

Stranded mRNA-seq Lib Prep Module for Illumina

RK20349



使用说明书

Version: N17H17v2.1

目录

1. 产品概述	1
2. 产品组分	1
3. 保存及运输条件	1
4. 其他自备材料	1
5. 实验流程	3
6. 操作注意事项	4
7. 文库构建步骤	6
8. 附录	15
9. 附表	17

1. 产品概述

- ◇ 适合于 Illumina 测序平台；
- ◇ 适合样本：动植物，真菌等真核生物 RNA 样本；
- ◇ Total RNA 起始量在 10 ng-1 µg；
- ◇ Stranded mRNA-seq Lib Prep Module for Illumina® 包含有 First Strand Synthesis Module, Second Strand Synthesis Module, DNA Lib Prep Module with UDG。
- ◇ 试剂盒在 Second strand cDNA 合成过程中掺入 dUTP 对其进行标记，在 PCR 富集文库前，使用 UDG 酶对该链进行水解消化，确保最终测序数据都来自 First Strand cDNA，保留 RNA 链方向，满足对链特异性 RNA 建库的需求。
- ◇ 试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，且每一批次的建库 Kit 都经过了建库和上机测序的验证，保证每一批次的试剂盒性能质量稳定。

2. 产品组分

试剂管名称与颜色	24 RXN	96 RXN
 2X Frag/Elute Buffer	144 µL	576 µL
 RT Strand Specificity Reagent	192 µL	768 µL
 First Strand Synthesis Enzyme Mix	48 µL	192 µL
 Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP	192 µL	768 µL
 Second Strand Synthesis Enzyme Mix	96 µL	384 µL
 Nuclease-free Water	1 ml X 2	8 mL
 End-prep Buffer	240 µL	960 µL
 End-prep Enzyme Mix	72 µL	288 µL
 Ligation Buffer	396 µL	1584 µL
 Ligase Mix	72 µL	288 µL
 2X PCR Mix	600 µL	1200 µL X 2
 UDG Enzyme	12 µL	48 µL
 Low EDTA TE	1 mL X 3	10 mL

 代表管盖颜色。

3. 保存及运输条件

试剂盒长途运输：尽量采用干冰运输，或者干冰结合冰袋方式，在 -40 ~ -20°C 温度条件下进行运输。

试剂盒保存：-20~-10°C 冰箱。

4. 其他自备材料

4.1. RNA 富集试剂盒

poly (A) mRNA Capture Module (ABclonal, Cat. RK30340);

rRNA Depletion Module (H/M/R) (ABclonal, Cat. RK20348);

4.2. 连接接头

Illumina 双端 UDI 短接头 (Cat. RK21622~RK21627)

4.3. 纯化磁珠

AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257), 或者其他具有相同性能的核酸纯化磁珠产品。

4.4. RNA 样本浓度和质量评估

Qubit 荧光定量仪

Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855);

Nanodrop ;

Agilent RNA 6000 Pico chip (Agilent #5067-1513)

4.5. 文库质控

Qubit 荧光定量仪;

ABQubit dsDNA Quantitation Kit (ABclonal, Cat. RK30140);

Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626);

