

xLibPreP™通用型 RNA 建库试剂盒(illumina)

操作说明书

(Cat#NR005, Version1.0)

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co., Ltd

For Research Use Only.

Not For Use in Diagnostic Procedures.

仅供科研使用

目录

产品概述	1
实验流程	2
产品组成	3
保存及运输条件	3
适用范围	3
注意事项	4
实验前准备	5
实验流程	7
1. RNA 片段化及一链 cDNA 合成	7
2. 二链合成及末端修复加 A	9
3. 接头连接	10
4. 文库 PCR 富集	13
附录	15

产品概述

xLibPreP™通用型 RNA 建库试剂盒 (illumina) 是针对 illumina 高通量测序平台定向开发的转录组文库构建专用试剂盒。本试剂盒包含两种类型的 Second Strand Buffer，可根据实验需要选择普通转录组以及链特异性转录组实验。

试剂盒进行了二链试剂的优化，将二链合成、末端修复加 A 步骤合并为一步，且中间不需要纯化步骤，极大的简化了操作步骤以及节省了操作时间。优化了反应体系后，能够包容更多样的 RNA 样本，提高了文库的转化效率，能够对不同起始量的 RNA 样本均有兼容性。本产品对于 10 ~ 1000 ng 起始量的 RNA 具有良好的兼容性，适用于各种类型样本。本产品提供了简便快速的建库流程，可在 2.5 小时内完成建库实验，极大地缩短了操作时间。

