

**NR602-01/02**

**VAHTS™ Stranded mRNA-seq  
Library Prep Kit for Illumina®**



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

网站/Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

技术支持/Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

技术服务/Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



[www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

Vazyme biotech co., ltd.

**使用说明书**

Version 5.1

- 产品概述
- 产品组分
- 贮藏条件
- 其他必需材料
- 适用范围
- 使用方法

## 产品概述

VAHTS™ Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina®适用于起始模板为0.1-1 µg总RNA的链特异性转录组文库构建。与常规转录组文库构建不同的是，在第二链cDNA合成时，掺入dUTP标记第二链；PCR前将标记的第二链模板用UDG酶消化，使得最终的测序信息都来自于第一链cDNA，从而保留了mRNA的链方向性。测序后的数据分析可确定转录本是来自正义还是反义DNA链。试剂盒中提供的所有试剂都经过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。

## 产品组分

组分	NR602-01 (24 rxn)	NR602-02 (96 rxn)		
Box 1	mRNA Capture Beads	1.2 ml	4.8 ml	■
	Beads Binding Buffer	1.2 ml	4.8 ml	■
	Beads Wash Buffer	9.6 ml	38.4 ml	
	Tris Buffer	1.2 ml	4.8 ml	■
Box 2	Frag/Prime Buffer	444 µl	2 × 888 µl	■
	Actinomycin D (5 mg/ml)	24 µl	96 µl	■
	1st Strand Buffer	144 µl	576 µl	■
	1st Strand Enzyme Mix	48 µl	192 µl	■
	2nd Strand Marking Buffer	480 µl	2 × 960 µl	■
	2nd Strand/End Repair Enzyme Mix	120 µl	480 µl	■
Box 3	dA-Tailing Buffer Mix	240 µl	960 µl	■
	dA-Tailing Enzyme Mix	60 µl	240 µl	■
	Ligation Mix	60 µl	240 µl	■
	Stop Ligation Mix	120 µl	480 µl	■
	PCR Primer Mix	120 µl	480 µl	■
	Amplification Mix 1	600 µl	4 × 600 µl	■
	Heat-labile UDG	24 µl	96 µl	■

## 贮藏条件

Box 1: 2-8 °C保存。  
 Box 2: -20 °C保存。  
 Box 3: -20 °C保存。

## 其他必需材料

100%乙醇  
 Nuclease free水

VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)或AMPure® XP Beads (Beckman #A63881)

VAHTS™ RNA Adapters set1 for Illumina® (Adapter 1-12, Vazyme #N803)

VAHTS™ RNA Adapters set2 for Illumina® (Adapter 13-27, Vazyme #N804)

## 适用范围

起始模板：0.1-1 µg完整度良好的总RNA。建议用Agilent 2100 Bioanalyzer对提取的总RNA进行质控，RIN值应≥8。不完整或降解的总RNA模板会给测序结果带来3'偏好性。

转录本信息：

本试剂盒适合于针对mRNA的链特异性RNA-seq分析，包括：基因表达、单核苷酸变异(single nucleotide variation)，可变剪切/融合基因、目标转录组分析等。如果需要分析非编码RNA，请选择VAHTS™ Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit for Illumina® (Vazyme #NR603)。

## 使用方法

### 1. mRNA分离/片段化

- 1.1. 将mRNA Capture Beads从2-8 °C取出，静置使其温度平衡至室温。
- 1.2. 准备RNA样品：在一个Nuclease free 离心管中，将0.1-1 µg总RNA溶解于50 µl Nuclease free水中，冰上放置备用。
- 1.3. 颠倒或旋涡振荡使mRNA Capture Beads充分混匀，吸取50 µl加入到总RNA样品中，用移液器吹打6次以彻底混匀。
- 1.4. 将样品置于PCR仪中，65 °C 5 min，4 °C hold，使RNA变性。
- 1.5. 室温放置5分钟，使mRNA结合到磁珠上。
- 1.6. 将样品置于磁力架5分钟，使mRNA与总RNA分离，小心移除上清。
- 1.7. 将样品从磁力架上取出，用200 µl Beads Wash Buffer吹打6次以彻底混匀，在磁力架上静置5分钟，小心移除上清。
- 1.8. 将样品从磁力架上取出，50 µl Tris Buffer重悬磁珠，用移液器吹打6次以彻底混匀。
- 1.9. 将样品置于PCR仪中，80 °C 2 min，25 °C hold，将mRNA洗脱下来。
- 1.10. 加入50 µl Beads Binding Buffer，用移液器吹打6次以彻底混匀。
- 1.11. 室温放置5分钟，使mRNA结合到磁珠上。
- 1.12. 将样品置于磁力架5分钟，使mRNA与总RNA分离，小心移除上清。
- 1.13. 将样品从磁力架上取出，用200 µl Beads Wash Buffer吹打6次以彻底混匀，在磁力架上静置5分钟，吸掉全部上清(注意最后需要用10 µl移液器吸干净残留液体)。
- 1.14. 将样品从磁力架上取出，用18.5 µl Frag/Prime Buffer重悬磁珠，用移液器吹打6次以彻底混匀；将样品置于PCR仪中，根据插入片段大小的需要，选择片段化程序：  
**插入片段150-200 bp:** 94 °C 8 min，4 °C hold;  
**插入片段200-300 bp:** 94 °C 5 min，4 °C hold;  
**插入片段250-450 bp:** 85 °C 6 min，4 °C hold;  
**插入片段450-550 bp:** 85 °C 5 min，4 °C hold。

