

QKGEN® DNA-RNA 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

本产品是一款基于片段化酶酶切打断的 DNA/RNA 共建库试剂盒。试剂盒的建库流程包括 RNA 逆转录、双链 cDNA 合成、双链 cDNA 片段化、末端修复和 dA-Tailing、接头连接和 PCR 扩增等步骤。本试剂盒使用片段化酶对双链 cDNA 进行片段化，并且 DNA 片段化、末端修复和 dA-Tailing 合并为一步完成，流程简单，整个过程大概需要 3-3.5 小时。

本试剂盒具有较高的检测灵敏度，较低的背景菌污染，适用于 mNGS 检测 RNA 样本，其他 RNA 样本及较为复杂的样本建库。

试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，且每一批次的试剂盒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稳定。

二、 产品组分

组分名称	QDR0096 (96rxn)
5X First Strand Buffer	384 μ L
RT Reagent	192 μ L
Radom Primers (N6)	192 μ L
1st Enzymes	192 μ L
Second Strand & dA Buffer	768 μ L
2nd Enzymes	384 μ L
FS Enzymes	192 μ L
Endprep Enzyme Mix	288 μ L
Ligation Buffer	1584 μ L
Ligase Mix	288 μ L
2X PCR Mix	1.2 mL x 2

三、 保存方法

-30 ~ -15 $^{\circ}$ C 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, Qubit 荧光定量仪, 接头试剂盒 QKGEN® NGS UDI primers Kit (for illumina) 等。

五、 注意事项

1. 请使用 RNase-free 的 PCR 管。
2. 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) 中提供。
3. 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 离心管中配制 Mix, 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。
4. 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。

六、 实验流程



七、文库构建步骤

(1) First strand cDNA 合成

(1.1) 取出 5X First Strand Buffer、RT Reagent 和 Radom Primers (N6)冰上融解，冰上配制如下体系：

组分	体积
DNA/RNA (1~300ng)	28 μ L
5X First Strand Buffer	4 μ L
RT Reagent	2 μ L
Radom Primers (N6)	2 μ L
1st Enzymes	2 μ L
总体积	38 μ L

注1：推荐样本核酸投入量 50ng 及以上，如投入量为 1-50ng，文库纯化步骤需要进行 (0.6+0.2) 倍数的片段分选。

注2：除 DNA/RNA 样本外其他组分可以提前配制预混 Mix，按照 1.2 倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够。

(1.2) 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪运行如下程序（**热盖温度 105°C**）：

温度	时间
25 °C	5 min
42 °C	20 min
85 °C	5 min
4 °C	Hold

(2) Second strand cDNA 合成

(2.1) 将 Second Strand & dA Buffer、2nd Enzymes 从冰箱中取出冰上融解，并按照下表体系依次加入各试剂：

组分	体积
1st cDNA	38 μ L
Second Strand & dA Buffer	8 μ L
2nd Enzymes	4 μ L
总体积	50 μ L

注：Second Strand & dA Buffer、2nd Enzymes 可以提前配制预混 Mix，按照 1.2 倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够。

(2.2) 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将样本置于 PCR 仪运行如下程序（**热盖温度关闭**）：

温度	时间
20 °C	30 min
72 °C	5 min
4 °C	Hold

(3) 双链 cDNA 打断、末端修复和 dA Tailing

(3.1) 将 FS Enzymes 和 Endprep Enzyme Mix 从冰箱中取出置于冰上，并按照下表体系依次加入各试剂：

组分	体积
双链 cDNA	50 μ L
FS Enzymes	2 μ L
Endprep Enzyme Mix	3 μ L
Nuclease-Free Water	5 μ L
总体积	60 μ L

注：FS Enzymes、Endprep Enzyme Mix 和 Nuclease-Free Water 可以提前配制预混 Mix，按照 1.2 倍样本数进行配制，避免因损耗而致体积不够。

(3.2) 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将样本置于 PCR 仪运行如下程序（**热盖温度设置为 75°C**）：

温度	时间
32 °C	30 min
65 °C	15 min
4 °C	Hold

(4) 接头连接

(4.1) 将 Ligation Buffer、Ligase Mix 和 Adapter 取出冰上融解，在冰上配制接头连接体系：

组分	体积
双链 cDNA	60 μ L
Ligation Buffer	16.5 μ L
Adapter	2.5 μ L
Ligase Mix	3 μ L
总体积	\approx 80 μ L