主要实验步骤如下：



图 1. xLibPreP™通用型 RNA 建库试剂盒 (illumina) 操作流程图

实验流程

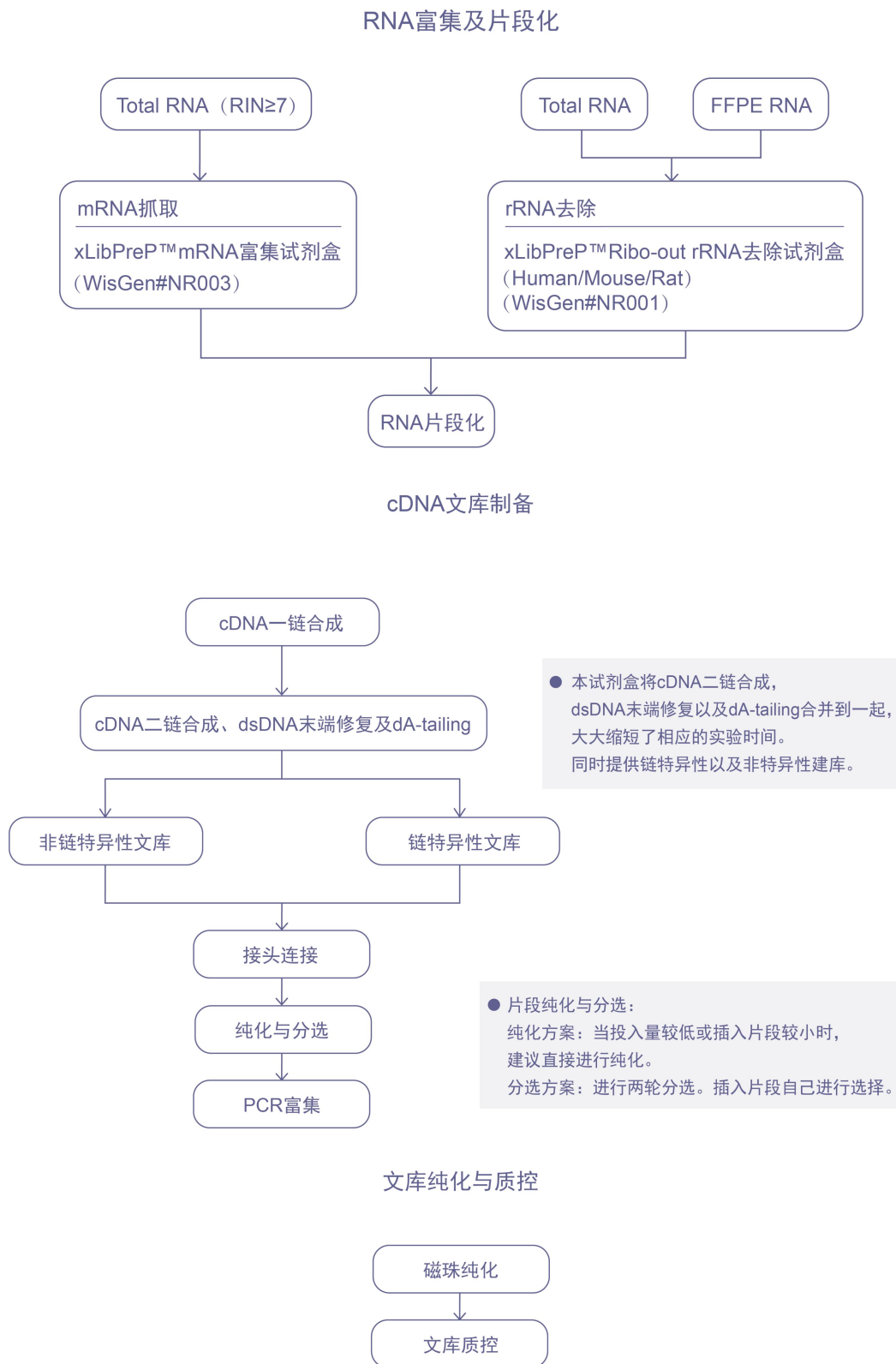


图 2. xLibPreP™通用型 RNA 建库试剂盒（illumina）实验流程图

产品组成

主货号：NR005 规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns(NR005-024)	96 rxns(NR005-096)
● 2x Fragment Buffer	192 μ L	768 μ L
● USIV Buffer	240 μ L	960 μ L
● EnzySyn UniScript IV Enzyme Mix	48 μ L	192 μ L
● 2nd Strand Reaction Buffer(dNTP)	240 μ L	960 μ L
● 2nd Strand Reaction Buffer(dUTP)	240 μ L	960 μ L
● 2nd Strand Enzyme	240 μ L	960 μ L
● Ligation Buffer	240 μ L	960 μ L
● Ligase Enzyme	120 μ L	480 μ L
● 2× HiFi Master Mix	600 μ L	2400 μ L
○ YWG UDI Index Primer plate	5*24 rxns (20 μ mol/each)	5*96 rxns (20 μ mol/each)
● YWG RNA Stubby Adapter	72 μ L	288 μ L

保存与运输条件

-30 ~ -15 °C保存，≤ 0 °C运输。

适用范围

本产品适用于 illumina 高通量测序平台的文库构建。

1. 兼容样本类型

本试剂盒适用于完整度良好的动、植物及真菌等真核生物总 RNA、经 Poly (A) 磁珠富集后的 mRNA，经 rRNA 探针去除后的 RNA 文库的构建。不同样本 Total RNA 中 mRNA 的含量差异较大，若 Total RNA 的投入量过低，则不能确保得到足够量的 mRNA 进行后续文库的构建。

2. RNA 起始量

10 ~ 1000 ng。

注意事项

1. RNA 样品质控

- 1.1** 总 RNA 模板的起始量应 $\geq 10\text{ng}$ ，若起始投入量过低，则会因为 mRNA 量过低而影响后续文库构建。
- 1.2** 使用 poly (A) mRNA 富集进行实验，请保证 RNA 样本的 RIN 值 ≥ 7 ，若 RIN 值 < 7 ，建议使用 Ribo-out rRNA 去除法进行实验。
- 1.3** 对于一些植物或其他真核生物样本，若样本有降解但能看出 18s 以及 28s 的条带，建议增加 Total RNA 的投入量，或适当增加循环数以进行实验。

2. 操作过程注意事项

- 2.1** 操作过程请注意避免核酸样本和产物之间的交叉污染。
- 2.2** 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的吸头、离心管进行实验。
- 2.3** 实验开始前，请清洁操作台，确保没有 RNA 酶和 DNA 的污染。
- 2.4** 进行文库扩增前，请确保 PCR 仪已经调试好并处于稳定的状态。
- 2.5** 为了防止 Adapter 发生自连，Adapter 需单独添加，不可以与 Ligation Buffer 和 Ligase Enzyme 提前预混。
- 2.6** 分选磁珠使用前，请务必置于室温下平衡 30 min 后使用。
- 2.7** 80%乙醇溶液需当天配置，避免由于乙醇挥发，导致文库建库失败。
- 2.8** 试剂盒中所有酶制剂在使用完毕后，应立即置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行保存，以免降低酶的活性，影响建库结果。
- 2.9** 实验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停实验，或者无需立即进行下游实验，可根据说明书的推荐步骤，将实验产物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并安排后续实验。

