

NGS illumina 平台快速 RNA 文库构建 试剂盒(含磁珠) 使用说明书

货 号:

NGS24011-S(24 rxns)

NGS24011-L(96 rxns)

一、试剂盒简介

NGS illumina 平台快速 RNA 文库构建试剂盒(含磁珠)是针对 illumina 高通量测序平台开发的转录组文库构建试剂盒。试剂盒将二链合成、末端修复和加 A 合并为一步，中间不需要纯化步骤，极大的简化了操作流程，缩短了建库时间；优化的反应体系，提高了文库转化效率，对更低质量的 RNA 有更好的解决方案。试剂盒包含的所有酶和缓冲液都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。通过搭配前处理的试剂盒，最大范围可适用于起始量为 1 ng - 1 µg 总 RNA 起始的转录组文库构建。直接投入纯化的 mRNA 建库时，可适用于起始模板量为 0.5-100 ng 的高质量 mRNA。试剂盒提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

二、试剂盒规格及组分

	组分名称	NGS24011-S (24 rxns)	NGS24011-L (96 rxns)	保存温度
Box 1	片段化缓冲液	432 µL	864 µL × 2	-25~-15 °C
	一链合成酶混合液	48 µL	192 µL	-25~-15 °C
	一链合成缓冲液	168 µL	672 µL	-25~-15 °C
	二链合成&加 A 酶混合液	96 µL	384 µL	-25~-15 °C
	二链合成&加 A 缓冲液(dNTP)	288 µL	1152 µL	-25~-15 °C
	二链合成&加 A 缓冲液(dUTP)	288 µL	1152 µL	-25~-15 °C
Box 2	连接酶	48 µL	192 µL	-25~-15 °C
	连接缓冲液	480 µL	960 µL × 2	-25~-15 °C
	2×PCR 扩增混合液	600 µL	1.2 mL × 2	-25~-15 °C
	截短型接头(illumina 平台)	120 µL	480 µL	-25~-15 °C
	UDG 酶	24 µL	96 µL	-25~-15 °C
Box 3	DNA 分选纯化磁珠*	1.4 mL × 2	11.2 mL	2~8°C

*注：Box 3 提供的磁珠量为纯化建库用量，如需分选建库，请自行采购 DNA 分选纯化磁珠(环球基因)或者使用或其他同等功能产品。

三、保存与运输条件

Box1: -25 ~ -15°C保存，干冰运输。

Box2: -25 ~ -15°C保存，干冰运输。

Box3: 2 ~ 8°C保存，冰袋运输。

四、自备材料

无水乙醇、无核酸酶水(Nuclease-free Water)、Qubit™ 1×dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品、DNA 分选纯化磁珠(环球基因)或其他同等功能产品、illumina 平台扩增引物(含 index)(环球基因)等。

磁力架、PCR 仪、微型离心机、涡旋振荡器、Qubit 定量仪或者其他定量仪器、Agilent 2100 Bioanalyzer

或其他片段分析仪、200 μ L PCR 单管或者八联排管、1.5 mL 离心管等。

五、注意事项

5.1 样本处理

实验开始前，建议使用环球基因 mRNA 磁珠捕获试剂盒(Cat: NGS24009)、核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除试剂盒(人/小鼠/大鼠)(Cat: NGS24010)。

为保证建库质量，在开始实验前必须对 RNA 样品进行质控，RNA 样品总量、纯度和完整性须满足以下条件：OD260/OD280 比值介于 1.8-2.1 之间，若比值 >2.1 则 RNA 样品中可能有基因组污染，若比值 <1.8 则可能有蛋白质污染；OD230/OD260 比值介于 0.4-0.5 之间，若比值 >0.5 则可能 RNA 样品中有盐或小分子杂质污染，比值 <0.4 可能有基因组污染。若使用 Bioanalyzer 进行 RNA 完整性检测，RIN 值 ≥ 7.0 ；若使用琼脂糖凝胶电泳检测，则 28S 和 18S 条带无明显降解，且无蛋白质和基因组污染。

