



mich[®] small RNA 建库试剂盒
mich[®] small RNA-seq Kit (Illumina)
Catalog #MSR-ILM-23096 (96 reactions)

使用说明书 (2023 Ver.1.1)

保定米奇生物科技有限公司
Mich Scientific Co., LTD

0312-5905689
info@michlab.cn
www.michlab.cn

目 录

产品概述	3
产品组分	3
储存条件及保质期	3
自备材料	4
注意事项	4
实验流程	4
操作方案	5
一、3' 端接头连接	5
二、剩余 3' 端接头灭活	5
三、3' 端连接产物纯化	6
四、5' 端接头连接	6
五、反转录	6
六、RT 产物纯化	7
七、PCR 富集	8
八、文库筛选	8
方案一：磁珠纯化	8
方案二：6% 非变性 PAGE 胶分选文库	10
附录	10

产品描述

mich® small RNA-seq Kit 是专为 Illumina® 高通量测序平台定向开发的一款 small RNA 文库构建试剂盒。本试剂盒适用于动物、植物总 RNA，外泌体 RNA，以及分离纯化的 small RNA 样本，模板起始量低至 1 ng。

mich® small RNA-seq Kit 提供 gel-free 文库制备方案，通过磁珠筛选，可以分离长度小于 100 nt 的核酸，所分离的核酸之间的长度差距可小至 20 nt，同时减少接头二聚体的形成，建库流程简单、快速。与此同时，为满足客户需求，试剂盒提供凝胶纯化方法以供参考。

mich® small RNA-seq Kit 包含文库构建所需的全部酶和缓冲液，所有组分经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证文库构建的稳定性和重复性。

产品组分

名称	管盖颜色	组分	24 次	48 次	96 次
Box 1 -20°C	蓝盖	3' 接头	36 µL	72 µL	144 µL
		3' 连接 buffer	96 µL	192 µL	384 µL
		3' 连接酶	48 µL	96 µL	192 µL
	绿盖	灭活剂	96 µL	192 µL	384 µL
	黄盖	5' 接头	24 µL	48 µL	96 µL
		5' 连接 buffer	60 µL	120 µL	240 µL
		5' 连接酶	48 µL	96 µL	192 µL
	红盖	反转录引物	24 µL	48 µL	96 µL
		反转录 buffer	96 µL	192 µL	384 µL
		反转录酶	48 µL	96 µL	192 µL
紫盖	PCR mix	192 µL	384 µL	768 µL	
Box 2 4°C	白盖	磁珠	4.4 mL	8.8 mL	17.6 mL
	白盖	纯化 buffer	744 µL	1488 µL	2 × 1488 µL
	黄盖	Linear Acrylamide	24 µL	48 µL	96 µL
	白盖	Gel Elution	6 mL	12 mL	24 mL
Box 3 -20°C	透明盖	i5	24 index	48 index	96 index
	白盖	i7	24 index	48 index	96 index

储存条件及保质期

Box 1 和 Box 3 所有组分 - 20°C 保存；Box 2 所有组分 4°C 保存。
有效期 12 个月。

自备材料

- 异丙醇
- 80% 乙醇 (新鲜配制)
- 1% TAE 琼脂糖胶, 6% TBE PAGE 胶, 及其配套电泳装置
- 1×TBE buffer
- GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Cat # SM1211)
- SYBR Gold (Invitrogen Cat #S11494)
- 0.45 μm, 2 mL Spin-X Centrifuge tube (Sigma Cat # CLS8162)
- 3 M 醋酸钠 (pH5.2)
- 掌式离心机
- PCR 管
- PCR 仪
- Vortex
- 磁力架
- 其它分子实验必备材料

