

QKGEN® TN RNA-seq Library Prep Kit

(for illumina)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

目录

一、产品简介：.....	2
二、产品组分：.....	2
三、保存方法：.....	2
四、注意事项：.....	2
1. 适用范围.....	2
2. 自备材料.....	2
五、文库构建原理.....	3
六、操作流程：.....	4
1. 一链 cDNA 合成.....	4
2. 片段化反应.....	4
3. 终止反应.....	5
4. 转新管.....	5
5. PCR 扩增.....	5
6. PCR 扩增产物纯化.....	6
7. 文库质检.....	7
附录 片段筛选操作步骤.....	8

一、产品简介：

本试剂盒是基于新型转座酶体系的 RNA 文库构建试剂盒，适用于 Illumina 测序平台。一链 cDNA 合成后，采用新型的转座酶进行 RNA/DNA 杂合链的片段化、加接头操作，取代了常规 RNA 文库构建过程中二链 cDNA 合成、片段化、末端修复加 A 以及接头连接的步骤，PCR 扩增纯化后即可完成文库构建，极大简化操作流程以及缩短文库构建时间，单个文库构建时间不超过 120 min。而且，在 1~50 ng 样本投入量范围内，不必考虑模板的投入量，优化的试剂盒体系可以满足仅使用同一套试剂、同一种流程，即可完成文库构建的需求，保证了文库构建的高效性和稳定性。

二、产品组分：

	组分	QRN0096 (96RXN)
一链 cDNA 合成	RT Enzyme Mix	192 μ L
	RT Reaction Buffer	768 μ L
一链 cDNA 片段化	Transposome	96 μ L
	5 \times Tnp Buffer	384 μ L
	10 \times Digestion buffer	240 μ L
PCR 扩增	5 \times High-Fidelity buffer	960 μ L
	High-Fidelity DNA polymerase	144 μ L
	10mM dNTP Mix	240 μ L
	PCR Primer Mix	192 μ L

三、保存方法：

-30 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存； \leq 0 $^{\circ}$ C 运输；

四、注意事项：

1. 适用范围

1~50ng 的纯化 RNA 样品。

2. 自备材料

接头试剂盒 QKGEN[®] NGS Tn5 Index Primers Kit for Illumina

纯化试剂盒 Beckman 的 Agencourt AMPure XP reagent 或齐凯基因磁珠分选试剂
磁力架

无水乙醇

无核酸酶水/ddH₂O

EP 管和 PCR 管 (DNase/RNase free)

各规格移液器、各规格枪头
PCR 仪
Qubit dsDNA HS 分析试剂盒

五、文库构建原理

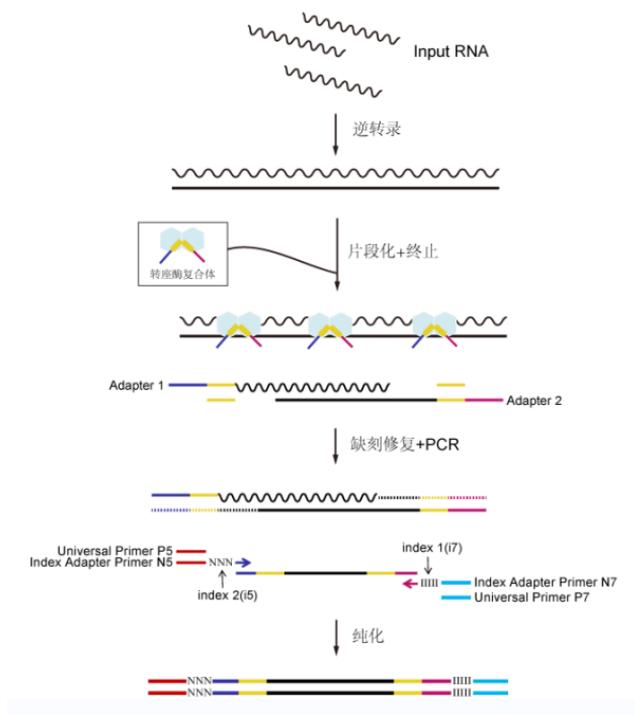


图 1. QGEN[®]转座酶法快速 RNA 文库构建原理

六、操作流程:

1. 一链 cDNA 合成

1) 按下表配制反应体系

表一 一链 cDNA 合成体系

组分	体积/反应
Total RNA/mRNA	1-50ng
RT Enzyme Mix	2 μ L
RT Reaction Buffer	8 μ L
无核酸酶水/ddH ₂ O	补至 20 μ L
总体积	20 μ L

2) 混合均匀后离心, PCR 仪上反应, 反应条件: 25 $^{\circ}$ C, 10 min; 50 $^{\circ}$ C, 15 min; 75 $^{\circ}$ C, 15 min; 4 $^{\circ}$ C, ∞

2. 片段化反应

1) 提前将 5 \times Tnp buffer、10 \times Digestion buffer 以及扩增所用试剂取出, 室温解冻, 轻微振荡混匀并短暂离心。

2) 取出新的 200 μ L PCR 管 (DNase/RNase free) 按照表二中配制反应体系 (冰盒上操作):

