



CWseq® RNA Library Prep Kit for Illumina & MGI (Non-strand)

Cat.No. CW3100

产品简介

CWseq® RNA Library Prep Kit for Illumina & MGI (Non-strand)是针对Illumina & MGI高通量测序平台的转录组非链特异文库构建试剂盒。包括RNA片段化、反转录、双链cDNA合成/末端修复、接头连接和文库扩增试剂。

试剂盒将第二链合成、末端修复和加A合并为一步，中间无需纯化产物步骤，极大的简化了操作流程，缩短了建库时间；优化的反应体系，提高了文库转化效率，对更低质量的RNA有更好的解决方案。通过搭配前处理的试剂盒，最大范围可适用于起始模板量为10 ng - 1 µg Total RNA起始的转录组文库构建。直接使用Total RNA建库时，可适用于起始模板量为0.25 - 100 ng的高质量Total RNA。试剂盒包含的所有试剂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。

保存条件

Box 1: -20 ± 5°C保存，干冰运输，如需长期保存，置于-70°C以下。

产品内容

Component	CW3100S 24 rxns	CW3100M 96 rxns
RNA-seq 2× Frag & Prime Buffer	240 µL	960 µL
RNA-seq 1st Strand Enzyme	48 µL	192 µL
RNA-seq 1st Strand Buffer	144 µL	576 µL
RNA-seq 2nd Strand Enzyme	120 µL	480 µL
RNA-seq 2nd Strand Buffer (dNTP)	720 µL	3×960 µL
RNA-seq DNA Ligase	120 µL	480 µL
RNA-seq DNA Ligation Buffer	720 µL	3×960 µL
RNA-seq 2× Amplification PCR Mix	600 µL	3×800 µL

产品特点

- 1. 适用性广：适用于完整度良好的动物、植物及真菌等真核生物总RNA、经Poly(A)法富集的mRNA、经rRNA去除后的RNA文库构建。
- 2. 文库产出高：优化的反应体系，提高了文库转化效率。

自备仪器、试剂和耗材

- 1. RNA评价：Agilent RNA 6000 Pico Kit
- 2. RNA前处理：推荐使用康为世纪rRNA去除试剂盒(CW3086)或者mRNA富集试剂(CW3090)。
- 3. 接头引物试剂盒：
Illumina平台：单端短接头引物试剂盒(CW2586/CW2587)、双端短接头引物试剂盒(CW3042/CW3079)、UDB接头（CW3084）、UDI长接头(CW3096)。
MGI平台：UDB接头(CW3082)、短接头引物试剂盒(CW3014/CW3015/CW3016)
- 4. DNA纯化磁珠：Agencourt RNA Clean XP Beads (Beckman #A63987)或其他等效产品
- 5. 环化试剂盒：Circularization Kit For MGI(CW3013)
- 6. DNA质控：Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或其他等效产品。
- 7. 其他材料：低吸附Nuclease-free的PCR管、1.5 mL离心管及过滤枪头，磁力架，无水乙醇（100%乙醇，分析纯），Nuclease-free ddH₂O，PCR仪器等。

RNA建库流程示意图



RNA文库构建流程

请在实验前仔细阅读本操作说明，根据使用测序平台类型选择操作方案。为保证建库质量，在实验开始前必须对RNA样品进行质控，按照供应商手册进行对应的mRNA富集或者是rRNA去除，若直接使用Total RNA建库，RNA应重悬在Nuclease-free ddH₂O中，不含盐（如Mg²⁺或胍盐）、螯合剂（如EDTA或EGTA）和有机物（如苯酚或乙醇），最后投入建库的RNA应避免DNA的污染。如果含有DNA，则需通过DNase I 孵育（试剂盒不提供）去除污染。但残留的DNase I 可能会干扰文库制备，因此确保样品中没有酶的残留非常重要。

适用范围

本试剂盒建议使用RNA完整度较好的样（RIN值 > 7），部分降解的样品，当RIN值≤7，RNA前处理不建议使用mRNA富集法，同时在建库过程中可能需要降低连接反应中的接头浓度，以减少接头二聚体的产生。或者可以在连接后进行二次纯化。

