Version 1

Code No. AG12711

AG12712

AG12713

AccuNext 单细胞/微量一步法 cDNA 合成及扩增试剂盒

AccuNext Single Cell / Low Input One Step cDNA Synthesis & Amplification kit

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** 4
- **实验前注意事项** 4
- **实验前准备** 5
- **操作方法** 6
  - A. 一步法 RT-PCR 反应 6
  - B. DNA 扩增产物纯化 8
  - C. DNA 扩增产物质量检测 9
  - D. 文库制备 9
- **实验例** 9
- **产品注意事项** 11

➢ 产品概述

本产品是在 *AccuNext* 单细胞/微量 cDNA 合成及扩增试剂盒 II（Code No. AG12575）基础上优化的一步法 RT-PCR 试剂盒，将反转录与 PCR 扩增为一管式反应，减少中间开盖、转移和分步配液步骤，降低污染风险并提高自动化兼容性。本产品采用耐热、延伸能力强的 *Evo Super M-MLV* 反转录酶及精心优化的缓冲体系，30 min 完成反转录，同时扩增体系也进行了优化，避免了 PCR 扩增的偏好性，且整个文库产量高及基因（包括低表达基因）检出量高。

本产品适用于无细胞壁的真核生物细胞（如哺乳动物细胞）或带有 Poly（A）尾的 RNA 全长 cDNA 合成与扩增。本产品包含进行细胞裂解、RT-PCR 所需的所有组分，既可直接以 1～1000 个细胞为模板，也可以 10 pg～1 μg 总 RNA 为模板，使用带特定接头的 Oligo (dT) Primer 进行反转录；利用反转录酶的末端转移酶活性，在反转录酶到达 mRNA 5' 端时，在 cDNA 的 3' 端引入几个不依赖于模板的碱基，通过 5' Template Switching Oligo（TSO）继续合成带有特定接头的 cDNA；利用添加在第一链 cDNA 两端接头序列进行后续的 PCR 扩增，确保了最终的 cDNA 文库包含 mRNA 的 5' 末端，保持 mRNA 转录本的原始表达信息，避免 3' 端的偏好性。

通过对全长 cDNA 文库进行 NGS 测序，可进行基因表达差异分析、可变剪接、融合基因等遗传调控信息分析。本产品能兼容 1～12 μl 的样本体积，可获得 2～40 ng 的 cDNA 扩增产物。

本产品的反应体系经过了精心优化，请使用本产品包含的试剂进行细胞裂解、RT-PCR 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。

➢ 产品组成

Package 2-1 组分如下（-80℃ 保存）：

组分名称	AG12711 （4 rxns）	AG12712 （12 rxns）	AG12713 （48 rxns）
5' Template Switching Oligo	4 μl	12 μl	48 μl

Package 2-2 组分如下（-20℃ 保存）：

组分名称	AG12711 （4 rxns）	AG12712 （12 rxns）	AG12713 （48 rxns）
7X Cell Lysis Buffer[*1]	8 μl	24 μl	96 μl
AccuNext One Step Enzyme Mix	8 μl	24 μl	96 μl
2X *AccuNext* One-Step Reaction Solution	100 μl	300 μl	1.2 ml
Nuclease free water	1 ml	1 ml	1 ml

*1：包含 3' Oligo (dT) Primer。

➢ 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（避免反复冻融）

Package 2-2 干冰运输或-20℃冰袋运输

➢ 实验原理及流程

以无细胞壁的真核生物细胞（如哺乳动物细胞）或带有 Poly（A）尾的 RNA 为模板，用带有特定接头的 3' Oligo (dT) Primer 进行反转录，利用反转录酶的末端转移酶活性，当反转录酶到达 mRNA 5' 端时，在 cDNA 的 3' 端引入几个不依赖于模板的碱基，通过 5' Template Switching Oligo（TSO）继续合成带有特定接头的 cDNA。以 cDNA 两端引入的接头序列为引物结合位点，进行 PCR 扩增获得全长 cDNA 产物。如图 1 所示：

