Stranded mRNA-seq Lib Prep Kit for Illumina

RK20301

使用说明书

Version: N17H17v4.0

目录

1. 产品概述 1
2. 产品组分 2
3. 保存及运输条件 3
4. 其他自备材料 3
5. 实验流程 4
6. 操作注意事项 5
7. 文库构建步骤 7
8. 附录 13
9. 附表 15

1. 产品概述

- ✧ 适合于 Illumina 测序平台；
- ✧ 适合样本：动植物，真菌等真核生物 RNA 样本；
- ✧ Total RNA 起始量在 10 ng-1 μg，推荐 RIN 值≥7；
- ✧ 试剂盒采用的是 RNA truncated Adapter，使用 PCR Index 进行 PCR 对每个样本添加独特的 index。Truncated Adapter 与 Full length Adapter 相比具有更高的连接效率，并且可以减少 Adapter dimer ；
- ✧ Stranded mRNA-seq Lib Prep Kit for Illumina® 包含有 Poly（A）mRNA Capture Module，Stranded mRNA-seq Lib Prep Module for Illumina 以及 Unique Dual Index for Illumina。mRNA 建库需要的所有缓冲液和酶都包含其中。
- ✧ 试剂盒在 Second strand cDNA 合成过程中掺入 dUTP 对其进行标记，在 PCR 富集文库前，使用 UDG 酶对该链进行水解消化，确保最终测序数据都来自 First Strand cDNA，保留 RNA 链方向，满足对链特异性 mRNA 建库的需求。
- ✧ 试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，且每一批次的建库 Kit 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质量稳定。

2. 产品组分

试剂盒模块	试剂管名称与颜色	24 RXN	96 RXN
Poly(A) mRNA Capture Module（RK20340）	2X Oligo d(T)$_{25}$ Capture Beads	1.2 mL	4.8 mL
	mRNA Binding Buffer	1.2 mL	4.8 mL
	Washing Buffer	9.6 mL	38.4 mL
	Tris Buffer	1.2 mL	4.8 mL
Stranded mRNA-seq Lib Prep Module for Illumina（RK20349）	2X Frag/Elute Buffer	144 μL	576 μL
	RT Strand Specificity Reagent	192 μL	768 μL
	First Strand Synthesis Enzyme Mix	48 μL	192 μL
	Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP	192 μL	768 μL
	Second Strand Synthesis Enzyme Mix	96 μL	384 μL
	Nuclease-free Water	1 ml X 2	8 mL
	End-prep Buffer	240 μL	960 μL
	End-prep Enzyme Mix	72 μL	288 μL
	Ligation Buffer	396 μL	1584 μL
	Ligase Mix	72 μL	288 μL
	2X PCR Mix	600 μL	1200 μl X 2
	UDG Enzyme	12 μL	48 μL
	Low EDTA TE	1 mL X 3	10 mL

代表管盖颜色。

试剂盒搭配 Illumina Truncated Adapter，因此必须通过 PCR 过程将文库结构补充完整，并为每个样本添加独特的 index 标记。根据需要可选择搭配的 Adapter module for Illumina 有：

产品名称	货号
Unique Dual Index for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21623
Unique Dual Index for Illumina Set_A (48 indices)	RK21624
Unique Dual Index for Illumina Set_B (48 indices)	RK21625
Unique Dual Index for Illumina Set_C (48 indices)	RK21626
Unique Dual Index for Illumina Set_D (48 indices)	RK21627

3. 保存及运输条件

Stranded mRNA-seq Lib Prep Kit for Illumina 包含三个 package：

货号	名称	储存温度
RK20340	Poly(A) mRNA Capture Module*	2~8℃
RK20349	Stranded mRNA-seq Lib Prep Module for Illumina	-20℃
RK21623~RK21627	Unique Dual Index for Illumina	-20℃

*：2X Oligo d(T)25 Capture Beads 不可-20℃保存，否则会影响 mRNA 捕获效率。

4. 其他自备材料

4.1. 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。

4.2. RNA 样本浓度和质量评估

Qubit 荧光定量仪

Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855)；

Nanodrop ；

Agilent RNA 6000 Pico chip (Agilent #5067-1513)

