Luminus Universal RNA-seq Lib Prep Kit

RK20314

使用说明书

Version: N20D16v1.1

目录

目录 1

1. 产品概述 1

4. 其他自备材料 1

7. 文库构建步骤 5

8. 附录 13

9. 附表 15

1. 产品概述

Luminus Universal RNA-seq Lib Prep Kit(ABclonal，Cat. RK20314)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。

本试剂盒将反应缓冲液和酶优化为一管式预混 Mix，操作简便，更适配自动化，产品性能更稳定。同时，试剂盒中提供了两种类型的 2nd cDNA Synthesis Mix，客户根据需要选择相应的 2nd cDNA Synthesis Mix 或者 2nd cDNA Synthesis Mix (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
1X Frag/Prime Buffer	432 μL	864 μL X 2
1st Synthetic Master Mix	216 μL	864 μL
2nd Synthetic Master Mix (with dNTP)	960 μL	960 μL X 4
2nd Synthetic Master Mix (with dUTP)	960 μL	960 μL X 4
Ligase Master Mix	720 μL	720 μL X 4
2X PCR Mix	600 μL	1.2 mLX 2

注 1. ○ 代表管盖颜色；

3. 保存及运输条件

试剂盒运输：尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式；

试剂盒保存：-20℃保存。

4. 其他自备材料

4.1. RNA 富集试剂盒

Poly(A) mRNA Capture Module V2 (ABclonal, Cat. RK20370)；

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

4.2. 连接接头

Illumina 双端 UDI 短接头（Cat. RK21623、RK21713、RK21714），Illumina 双端 UDI/UMI 短接头（Cat. RK21701、RK21715）；

MGI 双端 UDI 短接头（Cat. RK21687、RK21716）；

具体信息可以参考附表中的试剂盒兼容接头类型汇总表。

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. RNA 样本浓度和质量评估

Qubit 荧光定量仪

ABQubit RNA HS Assay Kit (ABclonal, Cat.NO. RK30143)

Nanodrop ；

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

4.5. 文库质控

Qubit 荧光定量仪；

ABQubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Pre-Mixed)(ABclonal, Cat. RK30141)；

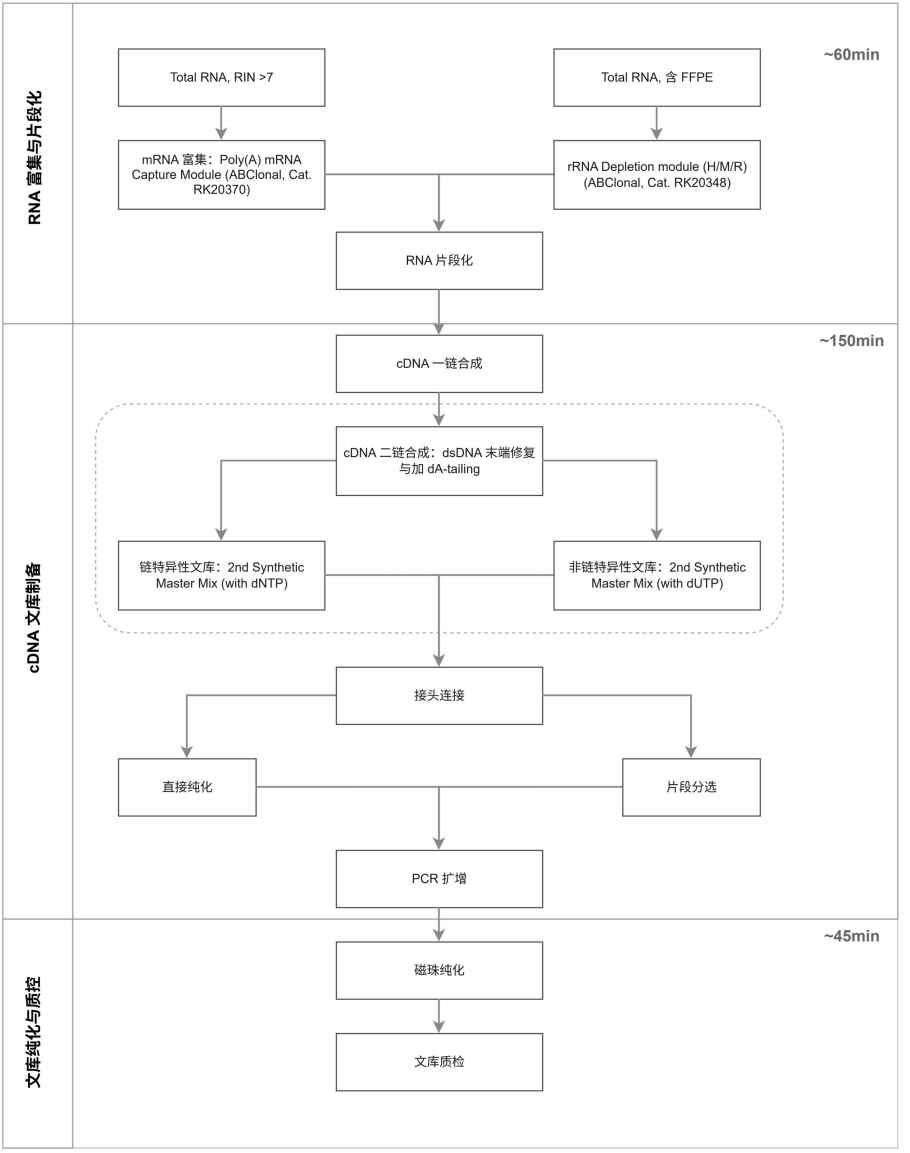
Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626)；

