

Universal RNA Library Prep Kit

使用说明书

【产品名称】

Universal RNA Library Prep Kit

【货号/规格】

KR001-A (24 rxns) ; KR001-B (96 rxns)

【产品简述】

Universal RNA Library Prep Kit是一款为Illumina及MGI高通量测序平台设计的转录组文库制备试剂盒，可以根据需要选择普通转录组或链特异转录组建库。本品兼容不同起始量的RNA，即使是较低的起始投入量也具有很高的文库转化率。减少了繁琐的加样步骤，操作更加简便。本品经过严格的质量检测，从而确保文库制备的质量和效率。

【储存条件】

-20℃。

【组成成分】

组分	KR001-A (24 rxns)	KR001-B (96 rxns)
Frag/Prime Buffer 2	480 μ l	960 μ l $\times$ 2
1st cDNA Master Mix 2	216 μ l	864 μ l
2nd cDNA Master Mix 2 (with dNTP)	960 μ l	960 μ l $\times$ 4
2nd cDNA Master Mix 2 (with dUTP)	960 μ l	960 μ l $\times$ 4
Ligase Master Mix 2	720 μ l	720 μ l $\times$ 4
Primer Mix 6 for Illumina	120 μ l	480 μ l
Primer Mix 6 for MGI	120 μ l	480 μ l
2X HIFI PCR Mix 3	600 μ l	600 μ l $\times$ 4

备注：请根据实际测序平台选择相应Primer Mix。

【注意事项】

- 在实验开始前必须对RNA样品进行质控，总RNA模板的起始投入量应 ≥ 10 ng，OD260/OD280比值应介于1.8 - 2.1之间。
- 混匀含RNA样品的溶液时应轻柔吹打，切勿涡旋振荡，否则会使RNA断裂，影响文库片段大小。
- 在二链合成前使用的耗材必须为RNase-free，二链合成及之后为DNase-free。

【标准建库流程】

A 目标RNA分离与片段化

方案1. mRNA富集法

mRNA富集方案适用于起始模板量为10 ng - 4 μ g完整度良好的动、植物及真菌等真核生物总RNA的转录组文库构建。

用mRNA Capture Beads纯化10 ng - 4 μ g总RNA，最后用18 μ l Frag/Prime Buffer 2重悬磁珠，洗脱mRNA。将样品置于PCR仪中，参照附录一设定程序进行片段化。

方案2. rRNA去除法

rRNA去除法方案适用于起始模板量为10 ng - 1 μ g 人、小鼠、大鼠等物种Total RNA全转录组文库构建。

去除rRNA后用RNA Clean Beads纯化RNA，用18 μ l Frag/Prime Buffer 2重悬磁珠，洗脱mRNA。将样品置于PCR仪中，参照附录一设定程序进行片段化。

方案3. 以纯化的mRNA或Total RNA起始的文库构建

适用于起始模板量为0.5 - 100 ng的纯化mRNA、经rRNA去除或Total RNA的转录组文库构建。

选择合适的片段化试剂参照附录一设定程序进行片段化。

从片段化到第一链cDNA合成过程中不可停留，mRNA在该体系下容易降解。

B 双链cDNA合成

- 将双链cDNA合成所需组分从-30 ~ -15℃取出，冰上解冻，上下颠倒混匀，短暂离心收集至管底，按下表配制第一链cDNA合成反应体系：

试剂	体积
上一步Fragmented mRNA	16 μ l
1st cDNA Master Mix 2	9 μ l
Total	25 μ l

- 将移液器调至20 μ l量程，并轻轻吸打10次充分混匀。

试剂在未加入体系前请避光。

- 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应：

温度	时间
热盖105℃	ON
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	∞

结束后立刻进行第二链cDNA合成反应。

可提前将步骤4需要的组分从-30 ~ -15℃取出，冰上放置备用。

- 按下表配制第二链cDNA合成反应体系：

试剂	体积
前一步反应产物	25 μ l
2nd cDNA Master Mix 2 (with dNTP/dUTP)	40 μ l

Total	65 μ l
-------	------------

做普通转录组时,使用2nd cDNA Master Mix 2 (with dNTP); 做链特异转录组时,使用2nd cDNA Master Mix 2 (with dUTP)。

5. 将移液器调至50 μ l量程,并轻轻吸打10次充分混匀。

6. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应:

温度	时间
热盖 105°C	ON
16°C	30 min
65°C	15 min
4°C	∞

二链合成产物可在-30 ~ -15°C暂存24 h。

C 接头连接

1. 按下表配制连接体系:

试剂	体积
前一步反应产物	65 μ l
Ligase Master Mix 2	30 μ l
Adapter X	5 μ l
Total	100 μ l

建议先将Adapter加入到ds cDNA中,充分混匀,再加入Ligase Master Mix 2。

所加入的接头体积固定为5 μ l,请根据初始的RNA投入量将接头稀释至相应浓度:

Total RNA起始投入量		接头浓度
方案1/方案2	方案3	
$\geq 1 \mu$ g	100 ng	5 μ M
500 ng	10 ng	3 μ M
100 ng	1 ng	2 μ M
10 ng	0.5 ng	1.5 μ M

2. 将移液器调至80 μ l量程,并轻轻吸打10次充分混匀。

3. 在PCR仪中进行连接反应:

温度	时间
热盖 105°C	ON
20°C	5min
4°C	∞

连接产物可在2 ~ 8°C暂存1 h。

D 产物纯化与分选

请根据需要选择方案:

纯化方案为一轮纯化,无分选操作,该方案可有效得到>200 bp的宽范围文库,并去除接头残留;分选方案为纯化加两轮分选,根据不同的接头使用情况参考附录一的方案,获得 ≥ 200 bp插入片段的文库。

纯化方案: 使用GDSPure DNA Selection Magbeads获得插入片段长度>200 bp的宽范围文库

1. 取100 μ l连接产物加入合适的PCR管中。
2. 涡旋磁珠使磁珠混匀,加入60 μ l (0.6X)磁珠悬液,用移液器轻轻吹打10次混匀,室温静置10 min。
3. 将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清,用移液器吸去上清,弃上清。
4. 保持PCR管在磁力架上,加入 200 μ l 80%新鲜配制的乙醇溶液,请勿吹打磁珠。室温静置30s,用移液器吸去上清,弃上清。
5. 重复步骤 4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。
6. 保持PCR管在磁力架上,自然风干至磁珠表面无明显光泽。

注意:该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率,磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

7. 将PCR管从磁力架上取下,进行洗脱:向管中加入22 μ l Nuclease-free ddH₂O,用移液器轻轻反复吹打,使磁珠和溶液充分混合均匀,室温静置 3-5 min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清,将20 μ l上清液转移到新的Nuclease-free PCR管中。

分选方案: 本方案包含纯化加两轮分选,可选择不同分选条件以获得预期插入片段长度用0.6X GDSPure DNA Selection Magbeads纯化连接产物:

1. 取100 μ l连接产物加入合适的PCR管中。
2. 涡旋磁珠使磁珠混匀,加入60 μ l (0.6X)磁珠悬液,用移液器轻轻吹打10次混匀,室温静置10 min。
3. 将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清,用移液器吸去上清,弃上清。
4. 保持PCR管在磁力架上,加入 200 μ l 80%新鲜配制的乙醇溶液,请勿吹打磁珠。室温静置30s,用移液器吸去上清,弃上清。
5. 重复步骤 4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。
6. 保持PCR管在磁力架上,自然风干至磁珠表面无明显光泽。

注意:该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率,磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

7. 将PCR管从磁力架上取下,进行洗脱:向管中加入102 μ l Nuclease-free ddH₂O,用移液器轻轻反复吹打,使磁珠和溶液充分混合均匀,室温静置 3-5 min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清,将100 μ l上清液转移到新的Nuclease-free PCR管中。

用两轮GDSPure DNA Selection Magbeads进行片段大小分选(以85 °C 6 min打断, Illumina 平台插入片段大小280 - 380 bp为例,其他长度文库请根据附录一选择相应的磁珠使用量):

8. 颠倒或旋涡振荡使GDSPure DNA Selection Magbeads充分混匀,吸取60 μ l (0.6X)磁珠加入到纯化产物中,使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
9. 室温孵育10 min,使DNA结合到磁珠上。
10. 将样品置于磁力架上,待溶液澄清后(约5 min),保持样品始终处于磁力架上,吸取150 μ l上清(此步骤保留上清,切勿丢弃!)至一个新的Nuclease-free PCR管中。
11. 加入10 μ l (0.1X) GDSPure DNA Selection Magbeads,使用移液器轻轻吸打10次充分混匀。

