

版本号: NR210831

TIANSeq Stranded RNA-Seq Kit (illumina)

TIANSeq定向 RNA文库构建试剂盒 (illumina平台)

目录号: NR103

产品内容

产品组成	NR103-01 (24 rxn)	NR103-02 (96 rxn)
Frag/1st Strand Buffer	120 μ l	480 μ l
RNA Synthesis Inhibitor (5 mg/ml)	24 μ l	96 μ l
1st Strand Enzyme Mix	40 μ l	160 μ l
2nd Strand Labeling 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
Heat-labile UDG	24 μ l	96 μ l
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 Stranded RNA-Seq Kit (Illumina)是针对Illumina高通量测序平台开发的链特异性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去除rRNA的总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1 ng。

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1 ng起始的动、植物及真菌的mRNA。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq rRNA Depletion Kit (H/M/R) (NR101)
2. TIANSeq Single-Index Adapter (Illumina) (NG214)
3. TIANSeq Size Selection DNA Beads (NG306)

产品特点

1. 可针对mRNA和除rRNA外的非编码RNA（如lncRNA）进行链特异性文库构建。
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，可用于低至1ng mRNA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的样本量, 确保样本起始量在1~100ng。

注意: 确定去除rRNA的总RNA或mRNA上样量至关重要。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。rRNA去除推荐配合使用TIANSeq rRNA Depletion Kit (H/R/M) (NR101)

(二) 试验步骤

将Frag/1st Strand Buffer 从-20℃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150~200 bp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. 稀释RNA Synthesis Inhibitor 至0.5 mg/ml：稀释的RNA Synthesis Inhibitor 对光非常敏感，并且会吸附于塑料和玻璃的表面。请根据实验反应数（1 μ l/反应）稀释适当体积并立刻使用，未用完的RNA Synthesis Inhibitor 稀释液应丢弃。

稀释前请将RNA Synthesis Inhibitor (5 mg/ml)解冻并短暂涡旋混匀后离心至管底，10 μ l 稀释液的制备体系如下：

组分名称	体积 (μ l)
RNA Synthesis Inhibitor (5 mg/ml)	1
Nuclease-Free ddH ₂ O	9
Total	10

2. 将1st Strand Enzyme Mix从-20 $^{\circ}$ C取出置于冰上，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 (μ l)
片段化的RNA样本	10
RNA Synthesis Inhibitor (0.5 mg/ml)	1
1st Strand Enzyme Mix	1.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	7.5
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。

3. 在PCR仪中进行第一链cDNA合成反应，PCR仪热盖温度设定为80 $^{\circ}$ C：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	25 $^{\circ}$ C	10 min
2	42 $^{\circ}$ C	15 min
3	70 $^{\circ}$ C	15 min
4	4 $^{\circ}$ C	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 Labeling Buffer和2nd Strand Enzyme Mix从-20℃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 Labeling 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磁珠至操作三步骤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 $^{\circ}$ C存放。

五、末端修复/dA添加

1. 将10 \times ERA Buffer和5 \times ERA Enzyme Mix 从-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C预冷的PCR仪中进行如下反应，PCR仪热盖温度设置为70 $^{\circ}$ C。

操作步骤	温度	时间
1	4 $^{\circ}$ C	1 min
2	20 $^{\circ}$ C	30 min
3	65 $^{\circ}$ C	30 min
4	4 $^{\circ}$ 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-20 $^{\circ}$ 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。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150~200bp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 μl 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 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 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 μl ）中加入1 \times 体积（100 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100 μl 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 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21.5 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19 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°C存放。

七、文库富集

1. 将2×HiFi PCR Master Mix和P5/P7 Primers Mix从-20°C取出置于冰上融化。2×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	19
2×HiFi PCR Master Mix	25
P5/P7 Primers Mix	5
Heat-labile UDG	1
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°C：

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
1	37°C	15 min	1
2	98°C	2 min	1
3	98°C	20 sec	10~17*
4	60°C	30 sec	
5	72°C	30 sec	
6	72°C	1 min	1
7	4°C	hold	1

*注意：请根据总RNA的质量和上样量确定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12~13个循环、对于100 ng起始总RNA，需要扩增14~15个循环，对于10 ng起始总RNA，PCR富集时需要扩增16~17个循环。如果不经过片段大小筛选，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×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。

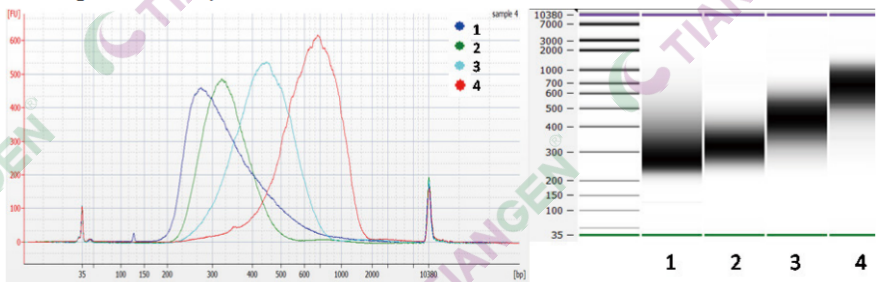
注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后可瞬时离心，使用移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

- (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120bp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. 200ng 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