Small RNA-seq Lib Prep Kit for ILlumina V3

RK20312

使用说明书

Version: N18B19v1.1

目录

1. 产品概述

Small RNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V3 (ABclonal，Cat. RK20312)是一款适配 Illumina 高通量测序平台的 Small RNA 建库试剂盒。本试剂盒适用于模板起始量为 100-1000 ng 动、植物的 Total RNA 样本或分离纯化的 Small RNA 样本，兼容血清、血浆、外泌体 等来源的 RNA 样本。

通常应用分析的 Small RNA 种类包含 miRNA，piRNA，tsRNA 等，且不同种类的 small RNA 长度会有所差异，因此在 PAGE 割胶回收步骤中需要针对目的 small RNA 酌情分析。本产品通过在 small RNA 的 3′ 和 5′ 两端各自连接通用接头，再经历反转录，PCR，磁珠纯化以及 PAGE 割胶回收等步骤，最终得到适用于 Illumina 平台测序的目的文库。

试剂盒包含建库所需要的接头、酶和缓冲液，每个组分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

子试剂盒	试剂管名称与颜色	24 RXN	96 RXN
Box-1	3′ Adapter II	24 μL	96 μL
	3′ Adapter Ligation Buffer II	192 μL	768 μL
	3′ Adapter Ligation Enzymes II	48 μL	192 μL
	Adapter Depletion Mix	48 μL	192 μL
	5′ Adapter Ligation Buffer	24 μL	96 μL
	5′ Adapter Ligation Enzymes	36 μL	144 μL
	5X First Strand Synthesis Buffer	192 μL	768 μL
	First Strand Synthesis Enzyme Mix	48 μL	192 μL
	2X LA PCR Mix	1.2 mL	4.8 mL
	Nuclease-free Water	1 mL	1 mL X 2
	Quick Load pBR322-MspI Digest Marker	240 μL	960 μL
	6X Loading Buffer	120 μL	480 μL
	Linear Acrylamide	24 μL	96 μL
Box-2	5′ Adapter	24 μL	96 μL
Box-3	DNA PAGE Gel Elution Buffer	6 mL	24 mL

注 1. 代表管盖颜色；

试剂盒中的 3′ Adapter 和 5′ Adapter 为截短型接头，因此必须通过 PCR 过程将文库结构补充完整，并为每个样本添加独特的 index 标记。根据需要可选择搭配的 Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina 有：

试剂盒名称	货号
Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina MidiSet (24 indices)	RK20358
Small RNA Adapter Module 96Index for Illumina Set_A (48 indices)	RK20359
Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina Set_B (48 indices)	RK20360

注. Small RNA Index Primer 包含 1-96 共 96 个 index primer，每个 index primer 使用按照 2.5 μL/样本进行文库 PCR 反应。具体 index 序列信息见附录。

3. 保存及运输条件

Small RNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V3 包含三个 package：

货号	储存温度
Box-1	-20℃
Box-2	-80℃
Box-3	室温

4. 其他自备材料

4.1. Small RNA 建库引物

Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina MidiSet (24 indices) (ABclonal，Cat.NO. RK20358),

Small RNA Adapter Module 96Index for Illumina Set_A (48 indices) (ABclonal，Cat.NO. RK20359),

Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina Set_B (48 indices) (ABclonal，Cat.NO. RK20360)

4.2. 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).

