Vazyme

www.vazyme.com

VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina®

NR801

Vazyme

Vazyme Biotech Co., Ltd

Web: www.vazyme.com
Tel: 400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com
Service: service@vazyme.com

企业已通过ISO 9001:2015
国际质量管理体系认证

Vazyme

www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 7.1

目 录 Contents

01/产品概述 …… 02
02/产品组分 …… 02
03/保存条件 …… 02
04/适用范围 …… 02
05/自备材料 …… 03
06/注意事项 …… 03
07/实验原理与流程概要 …… 04
08/使用方案 …… 06
08-1/3'接头连接 …… 06
08-2/多余3'接头封闭 …… 06
08-3/5'接头连接 …… 07
08-4/cDNA合成 …… 07
08-5/文库富集 …… 08
08-6/PCR产物纯化 …… 08
08-7/文库分选 …… 10
09/常见问题及解决方案 …… 12

01/产品概述

VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina®是针对Illumina®高通量测序平台定向开发的small RNA文库构建专用试剂盒。本试剂盒适用于模板起始量为0.1-1 μg的动、植物总RNA，以及分离纯化的small RNA。small RNA的3'和5'端分别连上通用接头，再经过逆转录、PCR扩增以及PAGE胶或磁珠纯化等步骤，最终得到适用于Illumina®平台的测序文库。试剂盒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。

02/产品组分

组分	NR801–01 (24 rxn)	NR801–02 (96 rxn)
RL3 Adaptor	24 μl	96 μl
RL3 Buffer	240 μl	960 μl
RL3 Enzyme mix	72 μl	288 μl
RT Primer	24 μl	96 μl
RL5 Adaptor	24 μl	96 μl
RL5 Buffer	24 μl	96 μl
RL5 Enzyme mix	60 μl	240 μl
RT Buffer	192 μl	768 μl
RT Enzyme mix	48 μl	192 μl
Amplification mix 3	1.2 ml	4 × 1.2 ml
pBR322/MspI digest DNA Marker	120 μl	480 μl
6 × Loading Buffer	500 μl	2 × 1 ml
Co-precipitator	120 μl	480 μl
RNase-free H_2O	500 μl	2 × 1 ml
GE Buffer	6 ml	24 ml
Filtration Column	24 个	96 个

▲产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色

03/保存条件

RL5 Adaptor，-70°C储存；Filtration Column，室温储存；其余组分，-20°C储存。

04/适用范围

VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina®适用于模板起始量为0.1-1 μg完整度良好（RIN≥7）的动、植物总RNA， 以及分离纯化的small RNA。不同样品的总RNA中small RNA含量差异较大，若总RNA投入量过低则无法保证文库构建成功。如使用不完整或者降解的（RIN<7）总RNA样品构建文库，最终文库中rRNA等其他种类RNA比例会升高，因此建议使用 Agilent RNA 6000 Pico Kit对总RNA样品进行质控，尽量避免使用RIN<7的RNA样品。

Vazyme
www.vazyme.com

05/自备材料

Small RNA Index Primer：VAHTS™ Small RNA Index Primer Kit for Illumina®（Vazyme#N813-816）
RNA质控：Agilent RNA 6000 Pico Kit （Agilent #5067-1513）；
文库质控：Agilent DNA 1000 kit （Agilent #5067-1504）、Agilent High Sensitivity Kit （Agilent # 5067-4626）；
文库纯化：VAHTS™ DNA Clean Beads （Vazyme #N411）；
文库分选：
1. PAGE胶分选：
6% Novex® TBE PAGE gel 1.0 mM 10-well （Life Technologies#EC6265BOX）、5 × TBE、Ultra GelRed Nucleic Acid Stain（Vazyme #GR501）或SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain （Life Technologies#S11494）、3M 醋酸钠（pH 5.2）、无水乙醇、新鲜配制的80%乙醇；
2. 磁珠分选：VAHTS™ DNA Clean Beads （Vazyme #N411）、新鲜配制的80%乙醇。
其他必备材料：
Nuclease-free H_2O 、RNase-free PCR管、低吸附EP管（Eppendorf #022431021）；
Agilent 2100 Bioanalyzer或其他等效产品、PCR仪、磁力架、-80℃冰箱、水浴锅、离心机。