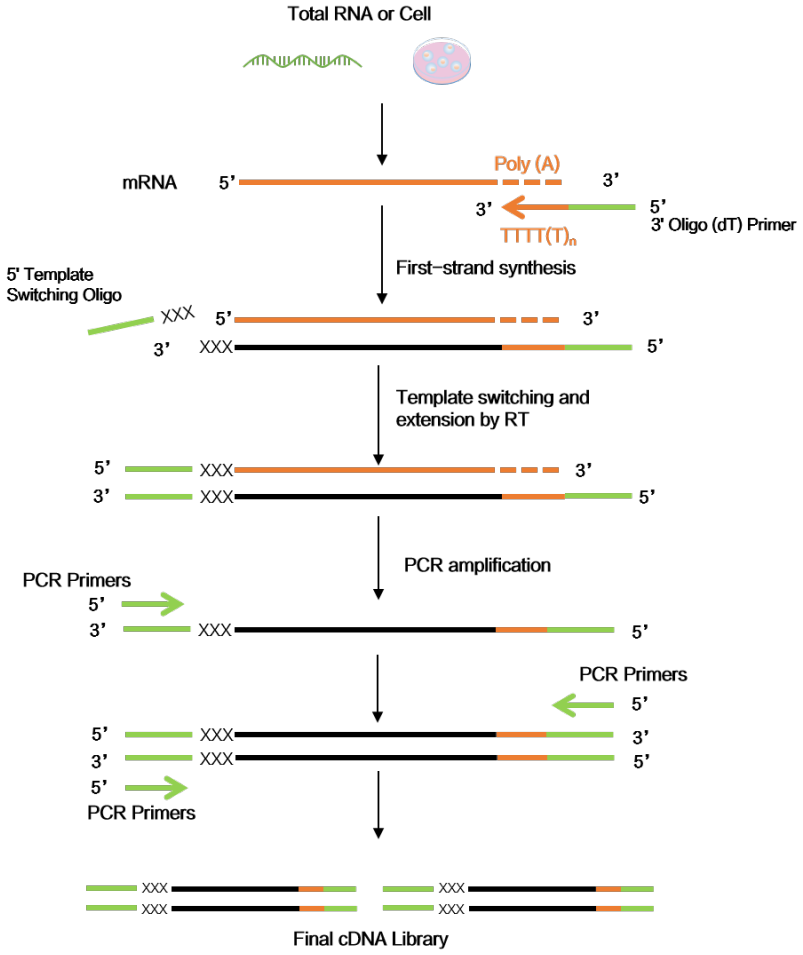


图 1. 全长 cDNA 合成原理

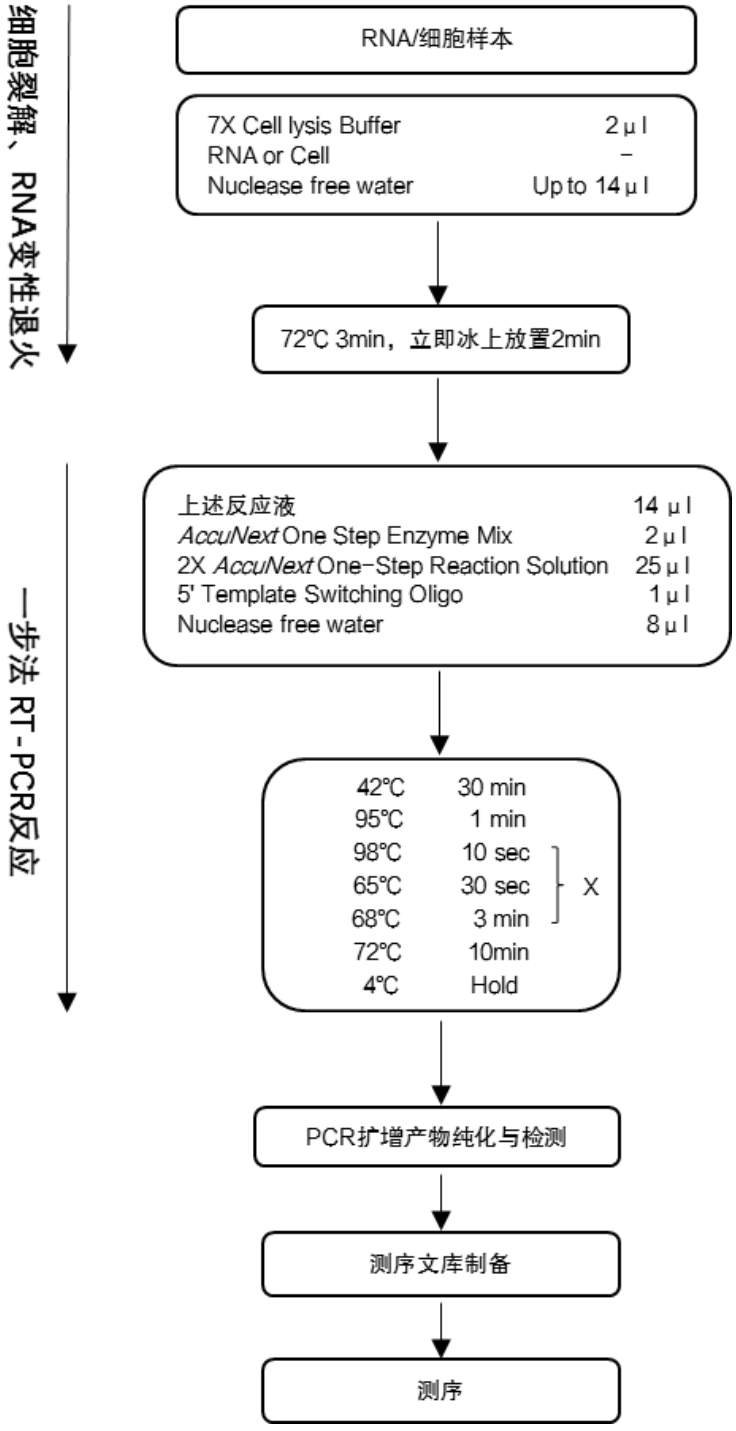

细胞裂解、RNA变性退火
一步法 RT-PCR反应
RNA/细胞样本
7X Cell lysis Buffer 2μl
RNA or Cell –
Nuclease free water Up to 14μl
72℃ 3min，立即冰上放置2min
上述反应液 14 μl
AccuNext One Step Enzyme Mix 2μl
2X AccuNext One-Step Reaction Solution 25μl
5' Template Switching Oligo 1μl
Nuclease free water 8μl
42℃ 30 min
95℃ 1 min
98℃ 10 sec
65℃ 30 sec
68℃ 3 min
X
72℃ 10min
4℃ Hold
PCR扩增产物纯化与检测
测序文库制备
测序

图 2. 实验操作流程

➢ 产品优势

1. 操作简便：一步法 RT-PCR，反转录与 PCR 扩增为一管式反应，减少中间开盖、转移和分步配液步骤，降低污染风险并提高自动化兼容性。
2. 高效 cDNA 合成体系：采用新型耐热、延伸能力强的 *Evo Super* M-MLV 反转录酶，反转录时间只需 30 min，在保证 cDNA 产量和全长覆盖的同时显著减少实验操作时间。
3. 样本兼容性强：支持 1～1000 个细胞或 10 pg～1μg 总 RNA，兼顾单细胞/微量样本与较高输入量 RNA。
4. 精心优化的扩增体系，降低 PCR 扩增偏好性，且整个文库产量高及基因（包括低表达基因)检出量高。
5. 通过双端引物扩增全长 cDNA，可获得全转录组信息，避免了 5' 端和 3' 端偏好性。

➢ 实验前注意事项

1. 防污染要求

- ❖ 由于本产品检测灵敏度高，要避免与其他实验的交叉污染。建议在两个物理隔离的实验室进行实验，一个 PCR 洁净室（建议设置正向气流）和一个普通实验室，并对实验区域进行定期清洁。
- ❖ 建议试剂配制在 PCR 洁净室内进行操作，PCR 扩增、PCR 扩增产物纯化与 PCR 扩增产物质量检测在普通实验室进行操作。
- ❖ 本产品是由 RNA 制备 cDNA，进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染，需要使用无菌无酶的器具，操作过程中要避免说话，且需要穿实验服，戴一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 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。
- ❖ 实验过程中小心轻柔地打开和关闭管盖，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。

