



RNA 文库制备试剂盒说明书

货号：RD3600202

【产品名称】

通用名称：RNA 文库制备试剂盒

【商品名称】

RNA 建库试剂盒（MGI）

【预期用途】

本产品是华大智造（MGI）高通量测序平台开发的 RNA 文库构建试剂盒套装，包括：全长 cDNA 合成试剂盒、DNA 文库制备试剂盒、双分子标签试剂盒、磁珠纯化试剂盒。与基因测序用试剂盒及芯片结合测序系统一起使用，用于组织样本中提取的基因组 RNA 文库的构建，产生用于高通量测序的文库。

【检验原理】

本产品采用高质量的片段化酶，将 DNA 片段化、末端修复及末端 dA 尾添加合并为一步，最终得到 5'末端含磷酸基团且 3'末端带有 dA 突出的 DNA 产物；采用高扩增效率的高保真酶，显著地提高了文库的质量及产量，从而获得可用于临床体外检测使用的高质量文库。

【主要组成成分】

试剂盒种类	组分信息	规格	数量
全长 cDNA 合成试剂盒 货号：RD3620101 规格：96T	Random Primer	96μL/管	1 管
	1st Reaction Buffer	768μL/管	1 管
	1st Strand Enzyme Mix	192μL/管	1 管
	2nd Reaction Buffer	672μL/管	1 管
	2nd Strand Enzyme Mix	288μL/管	1 管
DNA 文库制备试剂盒 (打断连接法) 货号：RD3610101 规格：96T	末端修复反应液	960μl/管	1 管
	增效剂	720μl/管	4 管
	T4 DNA 连接酶	480μl/管	1 管
	文库扩增反应液	600μl/管	4 管
双分子标签接头试剂盒 货号：RD3630201	序列接头	480μl/管	2 管
	UDB-P201~UDB-P208	60μl/管	/

规格: 96T	UDB-P101~UDB-P112	40 μ l/管	
纯化磁珠试剂盒 货号: RD3640101 规格: 20mL	纯化磁珠	20mL/管	1 管

【储存条件及有效期】

全长 cDNA 合成试剂盒

- 储存温度: -30°C~-15°C
- 有效期: 见试剂盒标签

DNA 文库制备试剂盒 (打断连接法)

- 储存温度: -30°C~-15°C
- 有效期: 见试剂盒标签

双分子标签接头试剂盒

- 储存温度: -30°C~-15°C
- 有效期: 见试剂盒标签

纯化磁珠试剂盒

- 储存温度: 4°C~8°C
- 有效期: 见试剂盒标签

【适用仪器】

适用于华大智造二代测序平台。

【样本要求】

1. 样本要求

适用 500pg-1 μ g 的基因组 DNA、全长 cDNA 等样本, 推荐使用完整度较好, A260/A280=1.8-2.0 的高质量 DNA 进行打断。

2. DNA 处理

2.1 DNA 打断

请将 DNA 打断至所需主带范围, 对于完整基因组 DNA, 酶切时间参考表 1

表 1 常规基因组 DNA 片段化时间选择表

插入片段主峰大小	片段化时间	优化范围
600bp	5min	3~8min
350bp	8min	5~12min
250bp	10min	8~15min
200bp	13min	10~20min
150bp	20min	12~25min

2.2 样本 DNA 接头连接

接头的质量和使用浓度直接影响连接效率及文库产量。接头用量过高可能会产生较多接头 Dimer; 用量较低可能会影响连接效率及文库产量。表 2 列举了使用本试剂盒, 不同 DNA 投入量推荐的接头使用量。

表 2 500pg~1μg DNA 投入推荐的接头使用量

DNA 投入量	接头: 投入 DNA 摩尔比	DNA 投入量	接头: 投入 DNA 摩尔比
1μg	10:1	50 ng	100:1
500ng	20:1	25 ng	200:1
250 ng	40:1	1 ng	200:1
100ng	100:1	500pg	400:1

【注】: 投入 DNA 摩尔数(pmol)≈ 投入 DNA 质量(ng)/ [0.66 × 投入 DNA 平均长度(bp)]。

2.3 样本 DNA 文库扩增

文库扩增步骤需要严格控制扩增循环数。循环数不足, 将导致文库产量低; 循环数过多, 又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。表 3 列举了使用本试剂盒, 获得 1μg 文库的推荐循环数。