06/注意事项

06–1/试剂盒各组分应于标注条件下保存

1. 5'接头RL5 Adaptor 为RNA接头，请置于-70℃保存。
2. 试剂盒中的各酶类组分，请置于-20°C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，使用后及时按条件保存，否则会导致酶活降低。
3. RL3 Buffer比较粘稠，解冻混匀后请短暂离心收集至管底，避免液体粘附于管盖和管壁，导致试剂损失。

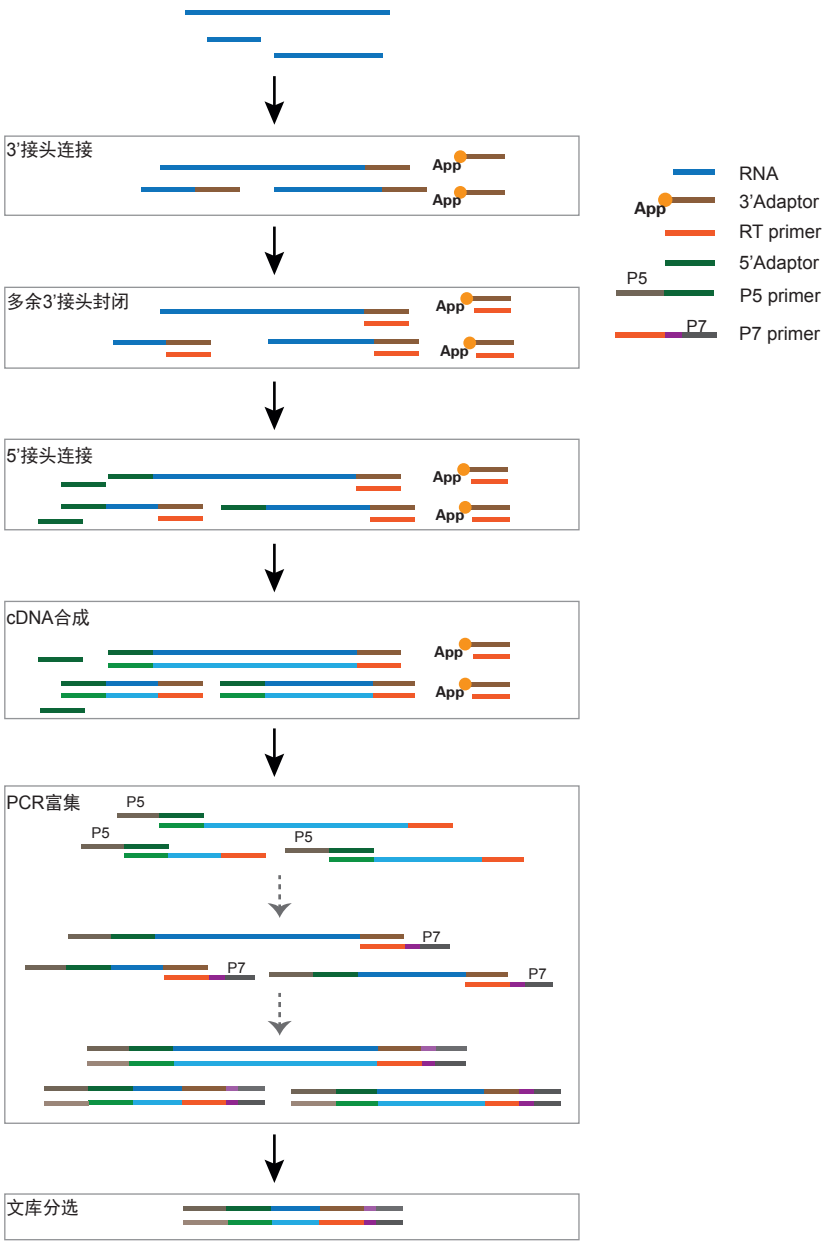
06–2/RNA样品质控

为保证建库质量，实验开始前请对RNA样品进行质控，RNA样品总量、纯度和完整性应满足以下条件：
1.以总RNA为起始模板，请使用沉淀法（如trizol法）或者small RNA专用提取试剂盒提取RNA样品，确保所使用的提取方法不会损失small RNA。
2.总RNA模板的起始投入量应≥100 ng，若起始投入量过低，不能确保文库构建成功。
3.OD260/OD280比值介于1.8-2.2之间，使用Bioanalyzer进行RNA完整性检测，RIN值≥7；使用琼脂糖凝胶电泳检测，则28S:18S≥1.5，且无蛋白质和基因组污染。