实验前准备

1. RNA 准备

本试剂盒不包含 RNA 前处理步骤，如需进行 mRNA 富集以及 rRNA 去除相关实验步骤，具体操作请参考相关产品说明。

2. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen# MB002	xPure™ 分选磁珠	也可使用 Agencourt® AMPure XP Beads 进行代替
WisGen# NR001	xLibPrep™ Ribo-out rRNA 去除试剂盒 (Human/Mouse/Rat)	
WisGen# NR003	xLibPrep™ mRNA 富集试剂盒	
*	Nuclease-Free Water	/
*	无水乙醇	/
*	0.1× TE Buffer	/

⬆ * 常规实验室供应商品牌即可

3. 自备材料

实验仪器及耗材

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	PCR 基因扩增仪	/
*	微型离心机	/
*	涡旋振荡混匀仪	/
*	移液器	单通道或多通道
Thermo Fisher# Q33216	Qubit® 3.0 Fluorometer	可选择基于荧光染料法的 DNA 定量系统的其它同类产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
Agilent#G2939AA	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system	或其它同类产品
WisGen#MR-C-16	xMag™ 磁力架 (0.2 mL*16 孔)	或其它同类产品
WisGen#QC001-R	xQuant™ 管 (适配 Qubit® 平台)	可选择适配 Qubit® 荧光计的其它同类产品
WisGen#QC002-R	xQuant™ 检测联管 (适配 Qubit® 平台)	可选择适配 Qubit® Flex 荧光计的其它同类产品
Axygen#PCR-02-C	0.2 mL 透明平盖 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的 其它同类产品
Axygen# PCR-0208-C	0.2 mL 八连排透明 PCR 薄壁管	可选择无核酸酶的 其它同类产品
Axygen# MCT-060-L-C	0.5 mL 低吸附离心管	可选择低吸附的 其它同类产品
*	1.5 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶的 产品
*	1000 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	200 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品
*	0.5 - 10 µL 吸头	建议选择无核酸酶 带滤芯的产品

⬆️ * 常规实验室供应商品牌即可

实验流程

1. RNA 片段化及一链 cDNA 合成

1.1 RNA 片段化

1.1.1 试剂准备

1.1.1.1 在开始实验前，确定是否进行样本是否需要 mRNA 富集以及 rRNA 去除相关实验，若需要进行相关实验，请先进行相应实验，在进行对应 RNA 片段化步骤。

1.1.1.2 将试剂盒中各组分置于冰上融化后颠倒混匀，瞬时离心后备用。

1.1.2 实验步骤

1.1.2.1 取 0.2 mL PCR 管，按照下表配制反应体系，加入各组分，请务必在冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
● 2x Fragment Buffer	8
RNA 实验样本	X
Nuclease-Free Water	8 - X
总体积	16

！ 注意：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系，并在此基础上增加体系 10%，以避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

1.1.2.2 根据插入片段大小的需要，选择对应的片段化条件，热盖温度设置为 105 °C。

插入片段大小 (bp)	温度 (°C)	时间 (min)
150-200	94	8
200-300	94	5
250-450	85	6
450-550	85	5

1.1.3 将步骤 1.1.2.1 的反应液完全涡旋混匀后，瞬时离心 30 sec，立即置于 PCR 仪中，并启动反应程序。

! 注意：将装有反应液的 PCR 管离心后，请注意不要产生气泡，以免影响 PCR 反应。

1.1.4 反应结束后，取 13μL 产物至新的 0.2mL 离心管中，并立即进行后续实验。

1.2 cDNA 一键合成

1.2.1 取出步骤 1.1.4 的 RNA 片段化产物，按照下表配制反应体系，加入各组分，请务必在冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
● USIV Buffer	10
● EnzySyn UniScript IV Enzyme Mix	2
RNA 片段化产物	13
总体积	25

! 注意：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系，并在此基础上增加体系 10%，以避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

1.2.2 按照下表设置 PCR 程序，热盖设置为 105°C：

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	25	10
2	42	15
3	70	15
4	4	Hold