2. 细胞样本要求

- ❖ 本产品中配有的细胞裂解液不能有效裂解细胞壁。若是样本为带有细胞壁的细胞，如植物细胞、真菌等，建议先去除细胞壁或使用提取后的 RNA 为模板。哺乳动物细胞可直接使用本产品中的裂解液进行裂解。
- ❖ 本产品不适用于经甲醛、丙酮等固定过的细胞。
- ❖ 由于本产品是以 Oligo dT 为引物进行反转录，因此不适用于不含 Poly A 尾的原核细胞。
- ❖ 细胞样本收集后，建议确认细胞活力，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，建议实验前用不含 Mg^{2+}、Ca^{2+} 等的 1X PBS 洗涤重悬细胞（可多洗几次），反应体系中培养基等液体加入体积越少越好。

3. **RNA 样本要求**

- 使用完整性高（RIN≥8）且纯度较高的 RNA。不完整的 RNA 会影响 cDNA 产量和长度分布。建议实验前对 RNA 的完整性进行检测，可以使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit（Agilent，Code No. 5067-1513）评价 RNA 的完整性。
- 由于本产品是以 Oligo dT 为引物进行反转录，不适用于降解的 RNA，如从 FFPE 提取的 RNA。

4. **扩增循环数的选择**

- 不同类型及不同用量的细胞或 RNA 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 293T Cell 及 293T Total RNA 摸索所得，可用于参考。

表 1. PCR 循环数推荐表

RNA 起始	Cell 起始	循环数
1 μg	-	3
100 ng	-	4 ~ 7
10 ng	1000 Cells	7 ~ 10
1 ng	100 Cells	10 ~ 13
100 pg	10 Cells	14 ~ 17
10 pg	1 Cell	17 ~ 20

➢ 实验前准备

1. **试剂 & 耗材：**

1) RNA 评价：Agilent RNA 6000 Pico Kit（Agilent，Code No. 5067-1513）或其他等效产品。
2) 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）】。
3) DNA 评价：High Sensitivity DNA Kit（Agilent，Code No. 5067-4626）及本公司产品 *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）】。
4) DNA 建库试剂盒：本公司产品 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，5 ng 模板量）（Code No. AG12522、AG12523）、*AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，1 ng 模板量）（Code No. AG12524、AG12525）或其他等效产品。
5) 其他材料：低吸附 tube 管，80%乙醇，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管。

2. 仪器：

1) 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. 一步法 RT-PCR 反应

1. 在冰上解冻所需的所有试剂

❖ 将所需用的试剂冰上融化后，短暂离心，混匀后放置在冰上备用。其中 5' Template Switching Oligo、*AccuNext* One Step Enzyme Mix 轻弹管壁混匀或用移液器混匀，请勿涡旋。其余试剂可轻柔涡旋混匀。

2. 细胞裂解及 RNA 变性、退火

1) 按照下表在冰上配制反应体系，配制好后用移液器轻柔混匀，并短暂离心收集，混匀时避免产生气泡，立即按照**步骤 2）**进行。

组分	体积
7X Cell Lysis Buffer	2 μl
RNA[*a] or 细胞[*b]	–
Nuclease free water	up to 14 μl

*a：推荐 RNA 模板加入量为 10 pg ~ 1 μg，如果样本量不受限制，建议在推荐范围内用较高的模板量。

*b：**若为 PBS 重悬细胞：**建议加入的细胞液不超过 5 μl；由于培养基及其他组分对反转录及 PCR 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，反应时加入体积越少越好。细胞数量不要超过 1000 Cells，过多的细胞会对反应产生抑制。

若用流式细胞仪分选细胞：可将细胞直接分选至上述 14 μl 反应液中，轻柔涡旋混匀。(建议立即进行后续实验，避免 RNA 降解；若不立即进行后续步骤，此步骤制备的溶液可于 −80℃ 最长**保存一个月**，使用时，再按照**步骤 2）**操作即可。

