

xLiBPreP™ds-cDNA 全长合成试剂盒

操作说明书

(Cat#NR010, 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
实验概述	1
保存及运输条件	1
适用范围	1
注意事项	2
实验前准备	3
实验流程	5
1. 1st cDNA 合成	5
2. 2nd cDNA 合成及回收	7

产品组成

主货号：NR010 规格：24 rxns / 96 rxns

产品组分	24 rxns(NR010-024)	96 rxns(NR010-096)
● 1st Reaction Buffer	240 μ L	960 μ L
● 1st Enzyme Mix	48 μ L	192 μ L
● 2nd Reaction Buffer	168 μ L	672 μ L
● 2nd Enzyme Mix	72 μ L	288 μ L

产品概述

xLiBPreP™ds-cDNA 全长合成试剂盒是一款适用于全程 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，可进行后续实验。本试剂盒可兼容对 5 ng - 2 μ g 的 Total RNA 建库(200 ng<TR501 \leq 2 μ g; 20 ng<TR502 \leq 200 ng; 5 ng \leq TR503 \leq 20 ng)。

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
*	Nuclease-Free Water	/
*	无水乙醇	/

 * 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
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 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	200 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	0.5 - 10 μ L 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
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 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
总体积	35

! 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 μ 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 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 13 μ L 上清至新的 PCR 管中，用于后续实验，并取出 1 μ L 进行 Qubit 定量。

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

