

Version 3

Code No. AG12511

AG12512

AccuNext Small RNA 文库制备试剂盒 (Illumina)

AccuNext Small RNA-seq Library 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.



目录

产品概述.....	1
产品组成.....	1
保存及运输.....	2
实验原理及流程.....	2
产品优势.....	3
实验前注意事项.....	4
实验前准备.....	5
操作方法.....	5
测序结果分析方法.....	11
实验例.....	12
产品注意事项.....	13
附录 A: 接头引物搭配方式.....	15
附录 B: <i>AccuNext</i> CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 的信息.....	15

➤ 产品概述

本产品是针对 illumina 高通量测序平台设计的 Small RNA 测序文库制备试剂盒，可从 1 ng~2 μg Total RNA (含有 Small RNA) 或 1 ng~1 μg 富集的 Small RNA 起始制备 Small RNA 测序文库，用于分析多种小 RNA(包括 miRNA、piRNA、snoRNA 和 snRNA 等)。利用 Poly(A) Polymerase 在 RNA 3' 末端加上 Poly(A) 尾，再用带有特定接头的 Oligo (dT) 引物进行反转录，利用反转录酶的末端转移酶活性，在 cDNA 末端加上特定接头。搭配 illumina 测序接头的引物进行 PCR 扩增【例如，*AccuNext*CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) (Code No. AG12505、AG12506、AG12507) 】，通过磁珠分选，获得 150 bp ~ 350 bp 适用于 illumina 测序平台的 Small RNA 文库。

本产品操作简单，无需进行接头连接等繁琐的步骤，即可添加 illumina 测序接头和 index 序列，获得 Small RNA 文库；优化的反应体系，提高了文库转化效率，能兼容不同的模板量，获得的测序结果稳定。

本产品中包含 RNA 3' 末端加 Poly(A) 尾、反转录 (RT) 和 PCR 扩增所需的所有组分，反应体系经过了精心优化，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。

➤ 产品组成

Package 2-1 组分如下 (-80°C 保存):

组分名称	AG12511 (12 rxns)	AG12512 (48 rxns)
Control micRNA (2.5 ng / μl)	5 μl	5 μl
smRNA Adapter Mix Solution	78 μl	312 μl

Package 2-2 组分如下 (-20°C保存):

组分名称	AG12511 (12 rxns)	AG12512 (48 rxns)
Poly(A) Polymerase (0.5U / μl)	12 μl	48 μl
4X Poly(A) Reaction Buffer	30 μl	120 μl
RNase Inhibitor (40U / μl)	9 μl	36 μl
3' smRNA dT Primer	12 μl	48 μl
<i>AccuNext</i> Reverse Transcriptase(100U / μl)	24 μl	96 μl
2X <i>AccuNext</i> PCR Buffer	600 μl	1.2 ml X 2 pcs
<i>AccuNext</i> DNA Polymerase (1 U / μl)	24 μl	96 μl
Nuclease free water	1 ml X 2 pcs	1 ml X 5 pcs
Tris Buffer (5 mM)	900 μl	1.2 ml X 3 pcs

注意: *AccuNext*CDI 接头引物(Illumina, 适用于 RNA 文库) (Code No. AG12505、AG12506、AG12507) 为实验必须试剂，但本产品中未配置，需要单独购买。*AccuNext* CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 的信息见附录 A 和 B。

➤ **保存及运输**

保存温度：Package 2-1 -80°C 保存

Package 2-2 -20°C 保存

运输温度：Package 2-1 干冰运输

Package 2-2 -20°C 冰袋运输或干冰运输

➤ **实验原理及流程**

以 Total RNA (含有 Small RNA) 或者富集的 Small RNA 为模板，先用 Poly (A) Polymerase 在 RNA 3' 末端加上 Poly (A) 尾，然后用带有特定接头的 3' smRNA dT Primer 进行反转录。当反转录酶到达 RNA 5' 端时，利用反转录酶的末端转移酶活性，在 cDNA 的 3' 端引入几个不依赖于模板的碱基，通过 smRNA Adapter Mix Solution 继续合成带有特定接头的 cDNA。以此双端带有特定接头的 cDNA 为模板，搭配带有 illumina 测序接头的引物进行 PCR 扩增即可获得适用于 Illumina 高通量测序平台的测序文库。如图 1 所示：

