



CWseq® Universal RNA-seq Library Prep Kit for Illumina/MGI

通用RNA文库制备试剂盒 (Illumina&MGI)

Cat. No. CW3085S (24 rxns)
CW3085M (96 rxns)

产品简介

CWseq® Universal RNA-seq Library Prep Kit for Illumina/MGI是兼容Illumina和MGI高通量测序双平台的转录组文库构建专用试剂盒。试剂盒将二链合成、末端修复和dA-Tailing合并为一步，中间不需要纯化步骤，极大的简化了操作流程，缩短了建库时间；优化的反应体系，提高了文库转化效率，对更低质量的RNA有更好的解决方案。试剂盒包含的所有酶和缓冲液都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。通过搭配前处理的试剂盒，最大范围可适用于起始量为1ng - 1µg Total RNA起始的转录组文库构建。直接投入Total RNA建库时，可适用于起始模板量为0.25-100ng的高质量Total RNA。

产品特点

1. 兼容性好: 适配多种RNA前期处理方式，兼容不同测序平台，长短接头。
2. 针对部分降解样本如FFPE，有更好的解决方案。
3. 适用性广: 可兼容多物种，如动物、植物、微生物的RNA建库。
4. 文库产出高: 优化的反应体系，提高了文库转化效率。
5. 测序质量高: 下机数据好，有效数据占比高。

保存条件: -30~-15°C保存, 干冰运输

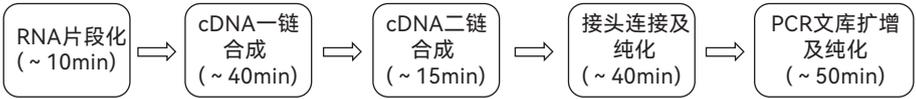
产品内容

Component	CW3085S (24 rxns)	CW3085M (96 rxns)
FFPE Treatment Buffer	140 µL	600 µL
Frag&Prime Buffer	290 µL	1.3 mL
1st Strand Buffer	240 µL	1.08 mL
1st Strand Enzyme	28 µL	120 µL
2nd Strand Buffer	370 µL	1.68 mL
2nd Strand Enzyme	28 µL	120 µL
Ligase Enzyme	140 µL	600 µL
Ligase Buffer	1.06 mL	4.8 mL
Amplification Master Mix (2X)	690 µL	3 mL
P5/P7 Primer Mix (10X)	140 µL	600 µL

自备仪器、试剂和耗材

1. RNA前处理: 推荐使用康为世纪rRNA去除试剂盒 (Cat.No.CW3086) 或者是mRNA富集试剂盒(Cat.No.CW3087);
2. 接头引物试剂盒:
MGI平台: 单端接头引物试剂盒I/II/III (Cat.No.CW3014/CW3015/CW3016)、双端UDB短接头 (Cat.No.CW3082)。
Illumina平台: 单端短接头引物试剂盒I/II (Cat.No.CW2586/CW2587)、双端短接头引物试剂盒 (Cat.No.CW3042/CW3079)、双端UDI短接头 (Cat.No.CW3084)。
3. DNA质控: Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品。
4. DNA纯化磁珠: 推荐使用康为世纪DNA纯化磁珠 (Cat.No.CW3171)。
5. 其他材料: 低吸附Nuclease-free的PCR管、1.5mL离心管及过滤枪头, 磁力架无水乙醇 (100%乙醇, 分析纯), Nuclease-free H₂O, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, PCR仪器等。

RNA建库流程示意图



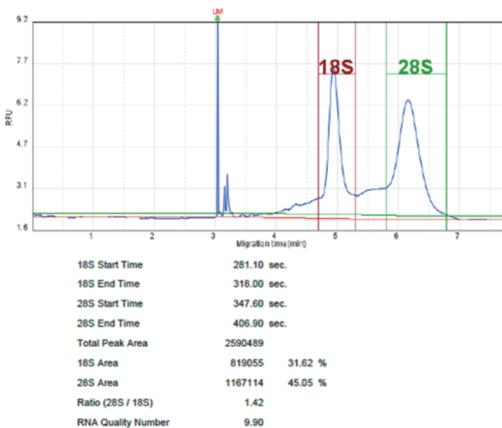
RNA文库构建流程

* * 请在实验前仔细阅读本操作说明，根据不同前处理类型选择对应的程序。为保证建库质量，在实验开始前必须对RNA样品进行质控，按照供应商手册进行对应的mRNA富集或者是rRNA去除，若直接使用Total RNA建库，RNA应重悬在无RNase的水中，不含盐（如镁离子或胍盐）、螯合剂（如EDTA或EGTA）和有机物（如苯酚或乙醇），最后投入建库的RNA应避免DNA的污染。如果含有DNA，则需通过DNase I孵育（试剂盒不提供）去除污染。但残留的DNase I可能会干扰文库制备，因此确保样品中没有残留的酶非常重要。

