Version 4

Code No. AG12543

AG12544

# *AccuNext* 链特异性单细胞/微量 RNA 建库试剂盒 Ⅱ（Illumina）

# *AccuNext* Stranded Single Cell & Low Input RNA-seq Library Prep Kit Ⅱ 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.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

# 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 ..... 5
- 使用注意事项 ..... 5
- 实验前准备 ..... 7
- 操作方法 ..... 7

A. 第一链 cDNA 合成 ..... 7

B. 文库扩增（PCR1） ..... 11

C. 第一次文库纯化与核糖体 RNA 去除 ..... 12

D. DNA 文库扩增（PCR2） ..... 12

E. 第二次文库纯化 ..... 13

F. 文库质量检测 ..... 14

- 产品注意事项 ..... 15
- 附录 A：接头引物搭配方式 ..... 16
- 附录 B：*AccuNext* 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 高通量测序平台设计的链特异性 RNA 测序文库构建试剂盒，可从 1~100 个细胞或 10 pg ~ 10 ng 的 Total RNA 样本进行 RNA 文库构建，包含 RNA 片段化、逆转录（RT）、PCR 文库扩增所需的所有组分。本产品通过加热使 RNA 片段化，然后用带通用接头序列的 3'-N6 Primer 进行反转录，反转录后在 cDNA 末端加上特定接头；搭配带有 illumina 测序接头的引物进行 PCR 扩增【例如，*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505 / AG12506 / AG12507）】进行文库扩增，随后根据需要进行核糖体 RNA 去除，再使用通用引物进行二轮扩增，纯化完成即可获得适用于 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，测序获得的数据质量高，覆盖度完整；同时，模板转换反应保留了 RNA 链的方向性，可获得 RNA 链特异性的测序数据。

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，不建议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。

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。

本产品中不包含 rRNA 去除模块，可根据需要选择合适的 rRNA 去除试剂。

## ➢ 产品组成

**Package 2-1 组分如下（-80℃保存）：**

| 组分名称 | AG12543<br>（12 rxns） | AG12544<br>（48 rxns） |
|---|---|---|
| 5'- Adapter Primer Mix | 54 μl | 216 μl |
| Control Total RNA（1 μg / μl）*1 | 5 μl | 5 μl |

*1：Control Total RNA 为 293T Cell Total RNA。

**Package 2-2 组分如下（-20℃保存）:**

| 组分名称 | AG12543<br>（12 rxns） | AG12544<br>（48 rxns） |
|---|---|---|
| 10X Cell Lysis Buffer | 228 μl | 920 μl |
| RNase Inhibitor（40 U/μl） | 18 μl | 72 μl |
| 5X First-Strand Buffer | 48 μl | 192 μl |
| 3'-N6 Primer | 12 μl | 48 μl |
| *AccuNext* Reverse Transcriptase (100 U/μl) | 24 μl | 96 μl |
| *AccuNext* DNA Polymerase (1 U/μl) | 36 μl | 144 μl |
| 2X *AccuNext* PCR Buffer | 900 μl | 900 μl X 4 pcs |
| *AccuNext* PCR Primer Mix | 24 μl | 96 μl |
| Nuclease free water | 1 ml | 1 ml X 3 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℃保存

Package 2-2 -20℃保存

运输温度：Package 2-1 干冰运输

Package 2-2 干冰运输或-20℃冰袋运输

## ➢ 实验原理及流程

以细胞或 Total RNA 为模板，用带有特定接头的 3'-N6 Primer 进行反转录，将 RNA 片段反转录成 cDNA；当反转录酶到达 RNA 5' 末端时，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，然后通过连接酶将 5 端带有特定接头，搭配带有 illumina 测序接头的引物进行 PCR 扩增（PCR1），获得双端带有测序接头的文库。然后根据需要进行核糖体去除，去除核糖体后使用通用引物 *AccuNext* PCR Primer Mix 进行第二轮 PCR 扩增（PCR2），进一步扩增源自非核糖体 DNA 文库。最后，对扩增产物进行二次纯化，得到最终的文库。原理如图 1 所示：

