序仪质控及测序 10
10　数据分析 10

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国国际科技促进会提出并归口。

本文件起草单位：深圳承启生物科技有限公司、武汉承启医学检验实验室有限公司、暨南大学、华南理工大学、赛哲生物。

本文件主要起草人：张　弓、陈　洋、余　卓、王　鑫、卢少华、金静洁、杜红丽、卢　红、陈　杰。

RNA 定量测序技术规程

1 范围

本文件确立了用于高通量转录组测序的总RNA核酸类样品的转录组测序和质控全流程，包括样本采集、处理、运输、检测和数据产生和质量评估分析全流程。

本文件适用于从新鲜动植物组织、新鲜可培养细胞、全血和细菌/真菌等样品总提取的真核生物和原核生物的总RNA样本的测序。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 35537-2017 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 40664-2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求

T/CHIA 21.4-2021 组学样本处理与数据分析标准 第4部分：转录组文库构建

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

高通量基因测序 high-throughput gene sequencing

区别于传统双脱氧（Sanger）测序，一种能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通常一次测序反应能产出不低于100 Mb的测序数据。

[来源：GB/T 30989-2014，3.19]

3.2

转录组测序 whole transcriptome sequencing

是通过二代测序平台快速全面地获得某一物种特定细胞或组织在某一状态下的几乎所有的转录本及基因序列，可以用于研究基因表达量、基因功能、结构、可变剪接和新转录本预测等。

[来源：T/CHIA 21.5-2021，3.1]

3.3

文库 library

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术等所得到的一个重建分子群，如基因组文库、互补DNA文库、噬菌体展示肽文库等。

[来源：GB/T 30989-2014，3.5]

3.4

测序片段 reads

高通量测序平台产生的含有碱基序列和质量值的序列片段。

[来源：GB/T 35890-2018，3.2]

3.5

Q30

测序数据中，碱基识别质量值为30的碱基识别准确率为99.9%，或错误率为0.1%。

[来源：GB/T 40226-2021，3.6]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RNA：核糖核苷酸（Ribonucleic acid）
DNA：脱氧核糖核苷酸（DeoxyriboNucleic acid）
rRNA：核糖体RNA（Ribosomal RNA）
bp：碱基对（Base pair）
OD：光密度（Optical density）
Trizol：总RNA抽提试剂（TRIpure Reagent）
PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）
DNB：DNB纳米球（DNA nanoball）
NCBI：美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information）
RefSeq：RNA参考序列库（RNA reference sequences collection）
FANSe3：超高精度的高速序列比对算法（Fast and Accurate mapping algorithm for Next-generation Sequencing, the 3rd generation）

5 质量控制要求

5.1 通用要求

5.1.1 生物样本及相关数据的使用应遵守区域、国家和国际的伦理规范。
5.1.2 样本质量要求应通过完整性和样本浓度确定，达到GB/T40664的总RNA样品质量要求。
5.1.3 用于高通量测序的核酸类样本应根据GB/T 35537-2017中4.1和4.2章节中的碱基测序准确率的要求进行质量控制。
5.1.4 使用MHCC97H细胞来源的RNA标准品进行转录组测序，对测序仪状态进行评估：测序数据使用FANSe3将reads比对到NCBI refseq标准参考转录组，FANSe3设置参数为FANSe3设置参数为-E5 -I1，mapping率＞80%，Q30＞80%，说明仪器和试剂状态良好，可正常进行转录组高通量测序。

5.2 动植物组织、培养细胞、全血和细菌/真菌样本量要求

根据不同样品类型和不同测序目标准备足量样品，在条件许可情况下，尽量加倍准备样品量，并做好样品备份工作，表1为样品最低量要求。

表1 样品最低量要求

样品类型	最低样品量
新鲜动物组织	200 mg
新鲜植物组织	300 mg
新鲜培养细胞	3×10^6 个
全血	3 mL
细菌/真菌菌体	300 mg

5.3 RNA样品运输要求

5.3.1 RNA样品如果需要运输，应尽量送往距离最近的实验室进行后续实验操作。
5.3.2 如需低温运送，应使用足够多的冰袋和保温盒，保证整个运输过程中的温度。低温运送时不应使用干冰。
5.3.3 空运时可使用普通0℃冰袋或-20℃封闭式冰盒，以防止温度过低而使塑料管变脆破裂。应使用旋盖密封管或气密性包装，以免因气压变化造成管盖弹开。
5.3.4 不同运送距离和时间，推荐运输条件见表2。