1.2.3 将步骤 1.2.1 的反应液完全涡旋混匀后，瞬时离心 30 sec，立即置于 PCR 仪中，并启动反应程序。

! 注意：将装有反应液的 PCR 管离心后，请注意不要产生气泡，以免影响 PCR 反应。

2. 二链合成及末端修复加 A

2.1 取出步骤 1.2.3 的产物，按照下表配制反应体系，加入各组分，请务必在冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
● *2nd Strand Reaction Buffer(dNTP)	10
● *2nd Strand Reaction Buffer(dUTP)	10
● 2nd Strand Enzyme	10
一链合成（步骤 1.2.3）的产物	25
总体积	45

！ 注意：* 根据进行的相关实验，选择合适的 Strand Reaction Buffer 进行实验，若需要进行链特异性建库，则选择 Strand Reaction Buffer（dUTP）进行；若不进行链特异性建库，则选择 Strand Reaction Buffer（dNTP）进行即可。

！ 注意：对于多个反应，请计算所需试剂的总体系，并在此基础上增加体系 10%，以避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

2.2 按照下表设置 PCR 程序，热盖设置为 105℃：

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	16	30
2	72	15
3	4	Hold

2.3 将步骤 2.1 的反应液完全涡旋混匀后，瞬时离心 30 sec，立即置于 PCR 仪中，并启动反应程序。

！ 注意：将装有反应液的 PCR 管离心后，请注意不要产生气泡，以免影响 PCR 反应。

2.4 反应结束后，立即进行后续实验。

3. 接头连接

3.1 为了保证接头的连接效率和文库产量，对于低起始量样本，建议用 1× TE Buffer 稀释后进行使用，具体用量请参考下表：

Input RNA (ng)	接头稀释倍数	浓度 (μM)
≥ 200	无需稀释	15
199 ~ 100	2 倍稀释	7.5
99 ~ 50	5 倍稀释	3
49 ~ 10	10 倍稀释	1.5

！ 注意：配套 Adapter (WisGen) 系列及产品原始浓度为 15 μmolL。

3.2 取出步骤 2.3 的 cDNA 合成产物，加入相应用量接头，如下表所示。

组分	体积 (μL)
cDNA 合成（步骤 2.3）产物	45
● Adapter *	2
Nuclease-Free Water	3
总体积	50

！ 注意：避免 Adapter 发生自连，Adapter 需单独添加，不可以与 Ligation Buffer 和 Ligase Enzyme 预混。

3.3 按照下表所示各组分用量配制反应体系，加入各组分，请务必在冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
步骤 3.2 混液	50
● Ligation Buffer	10
● Ligase Enzyme	5
总体积	65

！ 注意：对于多个反应，请计算所需试剂的总体积，并在此基础上增加 10%，涡旋混匀，再依次分装到 PCR 管中，避免因溶液转移过程中挂壁损失而造成分装反应数不足的问题。

3.4 按照下表设置 PCR 程序：

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	22	15
2	4	∞

！ 注意：此步骤如果使用 PCR 仪进行反应，请不要启动热盖，否则热盖温度过高，将导致 PCR 管反应温度高于设置温度。

3.5 将步骤 3.3 的反应液完全涡旋混匀后，瞬时离心 30 sec，立即置于 PCR 仪中，并启动反应程序。

！ 注意：将装有反应液的 PCR 管离心后，请注意不要产生气泡，以免影响 PCR 反应。

3.6 接头连接产物的纯化推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads，向反应产物中加入 35μL Nuclease-Free Water 后，再加入 0.8× 体积 (80 μL) 磁珠进行纯化，具体步骤如下：

3.6.1 将磁珠置于室温平衡 30 min，使用前涡旋或者振荡混匀。

！ 注意：磁珠使用前，必须室温平衡 30 min，否则影响 RNA 的回收率及片段筛选。

3.6.2 接头连接程序结束后，取出 0.2 mL PCR 管静置 5 min，平衡至室温，向步骤 3.4 的连接产物中加入 35μL Nuclease-Free Water 后，再加入 0.8× 体积 (80 μL) 磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

3.6.3 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器小心吸弃上清，注意不要吸到磁珠。

3.6.4 将 PCR 管置于磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），弃除上清。

3.6.5 重复步骤 3.6.4 一次。

3.6.6 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，置于磁力架上，用小量程的移液器小心将残留液去除，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

! 注意：干燥至磁珠界面无明显水珠即可，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，RNA 回收率降低。