4.3. 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。

4.4. 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. 文库割胶纯化

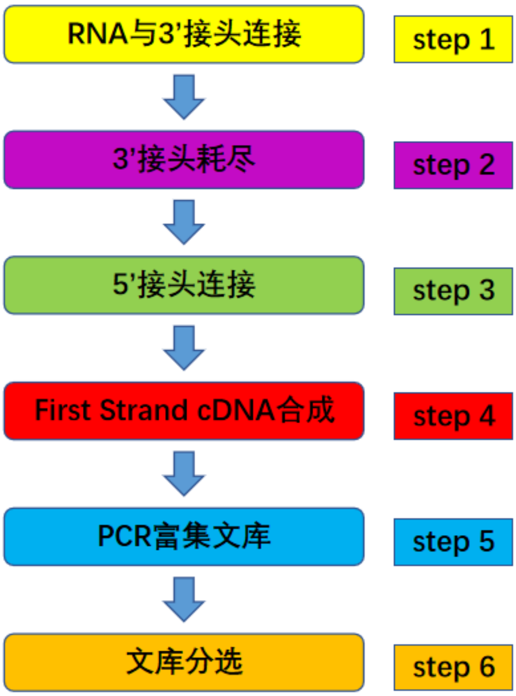
6%或 10% TBE PAGE 胶（自配）及其配套电泳装置

3M 乙酸钠，pH5.5

4.6. 其他试剂与耗材

80%乙醇（新鲜配制）、磁力架、PCR 仪、恒温金属浴或恒温水浴锅等。

5. 实验流程



6. 操作注意事项

6.1. RNA样品质控

6.1.1. 本试剂盒适用于Total RNA起始量在100-1000 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，更低的投入量也能正常构建文库，但割胶纯化步骤可能是必需的。

6.1.2. 针对Total RNA样本，最好使用完整性比较好的样本（RIN值>7），Small RNA目的文库的分析筛选只针对片段较小的样本，如果total RNA降解严重，本试剂盒不能保证分析Small RNA的种类；

6.1.3. 若分析样本为血浆、血清或其余外泌体时，如果Small RNA含量比较少，在3' Adapter连接时可以采用增加连接时间，甚至16℃过夜连接方法增加连接效率，避免因没有捕获到small RNA而导致建库失败；

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. 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或水洗脱，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. 正常miRNA文库片段约为150bp左右，130bp左右片段为接头二聚体。Total RNA起始量在100-1000 ng，文库几乎无接头二聚体。

6.3.2. 若建库不成功，可能是Small RNA丰度较低，尽量增加Total RNA的建库投入量，或者进行Small RNA富集后再建库。另外，也可以尝试增加3′ Adapter连接时间，甚至16℃过夜连接。

6.4. 关于 3′ Adapter 和 5′ Adapter 的稀释

6.4.1. 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 起始量下推荐使用的 3′ Adapter 和 5′ Adapter 稀释倍数，加入 Nuclease-free Water 稀释。若血清、血浆、外泌体等来源 RNA 含量低于 RNA Qubit 检测下限，可按照最大体积投入 9 μl，接头稀释倍数 5~10 倍。

表格1. 接头稀释倍数推荐表

Input RNA	接头稀释倍数
1μg	NA
100 ng	2 倍
10 ng	5-10 倍

6.5. 操作规范

6.5.1. 实验过程中请使用RNase-free的枪头、EP管、PCR管，吸取不同样品时请更换枪头。

6.5.2. 请佩戴手套、口罩操作，接触RNase-free空间外设备或其他工作区间后，请更换手套。

6.5.3. 试剂盒组分对温度敏感，应严格按照保存条件进行存储；在实验过程中取出-20℃ 或-80℃ 保存试剂时应置于冰上。

6.5.4. 移液器吸取试剂前应将该试剂瞬时离心，使溶液集中至试剂管底部；所有的试剂使用后请立即盖上管盖，避免污染。

6.5.5. 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置于合适的温度下保存，不正确的停放可能会降低建库成功率

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. 3′ 接头连接

7.1.1. 将 3′ Adapter II、3′ Adapter Ligation Buffer II、3′ Adapter Ligation Enzymes II 和 Nuclease-free Water 从试剂盒中取出，冰上溶解并混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用。以下所有操作均在冰上进行。