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

4.6. 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


RNA 富集与片段化
~60min
Total RNA, RIN >7
Total RNA, 含 FFPE
mRNA 富集：Poly(A) mRNA Capture Module (ABClonal, Cat. RK20370)
rRNA Depletion module (H/M/R) (ABClonal, Cat. RK20348)
RNA 片段化
cDNA 文库制备
~150min
cDNA 一链合成
cDNA 二链合成：dsDNA 末端修复与加 dA-tailing
链特异性文库：2nd Synthetic Master Mix (with dNTP)
非链特异性文库：2nd Synthetic Master Mix (with dUTP)
接头连接
直接纯化
片段分选
PCR 扩增
文库纯化与质控
~45min
磁珠纯化
文库质检

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10-1000 ng，推荐使用ABQubit RNA HS Assay Kit (ABclonal, Cat.NO. RK30143)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. 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Illumina和MGI接头，详见附表，客户可跟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的质量和使用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
1μg	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建库过程中应带口罩，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 前处理

方案一：poly (A) mRNA 捕获与片段化

使用 Poly(A) mRNA Capture Module V2 (ABclonal, Cat. RK20370) 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≥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 μL Nuclease-free Water中，冰上放置备用。

7.1.2. 待Oligo $(dT)_{25}$ Capture Beads恢复室温后涡旋混匀，取50 μL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≥75℃）：

温度	时间
65℃	5 min
25℃	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 μL Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清(约2 min)，弃上清。

7.1.6. 将PCR管从磁力架上取出，加入50 μL Tris Buffer，吹打混匀后PCR仪上孵育（热盖温度105℃）：

温度	时间
80℃	2 min

7.1.7. 降至室温后，加入50 μL 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 μL Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清(约2min)，弃上清。

7.1.10. 盖上管盖瞬时离心后，置于磁力架上，用10 μL移液器将残留液体完全弃除。

7.1.11. 干燥磁珠2-3 min，待酒精挥发完全后，加入18 μL 1X Frag/Prime 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℃）：

打断片段大小	打断条件
350-450 nt	94℃ 5 min，4℃ Hold
200-350 nt	94℃ 8 min，4℃ Hold

备注：其他片段化条件请参照表格5和6，合适的打断条件需要根据目的文库大小进行适当调整；

7.1.12. 当温度降至4℃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16 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℃）中，使probes与rRNA进行杂交：

温度	时间
95℃	2 min
95-22℃	0.1℃/sec，匀速降温至 22℃
22℃	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 μL
●	RNase H	2 μL
○	Nuclease-free Water	1 μL
	总体积	5 μL

7.1.7. 将5 μL 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 μL，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≥45 ℃）中，进行RNase H反应：

温度	时间
37℃	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 μL
●	DNase I	2.5 μL
○	Nuclease-free Water	22.5 μL
	总体积	30 μL

7.1.11. 将30 μL 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 μL，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≥45℃）中，进行DNase I消化：

温度	时间
37℃	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 μL
	Nuclease-free Water	14 μL
	总体积	21 μL

7.1.15. 提前将Agencourt RNA Clean XP Beads从2-8℃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 μL 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 μL 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 μL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18 μL 1X Frag/Prime 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℃）：

打断片段大小	打断条件
350-450 nt	94℃ 5 min，4℃ Hold
200-350 nt	94℃ 8 min，4℃ Hold

备注：其他片段化条件请参照表格5和6，合适的打断条件需要根据目的文库大小进行适当调整；

7.1.21. 当温度降至4℃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16 μL至另一个PCR管中，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 1st cDNA Synthesis Mix 室温融解混匀后，冰上配制如下体系：

