

QKGEN® ES RNA-seq Library Prep Kit

(for MGI)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

第一部分 产品信息

一、产品简介

本试剂盒是针对 MGI 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 0.1 ng-100 ng 处理后的 RNA（经 mRNA 磁珠捕获得到的 mRNA 或者经 rRNA 去除得到的 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，极大的简化了操作流程，缩短了建库时间，可在 3 个小时完成高质量测序文库的构建。

二、产品组分

组分名称	QRL1096
4x RNA Fragmentation Buffer II	432 μ l
Library First-Strand Buffer II	576 μ l
Library First-Strand Enzyme Mix	288 μ l
Library SEA Buffer II(+dUTP)	4x600 μ l
Library SEA Buffer II	4x600 μ l
Library SEA Enzyme Mix	960 μ l
Adapter Dilution Buffer	5 ml
Adapter Ligation Buffer II	4x720 μ l
Adapter Ligation Enzyme	480 μ l
Library Amplification SuperMix (2x)	4x600 μ l
Universal Primer for MGI	480 μ l
Uracil-DNA Glycosylase	96 μ l
Nuclease-free Water	5 ml

*自备试剂：新鲜配制的 80%乙醇，DNA Beads，QKGEN® Indexed Adapter for MGI。

三、保存方法

-20℃保存一年。

四、文库构建原理示意图和流程图

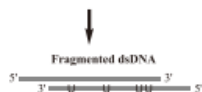
1. RNA片段化



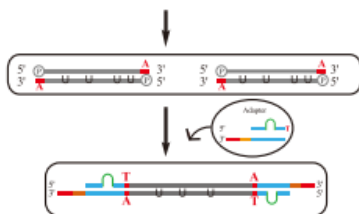
2. 一链合成



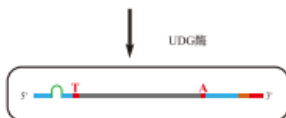
3. 二链合成、末端修复与加A



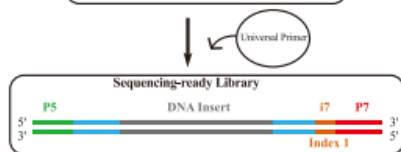
4. 接头连接



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)

第二部分 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。

Component	Volume
RNA	<12 μ l
4x RNA Fragmentation Buffer II	4 μ l
Nuclease-free Water	to 16 μ l

A. 起始样品要求：Total RNA 定量推荐使用基于特异识别 RNA 的荧光染料法，如 Qubit 等。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。

B. 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 4x RNA Fragmentation Buffer II 用 Nuclease-free Water 稀释到 1x，用 18 μ l 1x 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。

C. 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 200 μ l 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(热盖温度 105℃)：

RNA 片段化程序(插入片段 200 bp-350 bp)如下：

Temperature	Time
94℃	6 min
4℃	Hold

如果想获得其它长度的插入片段，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
150-200 bp	94℃	7-10 min
200-350 bp	94℃	4-6 min
≥ 350 bp	85℃	4-8 min

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

*针对含磁珠的片段化的操作，待样品温度降到 4℃后立即取出样品，置于磁力架 5 分钟，小心吸取 16 μl 上清至一新的 RNase-free PCR 管中，并立刻进行第一链 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

Component	Volume
Fragmented RNA	16 μl
Library First-Strand Buffer II	6 μl
Library First-Strand Enzyme Mix	3 μl
Total volume	25 μl

(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：

Temperature	Time
25℃	10 min

42°C	15 min
70°C	10 min
4°C	Hold

反应完成后取出样品并置于冰上，建议立刻进行下步操作。

3、cDNA 第二链合成、末端修复与加 A 反应

(1) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上，依次加入

Component	链特异性文库	非链特异性文库
First-Strand Product	25 µl	25 µl
Library SEA Buffer II (+dUTP)	25 µl	-
Library SEA Buffer II	-	25 µl
Library SEA Enzyme Mix	10 µl	10 µl
Total volume	60 µl	60 µl

(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 $\geq 80^{\circ}\text{C}$)，第二链合成程序如下：

Temperature	Time
16°C	30 min
68°C	15 min
4°C	Hold

4、接头连接

(1) 冰上溶化 QKGEN® Indexed Adapter for MGI，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
1 µg-5 µg	稀释 5 倍
200 ng-999 ng	稀释 10 倍
50 ng-199 ng	稀释 25 倍

*Adapter 的质量和用量直接影响建库的效率和质量。建议使用 QKGEN 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

Component	Volume
上步反应产物	60 µl
合适浓度的 Adapter	5 µl
Adapter Ligation Buffer II	30 µl
Adapter Ligation Enzyme	5 µl
Total volume	100 µl