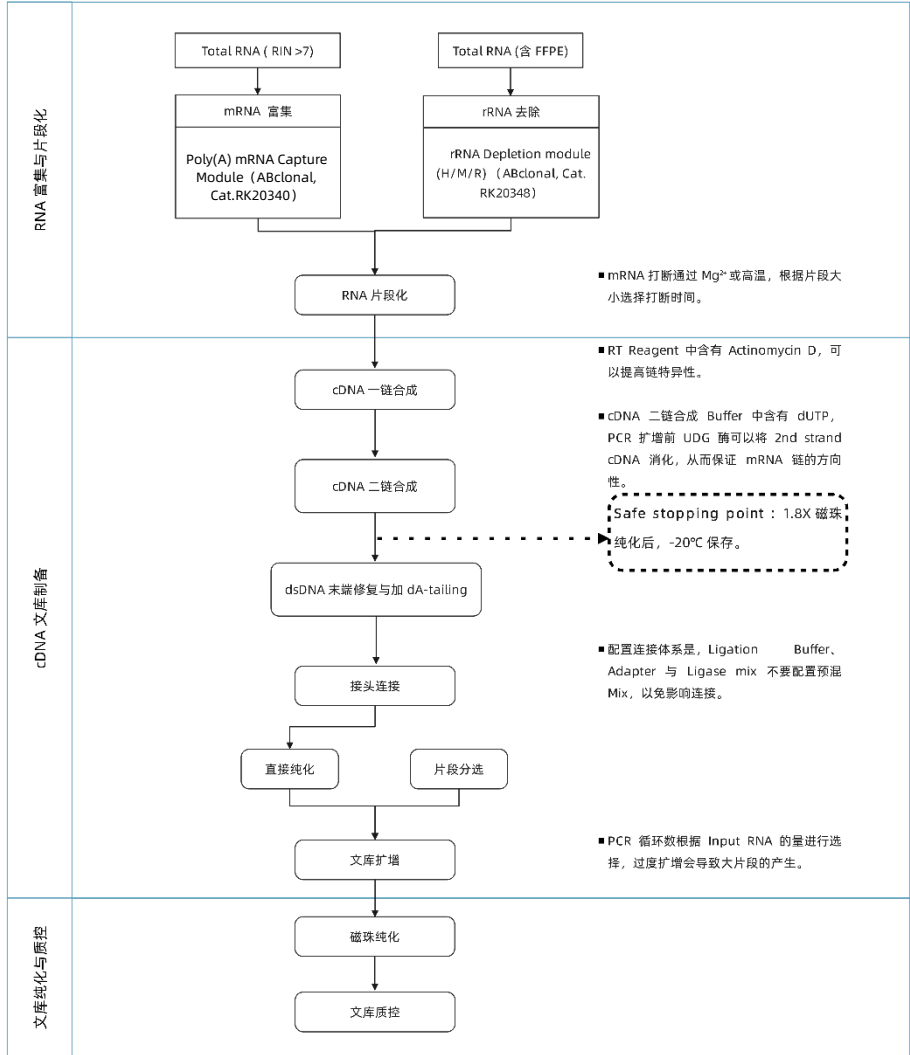
Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504);

4.6. 其他试剂与耗材

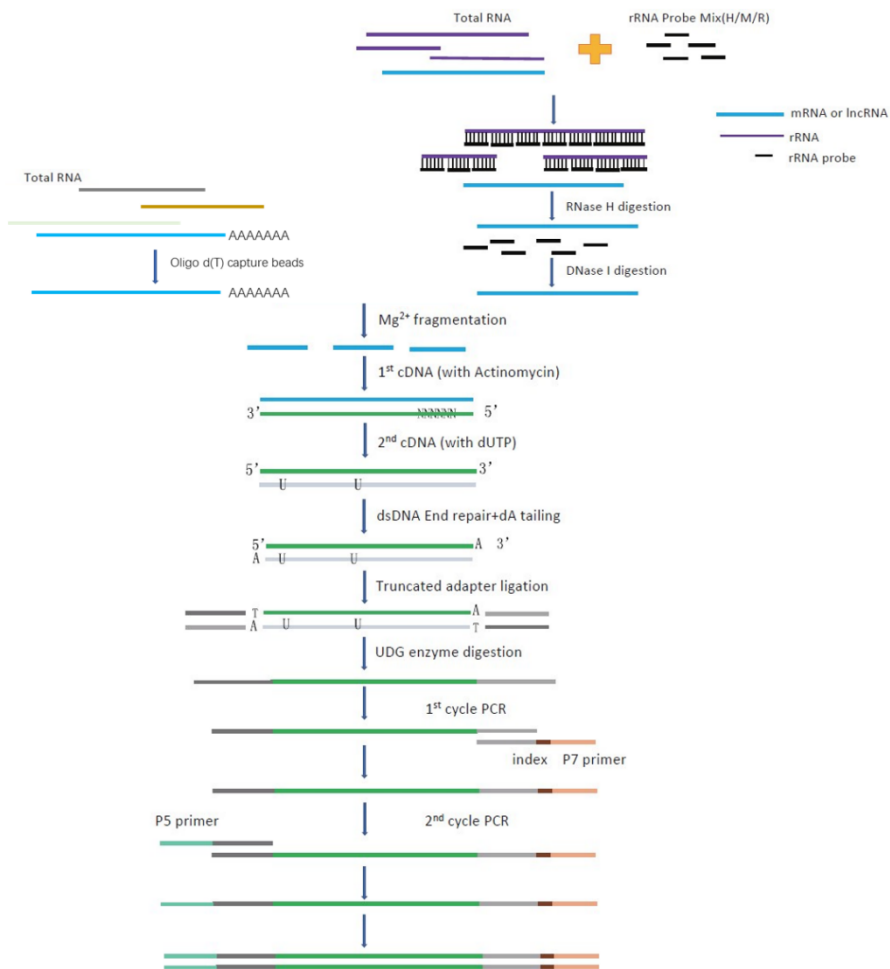
80%乙醇 (新鲜配制)、磁力架、PCR 仪等。

5. 实验流程

实验流程图



实验原理示意图



6. 操作注意事项

6.1. RNA样品质控

6.1.1. 关于Total RNA的定量建议选取Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855) 试剂盒进行定量，过低的投入量会影响正常的文库构建。

