

Hieff NGS[®] Fast RNA Library Prep Kit for Illumina[®]

极速 RNA 建库试剂盒

Cat No. 12304

使用说明书
Product Manual



目 录

产品信息	1
产品描述	1
产品组分	1
运输与保存方法	1
注意事项	1
使用方法	3
附录	6

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff NGS® Fast RNA Library Prep Kit for Illumina® 极速 RNA 建库试剂盒	12304ES08	8 T
	12304ES24	24 T
	12304ES96	96 T

产品描述

Hieff NGS® Fast RNA Library Prep Kit for Illumina®是用于 Illumina®测序平台的 RNA 测序文库构建试剂盒,包含宿主(人) rRNA 去除试剂, RNA 反转录试剂, 常规 ds-cDNA 合成试剂, 转座酶和优化的缓冲体系, 以及文库扩增试剂。本产品利用专业开发设计的新一代转座酶可以完成 5~10 ng ds-cDNA 建库, 简化了操作流程, 将建库时间缩短到 3 h。本试剂盒具有优秀的文库转化率, 可应用于多种临床样本的建库。经测序验证, 不同 GC 含量的样本, 均可获得优异的测序结果, 文库覆盖度高, 均一性好, 偏好性低 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。

产品组分

组分编号和名称	12304ES08	12304ES24	12304ES96
12304-A ○ Random Primer & rRNA Removal Mix	16 μL	48 μL	192 μL
12304-B ● 1st Reaction Buffer	64 μL	192 μL	768 μL
12304-C ● 1st Strand Enzyme Mix	16 μL	48 μL	192 μL
12304-D ● 2nd Reaction Buffer	56 μL	168 μL	672 μL
12304-E ● 2nd Strand Enzyme Mix	24 μL	72 μL	288 μL
12304-F ● 5×Reaction Buffer	32 μL	96 μL	384 μL
12304-G ● Transposome Mix V1	40 μL	120 μL	480 μL
12304-H ● PCR Primer Mix	24 μL	72 μL	288 μL
12304-I ● 2×Ultima Amplification Mix	200 μL	600 μL	2×1200 μL
12304-J (○) N5 (N501)*	8 μL	—	—
12304-K (○) N7 (N701)*	4 μL	—	—
12304-L (○) N7 (N702)*	4 μL	—	—

运输与保存方法

干冰运输。-20°C保存。有效期 1 年。

注意事项

一、关于操作

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 请于使用前将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀, 短暂离心后置于冰上待用。
3. 推荐在带热盖的PCR仪中进行各步骤反应, 使用前应预热PCR仪至反应温度附近。
4. 请使用无RNase污染的耗材, 并对实验区域定期进行清理, 推荐使用ThermoFisher公司的RNAZap™高效核酸去除喷雾去除RNA酶污染。
5. PCR产物因操作不当极易产生气溶胶污染, 进而影响实验结果准确性。推荐将PCR反应体系配制区和PCR产物纯化检测区进行强制性的物理隔离; 配备文库构建专用移液器等设备; 定时对各实验区域进行清洁(推荐使用ThermoFisher公司的DNAZap™高效核酸去除喷雾), 以保证实验环境的洁净度。
6. 本产品仅作科研用途!

二、关于产品原理

本产品基于转座酶法开发，其核心原理是转座酶及其转座机制。在 Transposome Mix 中包含由转座酶和两种等摩尔的接头 Adapter 1 和 Adapter 2 构成一个完整的转座子。转座发生时，该转座子将 Adapter 1 和 Adapter 2 接头序列插入靶基因中，形成一端带有 Adapter 1，一端带有 Adapter 2 的 DNA，之后利用 DNA 聚合酶将转座形成的切口补齐。这种产物经 N5 (N5XX)和 N7 (N7XX)以及 P5 和 P7 (PCR Primer Mix)两对引物扩增，产物经分选和纯化后即可为可测序文库。

