Version 1

Code No. AG12714

AccuNext Small RNA 连接法文库制备试剂盒（Illumina）

AccuNext Small RNA Ligation Library Prep Kit for Illumina

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

目录

- 产品概述 1
- 保存及运输 1
- 产品组成 2
- 实验原理及流程 3
- 使用注意事项 4
- 适用范围 5
- 实验前准备 5
- 操作方法 5

A. 3' Adapter 连接 6

B. 多余 3 端接头封闭 6

C. 5' Adapter 连接 7

D. 反转录 7

E. 文库扩增 8

F. 文库纯化 9

G. 文库质量检测 10

H. 文库分选 10

- 实验示例 11
- 附录 1：*AccuNext* SmRNA 接头引物（Illumina）的信息 12

➢ 产品概述

AccuNext Small RNA Ligation Library Prep Kit for Illumina 是针对 Illumina 高通量测序平台开发的 small RNA 测序文库制备试剂盒。本产品适用于模板起始量为 10 ng ~ 1 μg 的动植物 total RNA，提取纯化后的 small RNA 以及分离纯化的血清、血浆、外泌体 RNA。在 small RNA 的 3' 端和 5' 端分别连上接头，再经过逆转录、搭配 Illumina 测序接头的引物进行 PCR 扩增【例如，本公司 *AccuNext* SmRNA 接头引物（Illumina）（Code No. AG12715）】，通过磁珠分选或切胶回收，获得适用于 Illumina 测序平台的 small RNA 文库。

本产品依赖 RNA 底物具有 5' 端磷酸基团和 3' 端游离羟基。天然内源 small RNA（如 miRNA、siRNA 等）通常具备该末端结构，可直接用于建库。若 RNA 样本存在末端结构损伤（如降解、缺失磷酸基团或形成环化结构），建议先进行末端修复后再建库，以免因底物结构异常导致连接失败。若使用经过化学修饰或人工合成的 RNA，请预先确认末端结构是否符合上述要求；若不符，可能造成连接效率极低或无法建库。

本产品包含文库构建所需的所有酶和缓冲液，所有组分都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。实验中所有试剂请使用本产品中组分，不建议改变任何反应组分的用量及浓度或用其他等效产品替换，以免获得不好的结果，如需替换，请先进行验证。

➢ 保存及运输

保存温度：Package 2-1 -80 ℃保存

Package 2-2 -20 ℃保存

运输温度：Package 2-1 干冰运输

Package 2-2 -20 ℃冰袋运输或干冰运输

➢ 产品组成

Package 2-1 组分如下（-80℃保存）：

组分名称	12 rxns
5' Adapter Primer	12 μl

Package 2-2 组分如下（-20℃保存）：

组分名称	12 rxns
3' Adapter Primer	24 μl
3' Ligase Buffer	120 μl
3' Ligase Enzyme	12 μl
RT Primer	12 μl
RNase Inhibitor	12 μl
5' Ligase Buffer	72 μl
5' Ligase Enzyme	12 μl
RT Enzyme Mix	120 μl
smRNA PCR Mix	480 μl
smRNA Universal Primer	12 μl
Nuclease free water	1 ml

注意：*AccuNext* SmRNA 接头引物（Illumina）（Code No. AG12715）为实验必须试剂，但本产品中未配置，需要单独购买。*AccuNext*** SmRNA 接头引物（Illumina）的信息见附录 1。