7.1.2. 将RNA样本取出，冰上融解，配置如下反应体系：

	试剂	体积
	RNA 样本	1-9 μL
⚪	Nuclease-free Water	To 9 μL

7.1.3. 用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于冰上放置备用。

7.1.4. 将上述制备好的RNA溶液放入PCR仪中，运行如下程序（热盖温度≥75℃）：

温度	时间
70℃	2 min
反应结束立即放置冰上	2 min

7.1.5. 按下表依次加入各组份：

	组份	体积
	步骤 7.1.4 产物	9 μL
🟠	3' Adapter II*	1 μL
🟠	3' Adapter Ligation Buffer II**	8 μL
🟠	3' Adapter Ligation Enzymes II	2 μL
	总体积	20 μL

注1. 请根据起始模板投入量稀释3' Adapter II，参考表格1. 接头稀释倍数推荐表。

注2. 3' Adapter Ligation Buffer II比较粘稠，吸取时请尽量缓慢，以保证吸取体积准确。

7.1.6. 将配置好的上述反应体系使用移液器吹打15-20次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。置于PCR仪中，运行如下反应程序（热盖Off）：

温度	时间
30℃	1 hr
4℃	Hold

注. 对于small RNA含量较少的样本，可适当增加连接时间。如血清、血浆、外泌体等来源RNA含量低于RNA Qubit检测下限，推荐16℃过夜连接，以增加3' Adapter 的连接效率。

7.2. 3' 接头耗尽

7.2.1. 将 Adapter Depletion Mix 从试剂盒中取出，冰上溶解并混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用。以下所有操作均在冰上进行。

7.2.2. 按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
	步骤 7.1.6 产物	20 μL
●	Adapter Depletion Mix	2 μL
○	Nuclease-free Water	4.5 μL
	总体积	26.5 μL

7.2.1. 将配置好的上述反应体系使用移液器吹打15-20次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。置于PCR仪中，运行如下反应程序（热盖温度>75℃）：

温度	时间
30℃	15 min
37℃	15 min
75℃	5 min
4℃	Hold

7.3. 5′接头连接

7.3.1. 将 5′ Adapter，5′ Adapter Ligation Buffer 从试剂盒中取出，冰上溶解并混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用。以下所有操作均在冰上进行。

7.3.2. 5′ Adapter 变性：吸取 N+1 μL （N 为样本数）的 5′ Adapter 置于 新的 RNase-free 的 PCR 管中，运行如下程序（热盖温度>75℃）：

温度	时间
70℃	2 min
反应结束立即放置冰上	2 min

7.3.3. 按照下表依次加入各组分：

	组份	体积
	步骤 7.2.1 产物	26.5 μL
●	变性 5′ Adapter（步骤 7.3.2 产物）	1 μL
●	5′ Adapter Ligation Buffer	1 μL
●	5′ Adapter Ligation Enzymes	1.5 μL
	总体积	30 μL

注. 请根据起始模板投入量稀释5′ Adapter，参考表格1. 接头稀释倍数推荐表。

7.3.4. 将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。置于 PCR 仪中，运行如下反应程序（热盖 Off）：

温度	时间
25℃	1 hr
4℃	Hold

7.4. First Strand cDNA 的合成

7.4.1. 将 5X First Strand Synthesis Buffer，First Strand Synthesis Enzyme Mix 从试剂盒中取出，冰上溶解并混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用。以下所有操作均在冰上进行。

7.4.2. 按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
	步骤 7.3.4 产物	30 μL
●	5X First Strand Synthesis Buffer	8 μL
●	First Strand Synthesis Enzyme Mix	2 μL
	总体积	40 μL

7.4.3. 将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。置于 PCR 仪中，运行如下反应程序（热盖温度≥75℃）

温度	时间
50℃	1 hr
4℃	Hold

注. Safe Stopping Point：该步骤反应产物若不准备立即进行如下 PCR 富集步骤，则需要在 50℃ 1 hr 反应程序后，增加反应程序 70℃ 15 min 运行，该产物可在-20℃条件下保存 24 hr。

7.5. PCR 富集

将 sRNA Universal Primer*、PCR Index XX* 和 2X LA PCR Mix 从试剂盒中取出，冰上溶解并混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用。以下所有操作均在冰上进行。

注. 试剂盒 Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina 中包含 sRNA Universal Primer 和 PCR Index XX。