表 3 500 pg-1 μg Input DNA 获得 1 μg 产物扩增循环数推荐表

Input DNA	循环数
1 μg	3 - 5
500 ng	4 - 6
200 ng	5 - 7
50 ng	7 - 9

10 ng	10 - 12
1 ng	13 - 15
500 pg	14 - 16

注：若建库过程中需要进行长度分选，则参照较高循环数进行文库扩增。

【检验方法】

1 RNA变性

1.1 将 Random Primer 室温解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。按照下表配置反应液：

表 4 RNA 预变性反应体系

试剂名称	体积 (μL)
Random Primer	1
RNA	14
Total Volume	15

1.2 使用移液器轻轻吹打或低速震荡混匀，短暂离心。

1.3 将上述 PCR 反应管置于 PCR 仪中，按照表 5 所示反应程序，进行 RNA 变性

表 5 RNA 预变性反应程序

温度	时间
热盖 75°C	On
70°C	5min
立即置于冰上	3min

2 第一链 cDNA 的合成 (1st Strand Synthesis)

2.1 将第一链合成试剂从-20°C取出，室温解冻，颠倒混匀后瞬离，备用。

2.2 根据下表配置第一链合成反应体系

表 6 第一链 cDNA 合成反应体系

试剂	体积 (μL)
变性的 RNA	15
1st Reaction Buffer	8
1st Strand Enzyme	2
Total	25

2.3 使用移液器轻轻吹打或低速震荡混匀，短暂离心。

2.4 将上述 PCR 反应管置于 PCR 仪中，按照表 7 所示反应程序，进行第一链合成反应。

表 7 第一链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
25°C	5min
42°C	30min
85°C	5min
4°C	Hold

3 第二链 cDNA 的合成 (2nd Strand Synthesis)

3.1 将第二链合成试剂从-20°C 取出，解冻后振荡混匀，短暂离心备用。

3.2 根据下表配置第二链 cDNA 的合成反应体系

表 8 第二链 cDNA 合成反应体系

试剂	体积 (μL)
1st Strand cDNA	25
2nd Reaction Buffer	7
2nd Strand Enzyme	3
Total	35

3.3 使用移液器轻轻吹打或低速震荡混匀，短暂离心。

3.4 将上述PCR反应管置于PCR仪中，按表9所示反应程序，进行第二链 cDNA 合成反应。

表 9 第二链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖	Off
16°C	5 min
4°C	Hold

3.5 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底，吸取全部反应液转移至新的 1.5mL 离心管中。

4 二链产物纯化

4.1 提前 30 min 取出分选磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

4.2 向 cDNA 扩增产物内加入 60μL 分选磁珠，吹打混匀，室温孵育 5min。

4.3 将离心管短暂离心后置于磁力架。等待溶液澄清（约 3-5min），小心移除上清。

4.4 离心管仍置于磁力架上，每管加入 200 μl 新鲜配制的 80%乙醇。静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。

- 4.5 重复 4.4 步骤一次，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 4.6 室温 2-5min 使磁珠干燥，以磁珠表面不反光，磁珠表面无裂纹为准。
- 4.7 加入 21 μ l RNase-Free ddH₂O，涡旋混匀，室温孵育 5min。
- 4.8 短暂离心，将离心管置于磁力架 2min，直至溶液澄清，小心移取 20 μ l 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

➤ 停止点：cDNA 纯化产物可放置-20℃冰箱储存。

5. DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加

- 5.1 根据样本浓度，取适量样本（推荐 50ng）至新的 0.2mLPCR 管中，于冰上配置反应体系（见表 10）

表 10 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加反应体系

名称	体积 (μ L)
Input DNA	X
RNase-free ddH ₂ O	50-X
末端修复反应液	10
Total	60

- 5.2 使用移液器轻轻吹打或低速震荡混匀，短暂离心。
- 5.3 程序设置：设置 PCR 仪，条件如下表：设置热盖为 105℃，反应体系为 60 μ L。

表 11 DNA 片段化/末端修复/dA 尾添加反应程序

温度	时间
热盖 105℃	On
4℃	1min*
30℃	3-20min**
72℃	20min
4℃	Hold

【注】：*DNA 片段化过程为有效控制片段化效果，避免过度酶切，反应程序可预先设置 4℃，待模块温度降至 4℃ 时，将 PCR 管放入 PCR 仪即可。

**对于完整的基因组 DNA，酶切时间参考表 1；

- 5.4 将反应体系放进 PCR 仪运行程序。
- 5.5 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底。