5.2 接头连接

5.2.1 试剂盒不包含扩增引物，需要单独采购。环球基因可以提供相应产品，illumina 平台扩增引物(含 index)-96 反应（包含 96 次双端 index 扩增引物）、illumina 平台扩增引物(含 index)系列 A-24 反应（包含 24 次双端 index 扩增引物）、illumina 平台扩增引物(含 index)系列 B-24 反应（包含 24 次双端 index 扩增引物）。

5.2.2 接头的质量和使用浓度直接影响连接效率及文库产量。接头用量过高可能会产生较多接头二聚体；用量较低可能会影响连接效率及文库产量。本试剂盒操作方案中，所加入的接头体积固定为 5 μ L，表 1 列举了使用本试剂盒，不同 DNA 投入量推荐的接头稀释倍数(稀释接头使用 TE 缓冲液)。

表 1 不同总 RNA 投入推荐的接头使用浓度

DNA 投入量	接头稀释倍数	接头浓度
1 μ g	不稀释	15 μ M
500 ng	不稀释	15 μ M
100 ng	不稀释	15 μ M
10 ng	5 倍稀释	3 μ M

5.3 磁珠纯化及分选

5.3.1 磁珠应保存于 4℃ 条件，使用前请平衡至室温使用。

5.3.2 磁珠使用前，请充分震荡混匀或使用移液器吸吹混匀。

5.3.3 磁珠漂洗使用新鲜配置的 80%乙醇。

5.3.4 文库是否需要片段分选可根据需要进行，如需分选，建议接头连接后先纯化再分选。

5.3.5 转移或弃去上清时，注意不要吸取磁珠，否则将影响文库质量。

5.3.6 产物洗脱前，磁珠应充分干燥，但不可使磁珠干燥开裂，磁珠干燥不充分或者过度干燥都将影响建库效果。

5.4 其他注意事项

5.4.1 本试剂盒仅供科研使用，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作。



5.4.2 避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。

5.4.3 反应液配置时应尽量避免产生气泡，并注意防止漏液。

5.4.4 PCR 产物因操作不当极容易产生气溶胶污染，从而影响实验结果的准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。

5.4.5 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。

5.4.6 加样所用的移液器需要定期检测，保证加样的准确性。



六、操作步骤

6.1 RNA 片段化

经 mRNA 磁珠法富集的 mRNA 或去除核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 后的 RNA 应尽快进行后续操作，避免 RNA 降解。

6.1.1 mRNA 磁珠法富集的 mRNA，磁珠洗脱时建议直接加入 18 μ L 片段化缓冲液进行片段化(带 mRNA 磁珠进行片段化)，最后吸取 16 μ L 的上清液至一个新的离心管中进行一链合成；核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除法富集的 mRNA，磁珠洗脱时建议直接加入 18 μ L 片段化缓冲液，最后吸取 16 μ L 的上清液至一个新的离心管中进行片段化(不带磁珠进行片段化)，再进行一链合成。

6.1.2 将上述反应体系使用移液器轻轻吹打混匀，放入 PCR 仪中进行片段化孵育。根据插入片段大小的需要，选择片段化条件(热盖温度 105℃)，RNA 片段化程序如表 2：

表 2 RNA 片段化程序

打断片段大小(bp)	打断条件
100-250	94℃ 12 min, 4℃ hold
200-400	94℃ 8 min, 4℃ hold
350-500	94℃ 5 min, 4℃ hold

注：当程序结束并到达 4℃后，立刻进入下一步第一链合成。

6.2 第一链 cDNA 的合成

6.2.1 将一链合成缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.2.2 将一链合成酶混合液置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.2.3 将片段化结束的 PCR 管置于冰上，配置表 3 中的体系：