表2 RNA样品推荐运输条件

距离	到达时间	建议运输条件
小于200公里	当天	常温
200公里至1200公里	当天	常温
	陆运2天	常温，也可加0℃冰袋

距离	到达时间	建议运输条件
1200 公里至 2500 公里	陆运 3 至 4 天或空运 2 天	普通 0℃冰袋
大于 2500 公里	空运 3 天	普通 0℃冰袋
	陆运 7 至 10 天（需谨慎）	-20℃封闭式冰盒

5.4 总 RNA 核酸样本质量要求

5.4.1 总 RNA 完整性

总RNA样本的完整性应符合GB/T 40664的要求。通过凝胶电泳分析总RNA的rRNA的28S/18S（真核样品）和23S/16S（原核样品）rRNA比值进行判断，rRNA条带亮度比值接近2:1，rRNA条带明亮完整，说明无明显降解。

5.4.2 总 RNA 浓度和纯度

样本总RNA浓度应大于1 ng/μL。RNA样本纯度：$OD_{260/280}$=1.8～2.0。

5.5 转录组建库样本质量要求

常见的动物、植物、真菌等物种，包括人、鼠、水稻、拟南芥、酵母等。推荐使用的投入总RNA量为10 ng-1 μg。对于如水稻、拟南芥等植物mRNA丰度较低的物种，建议提高投入总RNA量至1 μg-2.5 μg。当样本轻微降解可适当增加投入量，总投入量不超过2.5 μg。

6 RNA 核酸样品采集方法

6.1 样品前处理

不同样品种类，样品前处理操作见表3：

表3 不同种类样品前处理方法

样品类型	处理方法
无细胞溶液（如细胞培养上清、血清，包括已提纯好溶于水的RNA）	至少加入溶液体积5倍以上的Trizol，充分混匀。蛋白质浓度特别高时（如血清）建议至少加入10倍以上体积的Trizol。
动物细胞（培养细胞）、植物原生质体	直接溶于足量Trizol中。
动物组织、临床组织块	大块的组织不易溶解，需低温快速剪成或切成0.5 mm^3以下的小块。由于组织离体后RNA会随着时间变化而变化，且RNA更易降解，因此若剪碎时间较长，请在液氮中研磨。Trizol的量要加足，建议按10倍体积来加。部分组织可能较难溶解，可用涡旋振荡器剧烈振荡，或用枪头、玻璃棒、金属棒等碾碎，使其均匀溶于Trizol，无沉淀。骨组织等无机盐含量高的组织块最终无法全部溶解，属正常现象。
细菌	微量台式离心机3000-6000 rpm 3-10分钟离心收菌，勿使用过高离心力。弃上清，溶于Trizol，可能需要剧烈涡旋振荡或枪头反复吹打才可完全溶解。部分细菌（尤以革兰阳性菌为甚）细胞壁非常厚，难以良好溶于Trizol，造成RNA提取效率极低。遇到这种情况请在收菌后用溶菌酶先进行破壁，再使用Trizol。极端情况下请于低温下使用细菌磨、French Press、Cell cracker等设备进行快速破壁后再溶于Trizol，但切记动作要快，细胞破碎后RNA降解会很迅速，即便是在4℃条件下。
植物组织	由于植物组织次生代谢产物极其复杂，常多糖多酚，不同组织差异极大，因此可先将组织在液氮中碾碎，然后溶于足量Trizol，离心取上清。若提取效率低下，建议采用试剂盒或CTAB法提取RNA，再按无细胞溶液溶于Trizol。