2) 按照下述程序，将样品放入提前预热的 PCR 仪中进行变性、退火

温度	时间
72℃	3 min
4℃	Hold

3) 72℃ 孵育 3 min 结束，待 PCR 仪温度降至 4℃ 后，立即将样品置于冰上 2 min。需立即进行下述步骤 **<3. RT-PCR 反应>**。

注：在孵育过程中，可按照步骤 **<3. RT-PCR 反应 >**，先制备好 RT-PCR Master Mix。

3. RT-PCR 反应

1) 配制 RT-PCR Master Mix：

组分	体积	
上述步骤 2 变性、退火后反应液	14 μl	
AccuNext One Step Enzyme Mix	2 μl	*c
2X *AccuNext* One-Step Reaction Solution	25 μl	
5' Template Switching Oligo	1 μl	
Nuclease free water	8 μl	
Total	50 μl	

*c：可将这 4 个组分先配制成 mix，轻柔涡旋混匀后，取 36 μl mix 加入至上述步骤 **2. 细胞裂解及 RNA 变性、退火反应液中**，用移液器或振荡器轻柔混匀并离心，立即进行后续步骤。

2) 在 PCR 仪中运行以下程序（建议在配制 RT-PCR Master Mix 前，提前设置反应程序）

步骤	温度	时间	循环数
反转录	42℃	30 min	1
预变性	95℃	1 min	1
变性	98℃	10 sec	X*d
退火	65℃	30 sec	
延伸	68℃	3 min	
最终延伸	72℃	10 min	1
保存	4℃	Hold	-

*d：**下表是根据 293T Cell 及 293T Total RNA 摸索所得的 PCR 扩增循环数推荐表，可用于参考**。不同的类型及不同用量的细胞或 RNA 基因表达情况不同，因此，建议摸索合适的循环数，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。扩增循环数过高，可能会因为 PCR 扩增的偏好性导致 DNA 文库质量下降；扩增循环数过低，会导致 DNA 产量不足，影响后续的测序文库制备。

表 1. PCR 循环数推荐表

RNA 起始	Cell 起始	循环数
1 μg	-	3
100 ng	-	4 ~ 7
10 ng	1000 Cells	7 ~ 10
1 ng	100 Cells	10 ~ 13
100 pg	10 Cells	14 ~ 17
10 pg	1 Cell	17 ~ 20

1. 反应结束后将产物放置于冰上，准备进行 DNA 纯化步骤（为避免 DNA 降解，建议尽快进行后续步骤）。

安全暂停点：样本可在 -20℃ 保存过夜，长期保存建议放于 -80℃。

B. DNA 扩增产物纯化

使用磁珠纯化 PCR 产物。以 *MagSpherix* DNA Beads（Code No. AG12546、AG12547、AG12548）纯化为例（如使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No.A63881)，可使用相同用量磁珠），步骤如下：

实验前准备：

- 首次使用，可根据实验情况将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4℃。
- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇，每个样品需要 400 μl。

操作步骤：

1. 将磁珠充分涡旋混匀后置于室温恢复 30 min，放置结束后再次涡旋混匀。
2. 添加 50 μl 的已恢复室温的磁珠至上述 50 μl PCR 扩增产物中（按照磁珠：样品的比例为 1：1），涡旋充分混匀，短暂离心。
3. 将磁珠 / DNA 混合物在室温下孵育 10 分钟，让 DNA 与磁珠结合。
4. 将样品放在磁力架上至少 5 分钟，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。
5. 保持 PCR 管始终处在磁力架上，加入 200 μl 新鲜配制的 80% 乙醇（**注意加入乙醇时不要影响干扰磁珠**），室温孵育 30 sec，小心移除上清。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 5 ~ 10 min 至无乙醇残留[*e]。

   *e：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。
8. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠，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，分离磁珠和液体直到溶液澄清 (约 5 min)。
10. 小心吸取 15 μl 上清转移到新的低吸附 tube 管中（**勿吸到磁珠**），-20℃保存。（为避免 DNA 降解，建议尽快进行文库构建）。

