

# NR102

## Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®

### 產品概述

Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®是針對 Illumina 高通量定序平台資料庫建構定向優化而成的試劑組。使用本試劑組採用 dUTP 法，可以將 total RNA、mRNA 或 rRNA depleted RNA 樣品製備成鏈特異性 RNAseq 資料庫。試劑組中提供的所有試劑都經過嚴格的品質控制和功能驗證，保證了資料庫建構的穩定性和重複性。

### 產品組成

組成	NR102-01 (24 rxn)	NR102-02 (96 rxn)
RT Enzyme Mix	48 µl	192 µl
5X RT Buffer	144 µl	576 µl
2nd Strand Enzyme Mix	96 µl	384 µl
2nd Strand Bufferwith dUTP (10X)	192 µl	768 µl
End Repair Enzyme Mix	120 µl	480 µl
End Repair Reaction Buffer (10X)	240 µl	960 µl
DNA polymerase I Klenow fragment exo -	72 µl	288 µl
dA-Tailing Reaction Buffer (10X)	120 µl	480 µl
Rapid T4 DNA Ligase	120 µl	480 µl
Rapid Ligation Reaction Buffer (5X)	240 µl	960 µl
Heat-labile UDG	24 µl	96 µl
Super-Fidelity DNA Polymerase	24 µl	96 µl
Super-Fidelity 2X PCR Buffer	600 µl	2 × 1.2 ml

### 有效日期

所有組成分-20°C儲存。有效期一年。

### 材料

Oligo (dT)<sub>25</sub> MagBeads (Vazyme #N401)

Actinomycin D (Sigma# A1410, dissolved in DMSO to 5 µg/ul)

磁力架

100%酒精

Nuclease free 水或 DEPC 水

10 mM Tris-HCl, pH 8.0 或者 0.1 × TE Buffer

低吸附 EP tube (Eppendorf #022431021)

AMPure® XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881)

PCR machine

Singleplex or Multiplex Oligos for Illumina® (Vazyme #N301,#N302 或#N303)



## 適用範圍

適用於將 1 µg-10 µg Total RNA, 10-100 ng 純化的 mRNA 或 10-100ng rRNA depleted RNA 樣品製備成 Illumina 高通量定序平台專用的鏈特异性 RNAseq 資料庫。

## 使用方法

**mRNA 分離/片段化** (此操作適用於 1-10 µg total RNA; 若起始樣品為純化的 mRNA 或 rRNA depleted RNA, 則進行下一步 mRNA 片段化操作)

1. 準備 total RNA 樣品: 在一個 nuclease-free 管中, 將 RNA 溶解於 50 µl nuclease-free 水, 放置於冰上備用。
2. 於一個 nuclease-free 微量離心管中準備 2X RT Buffer:

Nuclease free water	9 µl
5X RT Buffer	6 µl
In Total	15 µl

放置冰上備用。

3. 準備 Oligo (dT)<sub>25</sub> MagBeads :

- a) 吸取 15 µl 的 Oligo (dT)<sub>25</sub> MagBeads 加入於 nuclease-free 微量離心管中。
- b) 吸取 100 µl 的 2X RNA Binding Buffer 至 Oligo (dT)<sub>25</sub> MagBeads 中。用 pipetman 拍打 6 次以徹底混勻, 在磁力架上靜置 2 分鐘; 小心吸掉上清液, 將管子從磁力架上移走。
- c) 重複上一步驟。
- d) 以 50 µl 的 2X RNA Binding Buffer 重新懸浮 Oligo (dT)<sub>25</sub> MagBeads 。

4. 將磁珠加入第 1 步驟的 total RNA 樣品中, 用 pipetman 吹打 6 次以徹底混勻。
5. 65°C 5 min, 立刻以冰水浴冷卻 2 min, 使 RNA 變性。
6. 室溫放置 5 分鐘, 使 mRNA 結合到磁珠上。
7. 將樣品置於磁力架 2 分鐘, 使 mRNA 與 total RNA 分離; 小心吸掉上清液。
8. 將樣品從磁力架上取出, 用 200 µl Wash Buffer 重新懸浮磁珠; 用 pipetman 吹打 6 次徹底混勻, 在磁力架上靜置 2 分鐘, 丟棄上清液。
9. 重複上一步驟。
10. 將樣品從磁力架上取出, 用 50 µl Elution Buffer 重新懸浮磁珠; 用 pipetman 吹打 6 次徹底混勻。
11. 80°C 加熱 2 min, 25°C hold, 將 mRNA elute 下來。
12. 加入 50 µl 2X RNA Binding Buffer, 用 pipetman 吹打 6 次徹底混勻; 。
13. 重複步驟 5-9。
14. 將樣品從磁力架上取出, 用 200 µl Elution Buffer 重新懸浮磁珠; 用 pipetman 吹打 6 次徹底混勻, 在磁力架上靜置 2 分鐘, 丟棄上清液。