6.2 总 RNA 样品提取方法

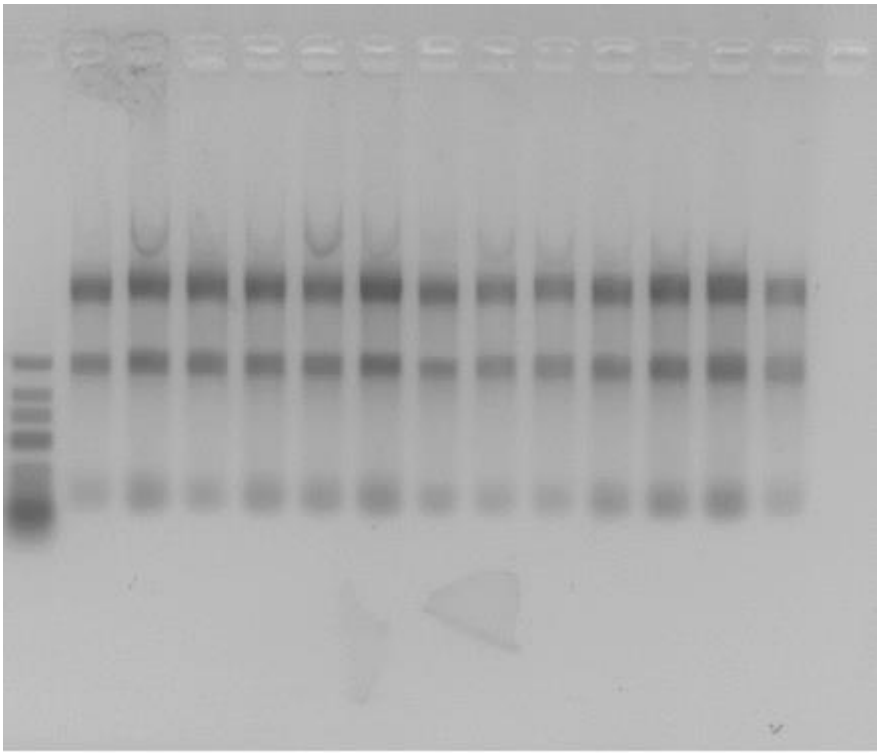
总RNA样品提取方法如下：

a) 每 1000 微升 Trizol 加入 0.2 mL 氯仿，剧烈混匀（可涡旋）15 s，室温放置 3 min，可观察到样品开始分层；
b) 12000 ×g， 4℃离心 15 min，使样品分成三层；
c) 小心吸取上层水相，约 600 μL，转移至新的 1.5 mL EP 管中，注意操作时不要吸取到中间层液体；

d) 加入 800 μL 异丙醇，倒置混匀；
e) 置于-20℃静置 8h；
f) 8h 后，12000 ×g，4℃ 离心 30 min，去除上清液；
g) 加入 1 mL 75% 乙醇（需-20℃提前预冷 30 min）；
h) 7500 ×g， 4℃离心 5 min，去除上清；
i) 重复步骤 6.2 g)、6.2 h)一次；
j) 去除残留的乙醇，打开管盖，风干 5 min；
k) 加入无 RNA 酶的纯水溶解，此步骤得到总 RNA 样品，置于-80℃冰箱保存。

7 总 RNA 核酸样品完整度检测

采用凝胶电泳分析法检测RNA完整度。凝胶电泳检测总RNA样本完整性结果见图1。



注：左边第一泳道为指示核酸分子大小的一系列核酸分子，从上到下分子量大小分别为：2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp和100 bp；其余泳道为真核细胞总RNA样品，样品均为完整度高的总RNA样品。

图1 琼脂糖凝胶电泳评估总 RNA 提取的纯度和完整度

8 RNA 建库

8.1 基因组 DNA 去除

RNA易被DNA污染，若不去除基因组DNA容易影响测序质量。需先用DNase I去除 DNA 并纯化后再开始后续实验，具体操作如下：

a) 反应体系见表 4；

表4 DNA 去除反应液

组分	投入质量或体积
Total RNA	1 μg
10X reaction buffer with $MgCl_2$	1 μL
DNase I，RNase-free	1 μL（1U）
RNase-Free Water	to 10 μL

b) 37℃孵育 30 min；
c) 加入 1 μL 50 mM EDTA 60℃孵育 10 min 终止 DNase I 反应；
d) 去除基因组后的 RNA 马上进行 mRNA 富集。