安全暂停点：样本可在 -20℃ 保存过夜，长期保存建议放于 -80℃。

C. DNA 扩增产物质量检测

1. 取 2 μl 纯化后的 DNA 扩增产物，使用 Qubit 4 Fluorometer 和 *AcuQ* 1X dsDNA HS Assay Kit（Code No. AG12549、AG12550）检测 PCR 产物浓度。具体操作请参照上述产品的说明书。
2. 取 1 μl 纯化后的 DNA 扩增产物，使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 和 Agilent High Sensitivity DNA Kit（Agilent，Code No. 5067-4626）进行验证。具体操作请参照上述产品的说明书。
3. 根据模板加入量的不同，成功的实验反应会产生 2 ~ 40 ng 的扩增产物，片段大小分布于 400 ~ 10000 bp，峰值位于 1000 ~ 2000 bp 左右。阴性对照无扩增产物。

D. 文库制备

1. 文库制备可根据测序平台选择合适的文库构建试剂盒，如选择 illumina 平台测序，推荐使用本公司产品 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，5 ng 模板量）(Code No. AG12522、AG12523)、*AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，1 ng 模板量）(Code No. AG12524、AG12525) 或同类产品制备文库。

➢ 实验例

1. 采用本产品进行 293T Total RNA 全长 cDNA 扩增，RNA 模板添加量为 10 pg，PCR 扩增循环数为 18。结果如下：图 3. A 显示了 cDNA 合成和扩增后的纯化产物，分布均匀。图 3. B 显示无模板的阴性对照中没有产物。

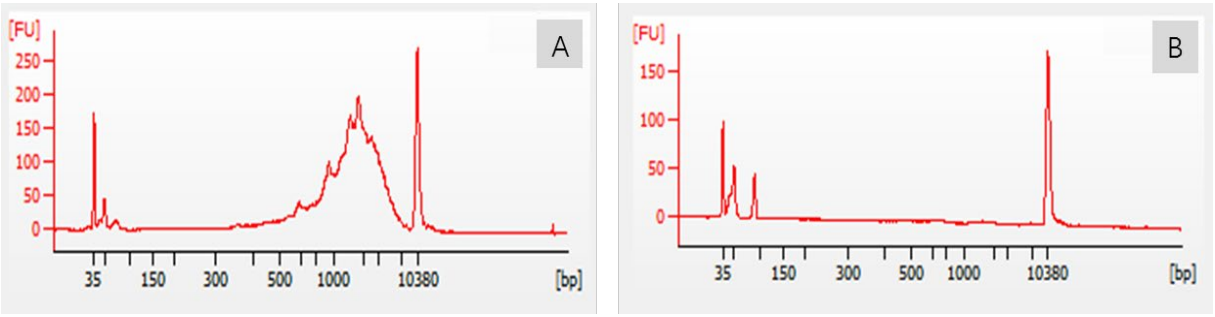


图 3. Agilent 2100 生物分析仪检测结果

2. 用本产品分别对 10pg ~ 1μg 293T Cell RNA 进行一步法 RT-PCR 扩增，然后以 PCR 产物构建 DNA 文库，使用 Illumina NovaSeq 6000 系统测序，数据如下：

Sequencing Alignment Metrics for RNA					
RNA source	293T cell RNA				
Input amount	10pg	100pg	100ng	500ng	1ug
Yield concentration（ng/ul）	1.08	1.34	2.64	4.79	10.1
Total number of reads(millions)	49.90	84.10	63.89	51.95	50.50
Q30 bases rate（%）	96.00	96.00	96.00	95.00	94.50
Total gene number(FPKM>0.1)	13,658	23,414	26,069	26,763	27,463
Total gene number(FPKM>1)	11,164	13,387	14,139	14,272	14,271
Percentage of reads（%）					
Mapped to genome（%）	96.54	96.81	96.50	95.08	95.18
Mapped uniquely to genome（%）	86.97	87.14	87.16	86.85	86.81
exon（%）	88.47	88.05	84.61	79.41	79.62
intron（%）	10.84	11.26	14.50	19.40	19.21
Intergenic（%）	0.69	0.69	0.89	1.18	1.17
GC（%）	48.91	48.69	48.83	46.65	46.90