7.5.1. 按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
	First Strand cDNA 产物	40 μL
●	2X LA PCR Mix	50 μL
	sRNA Universal Primer	2.5 μL
	PCR Index XX	2.5 μL
○	Nuclease-free Water	5 μL
	总体积	100 μL

7.5.2. 将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。置于 PCR 仪中，运行如下反应程序（热盖温度 105℃）：

温度	时间	Cycles
94℃	2 min	1
94℃	15 s	12-24*（详请参考表格 2）
62℃	30 s	
70℃	15 s	
70℃	5 min	1
4℃	Hold	

表格2. PCR 循环数推荐表

Input RNA	Cycles
1μg	12
100 ng	16
10ng	20
1ng	24

注 1：不同样本中 Small RNA 含量差别较大，上表推荐循环数是以 293T 细胞/小鼠肝脏组织 Total RNA 为模板得到的参考数据，因此请根据样品酌情增减扩增循环数。

注 2：若血清、血浆、外泌体等来源 RNA 含量低于 RNA Qubit 检测下限，循环数推荐为 24。

注 3：Safe Stopping Point：该步骤反应产物若不准备立即进行如下 PCR 产物纯化，可在-20℃条件下保存 24 hr，请避免 4℃保存过夜。

7.6. PCR 产物纯化

7.6.1. 提前 30 min 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前漩涡或者震荡混匀；

7.6.2. 将 PCR 产物(步骤 7.5.2 产物)转移至新的 1.5 mL Nuclease-free 离心管中,每个样本加入 180 μL 磁珠（1.8X），吹打混匀，室温静置 5 min；；

7.6.3. 将离心管转移至磁力架上静置 5 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠；

7.6.4. 使离心管保持在磁力架上，加入 500 μL 80%乙醇，静置 30 s 后小心移除上清；

7.6.5. 重复步骤 7.6.4 一次；

7.6.6. 保持离心管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥~5 min（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色）。

注：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。

7.6.7. 将离心管从磁力架上取下，加入 26 μL Nuclease-free Water，轻轻吹打充分混匀，室温静置 2min 后置于磁力架上，待溶液澄清后吸取 25 μL 上清至新的 Nuclease-free 离心管中。

7.6.8. 文库质控：Agilent 2100 检测文库：取 1 μL 纯化产物用 Agilent D1000 DNA Chip 分析，~150 bp 处峰为富集的 miRNA 文库或 piRNA 文库，典型文库产物检测结果如图 1 所示。

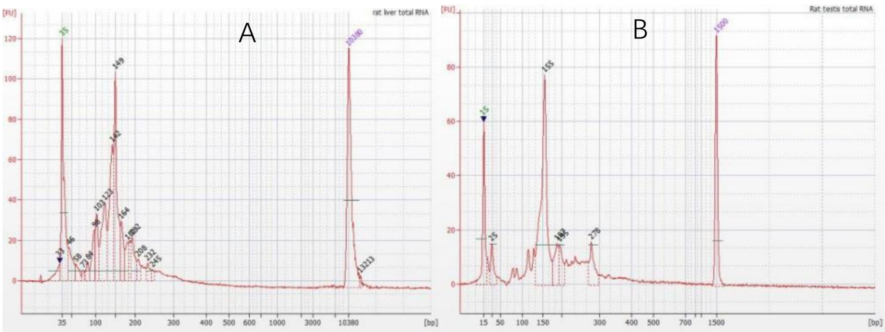


图 1. Small RNA 文库片段大小分布 2100 分析图。图 A 是 1 μg 大鼠肝脏组织 total RNA 构建的 Small RNA 文库，使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段大小分析；图 B 是 1 μg 大鼠睾丸组织 total RNA 构建的 Small RNA 文库，使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段大小分析。

7.7. 文库分选

根据步骤 7.6.8 的文库质控结果选择合适的文库分选方案。若如 2100 分析图显示样品中含有较多的接头二聚体（~130 bp）或较多扩增引物残留（70 - 80 bp）则建议选择非变性 PAGE 胶分选方案。