3.6.7 加入 21 μ L Nuclease-Free Water 或者 0.1 \times TE Buffer 至 PCR 管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 20 μ L 上清至新的 PCR 管中，用于后续的 PCR 富集实验。

4. 文库 PCR 富集

4.1 将 2× HiFi Master Mix 和 PCR Primer Mix 置于冰上融化，短暂混匀。

4.2 按照下表配制 PCR 反应体系，注意此步骤需于冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
纯化后的连接产物 (步骤 3.5.7)	20
● 2× HiFi Master Mix *	25
○ PCR Primer Mix	5
总体积	50

⬆ * 2× HiFi Master Mix 请在其它试剂或样本加入后再添加，避免酶活降低。

4.3 按步骤 4.2 中配制好的 PCR 反应液，轻柔吸打 6 ~ 8 次混匀或振荡混匀 10 sec。

⚠ 注意：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。

4.4 瞬时离心后将 PCR 反应管置于 PCR 仪内，按照步骤 4.5 的反应程序进行扩增。

4.5 按下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置为 105 °C。

步骤	温度 (°C)	时间	循环数 (cycles)
预变性	98	1 min	1
变性	98	10 sec	9~ 18 *
退火	60	30 sec	
延伸	72	30 sec	
完全延伸	72	1 min	1
Hold	4	∞	1

⬆ * 从不同物种和个体提取的等量总 RNA 中，mRNA 的占比也不一定相同。根据物种实际情况，可适当调整 PCR 循环数，一般为 9 - 18 个循环。

⬆ * 循环数具体参数可参考下表：

RNA 起始投入量	PCR 循环数推荐 (cycles)
>1 μg	9 ~ 10
1 μg	11 ~ 12
500ng	13 ~ 14
100ng	15 ~ 16
10ng	17 ~ 18

4.6 当 PCR 样品温度降至 4 °C，从 PCR 仪中取出 PCR 产物进行纯化，推荐用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads 进行纯化（如需进行分段分选，参考附录，具体步骤如下：

4.6.1 将磁珠置于室温平衡 30 min，使用前涡旋或者振荡混匀。

! 注意：磁珠使用前，务必置于室温平衡 30 min，否则影响分选片段及 RNA 回收率。

4.6.2 扩增程序结束后，加入 0.9× 体积（45 μL）的磁珠至步骤 4.5 的扩增产物中，充分吸打混匀 30 sec。

4.6.3 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器吸弃上清。

4.6.4 在 PCR 管中，加入 200 μL 80% 乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

4.6.5 重复步骤 4.6.4 一次。

4.6.6 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，放于磁力架上，用小量程的移液器小心去除残留的上清液，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

! 注意：干燥至磁珠界面无明显水珠，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，RNA 回收率降低。

4.6.7 加入 25 μL Nuclease-Free Water 或者 0.1× TE Buffer 至 0.2 mL PCR 管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮。室温静置 5 min 后，将反应管放置于磁力架上 2 min，使磁珠完全贴壁后，将上清转移至新的 0.2 mL PCR 管中，直接用于后续实验或 -20 °C 保存。

附录

1. 连接后两轮纯化方案

1.1 若对产物片段集中程度要求较高，可选择两轮纯化进行实验。

1.2 推荐用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads，具体步骤如下：

! 注意：如果文库体积不足 100 μ L，需用 Nuclease-Free Water 补足，随后进行片段筛选。

1.3 从 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 冰箱中把磁珠取出，室温平衡至少 30 min。

! 注意：磁珠使用前，必须在室温下放 30 min，避免影响 RNA 回收率及片段大小。

1.4 将磁珠涡旋振荡或颠倒混匀，避免因磁珠未混匀，导致纯化片段大小或者浓度出现较大误差。

1.5 接头连接程序结束后，取出 0.2 mL PCR 管静置 5 min，平衡至室温，向连接产物中加入 35 μ L Nuclease-Free Water 后，再加入 0.6 \times 体积 (60 μ L) 磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

1.6 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器小心吸弃上清，注意不要吸到磁珠。

1.7 将 PCR 管置于磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），弃除上清。

1.8 重复步骤 1.7 一次。

1.9 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，置于磁力架上，用小量程的移液器小心将残留液去除，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

! 注意：干燥至磁珠界面无明显水珠即可，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，RNA 回收率降低。