8.2 mRNA 富集

使用Vazyme的Library Preparation VAHTS mRNA Capture Beads进行mRNA捕获：

a) 将 mRNA Capture Beads 从 2℃-8℃取出，静置使其温度平衡至室温；
b) 准备 RNA 样品：在一个 Nuclease-free PCR 管中，用 Nuclease-free H_2O 将 0.01 μg-12.5 μg 总 RNA 稀释至 50 μL，冰上放置备用；
c) 涡旋振荡 mRNA Capture Beads 充分混匀，吸取 50 μL 加入到总 RNA 样品中，用移液器吹打至少 10 次以彻底混匀；
d) 将样品置于 PCR 仪中，65℃ 5 min，25℃ 5 min，4℃ hold，使 mRNA 结合到磁珠上；
e) 将样品置于磁力架 5 min，使 mRNA 与总 RNA 分离；小心移除上清；
f) 将样品从磁力架上取出，用 200 μL Beads Wash Buffer 吹打 6 次以彻底混匀，在磁力架上静置 5 min，小心移除上清；
g) 将样品从磁力架上取出，用 50 μL Tris Buffer 重悬磁珠；用移液器吹打 6 次以彻底混匀；
h) 将样品置于 PCR 仪中，80℃ 2 min，25℃ hold，将 mRNA 洗脱下来；
i) 加入 50 μL Beads Binding Buffer，用移液器吹打 6 次以彻底混匀；
j) 室温放置 5 min，使 mRNA 结合到磁珠上；
k) 将样品置于磁力架 5 min，使 mRNA 与总 RNA 分离；小心移除上清；
l) 将样品从磁力架上取出，用 200 μL Beads Wash Buffer 吹打 6 次以彻底混匀，在磁力架上静置 5 min，小心移除全部上清；
m) 加入 12 μL Nuclease-free H_2O,用移液器吹打 6 次充分混匀,将样品置于 PCR 仪中,80℃ 2 min，立即置于磁力架上 5 min，待溶液澄清后，小心吸取 10 μL 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中；
n) 剩余的 2 μL 于 NanoDrop 仪器检测 mRNA 富集后浓度，一般浓度大于 0.5 ng/μL 都可进入后续 RNA 文库构建；
o) mRNA 富集后样品可置于-20℃短暂保存，建议立即进入 RNA 文库构建。

8.3 RNA 片段化

若计划使用基于桥式PCR扩增与边合成边测序结合的测序技术平台对mRNA文库进行二代测序应将步骤8.3至8.10替换为T/CHIA 21.4—2021中4.1.3至4.1.9章节中的普通转录组建库流程进行；本流程基于MGIEasy mRNA文库制备试剂盒进行标准文库构建，最终将使用基于DNA纳米球与联合探针锚定聚合技术结合的测序技术平台对mRNA文库进行二代测序：

a) 向 mRNA 富集后的 10 μL 洗脱液洗脱液中加入 4 μL Fragmentation Buffer 吹打 10 次混匀，瞬时离心后放入 PCR 仪中；
b) 根据插入片段大小的需要，选择相对应的片段化条件，片段化条件见表 5。

表5 片段化条件推荐

插入片段	片段化条件	片段化时间
150 bp	94℃	8 min
250 bp	87℃	6 min

8.4 反转录以及二链合成

8.4.1 将 RT Buffer 从-20℃取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制反转录反应液，反应液体系见表 6。

表6 反转录反应液

组分	体积
RT Buffer	5 μL
RT Enzyme Mix	1 μL

组分	体积
Total	6 μL

8.4.2 用移液器吸取 6 μL 配制好的反转录反应液加入上一个步骤的片段化后产物中吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

8.4.3 按照表 7 中的反应条件在 PCR 仪中进行反应。

表7 反转录反应条件

温度	时间
热盖	on
25℃	10 min
42℃	30 min
70℃	15 min
4℃	Hold

8.4.4 反应结束后，将产物置于冰上，瞬时离心 10 s。

8.4.5 将 Second Strand Buffer 从-20℃取出，解冻后颠倒混匀，在冰上配制二链合成反应液，反应液体系见表 8。

表8 二链合成反应液

组分	体积
Second Strand Buffer	26 μL
Second Strand Enzyme Mix	4 μL
Total	30 μL

8.4.6 用移液器吸取 30 μL 配制好的二链合成反应液加入到上一步骤的反转录产物中吹打 10 次混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

8.4.7 按照表 9 反应条件在 PCR 仪中进行反应。

8.4.8 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。

表9 二链合成反应条件

温度	时间
热盖	on
16℃	60 min
4℃	Hold*
注：*不建议停止在此步骤，会降低产物回收效率，继续做完二连产物纯化后方可停止实验。	

8.5 二链产物纯化

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

8.5.2 用移液器吸取 75 μL DNA Clean Beads 至步骤 8.4.8 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。

8.5.3 室温孵育 5 min。

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

8.5.5 保持 1.5 mL 离心管置于磁力架上加入 200 μL 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。

8.5.6 重复 8.5.5 步骤尽量吸干管内液体，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。

8.5.7 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。

8.5.8 将 1.5 mL 离心管从磁力架上取下加入 42 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀 ，瞬时离心。

