



津灵微量 RNA NGS 建库试剂

产品简介

OxSens Ultra-low RNA NGS Library Prep Kit 基于 Illumina 和 MGI 的 total RNA (0.25-10 ng) 测序文库构建试剂盒, 包含 RNA 片段化试剂, 反转录试剂, ds-cDNA 合成试剂, rRNA 去除试剂以及文库扩增试剂。本试剂盒提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证, 最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

产品信息

货号	TR 300F
规格	6 T

组分信息

组分编号	组分名称	体积
TR 301	DNase I (RNase-free)	1 × 6 μL
TR 302	DNase I Buffer (10x)	1 × 6 μL
TR 303	EDTA (10x)	1 × 6 μL
TR 304	4xFragment Buffer	4 × 6 μL
TR 305	1st Reaction Mix	8 × 6 μL
TR 306	2nd Reaction Mix	35 × 6 μL
TR 307	ERAL Mix	35 × 6 μL
TR 308	Adapter (Illumina/MGI)	5 × 6 μL
TR 309	3nd Reaction Mix	25 × 6 μL
TR 310	MR Buffer (10x)	1.2 × 6 μL
TR 311	MR Mix (20x)	2 × 6 μL
TR 312	MR enzyme	1 × 6 μL
TR 313~336	UDB-P001~UDB-P024	2 × 2 μL
TR 413~436	P1-1~P1-24	5 × 2 μL
TR 337	Nuclease-Free Water	1 mL
TR 337	Nuclease-Free Water	1 mL

储存条件

-25~-15 °C 保存, 有效期 1 年; TR311 保存在-80°C。



使用说明

实验前请仔细阅读:

一、关于接头连接 (Adapter Ligation)

1. 本试剂盒使用的接头为 Illumina 或者 MGI。
2. 使用接头时, 请提前将接头取出放在 4 °C 或冰盒上解冻; 在室温操作时, 实验室温度不应超过 25 °C, 防止接头解链。
3. 建库过程中, 接头浓度过高或过低都会导致建库成功率变低。本试剂盒所加接头体积固定为 5 μ L, 请根据参考表 1 对接头进行稀释。接头稀释液请选择 0.1 $\times$ TE buffer, 稀释过的接头可在 4 °C 保存 48 小时。

表 1-1 Input Total RNA 量与 Illumina 接头使用浓度推荐表

Input Total RNA	MGI Adapter stock concentration
< 1 ng	1 μ M
1-10 ng	2 μ M

表 1-2 Input Total RNA 量与 MGI 接头使用浓度推荐表

Input Total RNA	MGI Adapter stock concentration
< 1 ng	1 μ M
1-10 ng	2 μ M

*可根据不同类型 total RNA 样本及投入量, 按需求适当调整 Adapter 使用量

二、关于文库扩增 (Library Amplification)

1. 文库扩增循环数需进行严格控制。循环数不足, 将导致文库产量低; 循环数过多, 又将导致文库偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。可根据表 2 中 Input Total RNA 量与相应扩增循环数的推荐表进行设置。

2. 表 2 中推荐的循环数可满足绝大多数建库需求, 若样本浓度过低, 可根据实际情况适当增加循环数。

表 2 Input Total RNA 量与扩增循环数推荐表

Input Total RNA	Number of cycles
< 1 ng	18-25
1 ng	16
10 ng	15

三、DNA 磁珠纯化 (Bead-based Clean Up)

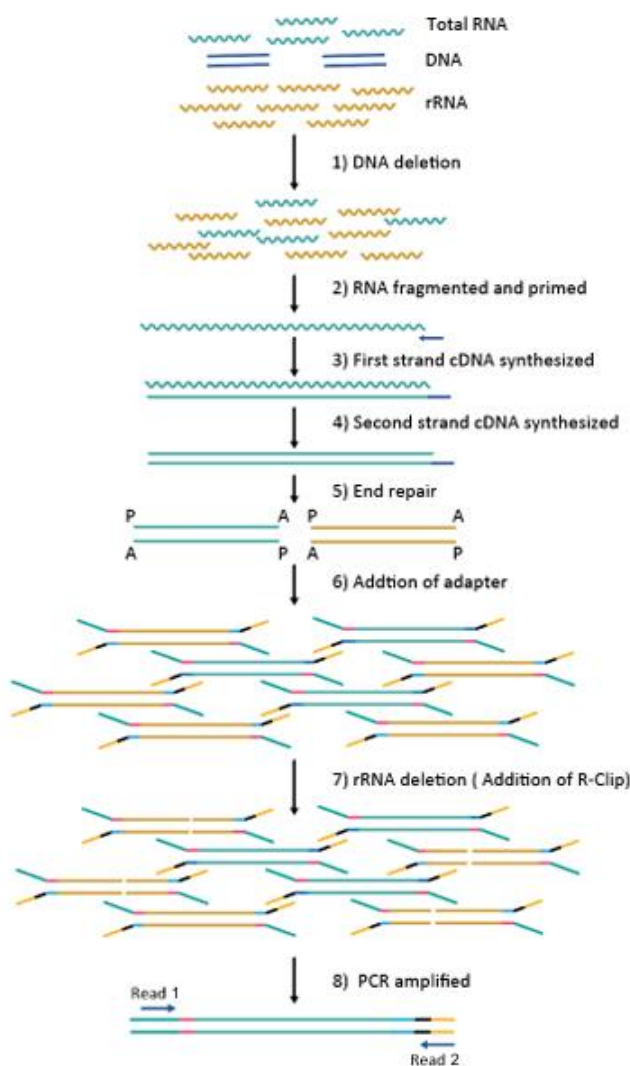
1. 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
2. 转移上清时, 请勿吸取磁珠, 磁珠残留将影响后续文库质量。
3. 纯化过程中使用的 80%乙醇应现用现配, 否则将影响回收效率。
4. 产物洗脱前的磁珠应置于室温干燥。无水乙醇的残留会影响后续反应; 但磁珠过分干燥, 出现开裂会降低纯化得率。通常情况下, 室温干燥 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。