- **【注意】**：不建议在此处停止，请继续步骤 6 接头连接。如果必须停止，末端修复产物可以放在-20℃冰箱过夜，但产量可能会降低 20%左右。

6. 接头连接

6.1 在冰盒上，根据表 12 试剂顺序添加接头连接反应试剂至上述 PCR 管内

表 12 接头连接反应体系

名称	体积 (μL)
dA-tailed DNA	60
增效剂	30*
序列接头	5**
T4 DNA 连接酶	5
Total	100

【注】：*增效剂比较粘稠，请上下颠倒、振荡，充分混匀并瞬时离心后使用。

**序列接头的使用量参照表 2，根据基因组 DNA 用量确定相应接头稀释倍数。

6.2 设置 PCR 仪程序，条件如表 13

表 13 接头连接反应程序

温度 (°C)	时间
热盖	off
20°C	15min
4°C	Hold

6.3 反应完成后，瞬时离心将反应液收集至管底。

6.4 转移全部连接产物至新的 1.5ml 离心管中。

✓ **停止点**：接头连接后产物可放置-20℃冰箱，不超过 16h。

7. 接头连接产物纯化

7.1 提前 30 min 取出分选磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

7.2 用移液器吸取 60 μL 分选磁珠至接头连接产物中，吹打混匀，室温孵育 5min。

7.3 将离心管短暂离心后置于磁力架。等待溶液澄清（约 3-5min），小心吸走上清，避免碰到磁珠。

- 7.4 离心管仍置于磁力架上，每管加入 200 μ l 新鲜配制的 80%乙醇。静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。
- 7.5 重复 7.4 步骤一次，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
- 7.6 室温 2-5min 使磁珠干燥，以磁珠表面不反光，磁珠表面无裂纹为准。
- 7.7 加入 21 μ l RNase-Free ddH₂O，涡旋混匀，室温孵育 5min。
- 7.8 短暂离心，将离心管置于磁力架 2min，直至溶液澄清，小心移取 20 μ l 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。
- ✓ 停止点：接头连接纯化后可放置-20℃冰箱储存。

8. 文库扩增

8.1 于无菌 PCR 管中配制下表所示反应体系。

表 14 PCR 扩增反应体系

试剂	体积 (μ L)
Adapter Ligated DNA	20
文库扩增反应液	25
UDB-P2xx	2.5
UDB-P1xx	2.5
Total	50

8.2 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。将上述 PCR 管置于 PCR 仪上，运行表 15 程序。