4.3. 文库质控

Qubit 荧光定量仪；

ABQubit dsDNA Quantitation Kit (ABclonal, Cat. RK30140)；

Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626)；

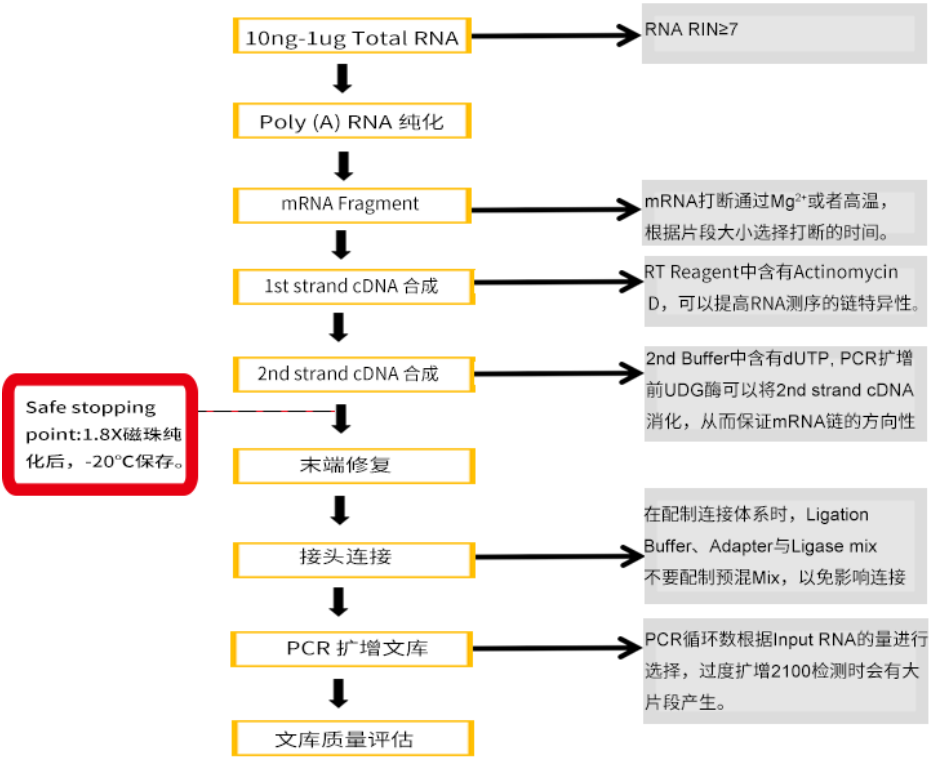
Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504)；

