

Version 6

Code No. AG12503

AG12504

# *AccuNext* 链特异性 RNA 文库制备试剂盒 (Illumina)

## *AccuNext* Stranded RNA-seq Library Kit for Illumina

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

## 目录

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| ➤ 产品概述.....                                                      | 1  |
| ➤ 产品组成.....                                                      | 1  |
| ➤ 保存及运输.....                                                     | 2  |
| ➤ 实验原理及流程.....                                                   | 2  |
| ➤ 产品优势.....                                                      | 4  |
| ➤ 使用注意事项.....                                                    | 5  |
| ➤ 实验前准备.....                                                     | 6  |
| ➤ 操作方法.....                                                      | 7  |
| A. RNA 片段化.....                                                  | 7  |
| B. 反转录.....                                                      | 7  |
| C. cDNA 纯化.....                                                  | 8  |
| D. 文库扩增.....                                                     | 9  |
| E. 文库纯化.....                                                     | 10 |
| F. 文库质量检测.....                                                   | 11 |
| ➤ 实验例.....                                                       | 11 |
| ➤ 产品注意事项.....                                                    | 13 |
| ➤ 附录 A: 接头引物搭配方式.....                                            | 16 |
| ➤ 附录 B: <i>AccuNext</i> CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 的信息..... | 16 |

## ➤ 产品概述

本产品是针对 Illumina 高通量测序平台研发的链特异性 RNA 文库构建试剂盒，可对 100 pg ~ 100 ng 的 RNA 样本进行 RNA 文库构建，包含 RNA 片段化、逆转录（RT）和 PCR 文库扩增所需的所有组分。本产品通过加热使 RNA 片段化，然后以带接头序列的 3'-N6 Primer 进行反转录，依靠反转录酶的模板转换活性（Template-switching），在 RNA 5' 端添加一段接头序列，产生两端带有接头序列的 cDNA；搭配 *AccuNext*CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505、AG12506、AG12507）进行 PCR 扩增即可获得适用于 Illumina 测序平台的测序文库。

本产品操作简单，无需进行传统的末端修复、接头连接等繁琐的步骤，即可获得 RNA 测序文库；优化的反应体系，提高了文库转化效率，能兼容不同的模板量，测序获得的数据均一性高，覆盖度完整；同时，模板转换反应的方向性保留了 RNA 的链方向性，可获得 RNA 链特异性的测序数据。

由于 Total RNA 中 rRNA 占比近 90%，为了测序时获得更多有效的数据量及降低测序成本，建议去除 rRNA 后再进行 RNA 文库构建，以减少测序中 rRNA 的数据占比，获得更多有效的数据。

本产品的反应体系经过了精心优化，请使用本产品中提供的试剂进行 RNA 片段化、逆转录和 PCR 文库扩增实验，建议不改变任何反应组分的用量及浓度，或用其他的等效产品替换本产品中组分，以免获得不好的结果。如需替换，请先进行验证。

## ➤ 产品组成

Package 2-1 组分如下（-80℃保存）：

| 组分名称                           | AG12503<br>( 12 rxns ) | AG12504<br>( 48 rxns ) |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| Control Total RNA* (1 μg / μl) | 20 μl                  | 20 μl                  |
| 5'-Adapter Primer Mix          | 54 μl                  | 216 μl                 |

\*：Control Total RNA 为 Mouse Liver Total RNA。

**Package 2-2 组分如下 ( -20°C保存 ) :**

| 组分名称                                                   | AG12503<br>( 12 rxns ) | AG12504<br>( 48 rxns ) |
|--------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)                        | 6 $\mu$ l              | 24 $\mu$ l             |
| 3'-N6 Primer                                           | 12 $\mu$ l             | 48 $\mu$ l             |
| 5X First-Strand Buffer                                 | 48 $\mu$ l             | 192 $\mu$ l            |
| <i>AccuNext</i> Reverse Transcriptase (100 U/ $\mu$ l) | 24 $\mu$ l             | 96 $\mu$ l             |
| 2X <i>AccuNext</i> PCR Mix II                          | 300 $\mu$ l            | 1.2 ml                 |
| Nuclease free water                                    | 1 ml                   | 1 ml X 4 pcs           |

**注意:** *AccuNext* CDI 接头引物 ( Illumina, 适用于 RNA 文库 ) ( Code No. AG12505、AG12506、AG12507 ) 为实验必须试剂, 但本产品中未配置, 需要单独购买。*AccuNext* CDI 接头引物 ( Illumina, 适用于 RNA 文库 ) 的信息见附录 A 和 B。

## ➤ 保存及运输

保存温度: Package 2-1 -80°C保存

Package 2-2 -20°C保存

运输温度: Package 2-1 干冰运输

Package 2-2 -20°C冰袋运输或干冰运输

## ➤ 实验原理及流程

以 RNA 为模板, 用带有特定接头的 3'-N6 Primer 为反转录引物, 合成 cDNA; 当反转录酶到达 mRNA 5' 端时, 利用反转录酶的末端转移酶活性, 在 cDNA 的 3' 端引入几个不依赖于模板的碱基, 通过 5'-Adapter Primer Mix 继续合成带有特定接头的 cDNA。以双端带有特定接头的 cDNA 为模板, 搭配 *AccuNext* CDI 接头引物 ( Illumina, 适用于 RNA 文库 ) ( Code No. AG12505、AG12506、AG12507 ) 进行 PCR 扩增即可获得适用于 Illumina 测序平台的测序文库。原理如图 1 所示:

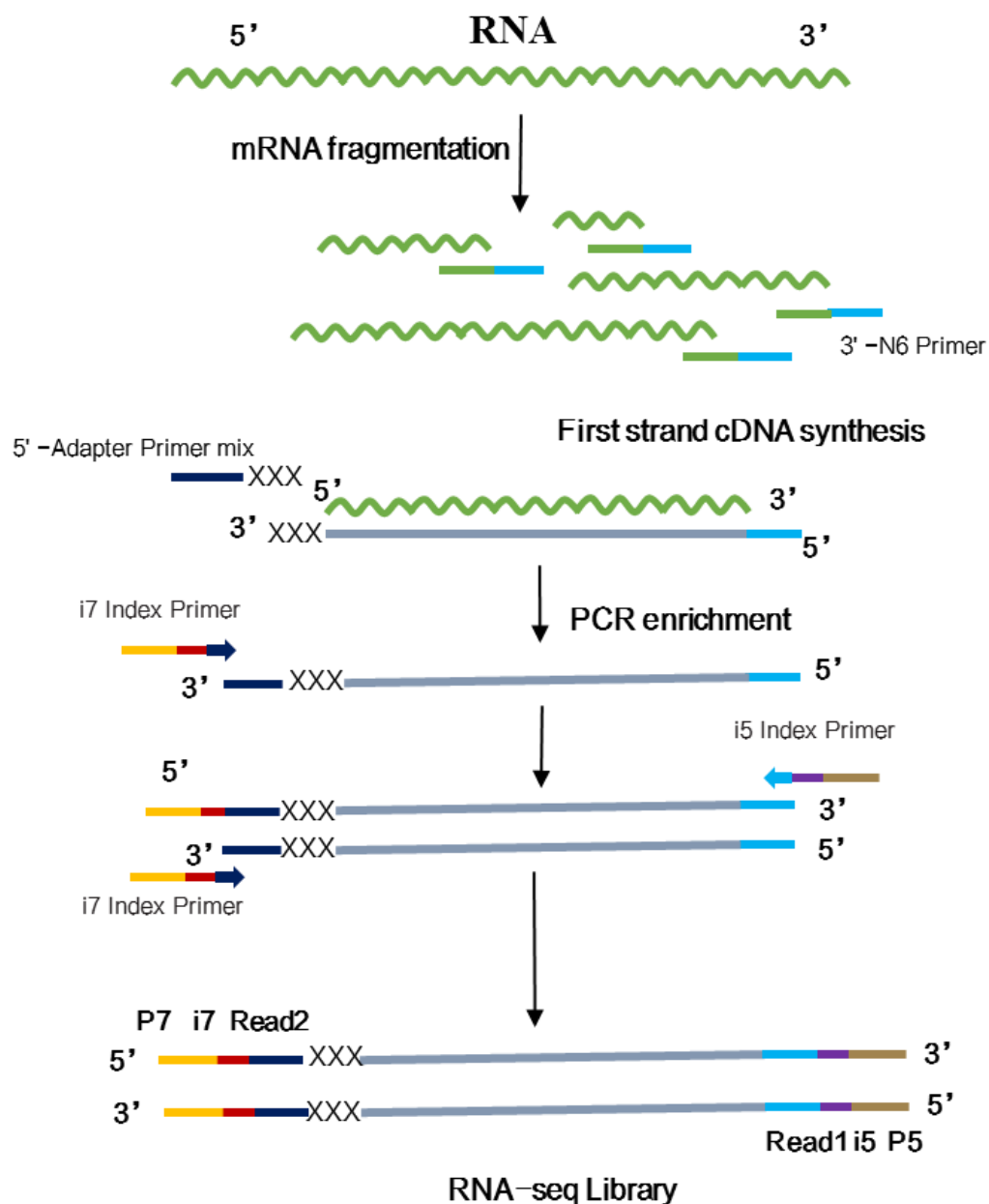


图 1：文库构建原理

**注：** i5 index Primer 和 i7 index Primer 可使用 *AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505、AG12506、AG12507）。

