

仅供研究使用，不可用于临床诊断
适用于 Illumina 和 MGI 测序平台
应用广泛

如有问题，请联系：

🌐 www.igenetech.com/support

📞 010-89146623

✉ support@igenetech.com

IGT™ Fast Stranded RNA Library Prep Kit v2.0

使用说明书

适用于 2022 年新产品体系

适用于 RNA 捕获测序的建库环节

版本号：C.0，2022 年 6 月

文档号：PROT220614

样本提取

文库制备

靶向扩增

上机测序

数据分析

版本说明

生产公司：艾吉泰康（嘉兴）生物科技有限公司

使用说明

本说明书适用于 IGT™ Fast Stranded RNA Library Prep Kit v2.0 产品，用于 RNA 捕获测序的建库环节。使用前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书内容进行实验。

试剂盒概述

IGT™ Fast Stranded RNA Library Prep Kit v2.0 是针对总 RNA 进行链特异性文库构建的试剂盒，可以搭配液相探针杂交捕获试剂盒，用于 RNA 捕获测序，适用于 Illumina 和 MGI 高通量测序平台。

更新信息

使用说明书名称	修订日期	修订内容摘要
C.0	2022 年 6 月	修改适配新产品体系
B.0	2022 年 4 月	v2.0 试剂盒对应说明书
A.0	2020 年 2 月	首次发布

试剂盒组成

完整的文库构建需要建库模块和接头模块两部分试剂, 可根据需求配套选购艾吉泰康的接头模块试剂



以下为艾吉泰康推荐品牌, 也可以使用已有满足实验要求的替代试剂和耗材。

建库模块: IGT™ Fast Stranded RNA Library Prep Kit v2.0

管盖颜色	组分	总量		保存温度
		16 rxn	96 rxn	
红色	Fast Frag Buffer	72 µL	432 µL	-20°C ± 5°C
棕色	Fast First Strand Buffer	108 µL	640 µL	
绿色	Fast First Strand Enzyme	36 µL	216 µL	
橙色	Fast Second Strand Buffer with dUTP	540 µL	2*1584 µL	
橙色	Fast Second Strand Enzyme	88 µL	540 µL	
蓝色	Fast Ligation Buffer	540 µL	2*1584 µL	
蓝色	Fast Ligase Mix	88 µL	540 µL	
白色	PCR Master Mix with UDG	450 µL	2*1350 µL	

IGT™ Adapter & Primer

请根据需求选择下列 IGT™ Adapter & Primer 中的一种。

IGT™ Adapter & Single-Indexed Primer (for MGI)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		96*1 rxn	96*10 rxn	
蓝色	Adapter (15 µM, for MGI SI)	540 µL	4*1350 µL	-20°C ± 5°C
白色	TPE 1.0 Primer (20µM, for MGI)	264 µL	96*75 µL	
板装	TPE 2.0 Indexed Primer N (20µM, for MGI)*	4 µL each	96*75 µL	

*N 为 index 编号。

IGT™ Adapter & UDI Primer (for Illumina/MGI)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		96*1 rxn	96*10 rxn	
蓝色	Adapter (15 µM)	540 µL	4*1350 µL	-20°C ± 5°C
板装或白色	UDI Primer N (10 µM each)*	8 µL each	96*75 µL	

*N 为 index 编号。

IGT™ UMI Adapter & UDI Primer (for Illumina/MGI)

管盖颜色	组分	总量		储存温度
		96*1 rxn	96*10 rxn	
蓝色	Insert UMI Adapter (15 µM)	540 µL	4*1350 µL	-20°C ± 5°C
板装或白色	UDI Primer N (10 µM each)*	8 µL each	96*75 µL	

