



CWseq® TP- rapid RNA Library Prep Kit for Illumina

转座酶法RNA文库快速制备试剂盒 Illumina

Cat. No. CW3088

产品简介

CWseq® TP- rapid RNA Library Prep Kit for Illumina是针对Illumina测序平台研发转座酶法RNA文库试剂盒。本试剂盒将野生型的转座酶进行特异性突变，特异性识别RNA/DNA 杂交链并完成片段化。本试剂盒只需合成cDNA一链，无需进行二链合成后再进行DNA打断建库，在2h内即可完成文库构建。本试剂盒缩短了建库时间，在扩增模块采用高保真DNA聚合酶进行文库富集，无偏好的进行PCR扩增，保证了测序结果准确性。

保存条件

-20±5℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW3088S (24 rxns)	CW3088M (96 rxns)
5×HiFiScript RT MasterMix	96 μL	384 μL
RNasin	24 μL	96 μL
PEG Solution	96 μL	384 μL
5×FA Reaction Buffer	168 μL	336 μL×2
TPS	72 μL	288 μL
2×Super HiFi PCR Mix	1.2 mL	1.2 mL×4

适用范围

本产品适用于动物、植物、微生物等多物种的Total RNA、mRNA或经rRNA去除后的RNA文库构建:

1. 对于mRNA建库, 建议使用高质量的RNA模板(RIN \geq 7)。因为低质量的RNA建库可能会引起3'偏好。建议使用10ng-1000ng Total RNA使用CWseq® mRNA Capture Kit 2.0 (CW3090)或其他同类mRNA捕获试剂进行mRNA富集后建库。
2. 针对RIN值 $<$ 7的RNA模板, 可使用去除rRNA的方法(推荐使用康为世纪CW3092或其他同类试剂)进行rRNA去除后再建库, 建议在去除rRNA后进行RNA定量, 选择 \leq 200ng的起始量进行建库。
3. 如果采用Total RNA进行建库, 建议进行RNA定量后, 选择1ng-200ng范围的起始量进行建库。

自备仪器、试剂和耗材

1. RNA质量评估及文库评估
Equalbit RNA HS Assay Kit
Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent #5067-1513)
Nanodrop (thermofisher #Nanodrop2000)
2. 接头引物
推荐使用康为世纪转座酶法二代测序多样本引物试剂盒 (Illumina) (Cat.No. CW2958、CW2959)
3. 纯化磁珠
推荐使用康为世纪DNA纯化试剂盒 (Cat.No. CW3171)
4. 其他材料:
低吸附的PCR管, 1.5 mL离心管, 过滤枪头, 磁力架 (建议使用DynaMagTM-2 Cat.No. 12321D), 无水乙醇 (100%乙醇, 分析纯), 去离子水 (pH在7.0-8.0之间), PCR仪器等。

实验前准备及重要注意事项

1. 为保证建库质量, 在开始实验前必须对RNA样品进行质控, RNA样品总量、纯度和完整性须满足以下条件:
OD260/OD280比值介于1.8-2.1之间, 若比值>2.1则RNA样品中可能有基因组污染, 若比值<1.8则可能有蛋白质污染; OD230/OD260比值介于0.4-0.5之间, 若比值>0.5则可能RNA样品中有盐或小分子杂质污染, 比值<0.4可能有基因组污染。若使用Bioanalyzer进行RNA完整性检测, 建议RIN值>7.0; 若使用琼脂糖凝胶电泳检测, 则28 s和18 s条带无明显降解, 且无蛋白质和基因组污染。
2. 对于以下四种情况可尝试建库但不保证建库质量。
 - a) RIN或RQN值略低于标准, 但基线光滑。
 - b) RIN或RQN值达到标准, 但基本线略有上升。
 - c) 基线光滑, RQN值达到标准, 5S峰值略高。
 - d) 28S/18S或23S/16S值略低于标准, 但基本线光滑。
3. 建议使用带滤芯的吸头, 在吸取不同样品时更换吸头。
4. 实验过程中务必使用新鲜的Nuclease-free H₂O, 建议分装至小管中逐个取用, 用后弃去。
5. 务必佩戴手套操作, 接触RNase-free空间外设备或其他工作区间后, 请更换手套。
6. 所有的试剂使用后务必立即盖上盖子, 避免污染。

建库流程示意图



mRNA富集文库构建操作流程

1. mRNA富集
对Total RNA定量后取10 ng-1000 ng进行mRNA富集。
2. RNA逆转录
 - 2.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀, 瞬时离心后置于冰上备用。
配置如下体系:

表1 逆转录体系配置

组分	体积
RNA Sample	15 μ L
5×HiFiScript RT Master Mix	4 μ L
RNasin	1 μ L
Total	20 μ L

2.2 轻弹混匀, 短暂离心收集置于冰上, 按照下述逆转录反应程序立即进行反应。

2.3 逆转录程序参见下表 (PCR仪热盖温度80°C):

表2 逆转录反应程序

步骤	温度	时间
1	25°C	5 min
2	37°C	30 min
3	70°C	10 min
4	4°C	Hold

3. 片段化

3.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀备用, 瞬时离心后置于冰上备用。

配置如下体系

表3 片段化体系配置

组分	体积
上述反应液	20 μ L
5 \times FA Reaction Buffer	7 μ L
TPS	0.5 μ L
PEG Solution	4 μ L
Nuclease-free ddH ₂ O	3.5 μ L
Total	35 μ L

3.2 涡旋混匀或移液枪吹打10次混匀, 短暂离心, 按照下述片段化反应程序立即进行片段化反应。

3.3 片段化程序参见下表 (PCR仪热盖温度65°C), 程序结束后置于冰上备用。

表4 片段化反应程序

步骤	温度	时间
1	55°C	10 min
2	4°C	Hold

注意: 片段化55°C 10 min完成后不可停, 需要进行PCR富集。

4. PCR富集

4.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀备用, 瞬时离心后置于冰上备用。

引物建议使用康为世纪转座酶法二代测序多样本引物试剂盒 (Illumina) (Cat.No. CW2958、CW2959)。配置如下体系:

表5 PCR扩增体系

组分	体积
上述反应液	35 μ L
2 \times Super HiFi PCR Mix	50 μ L
i5 index (N5XX)	2.5 μ L
i7 index (N7XX)	2.5 μ L
Nuclease-free ddH ₂ O	10 μ L
Total	100 μ L

4.2 涡旋混匀或移液枪吹打10次混匀，短暂离心，按照下述PCR扩增反应程序立即进行PCR反应。

4.3 PCR富集程序参见下表 (PCR仪热盖温度105 $^{\circ}$ C)

表6 PCR扩增程序

温度	时间	循环数
72 $^{\circ}$ C	3 min	1
98 $^{\circ}$ C	30 s	1
98 $^{\circ}$ C	15 s	
60 $^{\circ}$ C	30 s	参考表7
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	5 min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	1

表7 扩增循环数参考表

Total RNA投入量	循环数
10 \leq 投入量 \leq 20 ng	17- 20
20 < 投入量 \leq 200 ng	14 - 17
200 < 投入量 \leq 1000 ng	11 - 14

注意: 上表是依据高质量Input RNA时测得的循环数。当RNA样品质量较差时, 可适当提高循环数以获取足量文库。

5. PCR文库纯化

5.1 纯化磁珠 (推荐使用Cat.No. CW3171) 使用前应震荡混匀后置于室温平衡30 min。

5.2 PCR产物中加入80 μ L平衡至室温的磁珠, 涡旋震荡5秒钟后, 室温静置5分钟。

5.3 短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需3 - 5分钟), 小心吸取上清并弃除, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意: 不要弃除磁珠。

5.4 继续保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入200 μL 新鲜配置的80%乙醇, 室温放置30秒, 小心弃除上清。

注意: 加乙醇时, 液体不可直接吹打到磁珠上。

5.5 重复步骤 5.4。

5.6 保持离心管固定于磁力架上, 室温静置干燥至磁珠表面微裂, 加入25 μL ddH₂O回溶。

注意: 不要使磁珠过度干燥, 以免影响洗脱效率。

5.7 将离心管从磁力架上取下, 涡旋振荡使磁珠完全重悬, 室温静置5分钟。短暂离心, 将离心管放于磁力架上直至溶液澄清, 将上清溶液转移至一个新的离心管中。

-20°C保存。若需长期保存, 则置于-80°C保存。

rRNA去除文库构建操作流程

1. rRNA去除

针对RIN值<7的RNA模板, 可使用去除rRNA的方法(推荐使用康为世纪CW3092或其他同类试剂)进行rRNA去除后再建库, 建议在去除rRNA后进行RNA定量, 选择 ≤ 200 ng范围的起始量进行建库。在RNA样本的RIN值较低 (≤ 3) 时, 比如FFPE样本RNA、运输或保存不当的RNA样本, 导致RNA降解, 质检时RNA主峰小于500nt时, 使用转座酶方案建库效率低。所以在RIN值较低 (≤ 3) 的情况下, Total RNA的投入需要大于100 ng, 且扩增cycle数相较于mRNA富集建库要增加2-3个循环。