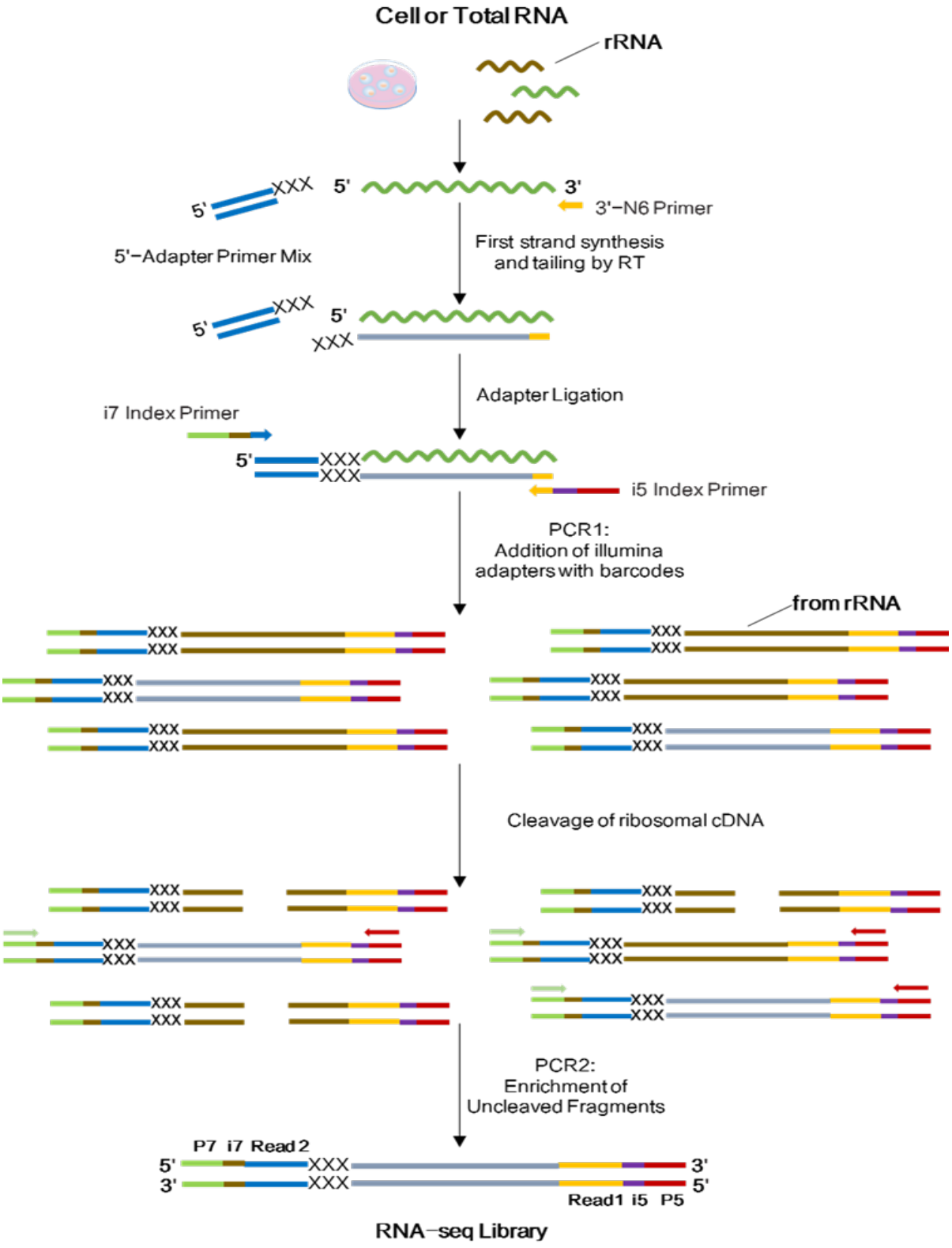
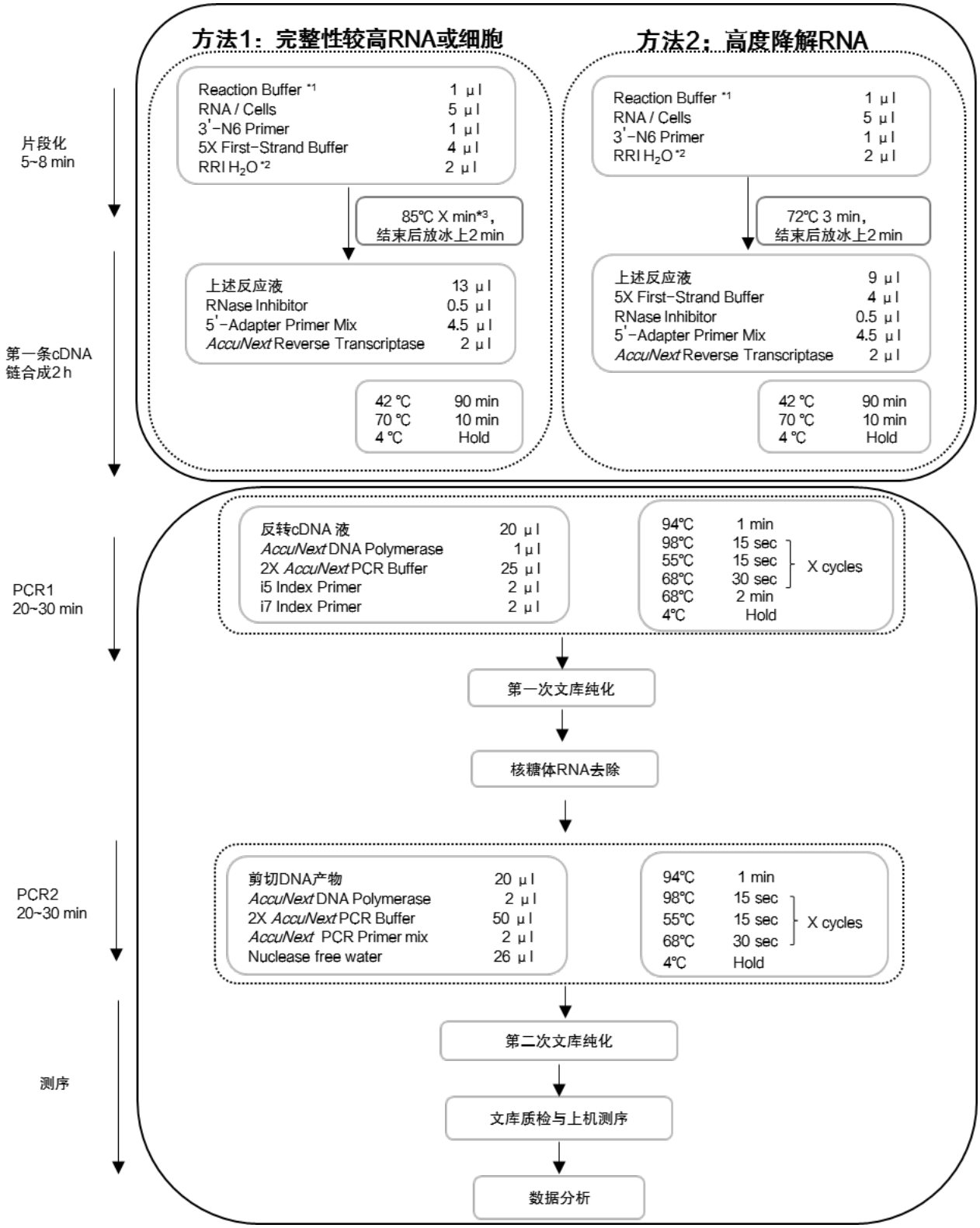