**注意:** 此步驟不是 Elute 步驟, 而是用 Elution Buffer 洗滌磁珠。此步驟中上清液應徹底清除。可用 10 µl 的 tip 仔細吸掉上清液, 不要攪動磁珠。

15. 加入 15 µl 2X RT Buffer 重新懸浮磁珠, 用 pipetman 吹打 6 次徹底混勻; 將樣品置於 PCR 儀器中, 94°C 15 min, 立刻將樣品置於磁力架 2 分鐘, 轉移 10 µl 上清液至一個新的 nuclease-free 管中, 進入第一鏈合成反應, 或將 mRNA 置於 -80°C 保存。**注意:** 本步驟獲得的資料庫插入片段大小約為 200bp; 如果要製備插入片段 > 200 bp 的資料庫, 調整 94°C 加熱時間至 5 min

**mRNA 片段化** 適用於 10–100 ng 純化的 mRNA 或 10–100 ng rRNA depleted RNA 樣品

1. 在 nuclease-free PCR 管中配製下列反應液：

mRNA/rRNA depleted RNA	10-100 ng
5X RT Buffer	4 $\mu$ l
Nuclease free water	To 10 $\mu$ l

2. 將樣品置於 PCR 儀器中，94°C, 15 min，立刻置於冰上冷卻 1 分鐘，進入第一鏈合成反應。

注意：此步驟獲得的資料庫插入片段大小約為 200 bp；若製備插入片段 > 200 bp 的資料庫，調整 94°C 加熱時間至 5 min。片段化的 mRNA 可在 -80°C 保存。

### 第一股/鏈合成

1. 將 Actinomycin D 貯存液 (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 用 nuclease free water 稀釋至 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l，立刻使用。(注意:稀釋的 Actinomycin D 溶液對光非常敏感，且會逐漸吸附在塑膠和玻璃的表面。因此，未用完的 Actinomycin D 稀釋液應丟棄。5  $\mu$ g/ $\mu$ l 的 Actinomycin D 貯存液可分裝後在 -20°C 保存至少一個月。)

2. 於 nuclease-free PCR 管中配製下列反應液：

Fragmented mRNA	10 $\mu$ l
RT Enzyme Mix	2 $\mu$ l
Actinomycin D (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Nuclease free water	3 $\mu$ l
In Total	20 $\mu$ l

3. 於 PCR 儀器中進行第一鏈合成反應，並在反應完成後立刻進行第二鏈合成反應:

25 °C, 10 min

50 °C, 30 min

85 °C, 5 min

Hold at 4 °C

### 第二股/鏈合成

1. 於 nuclease-free PCR 管中配製下列反應液：

1st Strand cDNA	20 $\mu$ l
2nd Strand Buffer with dUTP (10X)	8 $\mu$ l
2nd Strand Enzyme Mix	4 $\mu$ l
Nuclease-free water	48 $\mu$ l
In Total	80 $\mu$ l

2. 將反應液置於 PCR 儀器中，16°C 1 h。反應完成後可 -20°C 保存。

注意: 請將 PCR 儀器上蓋溫度設置成 40°C 以下。

3. 用 1.8X 體積的 AMPure XP beads 純化雙鏈 cDNA：

a) 渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。

b) 吸取 144  $\mu$ l AMPure XP beads 至 80  $\mu$ l 雙鏈 cDNA 產物中，使用 pipetman 輕輕吹打 10 次充分混勻。

c) 室溫靜置 5 分鐘。

d) 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(大約 5 分鐘)，保持 EP 管始終處於磁

力架中，小心移除上清液。

- e) 將 EP 管始終處於磁力架中，加入 200  $\mu$ l 新鮮配製的 80%乙醇清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，移除上清液。
- f) 重複上一步，共清洗 2 次。
- g) 保持 EP 管始終處於磁力架中，開蓋空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
- h) 將 EP 管從磁力架中取出，加入 90  $\mu$ l nuclease free 水進行 DNA elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕吹打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(大約 5 分鐘)，小心吸取 85  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR 管中。注意：Elite DNA 可在-20°C 保存。

