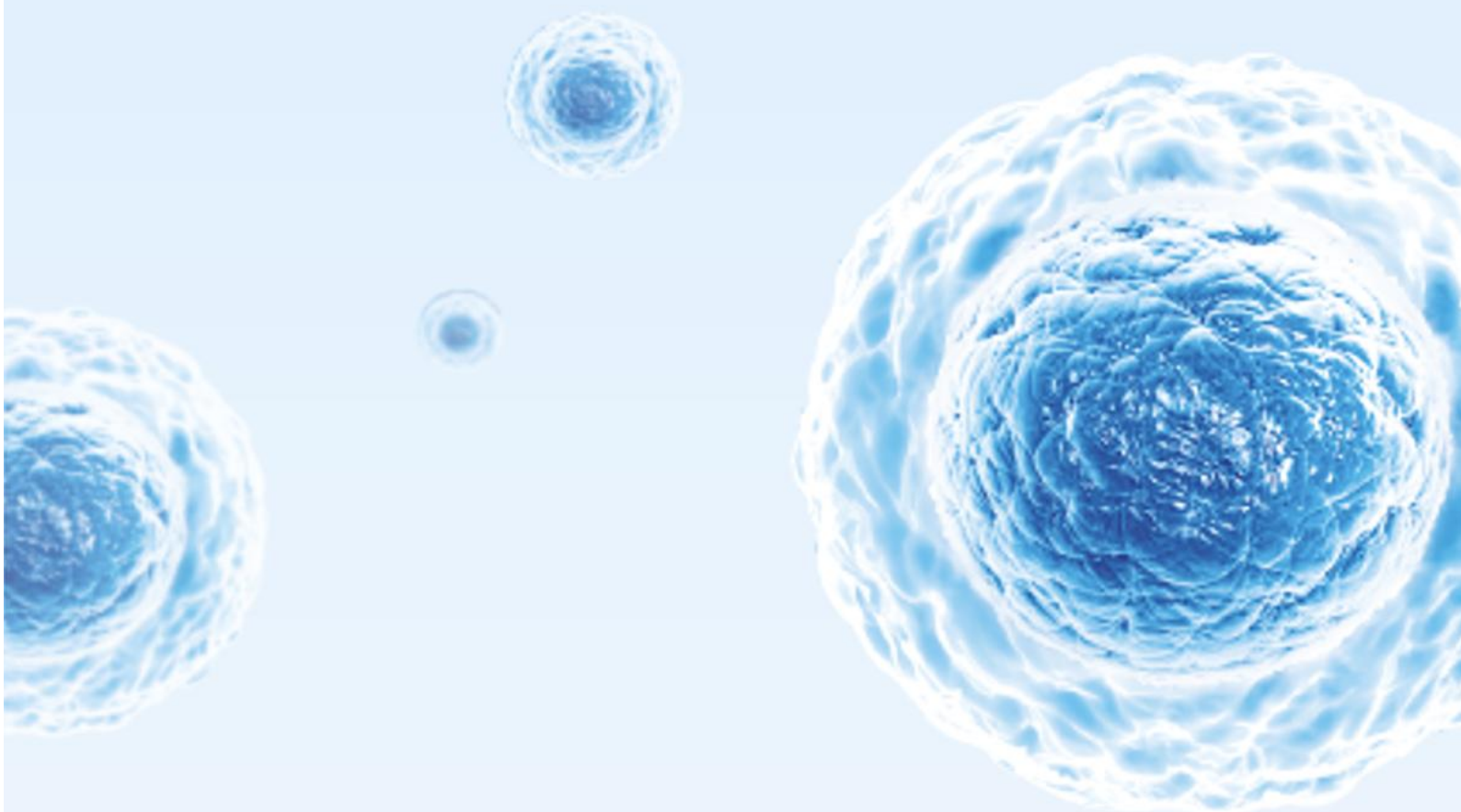




AccuraCode[®] HTP OneStep RNAseq Kit for 96 wells

高通量药物筛选 RNA 建库试剂盒 (96-Well 版) 用户手册

本用户手册适用于新格元以下产品

目录号	品名	规格
1071066	AccuraCode® HTP OneStep RNAseq Kit	1RXN (96Well)
1071065	AccuraCode® HTP OneStep RNAseq Kit	4RXNs (96Well)

文件信息

- 文件编号：UG0071062
- 文件名称：AccuraCode®高通量药物筛选 RNA 建库试剂盒用户手册（96-Well 版）
- 版本号：2023/08
- 版本日期：2023.08

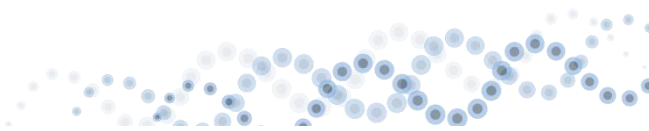
版权说明

新格元生物科技有限公司保留所有解释权利。本手册所描述的所有产品和服务仅供科学研究使用，不可用于临床诊断。

目 录

1 产品概况	5
1.1 产品说明	5
1.2 产品优势	5
1.3 技术原理	6
1.4 技术流程及操作时间	7
1.5 产品组分	8
2 用户自备仪器设备和试剂耗材	11
3 实验操作流程	14
3.1 实验操作流程	14
3.2 实验注意事项	14
3.3 细胞裂解和 mRNA 捕获	15
3.3.1 AccuraCode Lysis Mix 准备	15
3.3.2 细胞裂解和 RNA 捕获	16
3.4 OneStep 扩增获得 cDNA	16
3.4.1 One Step 反应	16
3.4.2 产物纯化	18
3.4.3 扩增纯化产物质检	19
3.5 转录组文库构建	20
3.5.1 片段化	20
3.5.2 连接接头	21

