

# Trace RNAseq Library Prep Kit

AT4205-01/02/03 使用说明书

## 产品简介

Trace RNAseq Library Prep Kit 能以 1-500 个细胞或 10pg-10 ng 总 RNA 为模板，进行 cDNA 的合成，并且利用逆转录酶添加一段接头序列，通过该接头序列进行后续 PCR 扩增，获得全长 cDNA 扩增产物。获得的全长 cDNA 扩增产物使用一步简单的酶促反应替代了传统 DNA 文库构建过程中的片段化、末端修复以及接头连接反应等步骤，显著缩短了文库构建的时间。本试剂盒具有节约时间、减少实验误差、降低污染、高灵敏度等优势。

## 试剂盒组成

产品成分		AT4205-01 (6 次)	AT4205-02 (24 次)	AT4205-03 (96 次)	保存条件
Box1	Lysis Buffer	20ul	80ul	320ul	-20℃
	Oligo (dT) VN Primer	6uL	24uL	96uL	-20℃
	dNTP Mix	6uL	24uL	96uL	-20℃
	UC-RNA RT buffer	15uL	60uL	240uL	-20℃
	DTT	3uL	12uL	48uL	-20℃
	UC-RNA Oligo	3uL	12uL	48uL	-80℃
	RNase Inhibitor	5uL	18uL	64uL	-20℃
	UC-RNA RT Enzyme	6uL	24uL	96uL	-20℃
	UC-RNA Primer Mix	12uL	48uL	192uL	-20℃
	PCR Master Mix	75uL	300uL	1200uL	-20℃
	Tn5-Frag Buffer	24 uL	96 uL	384 uL	-20℃
	TnZ	24 uL	96 uL	384 uL	-20℃
	Stop Solution	120 uL	480 uL	1920 uL	4℃
	Tn5-PCR Buffer	60 uL	240 uL	960 uL	-20℃
	dNTP(2.5 mM)	25 uL	100 uL	400 uL	-20℃
	Tn5-Universal Primer	30 uL	120 uL	480 uL	-20℃
Tn5-PCR Enzyme	3 uL	12 uL	48 uL	-20℃	

## 注意事项

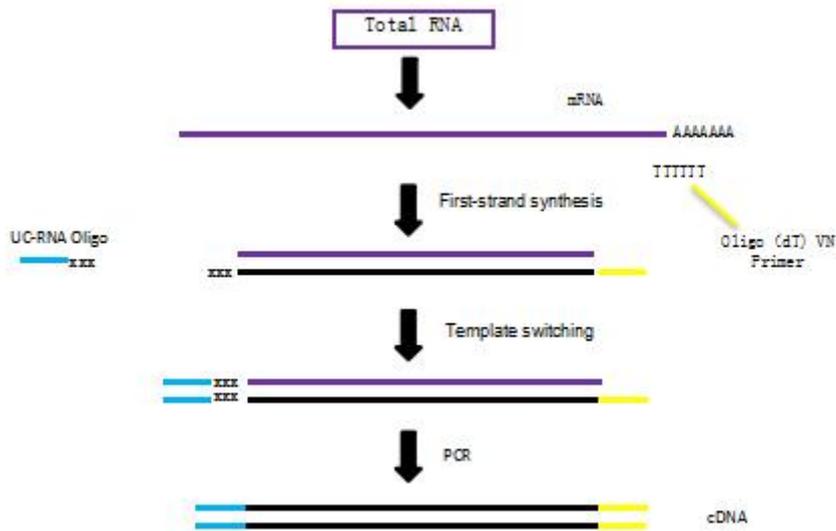
1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
3. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行试验。
4. 实验所用磁珠应提前 30 分钟自 4℃ 环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。

5. 收到试剂后，请将 UC-RNA Oligo 长期保存于-80℃，使用前在冰上融化。
6. Stop Solution 可放置 4℃保存，使用时请确保其恢复室温，如有沉淀析出，请放置 37℃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。