方案一：非变性 PAGE 胶分选

7.7.1. 将 10% 非变性 PAGE 胶状装置于电泳槽中，向电泳槽中加入适量的 0.5X TBE 电泳缓冲液；

7.7.2. 向纯化后的 25 μL PCR 产物中加入 5 μL 6X Loading Buffer，吹打混匀，瞬时离心；

7.7.3. 取 10 μL Quick Load pBR322-MspI Digest DNA Marker 加入 PAGE 胶孔中，然后将样品依次缓慢加入胶孔中；

7.7.4. 上样完成后，100 V 电压（10 V/1 cm）电泳约 85 min，待 loading 指示剂跑到距胶板底部~1 cm 时可停止电泳；

7.7.5. 将 PAGE 胶从电泳装置中取出，用 Safe nucleic acid dye（Safe Red） (RM19009) 染料染色液染色 10 min，在凝胶成像仪中进行观察；

7.7.6. 用刀片将目的文库所在位置条带割下，放置于准备的好的 1.5 mL EP 管中，可用枪头将胶条碾碎，加入 200 μL DNA PAGE Gel Elution Buffer，37℃ 孵育 3-4 hr；

注：可参考 8. 附录选择目的文库。

7.7.7. 瞬时离心，将上清转移到新的离心管中，用 50 μL DNA PAGE Gel Elution Buffer 再次冲洗胶条，吸取全部上清转移至同一 EP 管中；

7.7.8. 在新的离心管中加入 3 倍上清体积的无水乙醇，1/10 上清体积的 3 M 醋酸钠（pH5.5）和 1 μL Linear Acrylamide，旋涡震荡；

7.7.9. 将离心管放置于-80℃条件下，静置至少 30 min；

7.7.10.取出离心管，4℃ 12000 rpm 离心 10 min，小心弃去上清，避免吸到白色沉淀；

7.7.11.加入 500 μL 80% 乙醇，，4℃ 12000 rpm 离心 5 min，小心弃去上清。避免吸到白色沉淀；

7.7.12.重复 7.7.11 步骤一次；

7.7.13.室温开盖干燥 10 min；

7.7.14.待酒精完全挥发，加入 20 μL Nuclease-free Water 溶解沉淀；

7.7.15.2100 检测分选纯化的文库：取 1 μL 纯化产物用 Agilent D1000 DNA Chip 分析，良好的文库应如图所示：

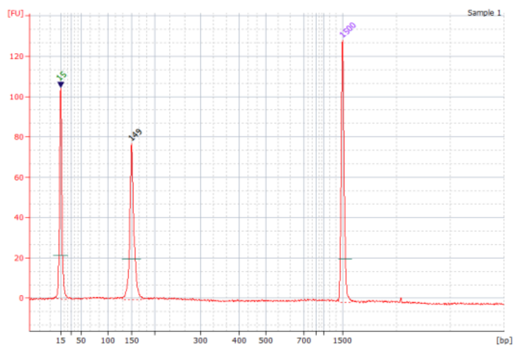


图 2. 大鼠肝脏组织小 RNA 文库割胶回收 2100 分析图。1 μg total RNA input，1.8X beads clean up，10% nature PAGE 割胶回收，取 1μL 割胶回收产物 2100 DNA 1000 Chip 芯片分析。

方案二：双轮磁珠分选

7.7.1. 提前 30 min 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前漩涡或者震荡混匀；

7.7.2. 向纯化后的 25 μL PCR 产物中加入 32.5 μL(1.3X)磁珠，吹打混匀，室温静置 5 min，转移至磁力架上 5 min，直至溶液澄清；

7.7.3. 小心移取上清 57.5 μL 至新的 PCR 管中，加入 22.5 μL(0.9X)磁珠，吹打混匀，室温静置 5 min，转移至磁力架上 5 min，直至溶液澄清，小心弃去上清；

