



Magic Small RNA Library Prep Kit for Illumina



Magicbio # M322

产品简介

Magic Small RNA Library Prep Kit for Illumina适用于构建illumina测序平台的microRNA文库，试剂盒操作简单，建库过程只需进行移液操作，无需纯化转管，极大地避免了操作带来的误差，构建的文库均一性高。

试剂盒组成

产品成分	M3221（24次）	M3222（96次）	保存条件
● 3 ADT	24 μL	96 μL	-20℃
● RNA Ligase 1	12 μL	48 μL	-20℃
● RNA Ligation Buffer 1	48 uL	192 uL	-20℃
● Ligation Enhancer Mix	60 μL	240 μL	-20℃
○ 5 ADT	24 μL	96 μL	-80℃
○ RNA Ligase 2	24 μL	96 μL	-20℃
○ RNA Ligation Buffer 2	36 μL	144 μL	-20℃
● RT Primer	24 μL	96 μL	-20℃
● RT buffer Mix	200 μL	800 μL	-20℃
● Reverse Transcriptase	24 μL	96 μL	-20℃
● RNase Inhibitor	48 μL	192 μL	-20℃
● PCR Master Mix	300 μL	1.2 mL	-20℃
● Primer-Universal	24 μL	96 μL	-20℃
● Magic Primer-Index	3 μL × 24管	6 μL × 48管	-20℃
PAGE Elution Buffer	12 mL	50 mL	4℃

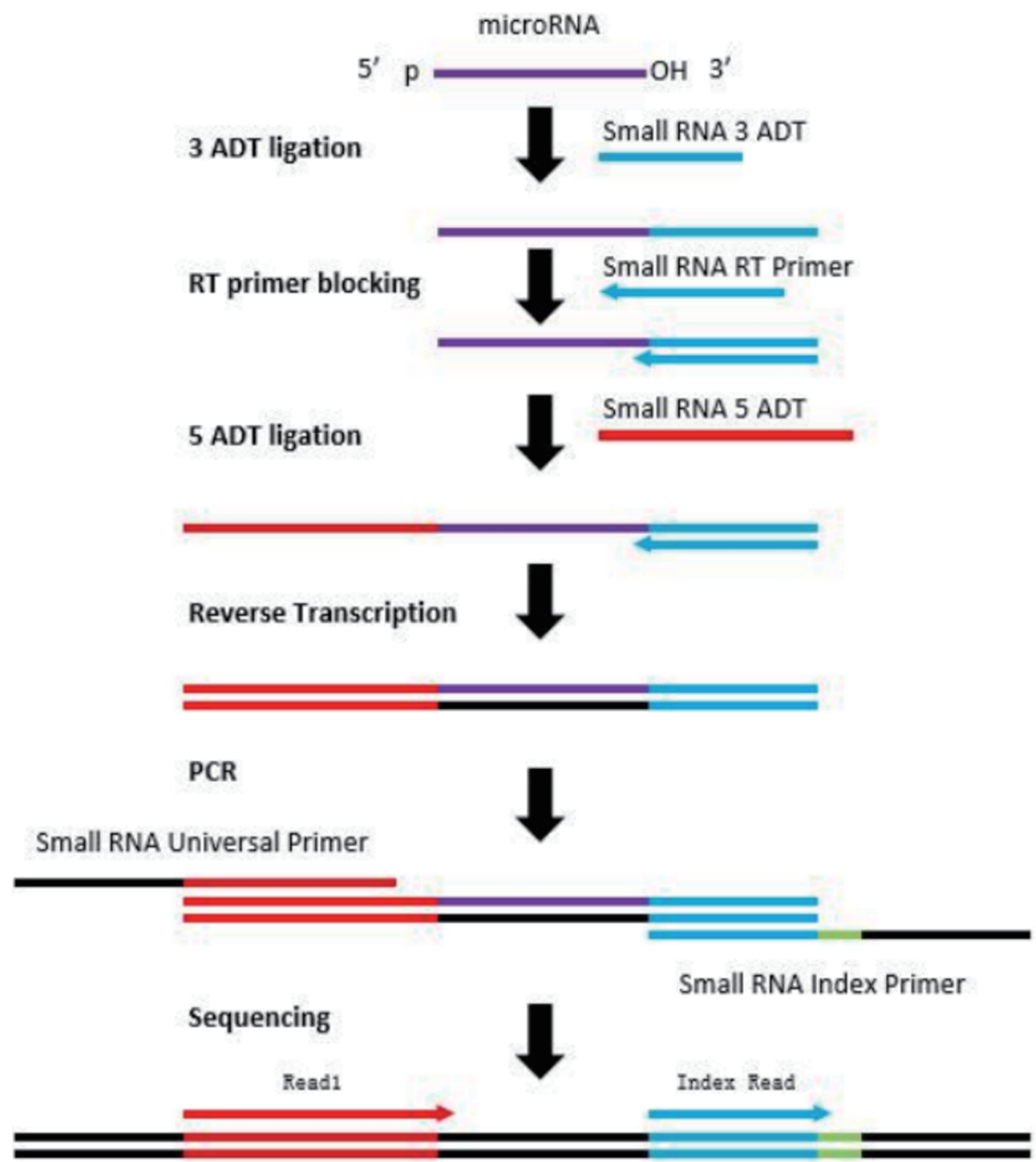
注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 收到试剂盒后，请将PAGE Elution Buffer保存至4℃。
3. 为保证连接效率，请尽量避免●3 ADT和○5 ADT反复冻融，建议分装多管保存。
4. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
5. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、EP管进行试验。
6. 请确保实验所用RNA样本质量较好，浓度在250 ng/μL以上。
7. 文库割胶回收时，所有用具均需保持干净，防止样本之间的交叉污染。