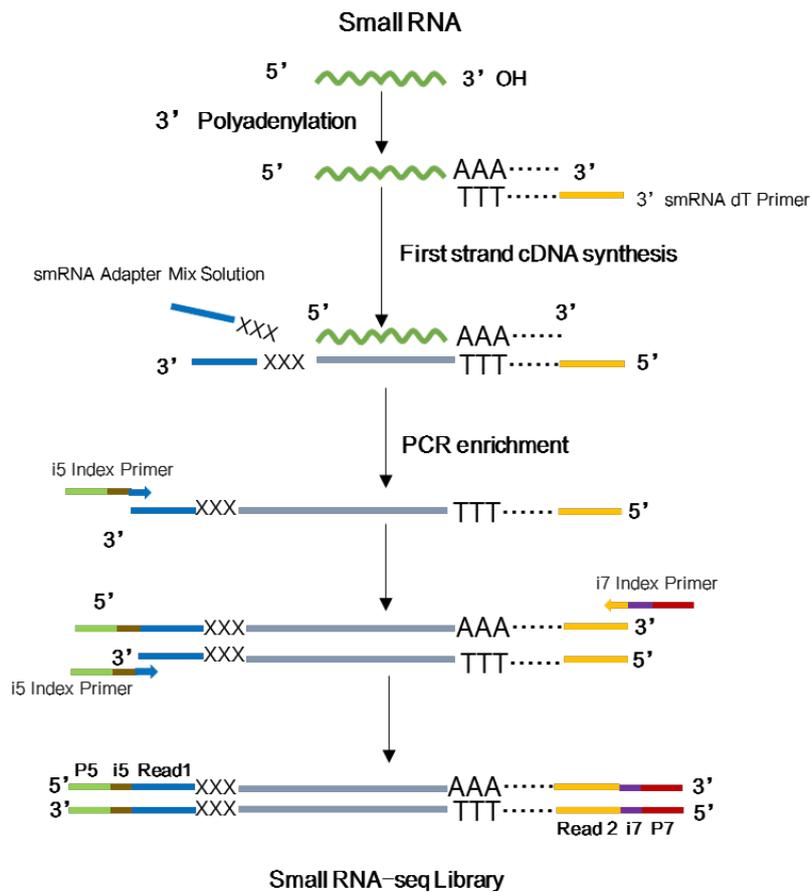


图 1：文库构建原理

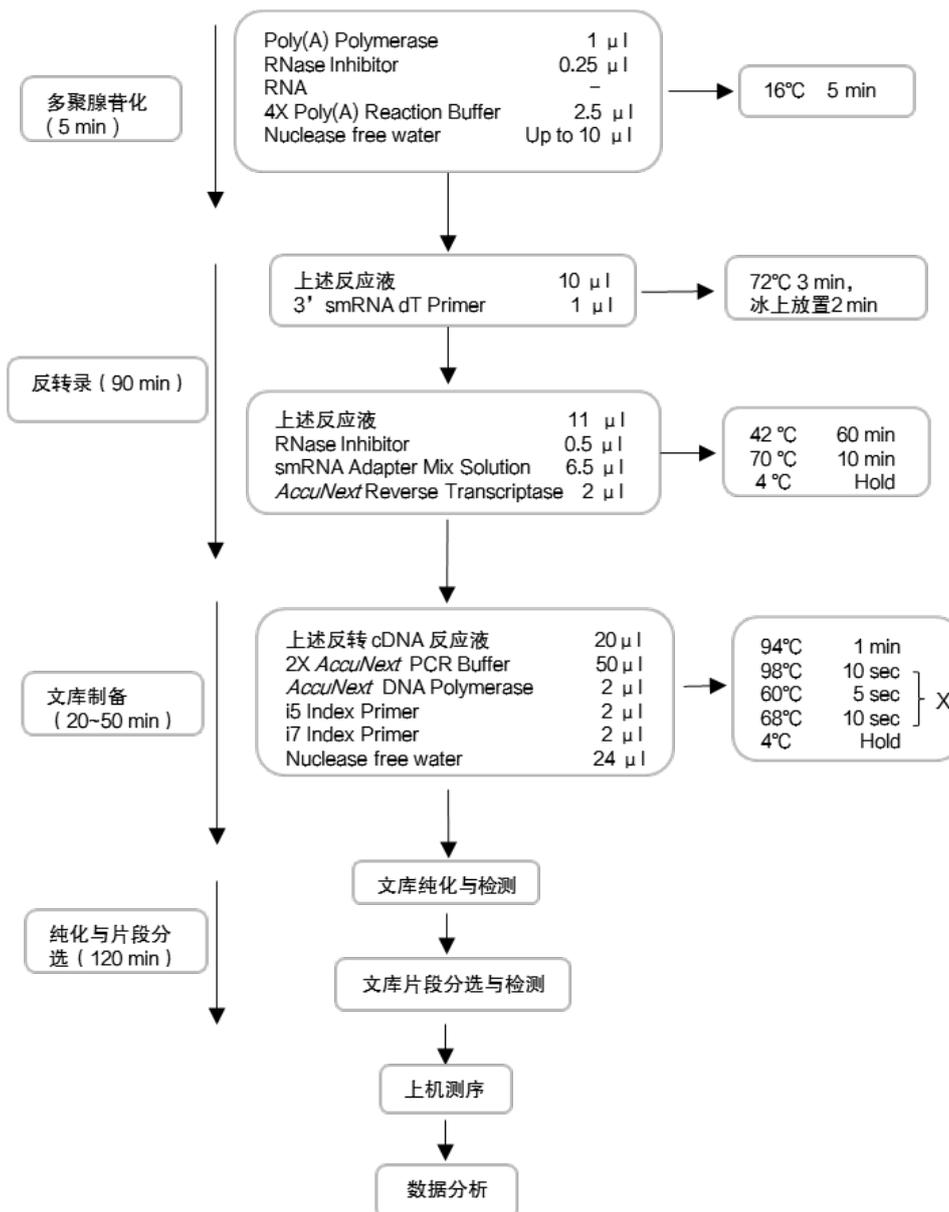


图 2: 实验操作流程

► 产品优势

1. 适用于 Illumina 测序平台：整合了 Index 和 Illumina 接头，构建的 Small RNA 文库可直接进行 Illumina 高通量测序平台测序。
2. 模板适用范围广：能够从 1 ng~2 μ g Total RNA (含有 Small RNA) 或 1 ng~1 μ g 富集的 Small RNA 中分析多种 Small RNA，包括 miRNA、piRNA、snoRNA 和 snRNA 等。
3. 偏好性低、操作简单，无需进行接头连接等繁琐的步骤，即可添加 illumina 接头和 index 序列，获得 Small RNA 测序文库，避免通过接头连接带来的偏好性。

➤ 实验前注意事项

1. 防污染要求

由于本产品检测灵敏度高，防污染是非常有必要的。可从以下几个方面注意：

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 耗材方面，进行反转录反应时需要使用 RNase-free 级别的耗材，为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 本产品中的试剂，应储存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置正向气流）、模板添加区、反转录区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
 - 1) 在试剂配制区进行以下操作：反转录试剂配制、PCR 扩增试剂配制；
 - 2) 在模板添加区加入模板；
 - 3) 在反转录区进行反转录；
 - 4) 在 PCR 扩增区进行扩增；
 - 5) 产物纯化区进行磁珠纯化；
 - 6) 在电泳检测区进行检测。
- ❖ 为避免污染，建议使用 2 台 PCR 仪进行实验：一台用于第一链 cDNA 合成，一台用于 PCR 扩增，且仪器需要定期清洁。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（70%酒精）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加 RNA 模板或细胞）实验，确认实验是否有污染。
- ❖ 若是首次实验，建议设置阳性对照（可使用本产品中的 Control micRNA）。

2. 样本要求

- ❖ 如果使用 Total RNA 起始，RNA 质量对实验成功与否至关重要，Total RNA 需要包含 Small RNA、完整性高（RIN \geq 8）、无污染。在 RNA 提取纯化后，建议实验前使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Code No. 5067-1513) 评价 RNA 的完整性。
- ❖ 如果使用 Small RNA 起始，确保 Small RNA 无污染，可使用 *SteadyPure* 组织细胞 Small RNA 提取试剂盒（Code No. AG21027）提取 Small RNA。
- ❖ 使用高纯度的 RNA 进行反应，防止残留的蛋白质、有机溶剂和盐离子等影响酶的活性，降低反应性能。
