

QKGEN® ES RNA-seq Library Prep Kit

(for Illumina)

使用说明书 (V2.0)

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、产品规格

组分	每反应体积	QRL0096 (96T)
RNA Frag Buffer	18 μ L	2 \times 900 μ L
1st-Strand Buffer	7 μ L	672 μ L
1st-Strand Enzyme Mix	2 μ L	192 μ L
SEA Buffer(dUTP)	25 μ L	4 \times 600 μ L
SEA Buffer(dNTP)	25 μ L	4 \times 600 μ L
SEA Enzyme Mix	15 μ L	2 \times 720 μ L
Dilution Buffer	-	5 mL
Ligation Buffer	25 μ L	4 \times 600 μ L
DNA Ligase	5 μ L	480 μ L
2 \times PCR SuperMix	25 μ L	4 \times 600 μ L
RNase-free Water	2 mL	3 \times 5 mL

三、保存方法

-30 ~ -15 $^{\circ}$ C 保存；干冰运输。有效期 1 年。

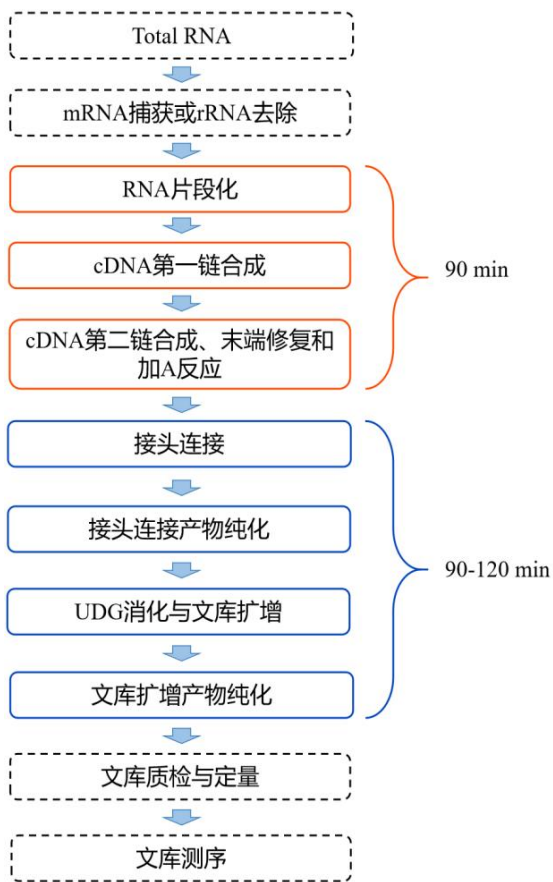
四、自备材料

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

五、注意事项

1. 起始材料要求：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（推荐使用 QKGEN® mRNA Capture Beads，货号：QMR0096）或者使用 RIN 值 >7 的 Total RNA 进行 rRNA Depletion（推荐使用 QKGEN® rRNA Depletion Kit (Bacteria)，货号：QRR0096；QKGEN® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat)，货号：QRR1096；QKGEN® rRNA Depletion Kit (Plant)，货号：QRR2096）。
2. 请使用 RNase-free 的 PCR 管。
3. 本试剂盒不提供含 Index 的 Primer 或 Adapter，在 QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina（货号：QJI1096）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。

六、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。

七、实验流程

1. RNA 片段化

- (1) 在 mRNA 捕获或 rRNA 去除后, 将 18 μ L RNA Frag Buffer 加到去上清的磁珠富集产物内, 涡旋混匀:

*mRNA 经捕获在洗脱时或者 Total RNA 经 rRNA Depletion 处理后纯化洗脱时, 直接用 18 μ L RNA Frag Buffer 来洗脱 RNA, 然后使用步骤 (2) 中的片段化程序进行片段化。

- (2) 将反应管置于 PCR 仪中, 进行以下 RNA 片段化程序(热盖温度 105 $^{\circ}$ C), 最终得到 250-450 bp 的插入片段:

温度	时间
85 $^{\circ}$ C	6 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

如果想获得其他长度的插入片段, 片段化条件如下表:

插入片段长度	温度	时间
150-250bp	94 $^{\circ}$ C	8 min
450-550bp	85 $^{\circ}$ C	5 min

- (3) 样品温度降至 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 后立即取出样品, 置于磁力架 5 分钟, 小心吸取 16 μ L 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, 依次加入以下体系:

组分	体积
片段化 RNA	16 μ L
1st-Strand Buffer	7 μ L
1st-Strand Enzyme Mix	2 μ L
总体积	25 μ L

(2) 移液器吹吸混匀数次，瞬时离心。

(3) 将反应管置于 PCR 仪中，进行以下第一链合成程序（热盖温度 $\geq 85^{\circ}\text{C}$ ）：

温度	时间
25 $^{\circ}\text{C}$	10 min
42 $^{\circ}\text{C}$	15 min
70 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	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，依次加入以下体系：

组分	链特异性文库	非链特异性文库
一链合成产物	25 μL	25 μL
SEA Buffer(dUTP)	25 μL	-
SEA Buffer(dNTP)	-	25 μL
SEA Enzyme Mix	15 μL	15 μL
总体积	65 μL	65 μL

(2) 移液器吹吸混匀数次，瞬时离心。

(3) 将反应管置于 PCR 仪上，进行以下第二链合成程序（热盖温度 $\geq 85^{\circ}\text{C}$ ）：

温度	时间
16 $^{\circ}\text{C}$	30 min
65 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

4. 接头连接

(1) 冰上溶化 I-adapter（在 QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina（货号：QJ11096）中提供），并参考下表准备合适浓度的 Adapter，使用 Dilution Buffer 进行稀释。

Total RNA 输入量	Adapter 稀释倍数
1 μg -5 μg	不稀释

200ng-999ng	稀释 3 倍
50ng-199ng	稀释 10 倍

(2) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上，依次加入以下体系：

组分	体积
上步反应产物	65 μ L
合适浓度的 Adapter	5 μ L
Ligation Buffer	25 μ L
DNA Ligase	5 μ L
总体积	100 μ L

*建议先将 Adapter 与上步反应产物混匀，再加入 Ligation Buffer 与 DNA Ligase 的混合液。不可先将 Adapter 与 Ligation Buffer、DNA Ligase 提前混成 mix，否则会影响连接效率。

(3) 移液器吹吸混匀数次，瞬时离心。

(4) 将反应管置于 PCR 仪上，20 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟（关闭热盖）。连接产物可立即进行纯化，或于-20 $^{\circ}$ C保存。

5. 接头连接产物纯化

(1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。

(2) 将 100 μ L 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 80 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。

(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，准备洗脱：

- a) 如产物无需进行片段分选，加入 21 μ L 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 μ L 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	体积
上步纯化产物	20 μL
2 \times PCR SuperMix	25 μL
UDI Primer XX*	5 μL
总体积	50 μL

* 每个样本加入不同的 UDI Primer，QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina（货号：QJI1096）试剂盒中提供多种含 index primer，请根据需要自行选择。

- (2) 移液器吹吸混匀，瞬时离心。
 (3) 将反应管置于 PCR 仪上进行以下扩增程序：

温度	时间	循环数
98°C	45 sec	1
98°C	15 sec	} 10-16**
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	3 min	1
4°C	∞	1

**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

- (1) 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
- (2) 将 100 μ L 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 45 μ L (0.9 \times) 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，准备洗脱：
 - a) 如产物无需进行片段分选，加入 21 μ L 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 μ L 至干净 1.5mL 离心管中；产物可于-20 $^{\circ}$ C 保存。
 - b) 如产物需进行片段分选，加入 101 μ L 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 μ L 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。

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 10min。

表 1 DNA 文库不同片段大小的推荐磁珠用量

长接头连接产物分选条件				
产物平均长度(bp)	~380	~430	~480	~530
插入片段长度(bp)	~250	~300	~350	~400
第一轮磁珠(DNA Beads:DNA)	0.70×	0.65×	0.60×	0.55×
第二轮磁珠(DNA Beads:DNA)	0.15×	0.15×	0.15×	0.15×
短接头连接产物分选条件				
产物平均长度(bp)	~310	~360	~410	~460
插入片段长度(bp)	~250	~300	~350	~400
第一轮磁珠(DNA Beads:DNA)	0.75×	0.70×	0.65×	0.60×
第二轮磁珠(DNA Beads:DNA)	0.15×	0.15×	0.15×	0.15×

注意：实验流程中推荐的 QKGEN® NGS UDI Primers Kit for Illumina（货号：QJII096）为短接头试剂盒。

4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2min，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。