

# **QKGEN® TN RNA-seq Library Prep**

## **Kit for illumina**

使用说明书 V3.0

本产品仅供科研用途

---

## 目 录

一、产品简介 .....	1
二、产品组分 .....	1
三、 自备材料 .....	1
四、文库构建原理 .....	2
五、操作流程 .....	3
(一) 核酸制备 .....	3
(二) 文库构建 .....	3
(三) 文库纯化 .....	4
(四) 文库质检 .....	5
附录 片段筛选操作步骤 .....	6

## 一、产品简介

本试剂盒是专为病原微生物宏基因组测序设计开发的文库构建试剂盒，适用于 Illumina Nextera 测序平台，可进行 DNA/RNA 共建库。本产品包含核酸制备和文库构建所有的试剂，可搭配自动化仪器使用，可实现输入样本 DNA/RNA，直接获得可上机文库的自动化流程。本产品能在 2-2.5 小时内快速完成反转录及文库构建。本试剂盒所有产品均经过严格的质量把控，保证了产品的性能以及批次间的稳定性。

## 二、产品组分

组分名称	每反应体积	规格（96 人份）	保存温度
YT Mix A	2 $\mu$ L	192 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
YT Buffer A	4 $\mu$ L	384 $\mu$ L	
YT EnzMix	5 $\mu$ L	480 $\mu$ L	
YT AmpMix	25 $\mu$ L	2.5mL	
YT Primer Mix	1 $\mu$ L	96 $\mu$ L	
DNA Purification Beads	50 $\mu$ L	4.8mL	2-8 $^{\circ}$ C
YT Buffer B	1 $\mu$ L	96 $\mu$ L	

## 三、自备材料

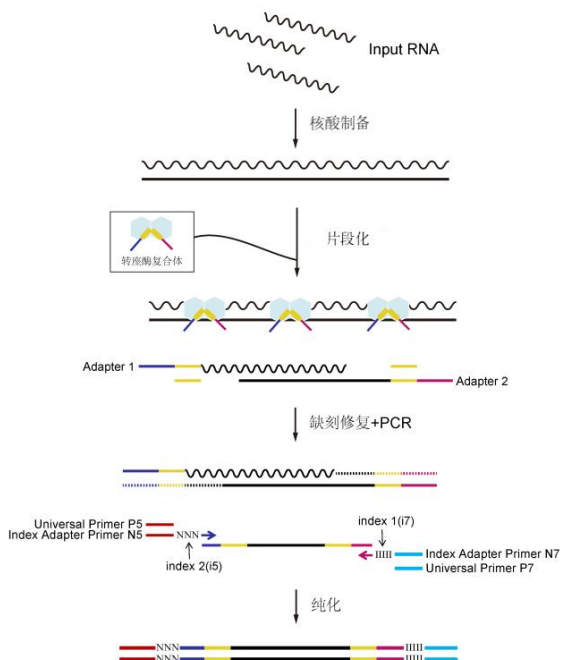
### 1.试剂耗材

名称	描述
无水乙醇	--
无核酸酶水	--
文库定量试剂 Qubit	ThermoFisher 的 Qubit dsDNA HS Assay Kit
文库片段分析试剂 2100	Agilent 的 High Sensitivity DNA Kit
转座酶法接头试剂盒	QKGEN <sup>®</sup> NGS Tn5 Index Primers Kit for Illumina
1.5mL 低吸附离心管	--
0.2mL PCR 管	--
各规格移液器及其吸头	--

## 2. 仪器设备

名称	描述
PCR 仪	--
Agilent 2100 或其他类似设备	也可使用 Qseq 100 生物分析仪
磁力架	--
掌上离心机	--
振荡器	--
Qubit 荧光计	Life
金属浴	--
计时器	--

## 四、文库构建原理



## 五、操作流程

### (一) 核酸制备

1. 反应液配置。根据下表配制核酸制备反应体系，然后混合均匀并瞬时离心：

组分	体积
YT Mix A	2 $\mu$ L
样本 RNA/DNA	8 $\mu$ L
总体积	10 $\mu$ L

2. 核酸制备反应。根据下表反应条件进行核酸制备反应：

温度	时间
25°C	2 min
55°C	10 min
95°C	1 min
10°C	$\infty$

### (二) 文库构建

1. 核酸片段化。提前将 YT Buffer A、YT Buffer B、YT Primer Mix、N5XX、N7XX 置于室温解冻，将 YT EnzMix、YT AmpMix 放置于冰盒上备用，使用前充分混匀。

按照下表配置片段化体系：

试剂	体积
YT Buffer A	4 $\mu$ L
YT EnzMix	5 $\mu$ L
YT Buffer B	1 $\mu$ L
上一步反应产物	10 $\mu$ L
总计	20 $\mu$ L

2. 片段化反应：

温度	时间
105°C	热盖
55°C	10 min

4°C	∞
-----	---

4. PCR 扩增。按以下体系配制文库扩增反应体系，混匀离心：

试剂	体积
YT AmpMix	25 $\mu$ L
YT Primer Mix	1 $\mu$ L
N5XX*	2 $\mu$ L
N7XX*	2 $\mu$ L
上一步反应产物	20 $\mu$ L
总计	50 $\mu$ L

**注：\*** 每个样本加入不同的 T5XX 和 T7XX。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。

5. 将反应管置于 PCR 仪上进行以下反应（热盖 105°C）：

步骤	温度	时间	循环数
1	72°C	3 min	-
2	98°C	45 s	-
3	98°C	10 s	13-15
	60°C	30 s	
	72°C	30 s	
4	72°C	3 min	-
5	4°C	HOLD	-

### (三) 文库纯化

- 提前取出 DNA Purification Beads 室温平衡 30 min，恢复室温后彻底振荡混匀。
- 向 50  $\mu$ L 扩增产物中加入 1 倍体积（50  $\mu$ L）的 DNA Purification Beads，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
- 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。
- 小心吸弃上清液，保留磁珠。

- 
5. 加入 200 $\mu$ 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 22  $\mu$ 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 20  $\mu$ L 上清液至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化好的文库。

*注：如产物需进行片段筛选，可参考附录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进行，可获得片段大小分布更为集中的 DNA 文库产物。*

#### **(四) 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。文库片段主峰约在 250-500 bp 之间。

## 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  $\mu\text{L}$  扩增产物中加入 50  $\mu\text{L}$  的无核酸酶水，使体积补足至 100 $\mu\text{L}$ 。
- 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。

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 $\mu\text{L}$ ，第一轮分选磁珠为 0.8X，即 80 $\mu\text{L}$ ，第二轮分选磁珠为 0.2X，即 20 $\mu\text{L}$ 。

- 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 $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 20  $\mu\text{L}$  上清液至新的 1.5mL 离心管中。