7.7.4. 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，小心移除上清；

7.7.5. 重复 7.7.4 步骤一次；

7.7.6. 瞬离，放置磁力架上，用 10 μL 移液器去除多余的乙醇，开盖室温干燥~5 min；

7.7.7. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 17 μL Nuclease-free Water，吹打混匀，室温静置 5 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后吸取 15 μL 上清至新的 PCR 管中。

8. 附录

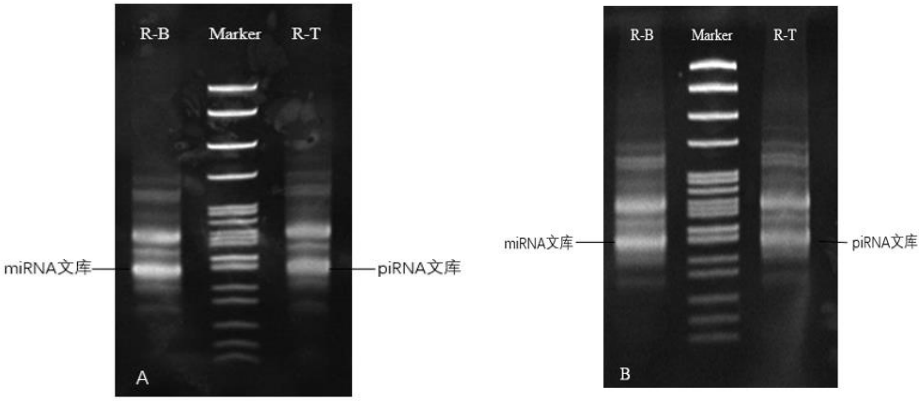
8.1. 除了用 Trizol 裂解法抽提 total RNA ，是否还能用其他方法提取 total RNA?

答：本试剂盒对 total RNA 的抽提没有特殊的要求，但是需要用能够抽提出 small RNA 的试剂盒进行抽提，在抽提的过程中，RNA 沉淀时间尽可能长一些，以便可以富集更多的 small RNA。

8.2. 在用 PAGE gel 进行分选时，需要切哪个条带？

答：在进行 PAGE 割胶回收时，在 147 bp 左右割取 miRNA 目的文库，153 bp 左右割取 piRNA 目的文库；或者进行 2100 分析看目的条带对应位置与 PAGE 胶对应位置进行目的条带的割取，切莫割取 130 bp 左右的条带（接头二聚体）。如果

文库浓度较低，使用 10% PAGE 胶回收，可增强文库的分辨率，避免割到接头二聚体。



6% PAGE Gel　　10% PAGE Gel

图 3. small RNA 文库的切胶回收。图 A 是 Small RNA 文库的 6% PAGE 凝胶电泳分析图。 R-B：大鼠脑组织样本 small RNA 文库； R-T:大鼠睾丸组织 small RNA 文库；图 B 是 Small RNA 文库的 10% PAGE 凝胶电泳分析图。R-B：大鼠脑组织样本 small RNA 文库；R-T：大鼠睾丸组织 small RNA 文库。

注. 10%浓度相对于 6%浓度 PAGE 胶分辨率更高，条带更集中，更容易进行割胶分析。

8.3. 怎样提高血清/血浆、外泌体样本的建库成功率?

答：推荐使用相应样本的商业试剂盒抽提 RNA。例如，对于 200ul 血清/血浆样本，可以使用 QIAGEN 的 miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit，对于 1ml 血清/血浆提取的外泌体样本，可以使用 QIAGEN 的 exoRNeasy kits。如提取产物低于 Qubit 可检测到的灵敏度下限，推荐样本 RNA 体积按照最大 9ul 投入。

8.4. 自备组分配制

8.4.1. 5X TBE 电泳缓冲液配方（1 L）

试剂	用量
Tris-base	54 g
硼酸	27.5 g
乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）	3.72 g

将上述试剂加入 1 L 烧杯中，加入 800 mL 去离子水，充分搅拌均匀，用 50% HCl 调 pH 至 8.3，定容至 1 L，最后使用 0.22 μm 滤纸过滤。