需自备试剂和耗材

无水乙醇；Nuclease-free H₂O；丙烯酰胺凝胶电泳试剂及耗材；Glycogen（糖原）；20 bp Marker（Takara，3420A）；核酸染料；Spin-X Centrifuge Tube(Corning，8162)；200 μL PCR管；500 μL PCR管；1.5 mL离心管；2 mL离心管。

实验原理图



操作步骤

1、3 ADT接头连接

1.1 在新的PCR管中配制如下反应体系：

Total RNA (0.5~1μg)	x μL
● 3 ADT	1.0 μL
Nuclease-free H ₂ O	(4.0-x) μL
Total	5.0 μL

充分混匀后，在PCR仪中70℃变性2 min。反应结束后取出，迅速放在冰上2 min，立即进行下游操作。

1.2 在样本变性PCR管中，加入以下反应体系：

● RNA Ligation Buffer 1	1.8 μL
● RNase Inhibitor	0.5 μL
● RNA Ligase 1	0.5 μL
Total	7.8 μL

充分混匀后，每个样本管再加入2.2 μL的● Ligation Enhancer Mix，使用移液器充分混匀后，在PCR仪中37℃反应1h。反应结束后取出，放在冰上，立即进行下游实验。

注意：Ligation Enhancer Mix非常粘稠，需先将其他试剂加入样本管充分混匀，再加入Ligation Enhancer Mix充分混匀。

2、RT引物结合

在上游反应的PCR管中，加入1 μL的●RT Primer，充分混匀后，在PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间
75℃	5 min
37℃	30 min
25℃	15 min

结束后取出，放在冰上，立即进行下游实验。

3、5 ADT接头连接

在上游反应的PCR管中，加入以下反应体系：

○RNA Ligation Buffer 2	1.4 μL
●RNase Inhibitor	0.5 μL
○5 ADT	1.0 μL
○RNA Ligase 2	1.0 μL
Total	14.9 μL

充分混匀后，在PCR仪中37℃反应1h。反应结束后取出，放在冰上，立即进行反转录实验。

4、反转录

在上游反应的PCR管中，加入以下反应体系：

● RT buffer Mix	8.0 μL
● RNase Inhibitor	1.0 μL
● Reverse Transcriptase	1.0 μL
Total	24.9 μL

充分混匀后在PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间
50℃	15 min
80℃	10 min

结束后取出，放在冰上，立即进行PCR扩增。如需暂停实验，可以把RT产物放在-20℃保存过夜。

5、PCR扩增

在新的PCR管中，配制如下反应体系：

RT Product	5.0 μL
● PCR Master Mix	12.5 μL
● Primer-Universal	1.0 μL
● Magic Primer-Index N*	1.0 μL
Nuclease-free H ₂ O	5.5 μL
Total	25.0 μL

