

Fast RNA-seq Lib Prep Kit V2

RK20306



使用说明书

Version: N19H22V5.3

目录

1. 产品概述	1
2. 产品组分	1
3. 保存及运输条件	2
4. 其他自备材料	2
5. 实验流程	3
6. 操作注意事项	3
7. 文库构建步骤	5
8. 附录	14
9. 附表	16

1. 产品概述

Fast RNA-seq Lib Prep Kit V2 (ABclonal, Cat. RK20306)是一款高效快速兼容性强的 RNA 建库试剂盒。适用于动植物，真菌等真核生物 Total RNA 样本，或者已经纯化好的 mRNA 样本；可将 10-1000 ng 的 RNA 样本构建成为适用于 MGI 和 Illumina 高通量测序平台的测序文库。本试剂盒可以同时兼容 MGI 和 Illumina 测序平台的 Full Adapter 和 Truncated Adapter。

本试剂盒将 RNA 文库构建过程 Second strand cDNA synthesis，End repair 和 dA-tailing 合并为一步，总时长从原来 7 hr 缩短到 3 hr，大大缩短了建库时间；同时，试剂盒中提供了两种类型的 Second Strand & dA Buffer，客户根据需要选择相应的 Second Strand & dA Buffer 或者 Second Strand & dA Buffer with dUTP 进行非链特异性文库构建或链特异性文库构建。

试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，且每一批次的建库 Kit 都经过了建库和上机测序的验证，保证每一批次的试剂盒性能稳定。

2. 产品组分

试剂管名称与颜色	24 RXN	96 RXN
 Frag/Elute Buffer	168 µL	672 µL
 RT Strand Specificity Reagent	96 µL	384 µL
 First Strand Synthesis Enzyme Mix	48 µL	192 µL
 Second Strand & dA Buffer	240 µL	960 µL
 Second Strand & dA Buffer with dUTP	240 µL	960 µL
 Second Strand & dA Enzymes	120 µL	480 µL
 Nuclease-free Water	2 mL	8 mL
 Ligation Buffer	396 µL	1584 µL
 Ligase Mix T5	72 µL	288 µL
 2X PCR Master Mix	600 µL	1.2mL X 2
 10X ILM PCR Primers	120 µL	480 µL
 MGI PCR Primer Mix	120 µL	480 µL
 Low EDTA TE	1 mL X 2	10 mL

注 1.  代表管盖颜色；

注 2. 试剂盒中同时提供 Second Strand & dA Buffer 和 Second Strand & dA Buffer with dUTP。当选择非链特异性文库构建时，请使用 Second Strand & dA Buffer；选择链特异性文库构建时，请使用 Second Strand & dA Buffer with dUTP。

注 3. 本试剂盒含有 MGI PCR Primer Mix（适用于 MGI 平台），10X ILM PCR Primers（适用于 Illumina 平台）。

3. 保存及运输条件

试剂盒长途运输：尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式，在-40 ~ -20℃温度条件下进行运输。

试剂盒保存：-20~-10℃冰箱。

4. 其他自备材料

4.1. RNA 富集试剂盒

poly (A) mRNA Capture Module (ABclonal, Cat. RK20340);

rRNA Depletion Module (H/M/R) (ABclonal, Cat. RK20348);

4.2. 连接接头

Illumina 双端 UDI 短接头 (Cat. RK21622~RK21627) , Illumina 双端 UDI/UMI 短接头 (Cat. RK21701~RK21703) ,

MGI 双端 UDI 短接头 (Cat. RK21686~RK21689) 。具体信息可以参考附表中的试剂盒兼容接头类型汇总表。

纯化磁珠

AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257), 或者其他具有相同性能的核酸纯化磁珠产品。

4.3. RNA 样本浓度和质量评估

Qubit 荧光定量仪

Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855);

Nanodrop ;

Agilent RNA 6000 Pico chip (Agilent #5067-1513)

4.4. 文库质控

Qubit 荧光定量仪;

ABQubit dsDNA Quantitation Kit (ABclonal, Cat. RK30140);

