Application Note

<<用户案例>>

产品名称：KAPA Stranded mRNA-Seq Kit Illumina®

实验名称：利用转录组测序技术分析拟南芥糖代谢相关基因

Ya-Chi Yu
University of Illinois at Urbana-Champaign

生物材料：拟南芥地上部

实验背景：高等植物叶片通过光合作用定大气中的 CO_2 产生糖，为其他组织器官提供能源和碳源，固定的碳以糖尤其是蔗糖的形式分配到植物各组织器官中，糖的转运主要由转运蛋白控制，对于提高农作物和林木的生产力具有非常重要的意义。我们的课题主要关注光同化产物分配的机理，通过分子遗传，分子工程学手段，为粮食，纤维，木材等产量提高提供分子生物学基础。

实验目的：构建拟南芥 mRNA 转录组，探究参与调控糖转运，代谢等相关基因。

KAPA 建库试剂盒在通用方法学中的应用

下一代测序技术(NGS)，又称为大规模平行测序技术，通常指第二代和第三代测序技术，与一代测序技术相比，其在测序速度以及成本上的优势使得该技术在各个领域得以迅速应用。

按所测序核酸分子的类型不同，NGS文库类型可分为DNA文库—全基因组测序 (WGS)、全外显子组测序 (WES)，染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq)；RNA 文库—转录组测序，RNA免疫沉淀测序(RIP-seq)。KAPA NGS系列产品可覆盖所有类型文库构建应用。

转录组研究目前是探寻基因表达水平的主要方法，以定位在不同基因位置上的RNA丰度来展示基因表达水平，进而研究不同实验条件、不同组织或细胞等之间的差异表达的基因，下一步也可对这些基因的功能、富集通路等分子机制进行深入的研究。随着二代测序技术的发展，测序成本大幅度降低，大规模转录组测序 (RNA-seq) 已经成为转录组研究的重要方法。KAPA的Stranded mRNA-Seq Kit建库试剂盒基于真核生物mRNA含有polyA尾的特性，用磁珠富集纯化，进而进行后续的文库构建。本文中利用Stranded mRNA-Seq Kit建库试剂盒构建拟南芥地上部mRNA转录组文库，通过转录组分析挖掘参与糖转运，代谢途径中的相关基因。

关键词：二代测序，拟南芥，mRNA，糖代谢

实验步骤

一、耗材及仪器准备

1. 单道移液器（1000 μL、200 μL、20 μL 10 μL 及 2 μL）

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

2. 超低吸附滤芯吸头 (1000 μL、200 μL、20 μL 及 10 μL)
3. 超低吸附 EP 馆 (1.5 mL)
4. Qubit 分析管
5. 96 孔无裙边反应板
6. 96 孔硅胶上盖
7. 96 孔板磁力架
8. 涡漩震荡仪
9. 离心机
10. PCR 仪
11. Nanodrop 及 Qubit
12. 冰板 (96 孔)

二、试剂准备

1. RNeasy PowerPlant 试剂盒(50) (Qiagen，货号：13500-50)
2. Turbo DNA free 试剂盒(50) (Invitrogen，货号：AM1907)
3. KAPA Stranded mRNA-Seq 试剂盒 (Roche，货号：KK8420)
4. KAPA Pure Beads (5 mL) (Roche，货号：KK8000)
5. KAPA Dual-Indexed Adapter Kit (15 μM) (Roche，货号：KK8722)
6. 无核酸水 (无 RNase 水)
7. 80%酒精 (当天现配)
8. 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

三、总 RNA 提取

1. RNeasy PowerPlant 试剂盒提取实验样品。收集各培养基中的拟南芥样品，于液氮中以研磨棒研磨均匀后依序加入试剂提取总 RNA，样品以无核酸水洗脱。
2. 取少量样品以 nanodrop 检测浓度并以 TAE 胶检测 RNA 品质 (图 1)及 chip 检测 RNA 的完整性 (见检测示例图 2)。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