### 末端修復並磷酸化

1. 在無菌 PCR 管中配製如列反應物

End Repair Reaction Buffer (10X)	10 $\mu$ l
End Repair Enzyme Mix	5 $\mu$ l
ds cDNA	85 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	To 100 $\mu$ l

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻 (請勿振盪 Vortex 混合)，並短暫離心將反應液體收集至管底。

3. 將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

上蓋加熱	On, 105°C
20°C	30 min

### 修復產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 160  $\mu$ l (1.6X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200  $\mu$ l 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 50  $\mu$ l 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心吸取 42  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 50  $\mu$ l 無菌超純水或者洗脫緩衝液洗脫 elute。

## 修復產物加 dA-tail

1. 在無菌 PCR tube 中配製下方反應物：

dA-Tailing Reaction Buffer (10X)	5 $\mu$ l
DNA polymerase I Klenow fragment exo -	3 $\mu$ l
純化後的末端修復產物	42 $\mu$ l
In Total	50 $\mu$ l

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心將反應液體收集至管底。

3. 將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

上蓋加熱	On, 105°C
37°C	30 min

## 加 dA-tail 產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 90  $\mu$ l (1.8X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200  $\mu$ l 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 36  $\mu$ l 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 32.5  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 30  $\mu$ l 無菌超純水或者洗脫緩衝液 洗脫 elute。

## 接合子 Adapter 連接

1. 在無菌 PCR tube 中配製下列反應：

Rapid Ligation Reaction Buffer (5X)	10 $\mu$ l
Rapid T4 DNA Ligase	5 $\mu$ l
純化後的加 dA-tail 產物	32.5 $\mu$ l
Adapter for Illumina (15 $\mu$ M) * **	2.5 $\mu$ l
In Total	To 50 $\mu$ l

\* Singleplex Oligos for Illumina® (Vazyme #N301), Multiplex Oligos set 1 for Illumina® (Vazyme #N302) 或 Multiplex Oligos set 2 for Illumina® (Vazyme #N303)中均提供 Adapter for Illumina

\*\* 若起始樣品量 < 5  $\mu$ g total RNA，或 < 50 ng mRNA/rRNA depleted RNA，請將 Adapter for Illumina (15  $\mu$ M)用無菌超純水稀釋 10 倍至 1.5  $\mu$ M 後使用。

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心將反應液體收集至管底。

3.將反應管置於 PCR machine 中，進行下述反應：

上蓋加熱	On, 105°C
20°C	15 min

### 連接產物使用 AMPure® XP Beads 純化

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 90 µl (1.8X) AMPure XP beads 至修復產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200 µl 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上清液。
6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
8. 將 EP tube 從磁力架中取出，若後續使用 AMPure XP beads 進行片段大小分離，則加入 105 µl 無菌超純水 elute 脫；若後續需要使用膠體回收進行片段大小分離，可根據需要調整 elute 體積。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 100 µl 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

### 使用 AMPure® XP Beads 進行片段大小分離

插入片段長度(bp)	200	250	300	400	500	700
總長度(插入片段+接合子)	320	370	420	520	620	820
第一次磁珠分離比例 (磁珠：DNA)	0.8X	0.7X	0.6X	0.55X	0.5X	0.45X
第二次磁珠分離比例 (磁珠：DNA)	0.2X	0.2X	0.2X	0.15X	0.15X	0.15X

表一：建議 AMPure XP beads 資料庫分離純化反應條件

注：表中“X”表示樣品 DNA 體積。如資料庫插入片段長度為 200 bp，樣品 DNA 體積為 100µl，則第一次分離磁珠使用體積為  $0.8 \times 100\mu\text{l} = 80\mu\text{l}$ ；第二次分離磁珠使用體積為  $0.2 \times 100\mu\text{l} = 20\mu\text{l}$ 。