- ❖ 使用 Nuclease free water 溶解或稀释 RNA，TE buffer 含有 EDTA 会影响反转录反应。

- ❖ 本产品可从低至 1 ng Total RNA (含有 Small RNA) 或 1 ng Small RNA 进行文库构建, 若 RNA 量充足, 建议使用较高的 RNA 起始量, 确保 RNA 文库构建成功率。
- ❖ Poly(A) Polymerase 加 A 需要 RNA 的 3' 末端为-OH 基团; 若 RNA 的 3' 末端是磷酸, 则需要先去磷酸化 (如 CLIP 分析处理的 RNA) 。

3. PCR 循环数选择

- ❖ 不同类型及不同用量的 RNA 样本中含有的 Small RNA 情况不同, 因此, 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) 。

➤ 实验前准备

1. 试剂&耗材:

- 1) *AccuNext* CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) (Code No. AG12505、AG12506、AG12507) 。
- 2) Small RNA 提取: 本公司产品 *SteadyPure* 组织细胞 Small RNA 提取试剂盒 (Code No. AG21027) 或其他等效产品。
- 3) 磁珠纯化: 本公司产品 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546、AG12547、AG12548) 或其他等效产品【如 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881) 】。
- 4) DNA 评价: High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 及 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Code No. Q32854) 或其他等效产品。
- 5) RNA 评价: Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Code No. 5067-1513) 或其他等效产品。
- 6) 其他材料: 80% 乙醇, 0.2 ml RNase-free PCR 管, 1.5 ml 离心管和低吸附 tube 管 (如 Eppendorf, Code No. 022431021) 或其他等效产品等。

2. 仪器:

- 1) PCR 仪、Qubit 4 Fluorometer、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机。

➤ 操作方法

A. 多聚腺苷化

- ✚ 将所需用的试剂冰上融化后, 短暂离心, 混匀后放置在冰上备用。其中 Poly(A) Polymerase 和 RNase Inhibitor 轻弹管壁混匀或用移液器混匀, 请勿涡旋。其

余试剂可轻柔涡旋混匀。

- 按照下列表格在冰上配制预混液，配制完成后，用移液器轻柔吸打混匀。

组分	体积
Poly(A) Polymerase (0.5 U/μl)	1 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.25 μl
4X Poly(A) Reaction Buffer	2.5 μl
RNA ^{*a}	-
Nuclease free water	Up to 10 μl