06–3/操作过程注意事项

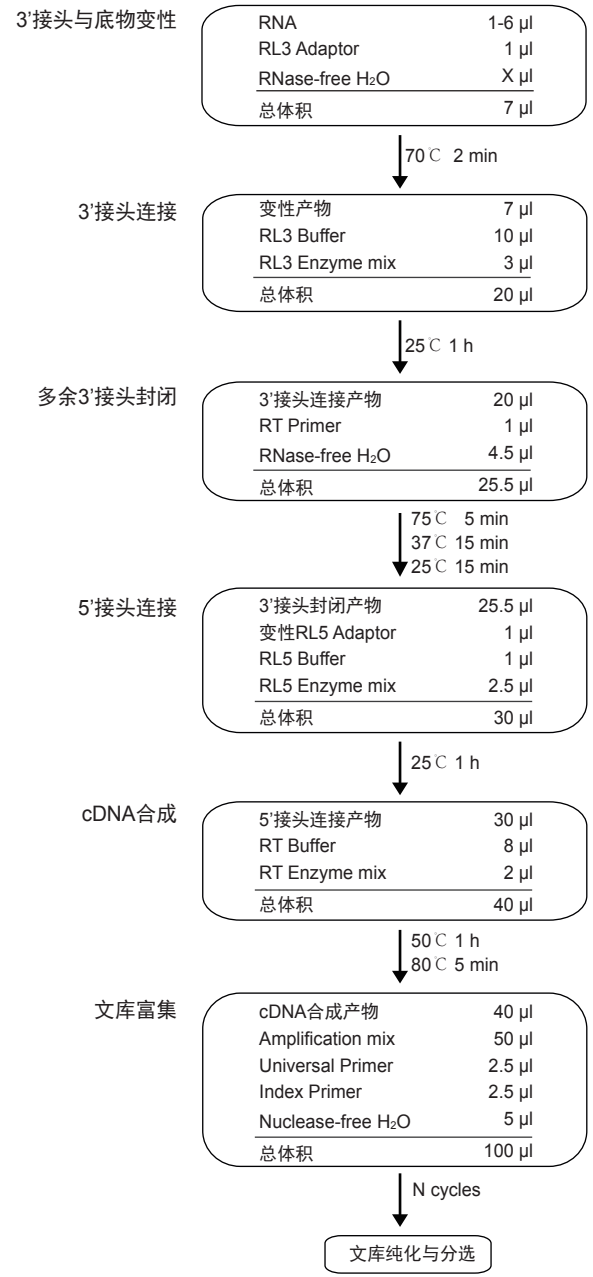
1. 实验过程中请使用RNase-free的枪头、EP管、PCR管，吸取不同样品时请更换枪头。
2. 请佩戴手套、口罩操作，接触RNase-free 空间外设备或其他工作区间后，请更换手套。
3. 所有的试剂使用后请立即盖上管盖，避免污染。
4. 实验过程中如需暂停，请严格按照使用方法中注明的可停放点将样品置于合适的温度下保存，不正确的停放可能会降低建库成功率。

07/实验原理与流程概要



Vazyme
www.vazyme.com

VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina® 文库构建流程



08/使用方案

08–1/ 3'接头连接

将RL3 Adaptor、RL3 Buffer、RL3 Enzyme mix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。