* * 由于固定过程中产生的严重损伤，FFPE RNA工作流程的效率很可能会较低，样本之间的差异也更大。对于严重降解和具有挑战性的样本，通常可以通过增加总RNA投入量来挽救性能。此外，一些提取方案不能充分对FFPE RNA样本解交联。在这些情况下，我们的FFPE预处理步骤可以提高文库的质量。所以如果您使用的是FFPE样本，请使用文库构建流程操作说明B（第12页）。

适用范围

1. 总RNA中大部分为rRNA约占80%，而mRNA只占5%左右，因此建议在建库前去除总RNA中rRNA的干扰，若总RNA起始投入量过低不能确保得到足够的mRNA用于后续文库构建。
2. RNA质量评估：建议使用RNA完整度较好的样本（RIN值>7），部分降解的样品，当RIN值≤7，可能需要降低连接反应中的接头浓度，以减少接头-二聚体的产生。或者，可以在连接后进行二次纯化。



293T Cell line total RNA质量评估示意图

实验前准备及重要注意事项

1. 为保证建库质量，在开始实验前必须对RNA样品进行质控，RNA样品总量、纯度和完整性须满足以下条件：

OD260/OD280比值介于1.8-2.1之间，若比值>2.1则RNA样品中可能有基因组污染，若比值<1.8则可能有蛋白质污染；OD230/OD260比值介于0.4-0.5之间，若比值>0.5则可能RNA样品中有盐或小分子杂质污染，比值<0.4可能有基因组污染。若使用Bioanalyzer进行RNA完整性检测，RIN值 \geq 7.0；若使用琼脂糖凝胶电泳检测，则28s和18s条带无明显降解，且无蛋白质和基因组污染。

2. 对于以下四种情况可尝试建库但不保证建库质量。

- a) RIN或RQN值略低于标准，但基线光滑。
- b) RIN或RQN值达到标准，但基本线略有上升。
- c) 基线光滑，RQN值达到标准，5S峰值略高。
- d) 28S/18S或23S/16S值略低于标准，但基本线光滑。

3. 建议使用带滤芯的吸头，在吸取不同样品时更换吸头。

4. 实验过程中务必使用新鲜的Nuclease-free H₂O，建议分装至小管中逐个取用，用后弃去。

5. 务必佩戴手套操作，接触RNase-free空间外设备或其他工作区间后，请更换手套。

6. 所有的试剂使用后务必立即盖上盖子，避免污染。

7. 接头

该试剂盒在 dsDNA连接时适配 3'末端悬挂T的接头类型。注意，接头的质量影响文库构建的整体效率，在实验之前确认接头的使用浓度，确保接头是双倍充分的。

当使用截短型（或stubby）接头，即样本标签会在文库扩增时加入，如后期需在同一个流动槽上进行测序，客户需要为每一个文库准备带唯一标签序列的（UDI）PCR引物。

使用截短型接头可以通过提高其在反应体系中的浓度而提升文库的构建效率，因此我们强烈推荐截短型的接头，以获得最好的性能。

该操作流程也兼容通过连接加入样本标签的全长接头。当使用全长接头时，需要为在同一个流动槽上进行测序的所有样本都提供唯一的样本标签。请参考接头供应商提供的技术文档，选择最优的标签混合方案。

8. P5/P7 Amplification Primers

如使用全长接头进行连接的文库，试剂盒提供了 P5/P7引物混合物（10X），浓度为每条引物 20 μ M。

P5: AATGATACGGCGACCACCGA

P7: CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT

9. 用户提供的扩增引物

在混合测序的工作流程中，当使用截短型（或stubby）接头时，每一个文库都必须使用一组（单独加入）带唯一标签的引物混合物，才可以在同一个流动槽内进行测序。

用户提供的引物也可以加入化学修饰（例如：一个或多个3'-硫代磷酸基团）以提高特异性。

请使用10 mM Tris-HCl, PH8.0缓冲液保存和稀释引物，避免多次的反复冻融。

文库构建流程A: 高质量和部分降解的样本

RNA片段化

经Poly(A)法富集的mRNA或去除rRNA后的RNA应尽快进行后续操作，避免RNA降解。

1. 建议对Total RNA定量后使用康为世纪试剂盒CW3086对rRNA去除（适用于人、大鼠、小鼠1ng-1 μ g总RNA中rRNA及珠蛋白mRNA的去除）或者使用CW3087捕获的方法进行mRNA富集（适用于人、动物、植物、真菌等真核生物2.5ng-1 μ g总RNA中mRNA的富集）。

(1) 使用CW3087时，磁珠洗脱时建议直接加入**27 μ L**表1的片段化反应体系进行洗脱，最后吸取25 μ L的上清液至一个新的Nuclease-free离心管中按下述表2反应条件进行RNA片段化反应。

