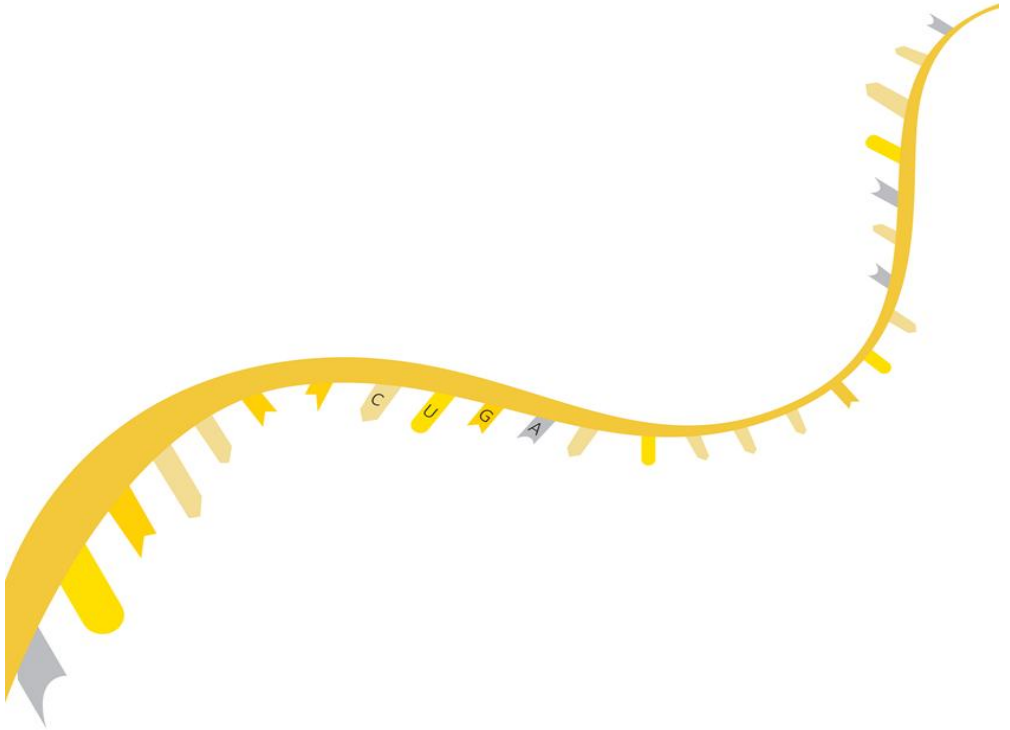




# RNA-seq Lib Prep Kit (with FS)

## RK20308

---



[www.abclonal.com](http://www.abclonal.com)  
version: N16E23v2.0

# 目录

1. 产品概述 .....	1
2. 产品组分 .....	2
3. 保存及运输条件 .....	2
4. 其它自备材料 .....	3
5. 实验流程 .....	4
6. 操作注意事项 .....	5
7. 文库构建步骤 .....	6
8. 附表 .....	13

# 1. 产品概述

RNA-seq Lib Prep Kit (with FS) (Cat.NO RK20308)是一款基于片段化酶酶切打断的 RNA 建库试剂盒。试剂盒的建库流程包括 RNA 逆转录、双链 cDNA 合成、双链 cDNA 片段化、末端修复和 dA-Tailing、接头连接和 PCR 扩增等步骤。本试剂盒使用片段化酶对双链 cDNA 进行片段化，并且 DNA 片段化、末端修复和 dA-Tailing 合并为一步完成，流程简单，整个过程可在 3-3.5 小时内完成。

本试剂盒具有较高的检测灵敏度，较低的背景菌污染，适用于 mNGS 检测 RNA 样本，其他 RNA 样本及较为复杂的样本建库。

试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，且每一批次的试剂盒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	8 RXN	24 RXN	96 RXN
● 5X First Strand Buffer	32 $\mu$ L	96 $\mu$ L	384 $\mu$ L
● RT Reagent	16 $\mu$ L	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● Radom Primers (N6)	16 $\mu$ L	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● 1st Enzymes	16 $\mu$ L	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● Second Strand & dA Buffer	64 $\mu$ L	192 $\mu$ L	768 $\mu$ L
● 2nd Enzymes	32 $\mu$ L	96 $\mu$ L	384 $\mu$ L
● FS Enzymes	16 $\mu$ L	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● Endprep Enzyme Mix	24 $\mu$ L	72 $\mu$ L	288 $\mu$ L
● Ligation Buffer	132 $\mu$ L	396 $\mu$ L	1584 $\mu$ L
● Ligase Mix	24 $\mu$ L	72 $\mu$ L	288 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	200 $\mu$ L	600 $\mu$ L	1.2 mL X 2
● Nuclease-Free Water	2 mL	2 mL	8 mL