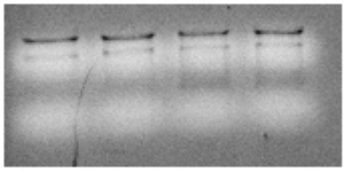


图 1. RNA 质量检测 TAE 胶图

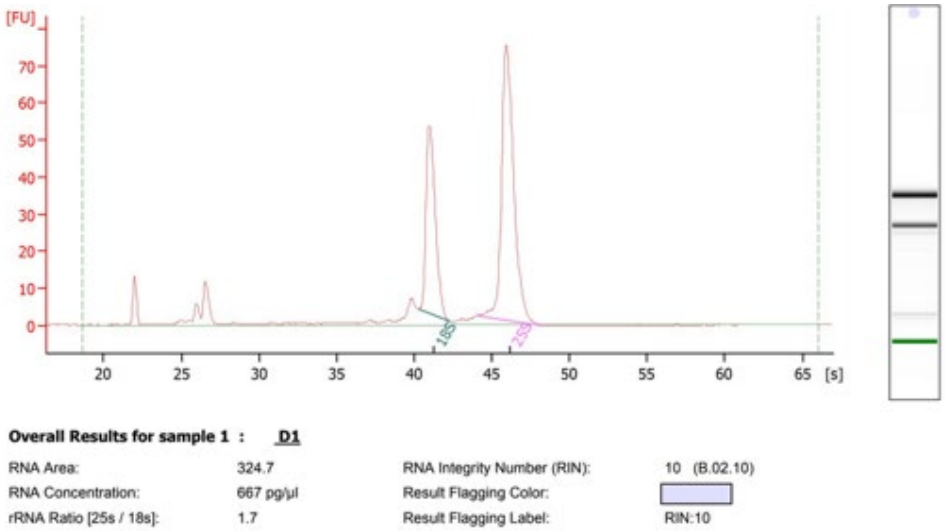


图 2. RNA 完整性 chip 检测图

3. 以 Turbo DNA free 试剂盒去除样品中的 DNA，再次以 nanodrop 检测浓度，保存于-80 °C 备用。

四、建库流程

注意事项：

1) 建库约耗时 6-8 小时，依据样品数量略有变化。

2) 纯化磁珠购入后，建议先以涡漩震荡器混匀后分装为 1 mL 小管，每次实验开始时取出一管置于常温备用(当日结束实验再放回 4 °C 冰箱长期保存)。

3) 每次使用磁珠前，务必混合均匀后再吸取。

mRNA 抓取：此步骤主要利用带有 T 碱基的磁珠进行 mRNA 的纯化

1. 取 1000 ng 总 RNA 样品调整为 50 µL，置于冰上备用。
2. mRNA 抓取磁珠需要以 mRNA 磁珠结合缓冲液清洗后方可使用。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

