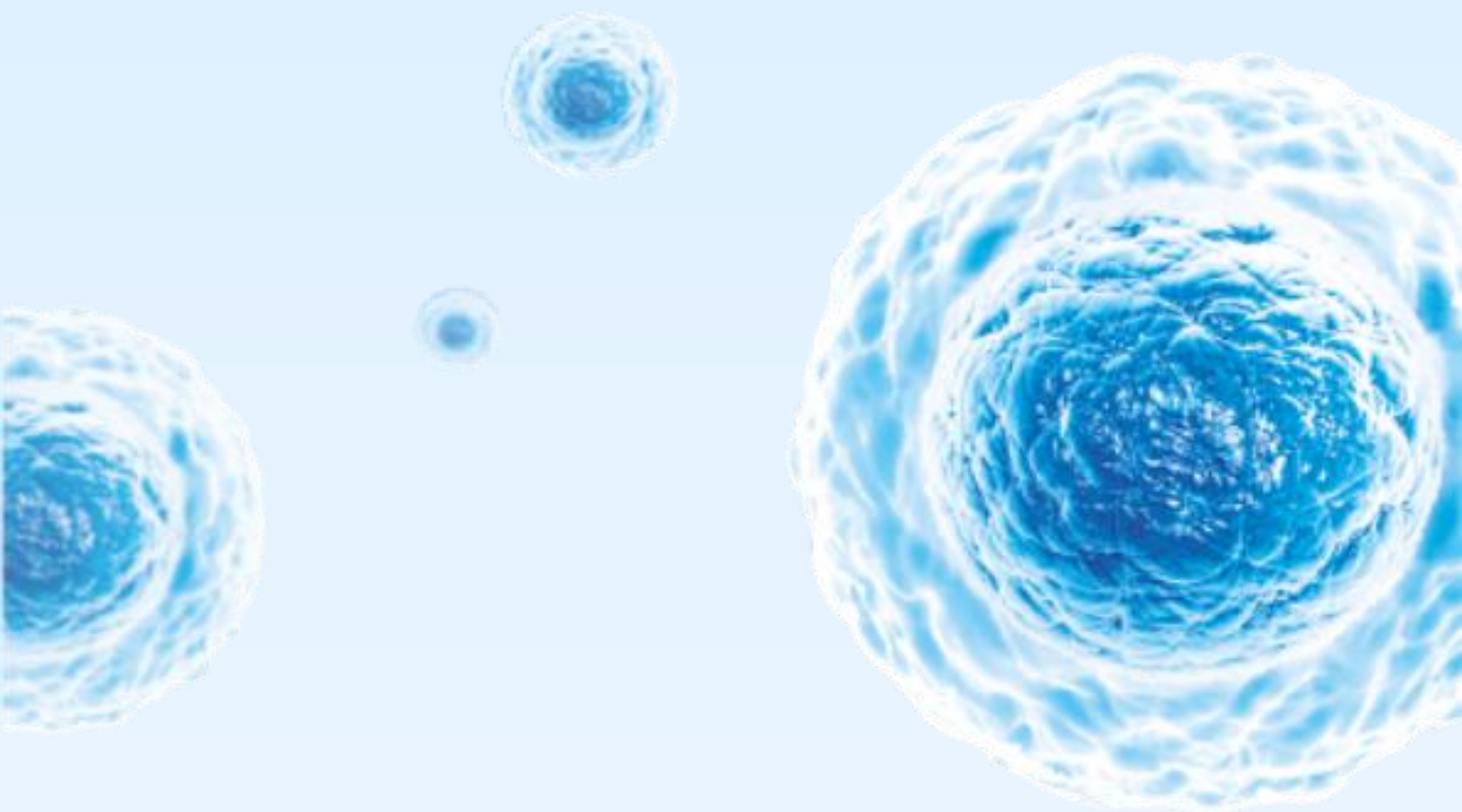




AccuraCode® RNA-seq Kit (96 Wells)
Bulk RNA 建库试剂盒（96-Well 版）用户手册

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
10710174	AccuraCode® RNA-seq Kit (96 wells)	1 RXNs

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. 基本信息	- 1 -
1.1 产品概述	- 1 -
1.2 产品组成	- 2 -
1.3 产品优势	- 3 -
1.4 技术原理	- 4 -
2. 自备仪器耗材试剂	- 5 -
3. 工作流程和操作时间	- 7 -
3.1 实验流程	- 7 -
3.2 实验注意事项	- 7 -
3.3 细胞投入量范围	- 8 -
4. 裂解准备和 mRNA 捕获	- 9 -
4.1 AccuraCode Barcode Beads 和 Lysis mix 准备	- 9 -
4.2 细胞裂解和 mRNA 捕获	- 10 -
5 反转录和 cDNA 扩增	- 12 -
5.1 反转录	- 12 -
5.2 cDNA 扩增	- 13 -
5.3 cDNA 纯化	- 15 -
5.4 cDNA 质检	- 16 -
6. 转录组文库构建	- 19 -
6.1 片段化	- 19 -

6.2 接头连接	- 20 -
6.3 接头连接后产物纯化	- 21 -
6.4 PCR 富集	- 22 -
6.5 扩增产物片段分选	- 23 -
6.6 文库质检	- 25 -
附录 A 技术原理	- 27 -
附录 B 测序	- 28 -
附录 C 常见问题	- 29 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