(2) 使用CW3086时，最后一步重悬磁珠时，建议直接加入**27 μ L**表1的片段化反应体系进行重悬，吹打充分混匀后将样品置于PCR仪中，按下述表2反应条件进行RNA片段化反应。反应结束后，将样品置于磁力架上，待溶液变澄清后，小心吸取25 μ L上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，立刻进行第一链cDNA合成反应。

(3) 若不进行RNA前处理，直接投入Total RNA进行建库时，建议投入0.25-100 ng的高质量Total RNA，重悬在**15 μ L**无RNase的水中，直接加入**10 μ L**的Frag&Prime Buffer，混合均匀后，按照表2的片段化启动程序进行反应。

2. 根据下表为每一个反应配制片段化和启动预混液：

表1 RNA片段化启动反应体系

组分	体积
Frag & Prime Buffer	10.8 μ L
NF Water	16.2 μ L

3. 将上述反应体系使用移液器轻轻吹打混匀或涡旋混合4秒，快速离心使所有液体收集到试管底部。按上述1步骤中的不同试剂盒进行片段化体系的加入。
4. 将加入片段化启动预混液的样品放入预冷的PCR仪中，将程序从4 $^{\circ}$ C推进至片段化孵育。根据插入片段大小的需要，选择片段化条件：

表2 RNA片段化启动反应程序推荐

步骤	温度	时间
Lid temperature	105 $^{\circ}$ C	N/A
Pre-cooling	4 $^{\circ}$ C	HOLD
RNA fragmentation	参考表3	
HOLD (Priming)	12 $^{\circ}$ C	HOLD

注意：当程序结束并到达12 $^{\circ}$ C后，立刻进入下一步第一链合成。

表3 根据RNA质量和所需插入片段大小推荐的RNA片段化条件

RNA质量	RIN	预期的插入片段 ^{1) 2)}	片段化条件
完整	>7	230-250bp	80°C for 10 min
		220-240bp	85°C for 10 min
		210-230bp	90°C for 10 min
		175-185bp	95°C for 10 min
部分降解 ³⁾	2-7	100-300bp	85°C for 2-5 min
降解, 非PPFE	1-2	由RNA质量决定	65°C for 1 min

注意: 1) 使用 NGS-Picard评估的平均大小。2) 假设使用 0.7X 连接后纯化比例。3) 降低片段化的温度和减少时间对于部分降解的样本可以产出更长的插入片段。

注意: 因mRNA磁珠富集作为前处理时, 建议使用RIN值 > 7的样本, 因此片段化时建议直接85°C for 10分钟即可, 此时插入片段大小约200bp, 若需要插入片段在300bp左右, 则在PCR扩增时额外增加两个循环数, 并在PCR产物纯化时使用0.7x磁珠。

第一链cDNA的合成

注意: 一链合成的缓冲液对光敏感。将其保存在试剂盒中, 直到需要解冻。在解冻和使用时, 要注意保护它不受阳光直射。可先设置PCR程序并启动预冷。

1. 按要求将第一链cDNA合成所需组分从-30 ~ -15°C取出, 冰上解冻上下颠倒混匀, 短暂离心收集至管底, 按下表配制第一链cDNA合成反应体系:

表4 第一链 cDNA 合成反应体系

组分	体积
上一步Fragmented mRNA	25 μL
1st Strand Buffer	9 μL
1st Strand Enzyme	1 μL
Total	35 μL

2. 将上述反应体系使用移液器轻轻吹打混匀或涡旋混合4秒, 瞬间将反应液离心至管底。
3. 将PCR管放到预冷的PCR仪上, 按照下表所示设置反应程序, 将程序从4°C推进的25°C孵育, 进行第一链cDNA的合成。

表4 第一链 cDNA 合成反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	105°C	N/A
Pre-cooling	4°C	HOLD
cDNA Synthesis	25°C	10 min
	42°C	15 min
RT Inactivation	70°C	15 min
HOLD	4°C	HOLD

注意: 第一链合成反应结束后, 将样本置于冰上, 或保持在PCR仪4°C。立刻进行第二链合成和加A尾步骤。

第二链cDNA的合成/加A

注意: 可先设置PCR程序并启动预冷。

1. 将第二链合成试剂从-30 ~ -15°C取出, 解冻后颠倒混匀; 按照下表所示, 配制第二链cDNA合成/加A反应液:

表6 第二链cDNA合成/加A反应体系

组分	体积
上一步1st Strand cDNA	35 μ L
2nd Strand Buffer	14 μ L
2nd Strand Enzyme	1 μ L
Total	50 μ L

2. 使用移液器轻轻吹打混匀或涡旋混合4秒, 瞬离将反应液离心至管底。
3. 将PCR管放到预冷的PCR仪上, 按照下表所示设置反应程序, 将程序从4°C推进的42°C孵育, 进行第二链cDNA的合成:

表7 第二链cDNA合成/加A反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	80°C	N/A
Pre-cooling	4°C	HOLD
2nd Strand Synthesis	42°C	5 min
A-Tailing	62°C	10 min
HOLD	4°C	HOLD

