

去除核糖体 RNA 样品的 SureSelect XT HS2 RNA 测序

作者

Katherine Felts,
Kristina Vsevolodova,
L. Scott Basehore,
Natalia Novoradovskaya,
Scott Happe
安捷伦科技有限公司

摘要

在本应用简报中，我们介绍了将市售核糖体 RNA (rRNA) 去除试剂盒与 SureSelect XT HS2 RNA 试剂联合用于 Illumina 测序仪样品制备。考察了一组采用不同方法去除 rRNA 序列的试剂盒，并列出了其中两种性能较好的试剂盒的数据。最后，提供了详细的 SureSelect XT HS2 rRNA 方案。

前言

RNA 的二代测序 (NGS) 可以提供关于表达谱、剪接变异、融合转录本和翻译后修饰的有用信息。为了实现高效的转录本分析，从测试样品中去除高丰度的 RNA 干扰组分非常有用。富集 RNA 样品的 3 种常用方法是使用 oligo(dT) 分离 mRNA、通过靶向探针捕获 mRNA，以及去除核糖体 RNA。由于核糖体 RNA 是总 RNA 中丰度最高的组分 (80%–90%)，因此在对转录组进行任何分析之前，都需要去除核糖体 RNA。靶向 RNA 测序 (RNA-Seq) 是对选定转录本进行重点评价，可使用福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样品生成高质量文库。然而，如果需要一种方法来进行无偏的总体转录本评价，mRNA 富集或 rRNA 去除是更合适的样品处理方法。Oligo(dT) 富集 mRNA 仅适用于高质量样品，因为高度片段化的样品将造成大片段样品损失和产生大量的末端碎片。使用去除 rRNA 而非 mRNA 富集的方法，使研究人员能够从高质量或高度片段化的样品（如 FFPE）制备 RNA 文库，并可以考察可能感兴趣的非多聚腺苷酸化 RNA 组分。

Agilent SureSelect XT HS2 RNA 产品组合目前不提供商业化的核糖体去除模块。因此，为支持希望制备去除 rRNA 的 XT HS2 RNA 文库的客户，我们优化了一个流程，并使用多款市售去除试剂盒对其进行了评估。表 1 介绍了第一轮测试中考察的 5 种 rRNA 去除试剂盒。所有试剂盒均可靶向人、小鼠和大鼠 (H/M/R) 的 rRNA 种类；然而，这些实验中仅测试了人 RNA。除人 rRNA 外，试剂盒 J 还可靶向细菌 rRNA 和人 β -球蛋白 RNA。测试的试剂盒代表了 4 种不同的 rRNA 去除作用模式。其中 3 种作用模式在文库制备前去除 rRNA，1 种作用模式在文库构建后靶向 DNA（试剂盒 K）。根据性能、易用性以及与现有 RNA XT HS2 试剂和工作流程的兼容性，选择了两种试剂盒进行了更广泛的测试（试剂盒 O 和试剂盒 M）。

试剂盒 O 用序列特异性 DNA 寡核苷酸靶向 rRNA，然后用 RNA 酶 H 处理，RNA 酶 H 可以酶解 DNA/RNA 杂交体。该流程包括 3 次孵育，然后对去除后的 RNA 进行 SPRI 纯化。RNA 特异性 SPRI 磁珠需单独购买。试剂盒 M 使用标记的寡核苷酸靶向 rRNA 序列，然后通过结合标记的磁珠从溶液中去除寡核苷酸。试剂盒 M 所需的时间较短，其中包括去除所需的所有试剂。然而，它比试剂盒 O 需要更多的手动操作步骤。文中介绍了同时使用高质量和 FFPE RNA 运行这两种试剂盒的数据。

表 1. 测试的市售 rRNA 去除试剂盒。 对表 1 中列出的 5 种试剂盒与 Agilent SureSelect RNA XT HS2 化学性质和工作流程的兼容性进行了测试。测试的 5 个试剂盒代表了 4 种不同的作用模式。其中 4 个试剂盒在文库构建前处理 RNA 样品，1 个试剂盒在文库构建后靶向 DNA（试剂盒 K）。还包括去除时间、生产商推荐的起始量范围、FFPE 样品相容性和我们对每种试剂盒的评估