6.1.2. Total RNA起始量在10-1000 ng, RNA RIN值 ≥ 7 ,推荐使用poly (A) mRNA 捕获试剂进行捕获；对FFPE一些降解样本推荐使用rRNA Depletion Module系列产品富集mRNA。

6.1.3. 针对降解样本的mRNA完整性较差，可参考表格1 不同RNA样本质量推荐打断条件；另外在接头连接后建议选择直接纯化程序，若要进行大片段文库筛选，可能会影响文库产量。如果需要提高文库产量，可以将PCR循环数提高2-3个循环。

表格1 不同RNA样本质量推荐打断条件

RNA 样本 RIN 值	打断条件
>7	94°C 15 min
2-6	94°C 7 min
<2	65°C 5 min

6.1.4. 针对植物或其他真核生物细胞RNA样本，如果RNA有降解但琼脂糖胶可以分别看到28S和18S条带，建议尝试加大 Total RNA 投入量，且适当增加PCR循环数，也可以得到足量的文库。

6.2. 磁珠使用原则

6.2.1. 磁珠在使用前请提前半小时拿出，放置于室温平衡。

6.2.2. Oligo (dT)25 Capture Beads和AFTMag NGS DNA Clean Beads 避免放入-20°C保存，冷冻会引起磁珠团聚而无法再分散，导致磁珠性能失效，如果磁珠被冷冻，建议另行购买。

6.2.3. AFTMag NGS DNA Clean Beads纯化过程中，必须待酒精完全挥发后再加入Low EDTA TE 洗脱，即磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色，酒精未挥发完全或者磁珠过分干燥（变龟裂）均会影响文库产量。

6.3. 文库质控

6.3.1. 文库峰形平滑无异常毛刺，且在130bp(接头二聚体)处没有出现检测峰，另外在文库峰的右侧没有大面积的大片段峰，则可以初步判断文库构建成功。

6.3.2. Total RNA质量合格(RIN值>7)，正常操作建库，建库不成功可能与解决方案如下：

Total RNA的RIN值是Total RNA的质量评估，并不能完全代表poly (A) RNA的丰度及完整性。对于部分特殊样本，虽然Total RNA的完整性较好，但有很多mRNA发生降解，导致poly (A) RNA纯化时损失较多，因而文库构建失败。如果遇到这种情况可以将poly (A) RNA纯化出来后，评估其丰度及完整性，方法是在实验过程步骤 7.1.10 结束后，加入6 μL的 Tris Buffer，80°C加热2分钟，置于磁力架上，澄清后取上清液即为完整的poly (A) RNA，再取1 μL进行Agilent 2100 RNA 6000 Pico chip分析。

6.3.3. 根据分析结果判定，如果是mRNA丰度较低，可以增加Total RNA的建库投入量。如果是mRNA完整性较差，可以将mRNA的打断时间进行调整。

6.4. 关于建库接头

6.4.1. 该试剂盒适配Illumina Truncated Adapter，详见附件，客户可根据实验需求进行选择。

6.4.2. Adapter的质量和浓度直接影响连接效率和文库产量。Adapter用量过高可能会产生较多的接头二聚体；用量过低可能会影响连接效率和文库产量。表2列举了使用本试剂和不同Input RNA量推荐的接头稀释倍数。

表格2. 接头使用浓度推荐表

Input RNA	稀释倍数
1 µg	1
100 ng	5
10 ng	10

6.5. 操作规范

- 6.5.1. mRNA建库过程中应戴口罩，手套。
- 6.5.2. poly (A) mRNA富集，在加入磁珠后均在室温条件下操作。
- 6.5.3. RNA样本冰上放置，并尽快进入下一步实验，避免RNA发生降解。
- 6.5.4. mRNA打断条件以及后续片段筛选需要按照说明书推荐范围进行选择，否则会影响文库大小及产量。
- 6.5.5. 磁珠纯化过程中，吸取上清液时，要小心操作，避免吸到磁珠，影响文库片段大小及产量。
- 6.5.6. 使用PCR Index时应小心，避免试剂与样本间的交叉污染。
- 6.5.7. 每一步反应的试剂可以提前配制预混Mix，按照1.1倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够

