

U-mRNAseq Library Prep Kit

AT4221-01/02/03 使用说明书

产品简介

U-mRNAseq Library Prep Kit 是针对 illumina 测序平台开发的 mRNA 链特异性文库构建试剂盒。本试剂盒在二链合成时加入 dUTP，并在 PCR 扩增富集文库前将带 U 标记的二链模板用 UDG 酶消化，确保了最终的测序信息都来自于单链 cDNA，实现链特异性。文库构建经历 mRNA 分离、片段化、一链合成、二链合成、末端修复、接头连接以及 PCR 扩增等过程，仅需 7-8h 即可实现真核生物从 0.5ug-5ug 的 total RNA 中分离出 mRNA，并将其构建成高质量的 mRNA 文库。试剂盒操作简单，极大的避免了繁杂操作带来的误差，构建的文库均一性高。

试剂盒组成

		AT4221-02			
		(6 次)	(24 次)	(96 次)	保存温度
BOX1	Oligo d(T) Beads	300 uL	1.2 mL	4.8 mL	4°C
	Binding Buffer	300 uL	1.2 mL	4.8 mL	4°C
	Washing Buffer	2.4 mL	9.6 mL	38.4 mL	4°C
	Tris Buffer	300 uL	1.2 mL	4.8 mL	4°C
BOX2	Frag/Primer Buffer	30 uL	120 uL	480 uL	-20°C
	First Strand Buffer	36 uL	144 uL	576 uL	-20°C
	First Strand Enzyme	12 uL	48 uL	192 uL	-20°C
	Actinomycin D (2.5mg/ml)	6 uL	24 uL	96 uL	-20°C
	Second Strand Marking Buffer	135 uL	540 uL	2.16 mL	-20°C
	Second Strand Enzyme	15 uL	60 uL	240 uL	-20°C
	DNA Buffer 1	42 uL	168 uL	672 uL	-20°C
	DNA Enzyme 1	15 uL	60 uL	240 uL	-20°C
	DNA Buffer 2	162 uL	648 uL	2.6 mL	-20°C
	DNA Enzyme 2	6 uL	24 uL	96 uL	-20°C
	Universal ADT	12 uL	48 uL	192 uL	-20°C
	PCR Master Mix	150 uL	600 uL	2.4 mL	-20°C
	Heat-labile UDG	6 uL	24 uL	96 uL	-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. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
4. 建库所使用的 RNA 必须是纯化后质检合格的样本，否则会严重影响建库结果。
5. 实验所用磁珠应提前 30 分钟自 4°C 环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
6. 80%乙醇需现配现用，用其清洗磁珠后，需清除干净，避免对后续反应产生影响。

需自备试剂和耗材

实验原理图

操作步骤

一，mRNA 分离：

- 1) 预热 65°C 和 80°C 的水浴锅两个。
- 2) 取 RNA 样品 0.5-5ug 加入到一个 1.5mL 的离心管中，用 Nuclease-free H₂O 补至 50uL，放置冰上备用。

- 6) 将样品置于磁力架上 5min，待溶液清澈，小心移除上清。
- 7) 加入 200uL Washing Buffer，吹打混合均匀，在磁力架上放置 5min，待溶液清澈，小心移除上清。
- 8) 加入 50uL Tris Buffer，重悬磁珠，混合均匀。
- 9) 将样本放入 80°C 水浴锅，放置 2min，室温放置 5min，使 mRNA 洗脱下来。
- 10) 加入 50uL Binding Buffer，吹打混合均匀。
- 11) 室温放置 5min，使 mRNA 结合到磁珠上。
- 12) 将样品置于磁力架上 5min，待溶液清澈，小心移除上清。
- 13) 加入 200uL Washing Buffer，吹打混合均匀，在磁力架上放置 5min，待溶液清澈，小心移除上清。
- 14) 加入 12uL Nuclease-free H₂O，重悬磁珠，混合均匀。
- 15) 将样本放入 80°C 水浴锅，放置 2min，立即将样品置于磁力架上 2min，待溶液清澈，转移 11uL 的上清液至一个新的 200uL PCR 管中，收集产物用于下游实验。

二，mRNA 片段化：

1. 在新的 200uL PCR 管中配制如下反应：

mRNA	11.0 uL
Frag/Primer Buffer	5.0 uL
总体积	16.0 uL

置 PCR 仪上 85°C 处理 5min，立即置冰上 2min。

三，双链 cDNA 合成

1. 一链合成

在上一步反应的 PCR 管中加入以下试剂：

Fragmented mRNA	16.0 uL
First Strand Buffer	6.0 uL
Actinomycin D (0.5mg/ml) *	1.0 uL
First Strand Enzyme	2.0 uL
总体积	25.0 uL