图 1：文库构建原理

**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）。




*1, 2：Reaction Buffer 和 RRI $H_2O$ 按照<A. 第一链 cDNA 合成步骤 2> 配制。

*3：片段化时间请参照<表 1：片段化时间推荐表>。

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. 灵敏度高：可从单细胞或 10 pg Total RNA 进行 RNA 文库构建。
3. 用途广泛：适用于 RIN 值 2 ~ 10 的 RNA 样本，同时，兼容降解样本（如 FFPE 样本）。
4. 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。
5. 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。

## ➢ 使用注意事项

**1. 防污染要求**

由于本产品检测灵敏度极高，防污染是非常有必要的。可从以下几个方面注意：

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 耗材方面，进行反转录反应时需要使用 RNase-free 级别的耗材，为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分为试剂配制区（建议为无菌正向气流）、模板添加区、反转录区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
  1) 在试剂配制区进行以下操作：反转录试剂配制、PCR 扩增试剂配制；
  2) 在模板添加区加入模板；
  3) 在反转录区进行反转录；
  4) 在 PCR 扩增区进行扩增；
  5) 产物纯化区进行磁珠纯化；
  6) 在电泳检测区进行检测。
- ❖ 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，且使用前后对仪器进行清洁。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面使用 70%酒精擦拭清洁。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，立即用水或 70%的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加 RNA 模板或细胞）实验，确认实验是否有污染。
- ❖ 若是首次实验，建议设置阳性对照，可使用本产品中的 Control Total RNA 进行阳性对照实验。

## 2. 样本要求

### RNA 样本

- 本产品可从降解的、部分降解的或完整性高的 RNA 开始进行 RNA 文库构建，在开始实验之前，请使用安捷伦 2100 生物分析仪（Agilent RNA 6000 Pico Kit，Code No. 5067-1513）确定 RNA（RIN 分数或 DV200）的完整性，根据 RNA 的质量，选择不同的片段化方法。
- 使用高纯度 RNA 进行反应，RNA 应不含基因组 DNA 及杂质，防止残留的蛋白质、有机溶剂和盐等影响酶的活性，降低反应性能。
- 本产品可从低至 10 pg 的 RNA 进行文库构建，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。