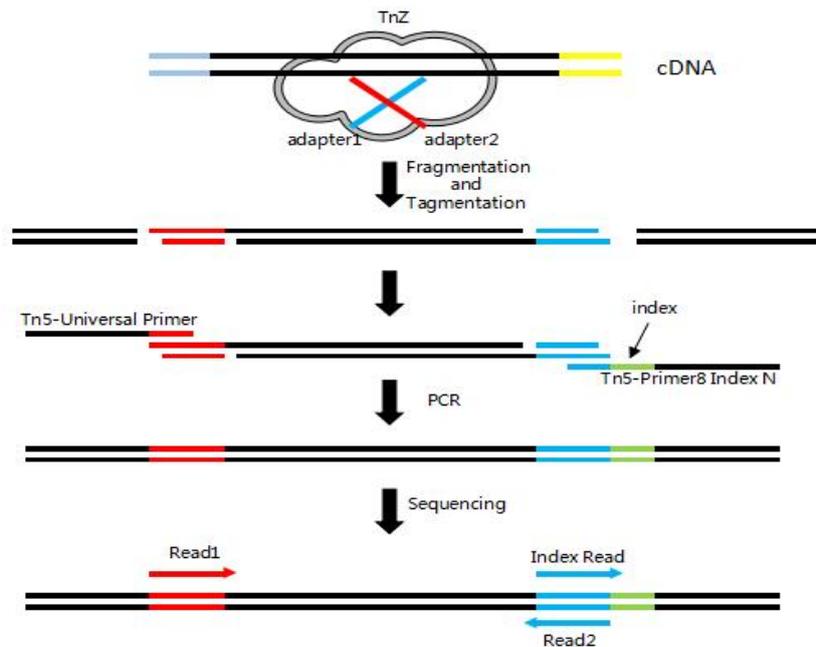
### 需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-free 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；

### RNA 逆转录实验原理图



### cDNA 文库构建原理图



## 操作步骤

### 第一链 cDNA 合成 (请在超净台中操作)

#### 一、样品准备：

Sample Buffer 配置：

组分	体积
Lysis Buffer	9 uL
RNase Inhibitor	1 uL
Total	10 uL

用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心，混匀时避免气泡的产生。

按照下表设置对照和待测样品，配置如下反应体系：

组分	阴性样品	待测样品
Sample Buffer	1 uL	1 uL
RNA (10pg~10ng) /细胞样品 (100~500cells)	-	0.5-2.5 uL
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	up to 3.5 uL	up to 3.5 uL

#### 二、反转录

- 在新的 PCR 管中配制如下反应体系： RNA (10pg~10ng) /细胞样品 (100~500cells)

组份	体积
Processed Sample	3.5 uL
Oligo (dT) VN Primer	1.0 uL
dNTP Mix	1.0 uL
Total	5.5 uL

移液器混合均匀后，72℃ for 3min ,立即置于冰上 2min;

- 向上述反应体系中加入以下组份：

组份	体积
UC-RNA RT buffer	2.0 uL
DTT	0.5 uL
<b>UC-RNA Oligo*</b>	0.5 uL
RNase Inhibitor	0.5 uL
UC-RNA RT Enzyme	1.0 uL
Total	10.0 uL

\*UC-RNA Oligo 应长期保存于-80℃，使用前在冰上解冻。

移液器混合均匀后，运行以下反应程序：

温度	时间
42°C	90min
70°C	15min
4°C	∞

### 三、cDNA 扩增

1. 按照下表配制反应体系：

组份	体积
反转录产物	10.0 uL
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	0.5 uL
UC-RNA Primer Mix	2.0 uL
PCR Master Mix	12.5 uL
Total	25.0 uL

2. 充分混匀后在 PCR 仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
98°C	1min	} n* Cycles
98°C	10s	
65°C	15s	
72°C	6min	
72°C	5min	
4°C	∞	