(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 仪中，20℃ 孵育 20 分钟。连接产物可立即进行纯化，或于 -20℃ 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) 从 2-8℃取出磁珠，室温静置 30 分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取 40 μl (0.4x)或 80 μl (0.8×) 的纯化磁珠加入上步产物中。

(3) 移液器吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。弃上清。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

(5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入 200 μl 新鲜配制的 80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒。弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(6) 重复步骤(5)一次。

(7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(8) 将反应管移出磁力架，加入 21 μl Library Elution Buffer。移液器吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 2 分钟。

(9) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 2 分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至 5 分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(10) 小心吸取 19 μ l 或 20 μ l 洗脱液转移到干净 PCR 管中, 进行下步文库扩增反应, 或于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意: 低浓度 DNA 不稳定, 建议立即进行文库扩增, 不建议 -20 $^{\circ}$ C 保存。

6、文库扩增

(1) 将无菌 PCR 管放在冰上, 依次加入

Component	链特异性文库	非链特异性文库
上步纯化产物	19 μ l	20 μ l
Uracil-DNA Glycosylase	1 μ l	-
Library Amplification SuperMix	25 μ l	25 μ l
Universal Primer for MGI	5 μ l	5 μ l
Total volume	50 μ l	50 μ l

(2) 移液器吹吸混匀, 点甩离心收集管壁上的液体。

(3) PCR 仪中进行以下扩增程序(热盖温度 105 $^{\circ}$ C)

50 $^{\circ}$ C	5 min*	
98 $^{\circ}$ C	3 min	
98 $^{\circ}$ C	30 sec	} 11-17 cycles**
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	3 min	
4 $^{\circ}$ C	Hold	

*针对链特异性文库, 先 50 $^{\circ}$ C 孵育后扩增; 针对非链特异性文库, 无需孵育直接扩增。

**针对不同的 RNA 起始样品量, 扩增循环数如下表:

Total RNA 起始量	Cycles
1 µg-5 µg	11-12
200 ng- 999 ng	13-14
50 ng-199 ng	15

7、文库扩增产物纯化

使用 0.9x 磁珠纯化的具体操作如下：

- (1) 从 2-8℃取出磁珠，室温静置 30 分钟后备用。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取 45 µl 磁珠(0.9x)加入上步产物中。
- (3) 移液器吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

- (4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会 影响最终产量。

- (5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入 200 µl 新鲜配制的 80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒，弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

- (6) 重复步骤(5)一次。
- (7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

- (8) 将反应管移出磁力架，加入 22 µl Library Elution Buffer*。移液

器吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 2 分钟。

(9) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 2 分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至 5 分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(10) 小心吸取 20 μ l 洗脱液转移到干净 1.5 ml 离心管中，产物可于 20℃ 保存。

*若纯化后需要进行片段分选 洗脱时推荐使用 105 μ l Library Elution Buffer 转移 100 μ l 洗脱产物至干净 1.5 ml 离心管中，再进行片段分选。

8、分选(可选)

根据表 2 的分选条件，以文库长度 470 bp 的分选条件为例进行分选。

(1) 从 2-8℃ 出磁珠，室温静置 30 分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取 64 μ l 磁珠(0.64x)到 1.5 ml 离心管中，将上步产物用 Nuclease-free Water 稀释至 100 μ l 后加入。

(3) 移液枪吹吸混匀，室温静置 10 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(4) 将离心管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，取上清到新的 1.5 ml 离心管中，弃磁珠。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终的分选效果。

(5) 在上清中重新加入 10 μl 磁珠(0.1x)。

(6) 吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(7) 将离心管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

(8) 保持离心管在磁力架上，向管中加入 200 μl 新鲜配制的 80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒，弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(9) 重复步骤(8)一次。

(10) 保持离心管在磁力架上，室温晾干磁珠。

注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(11) 将离心管移出磁力架，加入 21 μl Library Elution Buffer。吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置 2 分钟。

(12) 将离管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 2 分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至 5 分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(13) 小心吸取 20 μl 洗脱液转移到干净 PCR 管中，置于冰上进行下一步的文库质检，或于-20℃保存。

表 2 片段分选参照表

文库平均长度(bp)		~320	~470	~670
文库插入片段长度(bp)		~200	~350	~550
文库扩增产物 纯化后进行分选	第一次体积比(DNA Beads: DNA)	0.75x	0.64x	0.54x
	第二次体积比(DNA Beads: DNA)	0.20x	0.1x	0.12x

9、文库质检和定量

(1) 建议用 Agilent 2100 Bioanalyzer 评价文库质量，片段化合适的文库主峰应在 350-470 bp 之间。

(2) 浓度检测：推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或引领基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测。