4.4. 其他试剂与耗材

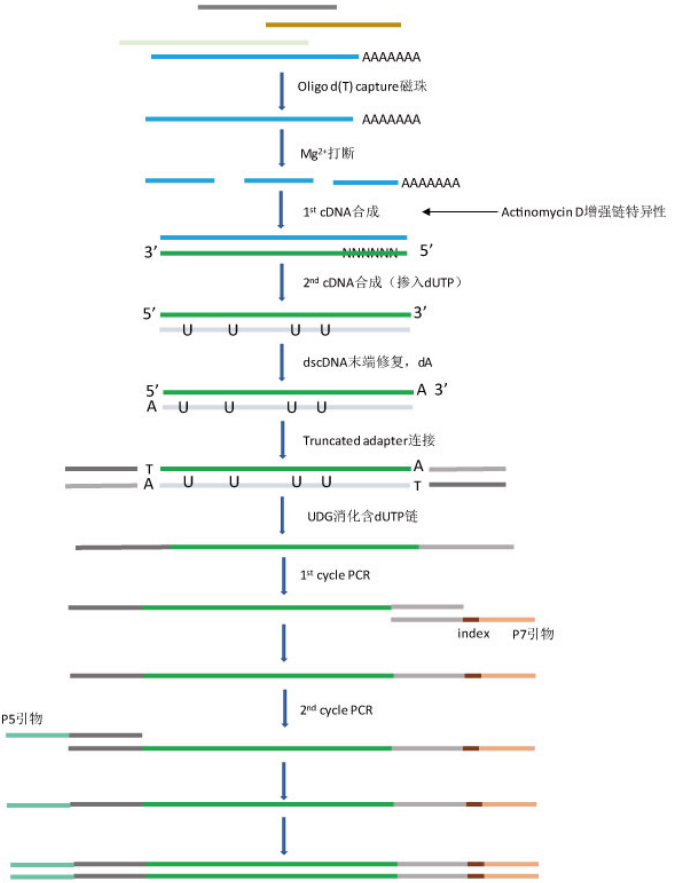
80%乙醇（新鲜配制）、磁力架、PCR 仪等。

5. 实验流程

实验流程图


10ng-1ug Total RNA
RNA RIN≥7
Poly (A) RNA 纯化
mRNA Fragment
mRNA打断通过Mg2+或者高温，根据片段大小选择打断的时间。
1st strand cDNA 合成
RT Reagent中含有Actinomycin D，可以提高RNA测序的链特异性。
2nd strand cDNA 合成
2nd Buffer中含有dUTP, PCR扩增前UDG酶可以将2nd strand cDNA消化，从而保证mRNA链的方向性
Safe stopping point:1.8X磁珠纯化后，-20°C保存。
末端修复
接头连接
在配制连接体系时，Ligation Buffer、Adapter与Ligase mix不要配制预混Mix，以免影响连接
PCR 扩增文库
PCR循环数根据Input RNA的量进行选择，过度扩增2100检测时会有大片段产生。
文库质量评估

实验原理示意图



6. 操作注意事项

6.1. RNA样品质控

6.1.1. 关于Total 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。

6.1.2. Total RNA起始量在10-1000 ng, RNA RIN值≥7， 投入量过低会影响正常的文库构建；对FFPE一些降解样本推荐使用rRNA Depletion Module系列产品富集mRNA 。

6.1.3. 针对植物或其他真核生物细胞RNA样本，如果RNA有降解但琼脂糖胶可以分别看到28S和18S条带，建议尝试加大Total RNA 投入量，且适当增加PCR循环数，也可以得到足量的文库。

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. Oligo (dT)25 Capture Beads和AFTMag NGS DNA Clean Beads 避免放入-20℃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Low EDTA TE 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

6.3.1. 文库峰形平滑无异常毛刺，且在130bp(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。

6.3.2. Total RNA质量合格(RIN值>7)，正常操作建库，建库不成功可能原因与解决方案如下：

Total RNA的RIN值是Total RNA的质量评估，并不能完全代表poly (A) RNA的丰度及完整性。对于部分特殊样本，虽然Total RNA的完整性较好，但有很多mRNA发生降解，导致poly (A) RNA纯化时损失较多，因而文库构建失败。如果遇到这种情况可以将poly (A) RNA纯化出来后，评估其丰度及完整性，方法是在实验过程步骤 7.1.10 结束后，加入6 μL的Tris Buffer，80℃加热2分钟，置于磁力架上，澄清后取上清液即为完整的poly (A) RNA，再取1 μL进行Agilent 2100 RNA 6000 Pico chip分析。

6.3.3. 根据分析结果判定，如果是mRNA丰度较低，可以增加Total RNA的建库投入量。如果是mRNA完整性较差，可以将mRNA的打断时间进行调整。

6.4. 操作规范

6.4.1. mRNA建库过程中应带口罩，手套。

6.4.2. poly (A) mRNA富集，在加入磁珠后均在室温条件下操作。

6.4.3. RNA样本冰上放置，并尽快进入下一步实验，避免RNA发生降解。

6.4.4. mRNA打断条件以及后续片段筛选需要按照说明书推荐范围进行选择，否则会影响文库大小及产量。

6.4.5. 磁珠纯化过程中，吸取上清液时，要小心操作，避免吸到磁珠，影响文库片段大小及产量。

6.4.6. 使用PCR Index时应小心，避免试剂与样本间的交叉污染。

6.4.7. 每一步反应的试剂可以提前配制预混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. 文库构建步骤