*N 为 index 编号。

自备的试剂、仪器和耗材

自备试剂

序号	试剂名称	推荐试剂	推荐品牌和货号
1	无水乙醇	无水乙醇	北京化工分析纯
2	Nuclease-Free Water	Nuclease-Free Water	Ambion (Cat # AM9930)
3	纯化磁珠 (任选一种使用)	Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter (Cat # A63880)
		IGT™ Pure Beads	iGeneTech (Cat # C80661)
4	文库片段质检试剂 (请根据仪器选择对应的试剂盒使用)	Agilent DNA 1000 Kit	Agilent (Cat # 5067-1504)
		S2 Cartridge (Standard Cartridge)	BiOptic (C105101)
5	Qubit 定量试剂	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher (Cat # C47257)

自备仪器

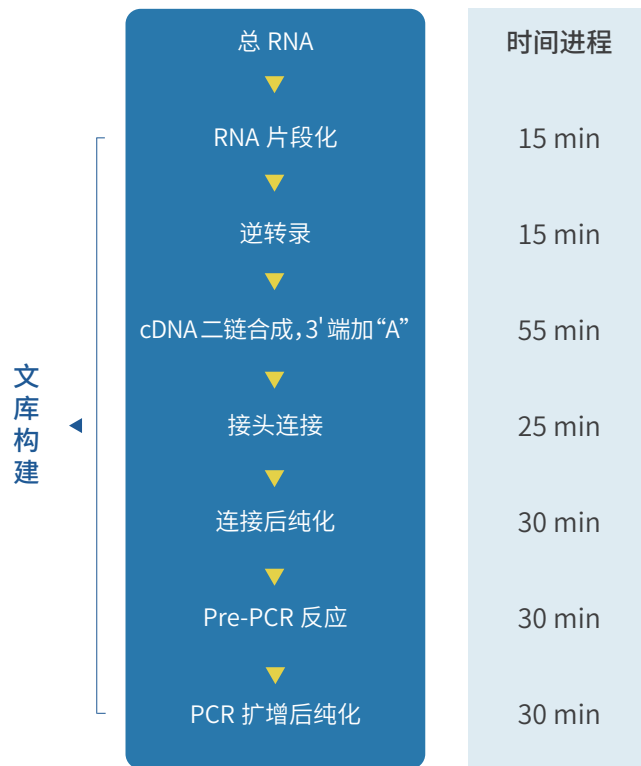
序号	仪器名称	推荐仪器	推荐品牌和货号
1	96 孔 PCR 管磁力架	DynaMag -96 Side	Thermo Fisher (Cat # 12331D)
2	涡旋振荡器	市面主流品牌	市面主流品牌
3	Qubit 荧光计	Qubit® 4.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Cat # Q33226)
4	片段分析仪 (任选一种使用)	Agilent 2100 Bioanalyzer system	Agilent (Cat # G2939AA)
		Qsep 100	BiOptic (Qsep100)
5	微型离心机	市面主流品牌	市面主流品牌
6	冰盒	市面主流品牌	市面主流品牌
7	PCR 仪	市面主流品牌	市面主流品牌

备注：以上为艾吉泰康推荐品牌，也可使用企业已有满足实验要求的替代仪器。

自备耗材

序号	耗材名称	推荐耗材	推荐品牌和货号
1	Qubit 定量管 (0.5 mL)	市面主流品牌	市面主流品牌
2	0.2 mL 离心管	市面主流品牌	市面主流品牌
3	0.2 mL 八连管	市面主流品牌	市面主流品牌
4	10 μ L 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌
5	200 μ L 移液器枪头	市面主流品牌	市面主流品牌