3.5.3 连接接头纯化	21
3.5.4 转录组文库构建	22
3.5.5 转录组文库分选	23
3.5.6 转录组文库质检	24
4 常见问题	26
附录: 生物废弃物分类及处理标准	29



1 产品概况

1.1 产品说明

AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit, 可一次完成数百种药物处理细胞的 RNA 捕获及混合建库操作, 能快速获得每种药物处理后细胞的基因表达信息, 经生信数据分析, 可获取到更多药物评价信息, 加速药物的筛选进程。

AccuraCode®将逆转录(RT)和 PCR 扩增步骤进行合并, 在高通量 PCR 板中进行一步法操作(OneStep), 高效获得各孔中的 cDNA 分子, 然后将每孔的 cDNA 混合纯化, 可构建成一个含多种药物化合物处理信息的混合 RNA-seq 文库, NGS 测序后, 可根据孔标签 (Well Barcode) 信息拆分出不同药物处理的转录本信息。

1.2 产品优势

AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit 其性能特征和优势如下:

- 1、一体化捕获建库试剂盒: 药筛流程更为简化, 试剂盒包含从 RNA 捕获到文库构建全流程的试剂, 整个药筛实验 5h 左右即可完成;
- 2、通量高: 一次可完成数百种药物的高通量筛选;
- 3、性价比高: 构建混合文库, 可降低药物筛选成本;
- 4、适用类型广: 适用多种细胞类型, 贴壁细胞和悬浮细胞均可应用于筛选, 具有广谱性。
- 5、分辨率更高: 相比传统药物高通量筛选技术针对于细胞表型, 基于 RNA 测序的 AccuraCode® 药物筛选技术可以针对基因层面;
- 6、获取到的药物作用信息更多维: 基于基因差异表达的分析, 既可定位至药物影响下

细胞的特异代谢途径，又可以同步揭示药物的其他作用效应，获取多维的药物作用信息，全面评估药物的作用机制。

1.3 技术原理

AccuraCode®高通量药物筛选方法结合了样本条形码(Well Barcode)和一步法逆转录-聚合酶链反应(OneStep RT-PCR)，可以同时构建含数百个样本信息的 RNA-seq 文库。

AccuraCode Lysis Mix 包含 illumina Read1 测序引物序列 (PCR handle)、Well Barcoding Oligo、分子标签(UMI) 和 PolyT 序列。Well Barcoding Oligo 可用于区分高通量细胞培养板 (96 孔板) 的不同样品，以便后续分析时能够区分不同类型或不同浓度药物化合物处理的样品。

细胞裂解后，带有独特 Well Barcode 及 UMI 的 Well Barcoding Oligo 通过 polyT 序列，对细胞内 mRNA 分子进行捕获标记，然后经 OneStep RT-PCR 获取各样品孔的 cDNA，并进行混合纯化；纯化得到的 cDNA 经过片段化、连接接头等建库步骤，可构建得到适用于 illumina 测序平台的测序文库。

