

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

AT4208-03				
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 H₂O；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 ₂ 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 ₂ O	5.5 uL
Total	25.0 uL

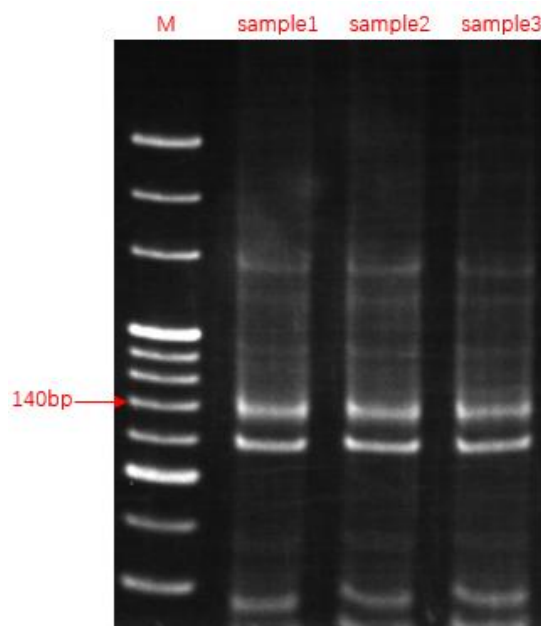
* SmallRNA Library Index Kit 提供多种 index，可根据样本数量选购。

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 ddH₂O 中染色 5min;
- 8) 染色结束后, 取出凝胶, 放入洁净的 ddH₂O 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 H₂O, 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