1. 模板与接头变性：将RNA底物自身以及RNA底物之间可能存在的二级结构打开。
   在RNase-free的PCR管中配制反应体系，如起始模板投入大于100 ng，则按照下表配制反应体系；
   如起始模板投入为100 ng，需使用RNase-free H_2O将3'接头RL3 Adaptor 进行1:1稀释，再按照下表配制反应体系。

组分	体积	
RNA	1-6 μl	
*RL3 Adaptor	1 μl	■
RNase-free H_2O	X μl	□
Total	7 μl	

▲*请根据起始模板投入量稀释接头，如接头使用量过多可能导致最终文库中接头二聚体增加。

2. 将PCR管置于提前预热至70℃的PCR仪中反应2 min，反应结束后立即取出置于冰上2 min。
3. 向步骤2的反应管中依次加入如下组分：

组分	体积	
步骤2产物	7 μl	
RL3 Buffer	10 μl	■
RL3 Enzyme mix	3 μl	■
Total	20 μl	

4. 使用移液器吹打10-15次充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于热盖的PCR仪中运行如下程序：

温度	时间
25℃	1 h
4℃	hold

▲ RL3 Buffer和RL3 Enzyme mix均比较粘稠，吸取时请尽量缓慢，以保证吸取体积准确；
▲该步骤的反应混合液比较粘稠，请使用移液器进行吹打混匀。

08–2/多余3'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。

1. 如起始模板投入大于100 ng，则按照下表配制反应体系；如起始模板投入为100 ng，需使用RNase-free H_2O将RT Primer进行1:1稀释，再按照下表配制反应体系。

组分	体积	
08-1步骤4产物	20 μl	
RT Primer	1 μl	■
RNase-free H_2O	4.5 μl	□
Total	25.5 μl	

2.使用移液器吹打10-15次混匀，短暂离心收集至管底。置于热盖的PCR仪中运行如下程序：

温度	时间
75℃	5 min
37℃	15 min
25℃	15 min
4℃	hold

08–3/5'接头连接

将5'接头RL5 Adaptor、RL5 Buffer和RL5 Enzyme mix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。

1.5'接头变性：5'接头RL5 Adaptor自身可能形成二级结构，使用前需变性打开二级结构。
按照反应个数N，取N × 1.1 μl 5'接头RL5 Adaptor 于RNase-free的PCR管中；
如起始模板投入为100 ng，需使用RNase-free H_2O对RL5 Adaptor进行1:1稀释；
将PCR管置于提前预热至70℃的PCR仪中反应2 min，反应结束后立即取出置于冰上2 min。

2.按照下表配制5'接头连接反应体系：

组分	体积
08-2步骤2产物	25.5 μl
变性RL5 Adaptor	1 μl
RL5 Buffer	1 μl
RL5 Enzyme mix	2.5 μl
Total	30 μl

3.使用移液器吹打10-15次充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于热盖的PCR仪中运行如下程序：

温度	时间
25℃	1 h
4℃	hold

08–4/cDNA合成

将RT Buffer和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。

1.按照下表配制逆转录反应体系：

组分	体积
08-3步骤3产物	30 μl
RT Buffer	8 μl
RT Enzyme mix	2 μl
Total	40 μl

2.使用移液器吹打10-15次充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于热盖的PCR仪中运行如下程序：

温度	时间
50℃	1 h
80℃	5 min
4℃	hold

该步骤反应产物可于-20℃存放24 h。

08–5/文库富集

将 Universal Primer 、Index Primer 和Amplification mix 3 取出，解冻混匀后置于冰上备用。

▲VAHTS™ Small RNA Index Primer Kit for Illumina®（Vazyme#N813-816）包含1种Universal Primer 和48种不同的Index Primer 。

1.按照下表配制反应体系：

组分	体积
08-4步骤2产物	40 μl
Amplifiction mix 3	50 μl
Universal Primer	2.5 μl
Index Primer	2.5 μl
Nuclease-free H_2O	5 μl
Total	100 μl