扩增循环数参考：

总 RNA 作为起始	细胞作为起始	参考循环数
10 ng	500 cells	8-9
1 ng	100 cells	11-12
100 pg	10 cells	14-15
10 pg	1 cell	17-18

### 四、cDNA 纯化

用磁珠纯化片段化产物，步骤如下：

- 1) 将室温放置的 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，并吸取 25uL 至 25 uL 片段化产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，转移混和样本至新的 1.5 mL 离心管中，室温孵育 5min。
- 2) 将反应管短暂离心并置于磁力架上，放置 5min，待溶液澄清，移除上清。
- 3) 保持离心管始终处于磁力架中，加入 200 uL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清。
- 4) 重复步骤 3，总计漂洗两次。

- 5) 保持离心管始终处于磁力架中，开盖干燥 5min。
- 6) 将离心管从磁力架中取出，加入 14uL 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。
- 7) 将反应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 13uL 上清至 200uL PCR 管中，1uL 测浓度。

**注：若 cDNA 总量少于 1ng，不建议继续进行下游实验。**

## 五、样本片段化反应：

1. 在新的 PCR 管中配制如下反应体系：

组份	体积
cDNA(1~50ng)	XuL
Tn5-Frag Buffer	4.0 uL
TnZ	4.0 uL
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	(12-X) uL
Total	20.0uL

**\* TnZ 在使用时，请先使用移液器轻轻吹打，混合均匀，然后每个样本单独加入，切勿配置混合液**

移液器轻轻吹打 20 次充分混匀，55°C 反应 15 分钟；

**反应结束后加入 20uL Stop Solution 并且充分混匀；**

2. 用磁珠纯化片段化产物，步骤如下：

- 1) 将室温放置的 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，并吸取 40uL 至 40 uL 片段化产物中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，转移混和样本至新的 1.5 mL 离心管中，室温孵育 5min。
- 2) 将反应管短暂离心并置于磁力架上，放置 5min，待溶液澄清，移除上清。
- 3) 保持离心管始终处于磁力架中，加入 200 uL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s 后移除上清。
- 4) 重复步骤 3，总计漂洗两次。
- 5) 保持离心管始终处于磁力架中，开盖干燥 5min。
- 6) 将离心管从磁力架中取出，加入 27uL 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。
- 7) 将反应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 25.5uL 上清至 200uL PCR 管中，待用。

## 六、PCR 扩增：

在新的 PCR 管中配制如下反应：

组份	体积
Recovered DNA Fragment	25.5 uL
Tn5-PCR Buffer	10.0 uL
dNTP(2.5 mM)	4.0 uL
Tn5-Universal Primer	5.0 uL
Tn5-Primer8 Index N*	5.0 uL
Tn5-PCR Enzyme	0.5 uL
总体积	50.0 uL

\*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
72℃	3min	
95℃	30s	} n* Cycles
95℃	15s	
60℃	30s	
72℃	3min	
72℃	5min	
4℃	∞	

扩增循环数参考：

cDNA 起始量	参考循环数
50-5 ng	9-12
5-1 ng	12-15

反应结束后取出，进行片段筛选。

## 七、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，目标文库片段大小在 400bp~600bp 之间，具体操作步骤如下：

1) 使用 Nuclease-free H<sub>2</sub>O 将 PCR 产物补足至 100uL；

**(因 PCR 反应中会使反应体系发生变化，体积不准确会导致筛选后的片段长度范围有偏差，此步骤非常重要)。**

2) 将室温放置 30min 后的 AMPure XP beads 涡旋震荡混匀，吸取 65ul 的 AMPure XP beads 和 100uL PCR 产物，加入 1.5mL 离心管中，移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温放置 10min；

3) 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 10min，待溶液澄清转移上清至干净 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 10min，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 1.5mL 离心管从磁力架中取出，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 15uL 上清至干净的 0.2mL PCR 管中；

## 八、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

Trace RNAseq Library Prep Kit 的文库结构如下：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-nnnn  
nnn-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGACXXXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnn 为插入序列

XXXXXXXX 为 index 序列