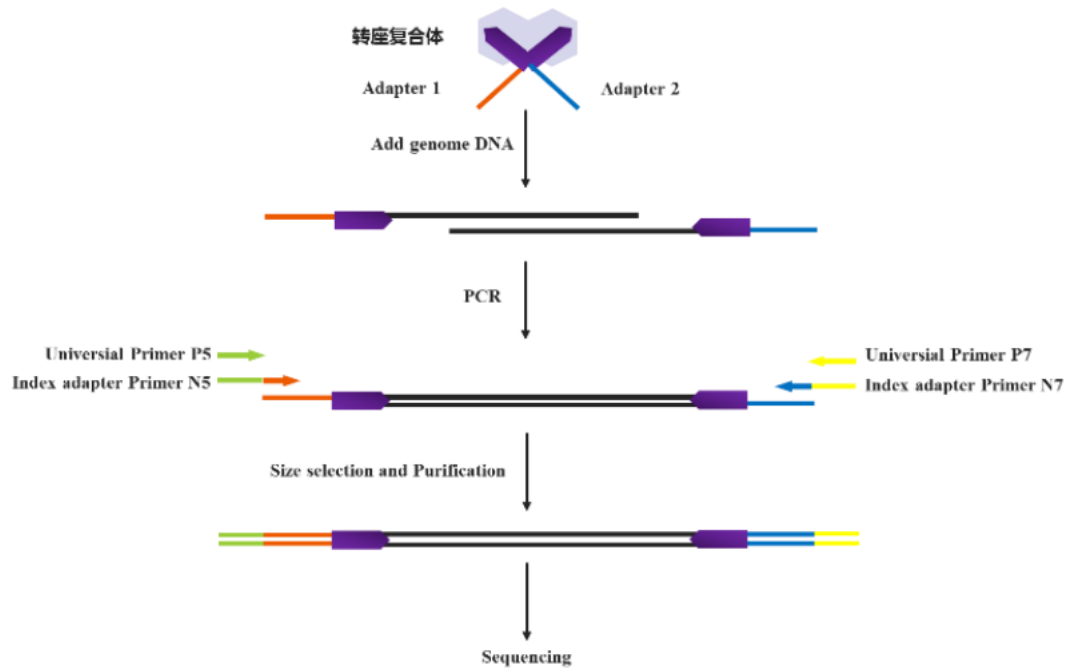


图1 Transposome 的工作原理

三、关于 ds-cDNA 的片段化

1. 本试剂盒适用 5~10 ng Input ds-cDNA。在 Input ds-cDNA 投入前，使用基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit[®]，PicoGreen[®]等进行定量。【注：Transposome Mix 对 DNA 浓度非常敏感，所以准确的 DNA 浓度测定对实验成功与否至关重要。】

四、DNA 磁珠纯化与分选 (Bead-based Clean Up and Size Selection)

1. 建库过程中有多个步骤需要使用 DNA 纯化磁珠，我们推荐使用 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601)或 AMPure[®] XP 磁珠(Beckman Cat#A63880)进行 DNA 纯化和分选。
2. 磁珠使用前应先平衡至室温，否则会导致得率下降、分选效果不佳。
3. 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。
4. 转移上清时，请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量。
5. 磁珠洗涤使用的 80%乙醇应现用现配，否则将影响回收效率。
6. 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥 3-5 min 足以让磁珠充分干燥。
7. DNA 纯化或长度分选产物如需保存，可使用 0.1×TE Buffer 洗脱，产物于 4°C 可保存 2 天，-20°C 可保存 1 个月。

五、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. 文库浓度检测可使用：基于双链 DNA 荧光染料的方法，如 Qubit[®]、PicoGreen[®]等；基于 qPCR 绝对定量的方法。
3. 推荐使用 qPCR 方法进行文库浓度检测：Qubit[®]等基于双链 DNA 荧光染料的浓度测定方法时，无法有效区分单端连接 Adapter 的产物、两端均未连接 Adapter 的产物及其他不完整双链结构产物；qPCR 绝对定量基于 PCR 扩增原理，仅定量样品中两端 Adapter 完整的文库（即可测序的文库），可排除单端或两端都不连接 Adapter 的不可测序文库的干扰。

- 文库浓度检测不可使用：基于光谱检测的方法，如 NanoDrop®等。
- 文库长度分布检测，可通过 Agilent Bioanalyzer 2100 等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。

六、自备材料 (Other Material)

- DNA 纯化磁珠：Hieff NGS® DNA Selection Beads (Yeasen Cat#12601)或 AMPure® XP Beads (A63880)或其他等效产品。
- N5 (N5XX)和 N7 (N7XX) Index 引物：Hieff NGS® Tagment Index Kit for Illumina® (96 Index) (Cat#12610ES96)。
- 文库质检：Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Chip/ High Sensitivity Chip 或其他等效产品；文库定量试剂。
- 其他材料：无水乙醇、无菌超纯水、低吸附枪头、PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