表 15 PCR 扩增反应程序

步骤	Cycles	温度 (°C)	时间
1	1	98	1min
		98	10s
2	X*	60	30s
		72	30s
3	1	72	5min

4 1 4 Hold

【注】*扩增循环数参照 3 确定。

8.3 反应结束后，瞬时离心将反应液收集至管底，吸取全部反应液转移至新的 1.5mL 离心管中。

9 扩增的文库纯化

9.1 提前 30 min 取出分选磁珠置于室温，使用前充分震荡混匀。

9.2 向 PCR 扩增产物内加入 50 μ L RNase-free ddH₂O，混合均匀。

9.3 根据 DNA 片段长度要求，参考表 16 向上述 100 μ L PCR 产物内加入第一轮分选磁珠，吹打混匀，室温孵育 5min。

9.4 将离心管短暂离心后置于磁力架。等待溶液澄清（约 3-5min），小心转移上清到干净的离心管中。

9.5 参考表 15 向上清中加入第二轮分选磁珠，吹打混匀，室温孵育 5min。

9.6 将离心管短暂离心后置于磁力架。等待溶液澄清（约 3-5min），小心移除上清。

9.7 离心管仍置于磁力架上，每管加入 200 μ l 新鲜配制的 80%乙醇。静置 30 s 后小心吸取并丢弃上清。

9.8 重复 9.7 步骤一次，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。

9.9 温 2-5min 使磁珠干燥，以磁珠表面不反光，磁珠表面无裂纹为准。

9.10 加入 21 μ l RNase-Free ddH₂O，涡旋混匀，室温孵育 5min。

9.11 短暂离心，将离心管置于磁力架 2~5min，直至溶液澄清，小心移取 20 μ l 上清至新 PCR 管中，切勿触碰磁珠。

表 16 磁珠文库分选推荐比例

DNA 文库插入 片段大小	150-250 bp	250-350 bp	350-450 bp	450-550 bp	550-650bp
DNA 文库大小	250-350 bp	350-450 bp	450-550 bp	550-650 bp	650-750bp
第一轮体积比 (Beads:DNA)	0.80 \times	0.70 \times	0.60 \times	0.55 \times	0.50 \times
第二轮体积比 (Beads:DNA)	0.20 \times	0.20 \times	0.20 \times	0.15 \times	0.15 \times

【注】表中“ \times ”表示样品 DNA 体积。如文库插入片段长度为 250 bp，样品 DNA 体积为 100 μ L，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.80 \times 100 μ L=80 μ L；第二轮分选磁珠使用体积为 0.20 \times 100 μ L=20 μ L

✓ 停止点：PCR 扩增纯化产物，可置-20°C 冰箱储存。

10 文库质检

10.1 文库浓度检测：使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 或 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit 等双链 DNA 荧光定量试剂盒，按照定量试剂盒的操作说明对 PCR 纯化后产物进行定量。

10.2 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。图 1 为本试剂盒构建文库双轮分选纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果：

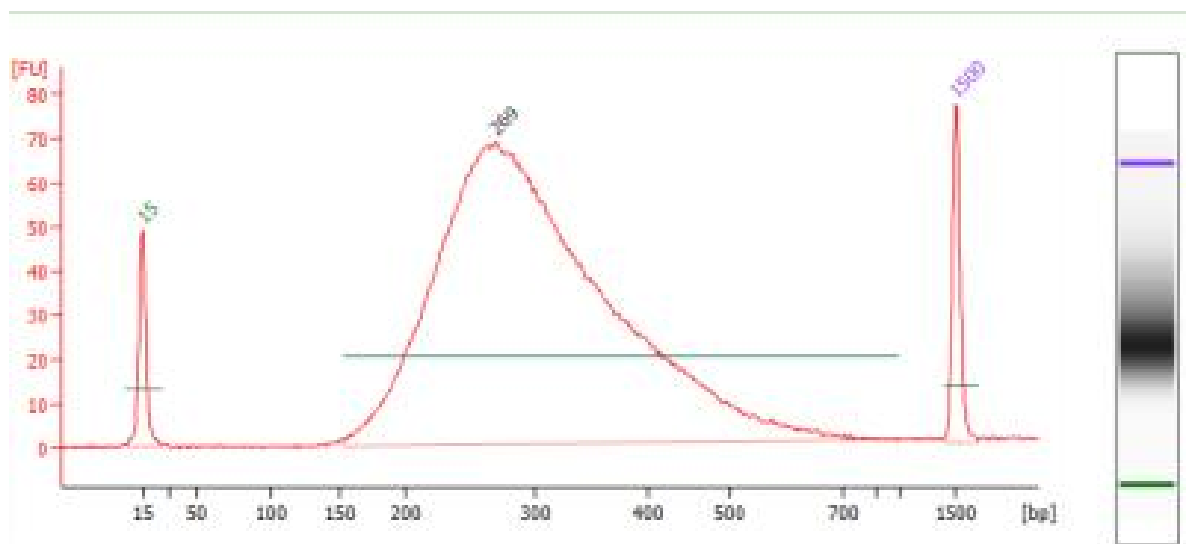


图 1 文库双轮分选纯化产物的 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测结果

【检验方法的局限性】

1. 本产品用于 RNA 样本的文库构建。
2. 样本的检测结果显示与 RNA 的投入量、纯度以及实验过程的操作是否正确等有关，任何操作失误都会导致最终文库构建失败。

【注意事项】

1. 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断。
2. 使用前请仔细阅读说明书，严格按说明书进行操作，超过有效期禁止使用。
3. 试剂避免反复冻融，开启后应尽快使用，不宜长时间存放，出现杂质浑浊请勿使用。