注意事项

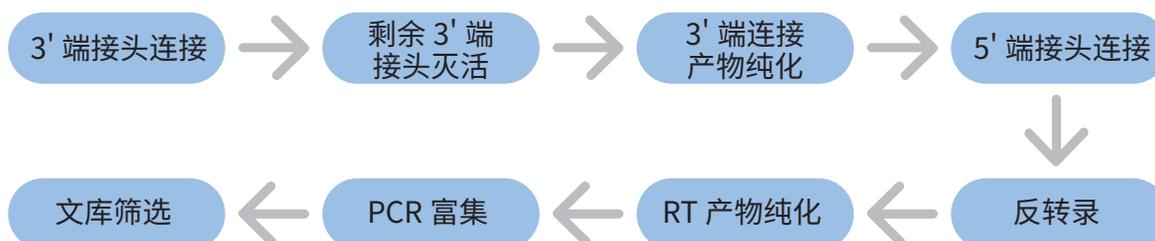
1. 试剂盒需在有效期内使用。
2. 部分提取和纯化方法可能无法有效地分离出 small RNA, 用户在使用试剂盒前需要确认提取和纯化方法能有效分离出 small RNA。提取的总 RNA 需使用 1% 琼脂糖凝胶或者 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行完整性检测。使用琼脂糖凝胶电泳检测时, 需 28S:18S \geq 1.5, 并且无蛋白质和基因组污染。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行 RNA 完整性检测时, 需 RIN 值 \geq 7。RNA 降解严重可能会导致建库失败。
3. 样本起始量不同, 接头需要进行不同梯度稀释, 具体参考表 1。
4. 请将试剂盒中的各酶类组置于 -20°C 保存。使用前混匀并进行短暂离心, 避免试剂粘附于管壁及管盖; 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。
5. 纯化磁珠不可冷冻, 使用时需从 4°C 平衡至室温。
6. RNA 易降解, 建库过程中要严格遵守实验操作, 使用 RNase-free 耗材, 避免 RNase 污染。

表 1 不同样本起始量的接头稀释梯度

起始量	接头稀释	PCR Cycles*
1 μg	不稀释	13 ~ 15
100 ng	0 ~ 1/2	16 ~ 18
10 ng	1/20	19 ~ 21
1 ng	1/240	21 ~ 24

*注: 当 PCR 产物出现明显 Dasy Chain, 可减少循环数。外泌体 RNA 可比建议循环数少 2 ~ 3 个循环。

实验流程



操作方案

一、3' 端接头连接

1. 将 3' 端接头连接组分取出，解冻并混匀，短暂离心收集至 PCR 管底，置于冰上备用。以下所有步骤均在冰上操作。

组分	体积
RNA	X μL
3' 端接头	1.5 μL^*
Nuclease-free H ₂ O	(2.5-X) μL
Total	4 μL

*注：不同起始量按表 1 稀释

2. 将 PCR 管置于 70° C 的 PCR 仪中（热盖 105° C）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
上步产物	4 μL
3' 连接 buffer	4 μL
3' 连接酶	2 μL
Total	10 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。将反应管置于热盖关闭的 PCR 仪中，25° C 孵育 1 h。连接效率低的样本可过夜连接 16 h。

二、剩余 3' 端接头灭活

1. 将 3' 端接头灭活组分取出，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。

组分	体积
上步产物	10 μL
灭活剂	4 μL
Total	14 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 50° C 热盖的 PCR 仪中，30° C 孵育 30 min。

三、3' 端连接产物纯化

1. 向上步产物中加入 Nuclease-free H₂O，补充体积到 20 μL。每个样本中加入 25 μL 纯化 buffer，用枪头轻轻混匀。
2. 每个样本中加入 40 μL 磁珠（提前平衡到室温*），用枪头轻轻混匀。
**注：后续步骤使用到磁珠时，都需将磁珠提前平衡到室温。*
3. 每个样本中加入 72.4 μL 异丙醇，用枪头轻轻混匀。
4. 室温静置孵育 5 min。
5. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
6. 保持样品始终置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，室温孵育 30 s，小心移除上清。重复此步骤 1 次。
7. 保持样品始终置于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约 5 ~ 10 min。不要过分干燥，避免降低回收效率。
8. 将样品从磁力架上取出，加入 12.5 μL Nuclease-free H₂O，使用移液器轻轻吹打，充分混匀，室温静置 5 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取 11 μL 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。

四、5' 端接头连接

1. 将 5' 端接头连接组分取出，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。

组分	体积
上步产物	11 μL
5' 端接头	1 μL*
5' 连接 buffer	2.5 μL
5' 连接酶	2 μL
Total	16.5 μL

*注：不同起始量按表 1 稀释

2. 使用移液器吹打 10 ~ 15 次混匀，短暂离心收集至管底。置于热盖关闭的 PCR 仪中 25°C 孵育 2 h。

五、反转录

1. 将反转录组分取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。
2. 按照下表配制逆转录反应体系：