AccuraCode® RNA-seq Kit，不仅可以同时处理近百个样本的常规混样 mRNA 捕获和混合建库操作，还可以应用于药物筛选。它能够一次性完成近百种药物处理细胞的 mRNA 捕获和混合建库操作，快速获取每种药物处理后细胞的基因表达信息。通过生物信息学数据分析，可以获得更多药物评价信息，从而加速药物筛选过程。

该试剂盒利用带有条形码（well-barcode）和 UMI 的磁珠捕获 mRNA。在经过反转录后，96 个产物被合并到一起，然后通过 PCR 扩增，最终形成一个包含 96 个样本的转录组文库。在完成测序后的分析过程中，利用 well barcode 可以将每个样本分离开来，获取每个样本的转录组信息，同时利用 UMI 进行 mRNA 的定量捕获。这一系列操作使得该试剂盒成为一种高效且可靠的工具，有助于加快研究过程并提高数据质量。

1.2 产品组成

Box 1: AccuraCode RNA-seq Kit

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积
AccuraCode Barcode Beads	1	15ul/well
Wash Buffer B	4	7mL
Purification Beads Wash Buffer	1	1.5 mL
BR Lysis Buffer	2	6mL
100mM DTT	1	880uL
ASF Lysis Enhancer	1	700uL
RNase Inhibitor	1	440uL
Reverse Transcriptase	1	70uL
RT Master Mix	2	400uL
RT Enhancer	1	150uL
TS Primer	2	50uL
Amplification Master Mix	1	400uL
A Primer Mix	1	200uL
Amplification Enzyme	1	20uL
Fragmentation Buffer V3	1	17uL
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	6uL
1 × TE	1	800uL
Ligation Mix	1	72uL
Ligation Booster	1	4uL
Adaptor	1	50uL
Library Amp Mix V3	1	60uL
Indexing Primer Mix1(ATCACGTT)	1	30uL
Indexing Primer Mix2(CGATGTTT)	1	30uL
Indexing Primer Mix 3 (TTAGGCAT)	1	30uL
Indexing Primer Mix 4 (TGACCACT)	1	30uL

注意:

- 按照各自的保存温度存放试剂。
- Indexing Primer Mix 包含多种，任选 1 种使用即可。

AccuraCode Barcode Beads(96well) 预装于 96 孔 PCR 板,AccuraCode Barcode Beads 顺序与箭头所指方向一致,从上到下为 1-96。

96 well plate - arrangement of Well Barcodes												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

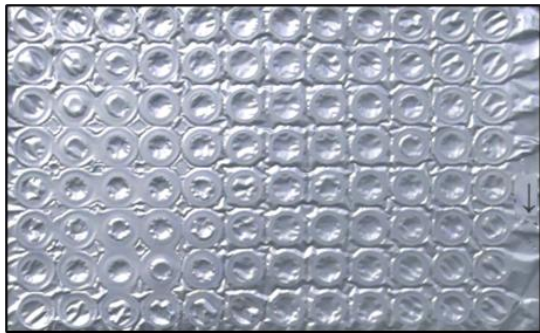


图 1 96 孔板 Barcode 分布情况

1.3 产品优势

- 通量高：一次可完成数百种药物的高通量筛选；
- 性价比高：构建混合文库，可降低药物筛选成本；
- 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。
- 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，是基于 RNA 测序的，AccuraCode[®] 药物筛选技术可以针对基因层面；
- 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。

1.4 技术原理

AccuraCode® RNA-seq 可以同时构建包含数百个样本信息的 RNA-seq 文库。

AccuraCode Barcode Beads 包含 Illumina Read1 测序引物序列 (PCR handle)、Well Barcode、分子标签 (UMI) 和 PolyT 序列。Well Barcode 可用于区分高通量细胞培养板(96 孔板) 中不同样品, 以便在后续分析中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, 携带独特 Well Barcode 和 UMI 的 Barcode Beads 通过 PolyT 序列对细胞内 mRNA 分子进行捕获标记。随后经过逆转录 (RT) 处理, 将 96 孔产物合并进行 PCR 扩增并纯化, 从而获得一个 cDNA。得到的 cDNA 经过片段化、连接接头等建库步骤, 可构建适用于 Illumina 测序平台的测序文库。这一流程的执行使得样本处理高效可靠, 为后续的数据分析提供坚实基础。