### 细胞样本

- 细胞内基因表达是瞬时的、变化的，与细胞的类型、状态、活力及周期都有关系。因此，不同的细胞最终获得 DNA 文库产量会有差异；为获得最佳的 DNA 文库产量，建议 PCR 反应时优化扩增循环数。
- 本产品不适用于经甲醛、丙酮等固定过的细胞。
- 细胞样本收集后，需要确认细胞活力，死细胞会发生明显的 RNA 降解，导致实验失败。
- 细胞培养基对实验有抑制作用，建议将细胞用不含 $Mg^{2+}$、$Ca^{2+}$ 等的 1X PBS 洗涤两次并重悬，反应时加入 PBS 体积越少越好。细胞数量不要过多，过多的细胞对反应会产生抑制。

## 3. PCR 扩增循环数选择

- 不同类型及不同用量的 RNA/细胞样本中基因表达情况不同，因此，正式实验前，可以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）。下表是根据本产品中 Control Total RNA 摸索所得，可用于参考。

表 1：PCR 循环数推荐表

| 细胞投入量 | RNA 投入量 | PCR1 循环数 | PCR2 循环数 | PCR2 后纯化次数 | 最终洗脱体积 μl |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 Cells | 10 pg | 12 | 13-14 | 1/2*[a] | 22/12*[a] |
| 10 Cells | 100 pg | 10 | 13-14 | | |
| 100 Cells | 1 ng | 7 | 13-14 | 1 | 22 |
| - | 10 ng | 5 | 13-14 | | |
| - | 100ng | 3 | 13-14 | | |
| - | 1 μg | 3 | 13-14 | | |

*a：通常情况下，PCR2 后只需要纯化 1 次，纯化一次使用 22μl Nuclease free water 洗脱；如果纯化后发现浓度比较低可选择二轮纯化，使用 12μl Nuclease free water 洗脱。

**4. 测序数据分析**

- 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。
- Read 2 读取时，前三个碱基（XXX）是反转录时引入的，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：**

- illumina 测序接头引物：*AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505 / AG12506 / AG12507）或其他等效产品。
- 磁珠纯化：本公司产品 *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 *AcuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit (Code No. AG12549 / AG12550)或其他等效产品。
- RNA 评价：Agilent RNA 6000 Pico Kit（Agilent, Code No. 5067-1513）或其他等效产品。
- 其他材料：80%乙醇，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管和低吸附 tube 管（如 Eppendorf, Code No. 022431021，或其他等效产品 )等。

**2. 仪器：**

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

## ➢ 操作方法

## A. 第一链 cDNA 合成

1. 冰上解冻所需的所有试剂
   - 将所需的试剂冰上融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。其中 *AccuNext* Reverse Transcriptase、5'-Adapter Primer Mix 和 RNase Inhibitor 轻弹管壁混匀或用移液枪轻柔吸打混匀，请勿涡旋混匀。其余试剂可轻柔涡旋振荡混匀。

- 5X First-Strand Buffer 可能会形成沉淀，使用前请振荡混匀使沉淀充分溶解。

2. 按照下表在冰上配制 RNase Inhibitor Water（RRI $H_2O$）和 Reaction Buffer，配制好后用移液枪轻柔混匀，并短暂离心，混匀时避免产生气泡。

1）RRI $H_2O$ 制备

| 组分 | 体积（μl） |
|---|---|
| Nuclease free water | 199 |
| RNase Inhibitor（40 U/μl） | 1 |
| Total | 200 |

2）Reaction Buffer 制备

| 组分 | 体积（μl） |
|---|---|
| 10X Cell Lysis Buffer | 19 |
| RNase Inhibitor（40 U/μl） | 1 |
| Total | 20 |

3. 根据 RNA 质量不同，选择不同的第一链 cDNA 合成方法（不同的片段化时间及温度），请参考下表：

表 2：片段化时间推荐表

| RIN 值 | 时间（min）*a | 温度（℃） | 第一链 cDNA 合成方法 |
|---|---|---|---|
| ≥7 or cells | 6 | 85 | 方法 1 |
| 4≤RIN＜7 | 4 | 85 | |
| RIN＜4 且 DV200≥60% | 2 | 85 | |
| RIN＜4 且 DV200＜60% | 3 | 72 | 方法 2 |

