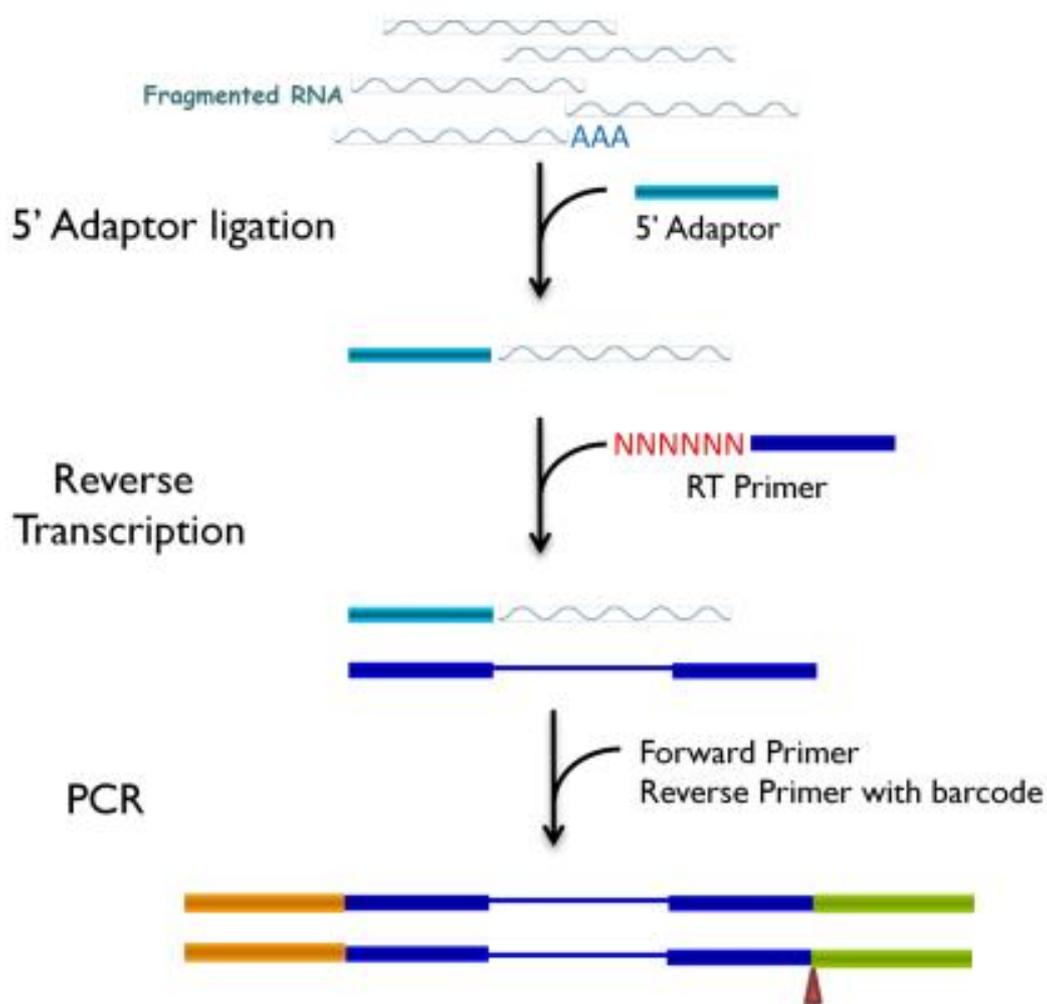


# RNA 高通量测序文库构建

## 实验流程图



## 一、实验材料

1. RNA Seq 5' Adaptor B
2. RNA Fragmentation Buffer (low input)
3. RNase Out
4. 10X Ligation Buffer
5. Ligation Enhancer Mix
6. 10mM ATP
7. Ligation Enzyme Supplement
8. Ligation Enzyme Mix
9. 10mM dNTP
10. 5X First Strand Buffer
11. Reverse Transcriptase
12. 100mM DTT
13. RT Primer (R)
14. DNA/RNA Seq PCR Primer F
15. DNA/RNA Seq Barcode Primer
16. 2X HiFi PCR Master Mix
17. Gnome Size Selector

## 二、主要仪器设备

台式离心机 (Thermo scientific); 电泳仪以及附件;

涡旋混合器 vortex (其林贝尔); -80°C冰箱 (Thermo scientific);

-20°C冰箱 (海尔公司); PCR 仪;

