

# xLibPreP™ 全长 RNA 建库试剂盒 操作说明书

(Cat#NR007, 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
产品组成 .....	2
保存及运输条件 .....	2
适用范围 .....	2
注意事项 .....	3
实验前准备 .....	4
实验流程 .....	6
1. 1st cDNA 合成 .....	6
2. 2nd cDNA 合成及回收 .....	7
3. 酶切打断/修复 .....	9
4. 接头连接 .....	10
5. 文库 PCR 富集 .....	13

## 产品概述

xLibPreP™ 全长 RNA 建库试剂盒是一款适用于全长 RNA 样本的一种 RNA 合成试剂盒，本试剂盒与传统的 RNA 建库不同，本试剂盒进行 RNA 建库时并不需要进行打断，可直接对 RNA 样本进行 First cDNA 合成即可。两轮 cDNA 合成纯化后为稳定的 cDNA 样本，后续可使用酶切建库，更快速的进行后续建库。

本试剂盒可兼容对 10ng - 2 µg 的 Total RNA 建库(200 ng<TR501≤2 µg；  
20 ng<TR502≤200 ng；10 ng≤TR503≤20 ng)。

## 产品组成

主货号：NR007      规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns (NR007-024)	96 rxns (NR007-096)
● 1st Reaction Buffer	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
● 1st Enzyme Mix	48 $\mu$ L	192 $\mu$ L
● 2nd Reaction Buffer	168 $\mu$ L	672 $\mu$ L
● 2nd Enzyme Mix	72 $\mu$ L	288 $\mu$ L
● EFS Buffer	216 $\mu$ L	864 $\mu$ L
● EFS Enzyme	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
● Ligation Buffer	720 $\mu$ L	2880 $\mu$ L
● Ligase Enzyme	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
● 2 $\times$ HiFi Master Mix	600 $\mu$ L	2400 $\mu$ L

## 保存与运输条件

-30 ~ -15  $^{\circ}$ C保存， $\leq$  0  $^{\circ}$ C运输。

## 适用范围

本产品适用于动物、植物、微生物等多物种的 Total RNA 的 RNA 文库构建。

### 1. RNA 起始量

10 ~ 1000 ng。

## 注意事项

**!** 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 操作过程请注意避免样本和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的吸头、离心管进行实验。
3. 实验开始前，请清洁操作台，确保没有 RNA 酶和 DNA 的污染。
4. 进行文库扩增前，请确保 PCR 仪已经调试好并处于稳定的状态。
5. 分选磁珠使用前，请务必置于室温下平衡 30 min 后使用。
6. 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。
7. 试剂盒中所有酶制剂在使用完毕后，应立即置于 -20 °C 进行保存，以免降低酶的活性，影响建库结果。
8. 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 °C 并安排后续实验。

## 实验前准备

### 1. 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#QC001	xQuant™ DNA 高灵敏定量试剂盒 (适配 Qubit® 平台)	用于投入 DNA 浓度及文库浓度的检测测定
*	Nuclease-Free Water	/
*	无水乙醇	/

⬆ \* 常规实验室供应商品牌即可

### 2. 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
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

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
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. 1st cDNA 合成

#### 1.1 试剂准备

1.1.1 在开始实验前，确定 RNA 浓度和投入量。

**!** 注意：确定投入的 RNA 浓度至关重要，尤其在投入量低于 100 ng 时，推荐使用染料法对 RNA 浓度进行准确定量。

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。

#### 1.2 实验步骤

1.2.1 取 0.2 mL PCR 管，按照下表配制反应体系，将各组分加入后，涡旋振荡混匀，请务必在冰上进行操作。

组分	体积 (μL)
● 1st Reaction Buffer	10
● 1st Enzyme Mix	2
Total RNA sample	X
Nuclease-Free Water	13 - X
<b>总体积</b>	<b>25</b>