寡核苷酸序列捕获mRNA的原理：



一步法RT-PCR的原理：

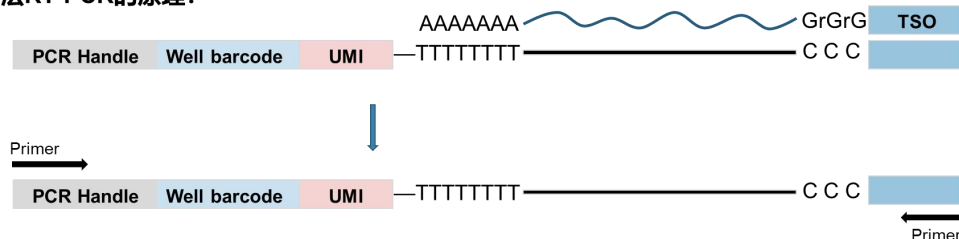


图 1 技术原理图

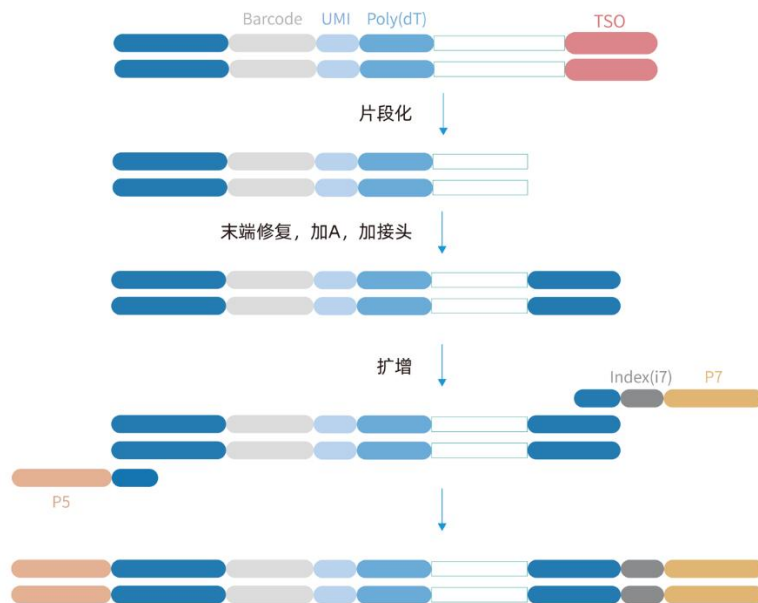


图 2 转录组建库原理图

1.4 技术流程及操作时间

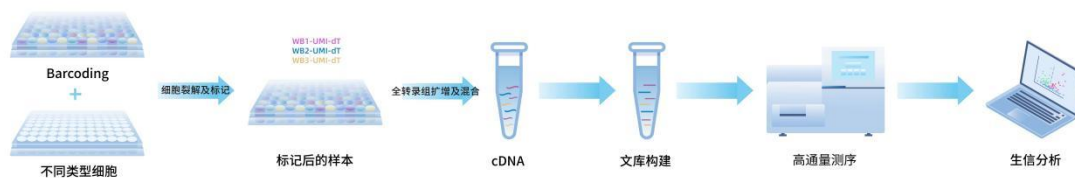


图 3 技术流程图

周期	步骤	时间	终止&保存
1h	药物处理结束细胞准备	0.5h-1h	
	细胞裂解和mRNA捕获		Stop, $-80^{\circ}\text{C} \leq 48\text{h}$
3h	逆转录和扩增	2 h	Stop, $4^{\circ}\text{C} \leq 72\text{h}$ or $-20^{\circ}\text{C} \leq 7$ days
5.5h	建库	2.5h	Stop, $-20^{\circ}\text{C} \leq 30$ days

图 4 操作时间

1.5 产品组分

1071066 (1 RXNs) 试剂盒组成

1071066 AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit 1 RXNs (96Well)

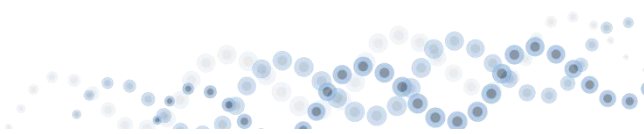
组分名称	储存条件
AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit	-20°C

1071066 (1 RXNs) 试剂组分表

1071066 AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit 1 RXNs (96Well)

组分名称	数量	体积/个
AccuraCode Lysis Mix(96well)	1	42μL/Well
One Step Buffer	1	4mL
Amplification Enzyme	1	160μL
Reverse Transcriptase	1	200μL
RNase Inhibitor	1	50μL
Fragmentation Buffer	1	17μL
Fragmentation Enzyme Mix	1	6μL
1×TE	1	800μL
Ligation Mix	1	72μL
Ligation booster	1	4μL
Adaptor	1	50μL
Library Amp Mix V2	1	60μL
Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	1	30μL
Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	1	30μL

注: Indexing Primer Mix 包含 2 种, 任选 1 种使用即可。



1071065 (4 RXNs) 试剂盒组成

1071065 AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit 4 RXNs (96Well)

组分名称	储存条件
AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit	-20°C

1071065 (4 RXNs) 试剂组分表

1071065 AccuraCode® HTP One Step RNAseq Kit 4 RXNs (96Well)

组分名称	数量	体积/个
AccuraCode Lysis Mix(96well)	4	42μL/Well
One Step Buffer	2	4mL
Amplification Enzyme	1	190μL
Reverse Transcriptase	1	235μL
RNase Inhibitor	1	120μL
Fragmentation Buffer	2	17μL
Fragmentation Enzyme Mix	2	6μL
1×TE	1	800μL
Ligation Mix	2	72μL
Ligation booster	2	4μL
Adaptor	1	50μL
Library Amp Mix V2	2	60μL
Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	1	30μL
Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	1	30μL
Indexing Primer Mix3 (TTAGGCAT)	1	30μL

注: Indexing Primer Mix 包含 4 种, 任选 1 种使用即可。

AccuraCode Lysis Mix 预装于 96Well 高通量 PCR 板, AccuraCode Lysis Mix 顺序与箭头所指方向一致, 从上到下为 1 到 96 (图 5)。

Well Barcode 序列信息请查阅https://github.com/singleron-RD/AccuraCode_WellBarcode

96孔板AccuraCode Lysis Mix排列顺序												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012
B	013	014	015	016	017	018	019	020	021	022	023	024
C	025	026	027	028	029	030	031	032	033	034	035	036
D	037	038	039	040	041	042	043	044	045	046	047	048
E	049	050	051	052	053	054	055	056	057	058	059	060
F	061	062	063	064	065	066	067	068	069	070	071	072
G	073	074	075	076	077	078	079	080	081	082	083	084
H	085	086	087	088	089	090	091	092	093	094	095	096

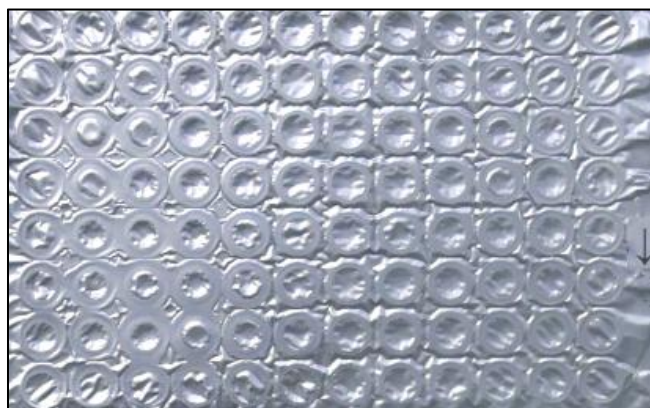
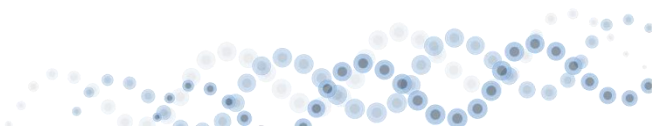


图 5 高通量 96 孔板 Barcode 分布情况图

2 用户自备仪器设备和试剂耗材

步骤	类别	名称
细胞裂解和 RNA 捕获	仪器	医用冷藏冷冻箱
		倒置显微镜
	耗材	无菌&无核酸酶高通量细胞培养板 (96 well)
		无菌&无核酸酶高通量 PCR 管 (96 well)
	试剂	75%乙醇 (用无水乙醇配制, 现配现用)
		1×PBS
		EB Buffer
	工具	0.5μL-200μL 高通量移液器, 或排枪
		不同规格无菌&无核酸酶吸头
		无菌&无核酸酶移液槽
		