移液器 (Eppendorf); 磁力架

紫外照胶仪器,

## 实验方法

### 1、RNA 片段化

20ul 体系 0.2 PCR 管

RNA (10-100ng) x ul

RNA Fragmentation Buffer 4 ul

补充 DEPC 水至 (16-x) ul

PCR 仪 95°C, 5min, 然后放置冰上

### 2、片段化的 RNA 进行末端补平和加接头

仍然在步骤 1 的 0.2 PCR 管中进行

再加入

10X Ligation Buffer 3.6 ul

10mM ATP 4 ul

Ligation Enzyme Mix 1 ul

Ligation Enzyme Supplement 1 ul

RNaseOUT 1 ul

Ligation Enhancer Mix 8 ul

RNA Seq 5' Adaptor B 2 ul

总体积为 40.6 ul

PCR 仪或者水浴锅 (量温度) 37°C, 2h, 然后置于冰上

### 3、回收连接产物

a) 摇动悬起磁珠

b) 吸 40ul 连接产物到新的 1.5ml EP 管, 每个样品加入 24ul 磁珠, 颠倒混匀

c) 每个样品加入 16ul 100% 乙醇, 颠倒混匀

d) 室温放置 5min

e) 在磁力架上放置 3min

f) 去掉上清

- g) 仍然将 EP 管放到磁力架上，然后加入 100ul 70% 乙醇轻吹磁珠 3 次
- h) 除去 70% 乙醇，样品离开磁力架，空气晾干 5min
- i) 10ul DEPC 水悬起磁珠
- j) 低速旋转或者震荡 2min
- k) 4°C 离心或瞬离 10s
- l) 将样品放在磁力架上 3min
- m) 将上清吸 10ul 到新的 0.2ml PCR 管继续进行后续实验

#### 4、反转录

上一步纯化的 RNA	10ul
RT Primer (R)	1ul
10mM dNTP	1ul

65°C, 5min, 立即插入冰上 1min

然后再加入

5X First Strand Buffer	4ul
100mM DTT	2ul
RNaseOut	1ul

25°C 2min 后，再加入 1ul 反转录酶，25°C 10min，再 42°C 40min，再 70°C，15min

#### 5、cDNA 纯化

- a) 摇动悬起磁珠
- b) 加入 6ul dd H<sub>2</sub>O 稀释 cDNA，然后吸取 25ul cDNA 到干净的 1.5 EP 管，加入 45ul 磁珠，混匀 5 次，再加入 21ul 100% 乙醇，轻柔吹打 5 次混匀
- c) 室温放置 5min
- d) 磁力架上放置 3min
- e) 去掉上清
- f) 仍然将 EP 管放到磁力架上，然后加入 100ul 70% 乙醇轻吹磁珠 3 次

- g) 除去 70%乙醇，样品离开磁力架，空气晾干 5min
- h) 20ul 水悬起磁珠
- i) 低速旋转或者震荡 2min
- j) 4°C离心或瞬离 10s
- k) 将样品放在磁力架上 3min
- l) 将上清吸 20ul 到新的 0.2ml EP 管继续进行后续实验

## 6、PCR 扩增

50ul 反应体系，摸循环数时，可以减少到 10ul 体系。

cDNA	20ul
2× HiFi PCR Master Mix	25ul
D/R Seq PCR Primer F	1.25ul
D/R Seq bcX	1.25ul
RNase free H2O	2.5ul

## 7、PCR 反应条件

98°C for 45 second

PCR cycle of 10-15 \*

98°C for 15 second

60°C for 30 second

72°C for 30 second

72°C for 1 min

4°C 保存

## 8、PCR 产物的回收（此步骤也可以做胶回收）

- a) 摇动悬起磁珠
- b) 每个样品加入 70ul 磁珠，混匀 5 次
- c) 室温放置 5min
- d) 磁珠 3min（此步骤放在磁珠的时间要足够，不能将磁珠带到了后面步

骤)

- e) 将上清转移至新管，加入 50ul 磁珠，混匀 5 次，室温 5 分钟
- f) 磁珠 3min
- g) 去掉上清（此步骤上清要去干净，不能将上清带到后面的步骤）
- h) 仍然将 EP 管放到磁力架上，然后加入 180ul 70% 乙醇轻吹磁珠 3 次
- i) 除去 70% 乙醇，样品离开磁力架，空气晾干 5min
- j) 20ul 水悬起磁珠
- k) 转或者震荡 2min
- l) 将样品放在磁力架上 3min
- m) 将上清吸 20ul 到新的 1.5EP 管，保存到-20°C用于测序(标好用的 barcode 序号，循环数等)

### 胶回收

- (1) 100mg=100ul 体积，加入 3 倍体积 BufferQG，42°C 10min，每隔 2-3min 混匀，直至完全溶解，瞬离。加入 1 倍胶体积的异丙醇，瞬离，每次取 750ul 至 Elute 柱，13000rpm 离心 1min。
- (2) 加入 500ul Buffer QG，离心 1min。加入 750ul Buffer PE，离心 1min。再一次加入 500ul buffer PE 洗涤，空转 1 次 2-3min。
- (3) 10ul EB(预先放置 65°C预热)洗脱，静置 1-2min，13000rpm 离心 1min，10ul EB 再洗脱一次。