4. 实验人员需经过专业培训，考核合格后方可上岗操作。
5. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
6. 请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清理。
7. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；配备文库构建专用移液器等设备；定时对各实验区域进行清洁，以保证实验环境的洁净度。
8. 实验过程产生的废液、废物等请按相关规定进行处理。

附录

附录 A 序列信息

UDB Adapter for MGI:

5'-/5Phos/ AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAATCAG -3'

5'-TTGTCTTCCTAAGCAACTCCTTGGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTT-3'

Barcode 2 Index Primer for MGI:

5'-/5Phos/CTCTCAGTACGTCAGCAGTT[Barcode 2 Index]CAACTCCTTGGCTCACAGAAC-3'

Barcode1 Index Primer for MGI:

5'-GCATGGCGACCTTATCAG[Barcode 1 Index]TTGTCTTCCTAAGACCGCTTGG-3'

[Barcode 2 Index] 表示 10bp 的 Barcode 2 Index 序列，[Barcode 1 Index] 表示 10bp 的 Barcode 1 Index 序列，各引物对应的 Index 名称、引物中包含的 Index 序列以及测序时对应的 Index 序列信息如下表所示：

Barcode 2 Index Primers	引物中的序列	测序仪拆分用序列（同引物中的序列）
P201	TAGGTCCGAT	TAGGTCCGAT
P202	GGACGGAATC	GGACGGAATC
P203	CTTACTGCCG	CTTACTGCCG
P204	ACCTAATTGA	ACCTAATTGA
P205	TTCGTATCCG	TTCGTATCCG
P206	GGTAACGAGC	GGTAACGAGC
P207	CAACGTATAA	CAACGTATAA
P208	ACGTCGCGTT	ACGTCGCGTT

Barcode 1 Index Primers	引物中的序列	测序仪拆分用序列（与引物中的序列反向互补）
P101	TAGGTCCGAT	ATCGGACCTA
P102	GGACGGAATC	GATTCCGTCC
P103	CTTACTGCCG	CGGCAGTAAG
P104	ACCTAATTGA	TCAATTAGGT
P105	TTCGTATCCG	CGGATACGAA
P106	GGTAACGAGC	GCTCGTTACC
P107	CAACGTATAA	TTATACGTTG
P108	ACGTCGCGTT	AACGCGACGT
P109	TTCTGCTAGC	GCTAGCAGAA
P110	AGGAAGATAG	CTATCTTCCT
P111	GCTCTTGCTT	AAGCAAGAGC
P112	CAAGCACGCA	TGCGTGCTTG

附录 B 关于磁珠及纯化

磁珠使用前注意事项

- ◆ 磁珠使用前，提前30 min从4°C取出，涡旋混匀且置于室温，使其平衡至室温，有利于保证回收效率。
- ◆ 磁珠每次使用前，需振荡或用移液器上下吹打，确保充分混匀。
- ◆ 磁珠使用量直接影响纯化到的DNA片段的下限长度。

磁珠操作注意事项

- ◆ 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发，应用Elution Buffer补齐体积，再用推荐磁珠用量进行纯化，以保证乘数正确，条带正确。
- ◆ 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，一般需要2~3 min。但由于磁力架吸力不同等原因，推荐分离时间有时可能需要延长，以液体彻底澄清为准。
- ◆ 磁珠与液体分离时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可余留2~3 μL 液体，避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。
- ◆ 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架中，请勿扰动磁珠。
- ◆ 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管中液体吸干。
- ◆ 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成无水乙醇残留影响后续反应，过分干燥（磁珠开裂）又会降低纯化得率。通常情况下，室温干燥需要5~10 min，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察，磁珠表面无反光，即可进行产物洗脱。
- ◆ 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应，所以，洗脱体积应该比最终吸取上清的体积多1 μL 。
- ◆ 在1.5 mL磁力架上开关管盖应小心，避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住离心管中下段，然后开盖。

【基本信息】

生产企业：瑞因迈拓科技（广州）有限公司

生产地址：广东省广州市黄埔区开源大道 188 号七栋 102。

联系方式：400-801-3391

售后服务单位：瑞因迈拓科技（广州）有限公司