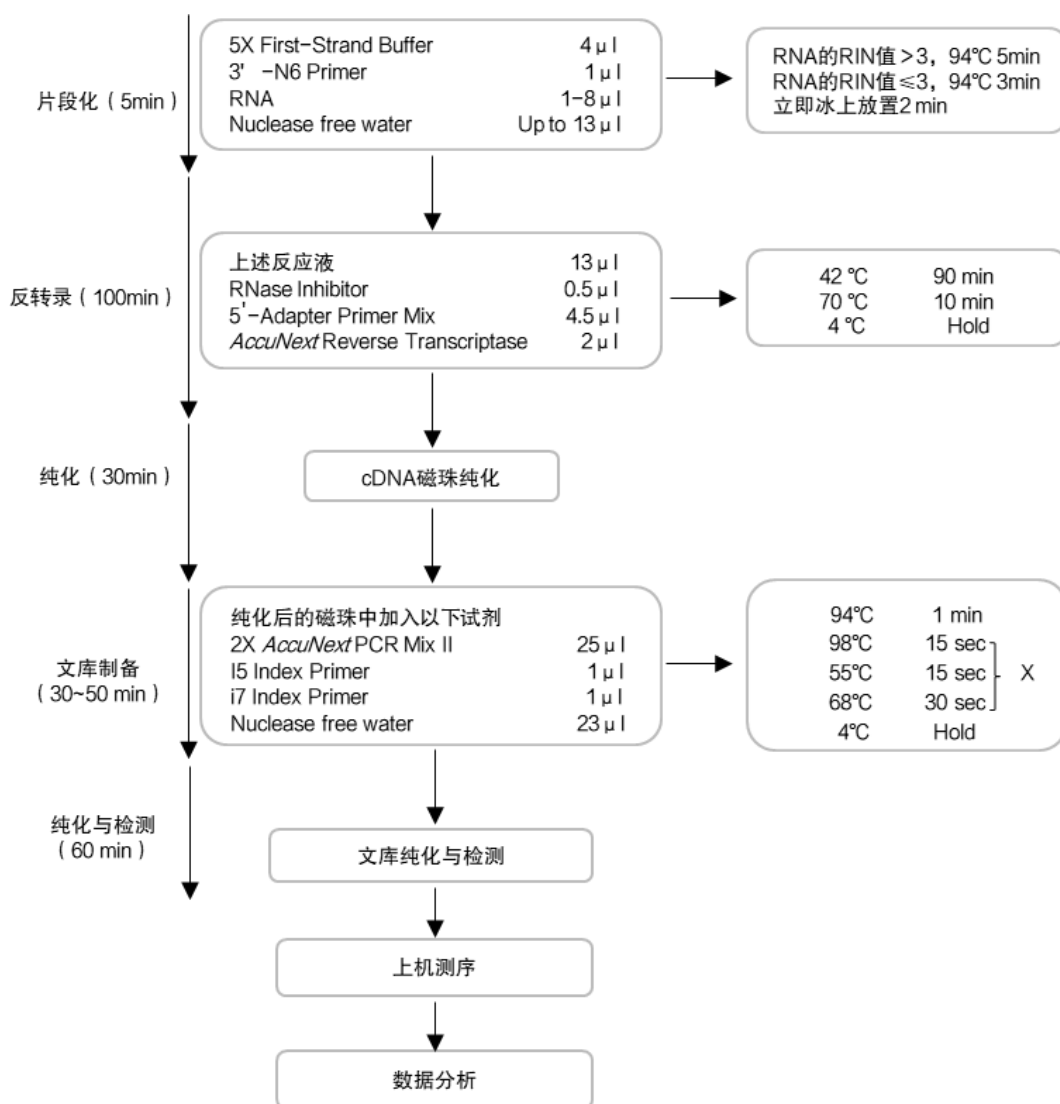


图 2：实验操作流程

## ➤ 产品优势

1. 适用于 Illumina 测序平台：整合了 Index 和 Illumina 接头，构建的 RNA 文库可直接进行 NGS 测序。
2. 模板适用范围广：可对 100 pg ~ 100 ng RNA 进行 RNA 文库构建；可兼容真核及原核生物 RNA 样本；降解的 RNA 也可以成功建库，兼容 RIN 值 2 ~ 10 的 RNA 样本。
3. 操作简单：无需进行传统的末端修复、接头连接等繁琐的步骤，即可获得 RNA 测序文库。
4. 能准确识别 RNA 链特异性：Read 1 读取的是原始 RNA 的反义链序列，Read 2 读取的是原始 RNA 的正义链序列。
5. 产品性能稳定：实验操作可重复。

## ➤ 使用注意事项

### 1. 防污染要求

- ❖ 在进行反转录反应时需要使用无菌无酶的器具，操作过程中应避免交谈，且需穿实验服，戴一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 由于本产品检测灵敏度高，要避免与其他实验的交叉污染。建议将试剂配制区、模板添加区、PCR 扩增区和产物纯化区进行物理隔离，且每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁，防止发生污染。
- ❖ 建议在试剂配制区内进行以下操作：试剂准备、cDNA 合成试剂配制、PCR 扩增试剂配制。请使用 RNase-free 级别的耗材，并对实验区域定期进行清洁。
- ❖ 为避免样品交叉污染，吸取不同样本时需更换枪头。
- ❖ 实验过程中小心轻柔地打开和关闭样品管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，请立即用水或 70% 的酒精擦拭干净。
- ❖ 为避免污染，建议使用 2 台 PCR 仪进行实验：一台用于第一链 cDNA 合成，一台用于 PCR 扩增。
- ❖ 若是首次实验，建议设置阳性对照及阴性对照，可使用本产品中的 Control Total RNA 进行阳性对照实验。

### 2. 样本要求

- ❖ 本产品可从 Total RNA 开始进行 RNA 文库构建，但为了增加测序数据有效性及降低测序成本，建议使用去除 rRNA 的 RNA 样本。可采用以下 2 种方法去除 rRNA：
  - 1) **mRNA 的富集**：针对完整性较好（RIN 值  $\geq 7$ ）的真核生物 RNA，可采用 Oligo dT 磁珠富集含有 Poly A 尾的 mRNA 样本。为避免低质量的样本（RIN 值  $< 7$ ）因 RNA 发生断裂，在用磁珠法富集 mRNA 时引入 3' 偏好性，建议实验前对 RNA 的完整性进行检测。
  - 2) **rRNA 的去除**：针对没有 Poly A 尾的 RNA 或降解的 RNA（RIN 值  $< 7$ ）可采用 rRNA 的去除试剂盒【如 NEB#NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human / Mouse / Rat)】处理后获得 RNA 样本。
- ❖ 本产品可从低至 100 pg 的 RNA 进行 cDNA 合成，但如果 RNA 量不限制的话，建议增加 RNA 的起始量，以确保 RNA 文库构建成功。

### 3. PCR 扩增循环数选择

- ❖ 不同类型及不同用量的 RNA 样本中基因表达情况不同，因此，建议正式实验前，先摸索合适的循环数。可设置循环数梯度，确定最佳循环数（在 PCR 产物

足够的前提下循环数越少越好)。下表是根据 Mouse Liver mRNA 及本产品中 Control Total RNA ( Mouse Liver Total RNA ) 摸索所得, 可用于参考。

| 模板量    | 推荐循环数   |
|--------|---------|
| 100 pg | 18 ~ 21 |
| 1 ng   | 15 ~ 17 |
| 10 ng  | 12 ~ 14 |
| 100 ng | 6 ~ 9   |

