

Small RNA Library Prep Kit for Illumina

使用说明书

【产品名称】

Small RNA Library Prep Kit for Illumina

【货号/规格】

KR003-A (24 rxns) ; KR003-B (96 rxns)

【产品简述】

Small RNA Library Prep Kit for Illumina是一款为Illumina高通量测序平台设计的小RNA文库制备试剂盒。建库基本流程为small RNA的3'和5'端分别连上通用接头，再经过逆转录、PCR扩增以及PAGE胶或磁珠纯化等步骤，最终得到适用于Illumina平台的测序文库。本品适用的投入RNA为起始量为10 ng - 1 µg的动、植物总RNA，以及≥1 ng分离纯化的血清、血浆、外泌体RNA。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】

RL5 Adaptor, -85 ~ -65°C 保存, 干冰运输; Filtration Column, 室温保存; 其余组分, -20°C 保存。

【组成成分】

组分	KR003-A (24 rxns)	KR003-B (96 rxns)
RL3 Adaptor	24 µl	96 µl
RL3 Buffer V2	240 µl	960 µl
RL3 Enzyme mix V2	72 µl	288 µl
RT Primer	24 µl	96 µl
RL5 Adaptor	24 µl	96 µl
RL5 Buffer	24 µl	96 µl
RL5 Enzyme mix	60 µl	240 µl
RT Buffer	192 µl	768 µl
RT Enzyme mix V2	48 µl	192 µl
2X HIFI PCR Mix 3	1.2 ml	1.2 ml × 4
pBR322/Mspl digest DNA Marker	60 µl	240 µl
6X Loading Buffer	500 µl	1 ml × 2
Co-precipitator	120 µl	480 µl

RNase-free ddH ₂ O	1 ml	1 ml × 4
GE Buffer	6 ml	24 ml
Filtration Column	24 pcs	48 pcs × 2

【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≥10 ng，OD260/OD280比值应介于1.8 - 2.2之间。
2. RL3 Buffer V2比较粘稠，解冻混匀后请短暂离心收集至管底，避免液体粘附于管盖和管壁，导致试剂损失。
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。

【基本建库流程】

请参照下表对接头进行稀释。如血清、血浆、外泌体RNA提取产物低于Qubit测定下限，则按照最大体积6 µl投入，推荐按照10 ng总RNA的接头稀释倍数进行稀释。

表1: 不同起始量总RNA投入对应接头稀释倍数参考表

Input RNA	Adaptor:ddH ₂ O (V:V)
1 µg-200 ng	-
200 ng-100 ng	1:1
10 ng	1:19-1:29

不同样本中small RNA占比差异较大，实际接头稀释倍数可根据实验中接头二聚体残留情况进行调整。

RL3 Adaptor、RL5 Adaptor、RT Primer均需参照上表进行稀释。

1. 接头连接

将RL3 Adaptor、RL3 Buffer V2、RL3 Enzyme mix V2取出，解冻并混匀，短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

1.1 模板与接头变性：根据模板RNA起始投入量，参照表1稀释RL3 Adaptor，在RNase-free的PCR管中按照下表配制反应体系。

试剂	体积
RNA	1-6 µl
RL3 Adaptor	1 µl
Nuclease-free ddH ₂ O	X µl
Total	7 µl

1.2 将PCR管置于提前预热至70°C的PCR仪中反应2 min，反应结束后立即取出置于冰上2 min。

1.3 向步骤3的反应管中依次加入如下组分：

试剂	体积
上一步的反应液	7 µl
RL3 Buffer V2	10 µl

<i>RL3 Enzyme mix V2</i>	3 μ l
<i>Total</i>	20 μ l

1.4 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

1.5 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	1h
4°C	∞

2. 多余3'接头封闭

将RT Primer取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

2.1 根据模板RNA起始投入量，参照表1稀释RT Primer，再按照下表配制反应体系。

试剂	体积
上一步的反应液	20 μ l
RT Primer	1 μ l
Nuclease-free ddH ₂ O	4.5 μ l
<i>Total</i>	25.5 μ l

