

## mRNAseq Library Prep Kit

AT4222-01/02/03 使用说明书

### 产品简介

mRNAseq Library Prep Kit 是针对 illumina 测序平台开发的 mRNA 文库构建试剂盒。文库构建试剂盒经历 mRNA 分离、片段化、一链合成、二链合成、接头连接以及 PCR 扩增等过程，仅需 8h 即可实现从 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

|      |                          | AT4222-03 |        |         |       |
|------|--------------------------|-----------|--------|---------|-------|
|      |                          | (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           | 2400 uL   | 9.6 mL | 38.4 mL | 4°C   |
|      | Tris Buffer              | 300 uL    | 1.2 mL | 4.8 mL  | 4°C   |
| BOX2 | Frag/Prime 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 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 |

### 注意事项

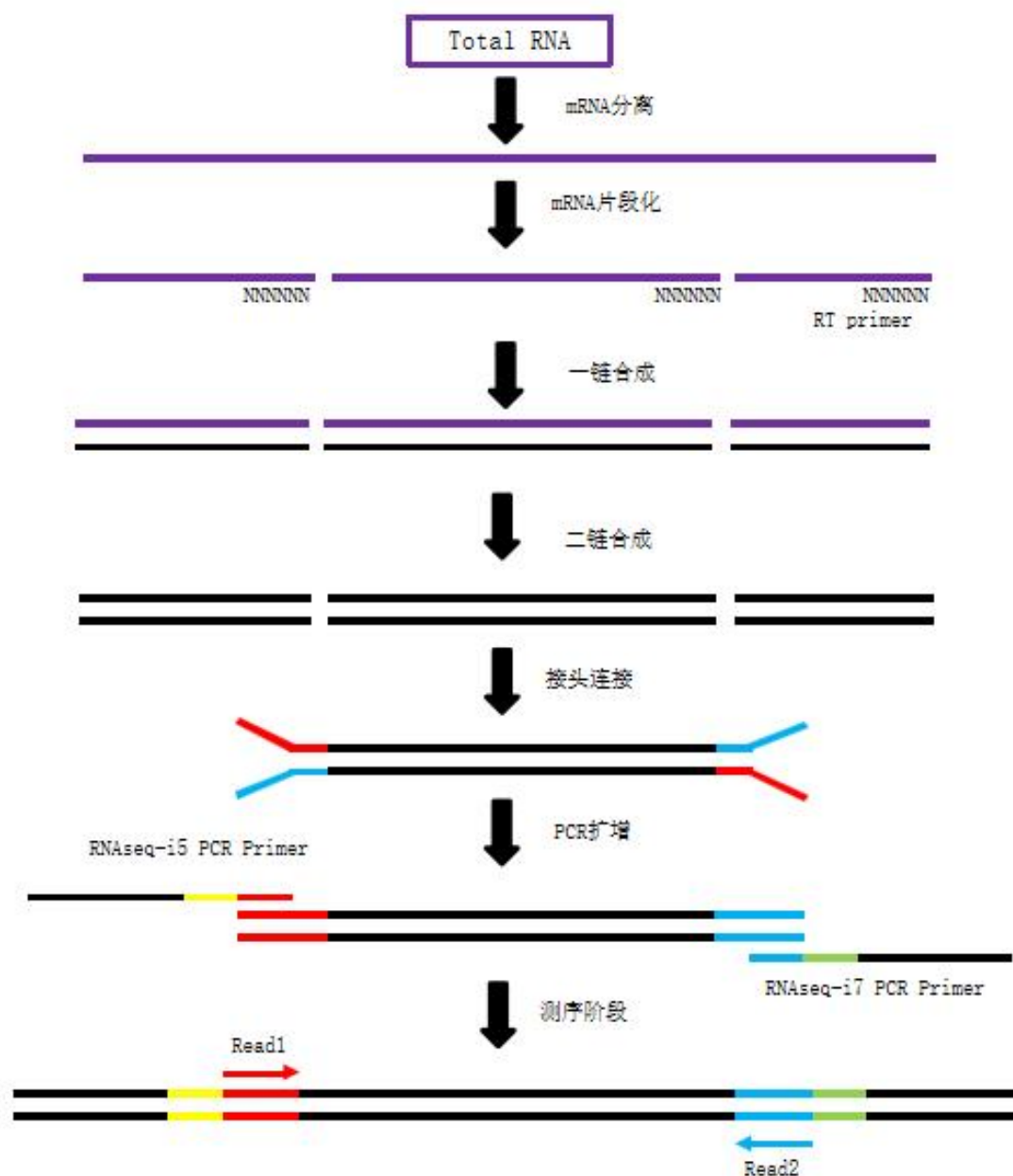
1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
4. 建库所使用的 RNA 必须是纯化后质检合格的样本，否则会严重影响建库结果。
5. 实验所用磁珠应提前 30 分钟自 4°C 环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
6. 80%乙醇需现配现用，用其清洗磁珠后，需清除干净，避免对后续反应产生影响。

### 需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-free H<sub>2</sub>O；AMPure XP beads 或效果相同的纯化磁珠；  
 200uL PCR 管；1.5mL 离心管；磁力架；水浴锅；

实验原理图

# mRNAseq Library Prep Kit



## 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 H<sub>2</sub>O 补至 50uL，放置冰上备用。
- 3) 取 50uL Oligo d(T)的 beads，加入到准备好的 RNA 样本中，用移液器吹打混匀。
- 4) 将混合样本放入 65°C 水浴锅，放置 5min，使 RNA 变性。
- 5) 室温放置 5min，使 mRNA 结合到磁珠上。
- 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 H<sub>2</sub>O，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/Prime Buffer | 5.0 uL  |
| 总体积               | 16.0 uL |

2. 置 PCR 仪上 85°C 反应 5min，立即置冰上 2min。

### 三，双链 cDNA 合成

#### 1. 一键合成

在上一步反应的 PCR 管中加入一下试剂：

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Fragmented mRNA     | 16.0 uL |
| First Strand Buffer | 6.0 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。

## 2. 二链合成

在上一步反应的 PCR 管中加入一下试剂：

|                      |         |
|----------------------|---------|
| 1st Strand cDNA      | 25.0 uL |
| Second Strand 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 H<sub>2</sub>O 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，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。

|               |         |
|---------------|---------|
| 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. 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 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 23uL Nuclease-free H<sub>2</sub>O 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 21uL 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                    | 21.0 uL |
| PCR Master Mix          | 25.0 uL |
| RNAseq-i5 PCR Primer N* | 2.0 uL  |
| RNAseq-i7 PCR Primer N* | 2.0 uL  |
| 总体积                     | 50.0 uL |

\*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         |
|------|------|-------------|
| 98°C | 30s  | 14~16Cycles |
| 98°C | 10s  |             |
| 65°C | 30s  |             |
| 72°C | 45s  |             |
| 72°C | 5min |             |
| 4°C  | ∞    |             |

反应结束后取出，进行片段筛选。

## 六、文库片段筛选：

(本方案实验结果的文库目的片段大小为 300~500bp)

- 1) 使用 Nuclease-free H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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

mRNAseq Library Prep Kit 的文库结构如下：

5'-AATGATACGCGACCAACCGAGATCTACACXXXXXXXXACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCT-nnn  
 nnnn-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 i5 PCR Primer 序列