*Small RNA Library Index Kit提供多种index，可根据样本数量选购。

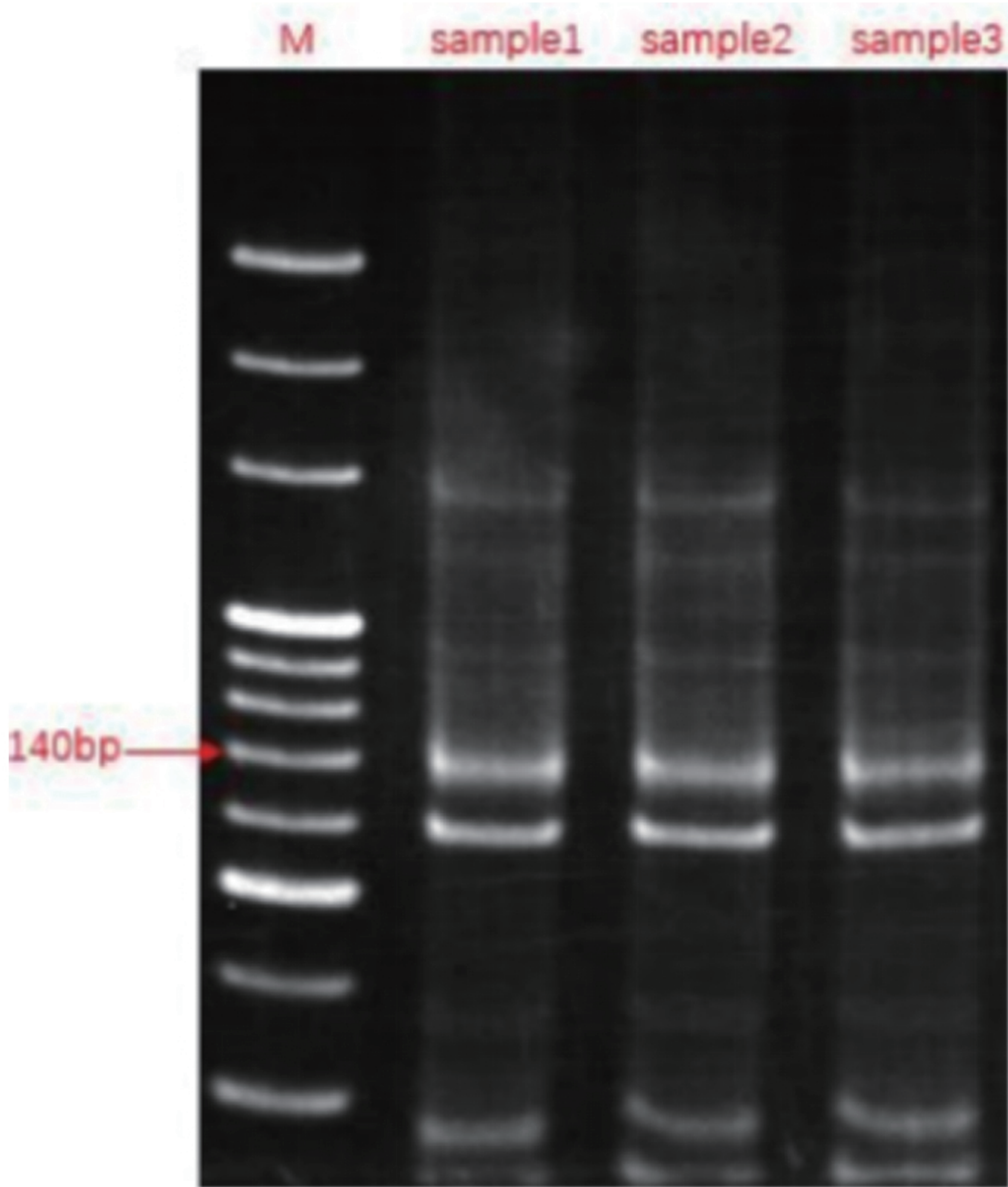
充分混匀后，在PCR仪中进行如下反应：

温度	时间	循环数
98℃	30s	} 18 Cycles
98℃	10s	
60℃	30s	
72℃	15s	
72℃	7min	
4℃	∞	

结束后取出，用6%的PAGE胶进行文库质检或置于-20℃保存。

6、PCR产物质检

取2 μL PCR产物，用6%的PAGE胶，200V电泳25 min。使用核酸染料染色后观察，建库成功则能在140 bp Marker处看到清晰单一的条带，如下图：