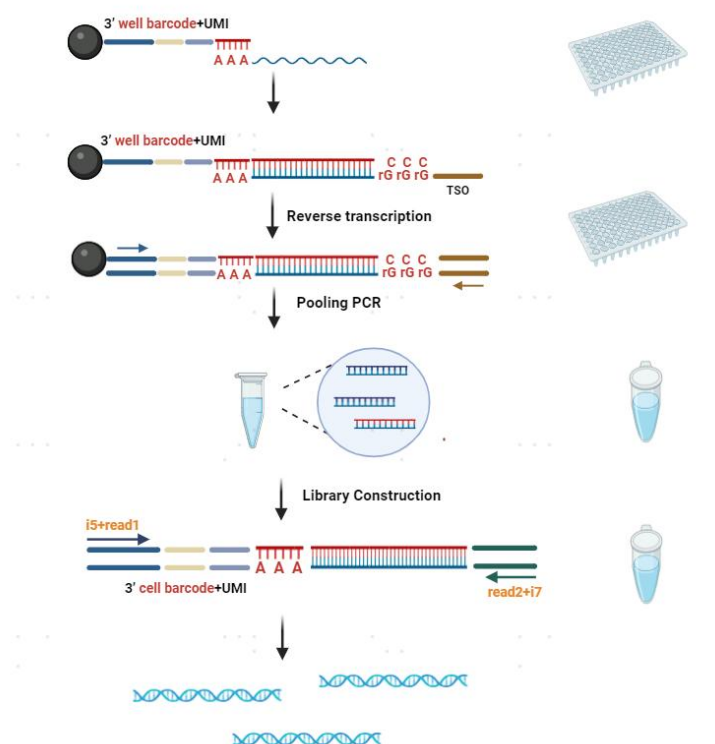


图 2 技术原理图

2. 自备仪器耗材试剂

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
		Nuclease-free Water
	工具	0.5 μL–200 μL 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 
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
		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
	工具	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)
		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)
		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
		DynaMag™ -PCR 磁力架/Thermo

注意: 试剂耗材必须是无菌、无核酸酶的。

3. 工作流程和操作时间

3.1 实验流程

Workflow	Station	Step duration	Stop point
Cell lysis and mRNA capture	Pre-PCR station	0.5 h – 1 h	
RT and amplification		2.5 h	4°C for 48 h or -20°C for a week
Library construction	Post-PCR station	2.5 h	-20°C or -80°C for 3 month
		Total: 5.5 h – 6 h	

图 3 工作流程和操作时间

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. 悬浮细胞加入裂解体系的体积不可超过 15 μ L，推荐 5–10 μ L；但每孔的细胞数量必须保证一致。否则可能会出现数据拆分不均匀现象。
7. 同一个 96 孔板上，只能做同一个物种的细胞。
8. 使用 AccuraCode Barcode Beads 时，室温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。
9. 细胞裂解时，严格控制细胞裂解时间 15 min。

注意：裂解完成后，裂解产物可保存至-80°C 但保存时间不得超过 24h。

10. 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。
11. 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。
12. 产物片段化时，必须提前设置 PCR 程序，PCR 仪热盖保持在 75℃。
13. 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 细胞投入量范围

细胞类型	细胞投入量*	细胞活性
悬浮细胞	1k~100k 个	≥85%
贴壁细胞	1k~30k 个	≥85%

*悬浮细胞：细胞投入量指投入裂解捕获的细胞数。

*贴壁细胞：细胞投入量指细胞经贴壁培养一定时间后投入裂解捕获的细胞数。（需要注意根据不同的细胞贴壁后的生长速率确定起始的细胞培养量和培养天数）

4. 裂解准备和 mRNA 捕获

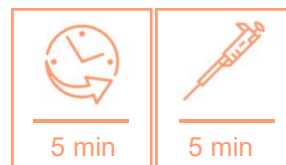
我们建议用户为所有需要无尘室条件的 PCR 前步骤建立一个“pre-PCR 区”。这些步骤包括组织解离、单细胞分离和 mRNA 捕获、反转录。对于 RNA 相关的工作，用 RNase Away(或同类产品)清洁所有工作台面和移液器。佩戴适当的口罩和实验室手套，以避免污染和 RNA 降解。

设立第二个实验区(Post-PCR)，进行 cDNA 扩增、纯化和 QC，以及文库制备和文库 QC。

4.1 AccuraCode Barcode Beads 和 Lysis mix 准备

准备材料：

- BR Lysis Buffer
- AccuraCode Barcode Beads
- 100mM DTT
- RNase Inhibitor
- ASF Lysis Enhancer



自备材料：

- 移液槽
- 96 孔 PCR 板
- 96 孔板封口膜
- 不同量程单通道移液器
- 15 mL 无菌&无核酸酶离心管

注：提前室温解冻“AccuraCode Barcode Beads”，完全溶解后混匀并短暂离心，置于冰上备用。

根据药筛处理的样本数选择对应数目的 AccuraCode Barcode Beads 并做好对应记录。

1. 根据下表在冰上配置 **Lysis Mix**，涡旋混匀并短暂离心后，在冰上暂存。

组分	1 well (1 x RXN, μL)	96wells (1.2 x RXN, μL)
BR Lysis Buffer	92.5	10656
100mM DTT	5	576
RNAse Inhibitor	2.5	288
ASF Lysis Enhancer	5	576
Total	105	12096

2. 将 Lysis Mix 倒入移液槽中，并放置于冰上。
3. 取一个新的 96 孔板，加入配制好的 Lysis Mix，每孔分装 105 μL 。
4. AccuraCode Barcode Beads 涡旋混匀并短暂离心，向加有 Lysis Mix 的 96 孔板中每孔分装 10 μL Beads，同时用移液器吹吸混匀，使得磁珠在 Lysis Mix 中均匀分布，在整板磁珠分装完毕后，将 96 孔板用封口膜密封后，暂存在冰上待用。

注意:

- 用锡箔纸密封的装有 AccuraCode Barcode Beads 的 96 孔板，直接用移液器枪头扎孔吸取，吸取磁珠时，要用移液器吸打混匀磁珠后再吸取。
- 记录好每孔对应的 AccuraCode Barcode Beads 序号。
- 确保正确的 96 孔板方向；缺口应该在右下方，箭头指向下方。
- 使用过后的装有 AccuraCode Barcode Beads 锡箔纸封的 96 孔板不得二次利用。

4.2 细胞裂解和 mRNA 捕获

准备材料:

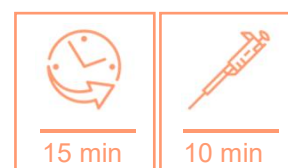
- Wash Buffer B

自备材料:

- 96 孔 PCR 板
- 96 孔封口膜
- PBS

悬浮细胞:

1. 将含有 AccuraCode Barcode Beads 和裂解液的 96 孔板置于冰上，用移液器混匀细胞，每孔加入 5–10 μL 细胞悬液。加样完毕后，用排枪反复轻柔吹吸 96 孔板，使得每孔的磁珠均匀分布。



注意:

- 每孔细胞数量必须保证一致；细胞悬液的体积不可超过 15 μ L；
- 同一个 96 孔板必须是同一物种细胞。

2. 将 96 孔板室温静置裂解 15min。

3. 裂解完成后用封口膜密封 96 孔板，板短暂离心，并放置在冰上待用。

贴壁细胞:

1. 药物处理后，去除细胞培养基，用 200 μ L PBS 洗涤细胞 2 次，洗去未贴壁或贴壁不紧密的细胞。

2. 将含有 AccuraCode Barcode Beads 和 Lysis Mix 的混合液转移到细胞培养板中。（注意转移顺序，保持与原板顺序一致）

3. 将 96 孔细胞板置于室温下裂解 15min，中途用移液器顺时针或逆时针吹打一次。

4. 裂解完成后，将细胞培养板置于冰上，每个孔中加入 80 μ L Wash Buffer B。

5. 将每孔内所有液体（包含磁珠）依次转移到新的 96 孔板上，转移顺序与原板一致。

注意: 由于会有部分磁珠粘连在细胞培养板上，因此该步骤需要多次吹打混匀，尽可能减少磁珠损失。

6. 用封口膜密封 96 孔板，短暂离心，并放置在冰上待用。

注意: 在完成以上裂解步骤后，要保证剩余操作都在低温进行。



5 反转录和 cDNA 扩增

5.1 反转录

准备材料:

- RT master Mix
- TS Primer
- RT Enhancer
- RNase Inhibitor
- Reverse Transcriptase
- Wash Buffer B
- 上一步裂解产物



自备材料:

- 96 孔 PCR 板
- 96 孔封口膜
- Cold Nuclease-Free Water
- 1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
- PCR 8 联管

1. 在室温下解冻 RT master Mix 、TS Primer 和 RT Enhancer，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上暂存（若 RT master Mix 试剂溶液中有沉淀物，请用手指轻弹试剂管壁）。
2. 根据下表提前配置 RT Mix，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上暂存。

组分	1 well (1 x RXN, μ L)	96 well (1.2 x RXN, μ L)
RT master Mix	6	691.2
Cold Nuclease-Free Water	2.25	259.2
TS Primer	0.5	57.6
RT Enhancer	0.5	57.6
RNase Inhibitor	0.25	28.8
Reverse Transcriptase	0.5	57.6
Total	10	1152

3. 将配置好的 RT Mix 分到 8 联管中，置于冰上保存。
4. 将 4.2 步的 96 孔板放置在 96 孔磁力架上，待溶液澄清后小心去除 80 μ L 上清（注意观察移液器枪头内液体是否吸走磁珠），随后立即向每孔中加入 100 μ L Wash Buffer B，所有孔操作完毕后，使用封口膜密封，涡旋混匀后短暂离心。

注意：该步骤，一排（列）上清去除后，要立即加入 Wash Buffer B，一次一排（列），避免磁珠长时间暴露于空气中，容易干燥，影响后续实验。

5. 将 96 孔板放置在 96 孔磁力架上，待溶液澄清后小心去除上清（将上清液全部去除，勿残留，小心不要吸走磁珠），随后立即向每孔中加入 10 μ L RT Mix，所有孔操作完毕后，使用封口膜密封，涡旋混匀后短暂离心。

注意：该步骤，一排（列）上清去除后，要立即沿着磁珠吸附的一侧加入 RT Mix，一次一排（列），避免磁珠长时间暴露于空气中，容易干燥，影响后续实验。

6. 将 96 孔板置于 PCR 仪中，进行以下程序：

Lid Temperature 80°C		Reaction Volume 30 μ L	
步骤	温度	时间	
1	42° C	1 h	
2	70° C	15 min	
3	4° C	Hold	

注：程序运行完成后，该产物可以在 4°C 放置过夜，-20°C 可保存 24h。

5.2 cDNA 扩增

准备材料：

- Amplification Master Mix
- A Primer Mix
- Amplification Enzyme
- 上一步 RT 产物



自备材料：

- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架
- PCR 8 联管
- Cold Nuclease-Free Water