试剂盒/供应商 (靶向的物种)	作用模式	时间	起始量范围	FFPE	备注
试剂盒 J (人、小鼠、大鼠、细菌、人 β 球蛋白)	RNA 酶 H	1.5–2 小时	1–1000 ng	是	易于使用，效果良好，去除范围广，与 SureSelect XT HS2 工作流程无缝匹配。RNA 特异性 SPRI 磁珠需单独购买。
试剂盒 O (人、小鼠、大鼠)	RNA 酶 H	1.5–2 小时	10–1000 ng	是	易于使用，效果良好，与 SureSelect XT HS2 工作流程无缝匹配。RNA 特异性 SPRI 磁珠需单独购买。
试剂盒 M (人、小鼠、大鼠)	基于磁珠的吸附	1.5 小时	1–1000 ng	是	无酶，易于使用，效果良好，与 SureSelect XT HS2 工作流程无缝匹配，包括所有试剂。
试剂盒 K (人、小鼠、大鼠)	Cas 9 剪切 rRNA 序列	2–2.5 小时	5–100 ng	否	配置可用于文库混合物的 rRNA 去除操作，这将带来便利性并节省成本。需要更改 SureSelect XT HS2 工作流程。
试剂盒 R (人、小鼠、大鼠)	阻断 cDNA 合成	15 分钟	1–1000 ng	是	短方案，需要优化以配合 SureSelect XT HS2 工作流程使用。

实验部分

RNA 来源

用于 qPCR 的通用人参比 RNA (UHRR) 来自安捷伦科技公司 (Santa Clara, CA, 货号 750500-41)。SeraSeq FFPE 融合 RNA 参比物质 v4 购自 SeraCare (Gaithersburg, MD, 货号 0710-0496)。黑色素瘤 FFPE 组织切片购自 Cureline Human Biospecimen CRO (Brisbane, CA, 货号定制)。

RNA 分离和认证

使用购自 Qiagen (Germantown, MD, 货号 73504) 的 RNeasy FFPE 试剂盒从 FFPE 组织切片中分离 RNA。在 NanoDrop 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 上测定各提取物的浓度。使用 RNA 6000 Nano 试剂盒 (Santa Clara, CA, 货号 5067-1511) 在 Agilent Bioanalyzer 2100 系统上进一步分析样品。使用生物分析仪软件进行弥散条带分析, 测定 DV₂₀₀ 值 (片段长度 > 200 nt 的样品百分比)。

SureSelect XT HS2 RNA 文库制备

根据生产商说明, 使用试剂盒 O 或试剂盒 M 去除 RNA 样品中的核糖体 RNA, 但调整最终样品体积以适应 RNA XT HS2 10 µL 的起始体积。使用 SureSelect XT HS2 RNA 文库制备试剂盒 (安捷伦科技公司, 货号 G9993A-D) 和附录中提供的流程, 使用去除 RNA 的样品来制备文库。

测序与数据分析

在 Illumina HiSeq 4000 上, 利用配对末端测序以 2 × 150 read 格式对文库进行分析。使用 STAR RNA 测序比对程序 v2.7.2 将 FASTQ 文件与人参比基因组 GRCh38 进行比对。将文库向下采样至 2000 万个 read 进行分析。使用 Picard 重复标记工具 (BROAD Institute) 标记 PCR 重复, 并报告输出中的重复率和估计文库大小。然后使用 RNA-SeQC v1.1.8 (BROAD Institute) 分析重复标记 .bam 文件, 并报告输出中的链特异性和匹配 read 百分比。使用 BWA-MEM 将 FASTQ 文件与 rRNA 参考文件比对, 分析残留 rRNA 百分比, 比对的样品百分比对应于文库中 rRNA 的百分比。使用 RSEM v0.8.1 生成基因表达谱, 以每百万 reads 转录本数 (TPM) 计。使用 Microsoft Excel 根据 TPM 输出计算相关系数。使用 STAR-Fusion v1.8.0 鉴定融合转录本。

结果与讨论

高质量 RNA

为评估两种 rRNA 去除方法的性能, 使用宽范围的起始量由 UHRR 制备文库。对于两种去除方法, 使用起始量 1–1000 ng 均可产生高质量文库。两种试剂盒的链特异性和匹配率均较高, 但试剂盒 O 的匹配率略好。SureSelect XT HS2 RNA 或试剂盒 O 去除试剂盒的生产商均不建议用 1 ng 的起始量, 图 1 中的结果印证了这一建议。如两种测试试剂盒呈现的结果, 除文库大小减少外, 1 ng 的低起始量显示出重复率急剧增加。两种方法在去除 rRNA 方面均表现良好 (残留 rRNA 均小于 1%)。然而, 试剂盒 M 的最高起始量显示出残留的 rRNA 增加, 表明 1000 ng 可能接近试剂盒的起始量高限。指标表右侧的柱状图显示了关于单个文库残留 rRNA 的更多信息。