表 3 第一链 cDNA 合成体系

试剂	体积
片段化后 mRNA	16 μ L
一链合成缓冲液	7 μ L
一链合成酶混合液	2 μ L
Total	25 μ L

6.2.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.2.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 4 程序(热盖温度 105℃)：

表 4 第一链 cDNA 合成程序

温度	时间
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	∞

注：第一链合成反应结束后，将样本置于冰上，或保持在 PCR 仪 4℃，立刻进行第二链合成和加 A 尾步骤。

6.3 第二链 cDNA 的合成/加 A

6.3.1 将二链合成&加 A 缓冲液(dNTP)/二链合成&加 A 缓冲液(dUTP)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.2 将二链合成&加 A 酶混合液置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.3 将上一步骤结束的 PCR 管置于冰上，配置表 5 中的体系：

表 5 第二链 cDNA 的合成/加 A 体系

试剂	体积(非链特异性文库)	体积(链特异性文库)
一链合成产物	25 μL	25 μL
Nuclease-free Water	9 μL	9 μL
二链合成&加 A 缓冲液(dNTP)	12 μL	/
二链合成&加 A 缓冲液(dUTP)	/	12 μL
二链合成&加 A 酶混合液	4 μL	4 μL
Total	50 μL	50 μL

6.3.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.3.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 6 程序(热盖温度 105℃)：

表 6 第二链 cDNA 的合成/加 A 程序

温度	时间
20℃	45 min
72℃	15 min
4℃*	∞

*注：程序结束且样本到 4℃后，立刻进入接头连接步骤。

6.4 接头连接

6.4.1 将连接缓冲液和截短型接头(illumina 平台)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.4.2 将连接酶置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.4.3 将上一步骤结束的 PCR 管置于冰上，配置表 7 中的体系：

表 7 连接体系

试剂	体积
二链合成&加 A 产物	50 μ L
Nuclease-free Water	3 μ L
连接缓冲液*	20 μ L
连接酶	2 μ L
截短型接头(illumina 平台)**	5 μ L
Total	80 μ L

注 1: 以上试剂配置时置于冰上操作, 连接缓冲液、连接酶可配置预混液, 但截短型接头(illumina 平台)需要单独添加, 以免接头自连。

*注 2: 连接缓冲液比较粘稠, 请上下颠倒、振荡, 充分混匀并短暂离心后使用。

**注 3: 截短型接头(illumina 平台)投入量保持 5 μ L, 避免加错体积, 低投入量接头稀释体系见第 2 页表 1。

6.4.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀, 并短暂离心将反应液离心至管底。

6.4.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中, 运行表 8 程序(热盖关闭):

表 8 接头连接程序

温度	时间
23 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	∞

注: 连接后纯化前将样本维持在冰上可减少接头二聚体的产生。

6.5 连接产物纯化或分选

6.5.1 连接产物纯化

- 1) 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出, 室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。
- 2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。
- 3) 向连接产物中加入 64 μ L(0.8 $\times$) DNA 分选纯化磁珠, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温孵育 5 min。
- 4) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心移除上清, 注意不要吸到磁珠。
- 5) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上, 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。
- 6) 重复步骤 5。
- 7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 使用 10 μ L 移液器移除管底残留的乙醇, 干燥至磁珠表面呈现哑光。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取出, 加入 21 μ L(非链特异性文库)/20 μ L(链特异性文库) Nuclease-free Water, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置 2 min。
- 9) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心转移 20 μ L(非链特异性文库)/19