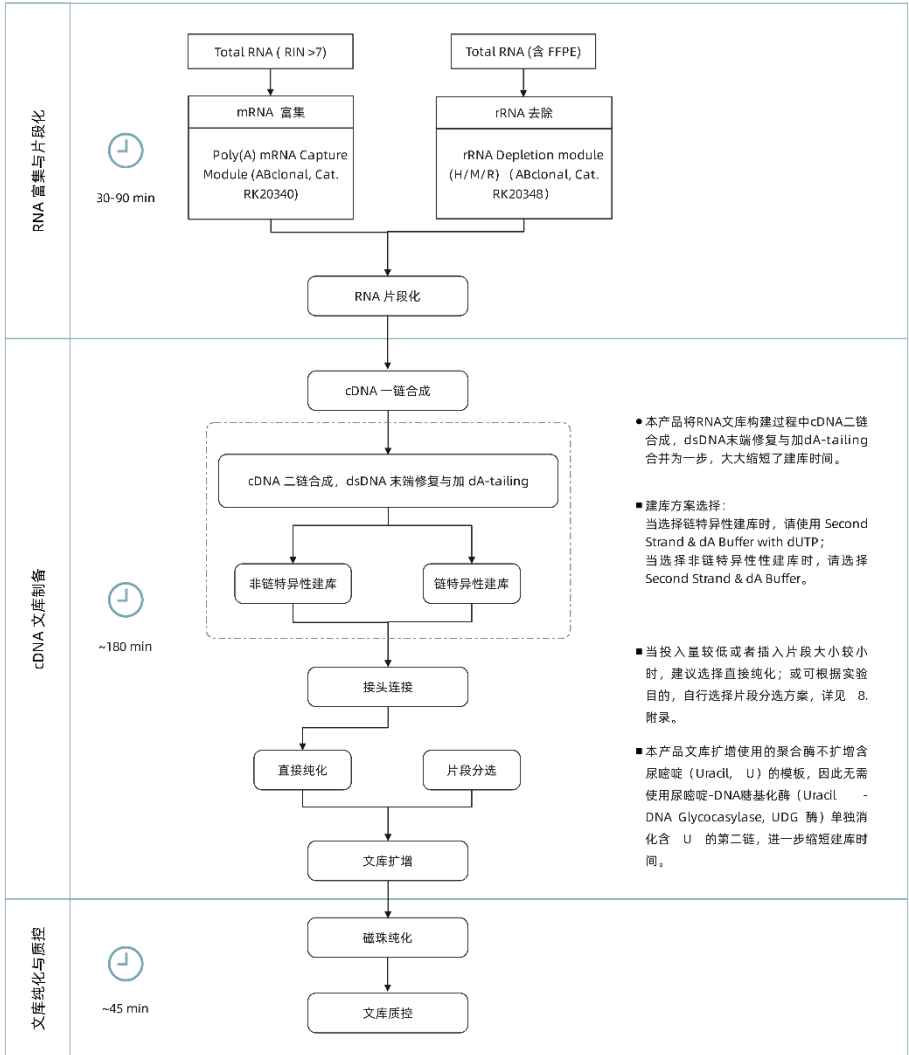
Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626);

Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504);

4.5. 其他试剂与耗材

80%乙醇（新鲜配制）、磁力架、PCR 仪等。

5. 实验流程



6. 操作注意事项

6.1. RNA样品质检

6.1.1. 本试剂盒适用于Total RNA起始量在10-1000 ng, 推荐使用Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855) 试剂盒对Total RNA进行定量, 过低的投入量会影响正常的文库构建。

6.1.2. 使用poly (A) mRNA 捕获试剂进行RNA富集时, 必须是高质量的Total RNA样本(RIN值>7), 否则建库会引入3'端的偏好性。因此, 针对RIN值 < 7的RNA样本推荐使用rRNA Depletion Module系列产品进行RNA富集。

6.1.3. 针对植物或其他真核生物细胞RNA样本，如果RNA有降解但琼脂糖胶可以分别看到28S和18S条带，建议尝试加大Total RNA 投入量，且适当增加PCR循环数，也可以得到足量的文库。

6.2. 磁珠使用原则

6.2.1. 磁珠在使用前请提前半小时拿出，放置于室温平衡。

6.2.2. 2X Oligo (dT)25 Capture Beads和AFTMag NGS DNA Clean Beads 避免放入-20℃保存，冷冻会引起磁珠团聚而无法再分散，导致磁珠性能失效，如果磁珠被冷冻，建议另行购买。

6.2.3. AFTMag NGS DNA Clean Beads纯化过程中，必须待酒精完全挥发后再加入Low EDTA TE 洗脱，即磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色，酒精未挥发完全或者磁珠过分干燥（变龟裂）均会影响文库产量。