高质量 RNA (UHRR)								
rRNA 去除试剂盒	试剂盒 O				试剂盒 M			
样品起始量 (ng)	1	10	100	1000	1	10	100	1000
估计的文库大小	1.4E+07	1.6E+08	4.2E+08	6.0E+08	2.4E+07	1.5E+08	4.0E+08	3.3E+08
重复率	27%	5%	3%	3%	18%	6%	3%	4%
链特异性	97%	98%	98%	98%	97%	97%	98%	98%
匹配率	89%	93%	93%	92%	87%	90%	87%	88%
残留 rRNA 百分比	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.5%	0.6%	0.6%	0.9%

重复反应的平均值

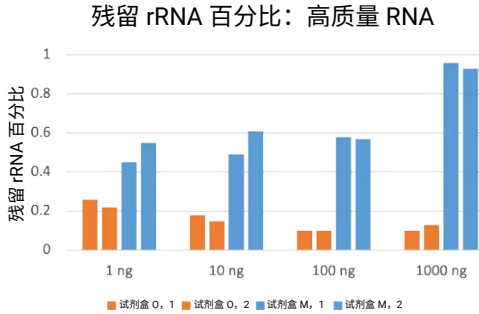


图 1. 由高质量 RNA 制备的去除 rRNA 文库的 RNA 测序指标。使用试剂盒 O 和试剂盒 M rRNA 去除试剂盒, 对 1、10、100 和 1000 ng 通用人参比 RNA 进行重复 rRNA 去除反应。使用所得 RNA 样品来制备 SureSelect XT HS2 RNA 文库。然后对文库进行测序并按照描述进行分析。测序指标表代表重复文库的平均结果。条形图显示了每个单独文库残留的 rRNA 百分比。试剂盒 O 文库用橙色条表示, 试剂盒 M 文库用蓝色条表示

FFPE RNA

由于 FFPE 样品的状态较差，并非给定样品中的所有 RNA 分子均具有足够的质量可在酶反应中进行操作。此外，在 SPRI 纯化过程中，非常小的片段被洗去，这也会导致样品损失。低起始量也可能导致文库构建过程中形成不希望得到的接头二聚体。由于这些不利影响，强烈建议使用更高起始量的 FFPE 来补充“可用”模板的损失。考虑到这一点，黑色素瘤 FFPE 样品的测试起始量范围从下限 50 ng 开始。使用试剂盒 M 去除 FFPE 文库样品残留的 rRNA 是试剂盒 O 去除样品的 4–5 倍。由于残留 rRNA 的贡献，试剂盒 M 文库的重复率较低，文库较大。整合到这些文库中的 rRNA 含有具有分子条形码 (MBC) 的接头，因此通过重复标记软件将其计为独特分子。它们的存在增加了文库的复杂度，重复的数量更少。然而，这些是没有信息的文库成员，占据了更有意义的文库成员的宝贵空间。试剂盒 M 观察到的较低匹配率支持了该结论，因为仅有少数 rRNA 与 GRCh38 参考文件匹配。试剂盒 O 去除方法的匹配率更高，这证明了尽量降低 rRNA 含量的益处。正如预期，所有文库指标都随着两种去除方法的起始量增加而得到改善。如果可用，更高的 FFPE RNA 起始量非常有用，建议起始量 ≥ 100 ng。指标表右侧的图表显示了单个文库的残留 rRNA 百分比。与测试的所有其他试剂盒 O 文库相比，50 ng 试剂盒 O 的重复测定结果中有一个异常高，将其视为离群值。