Application Note
Application note
Application Note

3. 先将 96 孔板放上磁力架，依样品数量准备 mRNA 抓取磁珠，每管加入 50 μL 混匀的 mRNA 抓取磁珠。
4. 磁珠与保存液分开后，移除澄清的液体并加入 50 μL mRNA 磁珠抓取缓冲液。
5. 将 96 孔板移出磁力架，以枪头吸打混合均匀再放回磁力架。
6. 再次移除澄清液体并加入 50 μL mRNA 磁珠抓取缓冲液。
7. 将 96 孔板移出磁力架，以枪头吸打混合均匀。此时磁珠已具备 mRNA 抓取能力。
8. 将各组总 RNA 样品(1000 ng in 50 μL)依序放入含有混合均匀磁珠的管中。
9. 将 96 孔板覆上硅胶盖封膜再放入已预热好的 PCR 仪中，65 °C 2 分钟再于 20 °C 冷却 5 分钟。
10. 当磁珠与目标 mRNA 片段结合后，将 96 孔板放上磁力架，当磁珠与磁力架结合后，移除澄清液体。
11. 各管加入 100 μL 的 mRNA 清洗缓冲液，将 96 孔板移出磁力架。各管以枪头吸打混匀。
12. 将 96 孔板放上磁力架，当磁珠与磁力架结合后，移除澄清液体。
13. 以 50 μL 无核酸水洗脱各管中的 mRNA。
14. 进行第二次磁珠的 mRNA 抓取。
15. 第二次抓取采用较高的温度，于 70 °C 反应 2 分钟再于 20 °C 冷却 5 分钟。
16. 在磁珠结合后，于各管中加入 50 μL mRNA 磁珠抓取缓衝液并以枪头吸打混匀。
17. 混合均匀后，放回 PCR 仪于 20 °C 反应 5 分钟。
18. 此时磁珠与目标 mRNA 片段已再度结合后，将 96 孔板放上磁力架，当磁珠与磁力架结合后，移除澄清液体。
19. 各管加入 200 μL 的 mRNA 清洗缓衝液，将 96 孔板移出磁力架。各管以枪头吸打混匀。
20. 将 96 孔板放上磁力架，当磁珠与磁力架结合后，移除澄清液体。

注意：残留的清洗缓冲液会影响后续 cDNA 的合成，务必将所有液体彻底移除。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

Application Note

mRNA 洗脱、酶系打断、接上随机引物：洗脱后的 mRNA 将会被酶切割为 300 bp 的小片段并连接上引物

1. 由于磁珠过度干燥会造成文库制备产量大幅下降。在 mRNA 抓取最后一步移除澄清液体前，要先将此步骤的体系(步骤 2)混合备用。
2. 洗脱、酶系打断及随机引物已在试剂盒中混合成 2×体系，只需要在冰上依比例以无 RNase 水混合为 1×工作浓度。
   - 11 µL 无 RNase 水
   - 11 µL Fragment, Prime and Elute Buffer
3. 每管加入 22 µL 的反应液，依据目标片端大小选择反应时间及温度。
4. 我们实验中的目标片段大小为 201-300 bp，故将反应体系置于 PCR 仪于 94 °C 反应 6 分钟。
5. 6 分钟后立即将 96 孔板放上磁力架，切勿置于冰上。 (当样品降温时，带有 PolyA 尾的 RNA 会形成杂合物)
6. 每一管取出 20 µL 的澄清液体置于冰板上并立即进行反转录。

合成第一链 cDNA：利用随机引物将小片段 mRNA 反转录为第一链 cDNA

1. 在冰板上组装 cDNA 合成所需试剂。
   - 20 µL 带有随机引物的短片段 mRNA (已在 96 孔板中)
   - 10 µL 第一链 cDNA 合成反应液
2. 每管加入 10 µL 试剂，吸打混匀数次。
3. 将 96 孔板放入 PCR 仪，25 °C 10 分钟使 Primer 延伸，再于 42 °C 合成第一链 cDNA，最后以 70 °C 15 分钟使酶失活，4 °C 保持。

合成第二链 cDNA：将 cDNA 和 RNA 混合的双链转为双链 cDNA (dscDNA)

1. 在冰板上预制第二链 cDNA 合成所需试剂：
   - 30 µL cDNA:RNA 混合的双链 (已在 96 孔板中)
   - 30 µL 第二链 cDNA 合成反应液
2. 每管加入 30 µL 试剂，以枪头吸打混匀数次

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

3. 将 96 孔板放入 PCR 仪，16 °C60 分钟合成第二链的 cDNA，4 °C 保持。

纯化：在此步骤中需要利用 1.8X KAPA Pure beads 进行纯化

1. 从 PCR 仪取出 96 孔板，加入 KAPA Pure beads 进行纯化：
   - 60 µL 双链 cDNA
   - 108 µL KAPA Pure beads
2. 吸打混匀数次，将 96 孔板置于室温 10 分钟。
3. 将 96 孔板放上磁力架，待溶液变澄清时移除 160 µL 上清液。
4. 每管加入 200 µL 80%乙醇。(需从无磁珠侧的管壁缓慢加入，不可以酒精直接冲洗磁珠)
5. 等待 30 秒后，小心的移除乙醇。
6. 重复步骤 4 和 5。
7. 等待 5 分钟，当磁珠表面乙醇蒸发，立刻加上 A 尾的反应液 (A-tailing)。