1. 在室温下解冻 Amplification Master Mix 和 A Primer Mix, 涡旋混匀并短暂离心, 置于冰上暂存。
2. 按照下表在冰上提前配置 PCR Mix, 涡旋混匀并短暂离心, 置于冰上暂存。

组分	1.1 x RXN (μL)
Amplification Master Mix	378.4
A Primer Mix	70.4
Cold nuclease-free water	413.6
Amplification Enzyme	17.6
Total	880

3. 短暂离心 96 孔板, 将每孔中的液体和磁珠吹打混匀, 并转移所有的产物到一个 2mL 离心管中。
4. 将装有 RT 产物的 2mL 离心管放在 1.5mL 规格磁力架上, 待溶液澄清后 (约 5min) 小心去除上清。
5. 将 2mL 离心管从磁力架上取出, 置于冰上向离心管中加入 800μL PCR Mix。
6. 涡旋混匀并短暂离心 2mL 离心管, 将内容物分装至 2 个 8 联管中, 每孔体积为 50μL。
7. 将 8 联管放入 PCR 仪中, 使用以下程序进行 PCR 扩增:

Lid Temperature 105°C	Reaction Volume 50μL	
步骤	温度	时间
1	95° C	3 min
2 cycles = 4	98° C	20 sec
	65° C	45 sec
	72° C	3 min
	98° C	20 sec
3 cycles = n (见下表)	67° C	20 sec
	72° C	3 min
	72° C	5 min
4	72° C	5 min
5	4° C	Hold

PCR 循环数根据每孔细胞投入量确定, 详见下表,

每孔细胞数	循环数 n
1K-10K	11

11K–50K	9
51K–100K	7

5.3 cDNA 纯化

准备材料：

- cDNA 扩增产物



自备材料：

- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架
- 1.5mL 离心管
- 无水乙醇
- AMPure XP 纯化磁珠

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 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。
- 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。

1. 纯化磁珠提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
2. PCR 产物短暂离心，将 8 联管中所有产物转移至两个新的 1.5mL 离心管中，短暂离心并用移液器量取产物体积。
3. 计算磁珠的体积，相当于扩增 cDNA 产物总体积的 $0.6 \times$ 。例如，如果测量产物的体积为 200 μ L，则使用 $0.6 \times 200 = 120\mu$ L 的磁珠。
4. 涡旋混匀磁珠，并吸取适当体积加入至 PCR 产物中，涡旋振荡 15s 充分混匀，室温孵育 5min。
5. 将 1.5mL 离心管短暂离心，置于 1.5mL 规格磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心吸除上清液至新的 1.5mL（或 2mL）离心管中，暂留。

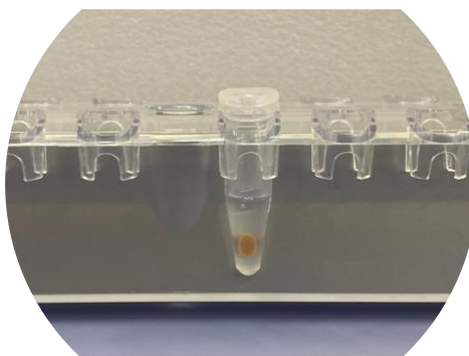


图4 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

6. 将离心管从磁力架上取出，加入 800 μ L Purification Beads Wash Buffer，涡旋 15s，在室温下孵育 5min。
7. 将离心管短暂离心，放在磁力架上 5min，直到液体澄清，小心去除上清。
8. 保持离心管置于磁力架上，加入 800 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
9. 重复步骤 8，总计漂洗 2 次。
10. 从磁力架上取下离心管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 3–5min。
11. 将离心管从磁力架上取出，每管加入 20 μ L Nuclease-free Water 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
12. 将离心管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取上清合并至一个新的灭菌 1.5mL 离心管中， -20°C 或 -80°C 可以保存三个月。

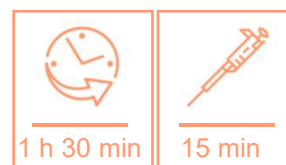
5.4 cDNA 质检

准备材料：

- 上一步纯化好的 cDNA

自备材料：

- Qubit 4.0 荧光定量仪
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）



○ 全自动核酸片段分析仪，如 Agilent Fragment Analyzer 5200

1. 取适量（建议 1 μ L）样品进行 cDNA 浓度和片段大小检测。
2. 推荐使用 Qubit 进行 cDNA 浓度检测，具体实验操作参见 Qubit 荧光定量仪操作与维护规程。
3. 推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测，具体实验操作参见 Agilent 片段分析仪使用说明书。
4. 质检结果请参照图 5，合格 cDNA 应同时满足以下几个条件：主峰片段大小应在 900–2000bp 左右；1000bp–5000bp 占比大于 15%；300bp 以下片段占比小于 40%。cDNA 评级分布见下表。（若在满足“合格”类条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况，评级评定为“风险”）

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量 > 300ng，质检主峰 900bp–2000bp 之间，1000bp–5000bp 占 比>15%，300bp 以下片段占比<40%	建议直接进行建库
风险	不满足“合格/不合格”任一评级条件	尝试风险建库
不合格	Qubit 检测总量<300 ng， 质检主峰<500bp 或主峰不明显	不建议进行建库实验