8.4.2. 10% PAGE 胶配制方法（40 mL）

试剂	用量
甲叉双丙烯酰胺（30%）	13.3 mL
5X TBE	8 mL
ddH2O	18.4 mL
过硫酸铵（AP，10%）	400 μL
四甲基乙二胺（TEMED	20 μL

10% AP 与 TEMED 依次最后加入，加入后迅速混匀并立即灌入提前预备好的胶板中，插入齿梳，30 分钟形成凝胶后即可使用；

8.4.3. 6% PAGE 胶配制方法（40 mL）

试剂	用量
甲叉双丙烯酰胺（30%）	8 mL
5X TBE	8 mL
ddH2O	24 mL
过硫酸铵（AP，10%）	400 μL
四甲基乙二胺（TEMED	20 μL

10% AP 与 TEMED 依次最后加入，加入后迅速混匀并立即灌入提前预备好的胶板中，插入齿梳，30 分钟形成凝胶后即可使用；

8.4.4. 3M 醋酸钠（pH5.5）配制方法（100 mL）

试剂	用量
无水醋酸钠	24.6 g
ddH2O	80 mL

完全溶解后，用冰醋酸调节 pH 至 5.5；

8.4.5. 部分自备基础试剂购买信息：

试剂	品牌	货号
Tris-base	Vetec	V900483
硼酸	国药	10004818
乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）	国药	10009717
甲叉双丙烯酰胺（30%）	生工	B546017-0500
过硫酸铵（AP，10%）	国药	10002618
四甲基乙二胺（TEMED）	北京鑫国昌盛生物有限公司	DH338-1
无水醋酸钠	生工	A500827-0500

9. 附表

9.1.1. Adapter 和 PCR index primer 序列信息

3′ Adapter：

5′ -rAppAGATCGGAAGAGCACACGTCT-3′

5′ Adapter：

5′ -rGrUrUrCrArGrArGrUrUrCrUrArCrArGrUrCrCrGrArCrGrArUrC-3′

sRNA Universal Primer：

5′ -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGA-3′

PCR Index XX：

5′-Spc/C*A*A*GCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA*T*C*T-3′

备注：XXXXXXXX 为 index 碱基序列

9.1.2. Index table 2. Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina® MidiSet (24 indices)（RK20358）

sRNA Index Primer Name	Index	sRNA Index Primer Name	Index
PCR Index 1	TTACCGAC	PCR Index 13	TCGTCTGA
PCR Index 2	AGTGACCT	PCR Index 14	AGCCTATC
PCR Index 3	TCGGATTC	PCR Index 15	CTGTACCA
PCR Index 4	CAAGGTAC	PCR Index 16	AGACCTTG
PCR Index 5	TCCTCATG	PCR Index 17	AGGATAGC
PCR Index 6	GTCAGTCA	PCR Index 18	CCTTCCAT
PCR Index 7	CGAATACG	PCR Index 19	GTCCTTGA
PCR Index 8	TCTAGGAG	PCR Index 20	TGCGTAAC
PCR Index 9	CGCAACTA	PCR Index 21	CACAGACT
PCR Index 10	CGTATCTC	PCR Index 22	TTACGTGC
PCR Index 11	GTACACCT	PCR Index 23	CCAAGGTT
PCR Index 12	CGGCATTA	PCR Index 24	CACGCAAT

