ExCell Bio
依科赛生物

ExCell Bio

TrueLib mRNA 建库试剂盒

TrueLib mRNA Library Prep Kit for Illumina

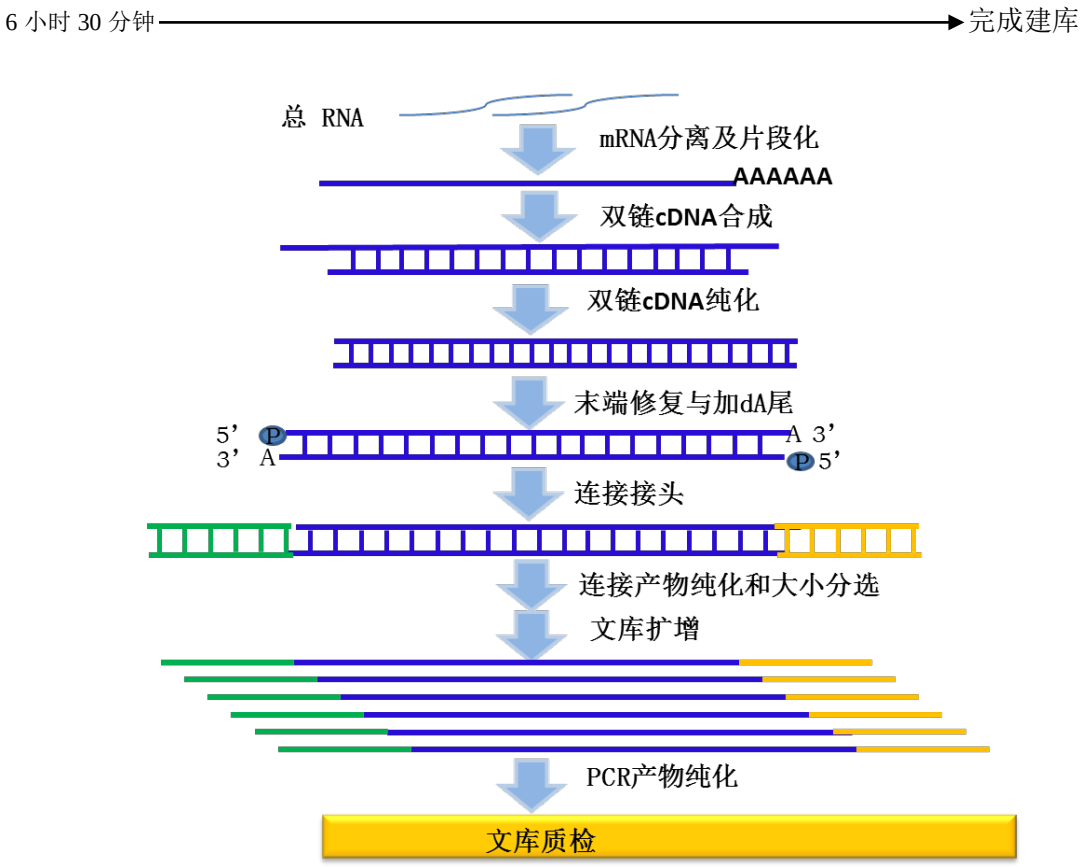
User Manual

Catalog Number	NGS00-2011	24 rxn
	NGS00-2012	48 rxn
	NGS00-2013	96 rxn

产品概述

TrueLib mRNA Library Prep Kit for Illumina是依科赛生物针对Illumina高通量测序平台而设计的mRNA文库构建试剂盒，该试剂盒中包含了mRNA分离、片段化、cDNA一链和二链合成、cDNA建库所需的整套试剂（接头和PCR引物除外）。该试剂盒中的mRNA结合磁珠特异性吸附mRNA，末端补平与加dA尾一步完成，无中间纯化步骤可直接进行Adapter连接。连接产物采用依科赛生物生产的高保真DNA聚合酶ExHiFi进行文库富集，完成无偏好PCR(polymerase cycler reaction，聚合酶链式反应)扩增。TrueLib mRNA Library Prep Kit for Illumina文库构建时间短、产量高、后期磁珠消耗少，是适用于Illumina测序平台mRNA文库制备的高效高质产品。