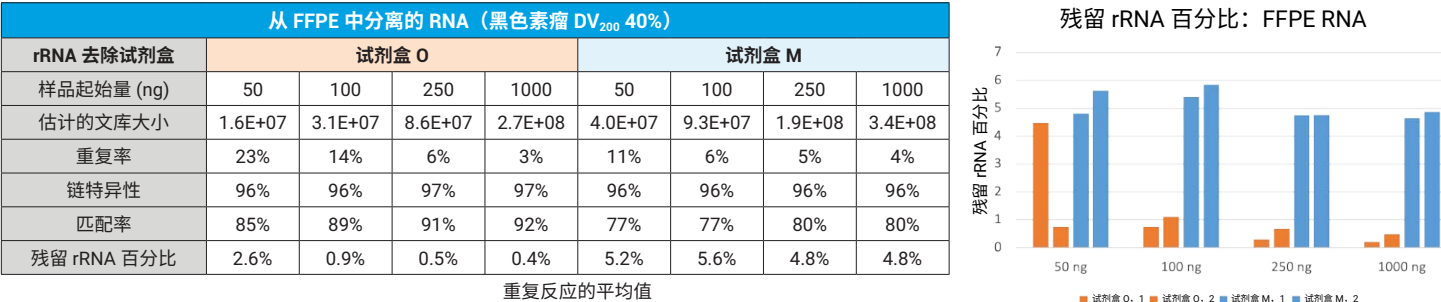


图 2. 由片段化 FFPE RNA 制备的去除 rRNA 文库的 RNA 测序指标。使用试剂盒 O 和试剂盒 M rRNA 去除试剂盒，对 50、100、250 和 1000 ng FFPE RNA 进行重复 rRNA 去除反应。使用所得 RNA 样品来制备 SureSelect XT HS2 RNA 文库。然后对文库进行测序并按照描述进行分析。测序指标代表重复文库的平均结果。条形图显示了每个单独文库残留的 rRNA 百分比。试剂盒 O 文库用橙色条表示，试剂盒 M 文库用蓝色条表示

基因表达

为了确定去除 rRNA 的 RNA XT HS2 文库的基因表达谱是否因去除过程发生显著改变，我们对无偏差对照数据集与去除 rRNA 样品的制备文库进行了相关性分析。为了尽量减少偏差，用 10 ng 未富集的 UHRR 制备基准文库。对该文库进行深度测序，并从所得数据集中手动删除所有 rRNA 序列。测试数据集是使用试剂盒 O 和试剂盒 M rRNA 去除试剂盒富集的 10 ng UHRR 制备的 RNA XT HS2 文库。对所有数据集进行期望最大化 (RSEM) 分析的 RNA 测序，并将 TPM 输出用于相关性研究。所有 5 个文库配对的相关系数见表 2。所有文库均观察到高度相关性 (≥ 94%)，两种去除试剂盒之间观察到的差异可忽略不计。

表 2. 去除 rRNA 的 SureSelect XT HS2 RNA 文库与基准文库的基因表达相关性分析。根据生产商说明，使用试剂盒 O 和试剂盒 M 对 10 ng UHRR 的重复反应去除核糖体成分。由获得的去除 RNA 样品构建 SureSelect XT HS2 RNA 文库，在 Illumina HiSeq 4000 平台上测序。作为参考，由未富集的 10 ng UHRR 样品构建文库，然后进行深度测序。然后从所得数据中手动去除 rRNA 序列，以提供用于比较的基准数据集。对每个文库进行 TPM 基因表达分析。使用 Microsoft Excel 对 TPM 计算相关系数 (r)，如下所示

GEx 相关性	试剂盒 O 重复反应 A	试剂盒 O 重复反应 B	试剂盒 M 重复反应 A	试剂盒 M 重复反应 B	未富集
试剂盒 O 重复反应 A	1.00				
试剂盒 O 重复反应 B	0.96	1.00			
试剂盒 M 重复反应 A	0.95	0.95	1.00		
试剂盒 M 重复反应 B	0.95	0.95	0.96	1.00	
未富集	0.94	0.94	0.94	0.94	1.00