组分	体积
上步产物	16.5 μ L
反转录引物	1 μ L
反转录 buffer	4 μ L
反转录酶	2 μ L
Total	23.5 μ L

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 105° C 热盖的 PCR 仪进行如下程序：

温度	时间
60°C	2 min
42°C	60 min
85°C	10 min
4°C	Hold

六、RT 产物纯化

1. 每个样本中加入 13 μ L 磁珠，用枪头轻轻混匀。
2. 每个样本中加入 12 μ L 异丙醇，用枪头轻轻混匀。
3. 室温孵育 5 min。
4. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取全部上清至新的 Nuclease-free PCR 管中。
5. 每个样本中加入 6 μ L 纯化 buffer，用枪头轻轻混匀。
6. 每个样本中加入 10 μ L 磁珠，用枪头轻轻混匀。
7. 向每个样本中加入 35 μ L 异丙醇，用枪头轻轻混匀。
8. 室温孵育 5 min。
9. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
10. 保持样品始终置于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇，室温孵育 30 s，小心移除上清。重复此步骤 1 次。
11. 保持样品始终置于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约 5 ~ 10 min。不要过分干燥，避免降低回收效率。
12. 将样品从磁力架上取下，加入 21.5 μ L Nuclease-free H₂O，使用移液器轻轻吹打，充分混匀，室温静置 5 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取 20 μ L 上清至新的 Nuclease-free PCR 管中。

七、PCR 富集

1. 按照下表配制 PCR 反应体系：

组分	体积
上步产物	20 μ L
PCR Master Mix	8 μ L
i5	1 μ L
i7	1 μ L
Total	30 μ L

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 105°C 热盖的 PCR 仪进行如下程序：

温度	时间	循环数
95°C	2 min	1
95°C	20 s	见表 1
60°C	30 s	
72°C	15 s	
72°C	2 min	1
4°C	Hold	1

八、文库筛选

方案一：磁珠纯化

1. 每个样本中加入 36 μ L 磁珠，用枪头轻轻混匀。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取全部上清至新的 Nuclease-free PCR 管中。
4. 向每个样本中加入 24 μ L 磁珠，用枪头轻轻混匀。
5. 室温孵育 5 min。
6. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
7. 保持样品始终置于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇，室温孵育 30 s，小心移除上清。重复此步骤 1 次。
8. 保持样品始终置于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约 5 ~ 10 min。不要过分干燥，避免降低回收效率。

9. 将样品从磁力架上取下，加入 31.5 μL Nuclease-free H_2O ，使用移液器轻轻吹打，充分混匀，室温静置 5 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取 30 μL 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。
10. 每个样本中加入 36 μL 磁珠，用枪头轻轻混匀。
11. 室温孵育 5 min。
12. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取全部上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。
13. 向每个样本中加入 24 μL 磁珠，用枪头轻轻混匀。
14. 室温孵育 5 min。
15. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
16. 保持样品始终处于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，室温孵育 30 s，小心移除上清。重复此步骤 1 次。
17. 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。不要过分干燥，避免降低回收效率。
18. 将样品从磁力架上取下，加入 20 μL Nuclease-free H_2O ，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取 18 μL 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。
19. Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库：取 1 μL 纯化后的 PCR 产物，用 Agilent DNA 1000 chip 分析，如图 1 所示：miRNA 文库的峰在 152 ~ 158 bp 处，piRNA 文库的峰在 160 ~ 168 bp 处。