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：
 - 1.1 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。
 - 1.2 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。
 - 1.3 若使用Bioanalyzer进行RNA完整性检测，RIN值 > 7.0；若使用琼脂糖凝胶电泳检测，则28S和18S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。
 - 2.1 RIN或RQN值略低于标准，但基线光滑。
 - 2.2 RIN或RQN值达到标准，但基本线略有上升。
 - 2.3 基线光滑，RQN值达到标准，5S峰值略高。
 - 2.4 28S/18S或23S/16S值略低于标准，但基本线光滑。
3. RNA样品准备：
 - 3.1 混匀含RNA样品的溶液时应小心操作，轻柔吹打，切勿涡旋振荡，否则会使RNA断裂，影响文库片段大小。
 - 3.2 经Poly(A)法富集的mRNA后的RNA应尽快进行后续操作，避免RNA降解。
 - 3.3 如果RNA的初始浓度较低时，可使用冻干、乙醇沉淀、过柱回收或RNA纯化磁珠等方法浓缩RNA。
4. DNA纯化磁珠的注意事项：
 - 4.1 磁珠从2~8℃取出后应平衡至室温，否则影响磁珠的抓取效率。
 - 4.2 每次吸取磁珠前都应将其涡旋振荡充分混匀或者使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
 - 4.3 样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，待溶液彻底澄清后再吸取上清，吸取上清时应余留1~2 μL。转移上清时切勿吸取磁珠，即使微量残留都将造成分选效果不佳从而导致文库产量下降的后果。此时可将磁珠混匀重新置于磁力架上再次分离即可。由于磁力架吸力不同等原因，默认分离时间有时可能需要延长，以彻底分离磁珠和液体。
 - 4.4 使用新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，久置的80%乙醇会导致杂质残留从而影响文库产出。漂洗过程中Nuclease-free的PCR管应始终置于磁力架上，请勿扰动磁珠。第二遍80%乙醇漂洗磁珠后，应尽量吸干上清，减少杂质残留。产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成乙醇残留影响后续反应；过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下，室温干燥至磁珠表面呈现哑光即可。请勿加热干燥（如置于37℃烘箱）。
5. 建议使用带滤芯的枪头，在吸取不同样品时更换枪头。
6. 实验过程中务必使用新鲜的Nuclease-free ddH₂O，建议分装至小管中逐个取用，用后弃去。
7. 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。
8. 所有的试剂使用后务必立即盖上盖子，避免污染。
9. 接头
 - 9.1 该试剂盒在 dsDNA连接时适配 3' 末端悬挂T的接头类型。注意，接头的质量影响文库构建的整体效率，在实验之前确认接头的使用浓度。
 - 9.2 当使用截短型(或stubby)接头，即样本标签会在文库扩增时加入，如后期需在同一个流动槽上进行测序，客户需要为每一个文库准备带唯一标签序列的(UDI)PCR引物。
 - 9.3 使用截短型接头可以通过提高其在反应体系中的浓度而提升文库的构建效率，因此我们强烈推荐使用截短型的接头，以获得最好的性能。

文库构建流程

RNA前处理（mRNA富集法或rRNA去除法）

A mRNA富集(CW3090)

1. 样本准备
- 将 RNA 取出置于冰上溶解，用无核酸酶水(Nuclease-free ddH₂O)将2.5 ng-1 μg 总RNA稀释至50 μL于Nuclease-freePCR管中，冰上放置备用。
2. 磁珠清洗
- 2.1 将试剂从2 ~ 8℃取出，室温下平衡20 min，将mRNA Capture Beads 旋涡振荡5-10 sec至磁珠充分悬浮。
- 2.2 吸取10 μL mRNA Capture Beads 至Nuclease-freePCR管中，置于磁力架上，待溶液澄清后，轻柔吸弃上清(注意不要触动磁珠)。
- 2.3 从磁力架上取下PCR管，加入50 μL mRNA Binding Buffer 1，涡旋振荡彻底混匀磁珠。瞬离后将PCR管置于磁力架上，待溶液澄清后，轻柔吸弃上清(注意不要触动磁珠)。
- 2.4 从磁力架上取下PCR管，加入50 μL mRNA Binding Buffer 1，涡旋振荡彻底混匀磁珠，并瞬离待用。
3. mRNA 捕获及纯化
- 3.1 将稀释好的50 μL total RNA 样本加入50μL清洗好的磁珠中。
- 3.2 将反应体系涡旋振荡混匀，短暂离心使所有液体流至PCR管底部。
- 3.3 将反应体系放入提前预热的PCR仪中，按下表反应程序进行孵育：