2.2 用移液器轻轻吹打10次混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

2.3 将PCR管置于PCR仪中，反应程序如下：

温度	时间
热盖105°C	ON
75°C	5 min
37°C	15 min
25°C	15 min
4°C	∞

3. 5'接头连接

将RL5 Adaptor、RL5 Buffer和RL5 Enzyme mix取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

3.1 5'接头变性：根据模板RNA起始投入量，参照表1稀释RL5 Adaptor，将稀释好的RL5 Adaptor置于PCR仪中70°C 2 min，反应结束后立即取出置于冰上。

3.2 按照下表配制5'接头连接反应体系：

试剂	体积
上一步的反应液	25.5 μ l
变性RL5 Adaptor	1 μ l

<i>RL5 Buffer</i>	1 μ l
<i>RL5 Enzyme mix</i>	2.5 μ l
<i>Total</i>	30 μ l

3.3 用移液器轻轻吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

3.4 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	1h
4°C	∞

4. cDNA合成

将RT Buffer和RT Enzyme mix V2取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

4.1 按照下表配制逆转录反应体系：

试剂	体积
上一步的反应液	30 μ l
RT Buffer	8 μ l
RT Enzyme mix V2	2 μ l
<i>Total</i>	40 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
50°C	1 h
85°C	5 min
4°C	∞

产物可于-20°C存放24小时。

5. PCR富集

将Universal Primer、Index Primer和2X HIFI PCR Mix 3取出，解冻混匀后置于冰上备用。

5.1 在PCR管中配制如下混合液：

试剂	体积
上一步的反应液	40 μ l
2X HIFI PCR Mix 3	50 μ l
Universal Primer	2.5 μ l
Index Primer	2.5 μ l

Nuclease-free ddH ₂ O	5 μ l
Total	100 μ l

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	-
94°C	3 min	1
94°C	15 sec	11-20
65°C	15 sec	
72°C	15 sec	
72°C	1 min	1
4°C	∞	-

扩增循环数需根据起始RNA投入量进行选择，可参考下表：

RNA起始投入量	参考循环数
1 μ g	11-12
500 ng	12-13
200 ng	13-14
100 ng	14-15
10 ng	20-22

当RNA样品量较低时，可适当提高循环数以获取足量文库。

产物可于-20°C存放24小时。

6. PCR产物纯化

使用GDSPure DNA Selection Magbeads进行纯化

6.1 取100 μ l产物加入合适的PCR管中。

6.2 磁珠平衡至室温后通过涡旋使磁珠混匀，取180 μ l (1.8X)磁珠悬液加入至PCR管中，用移液器轻轻吹打10次混匀，室温静置10 min。

6.3 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。

6.4 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。

6.5 重复步骤 6.4 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

6.6 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。

6.7 将PCR管从磁力架上取下，进行洗脱：向管中加入30 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 3-5min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，将28 μ l上清液转移到新的Nuclease-free PCR管中。

产物可于-20°C存放一周。

6.8 Agilent 2100 Bioanalyzer检测文库：取1 μ l纯化后的PCR产物用Agilent DNA 1000 chip分析，由于2100迁移率的影响，最终文库的主峰分布可能存在约6 - 8 bp偏差。

7. 文库分选

根据文库质控的结果选择文库分选纯化方式，如2100图显示120 bp处有较多接头二聚体、70 - 80 bp处有较多扩增引物残留以及160 bp和190 bp处有明显的rRNA，则建议选择PAGE胶分离；如接头二聚体、扩增引物残留以及rRNA较少则可以选择磁珠进行文库分选。为确保最终有效文库的比例，建议使用PAGE胶进行文库分选。