加 A 尾：于双链 cDNA 的尾端加上 A 碱基

1. 将 30 µL 的反应液加上已挥发乙醇的磁珠，吸打混匀。
2. 将 96 孔板放入 PCR 仪，于 30 °C30 分钟加上 A 尾，再以 60 °C 处理 30 分钟使酶失活。

接头连接：接头上带有 T 碱基，利用 T-A 连接的原理连接接头与双链 cDNA

1. 立即进行接头连接，接头需依照样品起始量调整浓度。
2. 本次试验起始量为 1000 ng，故将接头调整为 700 nM 的母液，实际工作浓度为 50 nM。
3. 混合接头连接反应液：
   - 30 µL 加 A 尾的 DNA
   - 35 µL 接头连接混合液
   - 5 µL 稀释后的接头母液 (700 nM)
4. 以枪头吸打混匀，放入 PCR 仪于 20 °C 反应 15 分钟。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

连接后纯化：由于未结合 cDNA 的接头会形成二聚体影响文库质量，此步骤利用 1X KAPA Pure Beads 移除小片段 DNA，共进行两次纯化

1. 预制纯化所需试剂
   - 70 µL 带有接头及 DNA 的磁珠
   - 70 µL PEG/Na 混合溶液
2. 以枪头吸打混匀。
3. 置于室温 10 分钟。
4. 将 96 孔板置于磁力架上。
5. 以枪头移除 135 µL 澄清液体。
6. 每管加入 200 µL 80%乙醇 (从远离磁珠侧的管壁加入)。
7. 等待至少 30 秒，小心移除乙醇。若有剩馀少量乙醇，可用 10 µL 枪头吸出。
8. 在室温条件下等待乙醇挥发。(约 3-5 分钟)
9. 将 96 孔板移出磁力架，即刻加入 50 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10. 在室温等待 2 分钟，DNA 会溶于 Tris 缓衝液中。
11. 将 96 孔板放回磁力架。
12. 再度重複上述步骤(1-8)，再以 22 µL10 mM Tris-HCl (pH 8.0)回溶 DNA(室温 2 分钟)。
13. 将 6 孔板放回磁力架。
14. 吸取 10 µL 澄清液体(注意不可吸入任何磁珠)。

扩增：利用接头上的通用序列以通用引物进行文库扩增，需依照样品量调整扩增循环

1. 预制扩增所需反应试剂
   - 20 µL 纯化后带有接头的 DNA 片段
   - 30 µL 文库扩增试剂混合液
2. 放入 PCR 仪进行扩增
   - 98 °C 45 秒 初始变性 (1 次循环)
   - 98 °C 15 秒 变性
   - 60 °C 30 秒 退火
   - 72 °C 30 秒 延伸

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

Application Note
Application note
Application Note

(上述三步骤循环数依样品量决定，本次试验为 8 个循环)

- 72 °C 5 分钟 最终延伸
- 4 °C 保持

3. 立刻进行纯化

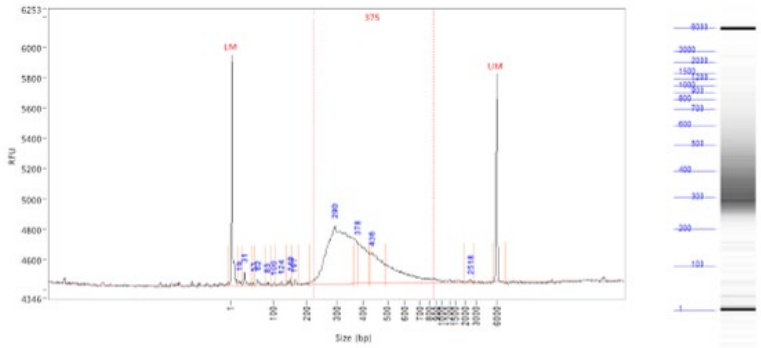
纯化：此步骤利用 1x KAPA Pure Beads 再次移除小片段 DNA (引物二聚体、接头二聚体…等)