#### 4. 测序数据分析

- ❖ Read 2 读取的是原始 RNA 的正义链序列, Read 1 读取的是原始 RNA 的反义链序列。
- ❖ Read 2 读取时, 前三个碱基 (XXX) 是由于模板转换时, 由 5'-Adapter Primer Mix 引入的序列, 因此在双端测序时, 分析前修剪去除这三个碱基序列。

### ➤ 实验前准备

#### 1. 试剂 & 耗材:

- ❖ mRNA 富集: *SteadyPure Mag* mRNA 纯化试剂盒 (磁珠法) (Code No. AG21204) 或其他等效产品。
- ❖ 磁珠纯化: 公司产品 *MagSpherix* DNA Beads ( Code No. AG12546、AG12547、AG12548 ) 或其他等效产品【如 AMPure XP Reagent ( Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 】。
- ❖ DNA 评价: High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 及及公司产品 *AcuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit ( Code No. AG12549、AG12550 ) 或其他等效产品【如 Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit ( Thermo Fisher Scientific, Code No. Q33231 ) 】。
- ❖ RNA 评价: Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Code No. 5067-1513) 或其他等效产品。
- ❖ 其他材料: 低吸附 Tube 管 (如 Eppendorf, Code No. 022431021, 或其他等效产品), 80%乙醇溶液, RNase-free PCR 管, 1.5 ml 离心管。

#### 2. 仪器:

- ❖ PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

## ➤ 操作方法

### A. RNA 片段化

1. 将待用试剂冰上融化，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。其中 5'-Adapter Primer Mix、*AccuNext* Reverse Transcriptase 和 RNase Inhibitor 轻弹管壁混匀或用移液器轻柔吸打混匀，请勿涡旋混匀。其余试剂可用涡旋振荡器轻柔混匀。按照下列表格在冰上配制预混，配制完成后，用移液器轻柔吸打混匀。

| 组分                     | 体积 ( $\mu$ l ) |
|------------------------|----------------|
| 5X First-Strand Buffer | 4              |
| 3'-N6 Primer           | 1              |
| RNA*                   | 1 ~ 8          |
| Nuclease free water    | Up to 13       |

\*: 推荐 RNA 加入量为 100 pg ~ 100 ng，如果样本量不受限制，建议在推荐范围内用较高的模板量。本产品中的 Control Total RNA 为 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 的 Mouse Liver Total RNA，可按照梯度稀释至 20 ng/ $\mu$ l、2 ng/ $\mu$ l、200 pg/ $\mu$ l、20pg/ $\mu$ l，取 5  $\mu$ l 加入反应体系中。

2. 根据 RNA 样本的 RIN 值，参照下表进行片段化反应\*。然后冰上放置 2 min。

| RIN 值    | 时间 ( min ) | 温度 ( $^{\circ}$ C ) |
|----------|------------|---------------------|
| >3       | 5          | 94                  |
| $\leq$ 3 | 3          | 94                  |

\*: 可在片段化过程中，同时按照 < B. 反转录 > 配制各组分预混液，待片段化结束，加入至上述片段化反应液中。如果 RNA 样本降解比较严重时，可适当调整片段化时间，如果在建库后的片段分布范围偏大，或者在大片段处会有明显的峰，可将片段化时间延长，若建库后的片段分布范围偏小，在小片段处有很明显的峰，则可适当减少片段化时间。

3. 片段化结束后，按照下述进行反转录反应。

### B. 反转录

1. 配制 RT Master Mix:

| 组分                                    | 体积 ( $\mu$ l ) |     |
|---------------------------------------|----------------|-----|
| 上述片段化反应液                              | 13             |     |
| RNase Inhibitor                       | 0.5            | } * |
| 5'-Adapter Primer Mix                 | 4.5            |     |
| <i>AccuNext</i> Reverse Transcriptase | 2              |     |
| Total                                 | 20             |     |

\*: 可将这 3 个组分配制成预混液 ( *AccuNext* Reverse Transcriptase 可在使用前添加 )，用移液器轻柔吸打混匀，取 7  $\mu$ l 预混液加入至上述片段化反应液中，再次轻柔吸打混匀并短暂离心。

2. 在 PCR 仪中运行以下程序（可提前设置反应程序）：

| 温度   | 时间     |
|------|--------|
| 42°C | 90 min |
| 70°C | 10 min |
| 4°C* | Hold*  |

\*：在下一步反应准备好之前，将产物置于冰上或 4°C 或 -20°C 暂存（为避免 cDNA 降解，建议尽快进行后续步骤）。

### C. cDNA 纯化

使用磁珠纯化 cDNA 产物。若使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548)，一般推荐使用 1.1X（磁珠量：样品量 = 1.1 : 1）的磁珠比例进行 cDNA 产物纯化。如果出现片段偏小的情况或需要更大的片段长度，可调整磁珠比例至 1.0X（磁珠量：样品量 = 1 : 1）进行纯化。步骤如下：

【注：不同的磁珠使用比例可能不一致，建议使用前摸索合适的磁珠比例。如果使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881)，推荐按照 1.0X 的磁珠比例进行纯化】。

#### 实验前准备：

1. 首次使用，可根据实际需求将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4°C。
2. 实验前，可根据实验量，配制新的 80%乙醇溶液（每个样品需要 800  $\mu$ l）。
3. 实验前，将磁珠恢复至室温（室温静置约 30 min），并轻柔涡旋至充分混匀（约 5 min）。