6.3. 文库质控

6.3.1. 文库峰形平滑无异常毛刺，且在130bp(接头二聚体)处没有出现检测峰，另外在文库峰的右侧没有大面积的大片段峰，则可以初步判断文库构建成功。

6.3.2. Total RNA质量合格(RIN值>7)，正常操作建库，建库不成功可能原因与解决方案如下：

Total RNA的RIN值是Total RNA的质量评估，并不能完全代表poly (A) RNA的丰度及完整性。对于部分特殊样本，虽然Total RNA的完整性较好，但有很多mRNA发生降解，导致poly (A) RNA纯化时损失较多，因而文库构建失败。如果遇到这种情况可以将poly (A) RNA纯化出来后，评估其丰度及完整性，方法是在实验过程步骤 7.1.10 结束后，加入6 μL的Tris Buffer，80℃加热2分钟，置于磁力架上，澄清后取上清液即为完整的poly (A) RNA，再取1 μL进行Agilent 2100 RNA 6000 Pico chip分析。

6.3.3. 根据分析结果判定，如果是mRNA丰度较低，可以增加Total RNA的建库投入量。如果是mRNA完整性较差，可以将mRNA的打断时间进行调整。

6.4. 关于建库接头

6.4.1. ABclonal可以提供长接头和短接头，详见附表，客户可根据实验需求进行选择。

6.4.2. 如果构建PCR-Free文库，需要在接头连接步骤使用带有完整Index的长接头，并将Adapter Ligation产物去除过剩的Adapter，再上机测序。

6.4.3. 本试剂盒兼容MGI和Illumina测序平台的 Full Adapter 和 Truncated Adapter。

6.4.4. Adapter的质量和浓度直接影响连接效率和文库产量。Adapter用量过高可能会产生较多的接头二聚体；用量较低可能会影响连接效率和文库产量。表1列举了使用本试剂和不同Total RNA起始量下推荐的接头使用浓度。

表格1. 接头使用浓度推荐表

Total RNA	Illumina adapter 使用浓度	MGI adapter 使用浓度
1 μg	15 μM	15 μM
100 ng	3 μM	7.5 μM
10 ng	1.5 μM	3 μM

6.5. 操作规范

6.5.1. mRNA建库过程中应戴口罩，手套。

6.5.2. poly (A) mRNA富集，在加入磁珠后均在室温条件下操作。

- 6.5.3. RNA样本冰上放置，并尽快进入下一步实验，避免RNA发生降解。
- 6.5.4. mRNA打断条件以及后续片段筛选需要按照说明书推荐范围进行选择，否则会影响文库大小及产量。
- 6.5.5. 磁珠纯化过程中，吸取上清液时，要小心操作，避免吸到磁珠，影响文库片段大小及产量。
- 6.5.6. 使用PCR Index时应小心，避免试剂与样本间的交叉污染。
- 6.5.7. 每一步反应的试剂可以提前配制预混Mix，按照1.1倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够

7. 文库构建步骤

7.1. RNA 富集与片段化

方案一：poly (A) mRNA 捕获与片段化

使用 poly (A) mRNA Capture Module (ABclonal, Cat. RK20340) 进行 mRNA 捕获为例，此试剂盒操作要求起始材料为真核生物的 Total RNA 样本（带有 poly (A) 尾），且 RNA RIN score $\geq$ 7。RNA 样本准备在冰上进行，其它过程均室温操作。

- 7.1.1. 将RNA取出冰上融解，取10-1000 ng Total RNA溶于50 μ L Nuclease-free Water中，冰上放置备用。
- 7.1.2. 待2X Oligo (dT)25 Capture Beads恢复室温后涡旋混匀，取50 μ L加入准备好的RNA溶液中，吹打混匀。
- 7.1.3. 将混合物放入PCR仪中进行孵育（热盖温度 $\geq$ 75 $^{\circ}$ C）：

温度	时间
65 $^{\circ}$ C	5 min
25 $^{\circ}$ C	5 min

- 7.1.4. 孵育结束后，取出离心管置于磁力架上约2 min，至溶液变澄清，弃上清。
- 7.1.5. 加入200 μ L Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清。
- 7.1.6. 将PCR管从磁力架上取出，加入50 μ L Tris Buffer，吹打混匀后PCR仪上孵育（热盖温度105 $^{\circ}$ C）：