*a: 推荐 RNA 加入量为 1 ng~2 μg, 如果样本量充足, 建议在推荐范围内用较高的模板量。本产品中的 Control micRNA 为 2.5 ng/μl, 用 Nuclease free water 稀释 10 倍至 0.25 ng/μl, 可取 4 μl 加入预混液中。

- 将加入预混液的 PCR 管放置在 PCR 仪中, 16°C 孵育 5 min, 立即将样品取出放在冰上。然后立即进行反转录反应 (此步骤不可暂停)。

B. 反转录

✚ 将所需的试剂冰上融化后, 短暂离心, 混匀后放置在冰上备用。其中 SmRNA Adapter Mix Solution、*AccuNext* Reverse Transcriptase 和 RNase Inhibitor 轻弹管壁混匀或用移液器混匀, 请勿涡旋。其余试剂可轻柔涡旋混匀。

- 立即向多聚腺苷酸化反应液中加入 1 μl 3' smRNA dT Primer, 用移液器轻柔吸打混匀, 瞬时离心。
- 将反应液置于 PCR 仪中 72°C 孵育 3 min, 孵育后取出放冰上冷却 2 min。
- 孵育结束后, 立即进行后续的反转录反应。

- 配制 RT Master Mix:**

组分	体积
上述反应液	11 μl
smRNA Adapter Mix Solution	6.5 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl
<i>AccuNext</i> Reverse Transcriptase (100 U/μl)	2 μl
Total	20 μl

*a: 将这 3 个组分配制成预混液 (可在使用前加入 *AccuNext* Reverse Transcriptase), 用移液器轻柔吸打混匀, 取 9 μl Mix 加入至上述多聚腺苷酸化反应液中。

- 轻柔涡旋混匀或者用移液器吹打混匀, 瞬时离心。
- 在 PCR 仪中运行以下程序 (可提前设置反应程序):

温度	时间
42°C	60 min
70°C	10 min
4°C	Hold

7. 在下一步反应准备好之前，将产物置于冰上或 4°C。
-  **安全暂停点：**样本可在 -20°C 保存过夜，长期保存建议放于 -80°C（为避免 cDNA 降解，建议尽快进行后续实验）。

C. 文库扩增

- 冰上融化 2X *AccuNext* PCR Buffer 和 PCR Primer，轻柔涡旋混匀，离心后放置于冰上。*AccuNext* DNA Polymerase 轻柔吹打混匀后放置于冰上备用。
- 按下表在冰上配制 PCR Master Mix:

组分	体积	
上述 cDNA 合成产物	20 μ l	
2X <i>AccuNext</i> PCR Buffer	50 μ l	} *b
<i>AccuNext</i> DNA Polymerase	2 μ l	
i5 Index Primer ^{*a}	2 μ l	
i7 Index Primer ^{*a}	2 μ l	
Nuclease free water	24 μ l	

*a: PCR 引物搭配 illumina 测序接头的引物【例如，*AccuNext* CDI 接头引物（illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505、AG12506、AG12507）】进行扩增；

*b: 可将这 5 个组分先配制成 Mix（如果多个样本需要用不同的 index 引物，也可将 i5 Index Primer 和 i7 Index Primer 单独配制），轻柔涡旋混匀后，取 80 μ l Mix 加入至上述反转录产物中。

- 轻柔涡旋混匀或者用移液器吹打混匀，瞬时离心。
- 在 PCR 仪中运行以下反应程序（建议在配制 PCR Master Mix 前，提前设置反应程序）：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	1 min	1
变性	98°C	10 sec	} X ^{*a}
退火	60°C	5 sec	
延伸	68°C	10 sec	
保存	4°C	Hold	-

*a: 扩增循环数会影响文库产量，下表是根据 Mouse liver Small RNA 和 Mouse liver Total RNA 摸索所得。不同的类型的 RNA 中含有的 Small RNA 情况不同，因此，建议摸索合适的循环数。可参考下表，设置循环数梯度，确定最佳循环数，在产量足够的前提下循环数越少越好。若使用本产品中的 Control micRNA，推荐使用 1 ng 的模板量，循环数为 12 cycles。

模板量	Small RNA 推荐循环数	Total RNA 推荐循环数
1 ng	13 ~ 14	17 ~ 18
10 ng	11 ~ 12	15 ~ 17
100 ng	9 ~ 10	14 ~ 16
500 ng	-	11 ~ 13
1 μg	8 ~ 9	9 ~ 10
2 μg	-	8 ~ 9

5. 反应结束后将产物放置于冰上，可进行后续文库纯化步骤。

 **安全暂停点：**样本可在 -20°C 保存过夜，长期保存建议放于 -80°C （为避免 DNA 文库降解，建议尽快进行后续实验）。

D. 文库纯化

使用磁珠纯化 PCR 产物。推荐使用 *MagSpherix* DNA Beads (Code No. AG12546、AG12547、AG12548) 按照 1.8X 磁珠比例 (磁珠量 : 样品量 = 1 : 1.8) 进行纯化，【如使用 AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881), 可使用相同用量磁珠】，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°C 。
-  实验前，根据实验量，配制新的 80%乙醇溶液 (每个样品需要 $400\ \mu\text{l}$)。
-  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。