12. 室温孵育 10 min, 使DNA结合到磁珠上。
13. 将样品置于磁力架上, 待溶液澄清后(约5 min), 小心移除上清。
14. 保持样品处于磁力架上, 加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
15. 重复步骤 14 一次。
16. 保持样品始终处于磁力架上, 在室温下干燥磁珠约 5 - 10 min。

加入 80% 乙醇时不要吹散磁珠。

最后移除上清时需要使用 10 μ l 移液器将残留液体吸干净。

磁珠干燥时避免因过分干燥(龟裂)降低回收效率。

17. 将样品从磁力架上取出, 加入 22 μ l Nuclease-free ddH₂O, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吸打充分混匀, 室温静置 2 min 置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心吸取 20 μ l 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。

转移上清时切勿吸取磁珠, 即使微量残留都将影响后续文库产量。

纯化产物可在 -30 ~ -15℃ 暂存 24 h。

E 文库扩增

1. 将试剂解冻后颠倒混匀, 于灭菌 200 μ l PCR 管中配制如下反应:

试剂	体积
纯化后的连接产物	20 μ l
2X HIFI PCR Mix 3	25 μ l
Primer Mix 6 for Illumina/MGI	5 μ l
Total	50 μ l

根据平台选择相应的 Primer Mix; 若使用短接头时则需搭配其提供的引物。

2. 用移液枪小心吹打混匀, 短暂离心将所有液体移至管底。
3. 在热循环仪中进行如下反应:

温度	时间	循环数
热盖 105℃	ON	-
98℃	45 sec	1
98℃	15 sec	9~18
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	1 min	1
4℃	∞	-

等量的总 RNA 由于来源物种不同或者不同个体, 其 mRNA 的占比也可能不同。参考下表根据样品实际情况, 可适当调整 PCR 循环数:

RNA 起始投入量		接头浓度	
方案 1/方案 2	方案 3	普通转录组	链特异转录组

$\geq 1 \mu$ g	-	9	9
1 μ g	100 ng	10	11
500 ng	10 ng	12	13
100 ng	1 ng	14	15
10 ng	0.5 ng	17	18

4. 使用 GDSPure DNA Selection Magbeads 对反应产物进行纯化:

- 4.1. 取 50 μ l 扩增产物加入合适的 PCR 管中。
- 4.2. 涡旋磁珠使磁珠混匀, 加入 45 μ l (0.9X) 磁珠悬液, 用移液器轻轻吹打 10 次混匀, 室温静置 5 min。
- 4.3. 将 PCR 管置于磁力架上至溶液变得澄清, 用移液器吸去上清, 弃上清。
- 4.4. 保持 PCR 管在磁力架上, 加入 200 μ l 80% 新鲜配制的乙醇溶液, 请勿吹打磁珠。室温静置 30 sec, 用移液器吸去上清, 弃上清。
- 4.5. 重复步骤 4.4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。
- 4.6. 保持 PCR 管在磁力架上, 自然风干至磁珠表面无明显光泽。

注意: 该步骤应避免磁珠干燥过度而影响洗脱效率, 磁珠表面有裂痕即代表干燥过度。

- 4.7. 将 PCR 管从磁力架上取下, 进行洗脱: 向管中加入 25 μ l Nuclease-free ddH₂O, 用移液器轻轻反复吹打, 使磁珠和溶液充分混合均匀, 室温静置 3-5 min。将 PCR 管置于磁力架上至溶液变得澄清, 将 23 μ l 上清液转移到新的 PCR 管中。