以下操作流程只適合於插入片段長度為 200 bp 的資料庫。其他長度資料庫請根據表一選擇最適合的磁珠量。

1. 以渦旋 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
2. 吸取 80 µl (0.8X) AMPure XP beads 至 100 µl B-1 純化產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
3. 室溫靜置 5 分鐘。
4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心轉移上清液至乾淨 EP 管中。
5. 吸取 20 µl (0.2X) AMPure XP beads 至上清液中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
6. 室溫靜置 5 分鐘。
7. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
8. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200 µl 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移除上

清液。

9. 重複步驟 8.兩次，共清洗三次。
10. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
11. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 28  $\mu$ l 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 21  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR tube 中，請勿觸碰 AMPure XP beads。

**注意:** 轉移上清時請勿吸取 AMPure XP beads，即使微量殘留都將影響後續資料庫擴增效率。

除此之外，修復產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用 50  $\mu$ l 無菌超純水或者以緩衝液洗脫 elute。

### 接合子連接產物 PCR 擴增

1. 在無菌 PCR 管中配製如下反應：

純化後的連接產物	21 $\mu$ l
Super-Fidelity 2X PCR Buffer	25 $\mu$ l
Universal PCR Primer for Illumina*	1 $\mu$ l
Index Primer for Illumina*	1 $\mu$ l
Heat-labile UDG	1 $\mu$ l
Super-Fidelity DNA Polymerase	1 $\mu$ l
In Total	50 $\mu$ l

\* Singleplex Oligos for Illumina® (Vazyme #N301), Multiplex Oligos set 1 for Illumina® (Vazyme #N302)或 Multiplex Oligos set 2 for Illumina® (Vazyme #N303)中均提供 Universal PCR Primer for Illumina 和 Index Primer for Illumina。

2. 使用 pipetman 輕輕拍打混勻，並短暫離心將反應液體收集至管底。
3. 將反應管放置於 PCR machine 中，進行下列反應：

步驟	溫度	時間	循環次數
含 U 鏈降解	25°C	10 min	1
預變性	98°C	30 sec	1
變性 Denature	98°C	10 sec	
退火 Annealing	65°C	30 sec	12-15*
延伸 Extension	72°C	30 sec	
完全延伸	72°C	5 min	1
Hold	4°C		

\* PCR 循環數不應超過 15 個循環，以免產生過度擴增(> 500 bp 產物)

## PCR 產物使用 AMPure XP beads 純化

1. 以 Vortex 振盪混勻 AMPure XP beads。
  2. 吸取 50  $\mu$ l (1X) AMPure XP beads 至 PCR 產物中，使用 pipetman 輕輕拍打 10 次充分混勻。
  3. 室溫靜置 5 分鐘。
  4. 將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後(約 5 分鐘)，小心移除上清液。
  5. 保持 EP 管始終置於磁力架中，加入 200  $\mu$ l 新鮮配製的 80%酒精清洗磁珠。室溫靜置 30 秒，小心移 除上清液。
  6. 重複步驟 5.兩次，共清洗三次。
  7. 保持 EP tube 置於磁力架中，打開蓋子空氣乾燥磁珠 10 分鐘。
  8. 將 EP tube 從磁力架中取出，加入 30  $\mu$ l 無菌超純水 elute。Vortex 振盪或使用 pipetman 輕輕拍打充分混勻。將反應管短暫離心並置於磁力架中分離磁珠和液體。待溶液澄清後 (約 5 分鐘)，小心吸取 25  $\mu$ l 上清液至無菌 PCR tube 中。
  9. 將製備好的 DNA 資料庫置於-20°C 保存。
- 除此之外，PCR 擴增產物也可使用管柱純化試劑組進行純化。最終使用同等體積的無菌超純水或者以緩衝液 elute。

## 用 Bioanalyzer® (Agilent high sensitivity chip)評估資料庫質量

- 1.以 nuclease free 水將資料庫做 5 倍稀釋。
2. 取 1  $\mu$ l 用 DNA High Sensitivity chip 分析。良好的資料庫應在預計大小的位置(如 300 bp 左右)有一個較狹窄的峰，如 Fig.1 所示。
3. 如果在 80 bp 左右(primers)或 128 bp 左右(adaptor-dimer)出現高峰，將資料庫用 nuclease free 水稀釋至 50  $\mu$ l，重複上一個步驟以再次純化 PCR 產物。