操作步骤：

1. 添加 $180\ \mu\text{l}$ 的已恢复室温的磁珠至上述 $100\ \mu\text{l}$ PCR 扩增产物中 (按照磁珠 : 样品的比例为 1.8 : 1)，涡旋充分混匀，短暂离心。
2. 将磁珠 / 文库混合物在室温下孵育 10 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 管始终处在磁力架上，加入 $200\ \mu\text{l}$ 80%乙醇 (注意加入乙醇溶液时不要干扰磁珠)，室温孵育 30 sec，用移液枪小心去除上清液。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 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。
 -  无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，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。
7. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 $30\ \mu\text{l}$ RNase free Water 覆盖

磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。

8. 孵育结束后，将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，分离磁珠和液体直到溶液澄清（约 5 min）。
9. 小心吸取 28 μ l 上清液转移到新的低吸附 tube 管中（勿吸到磁珠）。
10. 文库产物 -20°C 保存。

 **安全暂停点：**样本可在 -20°C 保存过夜，长期保存建议放于 -80°C 。

E. 文库纯化产物质量检测

1. 取 2 μ l 纯化后的 DNA 扩增产物，使用 Qubit 4 Fluorometer 和 Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit（Thermo Fisher, Code No. Q33231）检测文库产物浓度。具体操作请参照说明书。
2. 成功的实验反应：纯化后会产生浓度大于 10 ng/ μ l 的文库产物，1 ng 的 Control micRNA 经 12 个循环后产量约 30 ~ 50 ng/ μ l，阴性对照会产生约 1~2 ng/ μ l 的引物二聚体。
3. 文库检测完成后，可进行步骤 **F. 片段分选** 或直接进行 illumina 测序*^a。

*a: 若文库分布范围小于 350 nt，则可不进行片段分选，直接进行 illumina 测序；若文库分布范围大于 350 nt，则建议进行 **<F. 片段分选>** 步骤。

F. 片段分选

为了获得小于 350 bp 的 DNA 文库（目的片段+接头的长度），可对 DNA 文库进行分选，推荐使用 *MagSpherix* DNA Beads（Code No. AG12546、AG12547、AG12548）按照 0.9X 和 1.2X 磁珠比例进行片段分选【如果使用 AMPure XP Reagent（Beckman Coulter Life Sciences, Code No. A63881），推荐 0.8X 和 1.2X 进行片段分选】，步骤如下：

注：所有的磁珠用量均是依据 50 μ l DNA 体积计算而得，如使用“0.9X 和 1.2X”进行分选，则磁珠用量：0.9X 50 μ l = 45 μ l，1.2X 50 μ l = 60 μ l。

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°C 。
-  实验前，根据实验量，配制新的 80% 乙醇溶液（每个样品需要 800 μ l）。
-  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。

操作步骤：

1. 将纯化的文库转移到 0.2 ml PCR 管中，加入无酶水以使总体积达到 50 μ l。
2. 添加 45 μ l 的已恢复至室温的磁珠至上述 50 μ l 文库产物中（按照磁珠：样品的比例为 0.9 : 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 8 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 85 μ l 的上清液到新的 0.2 ml PCR 管中。
6. 添加 60 μ l 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 1.2 : 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 μ l 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。
 - ✦ 无乙醇残留时, 磁珠表面无光泽; 如果乙醇未干燥完全, 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 52 μ l 的 Tris buffer 覆盖磁珠, 用枪吹打混匀, 静止 5 min。
13. 将 PCR 管放在磁力架上至少 5 分钟, 直到液体完全清澈且上清液中没有磁珠。小心吸取 50 μ l 上清液至新的 PCR 管中, 注意不要打散磁珠。
14. **重复步骤 2~11, 然后直接进行第 15 步。**
15. 磁珠干燥后, 从磁力架上取下 PCR 管, 加入 22 μ l 的 Tris buffer 覆盖磁珠, 用枪吹打混匀, 静置 5 min。
16. 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 μ l 上清液至新的 PCR 管中 (注意不要打散磁珠), -20°C 保存。

G. 文库分选产物质量检测

1. 取 2 μ l 纯化后的 DNA 扩增产物, 使用 Qubit 4 Fluorometer 和 Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Code No.Q33231) 检测文库产物浓度。具体操作请参照说明书。
2. 取 1 μ l 纯化后的文库产物, 使用 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 检测文库的大小分布【如 Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Code No. 5067-4626) 】。具体操作请参照说明书。
3. 实验成功的反应: 会产生浓度大于 2 ng / μ l 的文库产物, 片段大小分布于 150 ~ 350 bp (下图 C); 1 ng 的阳性对照 Control micRNA 经 12 个循环后产量

约 10 ~ 20 ng/μl 的文库，主峰分布在~175 bp (下图 B)；不加 RNA 的阴性对照会产生约 1~2 ng/μl 的引物二聚体峰，主峰值~153 bp (为引物二聚体的峰，不影响实验结果) (下图 A)。