OneStep 扩增环节	仪器	-80℃医用低温保存箱
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
		PCR 仪
		Qubit 4.0 荧光定量仪

	试剂	无水乙醇
		RNase away
		Ampure XP 纯化磁珠
		Nuclease-free Water
		EB Buffer
		Qubit dsDNA HS assay kit
	耗材	无菌&无核酸酶加样槽
		无菌&无核酸酶高通量 PCR 管
		不同规格无菌&无核酸酶吸头
		15 mL 无菌&无核酸酶离心管
		2 mL 无菌&无核酸酶离心管
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.5ml PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)
	工具	不同量程单道移液器和高通量移液器
		DynaMag™-2 磁力架/Thermo
建库环节	仪器	医用冷藏冷冻箱
		全自动核酸片段分析仪 (安捷伦 AATI)
		Qubit 4.0 荧光定量仪
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
	试剂	Ampure XP 纯化磁珠



		80%乙醇（用无水乙醇配制，现配现用）
		EB Buffer
		Nuclease-free Water
		Qubit dsDNA HS Assay Kit
		核酸片段分析仪定量试剂
	耗材	不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5 mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2 mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.5ml PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）
	工具	不同量程单道移液器
		磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达

3 实验操作流程

3.1 实验操作流程



图 6 实验操作流程

3.2 实验注意事项

- 1.请严格按照保存条件储存试剂盒。
 - 2.若试剂溶液中有沉淀物，请用手指轻弹试剂管壁，并用移液器轻轻吹打混匀试剂溶液，确保试剂溶液澄清后再使用。
 - 3.实验开始前，用 RNase away 喷洒实验台，擦干即可。
 - 4.本实验中所用耗材需保证无菌、无核酸酶，实验人员需戴口罩和无菌手套进行操作，避免污染。
 - 5.在准备开始裂解细胞前，75%酒精清洁工作台面，观察药物处理结束后细胞状态并做好记录。
 - 6.使用 AccuraCode Lysis Mix 时，**冰上融化**后震荡混匀离心后用枪头扎破使用，**切勿将膜整片揭下**。
- 注：AccuraCode Lysis Mix 反复冻融不要超过三次。
- 7.本产品是直接裂解细胞同时捕获 mRNA 并以此作为 OneStep RT-PCR 的模板，因此在细胞药物处理前，对细胞接种量有一定要求，建议根据以下接种量进行操作：

细胞类型	细胞浓度	细胞接种量
悬浮细胞系	2.0×10^5 - 1.0×10^6 个/mL	100 μ L
贴壁细胞系	1.0×10^5 个/mL	100 μ L

8.在细胞开始裂解前，提前配置 OneStep 反应体系，并按要求将其分装至高通量 PCR 板中，分装完成后的 PCR 板放置于冰上（建议现配现用）。

9.细胞裂解时，严格控制细胞裂解时间 6min。

注：裂解完成后，裂解产物可保存至-80℃ 但保存时间不得超过 48h。

10.在将裂解产物加入到 One Step 反应体系中时，须严格控制操作时间，防止 RNA 降解，建议从裂解细胞开始到运行 One Step RT-PCR 程序应不超过 15min。

11.产物纯化过程中，Ampure XP 纯化磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

12.建库过程中，离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

13.产物片段化时，必须提前设置 PCR 程序，PCR 仪热盖保持在 75℃。

14.接头连接时，必须提前设置 PCR 程序，并关闭 PCR 仪上盖加热功能。

3.3 细胞裂解和 mRNA 捕获

3.3.1 AccuraCode Lysis Mix 准备

注：提前冰上解冻“AccuraCode Lysis Mix”，完全溶解后混匀离心置于冰上备用。根据药筛处理的 Well 选择对应数目的 Well Barcoding Oligo 并做好对应记录。

AccuraCode Lysis Mix 反复冻融不要超过三次。

1、贴壁细胞 AccuraCode Lysis Mix 用量 30 μ L/Well。

2、悬浮细胞 AccuraCode Lysis Mix 用量 10 μ L/Well。

3.3.2 细胞裂解和 RNA 捕获

注：(1) 在准备开始裂解细胞前，观察药物处理结束后细胞状态并做好记录。细胞裂解时，严格控制细胞裂解时间 6min。

(2) 裂解完成后，裂解产物可保存至-80 $^{\circ}$ C（保存时间不得超过 48h）

1、药物处理贴壁细胞：用 200 μ L PBS 进行洗涤，共 2 遍，加入 30 μ L 裂解反应液。室温裂解 6 min。

2、药物处理悬浮细胞：药物处理结束后，将细胞培养悬液混匀，每孔取出 10 μ L 至新的 96 孔板中，按照 1：1 加入 Cell Lysis Buffer（10 μ L），混匀室温裂解 6 min。（建议控制 10 μ L 细胞悬液含有的细胞量在 2000-10000 个细胞）

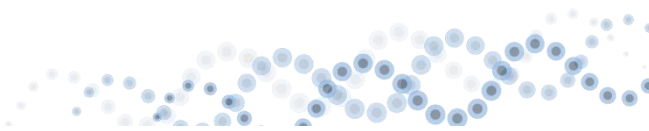
3.4 OneStep 扩增获得 cDNA

注：(1) 在细胞开始裂解前，提前配置 OneStep 反应体系，并按要求将其分装至高通量 PCR 板中，分装完成后的 PCR 板放置于冰上（建议现配现用）。

(2) 在将裂解产物加入到 One Step 反应体系中时，须严格控制操作时间，防止 RNA 降解，建议从裂解细胞开始到运行 One Step RT-PCR 程序应不超过 15min。