8.5.9 室温下孵育 5 min。

8.5.10　将 1.5 mL 离心管置于磁力架上静置 2 min-5 min 至液体澄清将 40 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

8.5.11　停止点：二链产物纯化后，可置于-20 ℃冰箱储存。

8.6　末端修复及添加 dA 尾

8.6.1　在冰上配制末端修复及添加 dA 尾反应液，反应液体系见表 10。

表10　末端修复及添加 dA 尾反应液

组分	体积
ERAT Buffer	7.1 μL
ERAT Enzyme Mix	2.9 μL
Total	10 μL

8.6.2　用移液器吸取 10 μL 配制好的 末端修复&添加 dA 尾反应液加入步骤 8.5.10 的纯化后二链产物中并轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

8.6.3　按照表 11 反应条件在 PCR 仪中进行反应。

8.6.4　瞬时离心将反应液收集至管底。不建议在此处停止，请继续做步骤 8.7 如果必须停止，末端修复产物可以放在-20 ℃冰箱过夜，但产量可能下降 20%左右。

表11　末端修复及添加 dA 尾反应条件

温度	时间
热盖	on
37 ℃	30 min
65 ℃	15 min
4 ℃	Hold

8.7　接头连接

8.7.1　Total RNA 为 1 μg 所以接头应该稀释 5 倍使用，反应液体系见表 12：

表12　Adapter 稀释

组分	体积
Adapter	2 μL
TE Buffer	8 μL
Total	10 μL

8.7.2　在步骤 8.6.4 的 PCR 管中加入 5 μL 对应的稀释后的 Adapter，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

8.7.3　在冰上配制接头连接反应液，反应液体系见表 13：

表13　接头连接反应液

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

8.7.4　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 8.7.2 的 PCR 管中用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。

8.7.5　按照表 14 反应条件进行在 PCR 仪中进行反应，反应体系见表 14：

表14　接头连接反应条件

温度	时间
热盖	on
23° C	30 min
4° C	Hold

8.7.6　瞬时离心将反应液收集至管底。

8.7.7 加入 20 μL TE Buffer 至总体系 100 μL，全部转移到新的 1.5 mL 离心管中。接头连接后产物可放置-20℃冰箱过夜储存，不超过 16 h。

8.8 连接产物纯化

8.8.1 插入片段为 150 bp（RNA 片段化条件为 94℃，8 min）的纯化方法。

8.8.1.1 提前 30 min 取出 DNA Clean Beads 置于室温，使用前充分震荡混匀。
8.8.1.2 用移液器吸取 50 μL DNA Clean Beads 至步骤 8.7.7 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 0.2 mL PCR 管中.
8.8.1.3 室温孵育 5 min。
8.8.1.4 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架，静置 5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
8.8.1.5 保持 PCR 管置于磁力架上加入 200 μL 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。
8.8.1.6 重复 8.8.1.5 步骤尽量吸干管内液体，保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
8.8.1.7 将 PCR 管从磁力架上取下加入 52 μL TE Buffer 进行 DNA 洗脱用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀 ，瞬时离心，室温下孵育 5 min。
8.8.1.8 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清将 50 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。连接产物纯化后，可置-20℃冰箱储存。

8.8.2 插入片段为 250 bp（RNA 片段化条件为 87℃，6 min）的纯化方法。

8.8.2.1 用移液器吸取 32.5 μL DNA Clean Beads 至步骤 8.8.1.8 中的 50 μL 上清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 0.2 mL PCR 管中，室温下孵育 5 min。
8.8.2.2 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清将 80 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
8.8.2.3 用移液器吸取 10 μL DNA Clean Beads 至步骤 8.8.2.2 中的 80 μL 上清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 0.2 mL PCR 管中，室温下孵育 5 min。
8.8.2.4 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架，静置 5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。
8.8.2.5 保持 PCR 管置于磁力架上加入 200 μL 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。
8.8.2.6 重复步骤 8.8.2.5 尽量吸干管内液体，保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
8.8.2.7 将 PCR 管从磁力架上取下加入 23 μL 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，室温下孵育 5 min。
8.8.2.8 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清将 21 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。连接产物纯化后，可置-20℃冰箱储存。