7. 文库构建步骤

7.1. RNA 富集与片段化

方案一： poly (A) mRNA 捕获与片段化

使用 poly (A) mRNA Capture Module (ABclonal, Cat. RK20340) 进行 mRNA 捕获为例，此试剂盒操作要求起始材料为真核生物的 Total RNA 样本（带有 poly (A) 尾），且 RNA RIN score≥7。RNA 样本准备在冰上进行，其它过程均室温操作。

- 7.1.1. 将RNA取出冰上融解，取10-1000 ng Total RNA溶于50 µL Nuclease-free Water中，冰上放置备用。
- 7.1.2. 待2X Oligo (dT)25 Capture Beads恢复室温后涡旋混匀，取50 µL加入准备好的RNA溶液中，吹打混匀。
- 7.1.3. 将混合物放入PCR仪中进行孵育（热盖温度≥75℃）：

温度	时间
65℃	5 min
25℃	5 min

- 7.1.4. 孵育结束后，取出离心管置于磁力架上约2 min，至溶液变澄清，弃上清。
- 7.1.5. 加入200 µL Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清。
- 7.1.6. 将PCR管从磁力架上取出，加入50 µL Tris Buffer，吹打混匀后PCR仪上孵育（热盖温度105℃）：

温度	时间
80℃	2 min

- 7.1.7. 降至室温后，加入50 µL mRNA Binding Buffer，吹打混匀，室温静置5 min。

7.1.8. 将离心管置于磁力架上约2 min，至溶液澄清，弃掉上清。

7.1.9. 加入200 μ L Washing Buffer吹打混匀，置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清。

7.1.10. 盖上管盖瞬时离心后，置于磁力架上，用10 μ L移液器将残留液体完全弃除。

7.1.11. 按照下表配制1X Frag/Elute Buffer:

试剂	体积
2X Frag/Elute Buffer*	6 μ L
Nuclease-free Water*	6 μ L
总体积	12 μ L

注 1. 可以提前配制预混 Mix，按照样本个数进行配制，无需多配；

7.1.12. 加入11 μ L Frag/Elute Buffer，吹打混匀后，按照下表程序进行RNA洗脱并打断（热盖温度105°C）：

打断片段大小	打断条件
200-300 nt	94°C 15 min, 4°C hold
300-450 nt	94°C 10 min, 4°C hold
400-700 nt	94°C 5 min, 4°C hold

7.1.13. 当温度降至4°C时，将离心管取出，瞬时离心，置于磁力架上，待溶液澄清后，取上清10 μ L至另一个PCR管中，立即进行下一步7.2 First strand cDNA 的合成。

方案二：rRNA去除与片段化

使用 ABclonal rRNA Depletion Module (H/M/R) (Cat. RK20348) 进行 rRNA depletion 方法纯化 RNA 为例，该方法能够有效去除总 RNA 中的细胞质 rRNA（包含细胞质 5S rRNA，5.8S rRNA，18S rRNA 和 28S rRNA）和线粒体 rRNA（包含 12S rRNA 和 16S rRNA）。

Probes与rRNA hybridization

7.1.1. 取10-1000 ng Total RNA，加入Nuclease-free Water稀释至12 μ L体积，冰上放置备用。

7.1.2. 取出Probe Hybridization Buffer冰上融解，按照下面体系配制probe hybridization预混液：

试剂	体积
Probe Hybridization Buffer	2 μ L
rRNA Probe Mix(H/M/R)	1 μ L
总体积	3 μ L

7.1.3. 将3 μ L probe hybridization 预混液加至提前准备好的12 μ L RNA溶液中，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心。

7.1.4. 将上体系置于PCR仪（热盖温度105°C）中，使probes与rRNA进行杂交：

温度	时间
95℃	2 min
95-22℃	0.1℃/sec, 匀速降温至 22℃
22℃	5 min

7.1.5. 杂交结束后, 将样本从PCR仪中取出, 置于冰上, 立即进行RNase H消化。反应期间, 提前将10X RNase H Buffer取出冰上融解。

RNase H消化

7.1.6. 按照下面体系配制RNase H反应预混液:

试剂	体积
10X RNase H Buffer	2 μ L
RNase H	2 μ L
Nuclease-free Water	1 μ L
总体积	5 μ L

7.1.7. 将5 μ L RNase H反应预混液加至上述7.1.5所得产物溶液中, 使RNase H反应体系达到20 μ L, 移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心。

7.1.8. 将反应体系置于PCR仪 (热盖温度 ≥ 45 °C) 中, 进行RNase H反应:

温度	时间
37℃	30 min

7.1.9. RNase H反应结束后, 将样本从PCR仪中取出置冰上, 立即进行DNase I消化。上步反应期间, 提前将10X DNase I Buffer取出冰上融解。

DNase I消化

7.1.10.按照下面体系配制DNase I反应预混液:

试剂	体积
10X DNase I Buffer	5 μ L
DNase I	2.5 μ L
Nuclease-free Water	22.5 μ L
总体积	30 μ L

7.1.11.将30 μ L DNase I反应预混液加至上述7.1.9所得产物溶液中, 使DNase I反应体系达到50 μ L, 移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心。

7.1.12.将反应体系置于PCR仪 (热盖温度 ≥ 45 °C) 中, 进行DNase I消化:

温度	时间
37℃	30 min

7.1.13. DNase I反应结束后，将样本从PCR仪中取出置冰上，立即进行RNA纯化。

rRNA-depleted RNA纯化

7.1.14. 按照下表配制1X Frag/Elute Buffer备用：

试剂	体积
2X Frag/Elute Buffer*	6 μ L
Nuclease-free Water*	6 μ L
总体积	12 μ L

注 1.* 可以提前配制预混 Mix，按照样本个数进行配制，无需多配；

7.1.15. 提前将Agencourt RNA Clean XP Beads从2-8°C取出，静置平衡30 min至室温，使用前涡旋混匀。

7.1.16. DNase I反应结束后，每个反应管中加入110 μ L Agencourt RNAClean XP Beads (2.2X)，吹打混匀。

7.1.17. 室温静置5 min，然后转移至磁力架上5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

7.1.18. 将离心管保持在磁力架上，加入200 μ L 80%乙醇，静置30 s，弃除全部上清。

7.1.19. 重复7.1.18步骤，将磁珠用80%乙醇再洗1次。用10 μ L枪头将残留液体彻底吸干。

7.1.20. 干燥磁珠2-3 min，待酒精挥发完全后，加入11 μ L 1X Frag/Elute Buffer，吹打混匀后。

7.1.21. 室温静置2 min，磁力架上1 min，待溶液变澄清，小心吸取10 μ L上清液至另一新的离心管中。

7.1.22. 将取出的上清置于PCR仪中进行RNA打断（热盖温度105°C）：

打断片段大小	打断条件
200-300 nt	94°C 15 min, 4°C hold
300-450 nt	94°C 10 min, 4°C hold
400-700 nt	94°C 5 min, 4°C hold

7.1.23. 当温度降至4°C时，将离心管取出，瞬时离心，立即进行7.2. First strand cDNA 的合成。

7.2. First strand cDNA 的合成

7.2.1. 取出 RT Strand Specificity Reagent 室温融解混匀后，冰上配制如下体系：

试剂	体积
打断后 mRNA**	10 μ L
RT Strand Specificity Reagent*	8 μ L
First Strand Synthesis Enzyme Mix*	2 μ L
总体积	20 μ L

*：可以提前配制预混 Mix，按样本总数的 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够；

**：2X Frag/Elute Buffer 中包含 First strand cDNA 合成必须的 Random Primer，执行此步骤时，请确保已添加 2X Frag/Elute Buffer。

7.2.2. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪（热盖温度 105°C）：

温度	时间
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	Hold

7.3. Second Strand cDNA 的合成

7.3.1. 将 Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP 从冰箱中取出冰上融解，并按照下表体系依次加入各试剂：

试剂	体积
First strand cDNA（步骤 7.2.2 产物）	20 μ L
Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP *	8 μ L
Second Strand Synthesis Enzyme Mix*	4 μ L
Nuclease-free Water*	48 μ L
总体积	80 μ L

*：可以提前配制预混 Mix，按照样本数 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够。

7.3.2. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心后，将样本置于 PCR 仪（热盖温度关闭）：

温度	时间
16°C	1 hr

7.3.3. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

7.3.4. 样本孵育结束后，每个样本加入 144 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.8X)，枪头吹打混匀；

7.3.5. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

7.3.6. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；

7.3.7. 重复 7.3.6，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干；

7.3.8. 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 40 μ L Low EDTA TE，吹打混匀；

