

RNA-seq 建库试剂盒（转座酶法）

AT4224-01/02/03 使用说明书

产品简介

RNA-seq 建库试剂盒（转座酶法）是可兼容低微量样本的转座酶法 RNA 文库构建试剂盒。试剂盒使用转座酶对 RNA/DNA 杂合链一步完成片段化和加接头反应，突破了在双链 DNA 上应用的限制，显著降低了对起始模板投入量的要求；同时大大缩短了文库构建的时间，仅需 4h 即可将 RNA 构建成高质量文库。试剂盒操作简单，极大的避免了繁杂操作带来的误差，构建的文库稳定性强，均一性和重复性高。

试剂盒组成

产品成分	AT4101-01 (6 次)	AT4101-02 (24 次)	AT4101-03 (96 次)	保存条件
4 × gDNA wiper Mix	15 μL	60 μL	240 μL	-20°C
Oligo(dT) ₂₃ VN	6 μL	24 μL	96 μL	-20°C
Random hexamers	6 μL	24 μL	96 μL	-20°C
5x RT Mix	24 μL	96 μL	384 μL	-20°C
5x TnZ-S buffer	42 μL	168 μL	672 μL	-20°C
TnZ-S	24 μL	96 μL	384 μL	-20°C
KT-Stop Solution	30 μL	120 μL	480 μL	-20°C
KT HiFi Amplification Mix	300 μL	1.2 mL	4.8 mL	-20°C
TSE	6 μL	24 μL	96 μL	-20°C
Tn5-Universal Primer	30 μL	120 μL	480 μL	-20°C

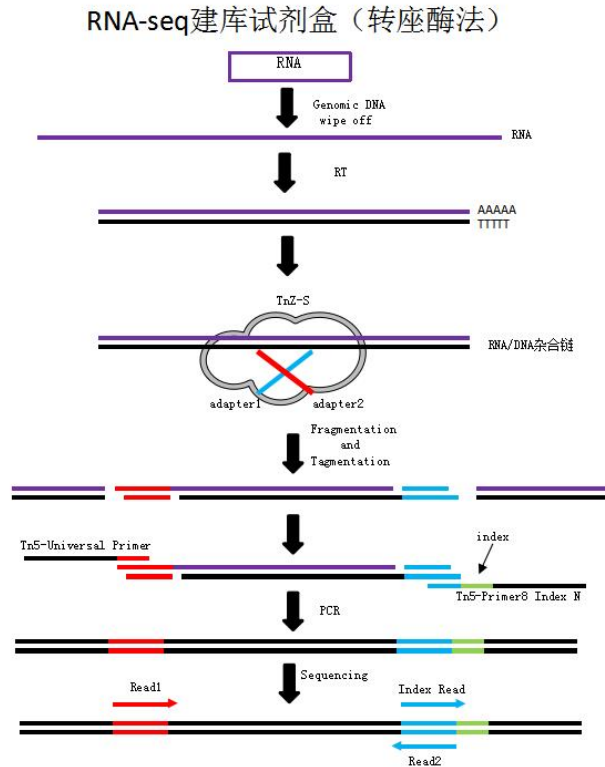
注意事项

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. RNA 浓度需使用精确测定，起始 RNA 量测定不准确，会影响文库得率。
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. KT-Stop Solution 在使用前，请确保其回复室温，如有沉淀析出，请放置 37°C 加热混匀，使沉淀溶解。
7. 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 H₂O；ATPure Plus beads（DNA 片段分选纯化磁珠）或效果相同的纯化磁珠
 200uL PCR 管；1.5mL 离心管；磁力架。

实验原理图



操作步骤

一，RNA/DNA 杂交产物生成

1. RNA 模板变性

在新的 PCR 管中配制如下反应体系：

Total RNA or poly A+ RNA or 去除 rRNA 后的 RNA	X μL
Nuclease-free H ₂ O	(7.5-X) μL
总体积	7.5 μL