温度	时间
80 $^{\circ}$ C	2 min

- 7.1.7. 降至室温后，加入50 μ L mRNA Binding Buffer，吹打混匀，室温静置5 min。
- 7.1.8. 将离心管置于磁力架上约2 min，至溶液澄清，弃掉上清。
- 7.1.9. 加入200 μ L Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清。
- 7.1.10. 盖上管盖瞬时离心后，置于磁力架上，用10 μ L移液器将残留液体完全弃除。
- 7.1.11. 按下表配制1X Frag/Elute Buffer：

试剂	体积
 Frag/Elute Buffer	7 μ L
 Nuclease-free Water	14 μ L
总体积	21 μ L

7.1.12. 加入21 μL 1X Frag/Elute Buffer, 吹打混匀后, 按照下表程序进行RNA洗脱并打断 (热盖温度105 $^{\circ}\text{C}$):

打断片段大小	打断条件
200-350 nt	94 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ Hold
300-400 nt	94 $^{\circ}\text{C}$ 12 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ Hold
350-500 nt	94 $^{\circ}\text{C}$ 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ Hold
450-600 nt	94 $^{\circ}\text{C}$ 6 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ Hold

7.1.13. 当温度降至4 $^{\circ}\text{C}$ 时, 将离心管取出, 瞬时离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 取上清液19 μL 至另一个PCR管中, 立即进行7.2. First strand cDNA 的合成。

方案二: rRNA 去除与片段化

使用 ABclonal rRNA Depletion Module (H/M/R) (Cat. RK20348) 进行 rRNA depletion 方法纯化 RNA 为例, 该方法能够有效去除总 RNA 中的细胞质 rRNA (包含细胞质 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA 和 28S rRNA) 和线粒体 rRNA (包含 12S rRNA 和 16S rRNA)。

Probes与rRNA hybridization

7.1.1. 取10-1000 ng Total RNA, 加入Nuclease-free Water稀释至12 μL 体积, 冰上放置备用。

7.1.2. 取出Probe Hybridization Buffer冰上融解, 按照下面体系配制probe hybridization预混液:

试剂	体积
 Probe Hybridization Buffer	2 μL
 rRNA Probe Mix(H/M/R)	1 μL
总体积	3 μL

7.1.3. 将3 μL probe hybridization 预混液加至提前准备好的12 μL RNA溶液中, 移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心。

7.1.4. 将上体系置于PCR仪 (热盖温度105 $^{\circ}\text{C}$) 中, 使probes与rRNA进行杂交:

温度	时间
95 $^{\circ}\text{C}$	2 min
95-22 $^{\circ}\text{C}$	0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, 匀速降温至 22 $^{\circ}\text{C}$
22 $^{\circ}\text{C}$	5 min

7.1.5. 杂交结束后, 将样本从PCR仪中取出, 置于冰上, 立即进行RNase H消化。反应期间, 提前将10X RNase H Buffer取出冰上融解。

RNase H消化

7.1.6. 按照下面体系配制RNase H反应预混液:

试剂	体积
● 10X RNase H Buffer	2 μ L
● RNase H	2 μ L
○ Nuclease-free Water	1 μ L
总体积	5 μ L

7.1.7. 将5 μ L RNase H反应预混液加至上述7.1.5所得产物溶液中，使RNase H反应体系达到20 μ L，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心。

7.1.8. 将反应体系置于PCR仪（热盖温度 $\geq 45^{\circ}\text{C}$ ）中，进行RNase H反应：

温度	时间
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min

7.1.9. RNase H反应结束后，将样本从PCR仪中取出置冰上，立即进行DNase I消化。上步反应期间，提前将10X DNase I Buffer取出冰上融解。

DNase I消化

7.1.10. 按照下面体系配制DNase I反应预混液：

试剂	体积
● 10X DNase I Buffer	5 μ L
● DNase I	2.5 μ L
○ Nuclease-free Water	22.5 μ L
总体积	30 μ L

7.1.11. 将30 μ L DNase I反应预混液加至上述7.1.9所得产物溶液中，使DNase I反应体系达到50 μ L，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心。

7.1.12. 将反应体系置于PCR仪（热盖温度 $\geq 45^{\circ}\text{C}$ ）中，进行DNase I消化：

温度	时间
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min

7.1.13. DNase I反应结束后，将样本从PCR仪中取出置冰上，立即进行RNA纯化。

rRNA-depleted RNA纯化

7.1.14. 按照下表配制1X Frag/Elute Buffer备用：

试剂	体积
● Frag/Elute Buffer	7 μ L
● Nuclease-free Water	14 μ L
总体积	21 μ L

7.1.15. 提前将Agencourt RNA Clean XP Beads从2-8 $^{\circ}\text{C}$ 取出，静置平衡30 min至室温，使用前涡旋混匀。