注：若在满足“合格”类条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况，评级评定为“风险”。

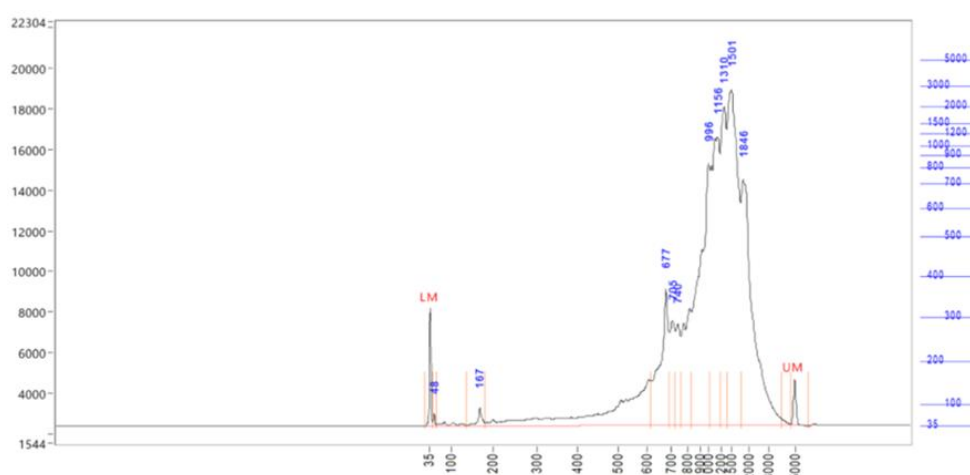


图 5 cDNA 片段分布示意图

5. cDNA 二次纯化操作

若质检发现 cDNA 300bp 以下片段占比在 10–40% 时，需要进行二次纯化，二次纯化后满足步骤 2 的“合格”要求仍可直接建库：

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

40–300 bp 片段占比	纯化磁珠比例
10% – 20%	0.8 x
21% – 35%	0.7 x
> 35%	0.6 x

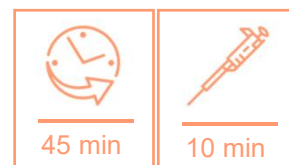
- 3) 其余操作方式与 5.3 相同，最终用 15 μ L 的 Nuclease-free Water 洗脱 cDNA。
- 4) 二次纯化后一般只需要测定 Qubit 值，不再需要核酸片段的质检。

6. 转录组文库构建

6.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3 ；
- Fragmentation Enzyme Mix V3 ；
- 1×TE；
- 步骤 5.4 的 QC 合格的 cDNA 产物



自备材料：

- 无核酸酶 PCR 管

1. 提前按照下表设置片段化 PCR 程序，反应体积 35 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75 $^{\circ}$ C。

热盖温度：75 $^{\circ}$ C		反应体积：35 μ L
Step	Temperature	Time
1	37 $^{\circ}$ C	10 min
2	65 $^{\circ}$ C	30 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3，确保完全融化，涡旋混匀（5–8 秒）并短暂离心后冰上备用；如果看到沉淀，涡旋混匀至沉淀消失，溶液变澄清。
3. 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡（5–8 秒）并瞬离，置于冰上备用。
4. 按照以下建议的 cDNA 模板投入量进行建库：
 - ① cDNA 总量在 10–50ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。
 - ② cDNA 总量在 50ng 以上时，选择 50ng 投入量进行建库。
5. 将 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

片段化反应体系：

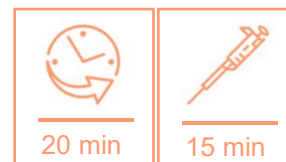
组分	体积 (μL)
cDNA (10ng 或 50ng)	Variable
1 X TE	Variable
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
Total	35

6. 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬时离心后将 PCR 管置于预热的 PCR 仪中并运行片段化程序。

7. 完成反应后立即进行下一步接头连接。

6.2 接头连接

准备材料：



- Ligation Mix;
- Ligation Booster;
- Adaptor;
- 步骤 6.1 的片段化产物

1. 提前按照下表设置接头连接 PCR 程序，反应体系 70μL，并关闭 PCR 仪热盖加热功能，若 PCR 仪无此功能，将热盖设置到最低温度。

热盖温度：OFF		反应体积：70μL
Step	Temperature	Time
1	20° C	15 min
2	4° C	Hold

2. 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。

3. Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积（多反应体系时建议 Adaptor 单独加入）。

4. 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

接头连接反应体系：

组分	体积 (μL)
Fragmented cDNA	35
Ligation Mix**	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

**Ligation Mix 比较粘稠，小心移液确保体积准确。

5. 涡旋混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中立即运行接头连接程序。

6.3 接头连接后产物纯化

准备材料：



- 0.1×TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1×TE)
- 步骤 6.2 的接头连接产物

自备材料：

- 无核酸酶水；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- 无水乙醇；
- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器；
- 无核酸酶 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠 (以下简称磁珠) 提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 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。
- 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。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25 μ L 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。
2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，加入 AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.2x 产物总体积（例如：片段化产物体积为 68.5 μ L，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7$ μ L AMPure XP 纯化磁珠），涡旋混匀后室温孵育 5min。