产品原理



自备仪器、试剂和耗材

1. 磁力架
2. PCR仪
3. 分别适用于PCR管及1.5 mL离心管迷你离心机
4. AMPure® XP 磁珠（Beckman Coulter, Inc. #A63881）

5. 样本接头引物试剂盒：建议使用依科赛生物生产的二代测序多样本接头引物试剂盒(Cat. No. NGS00-1021，NGS00-1022，NGS00-1031，NGS00-1032，NGS00-1033，NGS00-1034，NGS00-1035，NGS00-1036，NGS00-1037，NGS00-1038，NGS00-103C，NGS00-103D)
6. 无水乙醇
7. 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE
8. 冰盒
9. 反应管：建议使用低吸附PCR管与1.5 mL离心管
10. 枪头：建议使用高质量过滤枪头防止试剂盒、文库样本污染

特别提醒

1. 避免试剂的反复冻融
2. PCR产物因操作不当极易产生污染，导致结果不准确，建议将PCR反应体系配制区与产物纯化区隔离，并使用专用移液器，定期对实验区域进行清洁

产品应用

支持多种样本，且所得文库能够用于HiSeq X-10/4000/3000/2500/2000/1000、MiSeq和Nextseq500等多种Illumina测序平台。

产品组分及储存条件

	组分	NGS00-2011（24 rxn）	NGS00-2012（48 rxn）	NGS00-2013（96 rxn）
Kit 1	mRNA Binding Beads	240 μL	480 μL	960 μL
	Beads Binding Buffer	7.2 mL	14.4 mL	28.8 mL
	Beads Wash Buffer	28.8 mL	57.6 mL	2×57.6 mL
	Tris Buffer	6 mL	12.0 mL	24.0 mL
	Sterial ddH2O	1.5 mL	2×1.5 mL	4×1.5 mL
Kit 2	Frag/Prime Buffer	435 μL	870 μL	2×870 μL
	First Strand Synthesis Reaction Buffer	90 μL	180 μL	350 μL
	First Strand Synthesis Enzyme Mix	36 μL	72 μL	144 μL
	Second Strand Synthesis Reaction Buffer Buffer	480 μL	960 μL	2×960 μL
	Second Strand Synthesis	60 μL	120 μL	240 μL

	Enzyme Mix			
	End Prep Enzyme Mix	72 μL	144 μL	288 μL
	5×End Rapid Repair Reaction Buffer	350 μL	650 μL	1.3 mL
	Ligase Mix	48 μL	96 μL	192 μL
	Rapid ligase Buffer	350 μL	750 μL	1.5 mL
	ExHiFi 2×PCR Master Mix	600 μL	1.2 mL	2×1.2 mL

干冰运输；-20℃保存，有效期一年。

实验流程

该试剂盒适用于起始模板为 100ng-1μg 总 RNA 的转录组文库构建，建议用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对提取的总 RNA 进行质控， RIN 值应≥8

一. mRNA 分离/片段化

- 每次使用 mRNA Binding Beads 前，请将 mRNA Binding Beads 从 4℃冰箱中取出，平衡至室温再用。且每次使用前，必须充分混匀 mRNA Binding Beads。

1. 准备 RNA 样品：在 PCR 管中，将 100ng-1μg 总 RNA 溶解于 50 μL DEPC 水中，冰上放置备用
   - 可在做步骤 4 时准备 RNA 样品。
2. 吸取 10 μL mRNA Binding Beads 加入到 0.2 mL PCR 管中
3. 吸取 100 μL Beads Binding Buffer 加入到磁珠中，用移液器吹打 6 次充分混匀
4. 将 PCR 管置于磁力架上室温放置 2min
5. 小心移除所有上清，注意不要接触到磁珠
6. 重复第 3-5 步骤
7. 用 50 μL Beads Binding Buffer 重悬磁珠，将步骤 1 中的 50 μL 总 RNA 加入到磁珠中，充分混匀
   - 两个 50 μL 溶液体积一定要吸取准确。
8. 样品置于 PCR 仪中，65℃孵育 5 min，使 RNA 变性，4℃保存
9. PCR 仪温度达到 4℃后，将样品重悬，室温放置 5 分钟，使 mRNA 结合到磁珠上
10. 再次充分重悬磁珠后，室温再放置 5 分钟，使 mRNA 结合到磁珠上