融合检测

为了研究 rRNA 去除试剂盒检测基因融合转录本的性能，由 SeraSeq FFPE 融合 RNA v4 (DV₂₀₀ 60%) 的重复 50 ng 起始量反应制备 RNA XT HS2 文库。该参比样品报告了 16 个融合，如表 3 所示。使用 STAR-Fusion 分析软件报告每个文库中检测到的融合。合并连接和支持 read，并对重复文库的结果值取平均值，如表 3 所示。使用试剂盒 M 去除的样品显示出总体融合计数较高，检测出了列表中 16 个融合中的 13 个融合。此外，试剂盒 M 文库检测到所有 16 个融合，但试剂盒 O 漏掉 1 个 (EGFR-SEPT14)。当在其他测序指标的背景下考虑时，这里观察到的试剂盒 M 去除文库的融合检测水平进一步改善。如在黑色素瘤 FFPE 文库示例中所观察到的（图 2），与使用试剂盒 O 去除试剂盒制备的文库相比，SeraSeq FFPE 试剂盒 M 去除文库具有更高的残留 rRNA 量和更低的匹配率（数据未显示）。考虑到这一点，如果分析了相同数量的匹配 read，预期试剂盒 M 文库的融合计数将更高。

表 3. 融合检测。使用 Qiagen RNeasy FFPE 试剂盒从 SeraSeq FFPE 融合 RNA 参比物质 v4 卷中分离 RNA。根据生产商说明，使用试剂盒 O 和试剂盒 M 对 50 ng 起始量的重复反应去除核糖体成分。由获得的去除 rRNA 样品构建 SureSelect XT HS2 RNA 文库，在 Illumina HiSeq 4000 平台上测序。将样品归一化为 2000 万个 read，并使用 STAR-fusion（通过 BWA）分析工具测定融合。合并检测融合的连接和支持 read 数，并对重复样品的结果取平均值

rRNA 去除 SeraSeq FFPE RNA (DV ₂₀₀ 60%) 中融合的 read 计数		
预期融合	试剂盒 O	试剂盒 M
CCDC6-RET	2.5	6.5
CD74-ROS1	5	9
EGFR-SEPT14	0	1.5
EML4-ALK	1	2.5
ETV6-NTRK3	1.5	4
FGFR3-BAIAP2L1	9	5
FGFR3-TACC3	6.5	10
KIF5B-RET	3	3.5
LMNA-NTRK1	3	2.5
NCOA4-RET	1.5	3.5
PAX8-PPARG1	1.5	2
SLC34A2-ROS1	1.5	2
SLC45A3-BRAF	2	3
TFG-NTRK1	3	2.5
TMPRSS2-ERG	1	10
TPM3-NTRK1	2	6.5

连接 + 支持 read（重复反应的平均值）

结论

为与 SureSelect XT HS2 RNA 试剂和 workflows 结合使用，最初筛选了 5 种 rRNA 去除试剂盒。其中 3 种试剂盒与 workflows 无缝匹配，表现良好。其中选择两种试剂盒试剂盒 O 和试剂盒 M 对高质量和 FFPE RNA 样品进行广泛测试。这两种试剂盒对高质量 RNA 均表现良好，但试剂盒 O 在去除 FFPE 样品 rRNA 方面表现更好。对于测试的两种试剂盒，10–1000 ng 高质量 RNA 的起始量范围得到了高质量文库。对于这两种试剂盒，更高起始量的 FFPE RNA 改善了文库质量。如果可用，建议 FFPE RNA 的至少起始量为 100 ng。这两种试剂盒均产生高质量文库，彼此的基因表达谱与基准对照文库具有高度相关性。在检测基因融合方面，试剂盒 M 优于试剂盒 O。总体而言，这两种 rRNA 去除试剂盒除了可靠易用外，性能良好。建议使用其中任何一种试剂盒与 SureSelect XT HS2 RNA 试剂配套使用，方案见附录。

附录

构建去除 rRNA 的 XT HS2 RNA 文库所需的试剂和流程

所需试剂

试剂	供应商	货号
rRNA 去除试剂盒（人）		* 用户偏好
SureSelect XT HS2 RNA 文库制备试剂盒	安捷伦科技公司	G9993A-D（96 次反应） G9990A（16 次反应）**
AMPure XP 磁珠	Beckman Coulter	A63882 (4 L)、A63881 (60 mL)、A63880 (5 mL)
高灵敏度 DNA1000 ScreenTape 分析	安捷伦科技公司	5067-5584
高灵敏度 DNA1000 样品缓冲液	安捷伦科技公司	5067-5603

* 建议使用试剂盒 O 和/或试剂盒 M，但也可使用其他供应商提供的试剂盒。如果使用替代供应商，建议在文库构建前对 rRNA 进行去除，并遵守表 4 中提供的样品指导原则

