AlNoVar™ mRNA Library Prep Kit

产 品 说 明 书 • PRODUCT DESCRIPTION

ME Instruments Inc.
铭 毅 智 造

产品概述

本试剂盒适用于 Illumina、MGI 及铭毅智造等多款 NGS 测序平台，由 poly(A) mRNA 捕获、逆转录、双链 cDNA 合成、片段化、末端修复，接头连接和高保真 PCR 富集所需的预混酶模块组成，搭配不同测序平台接头以及测序引物试剂盒，可将提取的 RNA&DNA 样本制备成适配多款 NGS 测序平台使用的 DNA 文库。试剂盒操作简便，文库产量稳定，可提供高质量的 DNA 文库。

产品货号

MEK0821-24T、MEK0821-96T

来源

试剂盒中单个酶组分均来自于携带基因工程酶的大肠杆菌菌株。

纯度

单个酶组分纯度≥95%

产品组成及规格

组分名称	规格			使用说明
	MEK0821-8T（S）	MEK0821-24T	MEK0821-96T	
Random Primer Mix (A 管)	16 μL×1管	48 μL×1管	192 μL×1管	2 μL/反应
1st Strand Buffer (B 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
1st Strand Enzyme Mix (C 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
2nd Strand Buffer (D 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
2nd Strand Enzyme Mix (E 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
FEA Pro Buffer (F 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
FEA Enzyme Pro Mix (G 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
Rapid Ligation Buffer (H 管)	240 μL×1管	720 μL×1管	720 μL×4管	30 μL/反应
Rapid DNA Ligase (I 管)	40 μL×1管	120 μL×1管	480 μL×1管	5 μL/反应
2× Amplification Mix (J 管)	200 μL×1 管	600 μL×1 管	600 μL×4 管	25 μL/反应
2× Oligo(dT)25 Capture Beads (K 管)	400 μL×1 管	1.2 mL×1 管	1.2 mL×4 管	50 μL/反应
mRNA Binding Buffer (L 管)	400 μL×1 管	1.2 mL×1 管	1.2 mL×4 管	50 μL/反应
Washing Buffer (M 管)	3.2 mL×1 管	9.6 mL×1 管	38.4 mL×1 管	——
Tris Buffer (N 管)	400 μL×1 管	1.2 mL×1 管	1.2 mL×4 管	50 μL/反应

储存条件及有效期

-20±5℃储存，有效期 18 个月。

2× Oligo(dT)25 Capture Beads (K 管)，2-8℃保存，避免冷冻！

参考流程

自备仪器，设备和耗材：

1．DNA 纯化回收试剂盒（磁珠纯化）及配套设备耗材；

2. 其他材料：80%乙醇（新鲜配制）、无核酸酶水；PCR 管、PCR 仪、磁力架、枪头等。

实验前准备：

- 请使用无 RNase 污染，并对实验区域进行清理；
- 所有组分和反应装置应保持在冰上；
- 将酶 Mix 和扩增反应液在，短暂离心，备用。

实验流程

1． Poly(A) mRNA 捕获

此试剂盒操作要求起始材料为真核生物的 Total RNA（带有 poly(A)尾），且 RNA RIN score≥7。RNA 样本准备在冰上进行，其它过程均 室温操作。

2× Oligo(dT)25 Capture Beads (K 管)平衡至室温，涡旋混匀。按下表体积配制反应体系：

试剂	初始量 uL
total RNA （10ng~1ug）	X
无核酸酶水	50-X
2× Oligo(dT)25 Capture Beads (K 管)	50
Total	100

吹打混匀，上述体系，将混合物放入 PCR 仪中孵育，PCR 仪设置如下：

反应温度	反应时间
热盖 75℃	On
65℃	5 min
25℃	5 min

孵育结束后，取出 PCR 管置于磁力架上约 2min 至溶液变澄清，弃上清；

加入 200uL Washing Buffer (M 管) 吹打混匀，再次置于磁力架上，至溶液变澄清，弃上清；

加入 50uL Tris Buffer (N 管) ，吹打混匀后 PCR 仪上孵育，程序设置如下；

反应温度	反应时间
热盖 105℃	On
80℃	2 min

加入 50uL mRNA Binding Bufer (L 管)，吹打混匀，室温静置 5min；

将离心管置于磁力架上约 2min，至溶液变澄清，弃上清；

加入 200uLWashing Bufer (M 管)，吹打混匀，至溶液变澄清，弃上清；

盖上管盖稍微离心后，置于磁力架上，用 10uL 移液器将残留液体完全弃除。

加入 10uLNuclease-free Water，使用移液器吹打混匀，80℃ 2min，立即置于磁力架上放置 5min，待溶液澄清后，取 8uL 上清至新的 PCR 管中,立即放置于冰上待用。

2. 第一链 cDNA 合成

• 按照下表配制反应体系：

组分名称	1个反应用量
上一步产物	8uL
Random Primer Mix (A 管)	2 μL
Total	10 μL

• 使用移液器轻轻吸打充分混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。

• 在 PCR 仪上运行如下程序：

反应温度	反应时间
热盖 75℃	On
65℃	5 min
4℃	∞

• 向第一步的 PCR 管中加入以下组分：

组分名称	1个反应用量
上步产物（管内已含）	10 μL
1st Strand Buffer (B 管)	5 μL
1st Strand Enzyme Mix (C 管)	5 μL
Total	20 μL