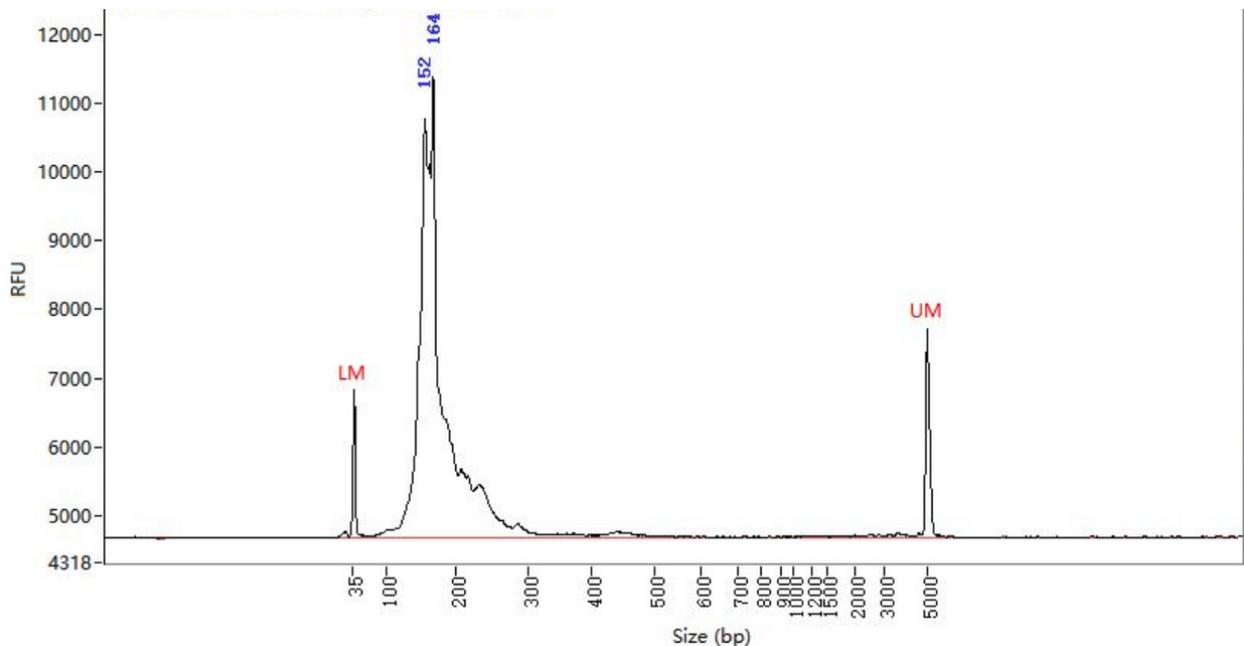
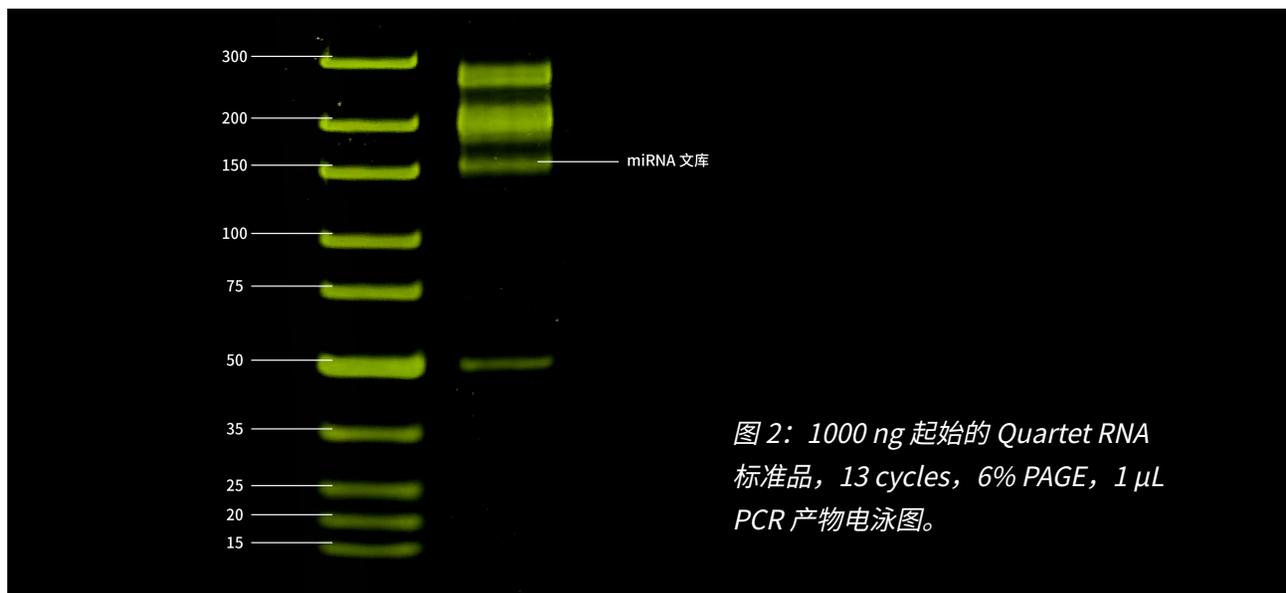