8.9 PCR 扩增

8.9.1 在冰上配置 PCR 反应液如表 15 所示，当样品数量比较多时，可增加一个 test 于 1.5 mL 离心管配置反应液。

表15 PCR 反应液

组分	体积
PCR Enzyme Mix	25 μL
PCR Primer Mix	4 μL
Total	29 μL

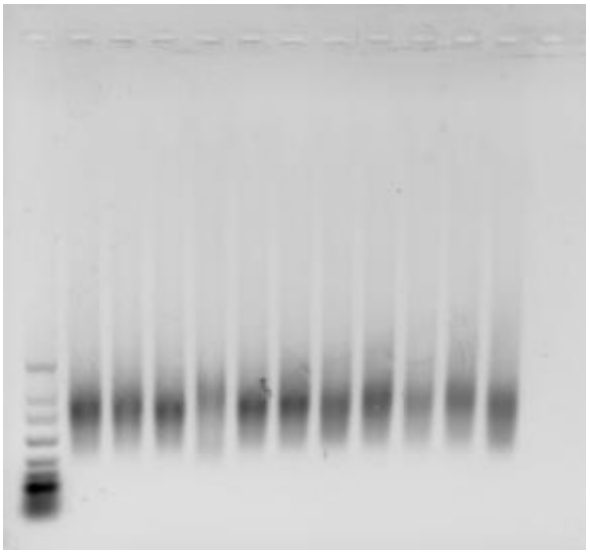
8.9.2 用移液器吸取 29 μL 配制好的 PCR 反应液加入步骤 8.8.2.8 的 PCR 管中，用移液器轻轻吹打至少 10 次至完全混匀，瞬时离心将反应液收集至管底。
8.9.3 按照表 16 反应条件进行在 PCR 仪中进行反应：

表16　PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
热盖	on	1循环
95℃	3 min	
95℃	30 s	10-14循环（1 μg Total RNA设置12或13个循环）
56℃	30 s	
72℃	1 min	
72℃	5 min	1循环
4℃	Hold	

8.9.4　瞬时离心将反应液收集置管底，吸取全部反应液转移到新的 PCR 管中。

8.9.5　PCR 产物质控：取 1 μL PCR 产物琼脂糖凝胶电泳查看 PCR 产物片段大小以及文库浓度（图 2），若插入片段为 250 bp 则 PCR 产物主片段在 330 bp 左右，插入片段为 150 bp 则 PCR 产物主片段在 230 bp 左右，条带颜色均匀，说明不用继续加 PCR 循环数。



左边第一泳道为指示核酸分子大小的一系列核酸分子，从上到下分子量大小分别为：500 bp、400 bp、300 bp、200 bp、150 bp、100 bp和50 bp；其余泳道为PCR产物。

图2　PCR 产物质检

8.10　PCR 产物纯化

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

8.10.2　用移液器吸取 60 μL DNA Clean Beads 至步骤 8.9.4 中的 PCR 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 0.2 mL PCR 管中.

8.10.3　室温孵育 5 min。

8.10.4　瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架，静置 5 min 至液体澄清，用移液器小心吸取并丢弃上清。

8.10.5　保持 PCR 管置于磁力架上加入 200 μL 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。

8.10.6　重复步骤 8.10.5 尽量吸干管内液体，保持 PCR 管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

8.10.7　将 PCR 管从磁力架上取下加入 32 μL 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，室温下孵育 5 min。

8.10.8　将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min 至液体澄清将 30 μL 上清液转移到新的 0.2 mL PCR 管中。PCR 纯化后产物，可置-20℃保存。

8.10.9　使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 测定文库浓度。要求最终 PCR 产物的摩尔产量≥ 1 pmoL，不同片段大小的 PCR 产物对应的产量请参考表 17。

表17　不同片段大小 PCR 产物 1 pmoL 对应产量

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

9　高通量测序仪质控及测序

使用MHCC97H细胞来源的RNA标准品进行转录组测序，对测序仪状态进行评估：MHCC97H细胞来源的测序数据使用FANSe3将reads比对到NCBI refseq标准参考转录组，FANSe3设置参数为-E5 -I1，mapping率＞80%，Q30＞80%，说明仪器和试剂状态良好，可正常进行待测样品的转录组高通量测序。

10　数据分析

测序数据使用FANSe3将reads比对到NCBI RefSeq标准参考转录组。FANSe3设置参数一般为-E5 -I1，若数据质量较差或期望变异程度较高，可适当放宽错配容限，如-E12% -I1 -S12。或使用Chi-Cloud测序云分析平台进行数据质量评估、基因比对、转录本定量及基因功能富集等完整分析。

注：Chi-Cloud测序云分析平台下载链接：http://www.chi-biotech.com/software/CHI.Client_V01R04C08.7z