7.1. RNA 富集与片段化

此试剂盒操作要求起始材料为真核生物的 Total RNA 样本（带有 poly (A) 尾），且 RNA RIN score≥7。RNA 样本准备在冰上进行，其它过程均室温操作。

7.1.1. 将RNA取出冰上融解，取10-1000 ng Total RNA溶于50 μL Nuclease-free Water中，冰上放置备用。

7.1.2. 待2X Oligo (dT)25 Capture Beads恢复室温后涡旋混匀，取50 μL加入准备好的RNA溶液中，吹打混匀。

7.1.3. 将混合物放入PCR仪中进行孵育（热盖温度≥75℃）：

温度	时间
65℃	5 min
25℃	5 min

7.1.4. 孵育结束后，取出离心管置于磁力架上约2 min，至溶液变澄清，弃上清。

7.1.5. 加入200 μL Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清。

7.1.6. 将PCR管从磁力架上取出，加入50 μL Tris Buffer，吹打混匀后PCR仪上孵育（热盖温度105℃）：

温度	时间
80℃	2 min

7.1.7. 降至室温后，加入50 μL mRNA Binding Buffer，吹打混匀，室温静置5 min。

7.1.8. 将离心管置于磁力架上约2 min，至溶液澄清，弃掉上清。

7.1.9. 加入200 μL Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清。

7.1.10.盖上管盖瞬时离心后，置于磁力架上，用10 μL移液器将残留液体完全弃除。

7.1.11.按照下表配制 Frag/Elute Buffer：

	试剂	体积
●	2X Frag/Elute Buffer	6 μL
○	Nuclease-free Water	6 μL
	总体积	12 μL

7.1.12.加入11 μL Frag/Elute Buffer，吹打混匀后，按照下表程序进行RNA洗脱并打断（热盖温度105℃）：

打断片段大小	打断条件
200-300 nt	94℃ 15 min，4℃ Hold
300-450 nt	94℃ 10 min，4℃ Hold
400-700 nt	94℃ 5 min，4℃ Hold

7.1.13.当温度降至4℃时，将离心管取出，瞬时离心，置于磁力架上，待溶液澄清后，取上清液10 μL至另一个PCR管中，立即进行7.2. First strand cDNA 的合成。

7.2. First strand cDNA 的合成

7.2.1. 取出 RT Strand Specificity Reagent 室温融解混匀后，冰上配制如下体系：

试剂	体积
打断后 mRNA**	10 μL
RT Strand Specificity Reagent*	8 μL
First Strand Synthesis Enzyme Mix*	2 μL
总体积	20 μL

* ：可以提前配制预混 Mix，按样本数的 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够；

**：2X Frag/Elute Buffer 中包含 First strand cDNA 合成必须的 Random Primer，执行此步骤时，请确保已添加 2X Frag/Elute Buffer。

7.2.2. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪（热盖温度 105℃）：

温度	时间
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	Hold

7.3. Second Strand cDNA 的合成

7.3.1. 将 Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP 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
First strand cDNA（步骤 7.2.2 产物）	20 μL
Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP *	8 μL
Second Strand Synthesis Enzyme Mix*	4 μL
Nuclease-free Water*	48 μL
总体积	80 μL

* ：可以提前配制预混 Mix，按照样本数 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够。

7.3.2. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心后，将样本置于 PCR 仪（热盖温度关闭）：

温度	时间
16℃	1hr

7.3.3. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

7.3.4. 样本孵育结束后，每个样本加入 144 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.8X)，枪头吹打混匀；

7.3.5. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

7.3.6. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；

7.3.7. 重复 7.3.6，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.3.8. 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 40 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.3.9. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 37 μL 上清至另一离心管中；