注：试剂盒所提供的 Actinomycin D 浓度为 2.5mg/ml，需在使用时稀释至 0.5mg/ml

混合均匀，PCR 仪上 25°C 反应 10min，42°C 反应 30min，70°C 反应 15min。

在上一步反应的 PCR 管中加入以下试剂：

1st Strand cDNA	25.0 uL
Second Strand Marking Buffer	22.5 uL
Second Strand Enzyme	2.5 uL
总体积	50.0 uL

混合均匀，PCR 仪上 16°C 反应 60min，65°C 反应 15min。

3. 用磁珠纯化反应产物，步骤如下：

- 1) 将室温放置 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，吸取 90uL 的 AMPure XP beads 加入到 50uL 反应产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，加入 1.5mL 离心管中，室温放置 5min。
- 2) 将 1.5mL 离心管瞬时低速离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清移除上清。
- 3) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架中，加入 200uL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清。
- 4) 重复步骤 3，总计漂洗两次。
- 5) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min；将 1.5mL 管从磁力架中取出，加入 43uL Nuclease-free H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。
- 6) 将 1.5mL 管瞬时低速离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取 40.5uL 上清至干净的 200uL PCR 管中，待用。

四，末端修复加“A”，接头连接

1.末端修复加“A”

在新的 200uL PCR 管中配制如下反应：

纯化产物	40.5 uL
DNA Buffer 1	7.0 uL
DNA Enzyme 1	2.5 uL
总体积	50.0 uL

混合均匀，PCR 仪上 37°C 反应 20min，72°C 反应 20min。

接头连接

在上一步反应的 PCR 管中加入以下试剂：

末端修复产物	50.0 uL
DNA Buffer 2	27.0 uL
DNA Enzyme 2	1.0 uL
Universal ADT	2.0 uL
总体积	80.0 uL

混合均匀，PCR 仪上 25°C 反应 15min，65°C 反应 10min。

3. 接头连接产物纯化

- 1) 将室温放置 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，吸取 64uL 的 AMPure XP beads 加入到 80uL 反应产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，加入 1.5mL 离心管中，室温放置 5min。
- 2) 将 1.5mL 离心管瞬时低速离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清移除上清。
- 3) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架中，加入 200uL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清。
- 4) 重复步骤 3，总计漂洗两次。
- 5) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min。将 1.5mL 管从磁力架中取出，加入 22uL Nuclease-free H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。
- 6) 将 1.5mL 管瞬时低速离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取 20uL 上清至干净的 200uL PCR 管中，待用。

五、PCR 扩增：

在新的 200uL PCR 管中配制如下反应：

纯化产物	20.0 uL
PCR Master Mix	25.0 uL
RNAseq-i5 PCR Primer N*	2.0 uL
RNAseq-i7 PCR Primer N*	2.0 uL
Heat-labile UDG	1.0 uL
总体积	50.0 uL

注：*RNAseq Library PCR Primers kit 提供多种 Primer，可根据样本数量选购。

温度	时间	循环数
37°C	10min	1
98°C	30s	1
98°C	10s	16Cycles
65°C	30s	
72°C	45s	
72°C	5min	1
4°C	∞	

反应结束后取出，进行片段筛选。

六、文库片段大小筛选：

文库片段大小筛选采用两轮磁珠捕获操作，本方案实验结果的文库目的片段大小为 400~600bp。

- 1) 使用 Nuclease-free H₂O 将 PCR 产物补足至 100uL。
- 2) 将室温放置 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，吸取 65 uL 至上游产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，将混合样本转移至一个 1.5mL 的离心管，室温孵育 5min。
- 3) 将 1.5mL 离心管瞬时低速离心并置于磁力架上，室温放置 10min，待溶液澄清，转移上清至一个新的 1.5mL 离心管中，丢弃磁珠。
- 4) 向上清中加入 10uL 的 AMPure XP beads，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 10min。
- 5) 将 1.5mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清移除上清。
- 6) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架中，加入 200uL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清。
- 7) 重复步骤 6，总计漂洗两次。
- 8) 保持 1.5mL 离心管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min；将 EP 管从磁力架中取出，加入 16uL Nuclease-free H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀。
- 9) 将 1.5mL 离心管瞬时低速离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清，吸取 15uL 上清至干净的 200uL PCR 管中。

七、文库质检

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

U-mRNAseq Library Prep Kit 的文库结构如下：

5'-AATGATACGCGACCAACGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-nnnnnn
 nn-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACXXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXXX 为 i5 PCR Primer 序列