7.3.9. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 37 μ L 上清至另一离心管中；

◇ 双链 cDNA 洗脱产物可在-20°C暂存 24 小时。

7.4. 末端修复

7.4.1. 将 End-prep Buffer 从冰箱中取出，冰上融解后配制如下体系：

试剂	体积
双链 cDNA（步骤 7.3.9 产物）	37 μ L
End-prep Buffer*	10 μ L
End-prep Enzyme Mix*	3 μ L
总体积	50 μ L

*：可以提前配制预混 Mix，按照样本 1.1 倍配制，避免因损耗而致体积不够。

7.4.2. 枪头吹打混匀，瞬时离心，PCR 仪上进行如下孵育（热盖温度 75℃）：

温度	时间
20℃	30 min
65℃	30 min
4℃	Hold

7.5. 接头连接

7.5.1. 将 Ligation Buffer，Truncated Adapter 取出冰上融解，在冰上配制接头连接体系：

试剂	体积
End-prep DNA（步骤 7.4.2 产物）	50 μ L
Ligation Buffer*	16.5 μ L
Truncated Adapter**	2.5 μ L
Ligase Mix	3 μ L
总体积	~70 μ L

*：Ligation Buffer 含有 PEG 比较粘稠，操作时需要慢吸慢打，避免因操作体积误差导致后续片段筛选产物的大小；

**：Adapter 为截短型接头，不适合于 PCR-free 的建库，必须进行扩增；

注意：在配制连接体系时，Ligase Mix 与 Truncated Adapter 不要配制预混 Mix，以免产生接头二聚体影响连接效率。

7.5.2. 吹打混匀，瞬时离心，PCR 仪上进行连接反应（热盖温度关闭）：

温度	时间
22℃	15 min

7.6. 连接产物纯化

连接反应结束后，可执行直接纯化或片段筛选任意一种连接产物纯化方案。

方案一：连接产物直接纯化

当 Input total RNA < 100 ng 或对无文库片段长度要求时，执行如下操作：。

7.6.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃ 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀；

7.6.2. 连接反应结束后，在产物中加入 56 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.8X)，吹打混匀；

7.6.3. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 ~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

- 7.6.4. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；
- 7.6.5. 重复 7.6.4，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；
- 7.6.6. 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 22 μL Low EDTA TE，吹打混匀；
- 7.6.7. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 19.5 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用；

方案二：连接产物直接片段筛选

当 input total RNA $\geq$ 100 ng 时，根据所需目的文库片段大小，参考表格 3 推荐的磁珠分选比例，执行片段分选。操作步骤如下（以 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 打断，分选文库大小为 420-570 bp 为例）：

- 7.6.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀；
- 7.6.2. 在连接体系中加入 30 μL Nuclease-free Water，共 100 μL 体系；
- 7.6.3. 再加入 30 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.30X)，吹打混匀；
- 7.6.4. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清（切勿丢弃上清）；
- 7.6.5. 将上清转移至另一离心管中，加入 20 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.2X)，吹打混匀；

注：根据文库片段大小更改两轮磁珠使用比例（文字已标灰），参考表格 3。

- 7.6.6. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清，小心弃除上清；
- 7.6.7. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；
- 7.6.8. 重复 7.6.7，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；
- 7.6.9. 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 22 μL Low EDTA TE，吹打混匀；
- 7.6.10. 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 19.5 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用；

表格 3. 直接片段筛选磁珠比例推荐表

打断条件	94 $^{\circ}\text{C}$ 15 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
RNA 片段大小	200-300 nt	300-450 nt	400-600 nt
文库片段大小	320-420 bp	420-570 bp	520-720 bp
第一轮磁珠比例	0.35X (35 μL)	0.3X (30 μL)	0.25X (25 μL)
第二轮磁珠比例	0.2X (20 μL)	0.2X (20 μL)	0.15X (15 μL)

注：更多片段筛选磁珠比例及文库大小分布见附录 8.2。

方案三：连接产物纯化后片段筛选

接头连接体系中的 Ligation Buffer 含有 PEG 成分，增强了片段分选体系的灵敏度，磁珠体积误差容易导致片段的偏移。如果对片段要求比较高，推荐先进行纯化再进行片段分选。具体步骤如下（以 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 打断，分选文库大小为 420-500 bp 为例）：

- 7.6.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；
- 7.6.2. 连接反应结束后，在产物中加入 70 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X)，吹打混匀；