#### 操作步骤

1. 将已恢复至室温的 22  $\mu$ l 磁珠加入至 20  $\mu$ l cDNA 产物中（按照磁珠：样品 = 1.1 : 1 比例添加）。用涡旋混匀 5 sec，或使用移液器吸打 10 次，充分混匀，短暂离心。
2. 将磁珠 / cDNA 混合物在室温下孵育 8 min，让 cDNA 与磁珠结合。
3. 将样品放在磁力架上至少 5 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心地去除上清液，注意不要打散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200  $\mu$ l 新配制的 80%乙醇溶液（**注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠**），室温孵育 30 sec，小心去除上清液。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 用桌面离心机短暂离心，然后将 PCR 管放在磁力架上约 30 sec，然后用 10  $\mu$ l 移液器除去剩余的乙醇溶液。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇溶液残留。

【注意：无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 cDNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 cDNA 洗脱效率。】

8. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 20  $\mu$ l Nuclease free water；使用移液器吸打混匀磁珠，室温孵育 2 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
9. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，分离磁珠和液体直至溶液澄清（约 5 min）。
10. 小心吸取全部上清液至新的 PCR 管中。
11. 重复上述步骤 1~7，更好地去除接头引物的污染。

【注意：在步骤 7 磁珠干燥至无乙醇残留后，不再重复步骤 8-10（加入 Nuclease free water），而是向干燥的磁珠中添加<D. 文库扩增>步骤配制好的 PCR Master Mix 进行后续操作。】

#### D. 文库扩增

1. 按下表在冰上配制 PCR Master Mix：

| 组分名称                          | 体积( $\mu$ l ) |
|-------------------------------|---------------|
| 2X <i>AccuNext</i> PCR Mix II | 25            |
| i5 Index Primer <sup>b</sup>  | 1             |
| i7 Index primer <sup>b</sup>  | 1             |
| Nuclease free water           | 23            |
| Total                         | 50            |

\*a：如果多个样本需要用不同的 index 引物，可将 i5 Index Primer 和 i7 Index Primer 单独配制。

\*b：i5 / i7 Index Primer 可使用 *AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505 / AG12506 / AG12507）。

2. 取 50  $\mu$ l PCR Master Mix 加入至上述 cDNA 纯化产物中（带磁珠），轻柔涡旋混匀，离心。
3. 立即在 PCR 仪中运行以下反应程序（建议在配制 PCR Master Mix 前，提前设置反应程序）：

| 步骤  | 温度   | 时间     | 循环数 |
|-----|------|--------|-----|
| 预变性 | 94°C | 1 min  | 1   |
| 变性  | 98°C | 15 sec | X*  |
| 退火  | 55°C | 15 sec |     |
| 延伸  | 68°C | 30 sec |     |
| 保存  | 4°C  | Hold   | -   |

\*: 不同类型及不同用量的 RNA 样本中基因表达情况不同, 因此, 建议正式实验前, 先摸索合适的循环数, 可设置循环数梯度, 确定最佳循环数 (在 PCR 产物足够的前提下循环数越少越好)。下表是根据 Mouse Liver mRNA 及本产品中 Control Total RNA (Mouse Liver Total RNA) 摸索所得, 可用于参考。

| 模板量    | 推荐循环数   |
|--------|---------|
| 100 pg | 18 ~ 21 |
| 1 ng   | 15 ~ 17 |
| 10 ng  | 12 ~ 14 |
| 100 ng | 6 ~ 9   |

- 反应结束后将产物放置于冰上, 可立即进行后续文库纯化步骤, 也可将文库扩增产物置于-20°C或-80°C保存 (为避免 DNA 降解, 建议尽快进行后续实验)。

## E. 文库纯化

使用磁珠纯化 DNA 文库。若使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546、AG12547、AG12548), 一般推荐使用 1.1X (磁珠量: 样品量 = 1.1 : 1) 的磁珠比例进行 DNA 文库纯化。如果出现片段偏小的情况或需要更大的片段长度, 可调整磁珠比例至 1.0X (磁珠量: 样品量 = 1 : 1) 进行纯化。步骤如下:

【注: 不同的磁珠使用比例可能不一致, 建议使用前摸索合适的磁珠比例。如果使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No.A63881), 推荐按照 1.0X 的磁珠比例进行纯化】。

### 实验前准备:

- 首次使用, 可根据实际需求将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中, 保存在 4°C。
- 实验前, 可根据实验量, 配制新的 80%乙醇溶液 (每个样品需要 400 μl)。
- 实验前, 将磁珠恢复至室温 (室温静置约 30 min), 并轻柔涡旋至充分混匀 (约 5 min)。

### 操作步骤:

- 添加 55 μl 的已恢复室温的磁珠至上述 50 μl DNA 文库中 (按照磁珠: 样品= 1.1 : 1)。涡旋混匀 5 sec 或使用移液器吸打 10 次, 充分混匀, 短暂离心。