3.4.1 One Step 反应

1、体系配置(细胞裂解前配置)：提前室温解冻“One Step Buffer”，涡旋离心然后置于冰上，在冰上按照如下表格配制 One Step Mix，涡旋混匀并短暂离心（若 One Step Buffer 试剂溶液中有沉淀物，请用手指轻弹试剂管壁，并用移液器轻轻吹打混匀试剂溶液，确保试剂溶液澄清后再使用）。



组分	96 Well (1.1×RXN, μL)
One Step Buffer	1793
RNase Inhibitor	26.4
Amplification Enzyme	42.4
Reverse Transcriptase	52.8
混匀后分装到高通量 PCR 板中, 18μL/Well	
Step3.3.2 产物	2
Total (per Well)	20

2、裂解完成后, 转移 Step3.3.2 产物 2μL 至装有 OneStep 反应体系的高通量 PCR 板中(冰上操作), 吹打混匀后在 PCR 仪中进行反应 (设置 PCR 仪的反应体系为 25μL, 并提前设置 PCR 仪热盖温度为 105°C)。PCR 板注意封膜或者盖子的密封性避免液体蒸发。

3、PCR 程序结束后, 可将样品在 4°C保存 48h 或-20°C保存一周, 或者直接进行 cDNA 扩增纯化。

Step	Temperature	Time
1	42°C	1:00:00
2	95°C	0:03:00
cycle = 4	98°C	0:00:20
	65°C	0:00:45
	72°C	0:03:00
贴壁细胞 10 cycle	98°C	0:00:20
	67°C	0:00:20
悬浮细胞 11~12 cycle	72°C	0:03:00
5	72°C	0:05:00
6	4°C	Hold

3.4.2 产物纯化

1、Ampure XP 纯化磁珠（后称纯化磁珠）提前 30min 从 4°C 中取出，恢复室温。

注：纯化磁珠使用前需混匀。

2、使用多通道移液器从高通量 PCR 板的孔中取出 10 μ L 扩增产物到试剂槽中，吹吸混匀后转移至 2mL 离心管中，然后再取出 800 μ L 扩增产物到新的 2mL 离心管中，加入 0.6 $\times$ 纯化磁珠（例如，量取的产物体积为 800 μ L，则加入 0.6 $\times$ 800= 480 μ L 体积的纯化磁珠）涡旋混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于 2mL 规格磁力架 (DynaMag™-2 磁力架/Thermo，本小节磁力架同规格) 上静置 5min；至液体透明澄清，小心吸除上清液至新的 2mL 离心管中，暂留。

注：纯化磁珠比较粘稠，准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。纯化时高通量 PCR 板每个 Well 吸取固定体积，混匀后再纯化，吸取体积建议不低于 10 μ L。（剩余产物的 PCR 板可放置在 -20°C 保存）

3、保持离心管始终处于磁力架上，加入 800 μ L 新配制的 80%乙醇漂洗纯化磁珠。室温孵育 30s，小心吸除上清液。

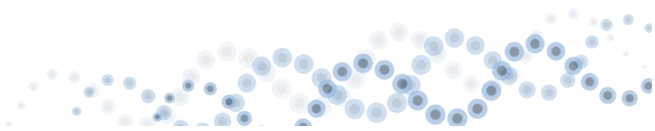
4、重复步骤 3，共计漂洗 2 次。

5、取下离心管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干约 2min（不要超过 5min）。

6、取下离心管，加入 20 μ L EB Buffer，吹打混匀纯化磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。

7、吸取上清并转移至新的 1.5mL EP 管中，即为纯化产物。

注：将样品置于 4°C 可保存 72h，置于 -20°C 可保存一周，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。



3.4.3 扩增纯化产物质检

1、取适量（建议 1 μ L）样品进行 cDNA 浓度和片段大小检测。推荐使用 Qubit 4.0 荧光定量仪（Thermo）进行核酸浓度测定，使用 AATI（Agilent）进行片段大小分析。

2、质检结果请参照图 7，合格 cDNA 应同时满足以下几个条件：cDNA 主峰在 800-2000bp 左右；400bp 以下占比应小于 10%，400-2000bp 占比应大于 80%。