5. DNA 纯化或长度分选产物如需保存, 可使用 $0.1 \times \text{TE Buffer}$ 洗脱, 产物于 4°C 可保存 2 天, -20°C 可保存 1 个月。

四、关于文库质检 (Library Quality Analysis)

1. 通常情况下, 构建好的文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。
2. 推荐文库浓度检测使用基于双链 DNA 荧光染料的方法, 如 Qubit[®]、PicoGreen[®]等或基于 qPCR 绝对定量的方法。
3. 文库长度分布检测, 推荐使用 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

五、建库流程图



其中, Read 1 为 RNA 序列。



六、RNA 文库构建

6.1 去除 DNA

(1)配置如下反应体系(10 μ L):			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
RNA	8 μ L		
DNase I (RNase-free)	1 μ L		
DNase I Buffer(10x)	1 μ L		
(2)混匀后瞬离, 将反应管置于 PCR 仪中,运行如下反应程序: 热盖关; 37 $^{\circ}$ C, 15 min. 4 $^{\circ}$ C, Hold。 (3) 反应终止后加入 1 μ L EDTA(10x)。 注意: 需增加一组 No-RT, 检测是否有 DNA 残留; 一组 NC, 检测是否存在环境污染。			

6.2 片段化

(1)配置如下反应体系(17 μ L):			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
上述反应	11 μ L		
4 $\times$ Fragment Buffer	4 μ L		
Nuclease-Free Water	2 μ L		
Total	17 μ L		
(2) 混匀后瞬离, 将反应管置于 PCR 仪中,运行如下反应程序: 105 $^{\circ}$ C, 热盖; 94 $^{\circ}$ C, 5 min;4 $^{\circ}$ C, Hold。			

6.3 第一链 cDNA 的合成 (1st Strand Synthesis)

(1) 配置如下反应体系(25 μ L):			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
上述反应体系	17 μ L		
1st Reaction Mix	8 μ L		



(2) 混匀后瞬离, 将反应管置于 PCR 仪中,运行如下反应程序: 105 °C, 热盖; 25 °C, 10 min; 42 °C,15 min; 70 °C, 15 min; 4 °C, Hold。(安全停止点)

6.4 PCR 反应 1: 第二链 cDNA 的合成/末端修复/加 A

(1)PCR 反应 1 预混液, 配置如下反应体系(60 μ L):			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
1st Strand cDNA	25 μ L		
2nd Reaction Mix	35 μ L		
(2)使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。			
(3)将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 运行如下反应程序:105 °C, 热盖; 16 °C,30 min; 72 °C, 15 min; 4 °C, Hold。			

6.5.1 PCR 反应 2: 接头连接 (Illumina)

(1) PCR 反应 2 预混液, 配置如下反应体系(100 μ L):			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
dA-tailed DNA	60 μ L		
ERAL Mix	35 μ L		
DNA Adapter (Illumina)	5 μ L		
(2)使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬离将反应液离心至管底。			
(3)将上述 PCR 管置于 PCR 仪中, 运行如下反应程序: 关闭热盖; 20 °C,15 min; 4 °C, Hold。			

*本试剂盒原始接头浓度为 15 μ M, 请根据表 1-1 的提示, 根据投入量对接头进行稀释, 使接头添加体积固定为 5 μ L。

6.5.2 PCR 反应 2: 接头连接 (MGI)

(1) PCR 反应 2 预混液, 配置如下反应体系(100 μ L):

反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μL
dA-tailed DNA	60 μL		
ERAL Mix	35 μL		
DNA Adapter (MGI)	5 μL		
(2)使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。			
(3)将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下反应程序:关闭热盖; 20 $^{\circ}\text{C}$,15 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, Hold。			