**!** 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 仪反应程序，热盖温度设置为 105 °C。

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	25	5
2	42	30
3	85	5
4	4	∞

1.2.3 反应液完全涡旋混匀后，将 0.2 mL PCR 管瞬时离心 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。

1.2.4 反应结束后，尽快进行后续实验，在 4 °C Hold 建议不宜超过 1 h。

## 2. 2nd cDNA 合成及回收

2.1 取出步骤 1.2.4 的 1st cDNA 合成产物，按照下表所示各组分用量配制反应体系，并将配制完成的反应体系涡旋混匀后置于冰上。

组分	体积 (μL)
步骤 1.2.4 产物	25
● 2nd Reaction Buffer	7
● 2nd Enzyme Mix	3
<b>总体积</b>	<b>35</b>

**！ 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。

2.2 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序如下：

步骤	温度 (°C)	时间 (min)
1	16	30
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。

2.3 2nd cDNA 合成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 0.6× 体积（21 μL）磁珠进行纯化，具体步骤如下：

2.3.1 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。

2.3.2 cDNA 合成程序结束后，取出 0.2 mL PCR 管，向步骤 2.2 的合成产物中加入 0.6× 体积（21 μL）磁珠进行纯化，用移液器吸打或者涡旋混匀 30 sec。

**2.3.3** 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。

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

**2.3.5** 重复步骤 2.3.4 一次。

**2.3.6** 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，DNA 回收率降低。

**2.3.7** 加入 14  $\mu$ 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 13 $\mu$ L 上清至新的 PCR 管中，用于后续实验，并取出 1 $\mu$ L 进行 Qubit 定量。

### 3. 酶切打断/修复

#### 3.1 试剂准备

3.1.1 将试剂盒中各组分置于冰上融化。EFS Enzyme Mix 用手指轻弹混匀，不要涡旋。

其余试剂可短暂涡旋混匀。

#### 3.2 实验步骤

3.2.1 取 0.2 mL PCR 管，并按下表配制反应体系，冰上操作，待各组全部加入后，涡旋振荡混匀。

组分	体积/质量
● EFS Enzyme Mix	10 $\mu$ L
● EFS Buffer	9 $\mu$ L
步骤 2.3.7 产物	12 $\mu$ L
○ 1× TE Buffer *	29 $\mu$ L
<b>总体积</b>	<b>60 <math>\mu</math>L</b>

⬆ \* 酶切反应体系必须加入 1× TE Buffer 抑制酶活，否则会导致片段严重偏小。1× TE Buffer 可用 10× TE Buffer 代替，加量为 4  $\mu$ L，剩余体积可用无核酶水补足。

⚠ **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。

3.2.2 按照下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置为 75  $^{\circ}$ C。

反应步骤	反应温度 ( $^{\circ}$ C)	时间 (min)
1	32	5
2	65	30
3	4	$\infty$

3.2.3 反应液完全涡旋混匀后，将 0.2 mL PCR 管瞬时离心 30 sec，立刻置于 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。

3.2.4 反应结束后，尽快进行后续实验，在 4  $^{\circ}$ C Hold 建议不宜超过 1 h。

## 4. 接头连接

4.1 本产品不含接头，用户可根据不同的测序平台，选择相应的接头套装试剂盒。

产品货号	产品名称	适用测序平台
YG001	YWG™ illumina 短接头套装	illumina/GeneMind
YG002	YWG™ illumina 分子标签接头套装	illumina/GeneMind
YG004	YWG™ MGI 短接头套装（双端 Barcode）	MGI
YG005	YWG™ MGI 分子标签接头套装（双端 Barcode）	MGI
YG006	YWG™ MGI 短接头套装（单端 Barcode）	MGI
YG009	YWG™ MGI 全长接头套装（单端 Barcode）	MGI

**！ 注意：**以上列表中产品属于建库配套系列产品（WisGen），如使用其他公司产品，请联系技术支持。

4.2 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 DNA (ng)	接头稀释倍数	浓度 (μM)
≥ 50	无需稀释	15
49 ~ 25	2 倍稀释	7.5
24 ~ 10	5 倍稀释	3
9 ~ 5	10 倍稀释	1.5
< 5	20 倍稀释	0.75