** G9990A 是 16 次反应试剂盒，包含 AMPure 磁珠。还包括本方案不需要的靶向序列捕获试剂

样品指南

使用用户根据生产商指导原则选择的方法制备去除 rRNA 的样品，并注意：

- RNA XT HS2 文库制备方案起始体积必须至少为 10 µL（水中）。应相应调整去除试剂盒方案的输出体积
- 对于文库制备，遵守基于质量的样品起始量建议，而不是去除试剂盒起始量范围（见下文表 4）。不建议使用 DV₂₀₀ < 20% 的样品

表 4. 根据样品质量推荐的 RNA 起始量		
RNA 样品类型	起始量范围	备注
高质量（非 FFPE）	10–1000 ng	低 RIN OK (> 4)
FFPE DV ₂₀₀ > 40%	50–1000 ng	建议对较低质量使用较高的起始量
FFPE DV ₂₀₀ 20%–40%	100–1000 ng	

SureSelect RNA XT HS2 文库构建

开始前：

- 在冰上解冻所需试剂，涡旋混匀。短暂离心将溶液收集到管底
- 将 AMPure 磁珠恢复至室温
- 使用前配制 70% 乙醇（400 µL/SPRI 纯化液/样品）

cDNA 合成

- 向各 10 µL 去除 rRNA 样品中加入 **10 µL** SureSelect RNA 2X Priming 缓冲液。将 FFPE 样品置于冰上储存，直至准备进行 cDNA 合成
- FFPE 样品**
- FFPE 样品已高度降解，无需任何额外的片段化。
- 跳过以下第 2 步（94 °C 加热片段化）。
- 非 FFPE 样品**
- 从细胞系、组织或新鲜冷冻组织中分离的 RNA 样品，无论质量如何，均需要经过片段化过程。继续进行第 2 步。

2. 根据下表，使用热循环仪片段化**非 FFPE** 样品。完成后放回冰上

循环次数	温度	时间	步骤
1X	94 °C	4:00	片段化
1X	4 °C	保持	冷藏

如果出现提示，将体积设置为 **20 µL**。

3. 编辑并预热热循环仪，用于第一链合成，如下所示：

循环次数	温度	时间	步骤
1X	25 °C	10:00	六聚体延伸
1X	37 °C	40:00	cDNA 合成
1X	4 °C	保持	冷藏

如果出现提示，将体积设置为 **24 µL**。

4. 涡旋第一链预混液并短暂离心
5. 在冰上向每份样品加入 **4 µL**。盖上盖子，涡旋混合，短暂离心
6. 将样品转移至热循环仪中并运行程序。完成后取出样品并转移至冰上
7. 编辑并预热热循环仪，用于第二链合成，如下所示：

循环次数	温度	时间	步骤
1X	16 °C	60:00	第二链合成
1X	4 °C	保持	冷藏

如果出现提示，将体积设置为 **54 µL**。

8. 涡旋解冻的第二链酶混合物和第二链寡核苷酸混合物瓶，短暂离心
9. 在冰上向各反应中加入 **25 µL** 第二链酶混合物和 **5 µL** 第二链寡核苷酸混合物。盖上盖子，涡旋混合，将反应液转移至预热的热循环仪中，运行程序
10. 在第二链合成后，SPRI 使用以下参数纯化 cDNA：

cDNA 合成后 SPRI 纯化				
体积为 54 µL, 1.9X				
循环次数	操作		体积	孵育时
1X	结合	AMPure XP 磁珠	105 µL	5:00
2X	清洗	70% 乙醇	200 µL	1:00
1X	干燥	室温或 37 °C	清洗	
1X	洗脱	水	52 µL	2:00
1X	转移		50 µL	

11. 将 50 µL 纯化的 cDNA 转移至新标记的离心管中



这是该流程的一个停止点。如果不继续进行文库构建，则在 **-20 °C** 下冷冻样品待用。

末端修复和接头连接

12. 通过混合下表中的试剂，制备适当体积的连接预混液。使用前充分混匀试剂，并根据需要按比例增加或减少试剂。缓冲液为粘性液体时，请缓慢移液。充分混合。**进行末端修复反应时，将预混液恢复至室温**

