

QKGEN® ES RNA-seq Library Prep Kit

(for Illumina)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

一、产品简介

本产品是针对 Illumina 高通量测序平台开发的专用于构建链特异性或非链特异性转录组文库的试剂盒。适用样品为 0.1ng-100ng 处理后的 RNA（经 mRNA 磁珠捕获得到的 mRNA 或者经 rRNA 去除后得到的 RNA）构建成高质量的测序文库，得到的文库产量高、信息完整。本试剂盒一步完成二链合成、末端修复与加 A 反应，中间不需要纯化步骤，极大地简化了操作流程，缩短了建库时间，可在 3 小时内完成高质量测序文库的构建。

二、产品组分

组分名称	QRL0096 (96rxn)
4×RNA Fragmentation Buffer II	432μl
Library First-Strand Buffer II	576μl
Library First-Strand Enzyme Mix	288μl
Library SEA Buffer II (+dUTP)	4×600μl
Library SEA Buffer II	4×600μl
Library SEA Enzyme Mix	960μl
Adapter for Illumina (16μM)	480μl
Adapter Dilution Buffer	5ml
Adapter Ligation Buffer III	4×720μl
Adapter Ligation Enzyme II	480μl
Library Amplification SuperMix (2X)	4×600μl
Universal Primer for Illumina	480μl
Uracil-DNA Glycosylase	96μl
Library Elution Buffer	4ml
Nuclease-free Water	5ml

备注：Adapter for Illumina (16μM)和 Universal Primer for Illumina 中均不含 Index，不可同时使用，需分别与含 Index 的 Primer 或含 Index 的 adapter 搭配使用。

三、保存方法

-30 ~ -15℃保存；干冰运输。有效期 1 年。

四、自备材料

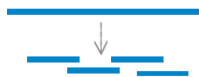
DNA 纯化磁珠、Nuclease-free ddH₂O、无水乙醇、低吸附吸头、Nuclease-free PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

五、注意事项：

1. 请使用 RNase-free 的 PCR 管。
2. 为保证建库成功率，建议使用 RIN 值≥8 的 Total RNA 进行 mRNA 捕获或者使用 RIN 值>7 的 Total RNA 进行 rRNA Depletion。
3. 本试剂盒不提供含 Index 的 Primer 或 Adapter，含 Index 的 Primer 在 QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina 或 QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 中提供。
4. 同时对多个样本进行建库时，建议在配制各步骤反应液时，在 1.5mL 离心管中按照样本数+0.5 人份进行配制，再分装到各样本管中，可有效避免由于加液误差对建库效果的影响。
5. 使用本试剂盒前，请将各组分置于冰上解冻，解冻后颠倒混匀，离心后置于冰上待用。