9.1.3. Index table 3. Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina® Set_A (48 indices)（RK20359）

sRNA Index Primer Name	Index	sRNA Index Primer Name	Index
PCR Index 1	TTACCGAC	PCR Index 25	TTCCAGGT
PCR Index 2	AGTGACCT	PCR Index 26	TCATCTCC
PCR Index 3	TCGGATTC	PCR Index 27	GAGAGTAC
PCR Index 4	CAAGGTAC	PCR Index 28	GTCGTTAC
PCR Index 5	TCCTCATG	PCR Index 29	GGAGGAAT
PCR Index 6	GTCAGTCA	PCR Index 30	AGGAACAC
PCR Index 7	CGAATACG	PCR Index 31	CAGTGCTT
PCR Index 8	TCTAGGAG	PCR Index 32	CTTGCTAG
PCR Index 9	CGCAACTA	PCR Index 33	TGGAAGCA
PCR Index 10	CGTATCTC	PCR Index 34	AGCTAAGC
PCR Index 11	GTACACCT	PCR Index 35	GAACGGTT
PCR Index 12	CGGCATTA	PCR Index 36	GGAATGTC
PCR Index 13	TCGTCTGA	PCR Index 37	TACGGTCT
PCR Index 14	AGCCTATC	PCR Index 38	CCAGTATC
PCR Index 15	CTGTACCA	PCR Index 39	TCTACGCA
PCR Index 16	AGACCTTG	PCR Index 40	GTAACCGA
PCR Index 17	AGGATAGC	PCR Index 41	GACGTCAT
PCR Index 18	CCTTCCAT	PCR Index 42	CTTACAGC
PCR Index 19	GTCCTTGA	PCR Index 43	TCCATTGC
PCR Index 20	TGCGTAAC	PCR Index 44	AGCGAGAT
PCR Index 21	CACAGACT	PCR Index 45	CAATAGCC
PCR Index 22	TTACGTGC	PCR Index 46	AAGACACC
PCR Index 23	CCAAGGTT	PCR Index 47	CCAGTTGA
PCR Index 24	CACGCAAT	PCR Index 48	TGGTGAAG

9.1.4. Index table 4. Small RNA Adapter Module 96 Index for Illumina® Set_B (48 indices)（RK20360）

sRNA Index Primer Name	Index	sRNA Index Primer Name	Index
PCR Index 49	AAGACCGT	PCR Index 73	TAGGAGCT
PCR Index 50	TTGCGAGA	PCR Index 74	CGAATTGC
PCR Index 51	GCAATTCC	PCR Index 75	GTCCTAAG
PCR Index 52	GAATCCGT	PCR Index 76	CTTAGGAC
PCR Index 53	CCGCTTAA	PCR Index 77	TCCACGTT
PCR Index 54	TACCTGCA	PCR Index 78	CAACACAG
PCR Index 55	GTCGATTG	PCR Index 79	GCCTTAAC
PCR Index 56	TATGGCAC	PCR Index 80	GTAAGGTG
PCR Index 57	CTCGAACA	PCR Index 81	AGCTACCA
PCR Index 58	CAACTCCA	PCR Index 82	CTTCACTG
PCR Index 59	GTCATCGT	PCR Index 83	GGTTGAAC
PCR Index 60	GGACATCA	PCR Index 84	GATAGCCA
PCR Index 61	CAGGTTCA	PCR Index 85	TACTCCAG
PCR Index 62	GAACGAAG	PCR Index 86	GGAAGAGA
PCR Index 63	CTCAGAAG	PCR Index 87	GCGTTAGA
PCR Index 64	CATGAGCA	PCR Index 88	ATCTGACC
PCR Index 65	GACGAACT	PCR Index 89	AACCAGAG
PCR Index 66	AGACGCTA	PCR Index 90	GTACCACA
PCR Index 67	ATAACGCC	PCR Index 91	GGTATAGG
PCR Index 68	GAATCACC	PCR Index 92	CGAGAGAA
PCR Index 69	GGCAAGTT	PCR Index 93	CAGCATAC
PCR Index 70	GATCTTGC	PCR Index 94	CTCGACTT
PCR Index 71	CAATGCGA	PCR Index 95	CTTCGGTT
PCR Index 72	GGTGTACA	PCR Index 96	CCACAACA

9.1.5. Quick Load pBR322-MspI Digest DNA Marker 条带大小

片段编号	片段大小（bp）
1	622
2	527
3	404
4	307
5	242
6	238
7	217
8	201
9	190
10	180
11,12	160
13,14	147
15	123
16	110
17	90
18	76
19	67
20,21	34
22,23	26
24	15
25,26	9

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