2. 将磁珠 / DNA 混合物在室温下孵育 8 min, 让 DNA 与磁珠结合。
3. 将样品放在磁力架上至少 5 min, 直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠, 小心地去除上清液, 注意不要打散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架上, 加入 200  $\mu$ l 新配制的 80%乙醇溶液 ( **注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠** ), 室温孵育 30 sec, 小心去除上清液。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 用桌面离心机短暂离心, 然后将 PCR 管放在磁力架上约 30 sec, 然后用 10  $\mu$ l 移液器除去剩余的乙醇溶液。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上, 开盖干燥磁珠 5 ~ 10 min 至无乙醇溶液残留;  
【注意: 无乙醇溶液残留时, 磁珠表面无光泽; 如果乙醇溶液未干燥完全, 可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠, 避免磁珠表面开裂, 降低 DNA 洗脱效率。】
8. 磁珠晾干后, 将 PCR 管从磁力架上取下, 加入 17  $\mu$ l RNase free Water 覆盖磁珠, 使用移液器吸打混匀磁珠, 室温孵育 2 min ( 如果磁珠干燥开裂, 适当延长孵育时间 ) 。
9. 将 PCR 管短暂离心, 置于磁力架上, 分离磁珠和液体直至溶液澄清 (约 5 min)。
10. 小心吸取 15  $\mu$ l 上清转移到新的低吸附 Tube 管中 ( **勿吸到磁珠** ), 即可获得构建的文库产物,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

## F. 文库质量检测

1. 取 2  $\mu$ l 纯化后的文库产物, 使用 Qubit 4 Fluorometer 和 *AccuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit ( Code No. AG12549、AG12550 ) 检测文库浓度, 具体操作请参照上述产品说明书。
2. 取 1  $\mu$ l 纯化后的文库产物, 使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 检测文库的大小分布【如 Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 】 , 具体操作请参照说明书。
3. 实验成功的反应, 会产生摩尔浓度大于 7.5 nM 的文库产物, 片段大小分布于 200 ~ 700 bp, 峰值位于 300 bp 左右。阴性对照无扩增产物。

## ► 实验例

1. 使用本公司产品 *SteadyPure Mag* mRNA 纯化试剂盒 ( 磁珠法 ) (Code No. AG21204 )纯化 mRNA。采用本产品进行 293T Cell mRNA 文库构建, RNA 模板添加量为 100 pg, PCR 扩增循环数为 19。结果如下: 图 3-A 显示了扩增后的

文库产物，分布均匀，峰值在 200 ~ 700 bp 之间。图 3-B 显示无模板的阴性对照中没有产物。

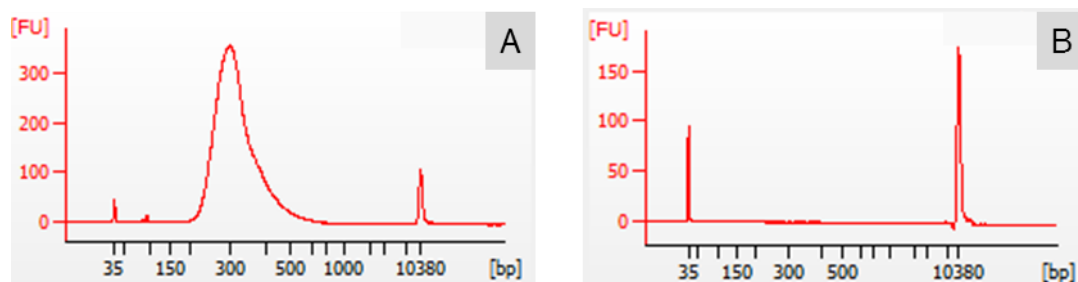


图 3. Agilent 2100 生物分析仪检测结果

- 以纯化的 293T Cell mRNA 为模板，用本产品进行文库构建，使用 Illumina NovaSeq 6000 系统测序，数据如下。

| Sequencing metrics comparing input mRNA amounts |                |       |       |       |
|-------------------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|
| mRNA source                                     | 293T cell mRNA |       |       |       |
| Input mRNA                                      | 100pg          |       | 10ng  |       |
| Replicate                                       | 1              | 2     | 1     | 2     |
| Q30 Bases rate ( % )                            | 93.2           | 92.62 | 91.91 | 92.5  |
| Total gene number(FPKM>0.1)                     | 17455          | 17348 | 21522 | 21399 |
| Total gene number(FPKM>1)                       | 12968          | 12986 | 13118 | 13090 |
| Percentage of reads(%)                          |                |       |       |       |
| rRNA residue rate                               | 2.49           | 2.25  | 2.63  | 2.66  |
| Mapped to genome                                | 90.51          | 90.16 | 88.06 | 88.69 |
| Mapped unique to genome                         | 85.19          | 85.02 | 82.88 | 83.38 |
| exon                                            | 89.97          | 90.08 | 90.54 | 90.5  |
| Intron                                          | 6.4            | 6.39  | 5.91  | 5.93  |
| Intergenic                                      | 3.63           | 3.53  | 3.55  | 3.57  |
| Pearson                                         | 0.918          |       | 0.982 |       |
| Spearman                                        | 0.81           |       | 0.878 |       |

表 1. 主要 mRNA-Seq 数据

- 以不同浓度（100 pg 和 10 ng）的 293T Cell mRNA 为模板，用本产品进行反转及文库构建，分别做 2 个技术重复，使用 Illumina NovaSeq 6000 系统测序，2 个技术重复结果的基因表达相关性很高，表明实验重复性好（图 4：A 为 100 pg、B 为 10 ng）