具体插入片段大小及分选条件见表一。

1.15. 将样品置于磁力架5分钟，转移16 µl上清至一个新的nuclease free离心管中，立刻进入第一链合成反应。

### 2. 双链cDNA合成

2.1. 将Actinomycin D (5 mg/ml) 从-20 °C取出，解冻后轻轻弹匀，短暂离心至管底。用nuclease free水稀释至0.5 mg/ml，立刻使用。(注意：稀释的Actinomycin D溶液对光非常敏感，且会逐渐吸附在塑料和玻璃的表面。因此，未用完的Actinomycin D稀释液应丢弃。)

2.2. 将1st Strand Buffer从-20 °C取出，解冻后颠倒混匀，配制第一链cDNA合成反应液：

Fragmented mRNA	16 µl	
Actinomycin D (0.5 mg/ml)	1 µl	■
1st Strand Buffer	6 µl	■
1st Strand Enzyme Mix	2 µl	■
总计	25 µl	

用移液器轻轻吹打混匀。

2.3. 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应：

25 °C	10 min
42 °C	15 min
70 °C	15 min
4 °C	Hold

立刻进行第二链合成反应。

2.4. 将2nd Strand Marking Buffer从-20 °C取出，解冻后颠倒混匀，配制第二链cDNA合成反应液：

1st Strand cDNA	25 µl	
2nd Strand Marking Buffer	20 µl	■
2nd Strand/End Repair Enzyme Mix	5 µl	■
总计	50 µl	

用移液器轻轻吹打混匀。

2.5. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应：

16 °C	60 min
4 °C	Hold

2.6. 双链cDNA纯化：

a) 将VAHTS™ DNA Clean Beads提前30分钟从2-8 °C取出，静置使其温度平衡至室温。

- b) 颠倒或旋涡振荡使VAHTS™ DNA Clean Beads充分混匀，吸取90 µl (1.8 ×)加入到第二链cDNA样品中，用移液器吹打10次以彻底混匀。
- c) 室温孵育10分钟。
- d) 磁力架上静置5分钟；待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架中，小心移除上清。
- e) 保持样品始终处于磁力架中，加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠（注意不要吹散磁珠），室温孵育30秒，小心移除上清。
- f) 重复上一步，总计漂洗2次。
- g) 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5-10分钟。
- h) 将样品从磁力架中取出，加入20 µl nuclease free水，涡旋振荡或使用移液器吹打充分混匀，室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟，待溶液澄清后，小心吸取17.5 µl上清至一个新的nuclease free离心管中。

注意：洗脱产物可在-20 °C保存。

### 3. 末端dA-Tailing

3.1. 将dA-Tailing Buffer Mix从-20 °C取出，解冻后颠倒混匀，配制末端dA-Tailing反应液：

末端修复的ds cDNA	17.5 µl	
dA-Tailing Buffer Mix	10 µl	■
dA-Tailing Enzyme Mix	2.5 µl	■
总计	30 µl	

用移液器轻轻吹打混匀。

3.2. 在PCR仪中进行dA-Tailing反应：

37 °C	30 min
70 °C	5 min
4 °C	Hold

立刻进行接头连接反应。

### 4. 接头连接

4.1. 将RNA Adapter从-20 °C取出，解冻后颠倒混匀，配制连接反应液：

dA-Tailing产物	30 µl	
Ligation Mix	2.5 µl	■
RNA Adapter*	2.5 µl	□
总计	35 µl	

用移液器轻轻吹打混匀。

\*VAHTS™ RNA Adapters set1 for Illumina® (Vazyme #N803)包含Adapter 1-12；

VAHTS™ RNA Adapters set2 for Illumina® (Vazyme #N804)包含Adapter 13-27。

4.2. 在PCR仪中进行连接反应：

30 °C	10 min
4 °C	Hold

4.3. 终止连接反应：

连接产物	35 µl	
Stop Ligation Mix	5 µl	■

使用移液器轻轻吹打充分混匀，终止反应。

### 5. 连接产物纯化和大小分选

方案 A. 获得插入片段长度约150-200 bp的文库(适用于mRNA片段化条件为94 °C 8 min)