1. 预制纯化所需试剂
   - 50 µL 纯化后带有接头的 DNA 片段
   - 50 µLKAPA Pure Beads
2. 以枪头吸打混匀，室温等待 10 分钟。
3. 将 96 孔板放上磁力架，待溶液澄清，吸去澄清液体。
4. 加入 200 µL80%乙醇 (从远离磁珠侧的管壁加入)。
5. 等待至少 30 秒，小心移除乙醇。若有剩余少量乙醇，可用 10 µL 枪头吸出。
6. 在室温条件下等待挥发 (约 3-5 分钟)。
7. 当磁珠块边缘出现裂痕，将 96 孔板移出磁力架，即刻加入 22 µL 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)。
8. 在室温等待 2 分钟，DNA 会溶于 Tris 缓衝液中。
9. 将 96 孔板放回磁力架，待溶液变为透明。
10. 每管取出 20 µL 澄清清液 (注意不可吸入磁珠) 放入 1.5 mL 低吸附 EP 管中。
11. 取出 1 µL 样品，以 Qubit 检测文库中 DNA 浓度。
12. 若欲检测文库质量，可使用 Bioanalyser 配合 Agilent DNA 1000 试剂组。此法可确认文库是否符合预期片段大小及接头二聚体是否确实被移除。
13. 将样品标记并置于-20 °C 冰箱中保存即可以 Illumina 测序仪进行文库测序。

实验结果

起始量 1000 ng 总 RNA，经 mRNA 抓取磁珠后进行文库构建后，经 8 个 PCR 循环扩增获得目标文库，库检质量合格，其中一个样品文库构建质量结果结果检测示例图见下图 3。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.



Peak	Size (bp)	Conc. (ng/uL)	From (bp)	To (bp)	Avg. Size (bp)	CV%	RFU	Corr. Peak Area
1	1 (LM)	0.0261	0	17	2	158.12	1515	10.381
2	19	0.0100	17	26	21	11.51	27	0.332
3	31	0.0230	26	48	33	12.66	81	0.763
4	53	0.0039	48	55	52	3.55	18	0.128
5	62	0.0155	55	82	64	8.21	31	0.514
6	85	0.0038	82	95	87	2.37	15	0.128
7	100	0.0025	95	106	100	2.08	13	0.084
8	124	0.0032	106	138	121	3.28	18	0.105
9	149	0.0100	138	156	145	2.41	39	0.333
10	161	0.0086	156	174	163	1.59	27	0.286
11	290	1.0393	208	361	301	11.35	382	34.478
12	378	0.2555	378	423	399	3.31	270	8.474
13	436	0.2372	429	493	458	4.05	199	7.868
14	2518	0.0034	1961	2750	2402	6.52	17	0.114
15	6000 (UM)	0.0114	5455	7164	5974	1.60	1375	4.556
	TIC:	1.6160	ng/uL					
	TIM:	10.829	nmole/L					
	Total Conc.:	2.0196	ng/uL					
Smear Analysis	216 bp to 847 bp	1.9015 ng/ul	94.2 %Total	8.350 nmole/L	375 Avg. Size (b.p.)	28.36 %CV		

图 3. 文库检测结果图

用户使用心得

相对 Illumina 的系统，减少了许多 DNA Pure beads 的用量(许多步骤可重複使用磁珠)，进而节省总试验经费。

Copyright © 2019 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.