

ShortSeq RNA Library Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

ShortSeq RNA Library Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

KR002-A (24 rxns) ; KR002-B (96 rxns)

【产品简述】

ShortSeq RNA Library Prep Kit for Illumina是一款为Illumina高通量测序平台设计的转座酶法RNA文库制备试剂盒。转座酶法通过酶促反应可以一步完成RNA片段化、二链合成、末端修复、dA-Tailing和接头连接等步骤，不仅减少了繁琐的步骤，同时可以降低起始模板的投入量，显著提升文库转化效率。本品兼容200ng至2μg起始量的RNA，可根据需要选择去除rRNA建库流程或mRNA建库流程。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	KR002-A (24 rxns)	KR002-B (96 rxns)
5X gDNA Wiper Mix	48 μl	192 μl
10X RT Mix	48 μl	192 μl
HiScript III Enzyme Mix	48 μl	192 μl
Oligo (dT) ₂₀ VN	24 μl	96 μl
Random hexamers	24 μl	96 μl
Tn5 VR100	120 μl	480 μl
Tagment Buffer	240 μl	960 μl
TStop Solution	48 μl	192 μl
2X HIFI PCR Mix	600 μl × 2	600 μl × 8
TSE	24 μl	96 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	1 ml	1 ml × 4

【注意事项】

1. 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≥200 ng，OD260/OD280比值应介于1.8 - 2.1之间。

2. 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。
3. 实验过程中注意防止RNase污染、样品交叉污染、PCR产物污染等。

【去除rRNA建库流程】

1. rRNA去除

对200-2000ng Total RNA（建议投入量1000ng）定量后进行rRNA去除。

2. RNA变性

2.1 在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
去除rRNA后的RNA	X μl
Nuclease-free ddH ₂ O	To 10 μl

2.2 65℃加热5 min，迅速置于冰上静置2 min。

3. RNA逆转录

3.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀备用。在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	10 μl
10X RT Mix	2 μl
HiScript III Enzyme Mix	2 μl
Oligo (dT) ₂₀ VN/Random hexamers	1 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	5 μl

3.2 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

3.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105℃	ON
25℃	5 min
37℃	30 min
85℃	5 sec
4℃	∞

4. 片段化

4.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀备用。在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	20 μl
Tagment Buffer	10 μl
Tn5 VR100	5 μl

4.2 涡旋振荡或用移液器轻轻吹打20次混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
55°C	15 min
10°C	∞

4.4 室温解冻TStop Solution，上下颠倒混匀后备用。反应完成后，在反应液中加入2 μl TStop Solution，涡旋振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

涡旋振荡或使用移液器吹打20次充分混匀。确认TStop Solution是否处于室温，并轻弹管壁确认有无沉淀。

如有沉淀，37°C加热即可溶解沉淀。该试剂容易起泡，勿剧烈涡旋振荡。

4.5 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
37°C	10 min
10°C	∞

5. PCR富集

5.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀备用。在PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	37 μl
2X HIFI PCR Mix	50 μl
TSE	1 μl
N5XX	5 μl
N7XX	5 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	2 μl

N5XX和N7XX是文库扩增专用的Index primer，可根据样品数量和Index搭配策略自行选择。

5.2 涡旋振荡或用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

5.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间	循环数
热盖105°C	ON	-
72°C	3 min	
95°C	3 min	1
98°C	20 sec	11-20
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	

72°C	5 min	1
4°C	∞	-

72°C孵育步骤用于进行链置换反应，请勿删除该步骤。

扩增循环数需根据起始RNA投入量进行选择，可参考下表：

Total RNA起始投入量	参考循环数
200-2000 ng	11-14
20-200 ng	14-17
5-20 ng	17-20

当RNA样品质量较差时，可适当提高循环数以获取足量文库。

6. 文库纯化及质控

6.1 使用80 μl (0.8 ×) GDSPure DNA Selection Magbeads进行纯化，具体方法请参见附录一：文库纯化方案。

6.2 将纯化好的文库进行文库浓度测定与长度分布检测，具体方法请参考附录二：文库质量检测。

【mRNA建库流程】

1. RNA质控

1. 对Total RNA使用Qubit测定浓度，Total RNA建议投入量范围：200-2000ng，建议投入1000ng。

1.2 用Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer进行质控，RIN值应≥7。

2. RNA变性

2.1 在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
Total RNA	X μl
Nuclease-free ddH ₂ O	To 8 μl