表 3. 10 pg ~ 1ug 的 293T Cell total RNA 主要 mRNA-Seq 数据

3. 以 1 ~ 1000 个 293T Cell 为模板，用本产品进行一步法 RT-PCR 扩增，然后以 PCR 产物构建 DNA 文库，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 4：A 为 1000 cells、B 为 100 cells、C 为 10 cells、D 为 1 cell）。

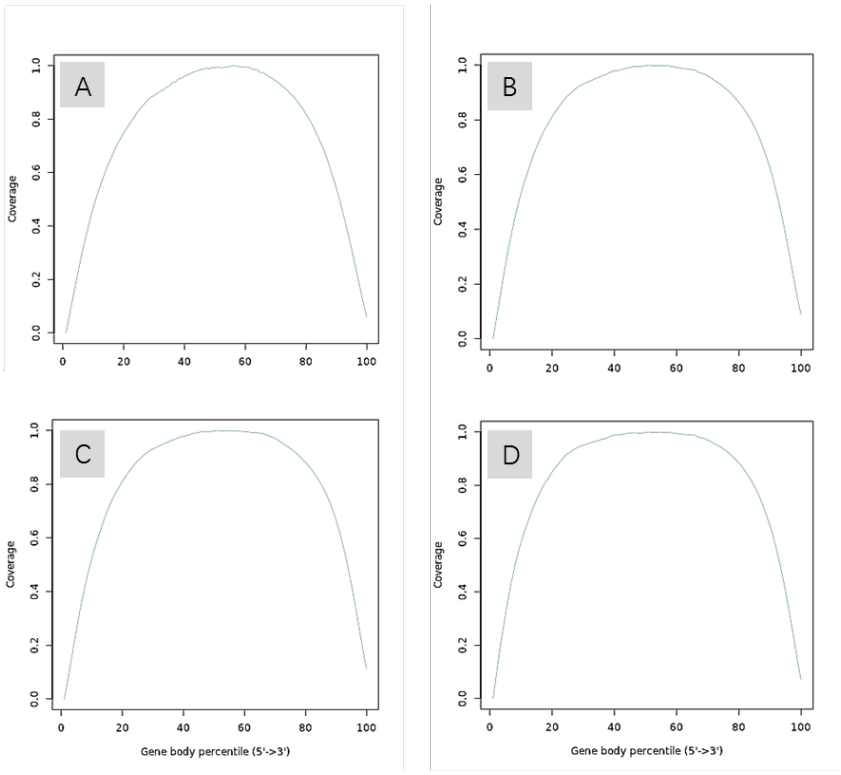


图 4. 测序数据在基因上的分布

➢ 产品注意事项

1. **防污染措施：**
   - ❖ 本产品是由 RNA 制备 cDNA，进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染，需要使用无菌无酶的器具，操作过程中要避免说话，且需要穿实验服，戴一次性口罩和手套等，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。建议在两个物理隔离的实验室进行实验，一个 PCR 洁净室（PCR 洁净室建议设置正向气流）和一个普通实验室，请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清洁。
   - ❖ 建议试剂配制在 PCR 洁净室内进行操作，PCR 扩增、PCR 扩增产物纯化与 PCR 扩增产物质量检测在普通实验室进行操作。
   - ❖ 本产品中的组分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，推荐使用带滤芯的枪头，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。