连接预混液		
试剂	1X	8X+
连接缓冲液	23 μL	207 μL
T4 DNA 连接酶	2 μL	18 μL
25 μL		

13. 使用下表概述的参数编辑和预热循环仪，用于末端修复/加 A 尾反应。确保热盖功能打开

循环次数	温度	时间	步骤
1X	20 °C	15:00	末端修复
1X	72 °C	15:00	加 A 尾
1X	4 °C	保持	冷藏

如果出现提示，将体积设置为 **70 μL** 。

14. 通过混合下表中的试剂，制备适当体积的末端修复/加 A 尾预混液。使用前充分混匀试剂，并根据需要按比例增加或减少试剂。混匀，短暂离心，然后将 **20 μL** 分配至各 50 μL 纯化 cDNA 样品中

末端修复/加 A 尾预混液		
试剂	1X	8X+
末端修复/加 A 尾缓冲液	16 μL	144 μL
末端修复/加 A 尾酶混合物	4 μL	36 μL
20 μL		

15. 混匀并短暂离心。将反应液转移至预热的热循环仪中并重新运行

16. 运行完成后，将样品转移至冰上，并使用下表中的参数对热循环仪进行编辑，用于下一个反应。开始运行，然后暂停，预热仪器

循环次数	温度	时间	步骤
1X	20 °C	30:00	接头连接
1X	4 °C	保持	冷藏

如果出现提示，将体积设置为 **100 μL** 。

17. 向冰上的每个末端修复/加 A 尾反应中，加入 **25 μL** 室温连接预混液。由于试剂有粘性，请缓慢移液。盖紧管盖并涡旋混合样品。短暂离心使溶液收集到管底
18. 取下瓶盖，向各样品中加入 **5 μL** 的 SureSelect XT HS2 RNA 接头寡核苷酸混合物。盖紧样品管盖并涡旋混合样品。短暂离心使溶液收集到管底。将反应液转移到预编辑的热循环仪中并重新运行

19. 从循环仪中取出样品，并在室温下转移到管架上

20. 对连接反应液进行同样 SPRI 纯化。第二次 SPRI 纯化极大地减少了接头二聚体的形成。纯化参数详见以下两个表格

注：每次纯化的磁珠和洗脱体积不同

连接后 SPRI 纯化 #1				
体积为 100 µL, 0.8X				
循环次数	操作		体积	孵育时间
1X	结合	AMPure XP 磁珠	80 µL	5:00
2X	清洗	70% 乙醇	200 µL	1:00
1X	干燥	室温或 37 °C	清洗	
1X	洗脱	水	50 µL	2:00
1X	转移		50 µL	

连接后 SPRI 纯化 #2				
体积为 50 µL, 1.2X				
循环次数	操作		体积	孵育时间
1X	结合	AMPure XP 磁珠	60 µL	5:00
2X	清洗	70% 乙醇	200 µL	1:00
1X	干燥	室温或 37 °C	清洗	
1X	洗脱	水	35 µL	2:00
1X	转移		34 µL	

21. 将第二次 SPRI 纯化的洗脱液转移至新离心管中，并置于冰上

rRNA 去除文库的扩增

22. 从冷冻储存中取出 SureSelect 标签引物，并在室温下解冻。解冻后，涡旋混合，然后离心使样品收集到孔底

23. 使用下表概述的参数编辑和预加热循环仪，对接头连接文库进行 PCR 扩增。使用表 5 所示的适当循环次数

PCR 循环参数			
阶段	循环次数	温度	时间（分:秒）
1	1	98 °C	2:00
2	见表 5	98 °C	0:30
		60 °C	0:30
		72 °C	1:00
3	1	72 °C	5:00
4	1	4 °C	保持

如果出现提示，将体积设置为 50 µL。

表 5. SureSelect XT HS2 rRNA 去除文库的建议 PCR 循环次数*

起始量 (ng)	非 FFPE	良好 FFPE (DV ₂₀₀ ≥ 50%)	平均 FFPE (DV ₂₀₀ 30%–50%)	不良 FFPE (DV ₂₀₀ 20%–30%)
10	12			
50	10	13	15	
100	9	12	14	16
250	8	11	13	15
500	7	10	12	14
1000	7	9	11	13

* 建议的 PCR 循环次数是该 Agilent SureSelect 核糖体去除应用的整数近似值

24. 使用下表制备适当体积的 PCR 反应混合物。充分混合

PCR 扩增预混液		
试剂	1X	8X+
含 dNTP 的 5X Herculanase II 缓冲液	10 µL	90 µL
Herculanase II DNA 聚合酶	1 µL	9 µL
	11 µL	