✧ 双链 cDNA 洗脱产物可在-20℃暂存 24 小时。

7.4. 末端修复

7.4.1. 将 End-prep Buffer 从冰箱中取出，冰上融解后配制如下体系：

试剂	体积
双链 cDNA（步骤 7.3.9 产物）	37 μL
End-prep Buffer*	10 μL
End-prep Enzyme Mix*	3 μL
总体积	50 μL

* ：可以提前配制预混 Mix，按照样本 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够。

7.4.2. 枪头吹打混匀，瞬时离心，PCR 仪上进行如下孵育（热盖温度 75℃）：

温度	时间
20℃	30 min
65℃	30 min
4℃	Hold

7.5. 接头连接

7.5.1. 将 Ligation Buffer，Truncated Adapter 取出冰上融解，在冰上配制接头连接体系：

试剂	体积
End-prep DNA（步骤 7.4.2 产物）	50 μL
Ligation Buffer*	16.5 μL
Truncated Adapter**	2.5 μL
Ligase Mix	3 μL
总体积	~70 μL

* ：Ligation Buffer 含有 PEG 比较粘稠，操作时需要慢吸慢打，避免因操作体积误差导致后续片段筛选产物的大小；

** ：Adapter 为截短型接头，不适合于 PCR-free 的建库，必须进行扩增；

注意：在配制连接体系时，Ligase Mix 与 Truncated Adapter 不要配制预混 Mix，以免产生接头二聚体影响连接效率。

7.5.2. 吹打混匀，瞬时离心，PCR 仪上进行连接反应（热盖温度关闭）：

温度	时间
22℃	15 min

7.6. 连接产物纯化

连接反应结束后，可执行直接纯化或片段筛选任意一种连接产物纯化方案。

方案一：连接产物直接纯化

当Input total RNA<100 ng或对无文库片段长度要求时，执行如下操作：。

7.6.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀；

7.6.2. 连接反应结束后，在产物中加入 56 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads(0.8X)，吹打混匀；

7.6.3. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

7.6.4. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；

7.6.5. 重复 7.6.4，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.6.6. 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 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.6.7. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 19.5 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用；

方案二：连接产物直接片段筛选

当 input total RNA≥100 ng 时，根据所需目的文库片段大小，参考表格 1 推荐的磁珠分选比例，执行片段分选。操作步骤如下（以 94℃ 10 min 打断，分选文库大小为 420-570 bp 为例）：

7.6.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀；

7.6.2. 在连接体系中加入 30 μL Nuclease-free Water，共 100 μL 体系；

7.6.3. 再加入 30 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（0.30X），吹打混匀；

7.6.4. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清（切勿丢弃上清）；

7.6.5. 将上清转移至另一离心管中，加入 20 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（0.2X），吹打混匀；

注：根据文库片段大小更改两轮磁珠使用比例（文字已标灰），参考表格 1。

7.6.6. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清，小心弃除上清；

7.6.7. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；

7.6.8. 重复 7.6.7，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.6.9. 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 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.6.10. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 19.5 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用；

表格1. 直接片段筛选磁珠比例推荐表

打断条件	94℃ 15 min	94℃ 10 min	94℃ 5 min
RNA 片段大小	200-300 nt	300-450 nt	400-600 nt
文库片段大小	320-420 bp	420-570 bp	520-720 bp
第一轮磁珠比例	0.35X（35 μL）	0.3X（30 μL）	0.25X（25 μL）
第二轮磁珠比例	0.2X（20 μL）	0.2X（20 μL）	0.15X（15 μL）

注：更多片段筛选磁珠比例及文库大小分布见附录 8.2。

方案三：连接产物纯化后片段筛选

接头连接体系中的 Ligation Buffer 含有 PEG 成分，增强了片段分选体系的灵敏度，磁珠体积误差容易导致片段的偏移。如果对片段要求比较高，推荐先进行纯化再进行片段分选。具体步骤如下（以 94℃ 10 min 打断，分选文库大小为 420-500 bp 为例）：

7.6.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

7.6.2. 连接反应结束后，在产物中加入 70 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X)，吹打混匀；