● 代表了管盖颜色。

## 3. 保存及运输条件

**试剂盒长途运输：**尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式，在-40 ~ -20°C温度条件下进行运输。

**试剂盒保存：**-20~-10°C冰箱。

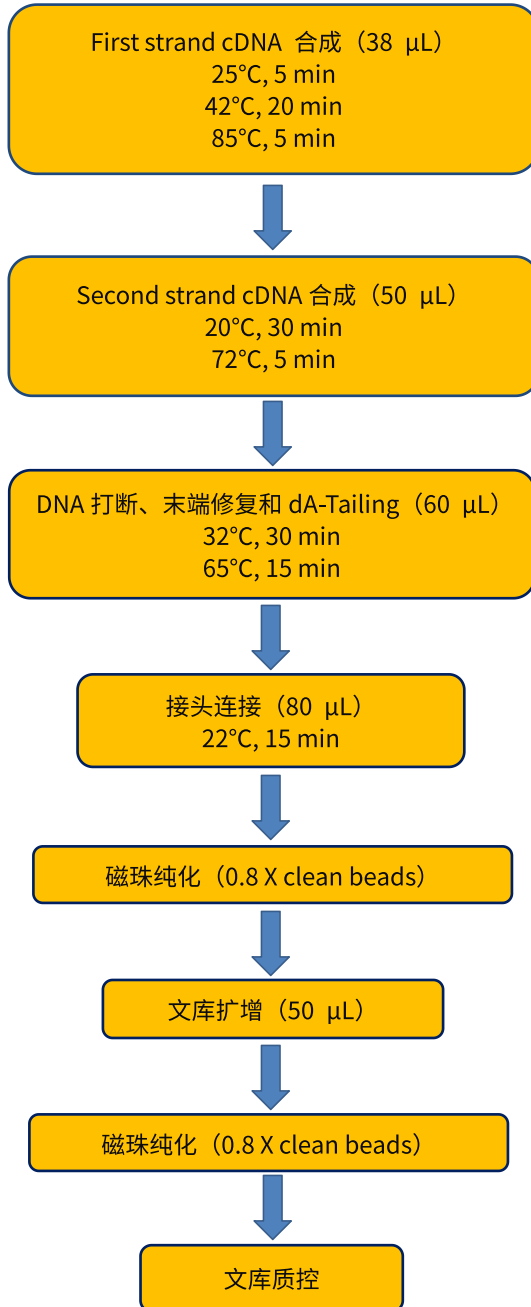
## 4. 其它自备材料

- ◆ 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
- ◆ 连接接头
  - ◇ Illumina 平台完整接头: Cat.NO. RK20292、RK20293、RK20298、RK21600-RK21602
  - ◇ Illumina 平台截短接头: Cat.NO. RK20294、RK20295、RK20297、RK20287、RK20296、RK21622-RK21625
  - ◇ MGI 平台完整接头: Cat.NO. RK21676、RK21677、RK21678、RK21679
  - ◇ MGI 平台截短接头: Cat.NO. RK21620-RK21621、RK21616、RK21617、RK21686-RK21689

具体信息可以参考附表中的试剂盒兼容接头类型汇总表。

- ◆ RNA 和 DNA 样本浓度评估
  - ◇ Qubit 荧光定量仪
  - ◇ Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855)
  - ◇ ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒 (ABclonal, Cat.NO. RK30140)或 Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32854)
  - ◇ Nanodrop
- ◆ 文库质控
  - ◇ Qubit 荧光定量仪
  - ◇ ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒(ABclonal, Cat.NO. RK30140)或 Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32854)
  - ◇ Agilent 2100 bioanalyzer
  - ◇ Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626)
  - ◇ Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504)
- ◆ 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



## 6. 操作注意事项

### 6.1 RNA 样品质控

关于 RNA 的定量建议选取 Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855)试剂盒进行定量；过低的投入量会影响正常的文库构建。

### 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 AFTMag NGS DNA Clean Beads 避免放入-20°C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 Nuclease-Free Water 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

文库峰形平滑无异常毛刺，且在 130 bp（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。

### 6.4 操作规范

6.4.1 RNA 建库过程中应戴口罩、手套；RNA 样本稀释后冰上放置，并尽快进入下一步实验，避免 RNA 发生降解。

6.4.2 使用带有 index 的接头或者 index PCR primer 时应小心，避免试剂与样本间的交叉污染。

## 7. 文库构建步骤

### 7.1 First strand cDNA 合成

7.1.1 取出 5X First Strand Buffer、RT Reagent 和 Radom Primers (N6)冰上融解，冰上配制如下体系：

试剂	体积
RNA 样本	28 $\mu$ L
● 5X First Strand Buffer	4 $\mu$ L
● RT Reagent	2 $\mu$ L
● Radom Primers (N6)	2 $\mu$ L
● 1st Enzymes	2 $\mu$ L
总体积	38 $\mu$ L