11. 将样品置于磁力架 2 分钟，使 mRNA 与总 RNA 分离，小心移除上清

- 注意不要接触到磁珠。

12. 将样品从磁力架上取出，加入 200 μL Beads Wash Buffer 吹打 6 次充分混匀。在磁力架上静置 2 分钟，小心移除上清

13. 重复步骤 12

- 注意最后需要用 10 μL 移液器吸干净残留液体。

14. 将样品从磁力架上取出，加入 50 μL Tris Buffer 重悬磁珠，用移液器吹打 6 次充分混匀

15. 将样品置于 PCR 仪中，80 ℃孵育 2 min，25℃保存，将 mRNA 洗脱下来

16. 待 PCR 仪温度降至 25℃时，取出样品加入 50 μL Beads Binding Buffer，用移液器轻轻吹打 6 次充分混匀

17. 室温放置 5 分钟，使 mRNA 结合到磁珠上

18. 再次重悬磁珠，室温再放置 5 分钟，使 mRNA 结合到磁珠上

19. 将样品置于磁力架上静置 2 分钟，使 mRNA 与总 RNA 分离，小心移除上清

20. 将样品从磁力架上取出，用 200 μL Beads Wash Buffer 轻轻吹打 6 次充分混匀磁珠，在磁力架上静置 2 分钟，移除全部上清

- 最后需要用 10 μL 移液器吸干净残留液体。

21. 加入 18 μL Frag/Prime Buffer，充分混匀。放入 PCR 仪上，运行 94℃ 10min 片段化程序

- 不同来源 RNA 样品可能存在片段化程序差异，可以根据情况调整片段化程序的温度及时间。

22. 反应结束后立即将样品放回磁力架上室温静置 2 分钟，待溶液澄清后吸取 15 μL 上清至一新的 PCR 管内，立即进行 cDNA 第一链反应

二. 双链 cDNA 合成

1. cDNA 第一链合成

1.1 配置 cDNA 第一链合成反应液

Fragmented mRNA	15 μL

First Strand Synthesis Enzyme Mix	1.5 μL
First Strand Synthesis Reaction Buffer	3.5 μL
Total	20 μL

- 用移液器轻轻吹打混匀

1.2 在 PCR 仪中按如下程序进行第一链 cDNA 合成反应

25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	hold

- 程序结束后立刻进行二链合成

2．cDNA 第二链合成

■ 配置 cDNA 第二链反应液

First Strand cDNA	20 μL
Second Strand Synthesis Reaction Buffer	20 μL
Second Strand Synthesis Enzyme Mix	2.5 μL
ddH2O	7.5 μL
Total	50 μL

- 用移液器轻轻吹打混匀

■ 在 PCR 仪中按如下程序进行第二链 cDNA 合成反应

16℃	60 min
4℃	hold

- 热盖温度设置为 40℃

三． 双链 cDNA 纯化

- 每次使用 AMPure XP 磁珠前，请将 AMPure XP 磁珠从 4℃冰箱中取出，平衡至室温再用。且每次使用前，必须充分混匀 AMPure XP 磁珠。

1． 吸取 90 μL (1.8×)AMPure XP 磁珠至上述反应管中，用移液器轻轻吹打 10 次，**充分混匀**

2． 室温孵育 5min

3. 将反应管瞬时离心后，置于磁力架上静置 5 分钟进行磁珠的分离。待溶液澄清后，小心移除上清，避免接触并吸取磁珠

   - 切记勿弃除磁珠。

4. 保持反应管始终置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30 秒，小心移除上清
5. 重复步骤 4
6. 将反应管瞬时离心，并用移液器再次吸尽残留液体
7. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中，将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥（约5分钟)