- 7.1.16. DNase I反应结束后，每个反应管中加入110 μ L Agencourt RNAClean XP Beads (2.2X)，吹打混匀。
- 7.1.17. 室温静置5 min，然后转移至磁力架上5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。
- 7.1.18. 将离心管保持在磁力架上，加入200 μ L 80%乙醇，静置30 s，弃除全部上清。
- 7.1.19. 重复7.1.18步骤，将磁珠用80%乙醇再洗1次。用10 μ L枪头将残留液体彻底吸干。
- 7.1.20. 干燥磁珠2-3 min，待酒精挥发完全后，加入21 μ L 1X Frag/Elute Buffer，吹打混匀后。
- 7.1.21. 室温静置2 min，磁力架上1 min，待溶液变澄清，小心吸取19 μ L上清液至另一新的离心管中。
- 7.1.22. 将取出的上清置于PCR仪中进行RNA打断（热盖温度105℃）：

打断片段大小	打断条件
200-350 nt	94℃ 15 min, 4℃ Hold
300-400 nt	94℃ 12 min, 4℃ Hold
350-500 nt	94℃ 8 min, 4℃ Hold
450-600 nt	94℃ 6 min, 4℃ Hold

- 7.1.23. 当温度降至4℃时，将离心管取出，瞬时离心，立即进行7.2. First strand cDNA 的合成。

7.2. First strand cDNA 的合成

- 7.2.1. 取出 RT Strand Specificity Reagent 室温融解混匀后，冰上配制如下体系：

试剂	体积
打断后 mRNA**	19 μ L
 RT Strand Specificity Reagent*	4 μ L
 First Strand Synthesis Enzyme Mix*	2 μ L
总体积	25 μ L

*：可以提前配制预混 Mix，按样本数的 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够；

**：Frag/Elute Buffer 中包含 First strand cDNA 合成必须的 Random Primer，执行此步骤时，请确保已添加 Frag/Elute Buffer。

- 7.2.2. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪（热盖温度 105℃）：

温度	时间
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	Hold

- 7.2.3. 上步反应期间，将二链 buffer 从冰箱中取出冰上融解。

7.3. Second Strand cDNA 的合成

- 7.3.1. 按照下表体系依次加入各试剂：

试剂	体积
First strand cDNA	25 μL
● Second Strand & dA Buffer/ Second Strand & dA Buffer with dUTP *	10 μL
● Second Strand & dA Enzymes	5 μL
● Nuclease-free Water	10 μL
总体积	50 μL

注：进行链特异性文库构建时，请使用 Second Strand & dA Buffer with dUTP；选择非链特异性文库构建时，请使用 Second Strand & dA Buffer。

7.3.2. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪（热盖温度 105℃）：

温度	时间
20℃	45 min
72℃	15 min
4℃	Hold

7.3.3. 上步反应期间，将 Ligation Buffer, Adapter 取出冰上融解。

7.4. 接头连接

7.4.1. 将 Ligation Buffer, Adapter 取出冰上融解，在冰上配制接头连接体系：

试剂	体积
ds cDNA（步骤 7.3.2 产物）	50 μL
● Ligation Buffer	16.5 μL
● Adapter*	5 μL
● Ligase Mix T5	3 μL
总体积	74.5 μL

注 1. Ligase Mix T5 与 adapter 不要配制预混 Mix，以免产生接头二聚体影响连接效率；

注 2. 本公司提供的 Adapter 原始浓度为 15 μM ，可参考表格 1 接头使用浓度推荐表选择对 Adapter 进行稀释，加 Nuclease-free Water 补齐连接体系至 74.5 μL ；

注 3. 使用完整接头，接头含有不同 index，添加 adapter 时，需要区分 index，及时更换枪头避免样品 index 污染。

7.4.2. 吹打混匀，瞬时离心，PCR 仪上进行连接反应（热盖温度关闭）：

温度	时间
22℃	15 min

7.5. 连接产物纯化

连接反应结束后，可执行直接纯化或片段筛选任意一种连接产物纯化方案。

方案一：连接产物直接纯化

当 Input total RNA < 100 ng 或对无文库片段长度要求时，执行如下操作：

- 7.5.1. 在连接后的 74.5 μL 反应体系中，每个样品中加入 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.8X)，吹打混匀，室温静置 5 min。
- 7.5.2. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。
- 7.5.3. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。
- 7.5.4. 重复步骤 7.5.3。
- 7.5.5. 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）。
- 7.5.6. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μL Low EDTA TE 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。
- 7.5.7. 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中。
- 7.5.8. 安全停止点：纯化后的接头连接产物可以暂时放置在 4°C 保存 1-2 周，或在 -20°C 长期保存。

