

版本号: NR210831

TIANSeq Fast RNA Library Kit (illumina)

TIANSeq快速 RNA文库构建试剂盒

(illumina平台)

目录号: NR102

产品内容

产品组成	NR102-01 (24 rxn)	NR102-02 (96 rxn)
Frag/1st Strand Buffer	120 μ l	480 μ l
1st Strand Enzyme Mix	40 μ l	160 μ l
2nd Strand Buffer	240 μ l	960 μ l
2nd Strand Enzyme Mix	90 μ l	360 μ l
10 \times ERA Buffer	120 μ l	480 μ l
5 \times ERA Enzyme Mix	240 μ l	960 μ l
TIANSeq DNA Ligase	240 μ l	960 μ l
5 \times Ligation Buffer	500 μ l	2 \times 1 ml
2 \times HiFi PCR Master Mix	600 μ l	4 \times 600 μ l
P5/P7 Primers Mix	120 μ l	480 μ l
Nuclease-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml	8 \times 1 ml

储存条件

请将试剂盒置于-30~-15 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。 保质期为一年。

产品简介

TIANSeq Fast RNA Library Kit (illumina)是针对Illumina高通量测序平台开发的非定向转录组文库构建专用试剂盒。本试剂盒采用快速一管式的操作流程，可对RNA样本进行快速文库构建，在双链cDNA合成后，样本的末端修复和dA尾添加一步完成，所得产物无需纯化即可直接用于接头的连接。此外，试剂盒采用专门设计的高效高保真聚合酶，所获得的PCR富集产物保真度高、无碱基偏好性。

试剂盒所适用的起始样本为将总RNA中的rRNA去除的RNA (保留了mRNA和其他的非编码RNA) 或者从总RNA中直接分离获得的mRNA。总RNA样本的起始模板量为10 ng~1 μg；mRNA样本的起始模板量低至500 pg。

适用范围：适用于illumina高通量测序平台RNA文库的构建。

适用样本量：10 ng~1 μg的总RNA；低至（500 pg）起始的动、植物及真菌的mRNA。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq Single-Index Adapter (Illumina) (NG214-01/02/03)
2. TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306-01/02/03)

产品特点

1. 可针对mRNA和除rRNA外的非编码RNA（如lncRNA）进行转录组分析。
2. 操作流程简便，可实现RNA样本的快速文库构建。
3. 文库转化率高，适用于极低起始量样本文库的高效转化。
4. PCR富集过程中保真度高，不存在碱基偏好性。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、EP管进行试验。
3. 试验开始前，请清洁操作台，并使用RNA酶及DNA酶清除试剂，如RNase Away (Molecular BioProducts, Inc) 处理台面。确保没有RNA酶和DNA酶的污染。
4. 试验前请仔细阅读说明书，可暂停步骤可按照说明书操作进行保存样品。
5. 使用RIN值≥7.0、完整性较好的高质量的RNA样本进行rRNA去除或mRNA的分离，否则会影响建库质量。

操作步骤

一、RNA片段化及随机引物结合

(一) 试验准备:

1. 将去除rRNA的总RNA或mRNA样品从-80℃冰箱取出置于冰上缓慢化冻。
2. 在开始实验前, 需要明确去除rRNA的总RNA或mRNA的起始样本量, 确保要进行片段化的RNA样本起始量在1~100 ng。

注意: 确定去除rRNA的总RNA或mRNA量至关重要。推荐使用Agilent 2100生物分析仪进行样品的质量及浓度检测, 要求rRNA的残留控制在10%以内, 以免影响建库后数据分析质量。

(二) 试验步骤

将Frag/1st Strand Buffer 从-30~-15℃取出置于冰上, 解冻后涡旋混匀, 在PCR管中建立如下反应体系, 用移液器轻轻吹打10次充分混匀, 将样品置于PCR仪中, 根据插入片段大小, 选择片段化所需条件:

- (1) 按照下表建立反应体系

组分名称	体积 (μl)
去除rRNA的总RNA或 mRNA	5
Frag/1st Strand Buffer	5
Total	10

- (2) 按照下表选择片段化条件

插入片段大小 (bp)	反应温度	反应时间
150~200	94℃	15 min, 4℃ hold
200~300	94℃	10 min, 4℃ hold
300~400	94℃	6 min, 4℃ hold
400~500	94℃	5 min, 4℃ hold