➢ 实验原理及流程

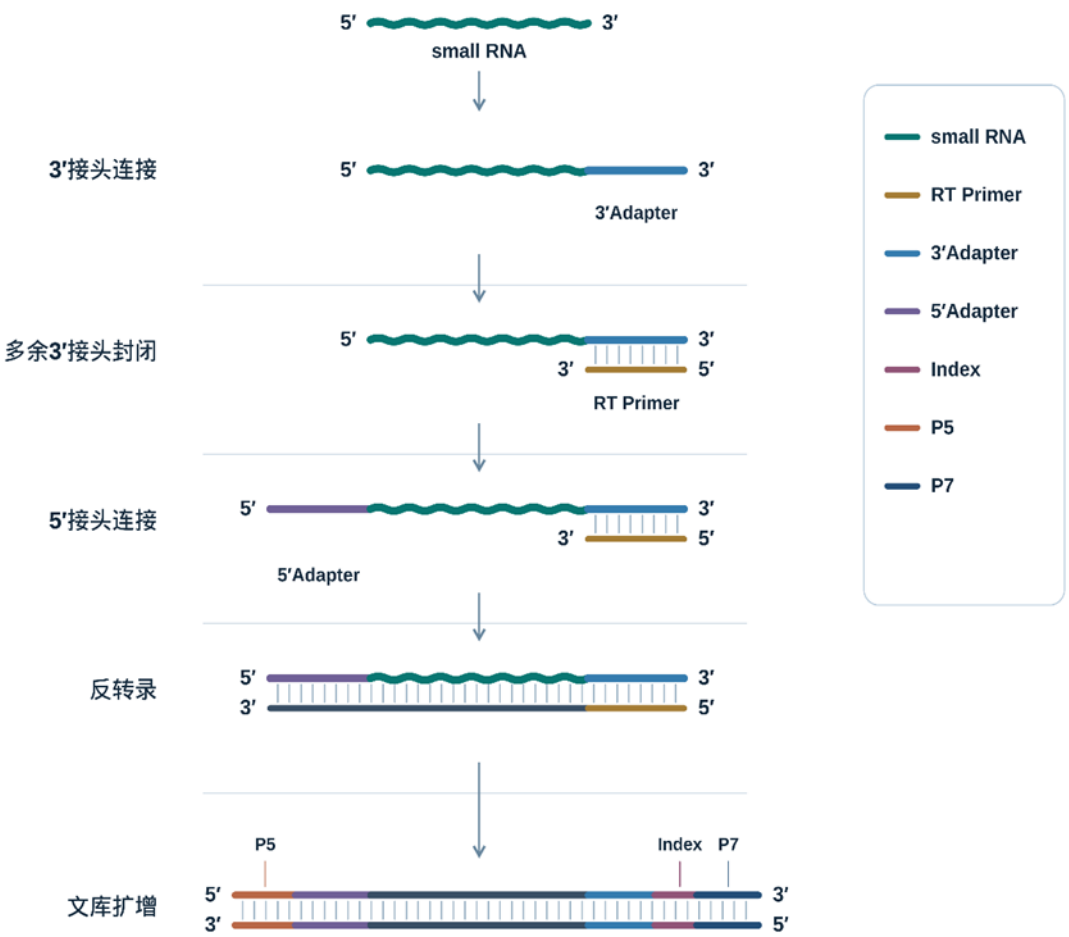

图 1：文库构建原理



图 2：文库结构

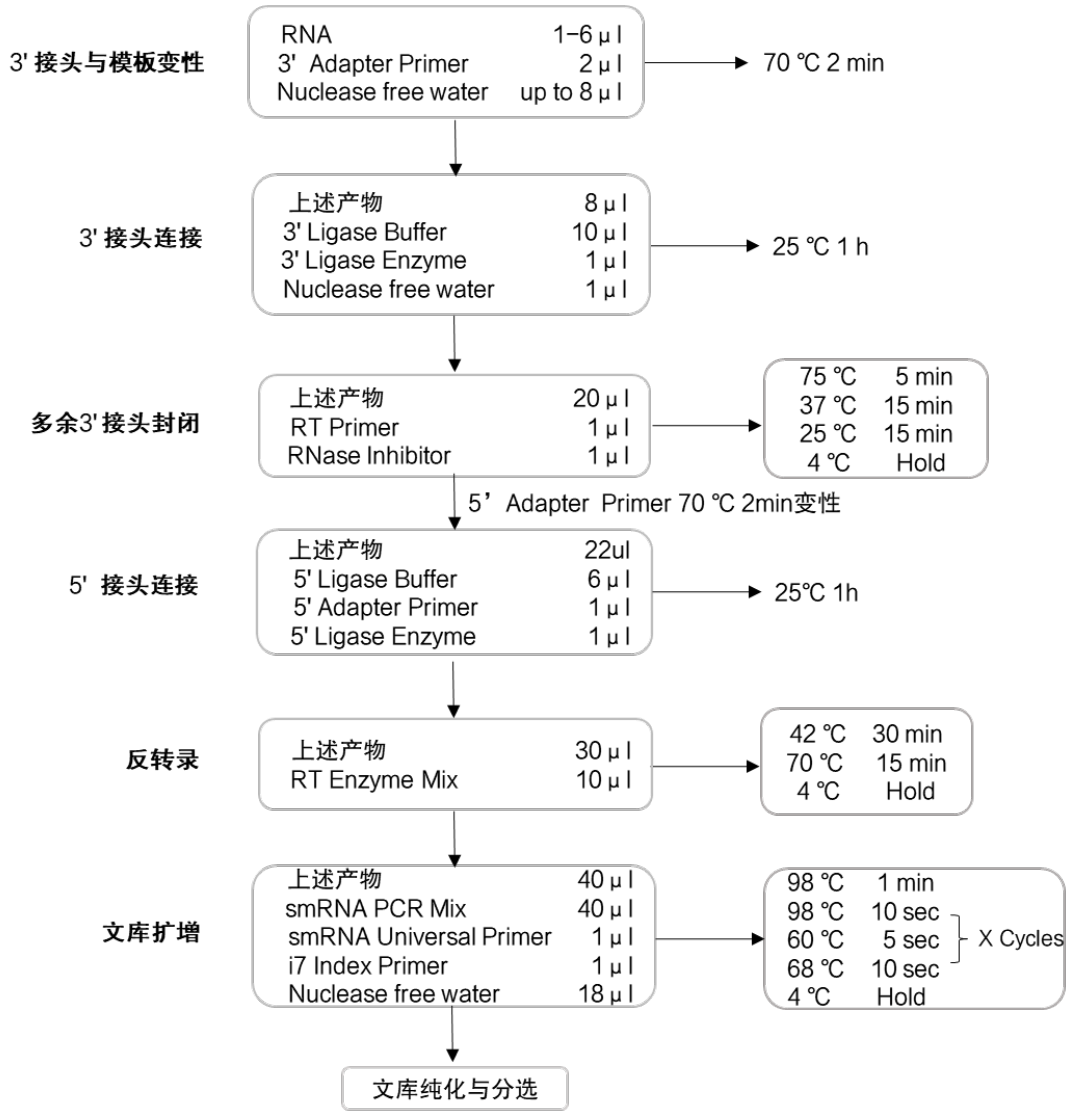

图 3：实验操作流程

➢ 使用注意事项

1. 5' Adapter Primer 为 RNA 接头，请置于-80 ℃保存。
2. 试剂盒中的各酶类组分，请置于-20 ℃保存。使用前混匀并进行短暂离心，避免粘附于管壁及管盖，造成损失；使用时应置于冰上，使用后及时保存于-20 ℃，否则会导致酶活降低。
3. 3' Ligase Buffer 比较粘稠，使用该试剂时需缓慢吸取，保证吸取体积的准确。
4. 实验过程中请使用 RNase free 的枪头、EP 管、PCR 管，吸取不同样品时请更换枪头
5. 请佩戴手套、口罩操作，接触 RNase free 空间外设备或其他工作区间后，请更换手套。

➢ 适用范围

1. 本产品适用于起始量为 10 ng ~ 1 μ g 的动植物 total RNA。建议 RNA 提取纯化后，使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit（Agilent，货号 5067-1513）评价 RNA 完整性，确认 RIN≥7 后再进行后续建库实验。total RNA 的质量直接决定文库构建成败，为确保文库质量，建议优先选择完整无降解、无蛋白质及基因组 DNA 污染、且小 RNA 组分充足的 RNA 样品。
2. 提取的 small RNA。由于不同来源和提取方式获得的 small RNA 得率、纯度差异较大，本产品暂不提供具体推荐投入量。建议根据实际样品情况设置投入量梯度进行预实验，以确定最佳建库投入量。
3. 分离纯化的血清、血浆、外泌体 RNA。

➢ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

- ❖ Illumina 测序接头引物：*AccuNext* SmRNA 接头引物（Illumina）（Code No. AG12715）或其他等效产品。
- ❖ DNA 评价：*AcuQ* 1X dsDNA（高灵敏度）定量试剂盒（AG12549 / AG12550）及 Agilent DNA High Sensitivity DNA Kit (Agilent)或其他等效产品。
- ❖ 其他材料：PBS、80%乙醇，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管等。

2. 仪器：

- ❖ 离心机、PCR 仪、Qubit 荧光计、Agilent 2100 生物分析仪、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

➢ 操作方法

接头用量需根据 RNA 起始投入量进行调整。接头量不足会导致文库产量偏低，接头量过量则易产生接头二聚体残留，影响文库纯度。为兼顾文库产量与质量，推荐按表 1 对接头进行稀释。