图 1: 1000 ng 起始的 Quartet RNA 标准品, 13 cycles, 文库筛选后 Agilent 2100 Bioanalyzer 图。152 bp 主峰为 miRNA, 164 bp 主峰为 piRNA。

方案二：6% 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 PCR 产物中加入 5 μ L 6×Loading Buffer，混匀后离心收集至管底。
3. 取 3 μ L DNA Ladder 缓慢加入 PAGE 胶样孔中。
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 18 μ L。如有多个文库在同一 PAGE 胶上电泳，不同样品间需隔开一个样孔（以避免样品间交叉污染），空孔中可加 18 μ L 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 DNA Ladder 橙色指示剂跑出胶板后约 3 ~ 5 min，方可停止电泳。
6. 将 PAGE 胶取出，用 SYBR Gold (Invitrogen) 核酸染料染色 10 min。
7. 在凝胶成像仪中进行观察，如图 2 所示，大约 155 bp 处的条带对应于 miRNA 文库。
8. 将对应的条带割下置于 1.5 mL 低吸附 EP 管中，一次性研磨棒碾碎胶条。
9. 向装有 PAGE 胶碎片的 1.5 mL EP 管中加入 250 μ L Gel Elution Buffer。
10. 于 50° C 水浴锅中温育 1 ~ 2 h。
11. 将步骤 10 中 EP 管所有产物转移到 Spin-X Centrifuge tube (Sigma) 中，12000 rpm 离心 2 min。
12. 弃去离心柱，将液体转移至新的 2 mL 低吸附 EP 管中。
13. 分别依次加入 1 μ L Linear Acrylamide、25 μ L 3 M 醋酸钠 (pH5.2) 和 1 mL 无水乙醇，振荡混匀后于 - 80° C 沉淀 1 h。
14. 取出 - 80° C 沉淀产物，于 4° C 冷冻离心机中 12000 rpm 离心 30 min。
15. 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 4° C 的冷冻离心机中，12000 rpm 离心 10 min。
16. 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。
17. 待步骤 16 产物中残留的酒精全部挥发，加入 15 μ L Nuclease-free H₂O 溶解沉淀。此为最终文库。



附录

一、接头序列

3' 接头序列	TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC
5' 接头序列	UCUUUCCCUACACGACGCUCUUCGUAUCU
RT 引物序列	GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
P5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXXAC ACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXXGTGACT GGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA

二、index 序列信息

名称	i7
7001	AAGATCAT
7002	TGCTATTC
7003	GACGTGTC
7004	CGGTAGTC
7005	GACAGCAG
7006	CTTGTACA
7007	GACAAGTG
7008	CTCGCCTT
7009	GAGCGTCA
7010	CGCGCTCG
7011	GAGCTCTA
7012	CTATAGGA
7013	AAGAGAGC
7014	TTATAGCG
7015	GAGCTAAG
7016	CGAAGCCA
7017	TTGTGGCT
7018	CGCGAGAC
7019	GAGATCGG
7020	CGCACTTA
7021	GATGTCAG
7022	CTACTTCG
7023	GATTACTC
7024	ACTCAGAC

名称	i5
5001	AATAATAG
5002	TTAGTAGC
5003	TGCGTGGC
5004	ACCAATTG
5005	CTACTGGT
5006	AGCAGAGT
5007	CATTATCG
5008	GTGCAGTC
5009	GTTACACAC
5010	CCGCATAC
5011	GTGGCGAA
5012	GTGGATAC
5013	AATATAAC
5014	TTCTAGGT
5015	AGATTGTG
5016	CAATCCGT
5017	TTACTTAC
5018	TTGTGAC
5019	AAGGAGCG
5020	CTCGAAGC
5021	GTTAGAAC
5022	CGAACTGT
5023	CATGTCTC
5024	CGACTATA