- 7.6.3. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；
- 7.6.4. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；
- 7.6.5. 重复 7.6.4，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；
- 7.6.6. 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 102.5 μL Low EDTA TE，吹打混匀；
- 7.6.7. 室温静置 2 min，将离心管置于磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 100 μL 上清至另一新的 PCR 管中进行片段分选。
- 7.6.8. 加入 65 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.65 X 100 μL) 至纯化后的连接产物中，吹打混匀；
- 7.6.9. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清（切勿丢弃上清）；
- 7.6.10. 将 160 μL 上清转移至另一离心管中，加入 10 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.1 X 100 μL)，吹打混匀；
- 注：根据文库片段大小更改两轮磁珠使用比例（文字已标灰），参考表格 4。**
- 7.6.11. 室温静置 5 min，磁力架上静置 5 min，直到溶液变澄清，小心弃除上清；
- 7.6.12. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；
- 7.6.13. 重复 7.6.12，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；
- 7.6.14. 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 22 μL Low EDTA TE，吹打混匀；
- 7.6.15. 室温静置 2 min，将离心管置于磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用；

表格4. 纯化后片段筛选磁珠比例推荐表

打断条件	连接产物纯化	第一轮磁珠比例	第二轮磁珠比例	文库片段大小 (bp)
94°C 5 min	1.0X 磁珠纯化	0.55X (55 μL)	0.1X (10 μL)	600-720
94°C 10 min		0.6X (60 μL)	0.1X (10 μL)	500-600
		0.65X (65 μL)	0.1X (10 μL)	420-500
94°C 15 min		0.75X (75 μL)	0.1X (10 μL)	360-420
		0.8X (80 μL)	0.1X (10 μL)	320-360

注：以上所有数据均为内部测试数据，因为连接体系与片段筛选体系密切相关且比较灵敏，个人操作习惯或移液器使用误差均可能导致片段大小发生偏移；如果得到文库片段偏大，建议增加第一轮磁珠的用量；如果得到文库片段偏小，建议减少第一轮磁珠的用量；调整比例可按照偏差大小进行调整，变化比例在 0.01X-0.05X。

7.7. PCR 扩增文库与纯化

- 7.7.1. 根据所选接头试剂盒配置相应 PCR 体系，进行文库扩增：

试剂	体积
连接纯化后产物	19.5 μL
2X PCR Mix	25 μL
UDG Enzyme	0.5 μL
UDI Primer*	5 μL
总体积	50 μL

* UDI primer 是已预湿的 P5 端和 P7 端 index 标记的 primer，取用时需要小心，每取用一次必须更换枪头，避免样本与试剂产生交叉污染，

影响样本测序结果；

7.7.2. 吹打混匀，微离心，参考下表设置 PCR 程序并进行 PCR 反应（热盖温度 105℃）：

温度	时间	Cycles
37℃	10 min	1
98℃	1 min	1
98℃	10 s	8-16* (详请参考表格 5)
60℃	15 s	
72℃	30 s	
72℃	1 min	1
4℃	Hold	

注：由于不同物种及组织提取的 mRNA 含量不同，实际循环数需要根据 Total RNA 样品的提取质量，物种组织类型，样本处理情况等调整扩增循环数。

表格5. PCR循环数推荐表

Total RNA	直接纯化 循环数选择	片段分选 循环数选择
10 ng	15-16	/
100 ng	12-13	14-15
1 μg	8-9	10-11

7.7.3. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8℃取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

7.7.4. PCR 反应结束后，每个反应管中加入 40 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.8X)，吹打混匀；

7.7.5. 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

7.7.6. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；

7.7.7. 重复 7.7.6，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

7.7.8. 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），加入 31 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

7.7.9. 室温静置 2 min, 磁力架上 1 min, 直到溶液变澄清, 小心吸取 30 μL 文库至另一新的离心管中, 留存备用。

8. 附录

8.1. RNA打断片段分布

mRNA 纯化来自小鼠组织 total RNA (1 μg), mRNA 使用 1X Frag/Elute Buffer 分别于 94°C 打断 5、10、15 分钟后, 磁力架上取上清, 使用 2.2X 体积的 Agencourt RNAClean XP beads 进行纯化。使用 Agilent RNA 6000 Pico chip 进行片段大小分析。