- 5A.1. 将VAHTS™ DNA Clean Beads提前30分钟从2-8 °C取出，静置使其温度平衡至室温。
- 5A.2. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS™ DNA Clean Beads充分混匀，吸取40 µl (1 ×)加到连接产物中，用移液器吹打10次以彻底混匀。
- 5A.3. 室温孵育10分钟。
- 5A.4. 磁力架上静置5分钟；待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架中，小心移除上清。
- 5A.5. 保持样品始终处于磁力架中，加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠（注意不要吹散磁珠），室温孵育30秒，小心移除上清。
- 5A.6. 重复上一步，总计漂洗2次。
- 5A.7. 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5-10分钟。
- 5A.8. 将样品从磁力架中取出，加入52.5 µl nuclease free水，涡旋振荡或使用移液器吹打充分混匀，室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟，待溶液澄清后，小心吸取50 µl上清至一个新的nuclease free离心管中。
- 5A.9. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS™ DNA Clean Beads充分混匀，吸取50 µl (1 ×)加到上一步的产物中，用移液器吹打10次以彻底混匀。
- 5A.10. 室温孵育10分钟。
- 5A.11. 磁力架上静置5分钟；待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架中，小心移除上清。
- 5A.12. 保持样品始终处于磁力架中，加入200 µl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠（注意不要吹散磁珠），室温孵育30秒，小心移除上清。
- 5A.13. 重复上一步，总计漂洗2次。
- 5A.14. 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5-10分钟。
- 5A.15. 将样品从磁力架中取出，加入21.5 µl nuclease free水，涡旋振荡或使用移液器吹打充分混匀，室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟，待溶液澄清后，小心吸取19 µl上清至一个新的nuclease free离心管中。立刻进行PCR扩增。

注意：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。

**方案 B. 获得插入片段长度大于200 bp的文库**(适用于mRNA片段化条件为94 °C 5 min、85 °C 6 min和85 °C 5 min。)

**B-1. 用1 x VAHTS™ DNA Clean Beads纯化连接产物**

- 5B.1. 将VAHTS™ DNA Clean Beads提前30分钟从2-8 °C取出，静置使其温度平衡至室温。
- 5B.2. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS™ DNA Clean Beads充分混匀，吸取40 μl (1 ×)加到连接产物中用移液器吹打10次以彻底混匀。
- 5B.3. 室温孵育10分钟。
- 5B.4. 磁力架上静置5分钟；待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架中，小心移除上清。
- 5B.5. 保持样品始终处于磁力架中，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠)，室温孵育30秒，小心移除上清。
- 5B.6. 重复上一步，总计漂洗2次。
- 5B.7. 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5-10分钟。
- 5B.8. 将样品从磁力架中取出，加入102.5 μl nuclease free水，涡旋振荡或使用移液器吹打充分混匀，室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟，待溶液澄清后，小心吸取100 μl上清至一个新的nuclease free离心管中。

**B-2. 用两轮VAHTS™ DNA Clean Beads进行片段大小分选** (以85 °C 6 min打断，插入片段约350-450 bp为例，其他长度文库请根据表一选择相应的磁珠使用量。)

插入片段长度 (bp)	200-300	250-350	350-450	450-550
文库长度 (bp)*	320-420	370-470	470-570	570-670
打断条件	94 °C 5 min	85 °C 6 min	85 °C 6 min	85 °C 5 min
第一轮磁珠体积 (μl)	70 (0.7 ×)	65 (0.65 ×)	60 (0.6 ×)	55 (0.55 ×)
第二轮磁珠体积 (μl)	10 (0.1 ×)	10 (0.1 ×)	10 (0.1 ×)	10 (0.1 ×)

表一：不同片段大小的推荐分选条件

\* 此处的文库长度是指在Agilent 2100 Bioanalyzer上主峰的分布范围，长度为插入片段长度+接头长度(120 bp)。文库大小的分布情况请参考6.4。

- 5B.9. 颠倒或旋涡振荡使VAHTS™ DNA Clean Beads充分混匀，吸取60 μl (0.6 ×)加入到上一步纯化连接产物中，用移液器吹打10次以彻底混匀。
- 5B.10. 室温孵育10分钟。
- 5B.11. 磁力架上静置5分钟，待溶液澄清。
- 5B.12. 保持样品始终处于磁力架中，小心吸取155 μl (总体积160 μl)上清至一个新的nuclease free离心管中，再加入10 μl (0.1 ×) VAHTS™ DNA Clean Beads，用移液器吹打10次以彻底混匀。
- 5B.13. 室温孵育10分钟。
- 5B.14. 磁力架上静置5分钟；待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架中，小心移除上清。
- 5B.15. 保持样品始终处于磁力架中，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠)，室温孵育30秒，小心移除上清。