表二 片段化反应体系

组分	体积/反应
上一步反应产物	20 μ L
5 \times Tnp buffer	4 μ L
Transposome *	1 μ L
总体积	25 μ L

注: * Transposome 应始终置于冰上, 该用量下酶切产物主带的片段范围一般为 200-500bp, 若反应不理想, 扩增产物的片段过大或过小、甚至无目的条带等, 建议根据实际酶切效果适当调整 Transposome 的用量。

3) 轻柔振荡混合均匀, 瞬时离心, 立即将 PCR 管置于提前按照表三设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表三 片段化反应程序

温度	时间
85 $^{\circ}$ C	ON, 热盖
55 $^{\circ}$ C	10 min

4°C	Hold
-----	------

3. 终止反应

- 1) 以上反应结束后，在反应体系中加入 2.5 μL 的 10 \times Digestion buffer，涡旋振荡混匀，短暂离心。
- 2) 将 PCR 管置于 PCR 仪上进行如下的终止反应：

表四 终止反应程序

温度	时间
85 °C	ON, 热盖
55 °C	5 min
4°C	Hold

4. 转新管

将终止后的酶切产物转移至新的 PCR 管中进行下一步扩增（在酶切反应管中进行扩增会降低文库产量）。

5. PCR 扩增

- 1) 将已经解冻的 5 \times High-Fidelity buffer、High-Fidelity DNA polymerase、PCR Primer Mix、N5 XX 以及 N7 XX 轻柔振荡混匀并短暂离心。（N5 XX 以及 N7 XX 在 QKGEN[®] NGS Tn5 Index Primers Kit for Illumina 试剂盒中提供）
- 2) 于冰盒上，按照表五配制 PCR 扩增反应体系：

表五 PCR 扩增反应体系

组分	体积/反应
1~50ng 终止后的 DNA 片段化产物	27.5 μL
5 \times High-Fidelity buffer	10 μL
High-Fidelity DNA polymerase	1.5 μL
10mM dNTP Mix	2.5 μL
PCR Primer Mix (10 μM each)	2 μL
N5XX (10 μM) *	2.5 μL
N7XX (10 μM) *	2.5 μL
无核酸酶水/ddH ₂ O	1.5 μL
总体积	50 μL

注：* 每个样本加入不同的N5XX和N7XX，具体引物及index序列及组合方案详见转座酶法接头试剂盒（QKGEN[®] NGS Tn5 Index Primers Kit for Illumina）的说明书中。

- 3) 轻柔振荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表六设置好程序的 PCR 仪

上进行反应。

表六 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
105 °C	ON, 热盖	/
72 °C	3 min	1
98 °C	30 s	1
98 °C	15 s	12 *
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	
4 °C	hold	1

注：* 在不考虑样本投入量（1-50ng），统一扩增循环数时，建议选择12个循环扩增。但应注意的是：循环数应根据模板输入量而定，输入量越低，则循环数应越高以保证文库产量，但同时测序数据中 duplication 也会增加，一般建议对样本DNA进行定量并按照下表进行扩增循环数设置，也可以根据实际需要进行调整：

DNA 模板投入量 (ng)	循环数
40~50	7~8
30~40	8~9
20~30	9~10
10~20	10~12
1~10	12~14

6. PCR 扩增产物纯化

- 1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min，恢复室温后彻底振荡混匀。
 - 2) 向 50 μ L 扩增产物中加入 1 倍体积（50 μ L）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 2 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 200 μ L 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，加入 26 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 25 μ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中。
- 注：如产物需进行片段筛选，可参考附录一的片段筛选操作步骤进行。片段筛选也可以选择胶回收等方法

法进行, 可获得片段大小分布更为集中的 DNA 文库产物。

7. 文库质检

1) 文库浓度测定

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) 文库片段大小分布测定

推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或者 Qseq-100 生物片段分析仪对构建好的文库进行片段大小分布检测。

附录 片段筛选操作步骤

- 1) 提前 30min 取出纯化磁珠室温平衡，恢复室温后彻底振荡混匀。
- 2) 向 50 μL 扩增产物中加入 50 μL 的无核酸酶水，使体积补足至 100 μL 。
- 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。

表七 DNA 文库不同片段大小的推荐磁珠用量

文库总长度分布范围	250-350bp	350-450bp	450-550bp
文库平均插入长度	约 130bp	约 230	约 330
第一轮加入磁珠体积倍数	0.8 \times	0.7 \times	0.6 \times
第二轮加入磁珠体积倍数	0.2 \times	0.2 \times	0.2 \times

注意：分选磁珠体积均为 DNA 样品体积的倍数，如样品体积为 100 μL ，第一轮分选磁珠为 0.8X，即 80 μL ，第二轮分选磁珠为 0.2X，即 20 μL 。

- 4) 孵育完成后，将离心管置于磁力架上静置 2min，待溶液变澄清，小心转移上清液至新的离心管，去掉磁珠。
- 5) 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。
- 6) 孵育完成后，将离心管置于磁力架上静置 2min，待溶液变澄清，小心去掉上清液，保留磁珠。
- 7) 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。
- 8) 重复步骤 7) 一次。
- 9) 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）
- 10) 将离心管从磁力架上取下，加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 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 上清液至新的 1.5mL 离心管中。