（一）文库构建原理示意图

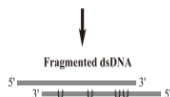
1. RNA片段化



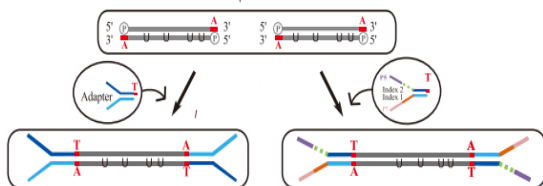
2. 一链合成



3. 二链合成、末端修复与加A



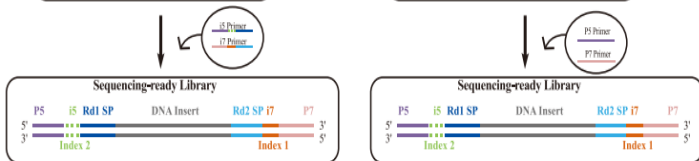
4. 接头连接



5. 去除含U链



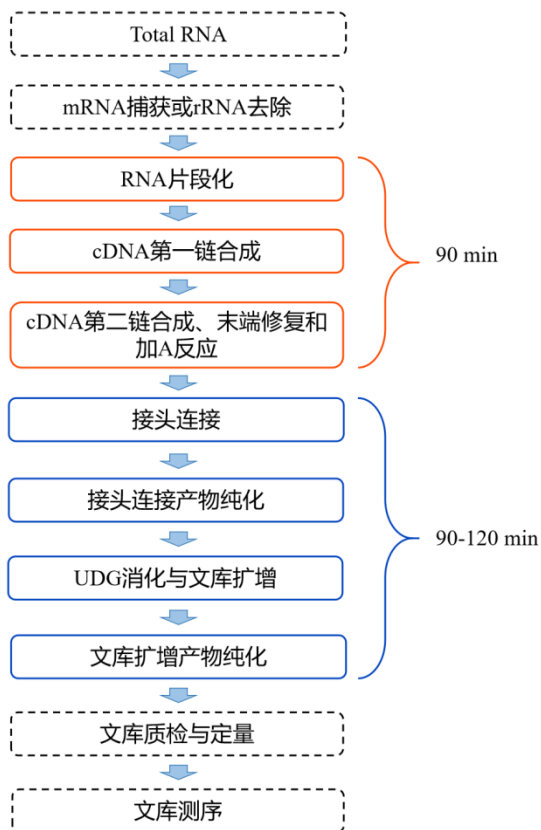
6. 文库扩增



链特异性文库构建原理示意图

（非链特异性文库二链合成时无 dUTP 掺入，无 UDG 酶消化的步骤）

（二）文库构建流程图



链特异性文库构建流程图

（非链特异性文库二链合成时无 dUTP 掺入，无 UDG 酶消化的步骤）

备注：流程图中虚线部分不包含在本试剂盒流程内。

（三）实验流程

1. RNA 片段化

- （1）将 mRNA 或经 rRNA Depletion 处理后的 RNA 按照以下体系混合，涡旋混匀：

组分	体积
RNA	≤12μL
4×RNA Fragmentation Buffer II	4μL
Nuclease-free Water	补足至 16μL

*mRNA 经捕获在洗脱时或者 Total RNA 经 rRNA Depletion 处理后纯化洗脱时，可将 4×RNA Fragmentation Buffer II 用 Nuclease-free Water 稀释至 1X，用 18μL RNA Fragmentation Buffer II 来洗脱 RNA，然后使用步骤（2）中的片段化程序进行片段化。

*如进行 mRNA 捕获，为了避免 WB33 对后续实验的影响，建议在第二次进行 WB33 清洗和去上清后，再加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇（使用 RNase-free water 配制），不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒后弃上清，室温晾干至磁珠刚刚出现干裂。

- （2）将反应管置于 PCR 仪中，进行以下孵育步骤（热该温度 105℃）：
RNA 片段化程序（插入片段 200~350bp）如下：

温度	时间
94℃	6 min
4℃	Hold

如果想获得其他长度的插入片段，片段化条件如表 1：

表 1. 不同插入片段长度的片段化条件

插入片段长度	温度	时间
150-200bp	94℃	7-10 min
200-350bp	94℃	4-6 min
≥ 350bp	86℃	4-8 min

注：建议在搭配 QKGEN[®] mRNA 捕获试剂盒时使用上述片段化条件。使用其他品牌 mRNA 捕获试剂盒时，需对片段化条件进行适当调整。

- （3）样品温度降至 4℃后立即取出样品，立即进行第一链 cDNA 合成反应，**不建议暂停**。

*针对含磁珠的片段化的操作，待样品温度降至 4℃后立即取出样品，置于磁力架 5 分钟，小心吸取 16μL 上清至一个新的 RNase-free PCR 管中，并立即进行第一链 cDNA 合成反应，**不建议暂停**。

2. cDNA 第一链合成

- (1) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上，依次加入：

组分	体积 μL
上步片段化 RNA	16
Library First-Strand Buffer II	6
Library First-Strand Enzyme Mix	3
总体积	25

- (2) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。
(3) 将反应管置于 PCR 仪中，进行以下孵育步骤（热盖温度≥85℃），第一链合成程序如下：

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

3. cDNA 第二链合成、末端修复和加 A 反应

- (1) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上，依次加入：

组分	链特异性文库	非链特异性文库
一链产物	25μL	25μL
Library SEA Buffer II (+dUTP)	25μL	-
Library SEA Buffer II	-	25μL
Library SEA Enzyme Mix	10μL	10μL
总体积	60μL	60μL

- (2) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。

- (3) 将反应管置于 PCR 仪上，进行一下孵育步骤（热盖温度 80℃），第二链合成程序如下：

温度	时间
16℃	30 min
68℃	15 min
4℃	Hold

4. 接头连接

- (1) 冰上溶化含 Index 的 Adapter 或不含 Index 的 Adapter for Illumina（16μM），并参考下表准备合适浓度的 Adapter，使用 Adapter Dilution Buffer 进行稀释。

Total RNA 输入量	Adapter 稀释倍数
1μg-5μg	不稀释
200ng-999ng	稀释 3 倍
50ng-199ng	稀释 10 倍

*注意：请根据需求选择 Adapter，如需在接头连接中加入 index，请使用含 Index 的 Adapter；如需在文库扩增中加入 Index，请使用本试剂盒提供的不含 Index 的 Adapter for Illumina。Adapter 的质量的用量直接影响建库的效率和质量。建议使用 QKGEN[®] 提供的 Adapter。提高 Adapter 加入量可一定程度上提高文库产出，但是过高会导致 Adapter 或 Adapter dimer 的残留（可通过纯化或分选去除）；加入量不足则影响连接效率从而导致文库质量较差（如插入片段自连导致嵌合体的形成）。

- (2) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上，依次加入：

组分	体积 μL
上步反应产物	60
合适浓度的 Adapter	5
Adapter Ligation Buffer III	30
Adapter Ligation Enzyme II	5
总体积	100

*建议先将 Adapter 与上步反应产物混匀，再加入 Adapter Ligation Buffer III 与 Adapter Ligation Enzyme II 的混合液。

- (3) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。

- (4) 将反应管置于 PCR 仪上, 20°C 孵育 15 分钟。连接产物可立即进行纯化, 或于 -20°C 保存。

5. 接头连接产物纯化

推荐含 Index 的接头连接产物使用 0.4× QKGEN®AT DNA Clean Beads (货号: ACB0005/ACB0060/ACB0450) 进行产物纯化; 不含 Index 的接头连接产物使用 0.8× QKGEN®AT DNA Clean Beads 进行产物纯化。