2. RNA逆转录

2.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀, 瞬时离心后置于冰上备用。

配置如下体系:

表1 逆转录体系配置

组分	体积
RNA Sample	15 μL
5 \times HiFiScript RT Master Mix	4 μL
RNasin	1 μL
Total	20 μL

2.2 轻弹混匀, 短暂离心收集置于冰上, 按照下述逆转录反应程序立即进行反应。

2.3 逆转录程序参见下表 (PCR仪热盖温度80°C):

表2 逆转录反应程序

步骤	温度	时间
1	25°C	5 min
2	37°C	30 min
3	70°C	10 min
4	4°C	Hold

3. 片段化

3.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀备用, 瞬时离心后置于冰上备用。配置如下体系

表3 片段化体系配置

步骤	体积
上述反应液	20 μ L
5×FA Reaction Buffer	7 μ L
TPS	0.5-3 μ L 参考表4
PEG Solution	4 μ L
Nuclease-free ddH ₂ O	up to 35 μ L

表4 TPS投入体积表

RNA投入量 (rRNA去除后定量)	TPS投入体积
0 < 投入量 \leq 1 ng	0.5 μ L
1 < 投入量 \leq 50 ng	1 μ L
50 < 投入量 \leq 200 ng	3 μ L

3.2 涡旋混匀或移液枪吹打10次混匀, 短暂离心, 按照下述片段化反应程序立即进行片段化反应。

3.3 片段化程序参见下表 (PCR仪热盖温度65°C), 程序结束后置于冰上备用。

表5 片段化反应程序

步骤	温度	时间
1	55°C	10 min
2	4°C	Hold

注意: 片段化55°C 10 min完成后不可停, 需要进行PCR富集。

4. PCR富集

4.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀备用, 瞬时离心后置于冰上备用。

引物建议使用康为世纪转座酶法二代测序多样本引物试剂盒 (Illumina) (Cat.No. CW2958、CW2959)。配置如下体系:

表6 PCR扩增体系

组分	体积
上述反应液	35 μ L
2 \times Super HiFi PCR Mix	50 μ L
i5 index	2.5 μ L
i7 index	2.5 μ L
Nuclease-free ddH ₂ O	5 μ L
Total	100 μ L

4.2 涡旋混匀或移液枪吹打10次混匀, 短暂离心, 按照下述PCR扩增反应程序立即进行PCR反应。

4.3 PCR富集程序参见下表 (PCR仪热盖温度105 $^{\circ}$ C):

表7 PCR扩增程序

温度	时间	循环数
72 $^{\circ}$ C	3 min	1
98 $^{\circ}$ C	30 s	1
98 $^{\circ}$ C	15 s	
60 $^{\circ}$ C	30 s	参考表8
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	5 min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	1

表8 扩增循环数参考表

RNA投入量 (rRNA去除后定量)	循环数
0 < 投入量 \leq 20 ng	17- 20
20 < 投入量 \leq 200 ng	14 - 17

注意: 上表是依据高质量Input RNA时测得的循环数。当RNA样品质量较差时, 可适当提高循环数以获取足量文库。

5. PCR文库纯化

5.1 纯化磁珠 (推荐使用Cat.No. CW3171) 使用前应震荡混匀后置于室温平衡30 min。

5.2 PCR产物中加入80 μ L平衡至室温的磁珠, 涡旋震荡5秒钟后, 室温静置5分钟。

5.3 短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需3 - 5分钟), 小心吸取上清并弃除, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意: 不要弃除磁珠。

5.4 继续保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入200 μ L新鲜配置的80%乙醇, 室温放置30秒, 小心弃除上清。

注意: 加乙醇时, 液体不可直接吹打到磁珠上。

5.5 重复步骤 5.4。

5.6 保持离心管固定于磁力架上，室温静置干燥至磁珠表面微裂，加入25 μ L ddH₂O回溶。

注意：不要使磁珠过度干燥，以免影响洗脱效率。

5.7 将离心管从磁力架上取下，涡旋振荡使磁珠完全重悬，室温静置5分钟。短暂离心，将离心管放于磁力架上直至溶液澄清，将上清溶液转移至一个新的离心管中。

-20°C保存。若需长期保存，则置于-80°C保存。

Total RNA文库构建操作流程

建议病原类样本可直接投入Total RNA进行建库

1. Total RNA定量

如果采用Total RNA进行建库，建议进行RNA定量后，选择1-200 ng范围的起始量进行建库。

2. RNA逆转录

2.1 室温解冻所需试剂，上下颠倒混匀，瞬时离心后置于冰上备用。配置如下体系：

表1 逆转录体系配置

组分	体积
RNA Sample	15 μ L
5 \times HiFiScript RT Master Mix	4 μ L
RNasin	1 μ L
Total	20 μ L