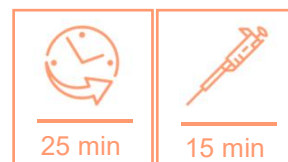
注：磁珠比较粘稠，需充分涡旋振荡混匀后准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无核酸酶 PCR 管中，暂时留存。
4. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，总计漂洗 2 次。
6. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 $\times$ TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
8. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，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 6.4 PCR 富集。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃保存 72 小时，-20℃保存一周。

6.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3;



- Indexing Primer Mix;
- 步骤 6.3 的接头连接后纯化产物。

1. 于冰上配置如下反应体系，涡旋混匀并短暂离心，将 PCR 管置于 PCR 仪中。

组分	1 x RXN (μ L)
Purified adapter-ligated product	15
Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix*	10
Total	50

注：Indexing Primer Mix*任意选择一种即可。

2. 提前按照下表设置 PCR 富集程序，并使 PCR 仪热盖保持在 105℃，反应体积 50 μ L。

热盖温度：105° C		反应体积：50 μ L
Step	Temperature	Time
1	98° C	30 sec
2 (循环数参见下表)	98° C	10 sec
	65° C	75 sec
3	65° C	5 min
4	4° C	Hold

扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

cDNA 投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

6.5 扩增产物片段分选

准备材料：

- 步骤 6.4 的 PCR 富集产物

自备材料：

- Elution Buffer;
- AMPure XP 纯化磁珠；



- 新鲜配制的 80%乙醇；
- Nuclease-free Water
- 不同量程单通道移液器；
- 无核酸酶 PCR 管；
- 1.5mL 离心管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 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。
- 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。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。
2. 将 6.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，并用 Nuclease-free Water 补齐至 50 μ L。涡旋混匀磁珠，AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.5x 产物总体积。（例如，产物体积为 50 μ L,则使用 $0.5 \times 50 = 25$ μ L AMPure XP 纯化磁珠，涡旋振荡 15s 充分混匀，室温孵育 5min。）
3. 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），小心回收上清液至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。
4. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5 μ L 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
5. 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。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
7. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。

8. 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，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
9. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Elution Buffer 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
10. 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 18 μ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

重要提示：此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃保存三个月。

6.6 文库质检

准备材料：

- 步骤 6.5 的纯化产物

自备材料：

- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit
- Qubit 测定管



1. 取一份待测样品（1 μ L）用 Qubit 4 荧光计测定浓度。
2. 取一份待测样品（约 5ng）用 Agilent Fragment Analyzer 5200 或同等设备测定片段大小分布。（按片段分析仪的建议稀释样品）。
3. 理想的文库应符合以下标准：
 - a. 在分析区间设定为 300 bp 至 2000 bp 时，主峰片段范围应在 400 bp 至 700 bp 之间。
 - b. 900 bp 至 1500 bp 之间的片段占比小于 10% 。
 - c. 300 bp 以下的片段占比小于 10% 。
4. 质控标准及处理方案如下：

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng，主峰 400bp-700bp 之间，900bp-5000bp 占 比<10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng，主峰 400b-700bp 之间，900bp-5000bp 占 比 10%-20%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 值<50ng，主峰<400bp， 225bp-500bp 占比<30%	不建议上机测序

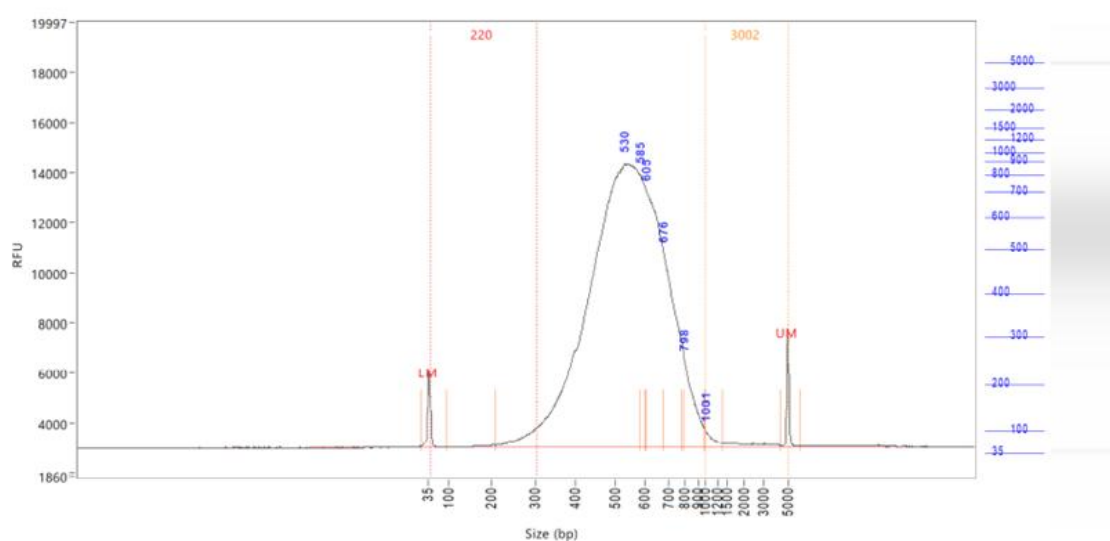


图6 文库质检图

附录 A 技术原理

AccuraCode® RNA-seq Kit 基于 96 孔板设计，利用带有条形码（well-barcode）和 UMI 的磁珠捕获 mRNA。在经过反转录后，96 个产物被合并到一起，然后通过 PCR 扩增，最终形成一个包含 96 个样本的转录组文库。在完成测序后的分析过程中，利用 well barcode 可以将每个样本分离开来，获取每个样本的转录组信息，同时利用 UMI 进行 mRNA 的定量捕获。这一系列操作使得该试剂盒成为一种高效且可靠的工具，有助于加快研究过程并提高数据质量。