7.6.3. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

7.6.4. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；

7.6.5. 重复 7.6.4，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.6.6. 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 102.5 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.6.7. 室温静置 2 min，将离心管置于磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 100 μL 上清至另一新的 PCR 管中进行片段分选。

7.6.8. 加入 65 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（0.65 X 100 μL）至纯化后的连接产物中，吹打混匀；

7.6.9. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清（切勿丢弃上清）；

7.6.10.将 160 μL 上清转移至另一离心管中，加入 10 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（0.1 X 100 μL），吹打混匀；

注：根据文库片段大小更改两轮磁珠使用比例（文字已标灰），参考表格 2。

7.6.11.室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清，小心弃除上清；

7.6.12.将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；

7.6.13.重复 7.6.12，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.6.14.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 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.6.15.室温静置 2 min，将离心管置于磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用；

表格2. 纯化后片段筛选磁珠比例推荐表

打断条件	连接产物纯化	第一轮磁珠比例	第二轮磁珠比例	文库片段大小 (bp)
94℃ 5 min	1.0X 磁珠纯化	0.55X (55 μL)	0.1X (10 μL)	600-720
94℃ 10 min		0.6X (60 μL)	0.1X (10 μL)	500-600
		0.65X (65 μL)	0.1X (10 μL)	420-500
94℃ 15 min		0.75X (75 μL)	0.1X (10 μL)	360-420
		0.8X (80 μL)	0.1X (10 μL)	320-360

注：以上所有数据均为内部测试数据，因为连接体系与片段筛选体系密切相关且比较灵敏，个人操作习惯或移液器使用误差均可能导致片段大小发生偏移：如果得到文库片段偏大，建议增加第一轮磁珠的用量；如果得到文库片段偏小，建议减少第一轮磁珠的用量；调整比例可按照偏差大小进行调整，变化比例在 0.01X-0.05X。

7.7. PCR 扩增文库与纯化

7.7.1. 根据所选接头试剂盒配置相应 PCR 体系，进行文库扩增：

试剂	体积
连接纯化后产物	19.5 μL
2X PCR Mix	25 μL
UDG Enzyme	0.5 μL
UDI Primer*	5 μL
总体积	50 μL

* UDI primer 是已预混的 P5 端和 P7 端 index 标记的 primer，取用时需要小心，每取用一次必须更换枪头，避免样本与试剂产生交叉污染，影响样本测序结果；

7.7.2. 吹打混匀，微离心，参考下表设置 PCR 程序并进行 PCR 反应（热盖温度 105℃）：

温度	时间	Cycles
37℃	10 min	1
98℃	1 min	1
98℃	10 s	8-16* （详请参考表格 3）
60℃	15 s	
72℃	30 s	
72℃	1 min	1
4℃	Hold	

注：由于不同物种及组织提取的 mRNA 含量不同，实际循环数需要根据 Total RNA 样品的提取质量，物种组织类型，样本处理情况等调整扩增循环数。

表格3. PCR循环数推荐表

Total RNA	直接纯化 循环数选择	片段分选 循环数选择
10 ng	15-16	/
100 ng	12-13	14-15
1 μg	8-9	10-11

7.7.3. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

7.7.4. PCR 反应结束后，每个反应管中加入 40 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads（0.8X），吹打混匀；

7.7.5. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

7.7.6. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；

7.7.7. 重复 7.7.6，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.7.8. 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 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.7.9. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 30 μL 文库至另一新的离心管中，留存备用。

8. 附录

8.1. RNA打断片段分布

mRNA 纯化来自小鼠组织 total RNA（1 μg），mRNA 使用 1X Frag/Elute Buffer 分别于 94℃打断 5、10、15 分钟后，磁力架上取上清，使用 2.2X 体积的 Agencourt RNAClean XP beads 进行纯化。使用 Agilent RNA 6000 Pico chip 进行片段大小分析。