25. 将 11 µL 的 PCR 预混液分配至各纯化接头连接文库中

26. 向每个反应中加入 5 µL 的 SureSelect XT HS2 标签引物对。盖紧管盖，混合并短暂离心

27. 将反应液放入预编辑的热循环仪中并重新运行

28. PCR 反应完成后，在室温下将反应液转移到离心管架上，并使用下表中描述的参数进行 SPRI 纯化

PCR 后 SPRI 纯化				
体积为 50 µL, 1X				
循环次数	操作		体积	孵育时间
1X	结合	AMPure XP 磁珠	50 µL	5:00
2X	清洗	70% 乙醇	200 µL	1:00
1X	干燥	室温或 37 °C	清洗	
1X	洗脱	低 TE 缓冲液	15 µL	2:00
1X	转移		15 µL	

29. 在 Agilent HS DNA1000 ScreenTape 分析中评估文库质量并测定文库产量。两个示例见下图 3

30. 将完成的文库储存在 -20°C 下待用，准备混合并提交用于测序

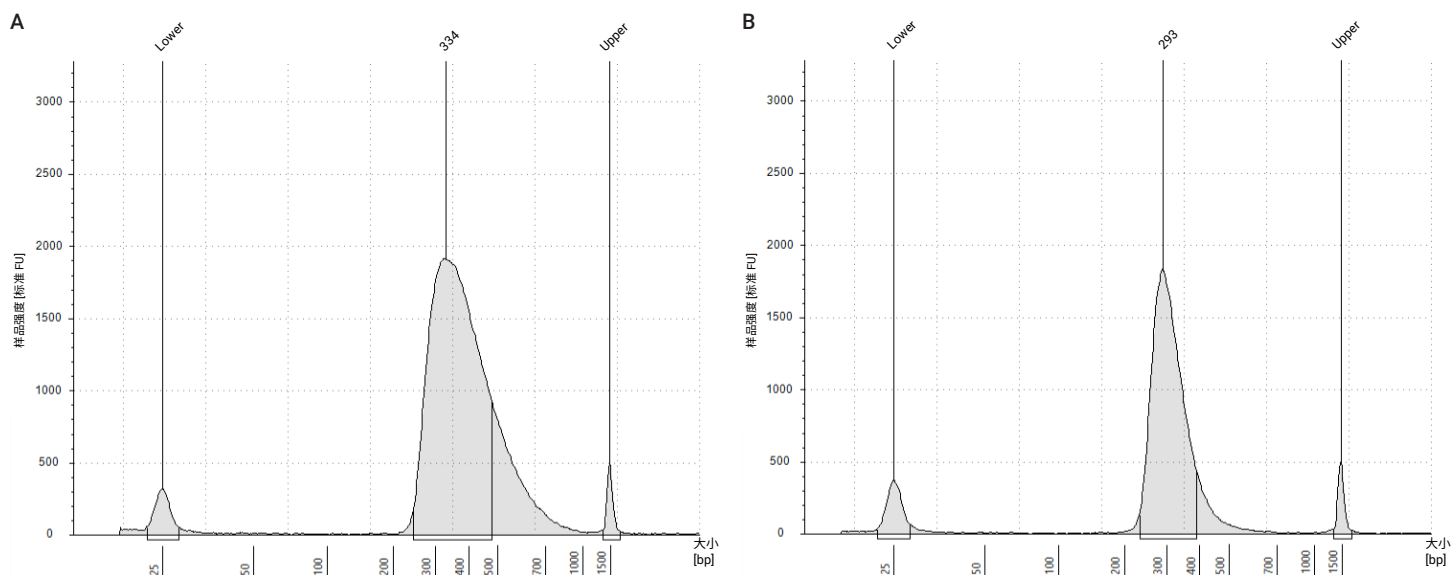


图 3. 去除 rRNA 的 SureSelect XT HS2 RNA 文库的高灵敏度 D1000 ScreenTape 电泳图。显示了使用试剂盒 O rRNA 去除试剂盒制备的 rRNA 去除文库的两个示例和提供的流程。A) 由 10 ng 起始高质量 RNA (UHRR) 制备的文库。B) 从黑色素瘤 FFPE 组织切片提取的 100 ng RNA 起始量制备的文库 (DV₂₀₀ 43%)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。
PR7001-1762

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
2023 年 12 月 5 日，中国出版
5994-6944ZHCN