表 1：不同起始量 Total RNA 投入对应接头稀释倍数参考表*a

模板投入量	接头稀释倍数*b
500 ng~1 μ g	N/A
100 ng~500 ng	2-5
10 ng~100 ng	10-20

***a：上表为使用鼠肝 Total RNA 为模板测试的接头稀释倍数，仅提供参考。不同样本中 small RNA 占比差异较大，实际接头稀释倍数可根据实验中接头二聚体残留情况进行调整。**

***b：使用 Nuclease free water 对 3' Adapter Primer、5' Adapter Primer 和 RT Primer 进行稀释，三者均按相同的稀释倍数进行稀释(即 3' Adapter Primer 稀释 2 倍后使用，则对应的 5' Adapter Primer 和 RT Primer 也需要稀释 2 倍使用)。**

A. 3' Adapter 连接

将 3' Adapter Primer、3' Ligase Buffer、3' Ligase Enzyme 取出，解冻并混匀，短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

模板与接头变性：根据模板投入量，参照表 1 稀释 3' Adapter Primer，按照下表配制反应体系，然后在 PCR 仪中 70 ℃反应 2 min，反应结束后冰上放置 2 min。

组分	体积
RNA	1-6 μl
3' Adapter Primer	2 μl
Nuclease free water	Variable
Total	8 μl

在上述反应结束的反应管中依次加入以下组分：

组分	体积
上述反应产物	8 μl
3' Ligase Buffer	10 μl
3' Ligase Enzyme	1 μl
Nuclease free water	1 μl
Total	20 μl

使用移液器吹打混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于 PCR 仪中运行以下程序（需关闭 PCR 仪热盖）：

温度	时间
25 ℃	1 h
4 ℃	Hold

B. 多余 3 端接头封闭

将 RT Primer 取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

根据模板投入量，参照表 1 稀释 RT Primer，按照下表配制反应体系:

组分	加入体积
上述反应产物	20 μl
RT Primer	1 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Total	22 μl

C. 5' Adapter 连接

将 5' Adapter Primer、5' Ligase Buffer、5' Ligase Enzyme 取出，解冻并混匀，短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

接头变性：根据模板投入量，参照表 1 稀释 5' Adapter Primer，将稀释好的 5' Adapter Primer 在 PCR 仪中 70 ℃反应 2 min，反应结束后在冰上放置 2 min。

按照下表配制 5' Adapter 连接反应体系：

组分	体积
上述反应产物	22 μl
5' Ligase Buffer	6 μl
5' Ligase Enzyme	1 μl
变性后 5' Adapter Primer	1 μl
Total	30 μl

使用移液器吹打混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于 PCR 仪中运行以下程序（需关闭 PCR 仪热盖）:

温度	时间
25 ℃	1 h
4 ℃	Hold

D. 反转录

将 RT Enzyme Mix 取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

按照下表配制反应体系:

组分	加入体积
上述反应产物	30 μl
RT Enzyme Mix	10 μl
Total	40 μl

使用移液器吹打充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于 PCR 仪中运行以下程序：

温度	时间
42℃	30 min
70℃	15 min
4℃	Hold

E. 文库扩增

将 smRNA PCR Mix、smRNA Universal Primer、Index Primer 取出，解冻混匀后置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

按下表在冰上配制 PCR Master Mix：

组分名称	体积
上述反应产物	40 μl
smRNA PCR Mix	40 μl
smRNA Universal Primer	1 μl
i7 Index Primer*c	1 μl
Nuclease free water	18 μl
Total	100 μl

***c：i7 Index Primer 可使用 *AccuNext* SmRNA 接头引物（Illumina）（Code No. AG12715）**

将上述配制好的反应液轻柔涡旋混匀，离心，立即在 PCR 仪中运行以下反应程序（建议在配制 PCR Master Mix 前设置好反应程序）：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98 ℃	1 min	1
变性	98 ℃	10 sec	X*d
退火	60 ℃	5 sec	
延伸	68 ℃	10 sec	
保存	4 ℃	Hold	-

下表是以鼠肝 total RNA 为模板摸索所得扩增循环数，可用于参考。

模板量	推荐循环数
500 ng~1 μg	11 ~ 13
100 ng	15 ~ 17
10 ng	20~ 22

该步骤反应产物可在-20℃保存 24h 再进行后续纯化。

***d：不同类型及不同用量的 RNA 样本中基因表达情况不同，建议正式实验前，先摸索合适的循环数，可设置循环数梯度，确定最佳循环数（在 PCR 产物足够的前提下循环数越少越好）。**

F. 文库纯化

使用磁珠纯化 DNA 文库。若使用 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548），一般推荐使用 1.8X（磁珠量：样品量 = 1.8：1）的磁珠比例进行 DNA 文库纯化。步骤如下：