**！ 注意：**配套 Adapter（WisGen）系列及产品原始浓度为 15 μmol/μL。

4.3 取出步骤 1.2.5 的酶切产物，加入相应用量接头，如下表所示。

组分	体积 (μL)
酶切（步骤 3.2.4）产物	60
Adapter *	3
Nuclease-Free Water	7
<b>总体积</b>	<b>70</b>

⬆️ \* 不同平台对应的接头模块不同，需根据平台选择合适的接头模块，按照说明书所示量添加。

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

4.4 按照下表所示各组分用量配制反应体系，并将配制完成的反应体系涡旋混匀后置于冰上。

组分	体积 (μL)
步骤 4.3 混液	70
Ligation Buffer	30
Ligase Enzyme	10
<b>总体积</b>	<b>110</b>

⚠️ **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。

4.5 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序如下：

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。

**4.6 接头连接产物的纯化**推荐使用 xPure™ 分选磁珠或者 Agencourt® AMPure XP Beads, 进行纯化, (如需进行分段分选, 参考附录一 片段分选部分) 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, 必须室温平衡 30 min, 否则影响 DNA 的回收率及片段筛选。

**4.6.2** 接头连接程序结束后, 取出 PCR 管静置 5 min, 平衡至室温, 向步骤 2.5 的连接产物中加入  $0.8 \times$  体积 (88  $\mu$ L) 磁珠进行纯化, 用移液器吸打或者涡旋混匀 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, 用移液器小心吸弃上清, 注意不要吸到磁珠。

**4.6.4** 将 PCR 管置于磁力架上, 加入 200  $\mu$ L 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 2.6.4 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, DNA 回收率降低。

**4.6.7** 加入 21  $\mu$ 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  $\mu$ L 上清至新的 PCR 管中, 用于后续的 PCR 富集实验。

## 5. 文库 PCR 富集

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

5.2 按照下表配制 PCR 体系，注意此步骤需于冰上操作。

组分	体积 (μL)
纯化后的连接产物（步骤 4.6.7）	20
● 2× HiFi Master Mix	25
○ PCR Primer Mix *	5
<b>总体积</b>	<b>50</b>

⬆ \* PCR Primer Mix 需与对应 Adapter 配套使用，不同平台使用接头模块不同，具体可参考不同平台对应接头模块说明书。

5.3 将步骤 3.2 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。

5.4 瞬时离心后将 PCR 反应管置于 PCR 仪内，按步骤 3.5 的反应程序进行扩增。

5.5 按下表设置 PCR 仪反应程序，热盖温度设置于 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：

DNA 模板量使用量 (ng)	PCR 循环数推荐 (Cycles)
>1 $\mu$ g	9 ~ 12
1 $\mu$ g	13 ~ 14
500ng	15 ~ 16
100ng	17 ~ 18

5.6 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 1），具体步骤如下：

5.6.1 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 DNA 的回收率及片段筛选。

5.6.2 扩增程序结束后，取出 PCR 管静置 5 min，平衡至室温，加入 1× 体积（50  $\mu$ L）的磁珠至步骤 3.5 的扩增产物中，充分吸打混匀 30 sec。

5.6.3 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，注意不要吸到磁珠。

5.6.4 在 PCR 管中，加入 200  $\mu$ L 80%乙醇（现用现配），静置 30 sec（不用吹散磁珠），去除上清。

5.6.5 重复步骤 5.6.4 一次。

5.6.6 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，DNA 回收率降低。

5.6.7 加入 30  $\mu$ L Nuclease-Free Water 或者 0.1× 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，将 PCR 管放置于磁力架上静置 2 min，使磁珠完全贴壁后，将上清转移至新的 PCR 管中，用于后续实验或 -20 °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 Web：www.wisgen.cn