   - 切记磁珠不要干燥时间太久，造成磁珠干燥过度，影响纯化效果。

8. 将反应管从磁力架中取出，加入 40 μL 灭菌超纯水洗脱 DNA，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀
9. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中，待溶液澄清后(约 5 分钟)，小心吸取 37 μL 上清至新的灭菌 PCR 管中

四、末端修复、加 dA 尾

1. PCR管中配制如下反应体系：

5×End Rapid Repair Reaction Buffer	10 μL
End Prep Enzyme Mix	3 μL
Purified dscDNA	37 μL

2. 使用移液器轻轻吹打，充分混匀上述溶液后，进行瞬时离心，将所有组分收集到管底
3. 按照下表设置PCR仪反应程序，将反应管放入PCR仪中

温度	时间
22℃	10 min
72℃	10 min
4℃	Hold forever

- 程序结束后立即进行接头连接反应

五、接头连接

1. 在完成末端修复的反应管中加入以下试剂：

Rapid ligase Buffer	10 μL
Ligase Mix	2 μL
Adapter	2.5 μL

反应管中溶液总体积为 64.5 μL

- **Rapid ligase Buffer 、Adapter 及 Ligase Mix 须分别依次加入反应管，不能做预混液后使用。**
- **如果样本超过 3 个或者在自动化仪器上操作，ddH$_2$O 可预先加入到 Adapter 中，再按照相应体积加入试剂。**

2. 用移液器轻轻吹打充分混匀后瞬时离心，使溶液收集到管底

2. 22℃反应 15 分钟

六、连接产物纯化

- **每次使用 AMPure XP 磁珠前，请将 AMPure XP 磁珠从冰箱中取出，平衡至室温使用。且每次使用前，必须充分混匀 AMPure XP 磁珠。**

A. 连接产物全纯化方案

1. 将 AMPure XP 磁珠从冰箱中取出，平衡至室温
2. 涡旋震荡混匀AMPure XP 磁珠
3. 取 80 μL（0.8×） 的 AMPure XP 磁珠至上述反应管中，用移液器轻轻吹打 10 次，**充分混匀**
4. 置于室温条件下，孵育 5 分钟
5. 将反应管瞬时离心后，置于磁力架中进行磁珠的分离。待溶液澄清后(约5分钟)，小心移除上清，避免接触并吸取磁珠

- **切记勿丢弃磁珠。**

6. 保持反应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 秒，小心移除上清
7. 重复步骤 6
8. 将反应管短暂离心，并用移液器吸尽残留液体
9. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中，将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约 5 分钟)

- **切记磁珠不要干燥时间太久，造成干燥过度，影响纯化效果。可以通过观察磁珠块出现第一道裂缝或者磁珠块表面光泽消失为干燥结束点。**

10. 将反应管从磁力架中取出，加入 25 μL 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 洗脱 DNA（如果需要进行步骤 B 的片段长度分选纯化，请用 101 μL 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 洗脱 DNA），涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静止 2 分钟
11. 将反应管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后(约 3 分钟)，小心吸取 23 μL（或者 100 μL）上清至新的 PCR 管中，进行 PCR 扩增（或者进行步骤 B 的片段长度分选纯化）

B. 连接产物片段长度分选纯化方案

表一： AMPure XP 磁珠文库分选纯化反应推荐条件

DNA 文库大小	插入片段	150 bp	200 bp	**250 bp**	300 bp	400 bp	500 bp	700 bp
	（插入片段+接头）	270 bp	320 bp	**370 bp**	420 bp	520 bp	620 bp	820 bp
磁珠用量	第一次选择	0.9×	0.8×	**0.7×**	0.6×	0.55×	0.5×	0.45×
	第二次选择	0.2×	0.2×	**0.2×**	0.2×	0.15×	0.15×	0.15×