2.将上述反应液混匀，短暂离心收集至管底。将反应管置于热盖的PCR仪中运行如下反应程序：

温度	时间	
94℃	3 min	
94℃	15 sec	N cycles
65℃	15 sec	
72℃	15 sec	
72℃	1 min	
4℃	hold	

反应循环数参考如下表：

模板投入	循环数
1 μg	12-13
500 ng	13-14
200 ng	14-15
100 ng	15-16

▲不同样本的small RNA含量差异较大，上表的参考反应循环数是依据293T细胞总RNA和小鼠肝脏组织总RNA为测试样本得到的参考数据。

该步骤反应产物可于-20℃存放24 h。

08–6/PCR产物纯化

1.将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2-8°C取出，静置使其平衡至室温。
2.颠倒或涡旋振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，吸取180 μl (1.8 ×)加入到PCR产物中，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
3.室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
4.将样品置于磁力架上，待溶液澄清后(约10 min)，小心移除上清。
5.保持样品始终处于磁力架上，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
6.重复步骤5一次。
7.保持样品始终处于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约5-10 min。

▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠；

▲最后移除上清时需使用10 μl移液器将残留液体吸干净，避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

Vazyme
www.vazyme.com

8. 将样品从磁力架上取出，加入30 μl Nuclease-free H_2O，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后（约5 min），小心吸取27.5 μl上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。

洗脱产物可在-20℃暂存一周；除磁珠纯化外，PCR产物也可使用对200 bp以下DNA片段有较高回收效率的PCR 产物专用纯化试剂盒进行纯化。

9. Agilent 2100 Bioanalyzer检测文库：取1 μl纯化后的PCR产物用Agilent DNA 1000 chip分析，由于2100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，如图1所示：miRNA文库的峰在143-147 bp处，piRNA文库的峰在153-156 bp处。

▲不同样本中small RNA含量和种类均有差别，不同长度的miRNA、piRNA及其他small RNA的比例也有差异，最终文库主峰的位置也可能存在几个碱基的偏差。

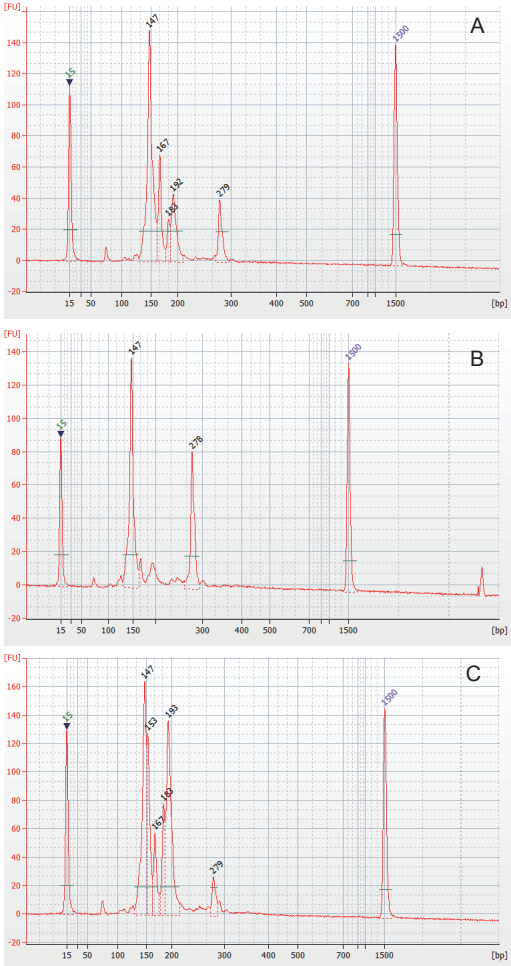


图1：A图和B图分别为1 μg、100 ng小鼠肝脏总RNA起始的small RNA文库，147 bp处的主峰为miRNA；C图为1 μg小鼠肾脏总RNA起始的small RNA文库，147 bp处的主峰为miRNA，153 bp处的主峰为piRNA。