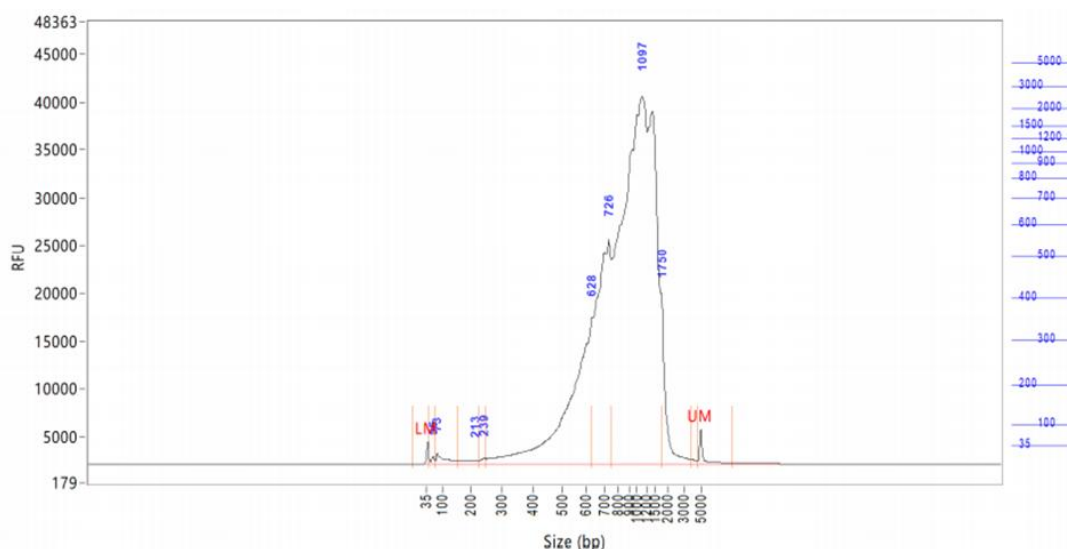


图 7 cDNA 质检图

3、cDNA 二次纯化（选做）：欲进一步降低 cDNA 400bp 以下片段所占比例，可按下表根据小片段占比进行二次纯化：

- 1) 将剩余 cDNA 的体积用 NF 水补充到 100ul；
- 2) 按照如下表格的推荐纯化磁珠的比例加入纯化磁珠；

40bp-400bp 占比	纯化磁珠比例
10%-20%	0.8×
20%-35%	0.7×
>35%	0.6×

*cDNA 总量低于 40ng、小片段占比>40%的, 0.7×纯化; cDNA 二次纯化比例不能低于 0.6×。

3) 其余操作方式与 3.4.2 相同, 最终用 15ul 的 EB Buffer 洗脱 cDNA。

4) 二次纯化后一般只需要测定 Qubit 值, 不再需要核酸片段的质检。

3.5 转录组文库构建

3.5.1 片段化

1、提前按照下表设置 PCR 程序, 反应体系 35μL, 并设置 PCR 仪热盖温度为 75℃。

Step	Temperature	Time
1	4℃	Hold
2	37℃	0:05:00
3	65℃	0:30:00
4	4℃	Hold

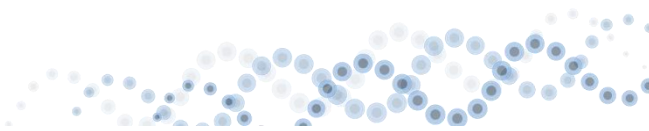
2、室温解冻 1×TE 和 Fragmentation Buffer, 确保完全融化, 涡旋混匀并离心后冰上备用; 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix 涡旋混匀, 置于冰上备用。将灭菌的 PCR 管置于冰上, 配置如下反应体系:

Component	Volume (μL)
Fragmentation Buffer	7
cDNA	Variable(10ng/50ng)
Fragmentation Enzyme Mix	2
1×TE	To 35

注: a) cDNA 总量在 10-50ng 时, 使用 10ng 投入量进行建库。

b) cDNA 总量在 50ng 以上时, 使用 50ng 投入量进行建库。

3、用移液器轻柔吹打充分混匀, 短暂离心后将 PCR 管置于 PCR 仪中, 跳过 PCR 程序的第一步, 运行 PCR 程序。



4、完成反应后立即进行下一步接头连接。

3.5.2 连接接头

1、按照下表设置 PCR 程序，反应体系 70 μ L，并关闭 PCR 仪热盖加热，备用。

Step	Temperature	Time
1	4°C	Hold
2	20°C	15min
3	4°C	Hold

1、Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意取准确体积，将 3.5.1 步反应的 PCR 管置于冰上，

配置

如下反应体系：

Component	Volume (μ L)
Step 3.5.1 产物	35
Ligation Mix	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

3、使用移液器轻柔吹打混匀并短暂离心。将反应管置于 PCR 仪中，跳过 PCR 程序的第一步，运行程序。

3.5.3 连接接头纯化

1、纯化磁珠提前 30min 从 4°C 中取出，恢复室温备用。将产物 PCR 管短暂离心，使用移液器量产物体积，涡旋混匀纯化磁珠并吸取 34.2 μ L 加入至 68.5 μ L 片段化产物中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。

注：纯化磁珠比较粘稠，准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不

一致。

2、将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无菌 PCR 管中，暂时留存。

3、保持纯化磁珠所在 PCR 管置于磁力架上，用 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗纯化磁珠，室温孵育 30s，小心吸除上清液。

4、重复步骤 3，总计漂洗 2 次。

5、从磁力架上取下纯化磁珠所在 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去管内及管壁多余酒精，开盖晾干纯化磁珠 1min（不要超过 2min）。

6、将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 $\times$ TE（提前使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1 $\times$ TE），涡旋振荡或吹打混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。

7、将纯化磁珠所在 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 3.5.4 转录组文库构建。

注：此步骤结束后可以将样品于-20 $^{\circ}$ C保存一周。

3.5.4 PCR 富集

1、将 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系，并使用移液器轻柔吹打混匀并短暂离心，将反应管置于 PCR 仪中。

Component	Volume (μ L)
Step 3.5.3 产物	15
Library Amp Mix V2	25
Indexing Primer Mix	10

Total

50

注：Indexing Primer Mix 包括 4 种，任意选择一种即可。

2、提前按照下表设置 PCR 程序，反应体系 50 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 105 $^{\circ}$ C

Step	Temperature	Time
1	98 $^{\circ}$ C	0:00:30
2 (循环数参见下表)	98 $^{\circ}$ C	0:00:10
	65 $^{\circ}$ C	0:01:15
3	65 $^{\circ}$ C	0:05:00
4	4 $^{\circ}$ C	Hold

注：扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

投入量	循环数
50ng	9
10ng	12

3.5.5 转录组文库分选

1、纯化磁珠提前 30min 从 4 $^{\circ}$ C 中取出，恢复室温备用。将 3.5.4 产物 PCR 管短暂离心，使用移液器量产物体积，涡旋混匀纯化磁珠并吸取 25 μ L 加入至 50 μ L 产物中（如体积不足 50 μ L 使用 Nuclease-free Water 补足），涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。