- **表中“×”表示样品 DNA 体积。如文库插入片段长度为 250 bp，样品 DNA 体积为 100 μL，则第一轮分选磁珠使用体积为 0.7×100 μL =70 μL；第二轮分选磁珠使用体积为 0.2×100 μL =20 μL。**
- **以下操作流程只适合于已经经过连接产物全纯化，用 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 洗脱的 DNA，且插入片段长度为 250 bp 的文库，其他长度文库请根据表一选择最适磁珠量。**

1. 取出步骤 A 经过连接产物全纯化的 100 μL DNA
2. 涡旋震荡AMPure XP 磁珠，使其充分混匀
3. 吸取 70 μL (0.7×) AMPure XP 磁珠至上述反应管中，用移液器轻轻吹打 10 次，**充分混匀**
4. 室温孵育 5 分钟
5. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中分离磁珠。待溶液澄清后(约 5 分钟)，小心转移上清（约 165 μL）至干净管中
   - **特别注意，此步骤保留上清，吸取上清时避免碰到磁珠。**
6. 吸取 20 μL (0.2×)混匀的 AMPure XP 磁珠至上清中，用移液器轻轻吹打至充分混匀
7. 室温孵育 5 分钟
8. 将反应管瞬时离心后置于磁力架中分离磁珠，待溶液澄清后(约 5 分钟)，小心移除上清
9. 保持反应管始终处于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30 秒，小心移除上清
10. 重复步骤 9
11. 将反应管瞬时离心，并用移液器吸尽残留液体
12. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中，将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约 5 分钟)
    - **切记磁珠不要干燥时间太久，造成磁珠干燥过度，影响纯化效果。可以通过观察磁珠块出现第一道裂缝或者磁珠块表面光泽消失为干燥结束点。**
13. 将反应管从磁力架中取出，加入 25 μL 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 洗脱 DNA，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀
14. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中，待溶液澄清后(约 5 分钟)，小心吸取 23 μL 上清至新的 PCR 管中

除此之外，接头连接产物也可使用柱纯化或胶回收试剂盒进行纯化，最终使用同样体积的 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 或者洗脱缓冲液洗脱。

七、PCR 扩增

1.请根据您购买的接头引物试剂盒选择A或者B方案进行PCR扩增试剂添加

A 如果您使用的是依科赛公司二代测序多样本接头引物试剂盒（Index Primers 12，Illumina）（Cat. No. NGS00-1021或NGS00-1022），请在PCR管中按以下体系加入试剂，用移液器轻轻吹打，充分混匀。

连接 Adapter 后的纯化产物	23 μL
ExHiFi 2× PCR Master Mix	25 μL
Universal primer	1 μL
Index primer	1 μL
反应总体积	50 μL

B 如果您使用的是依科赛公司二代测序多样本接头引物试剂盒（Index Adapters 24，Illumina）（Cat. No. NGS00-1031，NGS00-1032，NGS00-1033，NGS00-1034，NGS00-1035，NGS00-1036，NGS00-1037或NGS00-1038），请在PCR管中按以下体系加入试剂，用移液器轻轻吹打，充分混匀。

连接 Adapter 后的纯化产物	23 μL
ExHiFi 2× PCR Master Mix	25 μL
Primer Mix	2 μL
反应总体积	50 μL

3. 按下表设置PCR仪反应程序，打开热盖，将上述PCR反应管放入PCR仪中，进行反应

温度	时间	
98℃	30 s	
98℃	10 s	13-15 循环
65℃	30 s	
72℃	30 s	
72℃	1 min	

起始RNA量为1μg时，建议PCR循环数为13个循环；PCR循环数也可根据实验需要进行优化。

八、PCR 产物纯化

1. 涡旋震荡混匀AMPure XP 磁珠
2. 吸取 45 μL (0.9×)的 AMPure XP 磁珠至上述 PCR 反应产物中（约 50 μL），用移液器轻轻吹打 10 次，充分混匀。
3. 置于室温条件下，孵育 5 分钟
4. 将反应管瞬时离心后，置于磁力架中进行磁珠的分离。待溶液澄清后(约5分钟)，小心移除上清，