1.10 加入 52 μL Nuclease-Free Water 或者 $0.1\times$ TE Buffer 至 PCR 管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 50 μL 上清至新的 PCR 管中，用于后续的纯化。

1.11 向步骤 1.10 的上清中加入 $0.8\times$ 体积（40 μL ）磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

1.12 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器小心吸弃上清，注意不要吸到磁珠。

1.13 将 PCR 管置于磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），弃除上清。

1.14 重复步骤 1.13 一次。

1.15 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，置于磁力架上，用小量程的移液器小心将残留液去除，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

! 注意：干燥至磁珠界面无明显水珠即可，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，RNA 回收率降低。

1.16 加入 21 μL Nuclease-Free Water 或者 $0.1\times$ TE Buffer 至 PCR 管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min。

1.17 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 20 μL 上清至新的 PCR 管中，用于后续的 PCR 富集实验。

2. 片段分选

2.1 当 Input RNA \geq 100ng 时，且使用 Ribo-out rRNA 去除法进行建库的方案时，推荐连接后产物先使用 0.85 \times 纯化，再根据所需要文库的大小，进行片段分选（分选磁珠推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads），磁珠分选比例可参考下表：

打断条件	94°C 5min	94°C 5min	85°C 6min	85°C 6min	85°C 5min
片段大小(bp)	200 bp ~300 bp	200 bp ~300 bp	250 bp ~450 bp	250 bp ~450 bp	450 bp ~550 bp
文库大小(bp)	350 bp ~400 bp	400 bp ~450 bp	400 bp ~450 bp	450 bp ~500 bp	500 bp ~600 bp
第一轮磁珠比例 (磁珠体积: RNA 体积)	0.7 \times	0.7 \times	0.65 \times	0.65 \times	0.55 \times
第二轮磁珠比例 (磁珠体积: RNA 体积)	0.2 \times	0.1 \times	0.2 \times	0.1 \times	0.1 \times

! 注意：分选磁珠比例为磁珠体积和 RNA 体积的比值，若分选 350 bp 左右文库，文库体积 100 μ L，使用 0.7x-0.2x 分选，则第一轮分选磁珠使用 $0.7 \times 100 = 70$ μ L，第二轮分选磁珠使用 $0.2 \times 100 = 20$ μ L。

2.2 以 0.7 \times - 0.2 \times 的磁珠分选为例，推荐用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads，具体步骤如下：

! 注意：如果文库体积不足 100 μ L，需用 Nuclease-Free Water 补足，随后进行片段筛选。

2.3 从 2 ~ 8 °C 冰箱中把磁珠取出，室温平衡至少 30 min。

! 注意：磁珠使用前，必须在室温下放 30 min，避免影响 RNA 回收率及片段大小。

2.4 将磁珠涡旋振荡或颠倒混匀，避免因磁珠未混匀，导致纯化片段大小或者浓度出现较大误差。

2.5 接头连接程序结束后，取出 0.2 mL PCR 管静置 5 min，平衡至室温，向连接产物中加入 35 μ L Nuclease-Free Water 后，再加入 0.85 \times 体积 (85 μ L) 磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

2.6 室温孵育 5 min，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液完全澄清后，用移液器小心吸弃上清，注意不要吸到磁珠。

2.7 将 PCR 管置于磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），弃除上清。

2.8 重复步骤 1.7 一次。

2.9 将含有磁珠的 PCR 管从磁力架上取下，瞬时离心 10 sec，置于磁力架上，用小量程的移液器小心将残留液去除，开盖室温晾干 0.5 ~ 1 min，至管壁无明显水珠即可。

! **注意：**干燥至磁珠界面无明显水珠即可，不可过分干燥，以免造成磁珠龟裂，RNA 回收率降低。

2.10 加入 102 μ L Nuclease-Free Water 或者 0.1 \times TE Buffer 至 PCR 管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 100 μ L 上清至新的 PCR 管中，用于后续的分选纯化。

2.11 按上表第一轮筛选比例加入 70 μ L 磁珠至 RNA 文库中，充分吸打混匀 30 sec 或者涡旋混匀，室温孵育 5 min。

2.12 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待液体完全澄清后，用移液器小心吸取上清，并转移至另一新的 PCR 管中。