2.2 65°C加热5 min，迅速置于冰上静置2 min。

3. 基因组DNA去除（可选）

3.1 将5 × gDNA wiper Mix上下颠倒混匀备用，在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	8 μl
5X gDNA Wiper Mix	2 μl

3.2 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

3.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
42°C	2 min

85°C	30 sec
4°C	∞

4. RNA逆转录

4.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀备用。在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	10 μ l
10X RT Mix	2 μ l
HiScript III Enzyme Mix	2 μ l
Oligo (dT) ₂₀ VN	1 μ l
Nuclease-free ddH ₂ O	5 μ l

4.2 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

4.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
25°C	5 min
37°C	30 min
85°C	5 sec
4°C	∞

5. 片段化

5.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀备用。在Nuclease-free PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	20 μ l
Tagment Buffer	10 μ l
Tn5 VR100	5 μ l

5.2 涡旋振荡或用移液器轻轻吹打20次混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

5.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
55°C	15 min
10°C	∞

5.4 室温解冻TStop Solution，上下颠倒混匀后备用。反应完成后，在反应液中加入2 μ l TStop Solution，涡旋振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

涡旋振荡或使用移液器吹打20次充分混匀。确认TStop Solution是否处于室温，并轻弹管壁确认有无沉淀。如有沉淀，37°C加热即可溶解沉淀。该试剂容易起泡，勿剧烈涡旋振荡。

5.5 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
37°C	5 min
10°C	∞

6. PCR富集

6.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀备用。在PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	37 μ l
2X HIFI PCR Mix	50 μ l
TSE	1 μ l
N5XX	5 μ l
N7XX	5 μ l
Nuclease-free ddH ₂ O	2 μ l

N5XX和N7XX是文库扩增专用的Index primer，可根据样品数量和Index搭配策略自行选择。

6.2 涡旋振荡或用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

6.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间	循环数
热盖105°C	ON	-
72°C	3 min	
95°C	3 min	1
98°C	20 sec	11-20
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	∞	-

72°C孵育步骤用于进行链置换反应，请勿删除该步骤。

扩增循环数需根据起始RNA投入量进行选择，可参考下表：

Total RNA起始投入量	参考循环数
200-2000 ng	11-14
20-200 ng	14-17
5-20 ng	17-20

当RNA样品质量较差时，可适当提高循环数以获取足量文库。

7. 文库纯化及质控

7.1 使用 $80\ \mu\text{l}$ ($0.8\times$) *GDSPure DNA Selection Magbeads* 进行纯化, 具体方法请参见附录一: 文库纯化方案。

7.2 将纯化好的文库进行文库浓度测定与长度分布检测, 具体方法请参考附录二: 文库质量检测。

附录一: 文库纯化方案

使用 *GDSPure DNA Selection Magbeads* 进行纯化

- 取 $100\ \mu\text{l}$ 产物加入合适的 PCR 管中。
- 涡旋磁珠使磁珠混匀, 加入 $80\ \mu\text{l}$ ($0.8\times$) 磁珠悬液, 用移液器轻轻吹打 10 次混匀, 室温静置 $5\ \text{min}$ 。
- 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。
- 保持 PCR 管在磁力架上, 加入 $200\ \mu\text{l}$ 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。
- 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。
- 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 $22\ \mu\text{l}$ *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 3-5min。将 PCR 管置于磁力架上至溶液变得澄清, 将 $20\ \mu\text{l}$ 上清液转移到新的 *Nuclease-free PCR* 管中。

附录二: 文库质量检测

- 文库浓度测定

推荐使用荧光定量 PCR 的方式对文库浓度进行绝对定量, 也可以使用基于特异性识别双链 DNA 的荧光染料法进行测定。

- 文库长度分布检测

通过 *Agilent 2100 Bioanalyzer* 等基于电泳分离原理的类似设备进行文库长度分布检测。

图 1 KR002 建库流程图