避免吸取磁珠

- **切记勿丢弃磁珠。**

5. 保持反应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 秒，小心移除上清
6. 重复步骤 5
7. 将反应管瞬时离心，并用移液器吸尽残留液体
8. 打开反应管盖并保持反应管始终置于磁力架中，将磁珠暴露于空气中直至磁珠干燥(约 5 分钟)

- **切记磁珠不要干燥时间太久，造成干燥过度，影响纯化效果。可以通过观察磁珠块出现第一道裂缝或者磁珠块表面光泽消失为干燥结束点。**

9. 将反应管从磁力架中取出，加入 30 μL 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 洗脱 DNA，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀
10. 将反应管瞬时离心并置于磁力架中，待溶液澄清后(约5分钟)，小心吸取25 μL上清至新的PCR管中
11. 将制备好的DNA文库置于-20°C保存

除此之外，PCR 扩增产物也可使用柱纯化试剂盒进行纯化，最终使用同样体积的 10 mM Tris-HCl or 0.1×TE 或者洗脱缓冲液洗脱。

结果分析

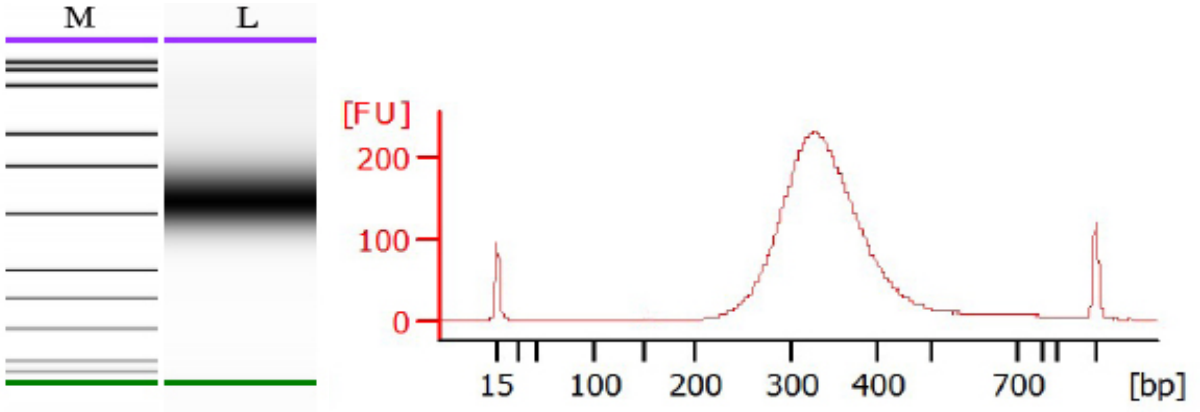
一. 文库浓度

为了得到高质量的测序结果，需要对 DNA 文库进行精确定量，首先推荐使用实时荧光定量 PCR（Real-time PCR）方法对 DNA 文库进行绝对定量。此外，还可使用荧光染料法，如 Qubit 法或荧光染料 picogreen 法，此处请勿使用基于吸光度测量的定量方法。最终可使用以下近似公式换算 DNA 文库的摩尔浓度。

文库平均总长度	近似转换公式	成簇反应 DNA 文库浓度
200 bp	1 ng/μL=7.5 nM	6-12 pM
300 bp	1 ng/μL=5.0 nM	6-12 pM
400 bp	1 ng/μL=3.8 nM	6-12 pM
500 bp	1 ng/μL=3.0 nM	6-12 pM

二. 文库长度分布

制备好的 DNA 文库可用琼脂糖凝胶电泳、Agilent 2100 Bioanalyzer 或 Fragment Analyzer 全自动毛细管电泳系统检测 DNA 文库中的片段长度分布范围。



Agilent 2100 Bioanalyzer 文库分析结果

M：DNA Ladder：15 bp，25 bp，50 bp，100 bp，150 bp，200 bp，300 bp，400 bp，500 bp，700 bp，850 bp，1000 bp，1500 bp。
L：使用 200 ng 人基因组 DNA 构建文库，磁珠进行选择回收后结果。

备注

在确认本产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。