2. **样品准备：**
   - ❖ **细胞样品准备**
     - 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 产量会有差异；为获得最佳的 DNA 产量，建议 PCR 反应时优化扩增循环数。
     - 细胞样品可使用台盼蓝或其他方式鉴定细胞活性，死亡的细胞会发生明显的 RNA 降解并导致反应失败。
     - 细胞培养基或样品中其他组分可能会对反应产生抑制，建议尽量减少不必要的样品体积，使用不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 1X PBS 缓冲液洗涤并重悬细胞。实验前，可测试培养基对反应是否有抑制作用：将培养基加入至 Control RNA 中检测培养基是否影响 cDNA 合成。另外，在取样时应尽量减少细胞样品体积，建议体积不超过 5 μl。
     - 本产品能以 1~1000 个细胞为起始模板，细胞过多会对反应有抑制作用。细胞种类不同细胞输入数可能会有变化，若出现抑制作用，建议可适当的减少细胞数。
     - 细胞裂解后，如不进行后续反应，可在-80℃保存一个月，尽快使用，避免长时间放置导致 RNA 降解。
   - ❖ **RNA 样品准备**
     - 使用纯度较高的 RNA 进行反应，防止残留的蛋白质、有机溶剂和盐等影响酶的活性，降低反应性能。

- 对于纯化的 RNA 样品，进行反应操作前可使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit 评价 RNA 完整性。降解的 RNA 作为起始模板会影响 cDNA 的产量和产物长度分布，可能导致反应失败。

3. **PCR 扩增循环：**

❖ **扩增循环数建议**

- 选择最佳的循环数，确保仍然在扩增的指数期。在 PCR 产物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 DNA 文库质量下降。
- 扩增循环数过低，会导致 DNA 产量不足，影响后续的测序文库制备。
- 建议在本说明书推荐的循环数基础上，增加或减少 2 ~ 3 个循环进行测试（如，1 Cell 分别用 15、17 和 19 个循环)。

4. **PCR 产物纯化：**

❖ 在使用前，应该先将磁珠恢复至室温，否则会导致 DNA 回收率下降。

❖ 磁珠每次使用前应先充分振荡混匀。

❖ 磁珠漂洗使用 80% 乙醇，现配现用。

❖ 漂洗结束后，应使乙醇充分挥发，否则会影响 PCR 扩增产物的回收率。

❖ 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，或干扰 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 检测。

5. **文库构建：**

❖ **文库构建**

- 根据后续测序平台选择合适的文库构建试剂盒，如选用 Illumina 平台，推荐使用本公司产品 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2 （Illumina，5 ng 模板量）（Code No. AG12522、AG12523）或 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，1 ng 模板量）（Code No. AG12524、AG12525）制备文库。

❖ **测序数据分析建议**

- 测序文库构建时，如果使用酶切法或超声打断法在双链 cDNA 的两端添加 Adapters，Reads 2 的测序结果会包含 3' Oligo (dT) Primer 的 dT30 序列。测序后，接头序列会出现在 Read 2 的前 25 个循环中，紧接着是 dT30 序列，出现碱基不平衡的情况，如下图 5。
- 如果为了避免测序到接头序列，可使用本公司产品 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，5 ng 模板量）（Code No. AG12522、AG12523）或 *AccuNext* 快速 DNA 文库制备试剂盒 Ver.2（Illumina，1 ng 模板量）（Code No. AG12524、AG12525）制备文库。
- 如果 Read 2 已经测序到接头序列，在比对到转录组之前，可从 Reads 中修剪接

头序列。

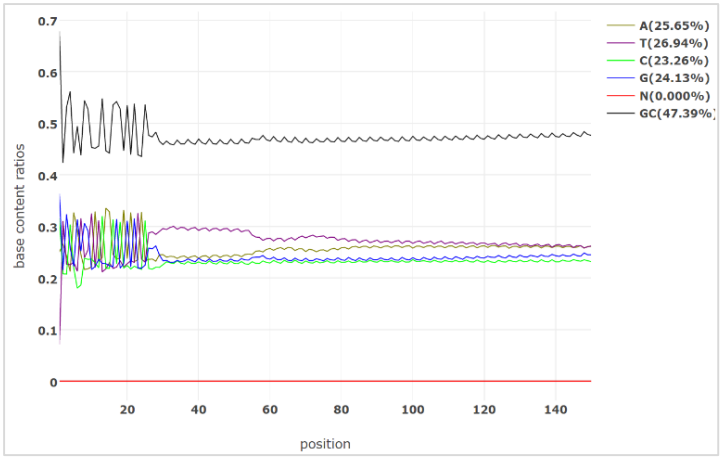


图 5. Read 2 碱基分布情况