注：除 RNA 样本外其他组分可以提前配制预混 Mix，按照 1.1 倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够。

7.1.2 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪运行如下程序（热盖温度 105°C）：

温度	时间
25°C	5 min
42°C	20 min
85°C	5 min
4°C	Hold



## 7.2 Second strand cDNA 合成

7.2.1 将 Second Strand & dA Buffer、2nd Enzymes 从冰箱中取出冰上融解，并按照下表体系依次加入各试剂：

试剂	体积
1st cDNA (步骤 7.1.2)	38 $\mu\text{L}$
● Second Strand & dA Buffer	8 $\mu\text{L}$
● 2nd Enzymes	4 $\mu\text{L}$
总体积	50 $\mu\text{L}$

注：Second Strand & dA Buffer、2nd Enzymes 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。

7.2.2 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将样本置于 PCR 仪运行如下程序（[热盖温度关闭](#)）：

温度	时间
20°C	30 min
72°C	5 min
4°C	$\infty$

## 7.3 DNA 打断、末端修复和 dA-Tailing

7.3.1 将 FS Enzymes 和 Endprep Enzyme Mix 从冰箱中取出置于冰上，并按照下表体系依次加入各试剂：

试剂	体积
双链 cDNA (步骤 7.2.2)	50 $\mu\text{L}$
● FS Enzymes	2 $\mu\text{L}$
● Endprep Enzyme Mix	3 $\mu\text{L}$
○ Nuclease-Free Water	5 $\mu\text{L}$
总体积	60 $\mu\text{L}$

注：FS Enzymes、Endprep Enzyme Mix 和 Nuclease-Free Water 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。

7.3.2 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将样本置于 PCR 仪运行如下程序（热盖温度设置为 75°C）：

温度	时间
32°C	30 min
65°C	15 min
4°C	∞

## 7.4 接头连接

7.4.1 将 Ligation Buffer、Ligase Mix 和 Adapter 取出冰上融解，在冰上配制接头连接体系：

试剂	体积
双链 cDNA（步骤 7.3.2）	60 μL
● Ligation Buffer	16.5 μL
● Adapter	2.5 μL
● Ligase Mix	3 μL
总体积	≈80 μL

注 1：在配连接体系时，可将 Ligation Buffer 和 Ligase Mix 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。

注 2：Adapter 不要配制预混 Mix，以免产生接头二聚体影响连接效率。

7.4.2 吹打混匀，瞬时离心，将样本置于 PCR 仪上进行连接反应（热盖温度关闭）：

温度	时间
22°C	15 min
4°C	∞

## 7.5 连接产物纯化

7.5.1 提前至少 30 min 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀。

7.5.2 连接反应结束后，在产物中加入 64  $\mu\text{L}$  AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.8X)，吹打混匀，室温静置 5 min。

7.5.3 转移离心管或 PCR 管至磁力架上，静置 5 min 或直至溶液变澄清，小心弃除上清，注意不到碰到磁珠。

7.5.4 将离心管保持在磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。

7.5.5 重复步骤 7.5.4。

7.5.6 短暂离心后将离心管或 PCR 管放回至磁力架，用 10  $\mu\text{L}$  枪头将残留液体彻底吸干。

7.5.7 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 22  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温静置 2 min。

7.5.8 转移离心管或 PCR 管至磁力架上，静置 5 min 或直到溶液变澄清，小心吸取 20  $\mu\text{L}$  上清至另一全新的 PCR 管中备用。

## 7.6 文库扩增

7.6.1 根据不同接头试剂盒进行不同的 PCR 体系配制。

本试剂盒兼容 MGI 平台和 Illumina 平台接头的完整接头和截短接头，请根据接头类型选择对应的文库扩增体系，接头类型及相关货号信息见附表。

PCR 体系一 (Illumina-截短接头, MGI-截短接头, 单端 index)

试剂	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
○ PCR Index Primer (MGI Index)	2.5 $\mu$ L
● Universal PCR Primer (MGI Universal PCR Primer)	2.5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

PCR 体系二 (Illumina-截短接头, 双端 index)

试剂	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
● I5 Primer	2.5 $\mu$ L
● I7 Primer	2.5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

PCR 体系三 (Illumina-截短接头, MGI-截短接头, 双端 index UDI/UMI)