建库流程

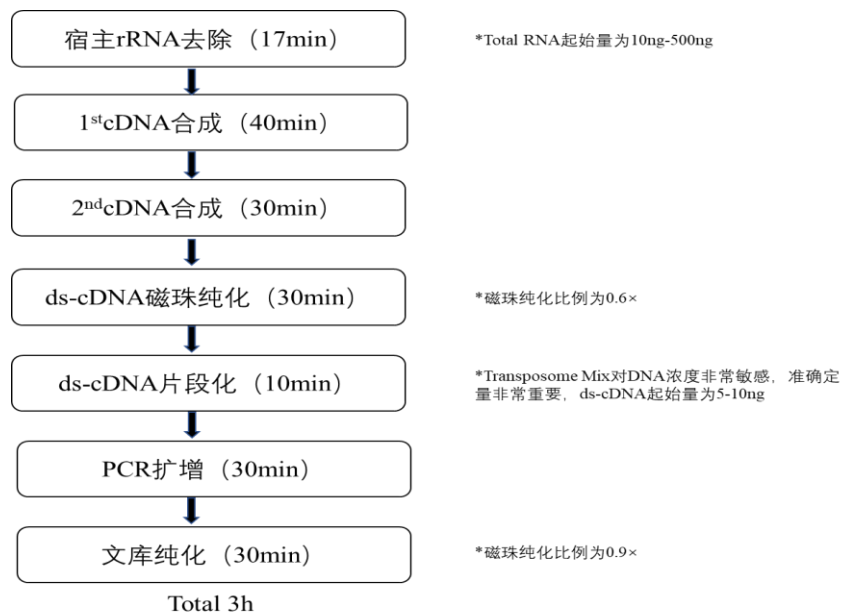


图2 极速 RNA 建库操作流程

使用方法

Step 1 宿主 rRNA 的去除

- 将 Random Primer & rRNA Removal Mix 室温解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。按照下表配置反应液：

表1 宿主 rRNA 去除反应体系

名称	体积 (μL)
Random Primer & rRNA Removal Mix	2
RNA (10 ng~500 ng)	13
Total	15

- 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬离将反应液离心至管底。
- 将上述PCR管置于PCR仪中，按照表2所示设置反应程序，进行RNA的预变性。

表 2 宿主 rRNA 去除反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
85°C	5 min
72°C	2 min
60°C	10 min
立即置于冰上	3 min

Step 2 第一链 cDNA 的合成 (1st Strand Synthesis)

1. 将第一链合成试剂从-20°C取出，室温解冻，颠倒混匀后瞬离。按表6所示，配制第一链cDNA合成的反应液。

表 3 第一链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
变性的 RNA	15
1st Reaction Buffer	8
1st Strand Enzyme Mix	2
Total	25

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，按照表 4 所示设置反应程序，进行第一链 cDNA 的合成。反应结束后立即进行第二链 cDNA 的合成。

表 4 第一链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖 105°C	On
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min
4°C	Hold

Step 3 第二链 cDNA 的合成 (2nd Strand Synthesis):

1. 将第二链合成试剂从-20°C取出，解冻后颠倒混匀；按照表 5 所示，配制第二链 cDNA 合成反应液。

表 5 第二链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
1st Strand cDNA	25
2nd Reaction Buffer	7
2nd Strand Enzyme Mix	3
Total	35

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，按照表 6 所示设置反应程序，进行第二链 cDNA 的合成。

表 6 第二链 cDNA 合成反应程序

温度	时间
热盖	Off
16°C	30 min
4°C	Hold

Step4 cDNA 产物纯化 (Post Ligation Clean Up)

1. 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80% 乙醇。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 21 μL Hieff NGS[®] DNA Selection Beads (0.6 \times , Beads:DNA=0.6:1)至第二链 cDNA 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中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。
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 14 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 12 μL 上清至新 PCR 管中，取 1 μL 的纯化测第二链 cDNA 产物进行 Qubit 定量，进行转座酶的片段化。

Step 5 DNA 片段化 (DNA Tagment)

1. 准备工作：将 Hieff NGS[®] DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80% 乙醇。将 5 \times Reaction Buffer 室温解冻后，颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 7 所示反应体系。

