

## Small RNA Library Prep Kit

### AT4208-01/02/03 使用说明书

#### 方案简介

Small RNA Library Prep Kit 适用于构建 illumina 测序平台的 microRNA 文库，试剂盒操作简单，建库过程只需进行移液操作，无需纯化转管。极大的避免了操作带来的误差，构建的文库均一性高。

#### 试剂成分

| AT4208-02                  |       |       |       |       |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Small RNA 3 ADT            | 6 uL  | 24uL  | 96uL  | -20°C |
| Small RNA 5 ADT            | 6 uL  | 24uL  | 96uL  | -20°C |
| Glycogen                   | 15 uL | 60uL  | 240uL | -20°C |
| PAGE Elution Buffer        | 3mL   | 12mL  | 48mL  | 4°C   |
| Small RNA Ligase 1         | 3 uL  | 12uL  | 48uL  | -20°C |
| RNA Ligation Buffer 1      | 12 uL | 48uL  | 192uL | -20°C |
| Ligation Enhancer          | 15 uL | 60uL  | 240uL | -20°C |
| Small RNA Ligase 2         | 6 uL  | 24uL  | 96uL  | -20°C |
| RNA Ligation Buffer 2      | 9 uL  | 36uL  | 144uL | -20°C |
| Small RNA RT Primer        | 6 uL  | 24uL  | 96uL  | -20°C |
| Small RNA RT Buffer        | 50 uL | 200uL | 800uL | -20°C |
| Small RNA RT Enzyme        | 6 uL  | 24uL  | 96uL  | -20°C |
| RNase Inhibitor            | 12 uL | 48uL  | 192uL | -20°C |
| PCR Master Mix             | 75 uL | 300uL | 1.2mL | -20°C |
| Small RNA Universal Primer | 6 uL  | 24uL  | 96uL  | -20°C |

#### 注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 收到试剂盒后，请将 PAGE Elution Buffer 保存至 4°C。
3. 未保证连接效率，请尽量避免 Small RNA 3 ADT 和 Small RNA 5 ADT 的反复冻融，建议分装多管保存。
4. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
5. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行试验。
6. 请确保实验所用 RNA 样本质量较好，浓度在 250ng/uL 以上。
7. 文库割胶回收时，所有用具均需保持干净，防止样本之间的交叉污染。

#### 需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-free H<sub>2</sub>O；丙烯酰胺凝胶电泳试剂及耗材；20bp Marker (Takara, 3420A)；核酸染料；Spin-X Centrifuge Tube (Corning, 8162)；200uL PCR 管；500uL PCR 管；1.5mL 离心管；2mL 离心管；

## 实验原理图

### 操作步骤

#### 一，Small RNA 3 ADT 接头连接

在新的 PCR 管中配制如下反应体系：

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Total RNA (0.5~1μg)            | x uL      |
| Small RNA 3 ADT                | 1.0 uL    |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O | (4.0-x)uL |
| Total                          | 5.0 uL    |

充分混匀后，在 PCR 仪中 70℃变性 2min。反应结束后取出，**迅速放在冰上 2min**，立即进行下游操作。

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| RNA Ligation Buffer 1 | 1.8 uL |
| RNase Inhibitor       | 0.5 uL |
| Small RNA Ligase 1    | 0.5 uL |
| Total                 | 7.8 uL |

充分混匀后，**每个样本管再加入 2.2uL 的 Ligation Enhancer**，使用移液器充分混匀后，在 PCR 仪中 37°C 反应 1h。反应结束后取出，放在冰上，立即进行下游实验。

**注意：Ligation Enhancer 非常粘稠，需先将其他试剂加入样本管充分混匀，再加入 Ligation Enhancer 充分混匀。**

## 二，RT 引物结合

在上游反应的 PCR 管中，**加入 1uL 的 Small RNA RT Primer**，充分混匀后，在 PCR 仪中，进行如下反应：

| 温度   | 时间    |
|------|-------|
| 75°C | 5min  |
| 37°C | 30min |
| 25°C | 15min |

结束后取出，放在冰上，立即进行下游实验。

## 三，Small RNA 5 ADT 接头连接

在上游反应的 PCR 管中，加入以下反应体系：

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| RNA Ligation Buffer 2 | 1.4 uL  |
| RNase Inhibitor       | 0.5 uL  |
| Small RNA 5 ADT       | 1.0 uL  |
| Small RNA Ligase 2    | 1.0 uL  |
| Total                 | 14.9 uL |

充分混匀后，在 PCR 仪中 37°C 反应 1h。反应结束后取出，放在冰上，立即进行反转录实验。

在上游反应的 PCR 管中，加入以下反应体系：

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Small RNA RT Buffer | 8.0 uL  |
| RNase Inhibitor     | 1.0 uL  |
| Small RNA RT Enzyme | 1.0 uL  |
| Total               | 24.9 uL |

