

## xLibPreP™ cDNA 二链合成试剂盒

# 操作说明书

(Cat#NR008, 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

产品组成 .....	1
产品概述 .....	1
保存及运输条件 .....	1
适用范围 .....	1
注意事项 .....	1
实验前准备 .....	2
实验流程 .....	4

## 产品组成

主货号：NR008 规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns(NR008-024)	96 rxns(NR008-096)
● Second Strand Buffer (dNTP)	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
● Second Strand Buffer (dUTP)	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
● Second Strand Enzyme	42 $\mu$ L	192 $\mu$ L

## 产品概述

xLibPreP™cDNA 二链合成试剂盒是以 xLibPreP™UniScript IV 一链合成试剂盒(NR002)产物为模板进行二链合成修复加 A 已生成双链 cDNA 产物。此产物可直接纯化，纯化后进行末修建库测试。

## 保存与运输条件

-30 ~ -15 °C保存， $\leq$  0 °C运输。

## 适用范围

本产品适用于已经进行逆转录文库的 RNA 样本，本产品可对逆转录后的文库直接使用，本产品不包含末端修复加 A 尾步骤，cDNA 合成后使用磁珠纯化，纯化后可使用末修加 A 试剂盒进行实验。

## 注意事项

**!** 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 本产品只适用于已经进行逆转录后的 RNA 样本，不可直接对 RNA 样本进行使用。
2. 试剂盒中的酶溶液对于温度敏感，请于使用前取出加入即可，使用弹混即可。
3. 实验开始前，请清洁操作台，确保没有 RNA 酶和 DNA 的污染。
4. 进行先关实验前，请确保 PCR 仪已经调试好并处于稳定的状态。

## 实验前准备

### 1. 逆转录 RNA 文库准备

本试剂盒不包含 mRNA 富集，rRNA 去除以及逆转录试剂盒，实验前先对 RNA 样本进行逆转录。

### 2. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
WisGen#NR003	xLibPrep™ mRNA 富集试剂盒	
WisGen#NR001	xLibPrep™ Ribo-out rRNA 去除试剂盒 (Human/Mouse/Rat)	
WisGen#NR002	xLibPreP™ UniScript IV 一链合成试剂盒	
*	Nuclease-Free Water	/

^ \* 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 RNA 定量系统的其它同类产品
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

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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. 试剂及样本准备

#### 1.1 逆转录文库准备

1.1.1 在开始实验前，请先使用 xLibPreP™UniScript IV 一链合成试剂盒 (WisGen#NR002) 进行 RNA 逆转录实验。

1.1.2 将试剂盒中除酶外各组分置于冰上融化后颠倒混匀，瞬时离心后备用。

### 2. 实验步骤

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)
逆转录文库	25
● *Second Strand Buffer (dNTP)	10
● *Second Strand Buffer(dUTP)	10
● Second Strand Enzyme	2
Nuclease-Free Water	8
总体积	45

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

2.2 按照下表设置 PCR 程序，无热盖温度。

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	16	40
2	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 合成的 cDNA 文库的纯化推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads，向反应体系中加入 1.8× 体积（81 μL）磁珠进行纯化，具体步骤如下：

2.4.1 将磁珠置于室温平衡 30 min，使用前涡旋或者振荡混匀。

2.4.2 合成 cDNA 文库后，向步骤 2.3 的产物中加入 1.8 × 体积（81 μL）磁珠进行纯化，用移液器吹打或者涡旋混匀 30 sec。

2.4.3 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。

2.4.4 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。

2.4.5 重复步骤 2.4.4 一次。

2.4.6 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。

2.4.7 加入 27 μL Nuclease-Free Water 或者 0.1× 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 25 μL 上清至新的 PCR 管中。

2.4.8 样品可置于冰上继续进行末端修复加 A 文库构建或其他分析应用，也可置于 -30°C ~ -15°C 保存。

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](mailto:order@wisgen.cn) Web : [www.wisgen.cn](http://www.wisgen.cn)