实验操作流程图



使用前说明

本操作说明书用于指导总 RNA 文库构建，适用于 Illumina 和 MGI 测序平台。使用前请仔细阅读本说明书，并且严格按照说明书内容进行实验。

- 文库构建过程中请使用 RNase-Free 的器材。
- 实验前请确认自备试剂（如无水乙醇）是否满足实验条件，按需订购。
- 实验过程中部分实验环节，不可暂停，请按照具体操作说明开展实验。
- 20℃保存的 Buffer、引物等试剂，使用前必须在冰盒上融化，充分混匀后使用，不可使用高温加热等方法将其溶解。
- 实验中使用的 Buffer、引物等试剂，若每次试剂使用量较少，尽量分装使用，避免反复冻融造成试剂质量变化。
- 实验样品应避免反复冻融，否则会导致 RNA 片段较小且测序质量下降。
- 样本质量对实验结果影响较大，建议使用合格样品开展实验。
- Enzyme 或 Enzyme Mix 类的试剂，使用前瞬时离心（≤ 600 g）后立即使用。
- 使用磁珠纯化样品时，提前将磁珠从 4℃冰箱取出，混匀后室温孵育 30 min 后再使用。
- RNA 样本 OD260/OD280 应在 1.8~2.1 之间，高于或低于此值，表明可能会有基因组或蛋白污染。
- RNA 建库过程中应佩戴手套、口罩，RNA 样本保持在冰盒上放置，实验环境保持洁净，避免 RNA 发生降解。

如果以上均满足，即可以开始实验

STEP 1 RNA 片段化

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Fast Frag Buffer

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

1.1 提前将 RNA 样本从 -80°C 冰箱中取出，提前将 Fast Frag Buffer 从 -20°C 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

1.2 在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
RNA 样本	13 μ L (总量 10 ng~1 μ g)
Fast Frag Buffer	4 μ L
总体积	17 μ L

1.3 使用移液器吸打混匀或涡旋混匀，瞬时离心。

1.4 设置 PCR 仪参数如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
	热盖温度 105°C
94°C	7 min
4°C	hold

1.5 当 PCR 仪温度降至 4°C 时，将 PCR 管取出，瞬时离心，立即进行 STEP 2。

STEP 2 逆转录

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Fast First Strand Buffer
- Fast First Strand Enzyme

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

2.1 提前将试剂盒中的 Fast First Strand Buffer 从 -20℃冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

2.2 将试剂盒中的 Fast First Strand Enzyme 从 -20℃冰箱中取出，颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

2.3 在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 1 反应结束的样品	17 μ L
Fast First Strand Buffer	6 μ L
Fast First Strand Enzyme	2 μ L
总体积	25 μ L

2.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

2.5 设置 PCR 仪参数如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 105℃	
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	hold

2.6 当 PCR 仪温度降至 4℃时，将 PCR 管取出，瞬时离心，立即进行 STEP 3。

STEP 3 cDNA 二链合成、3' 端加 “A”

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Fast Second Strand Buffer with dUTP
- Fast Second Strand Enzyme

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

3.1 提前将试剂盒中的 Fast Second Strand Buffer with dUTP 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

3.2 将试剂盒中的 Fast Second Strand Enzyme 从 -20℃ 冰箱中取出，颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

3.3 在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 2 的反应结束的样品	25 μL
Fast Second Strand Buffer with dUTP	30 μL
Fast Second Strand Enzyme	5 μL
总体积	60 μL

3.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈振荡混匀），瞬时离心。

3.5 设置 PCR 仪参数如下，将反应液置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
热盖温度 105℃	
16℃	30 min
72℃	15 min
4℃	hold

3.6 当 PCR 仪温度降至 4℃ 时，将 PCR 管取出，瞬时离心，立即进行 STEP 4。

STEP 4 接头连接

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Adapter
- Fast Ligation Buffer
- Fast Ligase Mix

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

4.1 提前将 Adapter 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.2 根据建库投入的 RNA 量，将 Adapter (15 μM) 提前稀释成合适的浓度：

RNA 投入量	接头浓度	稀释倍数
100 ng~500 ng	7.5 μM	2 倍
50 ng	3.75 μM	4 倍
25 ng	1.5 μM	10 倍
10 ng	0.75 μM	20 倍

4.3 提前将试剂盒中的 Fast Ligation Buffer 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.4 将 Fast Ligase Mix 从 -20℃ 冰箱中取出，颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