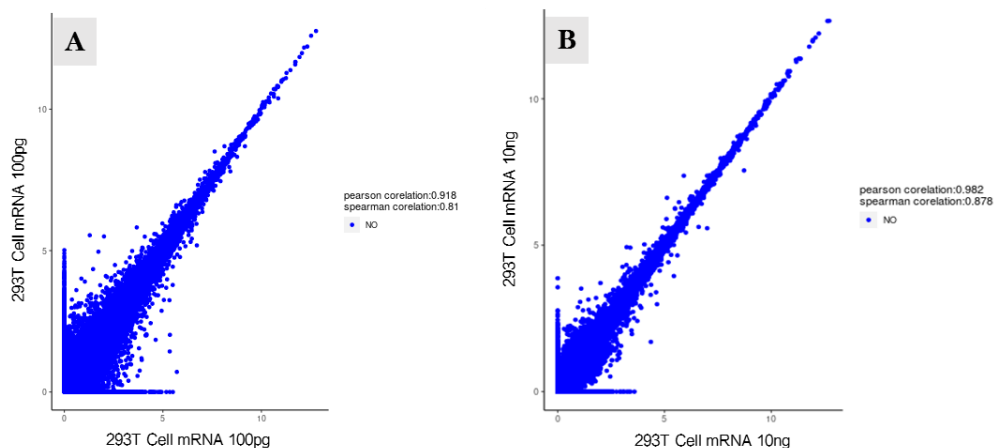


图 4. 基因表达重复性分析

4. 以 293T Cell mRNA 的 100 pg 和 10 ng 为模板，用本产品进行反转及文库构建，使用 Illumina NovaSeq 6000 系统测序，测序后分析测序片段在基因上的分布，结果显示用本产品扩增的片段无 5' 端和 3' 端的偏好性，分布均一（图 5：A 为 293T Cell mRNA 100 pg、B 为 293T Cell mRNA 10 ng）。

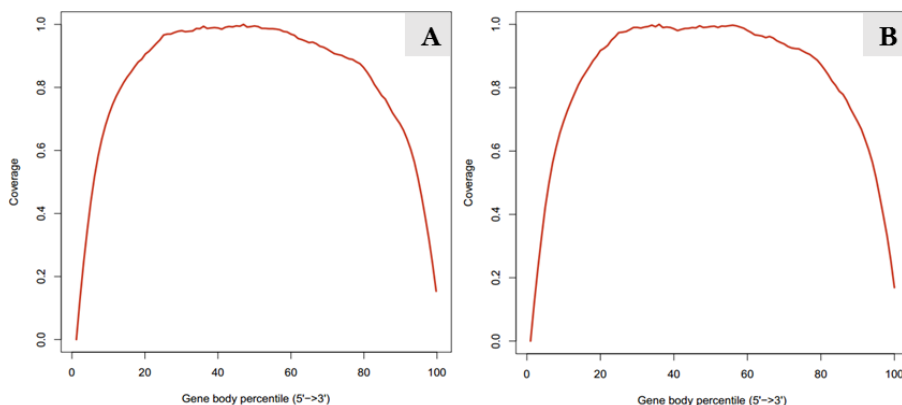


图 5. 测序数据在基因上的覆盖度

## ➤ 产品注意事项

### 1. 防污染措施

- ❖ 在进行反转录反应时需要使用无菌无酶的器具，操作过程中应避免讲话，且需穿戴好实验服，一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 由于本产品检测灵敏度高，要避免与其他实验的交叉污染。建议将试剂配制区、模板添加区、PCR 扩增区和产物纯化区进行物理隔离，且每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁，防止发生污染。
- ❖ 建议在试剂配制区内进行以下操作：试剂准备、cDNA 合成试剂配制、PCR 扩增试剂配制。请使用 RNase-free 级别的耗材，并对实验区域定期进行清洁。

- ❖ 本产品应储存在无核酸酶和无核酸污染的环境中，避免试剂污染。
- ❖ 为避免样品交叉污染，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 实验过程中小心轻柔地打开和关闭样品管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，请立即用水或 70% 的酒精擦拭。
- ❖ 为避免污染，建议使用 2 台 PCR 仪进行实验：一台用于第一链 cDNA 合成，一台用于 PCR 扩增。

## 2. 样品准备：

- ❖ 使用纯度较高的 RNA 进行反应，防止残留的蛋白质、有机溶剂和盐离子等影响酶的活性，降低反应性能。
- ❖ 由于 Total RNA 中 rRNA 占比近 90%，为了测序时获得更多有效的数据量及降低测序成本，建议去除 rRNA 后再进行 RNA 文库构建，以减少测序中 rRNA 的数据占比，获得更多有效的数据。
- ❖ 对于有部分降解的 RNA 或者没有 Poly A 尾的 RNA，可使用 rRNA 去除试剂盒【如 NEB#NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human / Mouse / Rat)】除去 rRNA 后进行文库构建。

## 3. 样品片段化

- ❖ 如果 RNA 样本降解比较严重时，可适当调整片段化时间，如果在建库后的片段分布范围偏大，或者在大片段处会有明显的峰，可将片段化时间延长，若建库后的片段分布范围偏小，在小片段处有很明显的峰，则可适当减少片段化时间。

## 4. 磁珠纯化（cDNA 及文库纯化）

- ❖ 在使用前，应该先将磁珠平衡至室温，避免导致产物回收率下降。
- ❖ 磁珠每次使用前应先充分振荡混匀。
- ❖ 纯化过程中使用的 80% 乙醇溶液，现配现用，避免长时间保存而导致乙醇溶液挥发，降低乙醇溶液浓度。
- ❖ 乙醇清洗完成后，应使乙醇溶液充分挥发，避免影响产物的回收率。
- ❖ 洗脱完毕，吸取上清时，应小心吸取洗脱液上清，避免吸入磁珠，以免对后续实验造成影响。
- ❖ 推荐纯化 cDNA 时，选择纯化两遍以去除引物的残留。

- ❖ 不同的磁珠比例可回收不同大小 DNA 片段，本试剂盒推荐 1.1X 的磁珠比例进行 cDNA 和文库纯化。若出现片段偏小的情况，可调整磁珠比例至 1.0X。