*本试剂盒原始接头浓度为 10 μM ，请根据表 1-2 的提示，根据投入量对接头进行稀释，使接头添加体积固定为 5 μL 。

6.6 连接产物纯化以及 rRNA 去除

适用于插入片段 < 200 bp 的文库(需进行两轮纯化)

- (1)将 DNA Selection Beads 磁珠提前 30 min 从 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 取出，室温平衡至少 30 min。
- (2)涡旋振荡或上下颠倒，保证磁珠充分混匀。
- (3)吸取 60 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.6 $\times$ ，Beads:DNA= 0.6:1)至 Adapter Ligation 产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
- (4)将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- (5)将 PCR 管置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80 %乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- (6)重复步骤 5，总共漂洗两次。
- (7)保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂(不超过 5 min)。
- (8)将 PCR 管从磁力架中取出，加入 52 μL ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 3 min)，小心移取 50 μL 上清至新 PCR 管中，进行第二轮纯化。
- (9)吸取 40 μL DNA Selection Beads (0.8 $\times$ ，Beads : DNA = 0.8:1)至上一步产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
- (10)将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- (11)将 PCR 管放置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80 %乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- (12)重复步骤 11，总计漂洗两次。
- (13)将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- (14)将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μL MR，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后(约 3 min)，小心移取 20 μL 上清至新 PCR 管中。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时 72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。

MR 配置体系(20 μL):			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μL



MR Buffer (10x)	2 μ L		
MR Mix (20x)	0.4 μ L(1 uM)		
MR enzyme	1 μ L(0.4 uM)		
Nuclease-Free Water	To 20 μ L		
注意：根据样本类型，MR enzyme 可添加 1-10 uL			

6.7.1 PCR 反应 3: 文库扩增 (Illumina)

(1) 配置如下反应体系(50 μ L):短接头连接产物 PCR 反应体系			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
3nd Reaction Mix	25 μ L		
Primer Mix for Illumina	5 μ L		
Adapter Ligated DNA	20 μ L		
(2)使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。			
(3)将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下反应程序:105 $^{\circ}$ C，热盖；98 $^{\circ}$ C,1 min；(98 $^{\circ}$ C，10 sec；60 $^{\circ}$ C，30 sec；72 $^{\circ}$ C，30 sec)，22 cycles；72 $^{\circ}$ C，5 min；4 $^{\circ}$ C，Hold。(安全停止点)			

6.7.2 PCR 反应 3: 文库扩增 (MGI)

(1) 配置如下反应体系(50 μ L):短接头连接产物 PCR 反应体系			
反应试剂	单个样品使用量	个数	使用总量 μ L
3nd Reaction Mix	25 μ L		
Primer Mix for MGI	2 μ L		
Nuclease-Free Water	3 μ L		
Adapter Ligated DNA	20 μ L		
(2)使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。			
(3)将上述 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下反应程序:105 $^{\circ}$ C，热盖；98 $^{\circ}$ C,1 min；(98 $^{\circ}$ C，10 sec；60 $^{\circ}$ C，30 sec；72 $^{\circ}$ C，30 sec)，22 cycles；72 $^{\circ}$ C，5 min；4 $^{\circ}$ C，Hold。(安全停止点)			

注：根据使用不同产品接头，需配置不同扩增体系。文库扩增循环数需根据样本质量、投入量等建库条件进行调整。

6.8 PCR 扩增产物纯化

- (1)将 DNA Selection Beads 磁珠提前 30 min 从 2~8 °C 取出，室温平衡至少 30 min。
- (2)涡旋振荡或上下颠倒，保证磁珠充分混匀。
- (3)吸取 45 μ L DNA Selection Beads ($0.9\times$ ，Beads:DNA=0.8:1)至 PCR 扩增产物中，涡旋或吹打混匀，室温孵育 5 min。
- (4)将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- (5)保持 PCR 管处于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
- (6)重复步骤 5，总共漂洗两次。
- (7)将 PCR 管放置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠至刚刚出现龟裂(不超过 5 min)。
- (8)将 PCR 管从磁力架中取出，加入 21 μ L ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打至充分混匀，室温静置 5 min。将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后(约 3 min)，小心移取 20 μ L 上清至新 PCR 管中，进行定量，质检。

6.9 质控

- (1)推荐使用 Qubit 4.0 检测文库浓度；推荐使用 Agilent 2100 检测文库长度 (建议 1.5 ng/ μ L，定量范围 5-500 pg/ μ L)。
- (3)推荐使用标准品 Human Brain Total RNA (Takara, 636530)

7 同类试剂盒比较

下图为不同 rRNA 去除方法制备文库，文库插入片段分布。图中 A、B 为血浆样本；C、D 为 0.25 ng 标准品；E、F 为 1 ng 标准品；G、H 为 10 ng 标准品；津灵试剂盒中 mt-rRNA 含量(A、C、E、G)为 1.2%-24%；国外 T 公司产品 (B、D、F、H) 为 3.8%-30%。