2.2 轻弹混匀，短暂离心收集置于冰上，按照下述逆转录反应程序立即进行反应。

2.3 逆转录程序参见下表 (PCR仪热盖温度80°C)

表2 逆转录反应程序

步骤	温度	时间
1	25°C	5 min
2	37°C	30 min
3	70°C	10 min
4	4°C	Hold

3. 片段化

3.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀备用, 瞬时离心后置于冰上备用。配置如下体系:

表3 片段化体系配置

步骤	体积
上述反应液	20 μL
5 \times FA Reaction Buffer	7 μL
TPS	1-3 μL (参考表4)
PEG Solution	4 μL
Nuclease-free ddH ₂ O	up to 35 μL

表4 TPS投入体积表

Total RNA投入量	TPS投入体积
1 \leq 投入量 \leq 50 ng	1 μL
50 < 投入量 \leq 200 ng	3 μL

3.2 涡旋混匀或移液枪吹打10次混匀, 短暂离心, 按照下述片段化反应程序立即进行片段化反应;

3.3 片段化程序参见下表 (PCR仪热盖温度65 $^{\circ}\text{C}$), 程序结束后置于冰上备用。

表5 片段化反应程序

步骤	温度	时间
1	55 $^{\circ}\text{C}$	10 min
2	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

4. PCR富集

4.1 室温解冻所需试剂, 上下颠倒混匀备用, 瞬时离心后置于冰上备用。引物建议使用康为世纪转座酶法二代测序多样本引物试剂盒 (Illumina) (Cat.No. CW2958、CW2959)。配置如下体系:

表6 PCR扩增体系

组分	体积
上述反应液	35 μL
2 \times Super HiFi PCR Mix	50 μL
i5 index	2.5 μL
i7 index	2.5 μL
Nuclease-free ddH ₂ O	5 μL
Total	100 μL

4.2 涡旋混匀或移液枪吹打10次混匀，短暂离心，按照下述PCR扩增反应程序立即进行PCR反应。

4.3 PCR富集程序参见下表 (PCR仪热盖温度105℃):

表7 PCR扩增程序

温度	时间	循环数
72℃	3 min	1
98℃	30 s	1
98℃	15 s	
60℃	30 s	参考表8
72℃	30 s	
72℃	5 min	1
4℃	Hold	1

表8 扩增循环数参考表

Total RNA投入量	循环数
1≤投入量≤20 ng	17- 20
20 < 投入量≤200 ng	14 - 17

注意: 上表是依据高质量Input RNA时测得的循环数。当RNA样品质量较差时, 可适当提高循环数以获取足量文库。

5. PCR文库纯化

5.1 纯化磁珠 (推荐使用Cat.No. CW3171) 使用前应震荡混匀后置于室温平衡30 min。

5.2 PCR产物中加入80 μL平衡至室温的磁珠, 涡旋震荡5秒钟后, 室温静置5分钟。

5.3 短暂离心, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠和上清溶液分离, 直至溶液澄清 (约需3-5分钟), 小心吸取上清并弃除, 期间避免接触已结合目标DNA的磁珠。

注意: 不要弃除磁珠。

5.4 继续保持离心管固定于磁力架上, 向离心管中加入200 μL新鲜配置的80%乙醇, 室温放置30秒, 小心弃除上清。

注意: 加乙醇时, 液体不可直接吹打到磁珠上。

5.5 重复步骤 5.4。

5.6 保持离心管固定于磁力架上, 室温静置干燥至磁珠表面微裂, 加入25 μL ddH₂O回溶。

注意: 不要使磁珠过度干燥, 以免影响洗脱效率。

5.7 将离心管从磁力架上取下, 涡旋振荡使磁珠完全重悬, 室温静置5分钟。短暂离心, 将离心管放于磁力架上直至溶液澄清, 将上清溶液转移至一个新的离心管中。

-20℃保存。若需长期保存, 则置于-80℃保存。