08–7/文库分选

根据08-6步骤9文库质控的结果选择文库分选纯化方式，如2100图显示120 bp处有较多接头二聚体、70-80 bp处有较多扩增引物残留以及160 bp和190 bp处有明显的rRNA，则建议选择PAGE胶分离；如接头二聚体、扩增引物残留以及rRNA较少则可以选择磁珠进行文库分选。为确保最终有效文库的比例，建议使用PAGE胶进行文库分选。

方案A：6% 非变性PAGE胶分选文库

1. 将6% 10孔非变性PAGE胶装置于电泳槽中，向其中加入适量1× TBE电泳缓冲液。
2. 向纯化的PCR产物中加入5 μl 6× Loading Buffer混匀后离心收集至管底。
3. 取5 μl pBR322/MspI digest DNA Marker缓慢加入PAGE胶样孔中，然后再加入10 μl 1× Loading Buffer进行平衡。
4. 将混有Loading Buffer的PCR产物缓慢加入PAGE胶样孔中，每个样品上两个样孔，每孔15 μl。如有多个文库在同一PAGE胶上电泳，为避免样品间交叉污染，不同样品间需隔开一个样孔，空出的样孔可补加15 μl 1× Loading Buffer进行平衡。
5. 上样完成后，120-150 V电压电泳约1 h，不同的电泳装置电泳迁移速率可能不一致，所需电泳时间有差异，待样孔中的Loading Buffer蓝色指示剂全部跑出胶板后约3-5 min方可停止电泳。
6. 将PAGE胶从电泳装置中取出，并将PAGE胶从胶板上剥下。用Gel-red核酸染料染色10 min，在凝胶成像仪中进行观察，如图2所示，大约140 bp和150 bp处的条带分别对应于miRNA文库和piRNA文库。

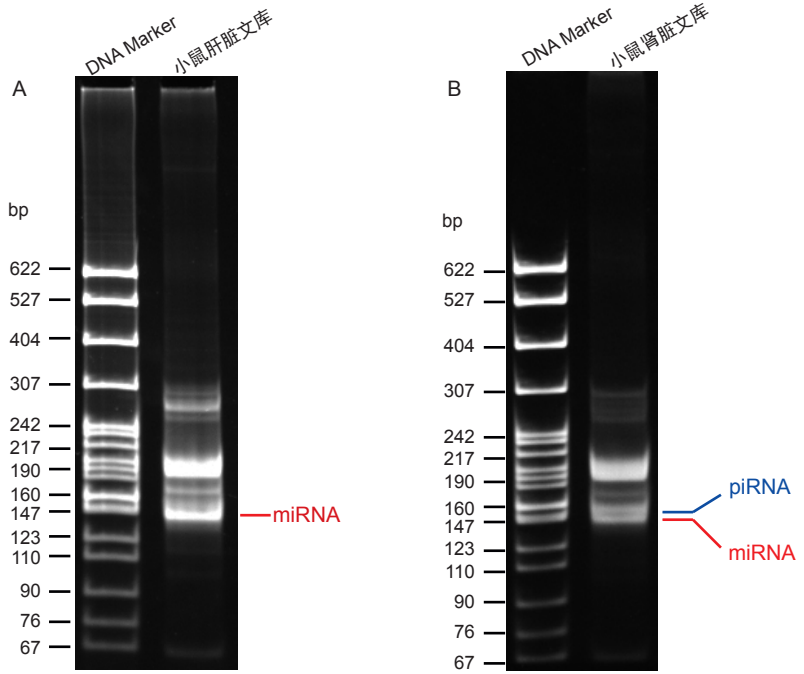


图2：A图为1 μg小鼠肝脏总RNA起始的small RNA文库，红线指示的条带为miRNA文库；B图为1 μg小鼠肾脏总RNA起始的small RNA文库，红线指示的条带为miRNA文库，蓝线指示的条带为piRNA文库。