F 文库质控/Library Quality Control

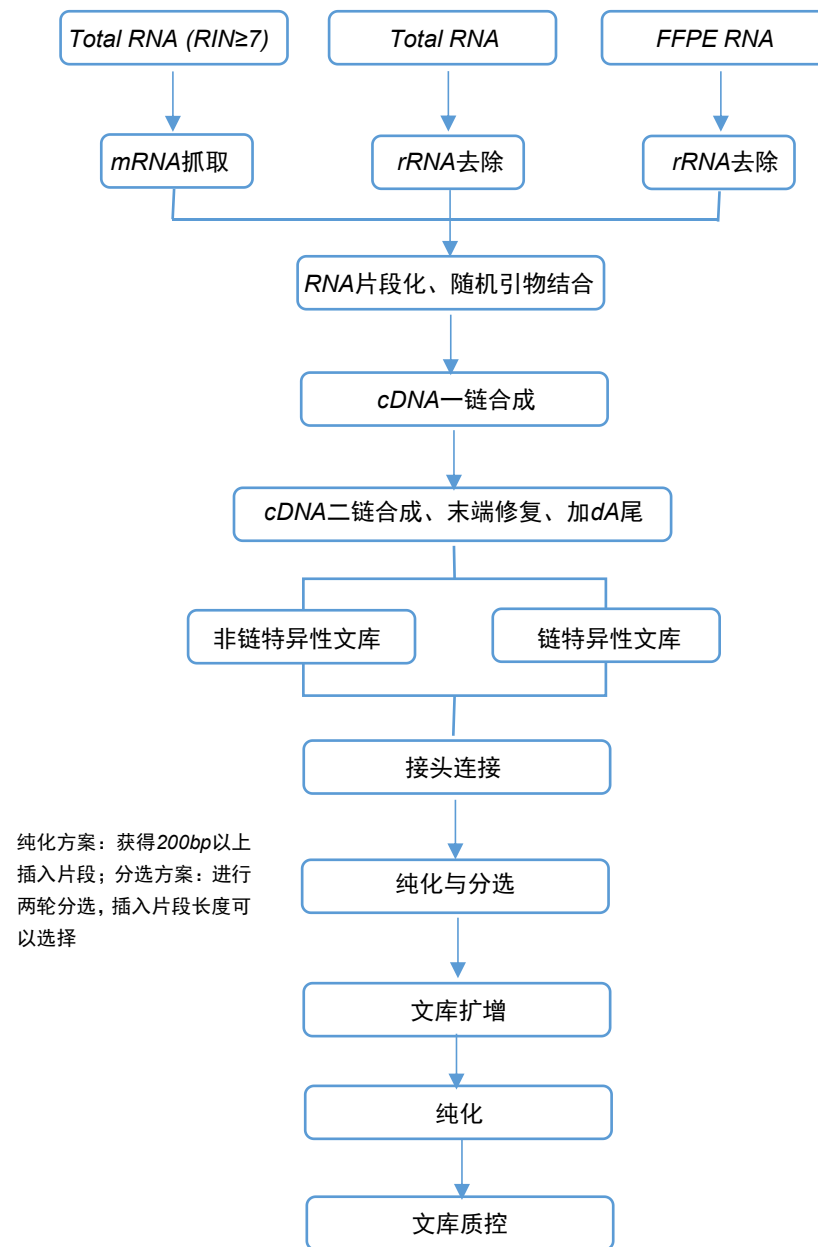
取 1 μ l 纯化后的 PCR 产物, 用 Agilent DNA 1000 kit (Agilent, #5067-1504) 分析。良好的文库应在预计大小的位置有一个较窄的峰。如果在 90 - 140 bp 出现峰, 则提示文库中有 adapter dimer 污染。此时, 将文库用 Nuclease-free ddH₂O 稀释至 50 μ l, 重复文库扩增/步骤 4 以再次纯化 PCR 产物。

附录一: Illumina & MGI 平台长短接头连接产物纯化分选方案

表 1 连接产物分选条件

平台		Illumina 平台			MGI 平台	
文库大小/bp		300-400	400-500	500-600	300-400	400-500
打断条件		94℃ 5min	85℃ 6min	85℃ 6min	94℃ 5min	85℃ 6min
插入片段大小/bp		180-280	280-380	380-480	220-320	280-380
长接头	第一轮磁珠量	0.65X	0.6X	0.5X	0.5X	0.45X
	第二轮磁珠量	0.1X	0.1X	0.1X	0.15X	0.15X
插入片段大小/bp		180-280	280-380	380-480	160-260	260-360
短接头	第一轮磁珠量	0.65X	0.6X	0.5X	0.5X	0.5X
	第二轮磁珠量	0.1X	0.1X	0.1X	0.2X	0.15X

图1 KR001建库流程图



纯化方案：获得200bp以上
插入片段；分选方案：进行
两轮分选，插入片段长度可
以选择