步骤	温度	时间
变性	75℃	2 min
杂交	25℃	8 min
HOLD	25℃	HOLD

- 3.4 反应结束后，从PCR仪中取出样品置于磁力架上，待溶液澄清后彻底吸弃上清，不要触动磁珠。
- 3.5 向PCR管中轻轻加入180 μL mRNA Washing Buffer，待溶液澄清后彻底吸弃上清，不要触动磁珠。
- 3.6 将PCR管从磁力架上取下，加入50 μL mRNA Elution Buffer，涡旋振荡彻底混匀磁珠，瞬离后将样本置于PCR仪中80℃反应2min，25℃ hold。
4. mRNA 再次捕获及纯化
- 4.1 向步骤 3.6 溶液中加入50 μL mRNA Binding Buffer 2，涡旋振荡彻底混匀磁珠，瞬离后放入提前预热的PCR仪中，按下表程序进行孵育：

步骤	温度	时间
变性	75℃	2 min
杂交	25℃	8 min
HOLD	25℃	HOLD

- 4.2 反应结束后，从PCR仪中取出样品置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃上清，不要触动磁珠。
- 4.3 向PCR管中轻轻加入180 μ L mRNA Washing Buffer，待溶液澄清后彻底吸弃上清，不要触动磁珠。
- 4.4 于室温下开盖晾干磁珠至无明显镜面反光。
- 4.5 加入19 μ L 1 $\times$ Frag & Prime Buffer(按照片段化反应表配制)进行磁珠重悬，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀，短暂离心后直接置于 PCR仪中进行片段化反应。

B rRNA去除(CW3086)

1. rRNA和珠蛋白mRNA去除

- 1.1 PCR仪预热：热盖80℃，77℃ HOLD。
- 1.2 反应液配制：如下表在冰上进行体系配置，在触式旋涡仪(或3000 rpm)上混合4 sec，短暂离心收集液体至底部。

试剂名称	体积
Depletion Mix	4.5 μ L
rRNA/Globin Probe (HMR)	2.5 μ L
Total Volume	7 μ L

- 1.3 RNA样品准备：在200 μ L Nuclease-free PCR管中，用Nuclease-free ddH₂O将1 ng - 1 μ g 总RNA稀释至18 μ L，冰上放置备用。
- 1.4 去除体系配制：将步骤1.2配置的反应液按下表加入到装有18 μ L总RNA样品的PCR管中，在触式旋涡仪(或3000 rpm)上混合4 sec，短暂离心收集液体至底部。

试剂名称	体积
RNA Sample	18 μ L
Depletion Reaction Mix(步骤1.2)	7 μ L
Total Volume	25 μ L

注意：样品冰上放置时间应不超过10 min。

- 1.5 rRNA和珠蛋白mRNA去除反应：将样品放入提前预热的PCR仪，如下表进行反应，反应完成后立即进入下一步。

步骤	温度	时间
变性	77℃	2 min
rRNA去除	65℃	15 min
HOLD	4℃	HOLD

2. 探针消化

2.1 PCR仪预冷：热盖40℃，4℃ HOLD

2.2 消化体系配置：冰上操作，在步骤1.5的样品中添加35 μL Probe Digestion Mix，在触式旋涡仪(或3000 rpm)上混合4 sec，短暂离心收集液体至底部。

2.3 探针消化反应：将样品放入天预冷的PCR仪，如下表进行反应，反应完成后立即进入下一步。

步骤	温度	时间
探针消化	37℃	10 min
HOLD	4℃	HOLD

3. RNA纯化

采用纯化磁珠进行RNA纯化(也可使用其他类似试剂)，使用前将磁珠平衡到室温，并涡旋彻底重悬。

3.1 将磁珠旋涡混匀后，吸取108 μL(1.8×)至步骤2.3的样品中，在触式旋涡仪(或3000 rpm)上混合4 sec，短暂离心收集液体至底部，室温放置5 min。