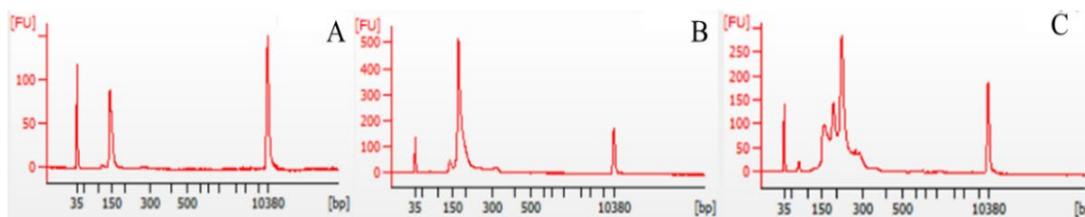


图 3. Agilent 2100 生物分析仪检测结果

➤ 测序结果分析方法

1. 使用本产品构建的文库具有链特异性，Read 1 读取的是 Small RNA 的正义链，一般建议测序时仅测 Read 1。从 Read 2 测序时，开始会有一段 Poly (T) 序列，可能导致测序质量降低，因此不建议从 Read 2 测序。
2. 由于使用 Poly(A) Polymerase 对 RNA 3' 端添加了 A 尾，因此无法判定原始 RNA 的 3' 端是否含有 A 碱基；在反转录进行模板转换时，会在 Read 1 引入三个碱基 (XXX) 序列，RNA 5' 端会含有多余的三个碱基 (但也会存在少量的不止 3 个碱基情况)。因此测序 Reads 并不是固定的结构，但大部分 Reads 都会含有 Poly(A) 序列，如果是 miRNA，则 Poly(A) 后面可能还会有部分 illumina 测序接头序列，如下图所示：



图 4. 文库结构

3. 在测序分析时，需要修剪去除 5' 端的三个碱基序列；同时需要去除 Poly(A) 序列之后的序列。对于短于 15 nt 的序列，通常也会舍弃。可能会存在以下几种情况：

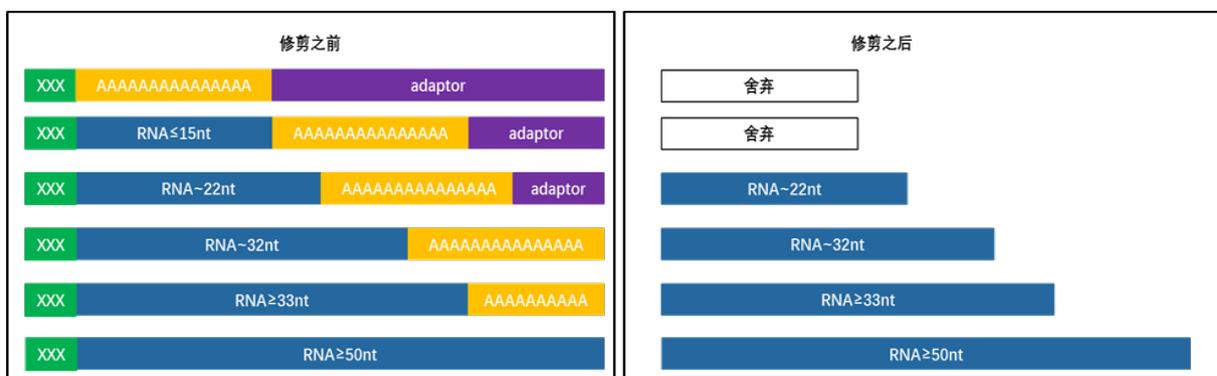


图 5. 数据分析参考

实验例

1. 采用本产品进行鼠肝 Total RNA 文库构建，RNA 模板添加量为 100 ng，PCR 扩增循环数为 15，文库产物经纯化及分选后结果如下：图 6-A 显示了扩增后的文库产物，分布均匀，峰值在 150 ~ 350 bp 之间。图 6-B 为无模板的阴性对照。

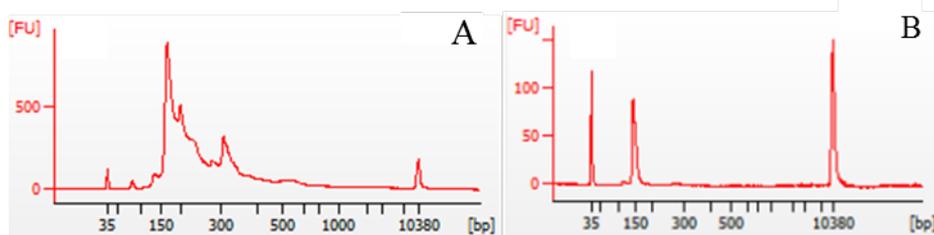


图 6. Agilent 2100 生物分析仪检测结果

2. 使用鼠肝 Total RNA 和鼠肝 Small RNA 为模板，用本产品进行文库构建，使用 Illumina NovaSeq 6000 系统测序，数据如下：