注意: 程序结束且样本到4°C后, 立刻进入接头连接步骤。

接头连接反应

注意: 可先设置PCR程序并启动预冷。

1. 使用适当的接头稀释液 (例如: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl), 按下表中规定的浓度制备适当体积的接头, 每个连接反应需要适当浓度的接头5 μ L。

注意: 不建议长时间保存浓度小于10 μ M的接头溶液。

注意: 表8是Total RNA建库前处理使用了rRNA去除探针后的建议接头浓度, 使用mRNA磁珠富集前处理或Total RNA直接建库的请参考附录1 (第21页)。

表8 不同RNA投入量推荐使用的全长/截断型接头浓度

	RNA投入量 (ng) ¹⁾	接头浓度 (μM)
全长型接头	< 10	Not recommended
	10-49 ²⁾	0.25
	50-199	1
	200-499	2
	500-749	2.5
	≥750	5
截断型接头	< 10	0.2
	10-99	2
	100-249	4
	≥250	6

注意: 1) 当使用部分降解样本时,降低接头的使用浓度或者进行连接后的二次纯化,都可能对减少接头二聚体有帮助。

2) 当使用全长接头且投入量小于20 ng时,推荐进行连接后的二次纯化。

- 在上述已完成的反应中加入 5 μL 适当浓度的接头。
- 向已加入接头的反应液中直接加入以下试剂:

表9 接头连接反应体系

组分	体积
Ligase Buffer	40 μL
Ligase Enzyme	5 μL
已加入接头的反应液	55 μL
Total	100 μL

- 连接预混液比较黏稠,将移液器调至80 μL上下吹打10次混匀,快速离心使所有液体收集到试管底部并置于冰上。
- 将PCR管放置在PCR仪器中推进到20°C孵育,运行以下程序

表10 接头连接反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	OFF	N/A
Pre-cooling	4°C	HOLD
Ligation	20°C	15 min
HOLD	4°C	HOLD

注意: 连接后纯化前将样本维持在冰上可减少接头二聚体的产生。

连接产物纯化

建议使用康为世纪DNA纯化磁珠 (CW3171) 进行连接产物纯化回收。

1. 提前30 min取出 CMPure置于室温, 使用前充分震荡混匀;
2. 将连接产物转移至一新的1.5 mL离心管中;
3. 吸取70 μ L CMPureL (0.7X)至100 μ L产物中, 充分震荡混匀, 室温孵育5 min;
4. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架, 静置5 min至液体澄清, 移液器吸取并弃掉上清;
5. 保持离心管固定于磁力架上, 加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30s, 弃去上清;
注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。
6. 重复步骤5一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 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底液体吸干;
注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。
7. 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管管盖, 室温干燥3~5min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。
8. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L洗脱液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0) 进行DNA 洗脱, 移液器吹打或充分震荡混匀并室温下溶解5 min;
9. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置5 min至液体澄清, 将20 μ L上清液全部转移到新的PCR管中, 进行下一步反应或者-20 $^{\circ}$ C保存。

安全停止点: 样本可以在-20 $^{\circ}$ C最多保存4周。

第二次连接后纯化 (可选)

注意: 这是一个可选步骤, 仅建议用于:

(1) 使用rRNA去除探针前处理时: 使用全长接头且起始量低于20 ngRNA; 用于部分降解的样本在连接反应中使用全长接头浓度的测试。(2) 使用mRNA磁珠富集前处理时: 使用全长接头且起始量低于50 ngRNA; 使用截断型接头且起始量低于10 ngRNA。(3) 直接用Total RNA建库时: 使用全长接头且起始量低于1 ngRNA; 用于部分降解的样本在连接反应中使用全长接头浓度的测试。

1. 提前30 min取出 CMPure置于室温, 使用前充分震荡混匀;
2. 吸取20 μ L CMPureL (1X)至第一步纯化后的20 μ L上清液中, 充分震荡混匀, 室温孵育5 min;
3. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架, 静置5 min至液体澄清, 移液器吸取并弃掉上清;
4. 保持离心管固定于磁力架上, 加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30s, 弃去上清;
注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。
5. 重复步骤4一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 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底液体吸干;
注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。
6. 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管管盖, 室温干燥3~5min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。

7. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μL 洗脱液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0) 进行DNA 洗脱, 移液器吹打或充分震荡混匀并室温下溶解5 min;
8. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置5 min至液体澄清, 将20 μL 上清液全部转移到新的PCR管中, 进行下一步反应或者-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
安全停止点: 样本可以在-20 $^{\circ}\text{C}$ 最多保存一个月。

PCR扩增

1. 冰上解冻并平衡扩增预混液 (2X)。一旦融化, 充分颠倒或大力旋转混匀 (不要震荡)。
2. 按照下表设置PCR程序:

表11 文库扩增PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Initial denaturation	98 $^{\circ}\text{C}$	45 s	1
Denaturation	98 $^{\circ}\text{C}$	15 s	
Annealing	P5/P7 primers: 60 $^{\circ}\text{C}$ ¹⁾ Indexed primers: 55 $^{\circ}\text{C}$ ²⁾	30 s	参考表12
Extension	72 $^{\circ}\text{C}$	30 – 45 s	
Final extension	72 $^{\circ}\text{C}$	60 s	1
—	12 $^{\circ}\text{C}$	HOLD	—

注意: 1) P5/P7 Primer Mix (10X)适合的温度。

2) 截短型接头方案的退火温度使用 55 $^{\circ}\text{C}$ 。对于其他接头/引物, 参考实验前准备及重要注意事项。

注意: 表12是Total RNA建库前处理使用了rRNA去除探针后的建议循环数, 使用mRNA磁珠富集前处理或Total RNA直接建库的请参考附录2 (第22页)。

表12 RNA投入量对应所需循环数

RNA投入量	10–50 nM文库所需 PCR循环数	
	全长型接头	截短型接头
1000ng	8–9	8–9
500ng	10–11	9–10
250ng	12–13	10–11
100ng	14–15	11–12
50ng	16–17	13–14
10ng	19–20	15–17
1ng	Not recommended	20–21

3. 根据下表配置PCR反应体系:

表13 PCR反应混合液的配制

组分	体积
Amplification Master Mix (2X)	25 μ L
P5/P7 Primer Mix (10X) or User-supplied primers ¹⁾	5 μ L
纯化回收的接头连接产物	20 μ L
Total	50 μ L

注意: 客户自备引物可参考相应说明书使用。

- 涡旋混匀5s, 瞬时离心将反应液收集至管底。
- 将上述PCR管置于PCR仪上并运行程序, 一旦程序结束, 立即进行扩增后纯化。

PCR产物纯化

建议使用康为世纪DNA纯化磁珠 (CW3171) 进行PCR产物纯化。

- 提前30 min 取出 CMPure置于室温, 使用前充分震荡混匀;
- 将PCR反应液转移至一新的1.5 mL离心管中; 吸取50 μ L (1x)体积 CMPure 至PCR产物中, 用移液器轻轻吹打或震荡充分混匀, 室温孵育5 min;
- 短暂离心, 将离心管放于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需5 min), 小心吸取上清, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠;
注意: 不要弃除磁珠。
- 保持离心管固定于磁力架上, 加入200 μ L 新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30s, 弃去上清;
注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。
- 重复步骤4一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 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底液体吸干;
注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。
- 保持离心管固定于磁力架上, 打开不粘管管盖, 室温干燥3~5 min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。
- 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L 10mM Tris-HCl pH 8.0, 涡旋振荡使磁珠完全重悬于离子水中, 室温静置5 min;
- 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置2 min至液体澄清, 将22 μ L上清液全部转移到新的PCR管中, 进行下一步反应或者-20 $^{\circ}$ C保存。

文库质控

1. 文库浓度检测一般有两种方法：一是基于双链DNA荧光染料的方法，如Qubit、PicoGreen等，二是基于qPCR绝对定量的方法。不建议使用基于光谱检测的方法，如 NanoDrop等。
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。

文库构建流程B: FFPE 样本

FFPE预处理

FFPE样本前处理建议使用去除rRNA方法。

1. (1) rRNA去除: 对Total RNA定量后使用康为世纪试剂盒CW3086对rRNA去除，磁珠洗脱时建议直接加入**17 μL** 表1的FFPE预处理反应体系进行洗脱。
(2) 若不进行RNA前处理，直接投入Total RNA进行建库时，建议投入0.25-100ng的Total RNA，体积**11 μL** ，直接加入**4 μL** 的FFPE Treatment Buffer，混合均匀后，按照表2的FFPE预处理预混液反应程序进行反应。
2. 根据下表准备FFPE预处理预混液:

表1 FFPE预处理预混液反应体系

组分	体积
FFPE Treatment Buffer	4.5 μL
NF Water	12.5 μL

3. 涡旋混合4秒，快速离心使所有液体收集到试管底部。
4. 将加入预混液的磁珠放入磁力架，至少5分钟或直至磁珠被完全吸附至管壁，溶液变得澄清。
5. 小心将15 μL 上清液转移到新的试管中。按照下表设置PCR程序:

表2 FFPE预处理预混液反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	105°C	N/A
FFPE heat treatment	70°C	30 min
HOLD	4°C	HOLD

6. 将反应管放入PCR仪并启动程序，程序结束后，立刻执行片段化和启动。

RNA片段化

1. 根据下表为每一个反应配制片段化和启动预混液:

表3 RNA片段化启动反应体系

组分	体积
Treated RNA	15 μ L
Frag & Prime Buffer	10 μ L

3. 将上述反应体系使用移液器轻轻吹打混匀或涡旋混合4秒，快速离心使所有液体收集到试管底部。
4. 将样品放入预冷的PCR仪中，将程序从4°C推进至片段化孵育：

表4 RNA片段化程序推荐

步骤	温度	时间
Lid temperature	105°C	N/A
Pre-cooling	4°C	HOLD
RNA fragmentation	65°C	1 min
HOLD (Priming)	12°C	HOLD

注意：当程序结束并到达12°C后，立刻进入下一步第一链合成。

第一链cDNA的合成

注意：一链合成的缓冲液对光敏感。将其保存在试剂盒中，直到需要解冻。在解冻和使用时，要注意保护它不受阳光直射。可先设置PCR程序并启动预冷。

1. 按要求将第一链cDNA合成所需组分从-30 ~ -15°C取出，冰上解冻上下颠倒混匀，短暂离心收集至管底，按下表配制第一链cDNA合成反应体系：

表5 第一链 cDNA 合成反应体系

组分	体积
上一步Fragmented mRNA	25 μ L
1st Strand Buffer	9 μ L
1st Strand Enzyme	1 μ L
Total	35 μ L

2. 将上述反应体系使用移液器轻轻吹打混匀或涡旋混合4秒，，瞬离将反应液离心至管底。
3. 将PCR管放到预冷的PCR仪上，按照下表所示设置反应程序，将程序从4°C推进的25°C孵育，进行第一链cDNA的合成。

表6 第一链 cDNA 合成反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	105°C	N/A
Pre-cooling	4°C	HOLD
cDNA Synthesis	25°C	10 min
	42°C	15 min
RT Inactivation	70°C	15 min
HOLD	4°C	HOLD

注意: 第一链合成反应结束后, 将样本置于冰上, 或保持在PCR仪4°C。立刻进行第二链合成和加A 尾步骤。

第二链cDNA的合成/加A

注意: 可先设置PCR程序并启动预冷。

1. 将第二链合成试剂从-30 ~ -15°C取出, 解冻后颠倒混匀; 按照下表所示, 配制第二链cDNA合成/加A反应液:

表7 第二链cDNA合成/加A反应体系

组分	体积
上一步1st Strand cDNA	35 μ L
2nd Strand Buffer	14 μ L
2nd Strand Enzyme	1 μ L
Total	50 μ L

2. 使用移液器轻轻吹打混匀或涡旋混合4秒, 瞬间将反应液离心至管底。
3. 将PCR管放到预冷的PCR仪上, 按照下表所示设置反应程序, 将程序从4°C推进的42°C孵育, 进行第二链cDNA的合成:

表8 第二链cDNA合成/加A反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	80°C	N/A
Pre-cooling	4°C	HOLD
2nd Strand Synthesis	42°C	5 min
A-Tailing	62°C	10 min
HOLD	4°C	HOLD

注意：程序结束且样本到4°C后，立刻进入接头连接步骤。

接头连接反应

注意：可先设置PCR程序并启动预冷。

1. 使用适当的接头稀释液（例如：10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl），按下表中规定的浓度制备适当体积的接头，每个连接反应需要适当浓度的接头5 μ L。

注意：不建议长时间保存浓度小于10 μ M的接头溶液。

注意：表9是Total RNA建库前处理使用了rRNA去除探针后的建议接头浓度，使用Total RNA直接建库的请参考附录3（第23页）。

表9 不同RNA投入量推荐使用的全长/截断型接头浓度

	RNA投入量 (ng) ¹⁾	接头浓度 (μ M)
全长型接头	< 20	0.05
	20-49 ²⁾	0.1
	50-199	0.25
	200-499	0.5
	\geq 500	1
截断型接头	10-49	0.2
	50-199	0.4
	200-499	0.75
	\geq 500	1

注意：1) 当使用全长接头且投入量小于100ng时，推荐进行连接后的二次纯化。

2) 当使用截短型接头且投入量小于50ng时，推荐进行连接后的二次纯化。

2. 在上述已完成的反应中加入 5 μ L适当浓度的接头。
3. 向已加入接头的反应液中直接加入以下试剂：

表10 接头连接反应体系

组分	体积
Ligase Buffer	40 μ L
Ligase Enzyme	5 μ L
已加入接头的反应液	55 μ L
Total	100 μ L

- 连接预混液比较黏稠，将移液器调至80 μ L上下吹打10次混匀，快速离心使所有液体收集到试管底部并置于冰上。
- 将PCR管放置在PCR仪器中推进到20 $^{\circ}$ C孵育，运行以下程序

表11 接头连接反应程序

步骤	温度	时间
Lid temperature	OFF	N/A
Pre-cooling	4 $^{\circ}$ C	HOLD
Ligation	20 $^{\circ}$ C	15 min
HOLD	4 $^{\circ}$ C	HOLD