7、文库割胶回收

- 1) 配置6%的PAGE胶；
- 2) 待胶凝固后，将固定架拆除，胶板冲洗干净，将胶板放入电泳槽中；
- 3) 将剩余的PCR产物和一定比例的6×loading buffer混合均匀；
- 4) 根据PCR产物质检情况，在每个胶孔中加入3~5 μL混合好的PCR产物；
(注：上样量太多会对割胶带来不便)
- 5) 取3 μL 20 bp Marker，电压200 V，进行电泳；
- 6) 准备管底带孔的500 μL PCR管和与其配套的2 mL离心管，500 μL PCR管置于2 mL离心管里；
- 7) 电泳结束后，取出凝胶，放入新鲜配制含有核酸染料的ddH₂O中染色5 min；

- 8) 染色结束后，取出凝胶，放入洁净的ddH₂O中漂洗干净，取出凝胶，拍照；
- 9) 将样品中大小为140 bp的条带切割回收，放入预先准备好的500 μL PCR管中；
- 10) 13000 rpm，离心1 min使500 μL PCR管内的凝胶过滤入2 mL离心管内，弃掉500 μL PCR管；
- 11) 加入500 μL PAGE Elution Buffer，混匀，45°C孵育2 h，孵育期间每隔15 min摇匀一次；
- 12) 将凝胶和液体快速倒入Spin-X Centrifuge Tube的柱子中，13000 rpm，离心3 min，当观察到液体全进入下方管子内时，弃掉柱子；
- 13) 液体中加入1400 μL无水乙醇和2 μL Glycogen，混匀，-80°C放置30 min（或者-20°C放置过夜）
- 14) 4°C，13000 rpm离心25 min，倒去液体，保留沉淀；
- 15) 加入750 μL预冷后的75%乙醇，4°C，13000 rpm离心5 min，去除液体，保留沉淀；
- 16) 晾干沉淀后，根据胶图情况，加入10~15 μL Nuclease-free H₂O，混匀、溶解沉淀，文库可保存于-20°C（短期）或-80°C（长期），等待后续质检、上机测序；

8、文库质检

文库质检分为两方面，定性检测和定量检测。

文库的定性检测，推荐使用凝胶电泳或者Agilent生物分析仪等方案对文库进行检测；文库的定量检测，推荐使用Real time PCR对文库进行检测。

文库结构

Small RNA Library Prep Kit的文库结构如下：

5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-nnnnnnnnn-TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAAGTCCAGTCACXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

注：nnnnnnnnn为插入序列

XXXXXX为index序列

附表Index序列

Index名称	index序列	Index名称	index序列	Index名称	index序列	Index名称	index序列
index 01	ATCACG	index 13	AGTCAA	index 25	ACTGAT	index 37	CGGAAT
index 02	CGATGT	index 14	AGTTCC	index 26	ATGAGC	index 38	CTAGCT
index 03	TTAGGC	index 15	ATGTCA	index 27	ATTCCT	index 39	CTATAC
index 04	TGACCA	index 16	CCGTCC	index 28	CAAAAG	index 40	CTCAGA
index 05	ACAGTG	index 17	GTAGAG	index 29	CAACTA	index 41	GACGAC
index 06	GCCAAT	index 18	GTCCGC	index 30	CACCGG	index 42	TAATCG
index 07	CAGATC	index 19	GTGAAA	index 31	CACGAT	index 43	TACAGC
index 08	ACTTGA	index 20	GTGGCC	index 32	CACTCA	index 44	TATAAT
index 09	GATCAG	index 21	GTTTCG	index 33	CAGGCG	index 45	TCATTC
index 10	TAGCTT	index 22	CGTACG	index 34	CATGGC	index 46	TCCCGA
index 11	GGCTAC	index 23	GAGTGG	index 35	CATTTT	index 47	TCGAAG
index 12	CTTGTA	index 24	GGTAGC	index 36	CCAACA	index 48	TCGGCA

产品仅限科研使用，请勿直接用于诊断或治疗