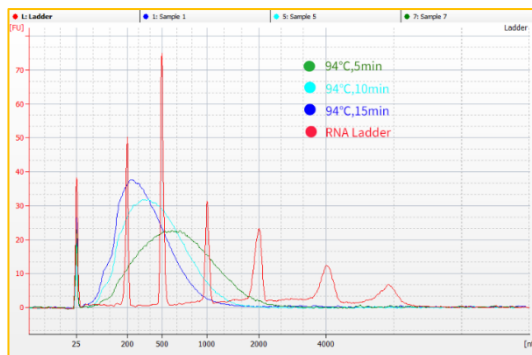


图1. mRNA打断片段分布2100分析图。

8.2. 片段筛选磁珠比例及文库大小分布

8.2.1. 以下为执行连接产物直接片段筛选的文库大小分析结果:

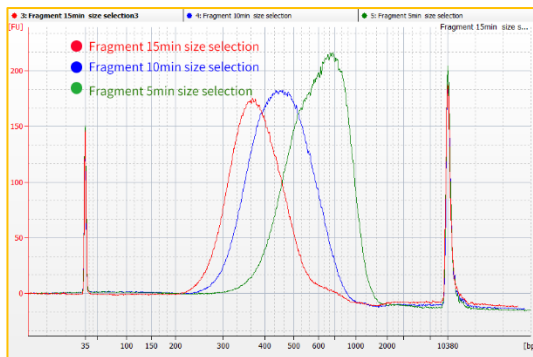


图2. 直接片段筛选文库片段大小分布2100分析图。

1 μg 小鼠细胞 total RNA 起始构建文库, 使用不同片段选择条件, PCR 10 cycles 得到的文库, 将文库稀释至 2 ng/ μL , 使用 Agilent high sensitivity DNA Chips 进行 2100 Bioanalyzer 分析。

8.2.2. 以下为执行连接产物直接片段筛选 (方案二) 操作, 使用其他磁珠比例的文库大小分析结果:

表格6. 其他片段筛选磁珠比例及文库大小分布

mRNA 打断条件	第一轮磁珠比例	第二轮磁珠比例	文库片段大小 (bp)
94°C 5 min	0.25X (25 μ L)	0.1X (10 μ L)	500-700
94°C 10 min	0.3X (30 μ L)	0.1X (10 μ L)	450-550
94°C 15 min	0.35X (35 μ L)	0.1X (10 μ L)	350-450

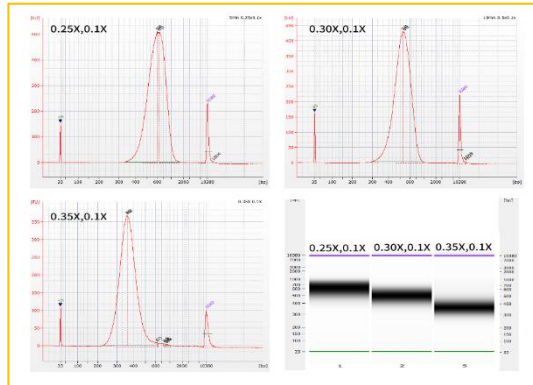


图3. 直接片段筛选文库片段大小分布2100分析图（其他磁珠比例）。

1 μ g 小鼠细胞 total RNA 起始构建文库，使用方案 2 不同片段分选条件，PCR 10 cycles 得到的文库，将文库稀释至 2 ng/ μ L，使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行峰形分析。

8.2.3. 以下为执行表格4. 纯化后片段筛选磁珠比例（方案三）的文库大小分析结果：

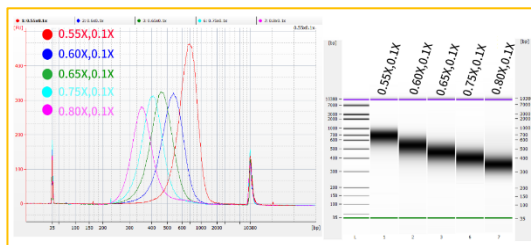


图4. 纯化后片段筛选文库片段大小分布2100分析图。

9. 附表

表格7. 试剂盒兼容接头及Index类型汇总

Index 类型	产品名称	货号
双端唯一 (8-base)	Unique Dual Index for Illumina MiniSet (8 indices)	RK21622
	Unique Dual Index for Illumina MidiSet (24 indices)	RK21623
	Unique Dual Index for Illumina Set_A (48 indices)	RK21624
	Unique Dual Index for Illumina Set_B (48 indices)	RK21625
	Unique Dual Index for Illumina Set_C (48 indices)	RK21626
	Unique Dual Index for Illumina Set_D (48 indices)	RK21627

注：ABclonal Illumina 截短型接头试剂盒中的引物均适用本试剂盒。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