



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



Order: 010-59822688
 Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057
 TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: NG180604

浓缩国际权威精华, 铸就TIANGEN优秀品质!

TIANSeq RNA Frag/cDNA Synthesis Module

TIANSeq RNA片段化及cDNA合成模块

目录号: NG308

产品内容

产品组成	NG308-01 (24 rxn)	NG308-02 (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
Nuclease-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml	8 \times 1 ml

保存条件

请将试剂盒置于-15~-25 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。保质期为一年。

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
- 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

产品简介

TIANSeq RNA Frag/cDNA Synthesis Module是匹配illumina高通量测序平台下非定向RNA文库构建中RNA的片段化及cDNA合成的模块，进行双链cDNA的合成反应。

本试剂盒适用的起始样本既可为从总RNA中去除rRNA的RNA，也可为从总RNA中直接分离获得的mRNA。本试剂盒包括RNA片段化及第一链、第二链cDNA合成的全套酶和反应缓冲液，精心优化的反应体系具有高效的逆转录活性及cDNA合成效率，并具有良好的实验兼容性。

适用范围：适用于illumina高通量测序平台RNA文库构建中RNA的片段化及双链cDNA的合成反应。

适用样本量：10 ng~1 μ g的总RNA 或低至1ng的mRNA样本。

推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq核糖体RNA去除试剂盒（人/小鼠/大鼠）（NR101）
2. TIANSeq RNA纯化磁珠（NG307）
3. TIANSeq DNA片段分选磁珠（NG306）

产品特点

样本广泛：既可针对mRNA，也可针对去除rRNA的RNA进行片段化及双链cDNA合成；

高效转化：优化的反应体系保证产品的稳定性及高效的双链cDNA合成效率；

操作简便：集成化的反应流程，简化操作步骤；

兼容性好：试剂盒反应产物双链cDNA经纯化可直接用于RNA-Seq文库的构建。

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RNase的枪头、离心管进行试验；
3. 试验开始前，请清洁操作台，并使用RNase清除试剂，如RNase Away（Molecular BioProducts, Inc）处理台面，确保没有RNase的污染；
4. 试验前请仔细阅读说明书，可暂停步骤需按照说明书操作进行样品保存；
5. 建议使用RIN值 \geq 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，否则会影响后需的RNA片段化及cDNA合成效率。

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°C 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。rRNA 去除推荐配合使用 TIANSeq 核糖体 RNA 去除试剂盒 (人 / 小鼠 / 大鼠) (NR101)

(二) 试验步骤

将 Frag/1st Strand Buffer 从 -20°C 取出, 解冻后轻弹混匀。在 PCR 管中建立如下反应体系, 用移液器轻轻吹打充分混匀, 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, PCR 热盖温度设定为 105°C。

插入片段大小 (bp)	反应温度	反应时间
150~200	94°C	15 min, 4°C hold
200~300	94°C	10 min, 4°C hold
300~450	94°C	8 min, 4°C hold
450~550	94°C	5 min, 4°C hold

* 注意: 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 -20°C 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 热盖温度设定为 105°C：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	25°C	10 min
2	42°C	15 min
3	70°C	15 min
4	4°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 Buffer 和 2nd Strand Enzyme Mix 从 -20°C 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 热盖温度设定为 ≤40°C：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	16°C	60 min
2	4°C	hold

* 注意：反应结束后，cDNA 第二链的合成产物可在 4°C 暂存 1 小时，但是建议反应结束后立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 DNA 片段分选磁珠 (NG306) 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 磁珠至上述的 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，使 DNA 充分结合到磁珠上，再将反应管置于磁力架上约 5 min。待溶液澄清后 (约 3~5 min)，用移液器小心吸弃上清。
4. 样品始终置于磁力架上，向反应管内加入 200 μl 新鲜配制的 80% 乙醇 (现用现配)，用移液器轻轻吹打漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，移液器小心吸弃上清。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 反应管始终置于磁力架上，室温开盖放置 5~10 min，干燥磁珠。
7. 加入 37.5 μl Nuclease-free H₂O 至离心管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静置 2 min，再将反应管放置于磁力架上 1~2 min，待溶液澄清后，转移 35 μl 上清至新的离心管中，用于后续实验。

* 注意：加入 80% 乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后需要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从而降低回收效率。

* 注意：转移上清时切勿吸取磁珠，此步纯化产物可在 -20°C 存放。