*a：片段化时间可根据实际情况进行调整：如果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。本产品中的 Control Total RNA，片段化条件推荐 85℃ 6 min；一般 FFPE 样本提取的 RNA 降解较严重，推荐**方法 2**。

## 方法 1：完整细胞或完整性较高/部分降解的 RNA 操作步骤

4. 第一链 cDNA 合成操作步骤：

1）按照下表在冰上配制反应体系，配制好后用移液枪轻柔混匀，并短暂离心，混匀时避免产生气泡。

| 组分 | 体积（μl） |
|---|---|
| 上述 Reaction Buffer | 1 |
| 5X First-Strand Buffer | 4 |
| 3'-N6 Primer | 1 |
| RNA / Cells | 5 μl *a / 2 μl *b |
| 上述 RRI $H_2O$ | up to 13 μl |

*a：推荐 RNA 模板加入量为 10 pg ~ 10 ng，如果样本量不受限制，建议在推荐范围内使用较高的模板量，体积最多可加 7 μl。本产品中提供的 Control

Total RNA 为 1 μg/μl，可按照 10 倍的梯度稀释至 2 ng/μl，加入 5 μl 使用。阴性对照加入 RRI $H_2O$。

*b：以细胞为模板，推荐单个反应中细胞数为 1 ~ 100 cells。

- ❖ **若用 PBS 重悬细胞：**建议加入 2 μl 的细胞液，最多不超过 5 μl；由于培养基及其他组分对反应有抑制作用，建议将细胞用不含 $Mg^{2+}$、$Ca^{2+}$ 等的 1X PBS 洗涤两次并重悬，反应时加入 PBS 体积越少越好。细胞数量不要过多，过多的细胞对反应会产生抑制。
- ❖ **若用流式细胞仪分选细胞：**建议将细胞直接分选至 2 μl PBS 中，再加 11 μl 除细胞外的上述反应液，轻弹管壁混匀。或将上述除细胞外的反应液直接配至 13 μl，再将细胞直接分选反应液中（忽略细胞分选的鞘液体积）。
- ❖ **若是冷冻的细胞：**建议先将反应液配好，然后取出细胞，放置在冰上融化，在细胞融化后**立即**加入配制好的反应液（避免 RNA 降解）。

2）按照下述程序，将样品放入 PCR 仪（提前预热）中进行反应。

| 温度 | 时间 |
|---|---|
| 85℃ | 2 ~ 6 min*a |
| 4℃ | Hold |

*a：按照**表 2** 中的建议选择合适时间（或者通过实验确定最佳时间）。

3）孵育结束后，立即将样品置于冰上 2 min。

4）立即进行反转录反应：按照下表在冰上配制 RT Master Mix：

| 组分 | 体积（μl） | |
|---|---|---|
| 上述片段化反应液 | 13 | |
| RNase Inhibitor（40 U/μl） | 0.5 | *a |
| 5'-Adapter Primer Mix | 4.5 | |
| *AccuNext* Reverse Transcriptase (100 U/μl) | 2 | |
| Total | 20 | |

*a：可在片段化过程中，将这 3 个组分配制成预混液（*AccuNext* Reverse Transcriptase 可在使用前添加），用移液枪轻柔吸打混匀，待片段化结束，取 7 μl 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。

5）在 PCR 仪中运行以下程序（可提前设置反应程序）：

| 温度 | 时间 |
|---|---|
| 42℃ | 90 min |
| 70℃ | 10 min |
| 4℃ | Hold |

6）在 **< B.文库扩增 >** 试剂备好之前，将产物放置于冰上或 4℃，然后尽快进行文库扩增，如不能立即进行文库扩增，可将 cDNA 合成产物保存于 −20℃ 过夜或 −80℃ 保存一个月（为避免 cDNA 降解，建议尽快进行后续实验）。

## 方法 2：高度降解的 RNA 操作步骤

4. 第一链 cDNA 合成操作步骤：

1）按照下表在冰上配制反应体系，配制好后用移液枪轻柔混匀，并短暂离心，混匀时避免产生气泡。

| 组分 | 体积（μl） |
|---|---|
| 上述 Reaction Buffer | 1 |
| 3'-N6 Primer | 1 |
| RNA*a | – |
| 上述 RRI $H_2O$ | up to 9 |

*a：推荐 RNA 模板加入量为 10 pg ~ 10 ng，如果样本量不受限制，建议在推荐范围内使用较高的模板量，如果是从固定的组织或细胞中提取的 RNA（如 FFPE RNA），建议模板投入量不少于 1 ng，较低的模板投入可能影响文库构建结果。