试剂	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
○ UDI Primer (MGI UDI Primer)	5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

## PCR 体系四 (Illumina-完整接头, MGI-完整接头)

试剂	体积
接头连接的 DNA	20 $\mu$ L
● 2X PCR Mix	25 $\mu$ L
● 10X ILM PCR Primers (MGI PCR Primer Mix)	5 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

注: MGI PCR Primer Mix (适用于 MGI 平台) (ABclonal, Cat.NO. RM23300) , 10X ILM PCR Primers (适用于 Illumina 平台) (ABclonal, Cat.NO. RM20726) , 如有需要, 可联系技术支持。

7.6.2 枪头吹打混匀, 瞬时离心, 将样本置于 PCR 仪中按照如下程序进行 PCR 扩增 (热盖温度 105°C) :

温度	时间	Cycles
98°C	45 s	1
98°C	10 s	
60°C	15 s	5-15 cycles
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	

7.6.3 PCR 循环数选择推荐:

样本类型	样本投入量	PCR 循环数
RNA 样本	1-10 ng	9 cycles
RNA 样本	10-300 ng	5-7 cycles

注 1: 低于 1 ng 样本投入, 需要提高循环数 2-4 cycles。

注 2: 由于不同样本质量和降解程度的差异, 可按照实际情况适当调整循环数。

## 7.7 扩增产物纯化

7.7.1 提前至少 30 min 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀。

7.7.2 反应结束后，每个反应管中加入 40  $\mu\text{L}$  AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.8X)，吹打混匀，室温静置 5 min。

7.7.3 转移离心管或 PCR 管至磁力架上，静置 5 min 或直至溶液变澄清，小心弃除上清，注意不要碰到磁珠。

7.7.4 将离心管或 PCR 管保持在磁力架上，加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。

7.7.5 重复步骤 7.7.4。

7.7.6 短暂离心后将离心管或 PCR 管放回至磁力架上，用 10  $\mu\text{L}$  枪头将残留液体彻底吸干。

7.7.7 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 31  $\mu\text{L}$  Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温静置 2 min。

7.7.8 转移离心管或 PCR 管至磁力架上，静置 5 min 或直到溶液变澄清，小心吸取 30  $\mu\text{L}$  文库至另一新的离心管中，留存备用。

## 8. 附表

### 试剂盒兼容接头及 Index 类型汇总

接头类型	Index 单端/双端	UMI/UDI	货号	试剂
Illumina-完整 接头	单端	×	RK20292	Full DNA Adapter Kit for Illumina Set_C (48 indices)
	单端	×	RK20293	Full DNA Adapter Kit for Illumina Set_D (48 indices)
	单端	×	RK20298	Full DNA Adapter Kit for Illumina MidiSet (24 indices)
	双端	UMI	RK21600- RK21602	Dual Unique UMI Adapters for Illumina
Illumina-截短 接头	单端	×	RK20294	Truncated DNA Adapter Kit for Illumina Set_C (48 indices)
	单端	×	RK20295	Truncated DNA Adapter Kit for Illumina Set_D (48 indices)
	单端	×	RK20297	Truncated DNA Adapter Kit for Illumina MidiSet (24 indices)
	双端	×	RK20287	Dual DNA Adapter 96 Kit for Illumina
	双端	×	RK20296	Dual DNA Adapter 96 Kit Extended for Illumina
	双端	UDI	RK21622- RK21625	Unique Dual Index for Illumina
	双端	UMI	RK21700- RK21703	Unique Dual Index (with UMI) for Illumina
MGI-完整接头	单端	×	RK21676	Full DNA Adapters Kit for MGI MiniSet (8 indices)
	单端	×	RK21677	Full DNA Adapters Kit for MGI MidiSet (24 indices)
	单端	×	RK21678	Full DNA Adapters Kit for MGI Set A (48 indices)
	单端	×	RK21679	Full DNA Adapters Kit for MGI Set B (48 indices)

MGI-截短接头	单端	×	RK21620- RK21621	Truncated DNA Adapter Kit for MGI MidiSet V2
	单端	×	RK21616	Truncated DNA Adapter Kit for MGI Set_A
	单端	×	RK21617	Truncated DNA Adapter Kit for MGI Set_B
	双端	UDI	RK21686- RK21689	Truncated DNA Adapter (UDI) Kit



## 中国

[www.abclonal.com.cn](http://www.abclonal.com.cn)

中国总部：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

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院  
2 号楼 4 楼

美国研发中心：86 Cummings Park Dr ,Woburn, MA 01801, United States

电话：400-999-6126

邮箱：[cn.market@abclonal.com](mailto:cn.market@abclonal.com)