3.2 将样品置于磁力架上5 min以上，直至溶液澄清，所有磁珠都吸附到管壁上，轻柔吸弃上清。

3.3 保持样品始终处于磁力架上，向样品中加入新鲜配制的80%乙醇，注意不要触动磁珠。室温放置30 sec以上，轻柔吸弃上清。

3.4 重复上一步骤，共漂洗2次。

3.5 保持样品始终处于磁力架上，室温下干燥3-5 min。

注：当磁珠表面出现裂纹并在管内看不到液体时，磁珠已充分干燥。

3.6 将样品从磁力架上取出，加入19 μL 1×Frag & Prime Buffer(按照片段化反应表配制)，用移液器吹打6次以充分混匀，室温静置2 min。然后在磁力架上静置2 min以上，待溶液澄清后，小心吸取17 μL上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，按照需求进行片段化反应。

RNA片段化

1. 根据选择的RNA前处理方法，配合使用1×Frag & Prime Buffer进行洗脱目标RNA。

1.1 mRNA富集法：直接加入19 μL 1×Frag & Prime Buffer进行磁珠重悬，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀，短暂离心后直接置于PCR仪中进行片段化反应。反应结束后，置于磁力架上，待溶液变澄清后，吸取17 μL上清至Nuclease-free PCR管中，立刻进行第一链cDNA合成反应。可参考表1选择片段化程序。

注意：选用mRNA抓取方案，为防止Poly(A)尾RNA与磁珠结合，在片段化反应程序结束后，立即将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，转移17 μL上清至Nuclease-free PCR管中，立即进入第一链cDNA合成反应。

1.2 rRNA去除法：加入19 μL 1×Frag & Prime Buffer进行磁珠重悬，室温静置2 min后，在磁力架上静置2 min以上，待溶液澄清后，小心吸取17 μL上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，按照需求进行片段化反应。可参考表1选择片段化程序。

2. 片段化反应1×Frag & Prime Buffer体系配制：

组分	体积
RNA-seq 2×Frag & Prime Buffer	10 μL
Nuclease-free ddH ₂ O	10 μL
Total	20 μL

3. 根据插入片段大小的需要，选择片段化条件，在PCR仪中进行如下反应：

步骤	温度	时间
热盖	105℃	On
片段化	参考表1	
HOLD	4℃	HOLD

注意：当程序结束并到达4℃后，立刻进入下一步第一链合成。可提前将双链cDNA合成需要的组分从-20 ± 5℃取出，冰上放置解冻。

表1 根据插入片段大小推荐的RNA片段化条件

插入片段大小(bp)	150-200	200-400	400-500
文库大小(bp)	320-420	420-520	520-620
片段化条件	94℃ 10 min 4℃ hold	94℃ 7 min 4℃ hold	94℃ 5 min 4℃ hold

第一链cDNA合成

1. 配制第一链cDNA合成反应体系：

组分	体积
上一步产物	17 μL
RNA-seq 1st Strand Enzyme	2 μL
RNA-seq 1st Strand Buffer	6 μL
Total	25 μL

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。

3. 在PCR仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖105℃	On
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	HOLD

注意：第一链合成反应结束后，将样本置于冰上，或保持在PCR仪4℃。立刻进行第二链合成和加A尾步骤。

第二链cDNA的合成/加A

1. 配制第二链cDNA合成/加A反应体系：

组分	体积
上一步产物	25 μL
RNA-seq 2nd Strand Enzyme	5 μL
RNA-seq 2nd Strand Buffer (dNTP)	30 μL
Total	60 μL

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。

3. 在PCR仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖105℃	On
16℃	30 min
72℃	15 min
4℃	HOLD

注意：第二链cDNA的合成/加A反应结束后，合成产物可在-20 ± 5℃暂存24h；低投入量或RNA质量不高的样本建议直接进行下一步反应。可提前将接头连接需要的组分从-20 ± 5℃取出，冰上放置解冻。