【注：不同品牌的磁珠使用比例不一致，若使用其他品牌磁珠，建议使用前摸索合适的磁珠比例】

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

实验步骤：

1. 添加 180 μl 的已恢复室温的磁珠至上述 100 μl DNA 文库中（按照磁珠：样品= 1.8：1）。涡旋混匀 5 sec 或使用移液器吸打 10 次，充分混匀，短暂离心。
2. 将磁珠 / DNA 混合物在室温下孵育 8 min，让 DNA 与磁珠结合。
3. 将样品放在磁力架上至少 5 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠，小心地去除上清液，注意不要打散磁珠。
4. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，加入 200 μl 新配制的 80%乙醇溶液（**注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠**），室温孵育 30 sec，小心去除上清液。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 用桌面离心机短暂离心，然后将 PCR 管放在磁力架上约 30 sec，然后用 10 μl 移液器除去剩余的乙醇溶液。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 5 ~ 10 min 至无乙醇溶液残留；**【注意：无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。】**
8. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 32 μl Nuclease free water 覆盖磁珠，使用移液器吸打混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
9. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，分离磁珠和液体直至溶液澄清（约 5 min）。
10. 小心吸取 30 μl 上清转移到新的低吸附 Tube 管中（**勿吸到磁珠**），即可获得构建的文库产物，-20℃保存。

G. 文库质量检测

1. 取 2μl 纯化后的文库，使用 Qubit 荧光计和 *AcuQ* 1X dsDNA（高灵敏度）定量试剂盒（Code No. AG12549 / AG12550）检测文库浓度。具体操作请参照说明书。
2. 取 1μl 纯化后的文库，使用 Agilent 2100 生物分析仪检测文库的大小分布【如 Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent)】，具体操作请参照说明书。

H. 文库分选

根据 G.文库质量检测的结果选择文库分选纯化方式，如接头二聚体、扩增引物残留较少则可以选择磁珠进行文库分选；如果 Agilent 2100 生物分析仪检测结果图显示 125 bp 处有较多接头二聚体、70~80 bp 处有较多扩增引物残留，为确保最终有效文库的比例，建议选择 PAGE 胶分离。

磁珠分选文库

使用 *MagSpherix* DNA Beads（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）按照 1.3X 和 0.9X 磁珠比例进行片段分选，步骤如下：

实验前准备：

- 首次使用，建议将磁珠分装至 1.5 ml 离心管中，保存在 4℃。
- 实验前，根据实验量，配制新的 80% 乙醇溶液，每个样品需要 400μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（放置约 30 min），使用前将磁珠涡旋约 5 min。

注：此处磁珠比例磁珠用量均是依据 30μl DNA 体积计算而得，如使用“1.3X 和 0.9X”进行分选，则磁珠用量：1.3 X 30μl = 39μl，0.9 X 30μl =27μl。

操作步骤：

1. 将纯化的文库转移到 0.2 ml PCR 管中，文库体积如果没有 30μl，加入无酶水以使总体积达到 30μl。
2. 添加 39μl 的已恢复至室温的磁珠至上述 30 μl 文库产物中（按照磁珠：样品的比例为 1.3：1），涡旋充分混匀，短暂离心。
3. 将磁珠 / 文库混合物在室温下孵育 10 min，让 DNA 与磁珠结合。
4. 将 PCR 管放在磁力架上 5 ~ 10 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。
5. 吸取约 66μl 的上清液到新的 0.2 ml PCR 管中。
6. 添加 27μl 已恢复至室温的磁珠至上述上清液中(按照磁珠：样品的比例为 0.9：1)，涡旋充分混匀，短暂离心。
7. 将磁珠 / 文库混合物在室温下孵育 8 min，让 DNA 与磁珠结合。
8. 将样品放在磁力架上至少 5 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心地去

除上清液，注意不要打散磁珠。

9. 保持 PCR 管始终处在磁力架上，加入 200 μl 新鲜配制的 80%乙醇溶液（注意加入乙醇时不要打散磁珠），室温孵育 30 sec，小心移除上清液。
10. 重复步骤 9 一次。
11. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。