充分混匀后在 PCR 仪中，进行如下反应：

| 温度   | 时间     |
|------|--------|
| 50°C | 1 h    |
| 70°C | 15 min |

结束后取出，放在冰上，立即进行 PCR 扩增。如需暂停实验，可以把 RT 产物放在-20°C保存过夜。

## 五，PCR 扩增

在新的 PCR 管中，配制如下反应体系：

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| RT Product                     | 5.0 uL  |
| PCR Master Mix                 | 12.5 uL |
| Small RNA Universal Primer     | 1.0 uL  |
| Small RNA Primer Index N*      | 1.0 uL  |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O | 5.5 uL  |
| Total                          | 25.0 uL |

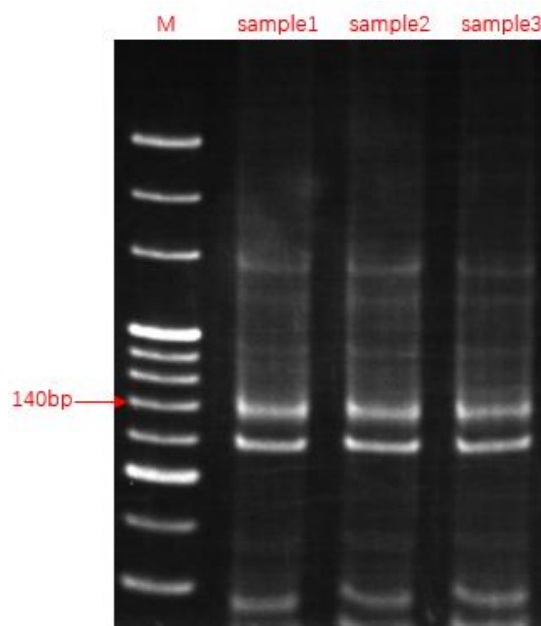
\* SmallRNA Library Index Kit 提供多种 index，可根据样本数量选购。

充分混匀后在 PCR 仪中，进行如下反应：

| 温度   | 时间   | 循环数        |
|------|------|------------|
| 98°C | 30s  | } 18Cycles |
| 98°C | 10s  |            |
| 60°C | 30s  |            |
| 72°C | 15s  |            |
| 72°C | 7min |            |
| 4°C  | ∞    |            |

结束后取出，用 6%的 PAGE 胶进行文库质检或置于-20°C保存。

取 2uL PCR 产物, 用 6%的 PAGE 胶, 200V 电泳 25min。使用核酸染料染色后观察, 建库成功则能在 140bp Marker 处看到清晰单一的条带, 如下图:



## 七, 文库割胶回收

- 1) 配置 6%的 PAGE 胶;
- 2) 待胶凝固后, 将固定架拆除, 胶板冲洗干净, 将胶板放入电泳槽中;
- 3) 将剩余的 PCR 产物和一定比例的 6×loading buffer 混合均匀;
- 4) 根据 PCR 产物质检情况, 在每个胶孔中加入 3 ~ 5uL 混合好的 PCR 产物;  
(注: 上样量太多会对割胶带来不便)
- 5) 取 3uL 20bp Marker, 电压 200V, 进行电泳;
- 6) 准备管底带孔的 500 uL PCR 管和与其配套的 2mL 离心管, 500 uL PCR 管置于 2mL 离心管里;
- 7) 电泳结束后, 取出凝胶, 放入新鲜配制含有核酸染料的 ddH<sub>2</sub>O 中染色 5min;
- 8) 染色结束后, 取出凝胶, 放入洁净的 ddH<sub>2</sub>O 中漂洗干净, 取出凝胶, 拍照;
- 9) 将样品中大小为 140bp 的条带切割回收, 放入预先准备好的 500 uL PCR 管中;
- 10) 13000 rpm, 离心 1 min 使 500 uL PCR 管内的凝胶过滤入 2mL 离心管内, 弃掉 500 uL PCR 管;
- 11) 加入 500 uL PAGE Elution Buffer, 混匀, 45°C 孵育 2 h, 孵育期间每隔 15min 摇匀一次;
- 12) 将凝胶和液体快速倒入 Spin-X Centrifuge Tube 的柱子中, 13000 rpm, 离心 3min, 当观察到液体全进入下方管子内时, 弃掉柱子;
- 13) 液体中加入 1400 uL 无水乙醇和 2 uL Glycogen, 混匀, -80°C 放置 30 min (或者 -20°C 放置过夜);
- 14) 4°C, 13000 rpm 离心 25 min, 倒去液体, 保留沉淀;
- 15) 加入 750 uL 预冷后的 75%乙醇, 4°C, 13000 rpm 离心 5 min, 去除液体, 保留沉淀;
- 16) 凉干沉淀后, 根据胶图情况, 加入 10 ~ 15uL Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 混匀、溶解沉淀, 文库可保存于 -20°C

文库质检分为两方面，定性检测和定量检测。

文库的定性检测，推荐使用凝胶电泳或者 Agilent 生物分析仪等方案对文库进行检测；文库的定量检测，推荐使用 Realtime PCR 对文库进行检测。

## 文库结构

Small RNA Library Prep Kit 的文库结构如下：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCTACAGTCCGACGATC-nnnnnnnnnn-TGG  
AATTCTCGGGTGCCAAGGAAGTCCAGTCACXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 index 序列