注意: 选择插入片段大小150~200bp范围时, 后续实验无需片段分选, 文库在预计大小范围内有相对较窄的峰, 如需插入片段范围大于200 bp, 则在文库富集前需要进行片段分选步骤, 具体操作步骤参见下文文库片段筛选步骤。

反应结束后将产物迅速置于冰上，立即进行第一链cDNA的合成反应。从片段化到第一链cDNA合成过程中不可停留，RNA在该体系下容易降解。

二、第一链cDNA合成

1. 将1st Strand Enzyme Mix从-30~-15℃取出，轻弹混匀，在PCR管中建立如下反应体系，并用移液器轻轻吹打10次充分混匀：

组分名称	体积 (μl)
片段化的RNA样本	10
1st Strand Enzyme Mix	1.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	8.5
Total	20

注意：如同时进行多个样品反应，可预先在合适的离心管中配制1st Strand Enzyme Mix和Nuclease-Free ddH₂O的混合液，再分装到各个反应管中，建议按照实际反应数的1.1倍配制预混液。

2. 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应，PCR仪热盖温度设定为80℃：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	25℃	10 min
2	42℃	15 min
3	70℃	15 min
4	4℃	hold

注意：反应结束后立即进行cDNA第二链的合成反应。

三、第二链cDNA合成

1. 将2nd Strand Buffer和2nd Strand Enzyme Mix从-30~-15℃取出，置于冰上融化。2nd Strand Enzyme Mix 融化后用手指轻弹后混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。在PCR管中建立如下反应体系，并用移液器轻轻吹打10次充分混匀：

组分名称	体积 (μl)
合成的第一链cDNA	20
2nd Strand Buffer	8.5
2nd Strand Enzyme Mix	3.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	48
Total	80

2. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应，PCR仪热盖温度设定为≤40℃：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	16℃	60 min
2	4℃	hold

注意：反应结束后，cDNA第二链的合成产物可在4℃暂存1小时，但是建议反应结束后即进行下一步纯化步骤。

四、双链cDNA纯化

向上述反应产物（80 μl）中加入1.8×体积（144 μl）TIANSeq Size Selection DNA Beads（NG306）磁珠进行纯化，具体步骤如下：

1. 将磁珠置于室温平衡20 min。
2. 涡旋使磁珠充分悬浮，加入144 μl磁珠至步骤三、2的cDNA双链合成产物溶液中，用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
3. 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。
4. 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30sec后，用移液器小心吸弃上清。
5. 重复步骤4一次。
6. 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后可瞬时离心，用10 μ l移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

7. 将PCR管从磁力架中取出，加入37.5 μ l Nuclease-Free ddH₂O 进行洗脱，使用移液器吹打10次充分混匀。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移35 μ l上清至新的离心管中，用于后续实验。

注意：转移上清时切勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量。此步纯化产物可在-20°C存放。

五、末端修复/dA添加

1. 将10 \times ERA Buffer和5 \times ERA Enzyme Mix 从-30~-15°C取出置于冰上融化。5 \times ERA Enzyme Mix 融化后用手指轻弹后混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。在PCR管中建立如下反应体系，并用移液器轻轻吹打10次充分混匀：

组分名称	体积 (μ l)
cDNA 样本	35
10 \times ERA buffer	5
5 \times ERA Enzyme Mix	10
Total	50

注意：此步骤需要保持在冰浴中进行。如同时进行多个样品反应，可预先在合适的离心管中配制10 \times ERA buffer和5 \times ERA Enzyme Mix的混合液，再分装到各个反应管中，建议按照实际反应数的1.1倍配制预混液

2. 在4°C预冷的PCR仪中进行如下反应，PCR仪热盖温度设置为70°C。

操作步骤	温度	时间
1	4°C	1 min
2	20°C	30 min
3	65°C	30 min
4	4°C	hold

3. 反应程序结束后，将反应产物置于冰上，立即进入接头连接步骤。

六、接头连接

1. 将Adapter，5 \times Ligation Buffer和TIANSeq DNA Ligase 从-30~-15°C取出置于冰上融化，TIANSeq DNA Ligase融化后用手指轻弹后混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。根据下表推荐将接头稀释至相应浓度：