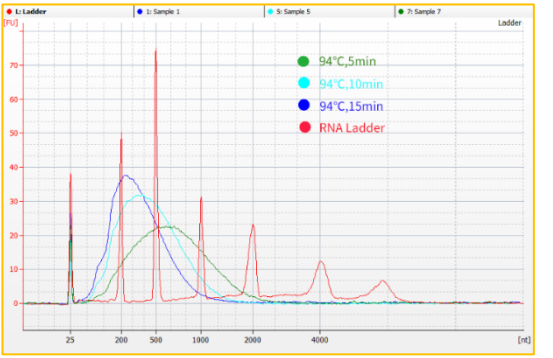


图1. mRNA打断片段分布2100分析图。

8.2. 片段筛选磁珠比例及文库大小分布

8.2.1. 以下为执行连接产物直接片段筛选的文库大小分析结果：

图2. 直接片段筛选文库片段大小分布2100分析图。

1 μg 小鼠细胞 total RNA 起始构建文库，使用不同片段分选条件，PCR 10 cycles 得到的文库，将文库稀释至 2 ng/μL，使用 Agilent high sensitivity DNA Chips 进行 2100 Bioanalyzer 分析。

8.2.2. 以下为执行连接产物直接片段筛选（方案二）操作，使用其他磁珠比例的文库大小分析结果：

表格3. 其他片段筛选磁珠比例及文库大小分布

mRNA 打断条件	第一轮磁珠比例	第二轮磁珠比例	文库片段大小（bp）
94℃ 5 min	0.25X (25 μL)	0.1X (10 μL)	500-700
94℃ 10 min	0.3X (30 μL)	0.1X (10 μL)	450-550
94℃ 15 min	0.35X (35 μL)	0.1X (10 μL)	350-450

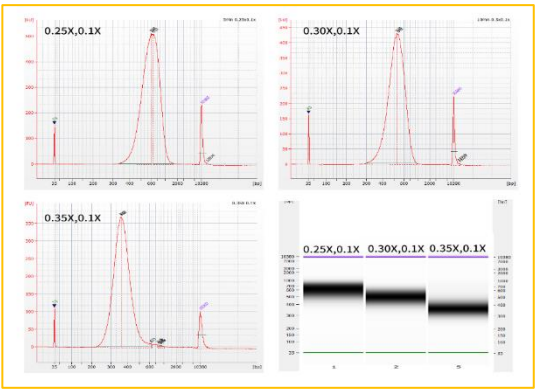


图3. 直接片段筛选文库片段大小分布2100分析图（其他磁珠比例）。

1 μg 小鼠细胞 total RNA 起始构建文库，使用方案 2 不同片段分选条件，PCR 10 cycles 得到的文库，将文库稀释至 2 ng/μL，使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行峰形分析。

8.2.3. 以下为执行表格2. 纯化后片段筛选磁珠比例（方案三）的文库大小分析结果：

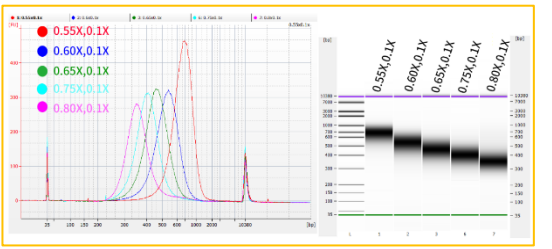


图4. 纯化后片段筛选文库片段大小分布2100分析图。

9. 附表

Index 信息详见接头试剂盒对应货号说明书。

表格4. 试剂盒兼容接头及Index类型汇总

Index 类型	产品名称	货号
双端唯一 (8-base)	Unique Dual Index for Illumina MiniSet (8 indices)	RK21622
	Unique Dual Index for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21623
	Unique Dual Index for Illumina Set_A (48 indices)	RK21624
	Unique Dual Index for Illumina Set_B (48 indices)	RK21625
	Unique Dual Index for Illumina Set_C (48 indices)	RK21626
	Unique Dual Index for Illumina Set_D (48 indices)	RK21627

注：ABclonal Illumina 截短型接头试剂盒中的引物均适用本试剂盒。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：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