方案二：连接产物直接片段筛选

当 input total RNA ≥ 100 ng 时，根据所需目的文库片段大小，参考表格 2 推荐的磁珠分选比例，执行片段分选。操作步骤如下（以 94°C 12 min 打断，连接完整接头，分选文库大小为 420-520 bp 为例）：

- 7.5.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀；
- 7.5.2. 在连接体系中加入 25 μL Nuclease-free Water，共 100 μL 体系；
- 7.5.3. 在上述体系中加入 30 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.30X)，吹打混匀，室温静置 5 min；
- 7.5.4. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，直到溶液变澄清（切勿丢弃上清）；
- 7.5.5. 将上清转移至另一离心管中，加入 10 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.1X)，吹打混匀，室温静置 5 min；
- 注：根据文库片段大小更改两轮磁珠使用比例（文字已标灰），参考表格 2。
- 7.5.6. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，直到溶液变澄清，小心弃除上清；
- 7.5.7. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇，静置 30s，弃除全部上清；
- 7.5.8. 重复 7.5.7；
- 7.5.9. 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）；
- 7.5.10. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL Low EDTA TE，吹打混匀；室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清液至另一新的 PCR 管中，即可用于文库扩增；

表格 2. 直接片段分选磁珠比例（完整接头）

打断条件	94°C 15 min	94°C 12 min	94°C 8 min	94°C 6 min
RNA 片段大小	200-350 nt	300-400 nt	350-500 nt	450-600 nt
文库片段大小	320-470 bp	420-520 bp	470-620 bp	570-720 bp
第一轮磁珠比例	0.35X (35 μL)	0.3X (30 μL)	0.27X (27 μL)	0.25X (25 μL)
第二轮磁珠比例	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)

注：关于磁短接头连接体系中，直接分选磁珠比例需要在不同打断时间推荐比例下将第一轮磁珠比例提高 0.03-0.08 的比例。

方案三：连接产物纯化后片段筛选

接头连接体系中的 Ligation Buffer 含有 PEG 成分，增强了片段分选体系的灵敏度，磁珠体积误差容易导致片段的偏移。如果对片段要求比较高，推荐先进行纯化再进行片段分选。具体步骤如下（以 94℃ 12 min 打断，连接完整接头，分选文库大小为 420-520 bp 为例）：

- 7.5.1. 连接反应结束后，在连接产物体系中，加入 74.5 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(1.0X)，吹打混匀；室温静置 5 min；
- 7.5.2. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠；
- 7.5.3. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s 后移除上清；
- 7.5.4. 重复步骤 7.5.3；
- 7.5.5. 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）；
- 7.5.6. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102.5 μL Low EDTA TE 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。；
- 7.5.7. 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，直到溶液变澄清，小心吸取 100 μL 上清至另一新的 PCR 管中；
- 7.5.8. 在纯化后连接产物 100 μl 体系中，加入 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.60X)，吹打混匀；室温静置 5 min；
- 7.5.9. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，直到溶液变澄清（切勿丢弃上清）；
- 7.5.10. 将 155 μL 上清液转移至另一离心管中，加入 10 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.1X)，吹打混匀；室温静置 5 min，磁力架上静置 2 min，直到溶液变澄清，小心移除上清；
- 注：根据使用的接头类型和文库片段大小更改两轮磁珠使用比例（文字已标灰），参考表 3 或表 4。
- 7.5.11. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；
- 7.5.12. 重复步骤 7.5.11；
- 7.5.13. 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）；
- 7.5.14. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μL Low EDTA TE，吹打混匀；室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清液至另一新的 PCR 管中，即可用于文库扩增；

表3 纯化后片段分选磁珠比例（完整接头）

打断条件	94℃15 min	94℃12 min	94℃ 8 min	94℃ 6 min
RNA 片段大小	200-350 nt	300-400 nt	350-500 nt	450-600 nt
文库片段大小	320-470 bp	420-520 bp	470-620 bp	570-720 bp
第一轮磁珠比例	0.65X (65 μL)	0.60X (60 μL)	0.55X (55 μL)	0.5X (50 μL)
第二轮磁珠比例	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)	0.1X(10 μL)