7.1 方案A：6%非变性PAGE胶分选文库

7.1.1 将6% 10孔非变性PAGE胶装置于电泳槽中，向其中加入适量1X TBE电泳缓冲液。

7.1.2 向纯化的PCR产物中加入5 μ l 6X Loading Buffer混匀后离心收集至管底。

7.1.3 取5 μ l DNA Marker缓慢加入PAGE胶样孔中。

7.1.4 将混有Loading Buffer的PCR产物缓慢加入PAGE胶样孔中，每个样品上两个样孔，每孔15 μ l。

7.1.5 上样完成后，120 - 150 V电压电泳约1 h，不同的电泳装置电泳迁移速率可能不一致，所需电泳时间有差异，待样孔中的Loading Buffer蓝色指示剂全部跑出胶板后约3 - 5 min方可停止电泳。

7.1.6 将PAGE胶从电泳装置中取出，将PAGE胶从胶板上剥下。用DSRed核酸染料染色10 min，在凝胶成像仪中进行观察对应的miRNA文库和piRNA文库的条带。

7.1.7 用刀片将对应的条带割下放于事先准备好的500 μ l低吸附EP管中(管底已用酒精灯烧过的1 ml注射器针头戳了数个小洞)，将500 μ l EP管套到1.5 ml低吸附EP管中，12,000 rpm (13,800 \times g)离心 2 min碾碎胶条。

胶条的碾碎程度取决于500 μ l EP管底部小洞的孔径，所以只需使用注射器针头戳穿即可。

7.1.8 离心完成后弃掉500 μ l EP管，向装有PAGE胶碎片的1.5 ml EP管中加入250 μ l GE Buffer，于50°C水浴锅中温育1 - 2 h。

7.1.9 将步骤8的EP管于离心机中12,000 rpm (13,800 \times g)离心2 min，将蒸发到管壁的液体收集至管底。

7.1.10 将步骤9的上清转移至离心过滤柱Filtration Column中12,000 rpm (13,800 \times g)离心2 min收集液体，弃去离心柱，将液体转移至新的1.5 ml低吸附EP管中。

7.1.11 向步骤10的上清中分别依次加入5 μ l Co-precipitator, 30 μ l 3M醋酸钠(pH 5.2)和1 ml无水乙醇，振荡混匀后于-80°C沉淀1 h。

7.1.12 取出-80°C沉淀产物，于预冷至4°C的冷冻离心机中12,000 rpm (13,800 \times g)，离心30 min。

7.1.13 小心移除上清，注意切勿吸取到白色沉淀。向EP管中加入1 ml新鲜配制的80%乙醇，于预冷至4°C的冷冻离心机中，12,000 rpm (13,800 \times g)离心10 min。

7.1.14 小心移除上清，注意切勿吸取到白色沉淀。短暂离心将管壁上残留的液体收集至管底，小心移除残留液体，室温开盖干燥约10 min。

7.1.15 待步骤14产物中残留的酒精全部挥发，加入15 μ l Nuclease-free ddH₂O溶解沉淀。

7.1.16 2100检测分选纯化的文库：取1 μ l分选纯化的产物用Agilent high sensitive chip分析。

7.2 方案B：双轮磁珠分选文库

使用GDSPure DNA Selection Magbeads进行纯化

7.2.1 取25 μ l产物加入合适的PCR管中。

7.2.2 磁珠平衡至室温后通过涡旋使磁珠混匀，取32.5 μ l (1.8X)磁珠悬液加入至PCR管中，用移液器轻轻吹打10次混匀，室温静置5 min。

7.2.3 将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，用移液器吸取上清至新的PCR管中。

7.2.4 向上清液中加入22.5 μ l磁珠(0.9 x)，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。

7.2.5 室温孵育5 min，使DNA结合到磁珠上。

7.2.6 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。

7.2.7 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。

7.2.8 重复步骤 7.2.7 一次。最后一次洗涤完成时应尽量吸取干净洗涤液。

7.2.9 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。

7.2.10 将PCR管从磁力架上取下，进行洗脱：向管中加入17.5 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 3-5min。将PCR管置于磁力架上至溶液变得澄清，将15 μ l上清液转移到新的Nuclease-free PCR管中。

7.2.11 Agilent 2100 Bioanalyzer检测文库：取1 μ l分选后的产物用Agilent DNA 1000 chip 或Agilent high sensitive chip分析。

图1 KR003建库流程图