【注意：无乙醇溶液残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇溶液未干燥完全，可能会影响 DNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 DNA 洗脱效率。】

12. 磁珠干燥后，从磁力架上取下 PCR 管，加入 22 μl 的 Nuclease free water 覆盖磁珠，用枪吹打混匀，静置 5 min。
13. 将 PCR 管放在磁力架上至少 5 min，直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠，小心吸取 20 μl 上清液至新的 PCR 管中（注意不要打散磁珠），-20 ℃保存。

➢ 实验示例

以小鼠肝脏 total RNA 作为模板，采用本产品进行 small RNA 文库构建，RNA 模板添加量为 10 ng，PCR 扩增循环数为 22，由于 Agilent 2100 生物分析仪迁移率的影响，最终文库的主峰分布可能存在约 6 ~8 bp 偏差，如下图所示：接头二聚体的峰为 125bp，miRNA 文库的峰在 145~150 bp 处。

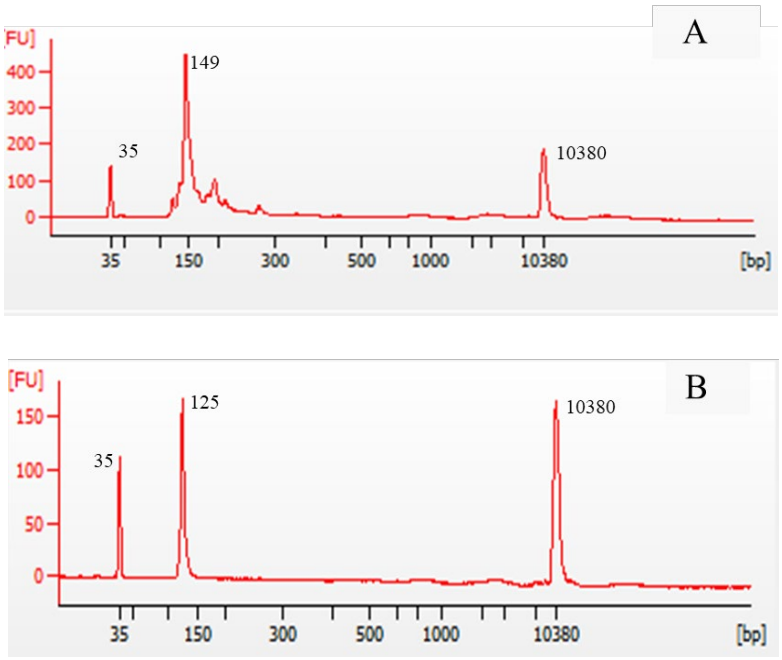

图 3. Agilent 2100 生物分析仪检测结果：

A 图为磁珠分选后的文库产物； B 图为无模板的阴性对照。

➢ 附录 1：*AccuNext* SmRNA 接头引物（Illumina）的信息

smRNA Universal Primer

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGA- 3'

i7 Index Primer

5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT **[i7 Index]**

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- 3'

[i7 Index] 表示 8 bp 的 i7 Index 序列。

具体序列见下表：

组分	引物 Index 序列	Sample Sheet 输入 / 测序时 Index 序列	
		NovaSeq 6000 v1.0 reagents, MiSeq, HiSeq 2000 / 2500	NovaSeq 6000 v1.5 reagents，MiniSeq, NextSeq, HiSeq 3000 / 4000
AccuNext SmRNA index 1 primer	CCGCGGTT	AACCGCGG	
AccuNext SmRNA index 2 primer	TTATAACC	GGTTATAA	
AccuNext SmRNA index 3 primer	GGACTTGG	CCAAGTCC	
AccuNext SmRNA index4 primer	AAGTCCAA	TTGGACTT	
AccuNext SmRNA index 5 primer	ATCCACTG	CAGTGGAT	
AccuNext SmRNA index 6 primer	GCTTGTCA	TGACAAGC	
AccuNext SmRNA index 7 primer	CAAGCTAG	CTAGCTTG	
AccuNext SmRNA index 8 primer	TGGATCGA	TCGATCCA	
AccuNext SmRNA index 9 primer	AGTTCAGG	CCTGAACT	
AccuNext SmRNA index 10 primer	GACCTGAA	TTCAGGTC	
AccuNext SmRNA index 11 primer	TCTCTACT	AGTAGAGA	
AccuNext SmRNA index 12 primer	CTCTCGTC	GACGAGAG	