- 5B.16. 重复上一步，总计漂洗2次。
- 5B.17. 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5分钟。
- 5B.18. 将样品从磁力架中取出，加入21.5 μl nuclease free水，涡旋振荡或使用移液器吹打充分混匀，室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟，待溶液澄清后，小心吸取19 μl上清至一个新的nuclease free离心管中。立刻进行PCR扩增。

● 注意：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。

**6. 文库扩增**

6.1. 将PCR Primer Mix, Amplification Mix 1从-20 °C取出，解冻后颠倒混匀，配制PCR反应液：

纯化过的接头连接产物	19 μl	
PCR Primer Mix	5 μl	■
Amplification Mix 1	25 μl	■
Heat-labile UDG	1 μl	■
总计	50 μl	

用移液器轻轻吹打混匀。

6.2. 将样品置于PCR仪中，进行下述反应：

步骤	温度	时间	循环数
含U链降解	37 °C	10 min	1
预变性	98 °C	30 sec	1
变性	98 °C	10 sec	
退火	60 °C	30 sec	15
延伸	72 °C	30 sec	
完全延伸	72 °C	5 min	1
Hold	4 °C		

6.3. 用VAHTS™ DNA Clean Beads纯化

- a) 将VAHTS™ DNA Clean Beads提前30分钟从2-8 °C取出，静置使其温度平衡至室温。
- b) 颠倒或旋涡振荡使VAHTS™ DNA Clean Beads充分混匀，吸取50 μl (1 ×)加入到PCR产物中，用移液器吹打10次以彻底混匀。
- c) 室温孵育10分钟。
- d) 磁力架上静置5分钟；待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架中，小心移除上清。
- e) 保持样品始终处于磁力架中，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠(注意不要吹散磁珠)，室温孵育30秒，小心移除上清。
- f) 重复上一步，总计漂洗2次。
- g) 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5-10分钟。

h) 将样品从磁力架中取出，加入25  $\mu$ l nuclease free水，涡旋振荡或使用移液器吹打充分混匀，室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟，待溶液澄清后，小心吸取22.5  $\mu$ l上清至一个新的nuclease free离心管中。

注意：转移上清时请勿吸取磁珠，即使微量残留都将影响后续文库质量的分析；洗脱产物可在-20  $^{\circ}$ C保存。

#### 6.4. 用Agilent 2100 Bioanalyzer评价文库质量

取1  $\mu$ l纯化后的PCR产物，用DNA 1000 chip分析。良好的文库应在预计大小的位置有一个较窄的峰，如图1, 2所示。如果在128 bp左右出现峰，则提示文库中有adapter-dimer污染。此时，将文库用nuclease free水稀释至50  $\mu$ l，重复步骤6.3以再次纯化PCR产物。

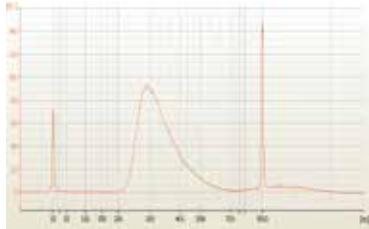


Fig 1. 100 ng universal human reference RNA, 片段化条件为94  $^{\circ}$ C 8 min, 并用两次1 x VAHTS™ DNA Clean Beads纯化。

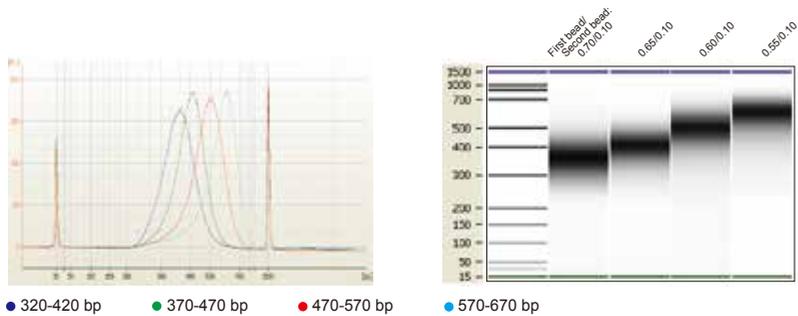


Fig 2. 200 ng universal human reference RNA, 不同的片段化条件, 一次1 x VAHTS™ DNA Clean Beads纯化后, 根据表一用不同比例的VAHTS™ DNA Clean Beads进行片段大小分选。