注：纯化磁珠比较粘稠，准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

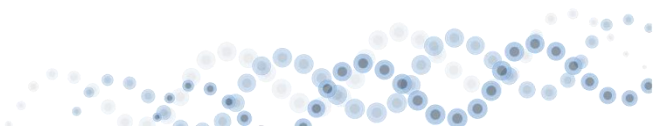
2、将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。

3、涡旋振荡混匀纯化磁珠并吸取 7.5 μ L（0.15 $\times$ 产物体积）加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。

- 4、将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
- 5、保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗纯化磁珠。室温孵育 30s，小心吸除上清液。
- 6、重复步骤 5，总计漂洗 2 次。
- 7、从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干纯化磁珠 1min（不要超过 2min）。
- 8、将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡或吹打混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
- 9、将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中，-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存三个月。

3.5.6 转录组文库质检

- 1、取适量（建议 1 μ L）样品进行产物浓度和片段大小检测。推荐使用 Qubit 荧光定量仪（Thermo）进行核酸浓度测定，使用 AATI（Agilent）进行片段大小分析。
- 2、质检结果请参照图 8，主峰片段范围须在 300-600bp，900bp-5000bp 占比小于 20%，300bp 以下占比小于 20%。若存在 200bp 左右小尖峰凸起，可 0.8 $\times$ 纯化后送测。
- 3、质检合格的文库，可直接送测序，也可置于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C冰箱保存 3 个月。



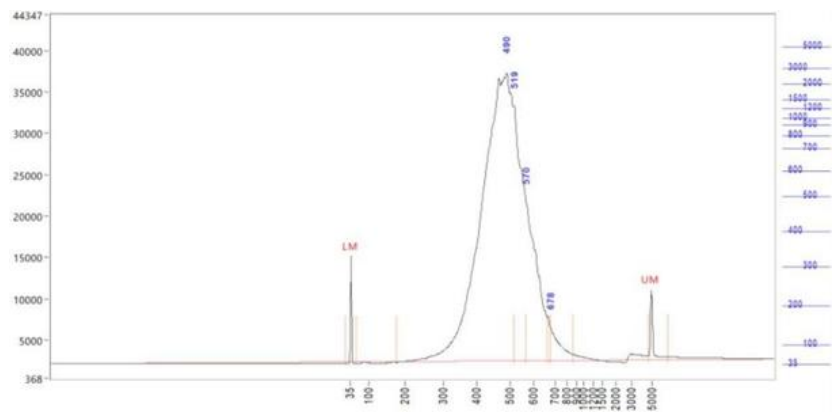


图 8 转录组文库质检图

4 常见问答

1、该产品可完成数百种以上药物化学物处理样本的混合建库，如何保证获得对应处理样本的转录本信息？

答：是根据 AccuraCode Lysis Mix 中的 Well Barcoding Oligo 序列信息拆分出不同药物处理的转录本信息。在取用 AccuraCode Lysis Mix 时，应注意标记每孔所对应的 Well Barcoding Oligo 序号，否则导致该孔对应转录组文库信息无法正确拆分。

2、每孔 AccuraCode Lysis Mix 可以反复使用吗？

答：每孔对应的 AccuraCode Lysis Mix 只能使用一次，避免反复使用出现交叉污染。使用 AccuraCode Lysis Mix 时，冰上融化后震荡混匀离心后用枪头扎破使用，切勿撕掉膜使用。

3、高通量药物筛选试剂盒，是否对悬浮细胞和贴壁细胞的细胞系均适用？

答：AccuraCode 试剂盒适用于多种类型的细胞系进行药物筛选后的建库，对悬浮细胞和贴壁细胞的高通量药物筛选均能适用；如果样本类型为原代细胞（例如 PBMC）建议进行细胞投入量的测试之后，再开展大规模实验。

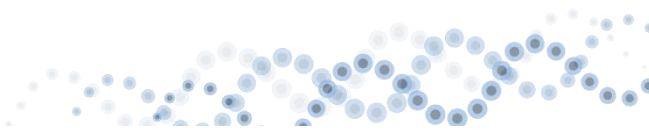
4、该高通量药物筛选试剂盒，对于悬浮细胞和贴壁细胞的药物筛选流程是否一样？

答：在细胞裂解和 RNA 捕获时，药物处理结束的悬浮细胞和贴壁细胞在裂解前处理不同。

（1）对于药物处理贴壁细胞：用 200 μ L PBS 洗 2 遍(200 μ L/遍)，加入 30 μ L 裂解体系。室温裂解 6min。（2）对于药物处理悬浮细胞：药物处理结束的细胞培养悬液混匀，每孔取出 10 μ L，按照 1: 1 加入 Cell Lysis Buffer（10 μ L），混匀室温裂解 6min。

5、本产品是否对药物处理前细胞起始接种量有要求？

答：本产品是直接裂解细胞同时捕获 mRNA 并以此作为 OneStep RT-PCR 的模板，因此在细胞药物处理前，对细胞接种量有一定要求，建议根据以下接种量进行操作：



细胞类型	细胞浓度	细胞接种量
悬浮细胞系	$2.0 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 个/mL	100 μ L
贴壁细胞系	1.0×10^5 /mL	100 μ L

6、药物处理结束后，进入 One step 反应中细胞量质控要求？

答：药物结束后在显微镜下观察细胞状态并做相应记录，建议进入 One step 反应体系中的 2 μ L 的裂解产物中的细胞投入量大于 200cell/well。如果细胞在药物处理后状态差或者出现大量凋亡，可能会导致进入 One step 反应中细胞量小于 200cell，进而影响此 well 的测序量。