μL(链特异性文库)上清至干净的 PCR 管中。

注 1: 此步骤后可以暂停, 纯化后的产物可以暂存于 4℃/-20℃, 保存于-20℃避免反复冻融, 尽快进行后续步骤。

注 2: 如文库不需要分选, 直接进行 6.6 文库扩增步骤; 如果进行文库分选, 则接头连接后直接进行 6.5.2 连接产物分选步骤。

6.5.2 连接产物分选

- 1) 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出, 室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。
- 2) 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。
- 3) 向连接产物中加入 64 μL(0.8×) DNA 分选纯化磁珠, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温孵育 5 min。
- 4) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心移除上清, 注意不要吸到磁珠。
- 5) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上, 加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 sec, 小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5。
- 7) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇, 干燥至磁珠表面呈现哑光。
- 8) 将 PCR 管从磁力架上取出, 加入 105 μL Nuclease-free Water, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置 2 min。
- 9) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心转移 100 μL 上清至干净的 PCR 管中。
- 10) 向 100 μL 上清中加入 65 μL(0.65×) DNA 分选纯化磁珠, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温孵育 5 min。
- 11) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心转移 160 μL 上清到干净的 PCR 管中, 注意不要吸到磁珠。
- 12) 向转移后的上清中加入 20 μL(0.2×) DNA 分选纯化磁珠, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温孵育 5 min。
- 13) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心移除上清, 注意不要吸到磁珠。
- 14) 保持 PCR 管始终放置于磁力架上, 加入 200 μL 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。
- 16) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇, 干燥至磁珠表面呈现哑光。
- 17) 将 PCR 管从磁力架上取出, 加入 21 μL(非链特异性文库)/20 μL(链特异性文库) Nuclease-free Water, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 室温静置 2 min。
- 18) 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心转移 20 μL(非链特异性文库)/19

μL(链特异性文库)上清至干净的 PCR 管中。

注：此步骤后可以暂停，分选后的产物可以暂存于 4℃/-20℃，保存于-20℃避免反复冻融，尽快进行后续步骤。

6.6 文库扩增

6.6.1 将 illumina 平台扩增引物(含 index)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.6.2 将 2×PCR 扩增混合液置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.6.3 将纯化或分选后的连接产物置于冰上，配置表 9 中的体系：

表 9 文库扩增体系

试剂	体积(非链特异性文库)	体积(链特异性文库)
连接产物	20 μL	19 μL
UDG 酶	/	1 μL
2×PCR 扩增混合液	25 μL	25 μL
D5XX Primer	2.5 μL	2.5 μL
D7XX Primer	2.5 μL	2.5 μL
Total	50 μL	50 μL

6.6.4 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。

6.6.5 将 PCR 管放入 PCR 仪中，运行表 10 程序(热盖温度 105℃)：

表 10 文库扩增程序

温度	时间	循环
25℃ *	10 min	1
98℃	2 min	1
98℃	20 sec	X**
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	2 min	1
4℃	∞	1

*注：链特异性文库构建时进行 25℃ 孵育，非链特异性文库构建时不需要进行 25℃ 孵育。

**注：通常 PCR 循环数需要根据投入量和物种不同进行调整，具体循环数见下表。

表 11 文库扩增推荐循环数

RNA 投入量	非链特异性文库*	链特异性文库*
1 μg	11-12	12-13
500 ng	12-13	13-14
100 ng	14-15	15-16
10 ng	17-18	18-19

*注 1：以上 PCR 循环数推荐为连接产物纯化后扩增循环数，物种不同，可适当调整扩增循环数。

*注 2：连接产物分选后扩增，扩增循环相应增加 1-2 个循环。

6.7 文库扩增产物纯化

6.7.1 将 DNA 分选纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

6.7.2 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 DNA 分选纯化磁珠混匀。

6.7.3 向 PCR 产物中加入 50 μ L(1 $\times$) DNA 分选纯化磁珠，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

6.7.4 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.7.5 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，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。

6.7.6 重复步骤 6.7.5。

6.7.7 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μ L 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

6.7.8 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 31 μ L Nuclease-free Water 或者 TE Buffer，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min。

6.7.9 将 PCR 管短暂离心并放置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心转移 30 μ L 上清至干净的管中，产物保存于-20 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。

6.8 文库质检

6.8.1 使用 QubitTM 1 $\times$ dsDNA HS Assay Kit 或其他同等功能产品对文库进行定量。

6.8.2 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他片段分析仪对文库进行片段分析。

七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。