Total RNA (ng)	接头浓度
1000 - 250	1.5 μ M
249 - 100	300 nM
99 - 10	75 nM

注意：如果是细菌RNA，因为不同菌种的RNA表达丰度差异较大，可以在上表基础上适当降低接头浓度避免出现接头二聚体。

2. 按下表在PCR管中建立如下反应体系，并用移液器轻轻吹打10次充分混匀：

组分名称	体积 (μ l)
dA-Tailing产物	50
Adapter	5
5 \times Ligation Buffer	20
TIANSeq DNA Ligase	10
Nuclease-Free ddH ₂ O	15
Total	100

注意：本试剂盒中不含测序 Adapter，推荐配合TIANSeq Single-Index Adapter (Illumina) (NG214) 使用，详见产品说明书。根据RNA的起始样本量，将接头稀释至对应浓度，参照上表反应体系加入对应体积稀释后的接头。此步骤需要保持在冰浴中进行。如同时进行多个样品反应，可预先在合适的离心管中配制5 \times Ligation Buffer, TIANSeq DNA Ligase和Nuclease-Free ddH₂O的混合液，再分装到各个反应管中，建议按照实际反应数的1.1倍配制预混液。

3. 在PCR仪中进行如下反应，PCR仪热盖温度设定为 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ 。

操作步骤	温度	时间
1	20 $^{\circ}\text{C}$	15 min
2	4 $^{\circ}\text{C}$	保持温度

4. 连接产物纯化及片段大小分选

该步骤提供两种备选方案。方案（一）为经过一轮磁珠纯化后无需分选，该方案适合构建插入片段为150~200 bp的文库，由于经过94 $^{\circ}\text{C}$ ~15 min 的片段化条件，可有效获得150~200 bp的插入片段，并去除接头残留；方案（二）为经过一轮磁珠纯化后，再进行两轮分选，根据不同的分选条件，可得到200 bp以上不同的插入片段，并去除接头残留，此方案中片段分选推荐配合TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306) 进行。

方案（一）：获得插入片段长度为150~200bp的文库，所需纯化方法如下：

向上述接头连接产物 (100 μ l) 中加入1 \times 体积 (100 μ l) TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306) 磁珠进行纯化，具体步骤如下：

- (1) 将磁珠置于室温平衡20 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入100 μ l磁珠至接头连接产物溶液中，用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- (3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μ l（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。
- (5) 重复步骤(4)一次。
- (6) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后可瞬时离心，使用移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

- (7) 将PCR管从磁力架中取出，加入22.5 μ l 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打10次充分混匀。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移20 μ l上清至新的离心管中，用于后续PCR富集实验。

注意：转移上清时切勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量。

方案（二）：获得插入片段长度为大于200bp的文库，所需纯化方法如下：

1. 纯化连接产物，所需步骤如下：

向上述接头连接产物（100 μ l）中加入1 \times 体积（100 μ l）TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306) 磁珠进行纯化，具体步骤如下：

- (1) 将磁珠置于室温平衡20 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入100 μ l磁珠至接头连接产物溶液中，用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- (3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μ l（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。
- (5) 重复步骤(4)一次。
- (6) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后可瞬时离心，使用移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

(7) 将PCR管从磁力架中取出，加入102.5 μ l Nuclease-Free ddH₂O 进行洗脱，使用移液器吹打10次充分混匀。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移100 μ l上清至新的离心管中，用于后续的片段分选。

注意：转移上清时请勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量

2. 两轮片段分选（以插入片段200~300 bp为例，其他长度请根据表一选择相应的磁珠使用量），所需方法如下：

表一：不同插入片段大小的分选条件

插入片段长度 (bp)	200~300	300~400	400~500
文库长度(bp)	320~420	420~520	520~620
片段化条件	94°C-10 min	94°C-6 min	94°C-5 min
第一次筛选磁珠比例	0.6×	0.57×	0.47×
第二次筛选磁珠比例	0.1×	0.1×	0.1×

向上述接头连接纯化产物（100 μ l）中加入0.6 \times 体积（60 μ l）的TIANSeq Size Selection DNA Beads（NG306）磁珠进行筛选纯化，具体步骤如下：

- (1) 将磁珠置于室温平衡20 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入60 μ l磁珠至接头连接纯化产物溶液中，用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- (3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心转移上清液至一个新的含有0.1 \times 体积（10 μ l）磁珠的离心管中并立即吹打混匀至少10次。转移上清时注意不要吸到磁珠。
- (4) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器吸弃上清。
- (5) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μ l（没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30 sec后，用移液器小心吸弃上清。
- (6) 重复步骤(5)一次。
- (7) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后可瞬时离心，使用移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