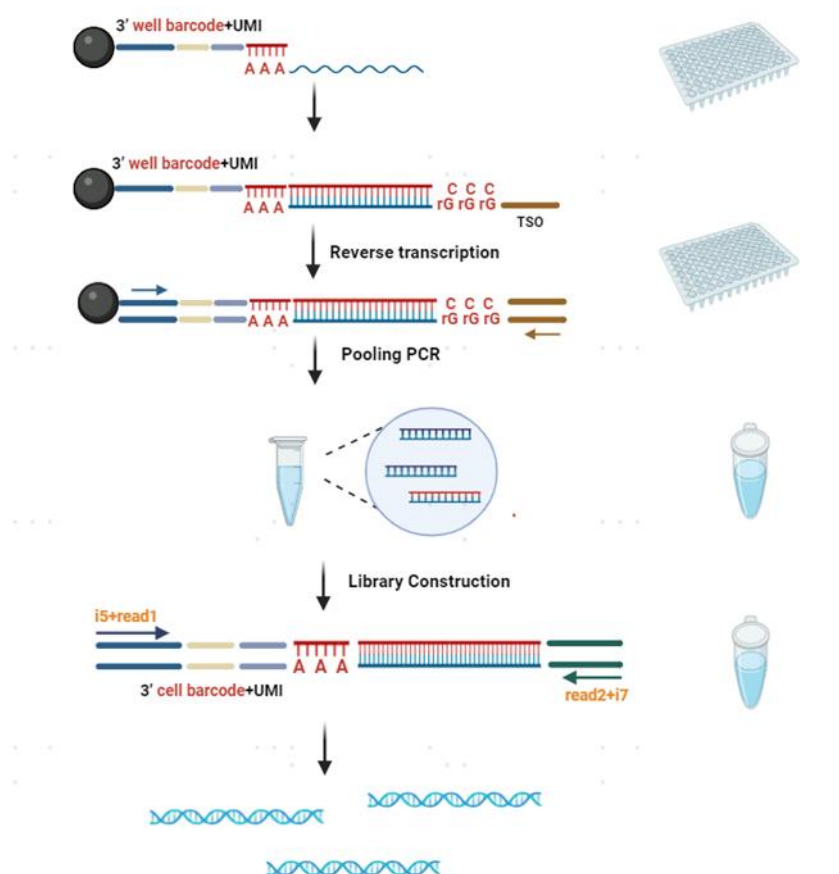
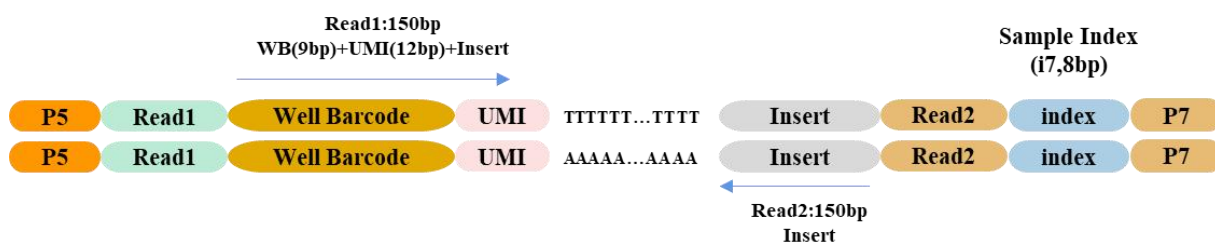


图 A1 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

附录 B 测序

AccuraCode® RNA-seq 文库包括标准的 Illumina 配对末端结构，以 P5 开始，以 P7 结束。Read1 和 Read2 是用于双端测序的标准 Illumina 测序引物位点。Read1 用于测序 9bp 的孔条形码和 12bp 的 UMI，Read2 用于量化基因表达。



根据具体的实验目的，建议使用不同的测序深度。每个样品孔的推荐测序深度如下：

- 建议的测序深度：1–5million / well
- 建议的测序读长：Pair-end 150bp (PE 150)

Read	Read1	i7 Index	i5 Index	Read2
Purpose	Barcode, UMI	Sample Index	N/A	Insert
Length	150	8	0	150

附录 C 常见问题

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

- 2、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。

- 3、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：药物处理结束的悬浮细胞和贴壁细胞在 RT 前处理不同。

- 4、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。

- 5、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 3-10G。

- 6、AccuraCode® RNA-seq 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，可快速获得每种药物的转录本和靶向基因表达信息。

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：苏州市工业园区新泽路 1 号生物医药产业园三期 A 区 1 号楼 401 单元（苏州）
南京市江北新区药谷大道 11 号加速器二期 06 栋 3-4 层（南京）