注意：连接后纯化前将样本维持在冰上可减少接头二聚体的产生。

连接产物纯化

建议使用康为世纪DNA纯化磁珠 (CW3171) 进行连接产物纯化回收。

- 提前30 min取出 CMPure 置于室温，使用前充分震荡混匀；
- 将连接产物转移至一新的1.5 mL离心管中。
- 吸取70 μ L CMPure (0.7X)至100 μ L产物中，充分震荡混匀，室温孵育5 min；
- 瞬时离心，将离心管置于磁力架，静置5 min至液体澄清，移液器吸取并弃掉上清；
- 保持离心管固定于磁力架上，加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇，室温静置30s，弃去上清；
注意：一定要使用新鲜配置的乙醇，否则会影响实验结果。
- 重复步骤5一次，最后一次尽量吸干管底液体，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底液体吸干；
注意：不要吸取磁珠，以免影响产量。

7. 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管管盖, 室温干燥3~5 min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。
8. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L洗脱液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0) 进行DNA 洗脱, 移液器吹打或充分震荡混匀并室温下溶解5 min;
9. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置5 min至液体澄清, 将20 μ L上清液全部转移到新的PCR管中, 进行下一步反应或者-20 $^{\circ}$ C保存。
安全停止点: 样本可以在-20 $^{\circ}$ C最多保存4周。

第二次连接后纯化 (可选)

注意: 这是一个可选步骤, 仅建议用于:

(1) 使用rRNA去除探针前处理时: 使用全长接头且起始量低于100 ng RNA; 使用截短型接头且起始量低于50 ng RNA。(2) 直接使用Total RNA建库时: 使用全长接头无论起始量是多少; 使用截短型接头且起始量低于2 ng RNA。

1. 提前30 min取出 CMPure置于室温, 使用前充分震荡混匀;
2. 吸取20 μ L CMPure (1X)至第一步纯化后的20 μ L上清液中, 充分震荡混匀, 室温孵育5 min;
3. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架, 静置5 min至液体澄清, 移液器吸取并弃掉上清;
4. 保持离心管固定于磁力架上, 加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30s, 弃去上清;
注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。
5. 重复步骤4一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 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底液体吸干。
注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。
6. 保持离心管固定于磁力架上, 打开离心管管盖, 室温干燥3~5 min, 直至磁珠无反光、无开裂;
注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。
7. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L洗脱液 (10mM Tris-HCl, pH 8.0) 进行DNA 洗脱, 移液器吹打或充分震荡混匀并室温下溶解5 min;
8. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置5 min至液体澄清, 将20 μ L上清液全部转移到新的PCR管中。
安全终止点: 样本可以在-20 $^{\circ}$ C 最多保存1个月

PCR扩增

1. 冰上解冻并平衡扩增预混液 (2X)。一旦融化, 充分颠倒或大力旋转混匀 (不要震荡)。
2. 按照下表设置PCR程序:

表12 文库扩增PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Initial denaturation	98°C	45 s	1
Denaturation	98°C	15 s	
Annealing	P5/P7 primers: 60°C ¹⁾ Indexed primers: 55°C ²⁾	30 s	参考表13
Extension	72°C	30 - 45 s	
Final extension	72°C	60 s	1
—	12°C	HOLD	—

注意: 1) P5/P7 Primer Mix (10X)适合的温度。

2) 截短型接头方案的退火温度使用 55°C。对于其他接头/引物, 参考实验前准备及重要注意事项。

注意: 表13是Total RNA建库前处理使用了rRNA去除探针后的建议循环数, 使用Total RNA直接建库的请参考附录3 (第23页)。

表13 RNA投入量对应所需循环数

RNA投入量	10-50 nM文库所需 PCR循环数	
	全长型接头	截短型接头
500ng	16-17	16-17
250ng	17-18	17-18
100ng	19-21	18-19
<100ng	21-23	19-20

3. 根据下表配置PCR反应体系:

表14 PCR反应混合液的配制

组分	体积
Amplification Master Mix (2X)	25 μ L
P5/P7 Primer Mix (10X) or User-supplied primers ¹⁾	5 μ L
纯化回收的接头连接产物	20 μ L
Total	50 μ L

注意: 1) 客户自备引物可参考相应说明书使用。

4. 涡旋混匀5s, 瞬时离心将反应液收集至管底。
5. 将上述PCR管置于PCR仪上并运行程序, 一旦程序结束, 立即进行扩增后纯化。

PCR产物纯化

建议使用康为世纪DNA纯化磁珠 (CW3171) 进行PCR产物纯化。

1. 提前30 min 取出 CMPure置于室温, 使用前充分震荡混匀;
2. 将PCR反应液转移至一新的1.5 mL离心管中; 吸取50 μ L (1x)体积 CMPure 至PCR产物中, 用移液器轻轻吹打或震荡充分混匀, 室温孵育5 min;
3. 短暂离心, 将离心管放于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需5 min), 小心吸取上清, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意: 不要弃除磁珠。