## 5. PCR 扩增循环数及引物选择

- ❖ 选择最佳的循环数，确保仍然在扩增的指数期。在 RNA 文库产量足够的前提下循环数越少越好。
- ❖ 扩增循环数过低，会导致 RNA 文库产量不足，影响后续的测序结果。
- ❖ 可参考本说明书推荐的循环数进行实验，若文库产量不足，可增加 2 ~ 3 个循环进行测试。AccuNext CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505、AG12506、AG12507）可根据不同的 Index 区分文库，i5 Index Primer 含有 8 种不同的 Index，i7 Index Primer 含有 12 种不同的 Index，建议选择不同的组合搭配使用（具体方法见附录 A）。

## 6. 测序及数据分析建议

- ❖ 大多数 Illumina 测序文库制备方案要求文库的最终浓度为  $\geq 2$  nM 或  $\geq 4$  nM，为了保证测序的成功率，可以制备摩尔浓度大于 7.5 nM 的文库进行测序，将其用合适的移液器转移至低吸附的 1.5ml 离心管中保存。
- ❖ Read 2 读取的是原始 RNA 的正义链序列，Read 1 读取的是原始 RNA 的反义链序列。
- ❖ Read 2 读取时，前三个碱基（XXX）是由于模板转换时，由 5'-Adapter Primer Mix 引入的序列，因此在双端测序时，分析前修剪去除这三个碱基序列。

## ➤ 附录 A：接头引物搭配方式

以 *AccuNext*CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) (Code No. AG12507) 为例, 可选择下表中任意一种搭配方式:

|       | AP701 | AP702 | AP703 | AP704 | AP705 | AP706 | AP707 | AP708 | AP709 | AP710 | AP711 | AP712 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| AP501 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP502 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP503 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP504 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP505 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP506 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP507 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |
| AP508 | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     | ○     |

## ➤ 附录 B: *AccuNext*CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 的信息

| 用途                                 | 品名    | AG12505<br>( 12 rxns ) | AG12506<br>( 48 rxns ) | AG12507<br>( 96 rxns ) | 管盖颜色 |
|------------------------------------|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------|
| i5 Index Primer<br>( AP501-AP508 ) | AP501 | 12 $\mu$ l             | 12 $\mu$ l             | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP502 | -                      | 12 $\mu$ l             | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP503 | -                      | 12 $\mu$ l             | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP504 | -                      | 12 $\mu$ l             | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP505 | -                      | -                      | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP506 | -                      | -                      | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP507 | -                      | -                      | 12 $\mu$ l             | ●    |
|                                    | AP508 | -                      | -                      | 12 $\mu$ l             | ●    |
| i7 Index Primer<br>( AP701-AP712 ) | AP701 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP702 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP703 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP704 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP705 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP706 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP707 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP708 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP709 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP710 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP711 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |
|                                    | AP712 | 5 $\mu$ l              | 5 $\mu$ l              | 8 $\mu$ l              | ●    |

**AccuNext CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 序列信息如下:**

**i5 Index Primer for Illumina**

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5 Index] ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- 3'

**i7 Index Primer for Illumina**

5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7 Index] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- 3'

[i5 Index] 表示 8 bp 的 i5 Index 序列, [i7 Index] 表示 8 bp 的 i7 Index 序列。

| 组分               |       | 引物 Index 序列 | Sample Sheet 输入 / 测序时 Index 序列                       |                                                                 |
|------------------|-------|-------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|                  |       |             | NovaSeq 6000 v1.0 reagents, MiSeq, HiSeq 2000 / 2500 | NovaSeq 6000 v1.5 reagents, MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000 / 4000 |
| i5 index Primers | AP501 | TATAGCCT    | TATAGCCT                                             | AGGCTATA                                                        |
|                  | AP502 | ATAGAGGC    | ATAGAGGC                                             | GCCTCTAT                                                        |
|                  | AP503 | CCTATCCT    | CCTATCCT                                             | AGGATAGG                                                        |
|                  | AP504 | GGCTCTGA    | GGCTCTGA                                             | TCAGAGCC                                                        |
|                  | AP505 | AGGCGAAG    | AGGCGAAG                                             | CTTCGCCT                                                        |
|                  | AP506 | TAATCTTA    | TAATCTTA                                             | TAAGATTA                                                        |
|                  | AP507 | CAGGACGT    | CAGGACGT                                             | ACGTCCTG                                                        |
|                  | AP508 | GTA CTGAC   | GTA CTGAC                                            | GTCAGTAC                                                        |
| i7 index Primers | AP701 | CGAGTAAT    | ATTACTCG                                             |                                                                 |
|                  | AP702 | TCTCCGGA    | TCCGGAGA                                             |                                                                 |
|                  | AP703 | AATGAGCG    | CGCTCATT                                             |                                                                 |
|                  | AP704 | GGAATCTC    | GAGATTCC                                             |                                                                 |
|                  | AP705 | TTCTGAAT    | ATTCAGAA                                             |                                                                 |
|                  | AP706 | ACGAATTC    | GAATTCGT                                             |                                                                 |
|                  | AP707 | AGCTTCAG    | CTGAAGCT                                             |                                                                 |
|                  | AP708 | GCGCATT     | TAATGCGC                                             |                                                                 |
|                  | AP709 | CATAGCCG    | CGGCTATG                                             |                                                                 |
|                  | AP710 | TTCGCGGA    | TCCGCGAA                                             |                                                                 |
|                  | AP711 | GCGCGAGA    | TCTCGCGC                                             |                                                                 |
|                  | AP712 | CTATCGCT    | AGCGATAG                                             |                                                                 |