2）按照下述程序，将样品放入 PCR 仪（提前预热）中进行反应。

| 温度 | 时间 |
|---|---|
| 72℃ | 3 min |
| 4℃ | Hold |

3）孵育结束后，立即将样品置于冰上 2 min。

4）立即进行反转录反应。按照下表在冰上配制 RT Master Mix：

| 组分 | 体积（μl） | |
|---|---|---|
| 上述反应液 | 9 | |
| 5X First-Strand Buffer | 4 | *a |
| RNase Inhibitor（40 U/μl） | 0.5 | |
| 5'-Adapter Primer Mix | 4.5 | |
| *AccuNext* Reverse Transcriptase（100 U/μl） | 2 | |
| Total | 20 | |

*a：可在退火过程中，将这 4 个组分配制成预混液（*AccuNext* Reverse Transcriptase 可在使用前添加），用移液枪轻柔吸打混匀，待反应结束，取 11μl 预混液加入至上述反应液中，再次轻柔吸打混匀并短暂离心。

5）在 PCR 仪中运行以下程序（可提前设置反应程序）：

| 温度 | 时间 |
|---|---|
| 42℃ | 90 min |
| 70℃ | 10 min |
| 4℃ | Hold |

6）在 <B.文库扩增 > 试剂备好之前，将产物放置于冰上或 4℃，然后尽快进行文库扩增，如不能立即进行文库扩增，可将 cDNA 合成产物保存于 −20℃ 过夜或 −80℃ 保存一个月（为避免 cDNA 降解，建议尽快进行后续实验）。

## B. 文库扩增（PCR1）

1. 在冰上融化 2X *AccuNext* PCR Buffer、i5 Index Primer 和 i7 Index Primer，轻柔涡旋混匀，短暂离心后放置于冰上备用。*AccuNext* DNA Polymerase 用移液枪轻柔吹打混匀后放置于冰上备用。
2. 按照下表在冰上配制 PCR Master Mix：

| 组分名称 | 体积(μl) | |
|---|---|---|
| *AccuNext* DNA Polymerase | 1 | |
| 2X *AccuNext* PCR Buffer | 25 | *a |
| i5 Index Primer*b | 2 | |
| i7 Index Primer*b | 2 | |
| Total | 30 | |

*a：可将这 4 个组分先配制成预混液，轻柔涡旋混匀后，然后加入 *AccuNext* DNA Polymerase，再轻柔吸打混匀，离心。如果多个样本需要用不同的 index 引物，也可以将 i5 Index Primer 和 i7 Index Primer 单独配制。

*b：i5 / i7 Index Primer 是带有 illumina 测序接头的引物【可使用 *AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）( Code No. AG12505 / AG12506 / AG12507 )】。

3. 取 30 μl PCR Master Mix 加入至上述 <A.第一链 cDNA 合成> 的 20 μl cDNA 合成产物中，轻柔涡旋混匀，离心。
4. 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℃ | 1 min | 1 |
| 变性 | 98℃ | 15 sec | X*a |
| 退火 | 55℃ | 15 sec | |
| 延伸 | 68℃ | 30 sec | |
| 最终延伸 | 68℃ | 2 min | 1 |
| 保存 | 4℃ | Hold | − |

*a：不同类型及不同用量的 RNA / Cells 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）。下表是根据本产品中 Control Total RNA 摸索所得，可用于参考。

表 3：PCR1 循环数推荐表

| 细胞投入量 | RNA 投入量 | PCR1 循环数 |
|---|---|---|
| 1 cell | 10 pg | 12 |
| 10 cells | 100 pg | 10 |
| 100 cells | 1 ng | 7 |
| – | 10 ng | 5 |
| – | 100ng | 3 |
| – | 1 μg | 3 |

5. 反应结束后将产物放置于冰上或 4℃，可立即进行后续 **< C.文库纯化 >** 步骤，也可将文库扩增产物置于 -20℃ 过夜或 -80℃ 保存一个月（为避免 DNA 文库降解，建议尽快进行后续实验）。

## C. 第一次文库纯化与核糖体 RNA 去除

建议对 DNA 文库扩增（PCR1）产物进行磁珠纯化，降低引物二聚体对测序结果的影响，另外如果提取的 RNA 未进行核糖体去除，纯化后的产物建议进行核糖体去除后再进行后续 DNA 文库扩增（PCR2）。