注 1: 在配连接体系时, 可将 Ligation Buffer 和 Ligase Mix 提前配制预混 Mix, 按照 1.2 倍样本数进行配制, 避免因损耗而致体积不够。

注 2: Adapter 不要配制预混 Mix, 以免产生接头二聚体影响连接效率。

(4.2) 吹打混匀, 瞬时离心, 将样本置于 PCR 仪上进行连接反应 (热盖温度关闭):

温度	时间
22 °C	15 min
4 °C	Hold

(5) 连接产物纯化

(5.1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。

(5.2) 在连接产物中加入 64 μ L (0.8 \times) 的纯化磁珠, 用移液器轻柔吹打混匀, 室温静置孵育 5 min。

(5.3) 孵育完成后, 将 PCR 管置于磁力架上, 室温静置 5 min, 直至溶液完全变澄清。

(5.4) 小心吸弃上清液, 保留磁珠。

(5.5) 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。

(5.6) 重复步骤 (5.5) 一次。

(5.7) 短暂离心后将 PCR 管放回至磁力架, 用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

(5.8) 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)

(5.9) 加入 22 μ L Nuclease-Free Water, 吹打混匀, 室温静置 2 min。

(5.10) 将 PCR 管置于磁力架上, 静置 5 min 或直到溶液变澄清, 小心吸取 20 μ L 上清至另一全新的 PCR 管中备用。

(6) 文库扩增

(6.1) 配制文库扩增体系

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
2X PCR Mix	25 μ L
UDI primer XXX*	5 μ L
总体积	50 μ L

*注: 每个样本加入不同的 UDI primer XXX, 该引物在 QKGEN® NGS UDI primers Kit (for illumina) 中提供。

(6.2) 枪头吹打混匀，瞬时离心，将样本置于 PCR 仪中按照如下程序进行 PCR 扩增（热盖温度 105°C）：

温度	时间	循环数
98 °C	45 s	1
98 °C	10 s	7-15 cycles
60 °C	15 s	
72 °C	30 s	
72 °C	1 min	1
°C	Hold	

(6.3) PCR 循环数推荐

样本类型	样本投入量	PCR 循环数
DNA/RNA 样本	1-10 ng	11-13 cycles
DNA/RNA 样本	10-50 ng	10-11 cycles
DNA/RNA 样本	100-300 ng	7-9 cycles

注 1: 低于 1 ng 样本投入，需要提高循环数 2-4 cycles。

注 2: 由于不同样本质量和降解程度的差异，可按照实际情况适当调整循环数。

(7) PCR 产物纯化

(7.1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。

(7.2) 在 PCR 产物中加入 40 μ L (0.8 \times) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。

(7.3) 孵育完成后，将 PCR 管置于磁力架上，室温静置 5 min，直至溶液完全变澄清。

(7.4) 小心吸弃上清液，保留磁珠。

(7.5) 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。

(7.6) 重复步骤（7.5）一次。

(7.7) 短暂离心后将 PCR 管放回至磁力架，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

(7.8) 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）

(7.9) 加入 31 μ L Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温静置 2 min。

(7.10) 将 PCR 管置于磁力架上，静置 5 min 或直到溶液变澄清，小心吸取 30 μ L 文库至另一新的离心管中，留存备用。

(8) 可选：PCR 产物片段分选

-
- (8.1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
 - (8.2) 将 PCR 产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 50 μ L Nuclease-Free Water 以及 60 μ L (0.6 \times) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 10 min。
 - (8.3) 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。
 - (8.4) 小心将上清液转移到新的离心管中，丢弃磁珠。
 - (8.5) 向上清液中加入 20 μ L (0.2 \times) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
 - (8.6) 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。
 - (8.7) 小心吸弃上清液，保留磁珠。
 - (8.8) 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。
 - (8.9) 重复步骤（8.8）一次。
 - (8.10) 短暂离心后将离心管放回至磁力架，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。
 - (8.11) 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）
 - (8.12) 加入 21 μ L Nuclease-Free Water，吹打混匀，室温静置 2 min。
 - (8.13) 将离心管置于磁力架上，静置 5 min 或直到溶液变澄清，小心吸取 20 μ L 文库至另一新的离心管中，留存备用。

(9) 文库质控

- (9.1) 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。
- (9.2) 片段分布检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段长度分布检测。