	试剂	体积
	打断后 mRNA**	16 μL
	1st Synthetic Master Mix *	9 μL
	总体积	25 μL

**：1X Frag/Prime 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 1X Frag/Prime 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
●/●	2nd Synthetic Master Mix (with dNTP)/	40 μL
	2nd Synthetic Master Mix (with dUTP)	
	总体积	65 μL

注：进行链特异性文库构建时，请使用 2nd cDNA Synthesis Mix(with dUTP)；选择非链特异性文库构建时，请使用 2nd Synthetic Master Mix (with dNTP)。

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 75℃）：

温度	时间
16℃	30 min
65℃	15 min
4℃	Hold

7.3.3. 上步反应期间，将 Ligase Master Mix，Adapter 取出冰上融解。

7.4. 接头连接

7.4.1. 在冰上配制接头连接体系：

	试剂	体积
	ds cDNA（步骤 7.3.2 产物）	65 μL
●	Ligase Master Mix	30 μL
	Truncated Adapter*	5 μL
	总体积	100 μL

注 1. Ligation Mix 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. 若使用本公司提供的 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 100 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（热盖关闭）：

温度	时间
20℃	15 min
4℃	Hold

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 100 μL 反应体系中，每个样品中加入 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.6X)，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 Nuclease-free Water 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℃保存 1-2 周，或在-20℃长期保存。

方案二：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℃ 8 min 打断，illumina 短接头为例，分选文库大小为 400-500 bp 为例）：

7.5.1. 连接反应结束后，在连接产物体系中，加入 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.6X)，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 5 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(约 3min)（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 μL Nuclease-free Water 重悬磁珠，室温静置 2 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。；

7.5.7. 将 PCR 管于磁力架上静置 1 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 5 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 15 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.15X)，吹打混匀；室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清，小心弃除上清；

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(约 3min)（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 Nuclease-free Water，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；

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2. 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 Mix	25 μL
UDI Primer （MGI UDI Primer）	5 μL
总体积	50 μL

表格3. 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 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 8. 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℃）：

温度	时间	Cycles
98℃	45 s	1
98℃	10 s	详请参考表格 4
60℃	15 s	
72℃	30 s	
72℃	1 min	1
4℃	Hold	

表格 4. Illumina 和 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	15-17	/
100 ng	12-14	14-16
1 μg	10-12	11-13

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 45 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.9X)，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 5 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(约 3min)（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 30μL Nuclease-free Water 重悬磁珠，室温静置 2 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

7.7.7. 将 PCR 管于磁力架上静置 1 min，转移 28 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 的质控。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。

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 80 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 Nuclease-free Water 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 Nuclease-free Water，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 20μL 上清液至另一新的 PCR 管中，即可用于文库扩增。

8.3 Illumina 和 MGI 平台长短接头连接产物分选方案推荐

表格 5 截短接头连接产物分选条件

	Illumina 平台			MGI 平台	
打断条件	**94℃ 8min**	**94℃ 8 min**	**94℃ 5min**	**94℃ 8min**	**94℃ 8 min**
RNA 片段大小	200-300 nt	250-350 nt	350-450 nt	200-300 nt	250-350 nt
文库片段大小	300-400 bp	400-500 bp	500-600 bp	300-400 bp	400-500 bp
第一轮磁珠比例	0.75X (75 μL)	0.60X (60 μL)	0.55X (50 μL)	0.70X (70 μL)	0.60X (60 μL)
第二轮磁珠比例	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)

表格 6 完整长接头连接产物分选条件

	Illumina 平台			MGI 平台	
打断条件	**94℃ 8min**	**94℃ 8 min**	**94℃ 5min**	**94℃ 8min**	**94℃ 8 min**
RNA 片段大小	200-300 nt	250-350 nt	350-450 nt	200-300 nt	250-350 nt
文库片段大小	300-400 bp	400-500 bp	500-600 bp	300-400 bp	400-500 bp
第一轮磁珠比例	0.65X (65 μL)	0.6X (60 μL)	0.55X (50 μL)	0.65X (65 μL)	0.6X (60 μL)
第二轮磁珠比例	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)	0.15X (15 μL)

9. 附表

表格7 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 MidiSet (24 indices)	RK21623
		Unique Dual Index for Illumina Set 1 (1-96 indices)	RK21713
		Unique Dual Index for Illumina Set 2 (97-192 indices)	RK21714
	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 (1-96 indices)	RK21715
MGI	截短接头（双端 UDI）	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit for MGI MidiSet	RK21687
		Truncated DNA Adapter（UDI) Kit for MGI（1-96 indices）	RK21716

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