Vazyme
www.vazyme.com

7. 用刀片将对应的条带割下放于事先准备好的500 μl低吸附EP管中（管底已用酒精灯烧过的1 ml注射器针头戳了数个小洞），将500 μl EP管套到1.5 ml低吸附EP管中，12000 rpm离心 2 min碾碎胶条。

▲胶条的碾碎程度取决于500 μl EP管底部小洞的孔径，所以只需使用注射器针头戳穿即可。

8. 离心完成后弃掉500 μl EP管，向装有PAGE胶碎片的1.5 ml EP管中加入250 μl GE Buffer，于50℃水浴锅中温育1-2 h。
9. 将步骤8的EP管于离心机中12000 rpm 离心2 min，将蒸发到管壁的液体收集至管底。
10. 将步骤9的上清转移至离心过滤柱Filtration Column中12000 rpm 离心2 min收集液体，弃去离心柱，将液体转移至新的1.5 ml低吸附EP管中。
11. 向步骤10的上清中分别依次加入5 μl Co-precipitator，30 μl 3M 醋酸钠（pH 5.2）和1 ml无水乙醇，振荡混匀后于-80℃沉淀1 h。
12. 取出-80℃沉淀产物，于预冷至4℃的冷冻离心机中12000 rpm，离心30 min。
13. 小心移除上清，注意切勿吸取到白色沉淀。向EP管中加入1 ml 新鲜配制的80%乙醇，于预冷至4℃的冷冻离心机中，12000 rpm离心10 min。
14. 小心移除上清，注意切勿吸取到白色沉淀。短暂离心将管壁上残留的液体收集至管底，小心移除残留液体，室温开盖干燥约10 min。
15. 待步骤14产物中残留的酒精全部挥发，加入15 μl Nuclease-free H_2O溶解沉淀。
16. 2100检测分选纯化的文库：取1 μl分选纯化的产物用Agilent High Sensitivity DNA Chip分析，良好的文库应该如图3所示，对应的miRNA文库条带在147-149 bp处。

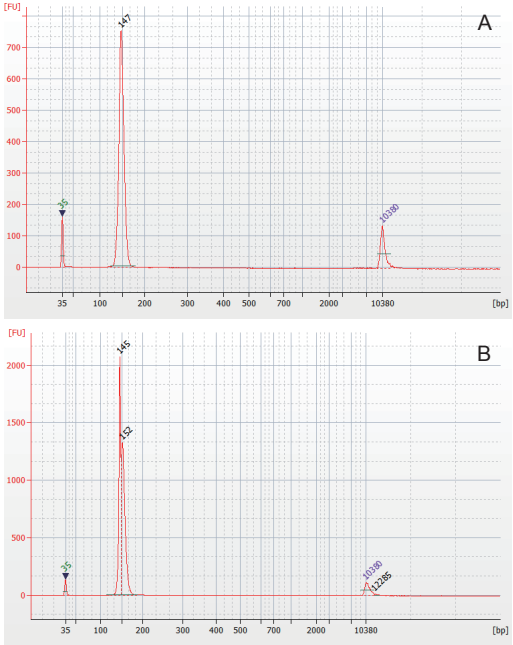


图3：A图为1 μg小鼠肝脏总RNA起始的small RNA文库PAGE胶纯化后对应的2100图；B图为1 μg小鼠肾脏总RNA起始的small RNA文库PAGE胶纯化后对应的2100图。

方案B：双轮磁珠分选文库

1. 将VAHTS DNA Clean Beads提前30 min从2-8°C取出，静置使其温度平衡至室温。
2. 颠倒或涡旋振荡使VAHTS DNA Clean Beads充分混匀，取25 μl纯化的PCR产物于200 μl PCR管中吸取32.5 μl 磁珠 （1.3 ×）加入到PCR产物中，使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
3. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
4. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约5 min），小心移取上清至新的Nuclease-free PCR管中。
5. 向步骤4的产物中加入22.5 μl磁珠（0.9 ×），使用移液器轻轻吹打10次充分混匀。
6. 室温孵育10 min，使DNA结合到磁珠上。
7. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约5 min），小心弃去上清。
8. 保持样品始终处于磁力架上，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温下孵育30 sec，小心移除上清。
9. 重复步骤8一次。
10. 保持样品始终处于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约5-10 min。

▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠；

▲最后移除上清时需要使用10 μl移液器将残留液体吸干净；

▲应避免磁珠过分干燥（龟裂）而降低回收效率。

11. 将样品从磁力架上取出，加入17.5 μl Nuclease-free H_2O，使用移液器轻轻吹10次打充分混匀，室温静置2 min后置于磁力架上，待溶液澄清后（约5 min），小心吸取15 μl上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。
12. 2100检测分选纯化的文库：取 1 μl分选纯化的产物用Agilent DNA 1000 Chip或Agilent High Sensitivity DNA Chip分析，良好的文库应该如图4所示，对应的miRNA文库条带在147-149

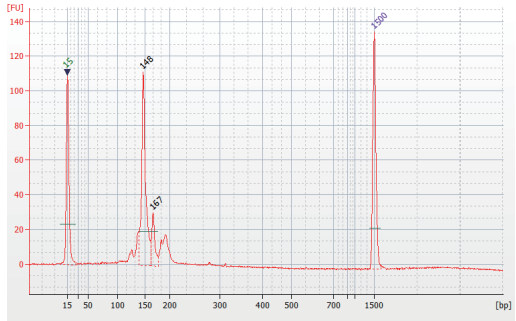


图4：1 μg小鼠肝脏总RNA起始的small RNA文库磁珠分选后对应的2100图

09/常见问题及解决方案

1. VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina®构建的small RNA文库结构：

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC——Insert——AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACIIIIIIATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Index

Vazyme
www.vazyme.com

2.除Ttrizol裂解法提取总RNA外，能否使用离心柱法提取的总RNA作为起始模板？

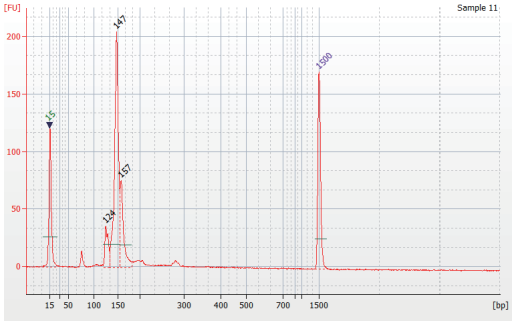
本试剂盒对总RNA的提取方式无特殊要求，如使用离心柱法提取试剂盒提取总RNA，请确保所使用的提取试剂盒不会损失small RNA。

3.RT primer能否在cDNA合成步骤添加？

不能。3'接头连接完成后加入的RT primer与多余3'接头反向互补形成双链结构，可以有效阻止5'接头与3'接头连接，从而减少接头二聚体的形成；另外，RT primer与已连上3'接头的RNA底物方向互补可作为逆转录步骤的引物，因此RT primer必须在3'接头连接完成之后添加，不能在cDNA合成步骤才添加。

4.除常规的动植物总RNA外，其他类型的总RNA是否可以作为起始模板进行文库构建？

除动、植物总RNA以及分离纯化的small RNA外，本试剂盒可以兼容其他类型的总RNA，比如外泌体总RNA作为起始模板。下图为以hela细胞培养物上清的外泌体总RNA为模板构建的miRNA文库（起始模板投入 80 ng）。



5.自备组分配方

5× TBE电泳缓冲液配方（1 L）

组分	质量/体积
Trise	54 g
硼酸	27.5 g
EDTA-2Na	4.65 g
ddH_2O	定容至1 L

完全溶解后即为5× TBE，将其稀释5倍即为1× TBE。

3M 醋酸钠（pH5.2）配方（10 ml）

组分	质量/体积
CH3COONa	2.46 g
ddH_2O	8 ml

完全溶解后，冰醋酸调节pH至5.2，ddH_2O定容至10 ml。