4.5 在冰盒上按下表配制反应体系：

试剂	体积
来自 STEP 3 反应结束的样品	60 μL
Fast Ligation Buffer	30 μL
Fast Ligase Mix	5 μL
Adapter (稀释后)	5 μL
总体积	100 μL



如果单次实验处理样本较多，需要对反应液进行预混合，请不要将 Adapter 进行预混合。最佳操作方式是先将 Adapter (稀释后) 和 STEP 3 反应结束的样品进行混合后，再将预混合反应液加入，这样可以有效降低接头自连。

4.6 使用移液器吸打混匀（避免剧烈震荡混匀），瞬时离心。

4.7 设置 PCR 仪参数如下（关闭热盖或不加盖热盖），将 PCR 管置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间
关闭热盖或不加盖	
20℃	15 min
4℃	hold

4.8 当 PCR 仪温度降至 4℃ 时，将 PCR 管取出，瞬时离心，立即进行 STEP 5。

STEP 5 连接后纯化

实验备注区

需要使用到的试剂:

- Nuclease-Free Water
- 80% 乙醇 (新配制)
- 纯化磁珠 (IGT™ Pure Beads)

需要使用到的仪器:

- 磁力架



纯化使用磁珠为 IGT™ Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP, 若选用其它品牌纯化磁珠, 需咨询对应供应商, 并通过预实验摸索合适的磁珠比例, 避免纯化失败。

- 5.1 提前用无水乙醇和 Nuclease-Free Water 配制 80% 乙醇, 并置于室温备用。请尽量使用新鲜配制的 80% 乙醇用于磁珠纯化。
- 5.2 提前从 4°C 冰箱中取出纯化磁珠, 混匀并置于室温平衡 30 min, 将已经平衡至室温的纯化磁珠, 涡旋混匀后备用。
- 5.3 在 STEP 4 完成后的 100 μL 反应液中加入 0.45 倍体积 (45 μL) 的纯化磁珠, 吸打混匀或涡旋混匀, 室温静置 5 min。
- 5.4 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架上 3 min, 待溶液澄清。
- 5.5 保持 PCR 管在磁力架上, 小心移弃上清, 向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液, 静置 30 s。
- 5.6 保持 PCR 管在磁力架上, 移弃上清, 再次向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液, 静置 30 s, 移弃上清。
- 5.7 盖上管盖, 瞬时离心, 将残留乙醇离心至管底, 置于磁力架上, 小心使用 10 μL 移液器移弃底部残留乙醇, 注意不要吸到磁珠。
- 5.8 保持 PCR 管在磁力架上, 室温静置 3~5 min, 晾干磁珠, 使残留乙醇彻底挥发。
- 5.9 加入 22 μL 的 Nuclease-Free Water, 将 PCR 管从磁力架取下, 吸打混匀或涡旋混匀, 室温静置 2 min。
- 5.10 瞬时离心, 将 PCR 管置于磁力架上 2 min, 待溶液澄清。
- 5.11 用移液器吸取 20 μL 上清液, 转移到新的 PCR 管中, 做好标记, 准备 STEP 6。

STEP 6 Pre-PCR 反应

实验备注区

需要使用到的试剂：

- PCR Master Mix with UDG
- UDI Primer

需要使用到的仪器：

- PCR 仪

6.1 提前将试剂盒中的 PCR Master Mix with UDG 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后颠倒混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

6.2 提前将试剂盒中的 UDI Primer 从 -20℃ 冰箱中取出，置于冰盒上融化，融化后短暂涡旋混匀并瞬时离心，置于冰盒上备用。

6.3 在冰盒上按下表配制 PCR 反应液，请记录好所使用的 Index 号：

试剂	体积
来自 STEP 5 反应结束的样品	20 μL
PCR Master Mix with UDG	25 μL
UDI Primer	5 μL
总体积	50 μL

