



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
- 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



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

版本号: NR180418

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)	NR101-02 (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-25~-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，可用于常规转录组分析及lncRNA等非编码RNA的分析。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1ng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) (NG214-01/02/03)
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。

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，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 (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，用移液器轻轻吹打漂洗磁珠，室温孵育30sec，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。

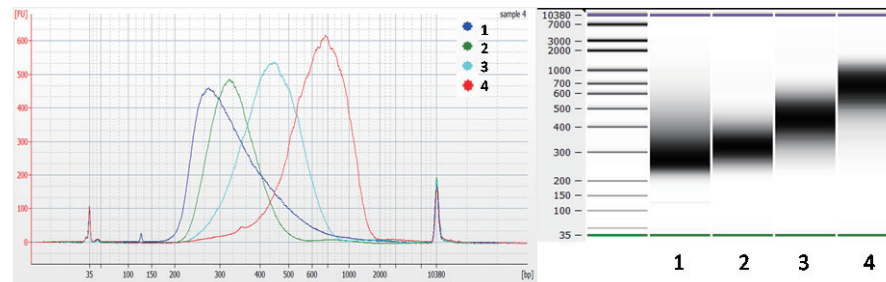
注意：加入80%乙醇漂洗磁珠时不要吹散磁珠；两次洗涤后需要使用移液器尽量吸尽残留的上清液；切勿过分干燥磁珠造成龟裂而降低回收效率。

- (7) 加入32.5 µl 10 mM Tris-HCl(pH8.0)至离心管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静止2min，再将反应管放置于磁力架上1~2 min，待溶液澄清后，转移30 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128bp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 H₂O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，根据表一不同比例进行片段分选后结果

(8) 加入22.5 μ l 10mM Tris-HCl (pH8.0) 至离心管内, 使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮, 室温静止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。此步纯化产物可在-20 $^{\circ}$ C存放。

七、文库富集

1. 将2 \times HiFi PCR Master Mix和P5/P7 Primers Mix从-20 $^{\circ}$ C 取出, 冰上解冻后轻弹混匀, 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 (μ l)
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热盖温度设定为105 $^{\circ}$ C:

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
1	98 $^{\circ}$ C	2 min	1
2	98 $^{\circ}$ C	20 sec	6-12
3	60 $^{\circ}$ C	30 sec	
4	72 $^{\circ}$ C	30 sec	
5	72 $^{\circ}$ C	1 min	1
6	4 $^{\circ}$ C	hold	1

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 $^{\circ}$ 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1~100 ng。

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

1. 将Frag/1st Strand Buffer 从-20 $^{\circ}$ 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 (μ l)
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 $^{\circ}$ C	15 min, 4 $^{\circ}$ C hold
200~300	94 $^{\circ}$ C	10 min, 4 $^{\circ}$ C hold
300~450	94 $^{\circ}$ C	8 min, 4 $^{\circ}$ C hold
450~550	94 $^{\circ}$ C	5 min, 4 $^{\circ}$ C 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, mRNA在该体系下容易降解。

二、第一链cDNA合成

1. 将1st Strand Enzyme Mix从-20℃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℃：

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2st Strand Buffer和2st Strand Enzyme Mix从-20℃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
2st Strand Buffer	8.5
2st Strand Enzyme Mix	3.5
Nuclease-Free ddH ₂ O	48
Total	80

(7) 加入52.5 μl 10mM Tris-HCl (pH8.0) 至离心管内，使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮，室温静止2min，再将反应管放置于磁力架上1~2 min，待溶液澄清后，转移50 μl上清至新的离心管中。

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	300~450	450~550
文库长度(bp)	320~420	420~570	570~670
片段化条件	94℃-10 min	94℃-8 min	94℃-5 min
第一次筛选磁珠体积	30 μl (0.6×)	25 μl (0.5×)	20 μl (0.4×)
第二次筛选磁珠体积	7.5 μl (0.1×)	7.0 μl (0.1×)	6.5 μl (0.1×)

向上述接头连接纯化产物 (50 μl) 中加入0.6×体积 (30 μl) 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30 μl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，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 (3~5 min)，用移液器小心转移上清液75μl至一个新的离心管中。
- (4) 加入转移上清体积 (75 μl) 0.1×的磁珠7.5 μl，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 (3~5 min)，用移液器小心吸弃上清。
- (5) 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，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。
- (6) 重复步骤 (5)一次。
- (7) 反应管始终置于磁力架上，室温开盖放置5~10 min，干燥磁珠。

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而降低回收效率。

(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(3~5min), 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 μ l新鲜配制的80%乙醇, 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。

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而降低回收效率。

(7) 加入22.5 μ l 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 至离心管内, 使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮, 室温静止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)中, 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80 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, 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(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 μ l新鲜配制的80%乙醇, 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。

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而降低回收效率。

2. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应, PCR热盖温度设定为 $\leq 40^{\circ}\text{C}$:

反应步骤	反应温度	反应时间
1	16 $^{\circ}\text{C}$	60 min
2	4 $^{\circ}\text{C}$	hold

注意: 反应结束后, cDNA第二链的合成产物可在4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μ l)中加入1.8 \times 体积(144 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144 μ l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, 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(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 μ l新鲜配制的80%乙醇, 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。

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而降低回收效率。

7. 加入37.5 μ l Nuclease-free H₂O至离心管内, 使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮, 室温静止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 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 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

五、末端修复/dA添加

1. 将10×ERA Buffer和5×ERA Enzyme Mix 从-20℃取出置于冰上融化，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)
cDNA 样本	35
10×ERA buffer	5
5×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×ERA buffer和5×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℃预冷的PCR仪中进行如下反应，PCR热盖温度设置为70℃。

操作步骤	温度	时间
1	4℃	1 min
2	20℃	30 min
3	65℃	30 min
4	4℃	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×Ligase Buffer和TIANSeq DNA Ligase 从-20℃取出置于冰上融化，轻弹混匀，按下表在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)
dA-Tailing产物	50
Adapter	5
5×Ligase 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NG214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×Ligase 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。

2. 在PCR仪中进行如下反应，PCR热盖温度设置为≤40℃。

操作步骤	温度	时间
1	20℃	15 min
2	4℃	hold

3. 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℃~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 μl) 中加入1×体积 (100μl) 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80 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。