## D. DNA 文库扩增（PCR2）

1. 冰上融化 2X *AccuNext* PCR Buffer 和 *AccuNext* PCR Primer Mix，轻柔涡旋混匀，离心后放置于冰上备用。*AccuNext* DNA Polymerase 用移液枪轻柔吹打混匀后放置于冰上备用。
2. 按照下表在冰上配制 PCR2 Master Mix：

| 组分名称 | 体积(μl) |
|---|---|
| *AccuNext* DNA Polymerase | 2 |
| 2X *AccuNext* PCR Buffer | 50 |
| *AccuNext* PCR Primer Mix | 2 |
| Nuclease free water | 26 |
| Total | 80 |

3. 取 80 μl PCR2 Master Mix 加入至上述 **<C.第一次文库纯化与核糖体 RNA 去除>** 的 20 μl 产物中，轻柔涡旋混匀，离心。
4. 立即在 PCR 仪中运行以下反应程序（建议在配制 PCR2 Master Mix 前，提前设置反应程序）：

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|---|---|---|---|
| 预变性 | 94℃ | 1 min | 1 |
| 变性 | 98℃ | 15 sec | 13-14[a] |
| 退火 | 55℃ | 15 sec | |
| 延伸 | 68℃ | 30 sec | |
| 保存 | 4℃ | Hold | – |

*a：PCR2 循环数根据 293T Total RNA 摸索所得的，用于参考，可根据实际情况进行调整。

5. 将产物放置于-20℃ 保存过夜或-80℃保存一个月（为避免 DNA 文库降解，建议尽快进行后续实验）。

## E. 第二次文库纯化

使用磁珠纯化 DNA 文库，推荐使用 *MagSpherix* DNA Beads（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）按照 1.1X 的磁珠比例（磁珠体积：样品体积 = 1.2：1）进行纯化【若使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881)，则使用 1X 的磁珠比例纯化即可】。

（**注：**磁珠比例可根据实际情况进行调整，如需获得片段更大的文库，可以适当降低磁珠比例，以舍弃小片段，比如降低到 1.0X 或 0.9X）。具体步骤如下：

**实验前准备：**

1. 首次使用，建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4℃。
2. 实验前，根据实验量，配制新的 80%乙醇溶液（每个样品需要 800 μl）。
3. 实验前，将磁珠恢复至室温（15~25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

**操作步骤：**

1. 取 120 μl *MagSpherix* DNA Beads 加入至 100 μl PCR2 产物中（按照磁珠：样品 = 1.2：1 比例添加）。轻柔涡旋混匀，短暂离心。
2. 将磁珠/ DNA 文库在室温（15~25℃）下孵育 8 min（样品体积较多，孵育时间增长），使文库与磁珠结合。
3. 将 PCR 管放在磁力架上至少 2 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。用移液枪小心吸弃上清液，注意不要打散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μl 80%乙醇溶液（**注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠**），室温（15~25℃）孵育 30 sec，用移液枪小心去除上清液。
5. 重复步骤 4 一次。用 10 μl 移液枪除去剩余的乙醇溶液。
6. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 2 ~ 5 min 至无乙醇溶液残留。
   - 无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，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。
7. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 22 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液枪吸打混匀磁珠，室温（15~25℃）孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。

8. 孵育结束后，将 PCR 管置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 2 min）。
9. 小心吸取 20 μl 上清至新的 PCR 管中（**勿吸到磁珠**），即可获得构建的文库产物，-20℃保存。由于文库的终浓度较低（一般大于 2 ng/μl），建议使用低吸附的 1.5 ml 离心管保存。

   **【注意：通常情况下，PCR2 后只需要纯化 1 次，但是对于 <1 ng RNA（如 100 pg、10 pg）和≤10 Cells，如果文库浓度较低，可进行后续步骤 10 ~ 20，再次纯化，以减少文库体积，提高文库浓度。】**
10. 取 24 μl *MagSpherix* DNA Beads 加入至 20 μl 纯化产物中（按照磁珠：样品 = 1.2：1 比例添加）。轻柔涡旋混匀，短暂离心。
11. 将磁珠/ DNA 文库在室温（15~25℃）下孵育 5min，使文库与磁珠结合。
12. 将 PCR 管放在磁力架上至少 2 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。用移液枪小心吸弃上清液，注意不要打散磁珠。
13. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μl 80%乙醇溶液（**注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠**），室温（15~25℃）孵育 30 sec，用移液枪小心去除上清液。
14. 重复步骤 14 一次。用 10 μl 移液枪除去剩余的乙醇溶液。
15. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 2 ~ 5 min 至无乙醇溶液残留。
    - 无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，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。
16. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 12 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，轻柔涡旋混匀，短暂离心，室温（15~25℃）孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
17. 孵育结束后，将 PCR 管置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 2 min）。
18. 小心吸取 10 μl 上清至新的 PCR 管中（勿吸到磁珠），即可获得构建的文库产物，-20℃保存。由于文库的终浓度较低（一般大于 2 ng/μl），建议使用低吸附的 1.5 ml 离心管保存。