• 在 PCR 仪上运行如下程序：

反应温度	反应时间
热盖 105℃	On
25℃	5 min
50℃	10 min
80℃	5 min
4℃	∞

3. 第二链合成

• 按照下表继续向 PCR 管中加入以下组分，配制第二链合成反应体系：

组分名称	1个反应用量
上步产物（管内已含）	20 μL
2nd Strand Buffer (D 管)	5 μL
2nd Strand Enzyme Mix (E 管)	5 μL
Total	30 μL

• 在 PCR 仪上进行第二链合成反应，运行如下程序：

反应温度	反应时间
热盖	Off
16℃	5 min
4℃	∞

4. 二链合成产物纯化

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；

• 建议体系内加入 50 μL 磁珠，用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 将 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 重复 80%乙醇漂洗步骤一次；

• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；

• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3~5 min，吸取 20 μL 至一个新 PCR 管；

• 将纯化后的产物保存在-20℃。

5. 片段化/末端修复

• 使用无核酸酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

组分名称	1个反应用量
上一步反应产物	20 μL
FEA Pro Buffer (F 管)	5 μL
FEA Enzyme Pro Mix (G 管)	5 μL
Total	30uL

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，PCR 仪 95℃热盖，程序设置如下：

反应步骤	循环数	反应温度	反应时间
预冷	1 cycle	4℃	+∞
酶切	1 cycle	32℃	20min*
终止酶切反应	1 cycle	65℃	30 min
结束	1 cycle	4℃	∞

*根据实验室条件自行测试。

DNA 片段化时间推荐

Fragment Peak Size	孵育参考时间			
	200bp	250bp	300bp	300-500bp
基因组 DNA（10ng-1ug）	30min（28-33min）	25min（22-28min）	20min（17-23min）	5-15min（—）
基因组 DNA（0.1ng-10ng）	20min（17-23min）	15min（13-17min）	10min（8-13min）	——

6． 快速接头连接

• 使用无 DNA 酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

组分名称	1 个反应用量（片段化 DNA）
上一步产物	30 μL
Rapid Ligation Buffer（H 管）	30 μL
Rapid DNA Ligase（I 管）	5 μL
通用接头[a]	5 μL
无核酸酶水	30 μL
Total	100μL

a：请参考表 1 的连接接头建议浓度，对接头进行稀释。

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，程序设置如下：

反应步骤	反应温度	反应时间
热盖	——	Off
接头连接	20℃	15 min
结束	4℃	∞

表1：连接接头建议浓度

Total RNA 投入量	连接接头浓度(μM)
10~100 ng	0.5
100~500 ng	2.0
500~1000 ng	5.0

7．连接产物纯化

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；

• 建议在连接后 100 μL 体系内加入 80 μL(0.8×)磁珠（使用前需充分混匀），用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 将 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 重复 80% 乙醇漂洗步骤一次；

• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；

• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 21 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3-5 min，吸取 20 μL 至一个新 PCR 管中，准备下一步实验；

• 如需进行两步片段分选，请参照 PCR 产物回收试剂盒（磁珠纯化）说明书进行。

8．高保真 PCR富集

• 使用无核酸酶的洁净 PCR 管，在冰浴上配制反应体系：

组分名称	1 个反应用量
2× Amplification Mix (J 管)	25 μL
纯化后连接产物	20 μL
Primer mix [b]	5 μL
Total	50 μL

b: 请选择与测序平台适配的 Primer mix

• 密封 PCR 管并短暂离心，轻轻涡旋震荡，使试剂混匀后，再次短暂离心，避免产生气泡。

• 将 PCR 管从冰上转移到 PCR 扩增仪上，PCR 仪 105℃热盖，程序设置如下：

反应步骤	循环数	反应温度	反应时间
预变性	1 cycle	98℃	45 sec
退火延伸	6-17 cycles[c]	98℃	15 sec
		60℃	30 sec
		72℃	30 sec
循环外延伸	1 cycle	72℃	60 sec
结束	1 cycle	4℃	∞

c: 建议文库循环数见表 2

表 2：建议文库扩增循环数

初始投入量	1μg 文库产出量建议循环数[d]
10~100 ng	12-17
100~500 ng	8-11
500~1000 ng	6-7

9．高保真 PCR富集产物纯化

• 提前将所需磁珠涡旋混匀后，在室温平衡至少 30 min；

• 建议 PCR 富集体系 50uL 内加入 50uL（1x）磁珠（使用前需充分混匀），用移液器吸打混匀 10 次，室温孵育 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 5 min，小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 将 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 现用现配 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s 后小心移除上清液，枪头不要碰到磁珠；

• 重复 80%乙醇漂洗步骤一次；

• 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器小心移除剩余的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留；

• 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 31 μL 无核酸酶水重悬磁珠，静置 5 min；

• 将 PCR 管置于磁力架上静置 3 ~ 5 min，吸取 30 μL 至一个新 PCR 管；

• 将纯化后的文库保存在-20℃。

公司地址：重庆市江北区铁山坪街道港城东环路 6 号 4 幢 8-2、9-2 网址：www.me-itech.com 邮箱：mingyi@me-itech.com