表格4. 纯化后片段分选磁珠比例（截短接头）

打断条件	94°C15 min	94°C12 min	94°C 8 min	94°C 6 min
RNA 片段大小	200-350 nt	300-400 nt	350-500 nt	450-600 nt
文库片段大小	320-470 bp	420-520 bp	470-620 bp	570-720 bp
第一轮磁珠比例	0.70X (70μL)	0.65X (65μL)	0.60X (60μL)	0.55X (55μL)
第二轮磁珠比例	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)	0.1X (10 μL)	0.1X(10 μL)

注：针对长短接头同样的分选比例产生的片段大小可能会有所偏差，可以根据需求调整磁珠的比例，如果需要使片段变大，建议减少第一轮磁珠的比例；如果需要使片段变小，建议增大第一轮磁珠的比例。

7.6. 文库扩增

7.6.1. 根据所选接头试剂盒配置相应 PCR 体系：

表格5. 截短接头PCR体系（Illumina-截短接头，MGI-截短接头，双端index UDI/UMI）

组分	体积
纯化后的接头连接产物	20 μL
● 2X PCR Master Mix	25 μL
○ UDI Primer (MGI UDI Primer)	5 μL
总体积	50 μL

表格6. 完整接头PCR体系（Illumina-完整接头，MGI-完整接头）

组分	体积
纯化后的接头连接产物	20 μL
● 2X PCR Master Mix	25 μL
● 10X ILM PCR Primers (MGI PCR Primer Mix)	5 μL
总体积	50 μL

注：试剂盒兼容接头及 Index 类型见 9. 附表。

7.6.2. 枪头吹打混匀，微离心，PCR 仪中按照如下程序进行 PCR（热盖温度 105°C）：

温度	时间	Cycles
98°C	45 s	1
98°C	10 s	详请参考表格.7 或表格.8
60°C	15 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	

表格 7. Illumina 接头 PCR 循环数推荐

Total RNA	连接产物 直接纯化循环数	连接产物 片段筛选循环数
10 ng	15-17	/
100 ng	12-14	13-15
1 µg	10-12	11-13

表格 8. MGI 接头 PCR 循环数推荐

Total RNA	连接产物 直接纯化循环数	连接产物 片段筛选循环数
10 ng	16-18	/
100 ng	13-15	14-16
1 µg	11-13	12-14

注 1: 此处循环数推荐适用于链特异性文库, 非链特异性文库循环数建议在此基础上降低 1-2 cycles;

注 2: 由于不同物种及组织提取的 mRNA 含量不同, 实际循环数需要根据 Total RNA 样品的提取质量, 物种组织类型, 样本处理情况等调整扩增循环数;

7.7. PCR 产物纯化

- 7.7.1. 在 PCR 产物中, 每个样品中加入 40 µL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.8X), 吹打混匀; 室温静置 5 min。
- 7.7.2. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min, 待溶液澄清后, 移除上清液, 注意不要碰到磁珠。
- 7.7.3. 将离心管保持在磁力架上, 加入 200 µL 80% 的乙醇漂洗磁珠, 孵育 30 s 后移除上清;
- 7.7.4. 重复步骤 7.7.3。
- 7.7.5. 保持 PCR 管在磁力架上, 使用 10 µL 移液器移除管底残留的乙醇, 打开管盖干燥至无乙醇残留 (磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色)。
- 7.7.6. 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 22 µL Low EDTA TE 重悬磁珠, 室温静置 1 min, 使磁珠上的 DNA 充分释放。
- 7.7.7. 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min, 转移 20 µL 上清液至一个新离心管中, 留存备用。