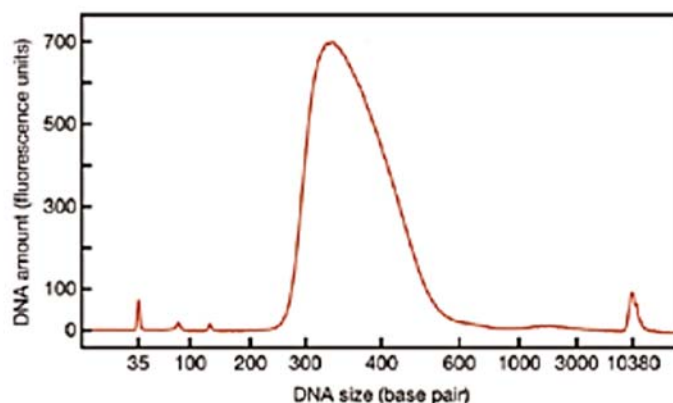


Fig.1. 用 Bioanalyzer 分析資料庫質量。

## 品質控制



## RT Enzyme Mix

SDS-PAGE 純度：所有酵素組成純度 > 95%。

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 10  $\mu$ l 此酵素和 1  $\mu$ g Hind III- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 10  $\mu$ l 本酵素和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中加入 10  $\mu$ l 本酶和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：50  $\mu$ l 反應體積中加入 10  $\mu$ l 本酶和 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10  $\mu$ l 本酶和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子特徵吸收高峰。

## 5X RT Buffer

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X RT Buffer 和 1  $\mu$ g Hind III- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X RT Buffer 和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X RT Buffer 和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：50  $\mu$ l 反應體積中包含 1X RT Buffer 和 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

磷酸酶活性檢測：磷酸酶活性檢測緩衝液中包含 1X RT Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處對硝基苯陰離子特徵吸收高峰。

## 2nd Strand Enzyme Mix

SDS-PAGE 純度：所有酵素組成純度 > 95%。

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 10  $\mu$ l 此酵素和 1  $\mu$ g Hind III- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 10  $\mu$ l 此酵素和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中加入 10  $\mu$ l 本酵素和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10  $\mu$ l 本酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子特徵吸收高峰。

## 2nd Strand RT Bufferwith dUTP (10X )

16 小時反應檢測：50  $\mu$ l 反應體積中包含 10  $\mu$ l 本品和 1  $\mu$ g Hind III- $\lambda$ DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50  $\mu$ l 反應體積中包含 10  $\mu$ l 本品和 1  $\mu$ g T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50  $\mu$ l 反應體積中加入 10  $\mu$ l 本品和 1  $\mu$ g  $\phi$ X174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：磷酸酶活性檢測緩衝液中包含 2nd Strand RT Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4

小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無硝基苯陰離子特徵吸收高峰

### **End Repair Enzyme Mix**

SDS-PAGE 純度：所有酵素組成純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經膠體電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

功能性活性檢測：在 1X End Prep Reaction Buffer 中加入 1 µl 酵素和 0.5 µg 包含 5' 和 3' 突出末端的片段化 DNA，25°C 下反應 20 分鐘。經毛細管電泳檢測，末端修復磷酸化的 DNA 比率 > 95%。

### **End Repair Reaction Buffer (10 X)**

16 小時反應檢測：50 µl 反應體積中包含 1X End Prep Reaction Buffer 和 1 µg Hind III-λDNA，37°C 下反應 16 小時。經膠體電泳檢測，無條帶降解；50 µl 反應體積中包含 1X End Prep Reaction Buffer 和 1 µg T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經膠體電泳檢測後，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中包含 1X End Prep Reaction Buffer 和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經膠體電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：在 1X End Prep Reaction Buffer 中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺膠體電泳檢測，無條帶降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X End Prep Reaction Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下靜置 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基陰離子吸收高峰。

### **DNA polymerase I Klenow fragment exo -**

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

RNase 活性殘留：在 1 µl 酵素中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，無條帶降解。