移液器吹打混匀瞬间后，65°C加热 5min，迅速置于冰上冷却 2-3min，进行下步实验。

2. 基因组 DNA 去除

在上述 PCR 管中配制如下反应体系：

上一步反应产物	7.5 μL
4 × gDNA wiper Mix	2.5 μL
总体积	10 μL

移液器吹打混匀瞬间后，42°C反应 2min，85°C反应 30s，置于冰上，进行下步实验。

3. 逆转录反应

在上述 PCR 管中配制如下反应体系：

上一步反应产物	10 μ L
Oligo(dT) ₂₃ VN	1 μ L
Random hexamers	1 μ L
5xRT Mix	4 μ L
Nuclease-free H ₂ O	4 μ L
总体积	20 μ L

移液器吹打混匀瞬离后，在 PCR 仪上进行反应：105°C 热盖，50°C 15min, 85°C 5s。进行下步实验。

二，样本片段化反应：

1. 在上述 PCR 管中配制如下反应体系：

上一步反应产物	20 μ L
5x TnZ-S buffer*	7 μ L
TnZ-S	4 μ L
Nuclease-free H ₂ O	4 μ L
总体积	35 μ L

* 5X TnZ-S buffer 在使用前室温解冻，上下颠倒混匀，瞬时离心备用

移液器轻轻吹打 20 次充分混匀，在 PCR 仪上进行反应：105°C 热盖，55°C 15min, 10°C Hold。进行下步实验。

2. 反应结束后加入 5 μ L KT-Stop Solution 移液器轻轻吹打充分混匀瞬离后，37°C 孵育 5 min。

三，PCR 富集

在上述 PCR 管中配制如下反应：

上一步反应产物	40 μ L
KT HiFi Amplification Mix	50 μ L
Tn5-Universal Primer	2 μ L
Tn5-Primer8 Index N*	2 μ L
TSE	1 μ L
Nuclease-free H ₂ O	5 μ L
总体积	100 μ L

*Tn5-DNAseq 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
42°C	15min	1 Cycle
72°C	3min	1 Cycle
98°C	3min	1 Cycle
98°C	20s	} 13-23 Cycles
60°C	15s	
72°C	30s	
72°C	5min	1 Cycle
4°C	∞	

*样本起始量为 1-10ng 时，扩增反应的循环数为 20-23
 样本起始量为 10-100ng 时，扩增反应的循环数为 17-20
 样本起始量为 100-500ng 时，扩增反应的循环数为 13-17

反应结束后取出，进行文库纯化。

四、文库纯化（无片段筛选步骤）：

文库纯化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 200~600bp。

1) 使用 Nuclease-free H₂O 将 PCR 产物补足至 100μL；

注意：因 PCR 反应中会使反应体系发生变化，此步骤非常重要，体积不准确会导致纯化后的片段长度范围有偏差。

- 2) 将室温放置 30min 后的 ATPure Plus beads 涡旋震荡混匀，吸取 100 μL 的 ATPure Plus beads 和 100 μL PCR 产物，加入 PCR 管中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温放置 5min；
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清转移上清；
- 4) 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200μL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；
- 5) 重复步骤 4，总计漂洗两次；
- 6) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min，直至磁珠表面无液体；将 PCR 管从磁力架中取出，加入 105 μL Nuclease-free H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5min；
- 7) 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，吸取 100 μL 上清至干净的 PCR 管中；
- 8) 涡旋震荡混匀 ATPure Plus beads，加入 90 μL 到 100 μL 上清移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温放置 5min；
- 9) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，室温放置 5min，待溶液澄清转移上清；
- 10) 保持 PCR 管始终处于磁力架中，加入 200 μL 80% 乙醇（现用现配）漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清；
- 11) 重复步骤 10，总计漂洗两次；
- 12) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5min，直至磁珠表面无液体；将 PCR 管从磁力架中取出，加入 16 μL Nuclease-free H₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5min；

13) 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，吸取 15 μ L 上清至干净的 PCR 管中，进行文库质检。

五、文库质检

1. 文库的浓度测定

推荐使用 Realtime PCR 对文库进行绝对定量，也可使用特异性识别 DNA 双链的荧光染料法对文库进行定量，如 Qubit。

2. 文库片段长度分布检测

推荐使用 Agilent 2100 BioAnalyzer 、 Qsep100 对文库进行检测，也可使用凝胶电泳检测。

文库结构

RNA-seq 建库试剂盒（转座酶法）的文库结构如下：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-nnnnnn
n-CTGTCTTTATACATCTCCGAGCCCACGAGACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 index 序列