4. 保持离心管固定于磁力架上, 加入200 μ L 新鲜配制的80%乙醇, 室温静置30s, 弃去上清;

注意: 一定要使用新鲜配置的乙醇, 否则会影响实验结果。

5. 重复步骤4一次, 最后一次尽量吸干管底液体, 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底液体吸干。

注意: 不要吸取磁珠, 以免影响产量。

6. 保持离心管固定于磁力架上, 打开不粘管管盖, 室温干燥3~5 min, 直至磁珠无反光、无开裂;

注意: 切勿加热晾干, 切勿过度干燥磁珠, 否则会影响产量。

7. 将离心管从磁力架上取下, 加入22 μ L 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 涡旋振荡使磁珠完全重悬于离子水中, 室温静置5 min;

8. 瞬时离心, 将离心管置于磁力架上, 静置2 min至液体澄清, 将22 μ L上清液全部转移到新的PCR管中, 进行下一步反应或者-20 $^{\circ}$ C保存。

文库质控

1. 文库浓度检测一般有两种方法：一是基于双链DNA荧光染料的方法，如Qubit、PicoGreen等，二是基于qPCR绝对定量的方法。不建议使用基于光谱检测的方法，如 NanoDrop等。
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。

附录1 文库构建流程A中使用mRNA磁珠富集前处理或Total RNA直接建库时推荐的接头浓度

(1) 文库构建流程A中使用mRNA磁珠富集前处理时推荐的接头浓度

	RNA投入量 (ng)	接头浓度 (μM)
全长型接头	$\leq 50^{1)}$	0.3
	51 – 150	0.3
	151 – 1000	1
截断型接头	$< 10^{2)}$	1
	11 – 250	1
	251 – 1000	4

注意: 1) 当使用全长接头且投入量小于50 ng时, 推荐进行连接后的二次纯化。

2) 当使用截断型接头且投入量小于10 ng时, 推荐进行连接后的二次纯化。

(2) 文库构建流程A中使用Total RNA直接建库时推荐的接头浓度

	RNA投入量 (ng) ¹⁾	接头浓度 (μM)
全长型接头	$< 0.25^{2)}$	0.1
	$0.25 - 4^{2)}$	0.25
	5 – 29	1
	30 – 74	2.5
	≥ 75	7.5
截断型接头	< 0.25	0.25
	0.25 – 1	0.5
	1–4	2
	5 – 29	4
	30 – 74	10
	≥ 75	15

注意: 1) 当使用部分降解样本时, 降低接头的使用浓度或者进行连接后的二次纯化, 都可能对减少接头二聚体有帮助。

2) 当使用全长接头且投入量小于1 ng时, 推荐进行连接后的二次纯化

附录2 文库构建流程A中使用mRNA磁珠富集前处理或Total RNA直接建库时推荐的PCR扩增循环数

(1) 文库构建流程A中使用mRNA磁珠富集前处理时推荐的PCR循环数

RNA投入量 (ng)	10-50 nM文库所需 PCR循环数 ¹⁾
251 - 1000	8-9
101 - 250	10-12
51 - 100	12-13
11 - 50	13-15
2.5 - 10	16-18

注意: 1) 若需要290至310 bp插入片段时, 建议PCR产物纯化时加入0.7x磁珠进行纯化, 此时PCR扩增循环数需要额外增加2个PCR循环。

(2) 文库构建流程A中使用Total RNA直接建库时推荐的PCR循环数

RNA投入量 (ng)	10-50 nM文库所需 PCR循环数	
	全长型接头	截短型接头
100	8	7 ¹⁾
50	8-9	
25	9-10	8
10	10-11	8-9
5	11-12	9-10
1	14-15	10-11
<1	18-19	14-15

注意: 1) 建议至少进行6个扩增循环, 以确保保留转录本链起源信息。

附录3: 文库构建流程B中使用Total RNA直接建库时推荐的接头浓度和PCR扩增循环数

(1) 文库构建流程B中使用Total RNA直接建库时推荐的接头浓度

	RNA投入量 (ng) ¹⁾	接头浓度 (μM)
全长型接头 ¹⁾	<1	0.05
	1 - 4	0.1
	5 - 9	0.25
	≥10	0.5
截断型接头	<2 ²⁾	0.35
	2 - 4	0.5
	5 - 9	1
	≥10	2

注意: 1) 当使用全长接头时, 无论投入量多少, 都推荐进行连接后的二次纯化。

2) 当使用截断型接头且投入量小于2 ng时, 推荐进行连接后的二次纯化。

(2) 文库构建流程B中使用Total RNA直接建库时推荐的PCR循环数

RNA投入量 (ng)	10-50 nM文库所需 PCR循环数	
	全长型接头	截短型接头
100	9-10	8-9
50	11-12	9-10
25	13-14	11-12
10	14-15	12-13
5	20-21	16-17
1	25-26	20-21
<1	27-28	22-23