## F. 文库质量检测

1. 取 2 μl 纯化后的文库产物，使用 Qubit 检测文库浓度【如 *AcuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit (Code No. AG12549 / AG12550)或其他等效产品】，具体操作请参照说明书。

2. 取 1 μl 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，会产生浓度大于 2 ng/μl 的文库产物，片段大小分布于 200 ~ 1000 bp，峰值位于 300 ~ 450 bp。阴性对照无扩增产物。

## ➢ 产品注意事项

### 1. 样品片段化

- ❖ 根据不同的 RNA 质量，选择合适的片段化方法。如果 RNA 样本降解比较严重时，可适当缩短片段化时间；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。

### 2. 磁珠纯化（DNA 文库纯化）

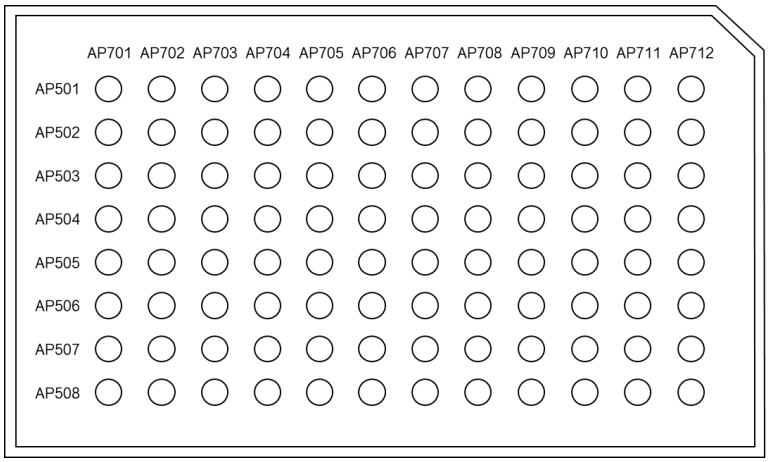
- ❖ 在使用前，应该先将磁珠恢复至室温（15~25℃），避免产物回收率下降。
- ❖ 磁珠每次使用前应先充分振荡混匀。
- ❖ 纯化过程中使用的 80%乙醇溶液，现配现用，避免长时间保存而导致乙醇溶液挥发，降低乙醇溶液浓度。
- ❖ 乙醇溶液清洗完成后，应使乙醇溶液充分挥发，避免影响产物的回收率。
- ❖ 洗脱完毕，吸取上清时，应小心吸取洗脱液上清，避免吸入磁珠，以免对后续实验造成影响。

### 3. 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。
- ❖ 扩增循环数过高，可能会因为 PCR 扩增的偏好性导致 RNA 文库质量下降。
- ❖ 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，可在 PCR2 增加 1 ~ 2 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 和 B）。

## ➢ 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：




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

| 用途 | 品名 | AG12505（12 rxns） | AG12506（48 rxns） | AG12507（96 rxns） | 管盖颜色 |
|---|---|---|---|---|---|
| i5 Index Primer（AP501-AP508） | AP501 | 12 μl | 12 μl | 12 μl | 绿 |
| | AP502 | - | 12 μl | 12 μl | 绿 |
| | AP503 | - | 12 μl | 12 μl | 绿 |
| | AP504 | - | 12 μl | 12 μl | 绿 |
| | AP505 | - | - | 12 μl | 绿 |
| | AP506 | - | - | 12 μl | 绿 |
| | AP507 | - | - | 12 μl | 绿 |
| | AP508 | - | - | 12 μl | 绿 |
| i7 Index Primer（AP701-AP712） | AP701 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP702 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP703 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP704 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP705 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP706 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP707 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP708 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP709 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP710 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP711 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |
| | AP712 | 5 μl | 5 μl | 8 μl | 红 |

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

**i5 Index Primer**

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

**i7 Index Primer**

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 | GTACTGAC | GTACTGAC | 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 | GCGCATTA | TAATGCGC | |
| | AP709 | CATAGCCG | CGGCTATG | |
| | AP710 | TTCGCGGA | TCCGCGAA | |
| | AP711 | GCGCGAGA | TCTCGCGC | |
| | AP712 | CTATCGCT | AGCGATAG | |