外切酶活性檢測：50 µl 反應體積中加入 40 µl 本酶和 1 µg [<sup>3</sup>H] DNA (105 cpm/µg)，37°C 下反應 4 小時。經同位素測定，放射強度釋放量 < 0.1%。

3'→5' 外切酶活性檢測：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 10 nM 5'-FAM 標記的寡核核苷酸，37°C 下反應 30 分鐘。經毛細管電泳檢測，無 3'→5' 降解產物可見。

功能性活性檢測：37°C 下反應 30 分鐘，1 µl 酵素可使 50 nmol 的 dNTP 摻入酸不溶性沉澱物。

### **dA-Tailing Reaction Buffer (10X)**

16 小時反應檢測：50 µl 反應體積中包含 1X dA-Tailing Reaction Buffer 和 1 µg Hind III-λDNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50 µl 反應體積中包含 1X dA-Tailing Reaction Buffer 和 1 µg T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中包含 1 × dA-Tailing Reaction Buffer 和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：在 1X dA-Tailing Reaction Buffer 中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X dA-Tailing Reaction Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

### **Rapid T4 DNA Ligase**

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 本酶和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

RNase 活性殘留：在 10µl 本酶中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

外切酶活性檢測：50 µl 反應體積中加入 10 µl 本酶和 1 µg [3H] DNA (105 cpm/µg)，37°C 下反應 4 小時。經同位素測定，放射強度釋放量 < 0.1%。

功能性活性檢測(平末端連接)：50 µl 反應體積中加入 5 µl 本酶，1X Rapid Ligation Reaction Buffer，平末端 300 bp DNA 片段 1.5 pmol 和 30 bp 5'磷酸化平末端雙鏈接合子 DNA 片段 15 pmol，20°C 下反應 15 分鐘。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，雙端連接接合子 DNA 的比率 > 95%。

功能性活性檢測(TA 末端連接)：50 µl 反應體積中加入 5 µl 本酶，1X Rapid Ligation Reaction Buffer，兩端均包含 dA 突出的 300 bp DNA 片段 1.5 pmol 和 30 bp 末端包含 dT 突出雙鏈接合子 DNA 片段 15 pmol，20°C 下反應 15 分鐘。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，雙端連接接合子 DNA 的比率 > 95%。

### **Rapid Ligation Reaction Buffer (5X)**

16 小時反應檢測：50 µl 反應體積中包含 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 1 µg HindIII-λDNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解；50 µl 反應體積中包含 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 1 µg T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，條帶無降解。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中包含 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

RNase 活性殘留：在 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 中加入 40 ng FAM-RNA，37°C 下反應 16 小時。經聚丙烯醯胺凝膠電泳檢測，條帶無降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X Rapid Ligation Reaction Buffer 和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。不溶性沉澱物。

### **Heat-labile UDG**

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 本酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。



磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 本酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子特徵吸收高峰。

### **Super-Fidelity DNA Polymerase**

SDS-PAGE 純度：純度 > 95%。

核酸內切酶殘留：50 µl 反應體積中加入 10 µl 酵素和 1 µg φX174 RF I DNA，37°C 下反應 4 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，RF II 轉化比率 < 10%。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 10 µl 酵素和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基陰離子吸收高峰。

擴增性能檢測：50 µl 反應體積中加入 1 µl 本品，10 ng 人基因組 DNA 以及 0.5 µM 擴增引子擴增 1 kb 片段。30 個循環後經瓊脂糖凝膠電泳檢測，有特異性 1 kb 擴增產物可見。

### **Super-Fidelity 2X PCR Buffer**

16 小時反應檢測：50 µl 反應體積中包含 25 µl 本品和 1 µg Hind III-λDNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，無發現條帶降解；50 µl 反應體積中包含 25 µl 本品和 1 µg T3 DNA，37°C 下反應 16 小時。經瓊脂糖凝膠電泳檢測，無發現條帶降解。

磷酸酶活性檢測：在磷酸酶活性檢測緩衝液中加入 1X 本品和 2.5 mM 對硝基苯磷酸，37°C 下反應 4 小時。經光譜測定法檢測，405 nm 處無對硝基苯陰離子吸收高峰。

### **Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®**

所有批次均進行 RNA 資料庫建構並在 Illumina 定序平台上進行定序驗證。