8. 附录

8.1. FFPE 样本或其他降解样本的 RNA 建库说明

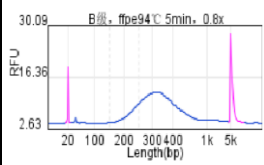
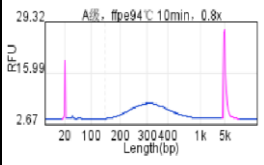
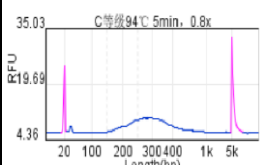
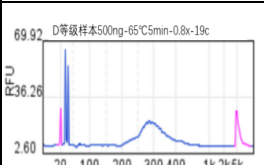
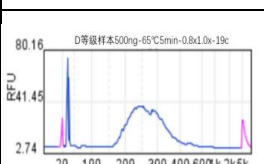
- 8.1.1. FFPE 样本或其他降解样本的 RNA 完整性较差，推荐使用 rRNA Depletion Module 系列产品进行 RNA 富集；
- 8.1.2. FFPE 样本因为损伤或降解的原因，建库的时候需要进行建库条件的优化和调整，并且适当增大扩增循环数。
- 8.1.3. FFPE 样本经福尔马林固定会导致 RNA 发生片段化，RIN 值无法用于 RNA 的质检。因此，通常以 DV200 衡量 FFPE 样本提取的 RNA 质量。DV200 是指长度 > 200nt 的 RNA 片段占总 RNA 片段的比例，DV200 值与 FFPE 来源的 RNA 成功测序之间存在着直接的关联。DV200 大于 70% 表明为高质量 RNA，介于 50%-70% 之间为中等质量 RNA 样品，需要使用更高的起始量进行转录组分析。DV200 值低于 20% 表明 RNA 样品已严重降解，不建议用于进一步实验。可参考表 9 列举的不同等级 FFPE 样本的建库结果，调整合适的建库方案。

8.2. FFPE 样本或其他降解样本 RNA 建库的接头连接纯化条件

对于 ≤10ng 的低起始量 RNA 或者 DV200 < 30% 的 FFPE 等低质量样本，推荐在接头连接后进行直接纯化或两轮纯化。直接纯化可参考步骤 7.5 连接产物纯化中的方案一：连接产物直接纯化；两轮纯化是在直接纯化后再增加一次 AFTMag NGS DNA Clean Beads(1.0X) 纯化操作，得到的峰型会更加集中。具体操作步骤如下：

- 8.2.1. 连接反应结束后，在连接产物体系中，加入 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.8X)，吹打混匀；室温静置 5 min；
- 8.2.2. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠；
- 8.2.3. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇，静置 30 s 后移除上清；
- 8.2.4. 重复步骤 8.2.3；
- 8.2.5. 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）；
- 8.2.6. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102.5 μL Low EDTA TE 重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放；
- 8.2.7. 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，直到溶液变澄清，小心吸取 100 μL 上清至另一新的 PCR 管中；
- 8.2.8. 在纯化后连接产物 100 μL 体系中，加入 100 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(1.0X)，吹打混匀；室温静置 5 min；
- 8.2.9. 将 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min，待溶液变澄清，移除上清液，注意不要碰到磁珠；
- 8.2.10. 离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；
- 8.2.11. 重复步骤 8.2.10；
- 8.2.12. 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）；
- 8.2.13. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μL Low EDTA TE，吹打混匀；室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清液至另一新的 PCR 管中，即可用于文库扩增。

表格9. 不同等级的FFPE样本建库结果

样本投入量 (ng)	DV200	打断条件	连接产物 纯化条件	PCR 扩增 循环数	文库产量 ng/ul (31μl 洗脱)	文库峰形
200ng	>70%	94°C 10min	0.8X	14	30.8	
200ng	50%-70%	94°C 5min	0.8X	15	30.2	
500ng	30%-50%	94°C 3min	0.8X	16	5.22	
500ng	< 30%	65°C 5min	0.8x	19	3.22	
500ng	< 30%	65°C 5min	0.8x; 1.0x	19	1.07	

9. 附表

表格10. 试剂盒兼容接头及Index类型汇总

测序平台	分类	产品名称	货号
Illumina	截短接头 (双端 UDI)	Unique Dual Index for Illumina MiniSet (8 indices)	RK21622
		Unique Dual Index for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21623
		Unique Dual Index for Illumina Set_A (48 indices)	RK21624
		Unique Dual Index for Illumina Set_B (48 indices)	RK21625
		Unique Dual Index for Illumina Set_C (48 indices)	RK21626
		Unique Dual Index for Illumina Set_D (48 indices)	RK21627
	截短接头 (双端 UDI+UMI)	Unique Dual Index (with UMI) for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21701
		Unique Dual Index (with UMI) for Illumina Set_A (48 indices)	RK21702
		Unique Dual Index (with UMI) for Illumina Set_B (48 indices)	RK21703
MGI	截短接头 (双端 UDI)	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI MiniSet	RK21686
		Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI MidiSet	RK21687
		Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI Set A	RK21688
		Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI Set B	RK21689

接头及 Index 信息详见对应货号说明书。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