表 7 片段化反应体系

名称	体积 (μL)
2nd Strand cDNA 纯化产物	5~10 ng
5 \times Reaction Buffer	4
Transposome Mix V1	5
ddH ₂ O	Up to 20

3. 使用移液器轻轻吹打或低速振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
4. 将上述 PCR 管置于 PCR 仪，设置表 8 所示反应程序，进行 DNA 片段化，末端修复及 dA 尾添加反应。

表 8 片段化的反应程序

温度	时间
热盖 105 $^{\circ}\text{C}$	on
55 $^{\circ}\text{C}$	10 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

Step 6 文库扩增 (Library Amplification)

该步骤将对纯化或长度分选后的接头连接产物进行 PCR 扩增富集。

1. 将表 8 中的试剂解冻后颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 于无菌 PCR 管中配制表 9 所示反应体系。

表 9 文库扩增 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μL)
片段化产物	20
PCR Primer Mix	3
N5XX*	1
N7XX*	1
2 \times Ultima Amplification Mix	25
Total	50

【注】：*Hieff NGS[®] Tagment Index Kit for Illumina[®] (96 Index) (Cat#12610ES96) 中提供 8 种 N5XX 和 12 种 N7XX，可根据样品数量和 Index 选择策略自行选择。

3. 使用移液器轻轻吹打或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

4. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置表 10 示反应程序，进行 PCR 扩增。

表 10 文库扩增 PCR 扩增反应程序

温度	时间	循环数
72°C	3 min	1*
95°C	1 min	1
95°C	10 sec	13~15 cycles**
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	-

【注】：*此步不可省略。转座反应产物并非完整的双链 DNA，72°C 孵育 3 min 用于生成成熟的 PCR 模板。

**循环数请根据测序需要进行选择。起始 DNA 量为 5-10 ng 时，推荐 13-15 个扩增循环。

Step 7 扩增产物磁珠纯化 (Post Amplification Clean Up)

1. 准备工作：将 Hieff NGS® DNA Selection Beads 磁珠由冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。配制 80% 乙醇。
2. 涡旋振荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 45 μL Hieff NGS® DNA Selection Beads (0.9×, Beads:DNA=0.9:1) 至 PCR 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中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心移除上清。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次。
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 21 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 20 μL 上清至新 PCR 管中，进行文库定量、质检。

Step 8 文库质量控制

通常情况下，构建好的文库可通过浓度检测和长度分布检测来进行质量评价，具体请参见注意事项五。

附录

使用 Hieff NGS® Fast RNA Library Prep Kit for Illumina® 对 50 ng ~500 ng 293 RNA 样本建库，使用 0.9× 磁珠进行 PCR 后纯化，结果使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。

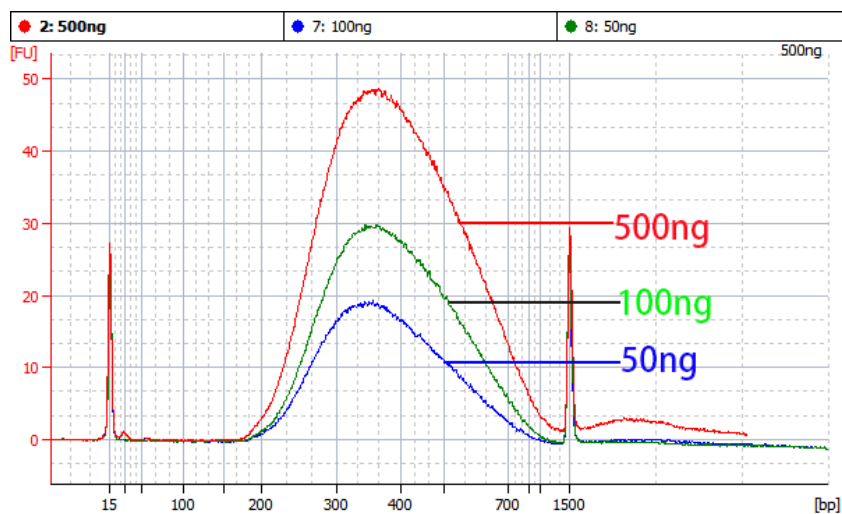


图 3 极速 RNA 建库峰图

Good science

Good products

翌圣生物科技（上海）股份有限公司

服务电话:400-6111-883

咨询邮箱:marketing@yeasen.com

网 址:www.yeasen.com

地 址:上海市浦东新区国际医学园区天雄路166号1号楼402室