- (1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
- (2) 将 100μL 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中, 加入 40μL (0.4×) 或 80μL (0.8×) 的纯化磁珠, 用移液器轻柔吹打混匀, 室温静置孵育 5 min。
- (3) 孵育完成后, 将离心管置于磁力架上, 室温静置 5 min, 直至溶液完全变澄清。
- (4) 小心吸弃上清液, 保留磁珠。
- (5) 加入 200μL 80%乙醇溶液 (现配现用), 室温静置 30s, 小心吸弃上清液。
- (6) 重复步骤 5 一次。
- (7) 尽可能将残留的乙醇吸弃, 注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上, 打开离心管管盖, 室温晾干至磁珠看不到反光 (约 1-3 min)。(注意磁珠不能太干, 不能出现干裂, 否则影响得率)
- (8) 将离心管从磁力架上取下, 准备洗脱:
 - a) 如产物无需进行片段分选, 加入 21μL 无核酸酶水重悬磁珠, 室温孵育 5 min, 将离心管置于磁力架上, 待溶液完全变澄清, 小心移取 20μL 至新的 PCR 管中;
 - b) 如产物需进行片段分选, 加入 101 μL 无核酸酶水重悬磁珠, 室温孵育 5 min, 将离心管置于磁力架上, 待溶液完全变澄清, 小心移取 100 μL 上清液至新的 1.5mL 离心管中, 继续进行片段分选, 具体操作则参考附录一的片段分选操作步骤进行。

6. 文库扩增

- (1) 请根据需要配制文库扩增体系, 当使用 Index 的 Adapter 时, 按下表加入:

组分	链特异性文库	非链特异性文库
上步纯化产物	19μL	20μL
Library Amplification SuperMix (2X)	25μL	25μL
Universal Primer for Illumina	5μL	5μL
Uracil-DNA Glycosylase	1μL	-
总体积	50μL	50μL

当使用不含 Index 的 Adapter for Illumina 时, 需搭配 index 的 i5/i7 primer, 按下表加入:

组分	链特异性文库	非链特异性文库
上步纯化产物	19μL	20μL
Library Amplification SuperMix (2X)	25μL	25μL
i5 primer*	2.5μL	2.5μL
i7 primer*	2.5μL	2.5μL
Uracil-DNA Glycosylase	1μL	-
总体积	50μL	50μL

* QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina 和 QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 中提供多种含 index primers, 请根据需要自行选择。

(2) 移液器吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体。

(3) PCR 仪上进行一下扩增程序:

温度	时间	循环数
50°C	5 min*	1
98°C	3 min	1
98°C	30 sec	11-17**
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	3 min	1
4°C	∞	1

*注: 针对链特异性文库, 先 50°C 孵育后扩增; 针对非链特异性文库, 无需孵育直接扩增。

**扩增循环数根据 RNA 的投入量来进行相应的调整, 可参考下表执行:

Total RNA 起始量	推荐扩增循环数	
	链特异性文库	非链特异性文库
1000 ng	11-12	10-11
200 ng	13-14	12-13
50 ng	15-16	14-15

7. 文库扩增产物纯化

磁珠纯化操作步骤同“5. 接头连接产物纯化”，但需使用 1.0 倍体积（50 μ L）的纯化磁珠进行扩增产物纯化。如需进行片段分选请参考**附录一**。

8. 文库质控

- （1）浓度检测：推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测。
- （2）片段分布检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段长度分布检测。

附 录

附录一 片段分选操作步骤

1. 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡，配制 80% 乙醇。
2. 先确保样品体积 $\geq 100 \mu\text{L}$ ，不足 $100 \mu\text{L}$ ，应加无核酸酶水补足。
3. 根据 DNA 片段长度要求，参考以下表格向样品中加入第一轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。

表 1 DNA 文库不同片段大小的推荐磁珠用量

DNA 插入片段大小	150-250bp	200-300bp	300-400bp	400-500bp
DNA 文库大小	250-350bp	350-450bp	450-550bp	550-650bp
第一轮加入磁珠体积倍数	0.8×	0.7×	0.6×	0.55×
第二轮加入磁珠体积倍数	0.2×	0.2×	0.2×	0.15×

注意：分选磁珠体积均为 DNA 样品体积的倍数。

4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 15min，直至溶液完全变澄清。
5. 小心将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中（注意不要吸取到磁珠），丢弃磁珠。
6. 向上清液中加入第二轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
7. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
8. 加入 200 μL 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
11. 加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μL 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

附录二 文库结构

本试剂盒使用 QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina 或 QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina，所得文库结构如下：

5' -AATGATACGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]ACACTCTTTCCTACACGA

CGCTCTTCCGATCT-XXXXXXXX-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC

[i7]ATCTCGTATGCGTCTTCTGCTTG-3'

i5: Index 2,8 bases;

i7: Index 1,8bases

-XXXXXXXX-:插入序列