(8) 将PCR管从磁力架中取出，加入22.5 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打10次充分混匀。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移20 μl 上清至新的离心管中，用于后续的PCR富集实验。

注意：转移上清时切勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量。此步纯化产物可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

七、文库富集

1. 将2 \times HiFi PCR Master Mix和P5/P7 Primers Mix从-30~-15 $^{\circ}\text{C}$ 取出置于冰上融化。2 \times HiFi PCR Master Mix融化后用手指轻弹颠倒混匀，不要涡旋。其余试剂可短暂涡旋混匀。在PCR管中建立如下反应体系，并用移液器轻轻吹打10次充分混匀：

组分名称	体积 (μl)
纯化的接头连接产物	20
2 \times HiFi PCR Master Mix	25
P5/P7 Primers Mix	5
Total	50

2. 在PCR仪中进行文库富集反应，PCR仪热盖温度设定为105 $^{\circ}\text{C}$ ：

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
1	98 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1
2	98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec	8~16*
3	60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
4	72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
5	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min	1
6	4 $^{\circ}\text{C}$	hold	1

*注：请根据总RNA的质量 (RIN \geq 7.0) 和上样量确定PCR循环数。经过片段大小筛选步骤后，对于1000 ng起始总RNA，PCR富集时需要扩增10~12个循环、对于100 ng起始总RNA，需要扩增13~15个循环，对于10 ng起始总RNA，PCR富集时需要扩增15~16个循环。如果不经片段大小筛选，可适当减少1-2个循环。

3. PCR产物纯化

向上述反应产物 (50 μl) 中加入1 \times 体积 (50 μl) TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306) 磁珠进行纯化，具体步骤如下：

- (1) 将磁珠置于室温平衡20 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入50 μl 磁珠至PCR产物溶液中，用移液器轻轻吸打10次充分混匀。
- (3) 室温孵育5 min后，将反应管置于磁力架上5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上，用200~500 μl （没过磁珠即可）80%乙醇（现用现配）洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打3~5次（不要吹散磁珠）。磁力架上静置30sec后，用移液器小心吸弃上清。
- (5) 重复步骤(4)一次。
- (6) 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置5~10 min或至磁珠干燥为止。

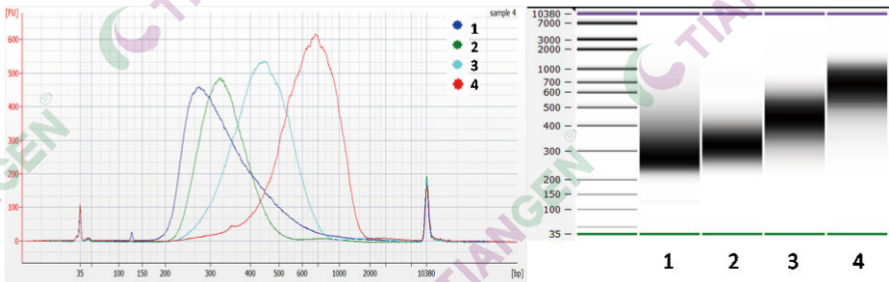
注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后可瞬时离心，使用移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

- (7) 将PCR管从磁力架中取出，加入22.5 μl 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行洗脱，使用移液器吹打10次充分混匀。室温静置5 min后，置于磁力架上5min，待磁珠完全贴壁后，转移20 μl 上清至新的离心管中。

注意：转移上清时切勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量。

4. 用Agilent 2100 Bioanalyzer 评价文库质量 (Agilent High Sensitivity Chip)

将所得文库适当稀释，取1 μl 用于Agilent 2100 Bioanalyzer分析 (Agilent High Sensitivity Chip)，良好的文库在预计的大小范围内会有一个比较集中的峰，如图1所示。如果在120 bp左右出现峰，则提示文库中存在adapter-dimer污染，此时将文库加入Nuclease-free ddH₂O稀释至50 μl ，重复PCR产物纯化步骤即可有效去除污染。



文库大小：1, 270-320 bp; 2, 320-420 bp; 3, 420-570 bp; 4, 570-670 bp

图1. 200 ng Rat reference RNA，四种不同片段化条件，根据不同比例进行片段分选后结果。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- NGS文库构建系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品