6.4 使用移液器吸打混匀（避免剧烈震荡混匀），瞬时离心。

6.5 设置 PCR 程序如下，将 PCR 管置于 PCR 仪上，运行程序：

温度	时间	PCR 循环数	样本投入量	PCR 循环数 (文库产出 1 μg)
热盖温度 105℃				
98℃	1 min	1	500 ng	7
98℃	10 s	N cycles	250 ng	7
60℃	30 s		100 ng	9
72℃	30 s		50 ng	10
72℃	5 min		25 ng	11
4℃	hold	1	10 ng	12



PCR 循环数根据投入 RNA 的量进行调整。

6.6 当 PCR 仪温度降至 4℃ 时，将 PCR 管取出，短暂离心，立即进行 STEP 7。

STEP 7 PCR 扩增后纯化

实验备注区

需要使用到的试剂：

- Nuclease-Free Water
- 80% 乙醇（新配制）
- 纯化磁珠（IGT™ Pure Beads）

需要使用到的仪器：

- 磁力架

! 纯化使用磁珠为 IGT™ Pure Beads 或 Agencourt AMPure XP，若选用其它品牌纯化磁珠，需咨询对应供应商，并通过预实验摸索合适的磁珠比例，避免纯化失败。

- 7.1 提前用无水乙醇和 Nuclease-Free Water 配制 80% 乙醇，并置于室温备用。请尽量使用新鲜配制的 80% 乙醇用于磁珠纯化。
- 7.2 提前从 4°C 冰箱中取出纯化磁珠，混匀并置于室温平衡 30 min，将已经平衡至室温的纯化磁珠，涡旋混匀后备用。
- 7.3 在 STEP 6 完成后的 50 μL 反应液中加入 0.9 倍体积的纯化磁珠（45 μL），吸打混匀或涡旋混匀，室温静置 5 min。
- 7.4 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清。
- 7.5 保持 PCR 管在磁力架上，小心移弃上清，向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液，静置 30 s。
- 7.6 保持 PCR 管在磁力架上，移弃上清，再次向 PCR 管内加入 200 μL 80% 乙醇溶液，静置 30 s，移弃上清。
- 7.7 盖上管盖，瞬时离心，将残留乙醇离心至管底，将 PCR 管置于磁力架上，小心使用 10 μL 移液器移弃底部残留的乙醇，注意不要吸到磁珠。
- 7.8 保持 PCR 管在磁力架上，室温静置 3~5 min，晾干磁珠，使残留的乙醇彻底挥发。
- 7.9 加入 30 μL 的 Nuclease-Free Water，将 PCR 管从磁力架取下，吸打混匀或涡旋混匀，室温静置 2 min。
- 7.10 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上 2 min，待溶液澄清。
- 7.11 用移液器吸取 28 μL 上清液，转移到新的 PCR 管中，做好标记。
- 7.12 取 1 μL 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂在 Qubit 4.0 Fluorometer 上进行文库浓度测定，记录文库浓度。
- 7.13 取 1 μL 样品使用片段分析仪进行片段长度测定。

实验结束，可以安排上机测序！

实验备忘录

如有任何疑问，请联系：

🌐 www.igenetech.com/support ☎ 010-89146623 ✉ support@igenetech.com

实验备忘录



网址: www.igenetech.com
邮箱: support@igenetech.com
电话: 010-89146623
总部地址: 北京市昌平区中关村生命科学园生命园路8号院一区9号楼A座3层
嘉兴子公司地址: 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇宏业路371号2号楼

仅供研究使用, 不可用于临床诊断。

版权声明: 本手册版权属于艾吉泰康生物科技(北京)有限公司及其子公司所有, 未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译成其他语言。本手册中所有商标或标识均属于艾吉泰康生物科技(北京)有限公司、其子公司及其所有者所有。

版本号: C.0, 2022年6月
文档号: PROT220614

官方微信