2.13 加入第二轮 20 μ L 磁珠至上清液中，用移液器吹打混匀 30 sec 或者涡旋混匀，室温孵育 5 min。

2.14 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，待液体完全澄清后，用移液器小心去除上清，注意不要吸到磁珠。

2.15 加入 200 μ L 80%乙醇（现配现用），置于磁力架上 30 sec，不要吹散磁珠。

2.16 当溶液完全澄清后，用移液器小心去除上清，注意不要吸到磁珠。

2.17 重复步骤 1.15 ~ 1.16 一次。

2.18 去除上清后，可将 PCR 管放于离心机上瞬时离心 10 sec，置于磁力架上 30 sec，用移液器将上清完全去除，室温晾干 0.5 ~ 1 min，待乙醇完全挥发，磁珠界面成磨砂状，无明显水珠即可。

! 注意：请勿过度干燥磁珠，造成磁珠龟裂，影响洗脱效率。

2.19 加入 21 μ L Nuclease-Free Water 或者 0.1 \times TE Buffer 至 PCR 管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 5 min。

2.20 将 PCR 管置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，转移 20 μ L 上清至新的 PCR 管中，用于后续的 PCR 富集实验。

3. 常见问题与解决方案

3.1 如果文库浓度过低，可以从哪些角度去寻找原因并如何改进？

3.1.1 以高质量的 RNA 样品为模板构建得到的文库浓度都能达到上机测序要求，如果无法提供合格的 RNA 样品，可尝试使用以下方法弥补：

起始量：提高样品起始量。做几个重复的样品，到片段化步骤合并在一起，或做到 PCR 前合并在一起。

3.2 rRNA 残留较高的问题

3.2.1 注意 mRNA 获取方法的不同，其兼容的起始量有所不同，请选择规格范围内的起始总 RNA 投入。注意 Input RNA 的物种与 rRNA 去除试剂盒是否兼容。

3.3 文库定量常见问题

3.3.1 文库定量有两种方式：Qubit 和 qPCR 分别测定文库质量浓度和文库摩尔浓度。

其中由于 qPCR 利用成簇反应引物进行扩增定量，较为真实的反映出文库中可用于上机测序的 DNA 片段的数量，所以 qPCR 得到的文库定量结果较为可信。在 qPCR 过程单链能够被有效测定，而在 Qubit 测定时，单链部分不计入有效浓度，因此表现为 Qubit 测定浓度低于 qPCR 定量浓度约 10% - 50%。一般可同时使用两种方式定量文库，相互校正。

3.4 本试剂盒是否适合用于 Small RNA 文库制备？

3.4.1 不适用。因为 Small RNA 的长度仅为 22 nt 左右，而本试剂盒中磁珠抓取片段最低为 100 bp 左右，无法有效富集到 Small RNA 片段。

3.5 FFPE 样本是否可以用该试剂盒建库？

3.5.1 FFPE 样本中的 mRNA 会有一定降解，完整度较差，建议与 Ribo-out rRNA rRNA 去除试剂盒 (Human/ Mouse/Rat) (WisGen#NR001)试剂盒搭配使用，进行文库构建。

3.6 使用说明书方案进行分选，分选插入片段有偏差，为什么？

3.6.1 使用磁珠分选过程中，磁珠未平衡至室温、未混匀、移液器不准、枪头挂壁严重等都会致使磁珠加入量与规定值不一致，导致所分选的插入片段差异较大。

3.7 文库扩增最高可以使用多少循环？

3.7.1 可根据起始量来调整循环数；如果不确定，建议取 1 μ l 进行 Qubit 检测后酌情再补 1 - 2 个循环，最多不超过 19 个循环。高产量文库通常会出现不同程度的过度扩增现象。因为在文库扩增后期，通常引物被最先耗尽，大量文库片段在无法结合到引物的情况下，片段之间通过不完全匹配关系退火结合，从而形成部分双链+部分单链的杂合链，且片段更大。根据不同检测方式的对应原理，过度扩增产物在 Qsep[®] 100 生物片段分析仪峰型中表现为 upper marker 之后有轻微翘尾。但以上现象均属正常，不影响文库测序和数据分析。

欣基（杭州）生物科技有限公司

WisGen BioSciences Co., Ltd

Add : 浙江省杭州市钱塘区福城路 400 号 6 幢 8 层

Service : order@wisgen.cn Web : www.wisgen.cn