接头连接

1. 配制接头连接反应体系：

组分	体积
上一步产物	60 μL
RNA-seq DNA Ligase	5 μL
RNA-seq DNA Ligation Buffer	30 μL
Adapter*	5 μL
Total	100 μL

*注意：此步骤加入的Adapter浓度依据样本类型和投入量的不同，需要匹配不同的浓度。详情见表2。

表2 RNA投入Adapter使用浓度推荐表

Input RNA	Adapter工作浓度
10 ng	1 μM
100 ng	1.5 μM
500 ng	3 μM
≥ 1 μg	5 μM

注意：当使用部分降解样本时，降低接头的使用浓度或者执行连接后的二次纯化，都可能对减少接头二聚体有帮助。不建议长时间保存浓度小于10μM的接头溶液。

2. 使用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 短暂离心将所有液体收集至PCR管底部。

3. 在PCR仪中进行如下反应：

温度	时间
热盖105°C	Off
20°C	15 min
4°C	HOLD

注意：连接后纯化前将样本放置于冰上可减少接头二聚体的产生。

连接产物纯化后分选

以下为使用Agencourt RNA Clean XP Beads (Beckman #A63987)磁珠下的分选方案，如使用其他品牌磁珠请咨询技术支持。

纯化后分选方案为一轮纯化，两轮分选，根据不同的插入片段长度需求选择表3(Illumina)、表4(MGI)的纯化后分选方案，获得≥200 bp插入片段的文库。

表3. 根据插入片段大小推荐的分选条件(Illumina)

插入片段大小(bp)	150-200	200-300	300-400	400-500
文库大小(bp)	270-320	320-420	420-520	520-620
片段化条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
纯化磁珠用量	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
第一轮分选磁珠用量	75 µL	62 µL	55 µL	52 µL
第二轮分选磁珠用量	25 µL	25 µL	20 µL	20 µL

表4. 根据插入片段大小推荐的分选条件(MGI)

插入片段大小(bp)	150-200	200-300	300-400	400-500
文库大小(bp)	270-320	320-420	420-520	520-620
片段化条件	94°C 10 min	94°C 7 min	94°C 7 min	94°C 5 min
纯化磁珠用量	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
第一轮分选磁珠用量	70 µL	62 µL	55 µL	45 µL
第二轮分选磁珠用量	20 µL	25 µL	20 µL	20 µL

分选方案：本方案包含一轮纯化，两轮分选。可选择不同的纯化分选方案以获得预期插入片段长度。(以表3中94°C 7 min打断，分选插入片段大小200 - 300bp为例，其他插入片段长度请根据表3、表4选择相应的磁珠用量)

扩增产物纯化

1. 将磁珠提前30 min从2 ~ 8℃取出，静置使其平衡至室温。
2. 颠倒或涡旋振荡使磁珠充分混匀。吸取45 μL加入到扩增产物中，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
3. 室温孵育5 min，使DNA与磁珠充分结合。
4. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。
5. 保持样品处于磁力架上，加入没过磁珠的80%乙醇(新鲜配制)漂洗磁珠，室温孵育10 sec，小心移除上清。
6. 重复上述步骤一次。
7. 保持样品处于磁力架上，在室温下开盖干燥，至磁珠表面呈现哑光。
 - 7.1 加入80%乙醇时不要吹散磁珠。
 - 7.2 最后移除上清时需要使用10 μL移液器将残留液体吸干净。
 - 7.3 磁珠表面由深褐色变为棕褐色，表面无反光即可进行洗脱。如磁珠过度干燥会影响洗脱步骤的洗脱效率。
8. 将样品从磁力架上取出，加入22 μL Nuclease-free ddH₂O，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打10次充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后(约2 min)。小心吸取20 μL上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
 - 8.1 转移上清时切勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库产量。

文库质控

1. 文库浓度检测一般有两种方法：一是基于双链DNA荧光染料的方法，如Qubit、PicoGreen等，二是基于qPCR绝对定量的方法。不建议使用基于光谱检测的方法，如Nanodrop等。
2. 文库长度分布检测，可通过Agilent Bioanalyzer 2100等基于毛细管电泳或微控流原理的设备进行检测。