Sequencing Alignment Metrics for Small RNA						
RNA source	鼠肝 small RNA			鼠肝 Total RNA		
Input RNA	1 μg	100 ng		1 μg	100 ng	
Total number of reads (million)	11.51	11.69	11.75	10.99	13.91	11.34
Clean reads (million)	11.51	11.69	11.75	10.99	13.91	11.34
Mapped mature (types)	362	312	323	433	361	362
Mapped hairpin (types)	377	323	335	429	357	345
Mapped uniq sRNA (types)	2102	1687	1882	2595	2034	2073
tRNA (numbers)	15727	18679	16398	43685	69287	57516
snRNA (numbers)	67580	81721	73563	28493	73747	61864
snoRNA (numbers)	213714	193243	167438	267611	322358	263028
rRNA 占比 (%)	4.81	9.63	8.74	19.65	18.04	18
Q30 (%)	89.86	90.39	90.24	89.49	89.02	90.3

表 1. 主要 Small RNA-Seq 数据

3. 以 100 ng 的鼠肝 Small RNA 和鼠肝 Total RNA 为模板，用本产品进行 Small RNA 文库构建，使用 Illumina NovaSeq 6000 系统测序，结果表明实验重复性好（图 7-A 为鼠肝 small RNA 100 ng、图 7-B 为鼠肝 Total RNA 100 ng）。

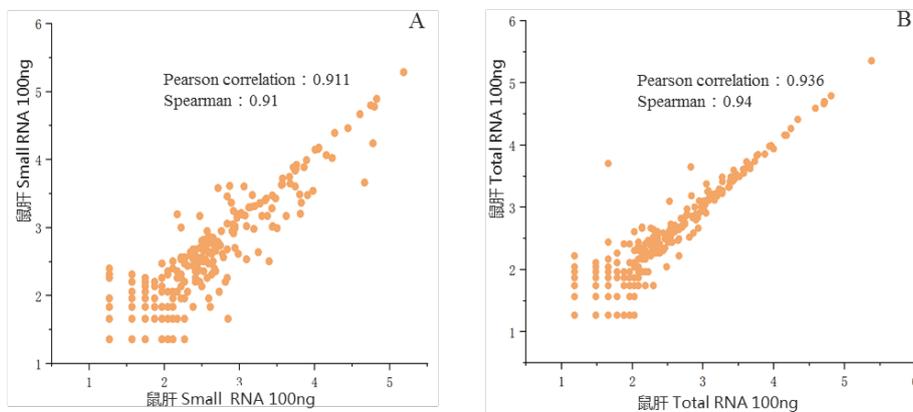


图 7. 基因表达重复性分析

► 产品注意事项

1. 防污染要求：

由于本产品检测灵敏度极高，防污染是非常有必要的。可从以下几个方面注意：

- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 耗材方面，进行反转录反应时需要使用 RNase-free 级别的耗材，为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
- ❖ 本产品中的试剂，应储存在无核酸酶和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置正向气流）、模板添加区、反转录区、PCR 扩增区、产物纯化区和电泳检测区。
 - 1) 在试剂配制区进行以下操作：反转录试剂配制、PCR 扩增试剂配制；
 - 2) 在模板添加区加入模板；
 - 3) 在反转录区进行反转录；
 - 4) 在 PCR 扩增区进行扩增；
 - 5) 产物纯化区进行磁珠纯化；
 - 6) 在电泳检测区进行检测。
- ❖ 为避免污染，建议使用 2 台 PCR 仪进行实验：一台用于第一链 cDNA 合成，一台用于 PCR 扩增，且仪器需要定期清洁。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后对实验台面进行擦拭清洁（70%酒精）。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的酒精擦拭。
- ❖ 每次实验，建议设置阴性对照（不加 RNA 模板或细胞）实验，确认实验是否有污染。

- ❖ 若是首次实验，建议设置阳性对照（可使用本产品中的 Control micRNA）。

2. RNA 样品准备：

- ❖ RNA 质量对实验成功与否至关重要，使用 Total RNA 必须包含 Small RNA、且完整性高（ $RIN \geq 8$ ）。
- ❖ 使用高纯度的 RNA 进行反应，防止残留的蛋白质、有机溶剂和盐离子等影响酶的活性，降低反应性能。
- ❖ 使用 Nuclease free water 溶解或稀释 RNA，TE buffer 含有 EDTA 会影响反转录反应。

3. PCR 扩增循环：

- ❖ 选择最佳的循环数，确保仍然在扩增的指数期，在产量足够的前提下循环数越少越好。
- ❖ 扩增循环数过高，可能会因为 PCR 扩增的偏好性导致 DNA 文库质量下降。
- ❖ 扩增循环数过低，会导致 DNA 产量不足，影响后续的测序文库制备。
- ❖ 建议在本说明书推荐的循环数基础上，增加或减少 2~3 个循环进行测试。（如，1 ng small RNA 分别用 13、14 和 15 个循环进行测试）。
- ❖ *AccuNext* CDI 接头引物（Illumina，适用于 RNA 文库）（Code No. AG12505、AG12506、AG12507）可根据不同的 Index 区分文库，i5 Index Primer 含有 8 种不同的 Index，i7 Index Primer 含有 12 种不同的 Index，建议选择不同的组合搭配使用（具体方法见附录 A 和 B）。