7、细胞裂解和 RNA 捕获时，裂解的时间对获得 cDNA 的影响？

答：为了获得质控较好的 cDNA，按照实验要求时间操作，裂解时间过久，RNA 容易降解，后续 cDNA 中小片段占比高。

8、cDNA 混合纯化时的注意事项是什么？

答：高通量 PCR 板每个孔中吸取固定体积，混匀后再纯化，每孔吸取体积建议不少于 10 μ L。

9、药物筛选混合建库测序时，是否有推荐的测序量？

答：根据实验目的不同，有不同测序深度，一般每个样本孔 (Well) 建议测 5-25 Million Reads。

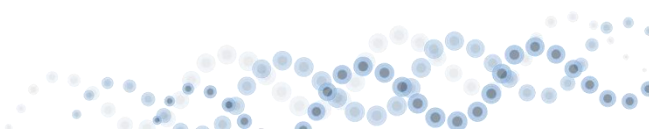
10、AccuraCode[®] HTP OneStep RNAseq 所采用的一步法与常规的两步相比，有什么优势？

答：本产品采用一步法 RT-PCR，可以提高逆转录的 cDNA 质量，减少因 PCR 转板可能造成的污染。

11、AccuraCode[®] HTP OneStep RNAseq 试剂盒是否涉及到药物的处理？

答：不涉及，本产品用于高通量药物处理结束后的细胞 RNA 的捕获，一步获得 cDNA，

进而构建一个汇集多种药物化合物处理不同样本的混合 RNA-seq 文库文库，快速获得每种药物的转录本和靶向基因表达信息。



附录：生物废弃物分类及处理标准

● 生物废弃物分类及处理目的

规范实验室在生产过程中所产生的危险性废弃物的收集、贮存、处置的行为，加强危险性废弃物的安全管理，防止生物污染，保护环境，保障人员健康。

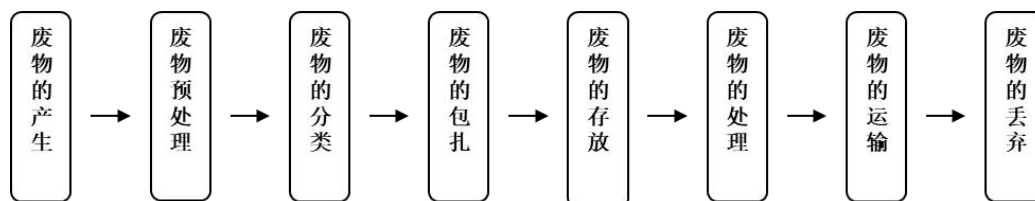


图 10-1 危险性废弃物管理工作守则流程图

● 生物废弃物分类

样本制备的过程，主要废弃物包含液体生物废弃物(废液槽，以及各个使用后剩余残留的试剂)，以及固体生物废弃物(微流控芯片，连接模块)，一般非生物医疗废弃物，各废弃物分类定义如下，在操作中所产生的废弃物需依照定义分类回收，并依照对应的处理方法进行处理。

凡与危险性废弃物产生有关的人均须接受培训，使其能辨认该类废弃物并作适当分类，以确保废弃物包扎正确及安全妥当回收。

1. 实验废弃液、废弃培养基及初次清洗废弃水（此类主要是化学性废弃物）。

实验废弃液：实验过程中所使用的试剂、试剂的混合物、试剂与其它物质（细胞悬液、磁珠等）的混合物所产生的废弃的液态或半固态物质。比如：PBS、HBSS 等（Elution Buffer 除外）。

2. 废弃包装、容器、废弃实验耗材等。

- 1) 试剂或化学品的内包装：直接与试剂或化学品接触的瓶、管、盒、塑料等。

2) 废弃样本：组织样本、细胞样本、血液样本等的剩余样本。需要单独分开存放、收集和放置;此类主要是感染性废弃物、病理性废弃物。

3) 非生物医疗性废弃物（生活垃圾）：由实验室在生产过程中产生的，但无潜在传染性的废弃物，如试剂的外包装、打印的废弃报告单、各种辅助材料外包装等无接触到危险性或生物医疗废弃物质。

● 生物废弃物的收集、存放与处理

1. 实验室应当用有盖的废弃物桶来收集废弃物（医疗废弃物标志如下图）。

2. 非危险性废弃物由生物安全员收集后放在指定的废弃物存放处。

3. 生物安全员收集的危险性废弃物在入库前，固态危废需检查是否包装捆扎好，检查有无破损溢出的情况，相应标识是否粘贴，确认正常后进行称重，然后进行入库操作，入库后放入吨袋中，整齐有序地进行堆放；液态危废先将小号废液桶里的废液进行称重，检查有无泄漏，相应标识是否粘贴，确认正常后进行入库操作，倒入危废暂存间内的 50L 的大危废储存桶内，并及时进行密封。

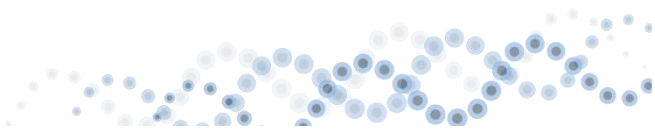
4. 非危险性废弃物及生活废弃物由平台公司的人员收集处理。

5. 危险性废弃物丢置注意事项：

1) 经污染的利器是唯一会对处理者构成感染危险的危险性废弃物。它们必须弃置于非刺穿的利器盒内，以便送至专业处理地。

2) 化学性废弃物中批量的废化学试剂、废消毒剂应当交由专门机构处置。

3) 包装好或容器内的感染性废弃物、病理性废弃物、损伤性废弃物不得取出。





附图 医疗废弃物处理



新格元生物科技有限公司

电 话：025-58862675

电子邮件：product-service-support@singleronbio.com

网 址：www.singleronbio.com

地 址：南京市江北新区药谷大道 11 号加速器二期 06 栋 4-5 层（南京）
苏州工业园区新泽路 1 号生物医药产业园三期 A 区 1 号楼 401 单元（苏州）