4. PCR 产物纯化：

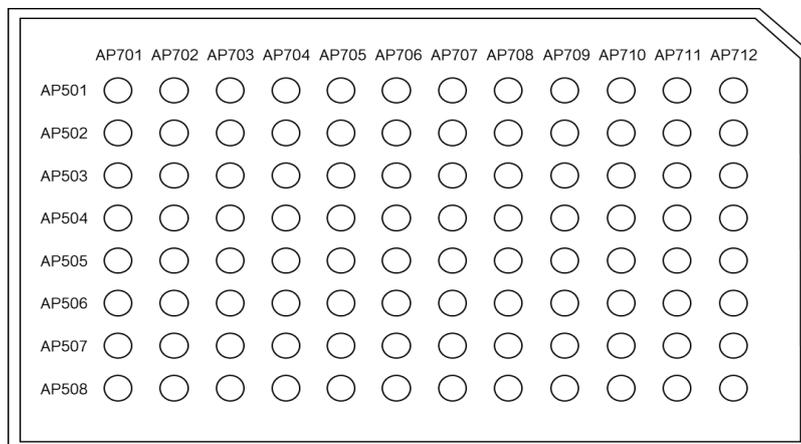
- ❖ 在使用前，先将磁珠恢复至室温，否则会导致 DNA 回收率下降。
- ❖ 磁珠每次使用前应先充分振荡混匀。
- ❖ 磁珠漂洗使用 80%乙醇，现配现用。
- ❖ 漂洗结束后，应使乙醇充分挥发，否则会影响 cDNA 的回收率。
- ❖ 洗脱完毕，吸取上清时，应小心吸取洗脱液上清，避免吸入磁珠；以免对后续实验造成影响，或干扰 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 检测。

5. 测序及数据分析建议

- ❖ 文库制备浓度一般大于 2 ng/ μ l，建议用低吸附的 1.5ml 离心管保存。
- ❖ Read 1 前三个碱基（XXX）是由于模板转换时，由 smRNA Adapter Mix Solution 引入的序列，所以在分析前，应该去除。
- ❖ 使用本产品构建的文库具有链特异性，Read 1 读取的是 Small RNA 的正义链，一般建议测序时仅测 Read 1。从 Read 2 测序时，开始会有一段 Poly（T）序列，可能导致测序质量降低，因此不建议从 Read 2 测序。

➤ 附录 A: 接头引物搭配方式

以 *AccuNext* CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) (Code No. AG12507) 为例, 可选择下表中任意一种搭配方式:



➤ 附录 B: *AccuNext* CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 的信息

用途	品名	AG12505 (12 rxns)	AG12506 (48 rxns)	AG12507 (96 rxns)	管盖颜色
i5 Index Primer (AP501-AP508)	AP501	12 μ l	12 μ l	12 μ l	●
	AP502	-	12 μ l	12 μ l	●
	AP503	-	12 μ l	12 μ l	●
	AP504	-	12 μ l	12 μ l	●
	AP505	-	-	12 μ l	●
	AP506	-	-	12 μ l	●
	AP507	-	-	12 μ l	●
	AP508	-	-	12 μ l	●
i7 Index Primer (AP701-AP712)	AP701	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP702	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP703	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP704	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP705	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP706	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP707	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP708	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP709	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP710	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP711	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●
	AP712	5 μ l	5 μ l	8 μ l	●

AccuNext CDI 接头引物 (Illumina, 适用于 RNA 文库) 序列信息如下:

i5 Index Primer

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5 Index] ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- 3'

i7 Index Primer

5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7 Index] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- 3'

[i5 Index] 表示 8 bp 的 i5 Index 序列, [i7 Index] 表示 8 bp 的 i7 Index 序列:

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	
i5 index Primers	AP501	TATAGCCT	TATAGCCT	AGGCTATA
	AP502	ATAGAGGC	ATAGAGGC	GCCTCTAT
	AP503	CCTATCCT	CCTATCCT	AGGATAGG
	AP504	GGCTCTGA	GGCTCTGA	TCAGAGCC
	AP505	AGGCGAAG	AGGCGAAG	CTTCGCCT
	AP506	TAATCTTA	TAATCTTA	TAAGATTA
	AP507	CAGGACGT	CAGGACGT	ACGTCCTG
	AP508	GTA CTGAC	GTA CTGAC	GTCAGTAC
i7 index Primers	AP701	CGAGTAAT	ATTACTCG	
	AP702	TCTCCGGA	TCCGGAGA	
	AP703	AATGAGCG	CGCTCATT	
	AP704	GGAATCTC	GAGATTCC	
	AP705	TTCTGAAT	ATTCAGAA	
	AP706	ACGAATTC	GAATTCGT	
	AP707	AGCTTCAG	CTGAAGCT	
	AP708	GCGCATT A	TAATGCGC	
	AP709	CATAGCCG	CGGCTATG	
	AP710	TTCGCGGA	TCCGCGAA	
	AP711	GCGCGAGA	TCTCGCGC	
	AP712	CTATCGCT	AGCGATAG	