

版本号: NR240905

# TIANSeq Universal RNA Library kit

## TIANSeq通用型RNA文库构建试剂盒

目录号: NR122

### 产品内容

产品组成	NR122-01 (8 rxn)	NR122-02 (24 rxn)	NR122-03 (96 rxn)
4×Frag Buffer1	40 µl	120 µl	480 µl
1st Strand Enzyme Mix	20 µl	60 µl	240 µl
1st Strand Buffer1	60 µl	180 µl	720 µl
2nd Strand Buffer3	240 µl	720 µl	2×1440 µl
2nd Strand Enzyme Mix2	40 µl	120 µl	480 µl
TIANSeq DNA Ligase1	40 µl	120 µl	480 µl
4×Ligation Buffer	200 µl	600 µl	2×1200 µl
2×HiFi PCR Master Mix-V1	200 µl	600 µl	4×600 µl
P5/P7 Primers Mix (10 µM each)	40 µl	120 µl	480 µl
Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	2×1 ml	8×1 ml

### 储存条件

请将试剂盒置于-30~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

---

## 产品简介

TIANSeq Universal RNA Library Kit是兼容illumina和MGI高通量测序平台所优化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，一链合成后，双链cDNA、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、基本无碱基偏好性。

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和它的非编码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  $\mu$ g；mRNA样本的起始模板量低至100 pg。

适用样本量：10 ng-1  $\mu$ g的总RNA；低至（100 pg）起始的动、植物及真菌的mRNA。

## 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，基本不存在碱基偏好性。

## 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 $\geq 7.0$ 、完整性较好的高质量的RNA样本进行rRNA去除或mRNA的分离，否则会影响建库质量。

## 操作步骤

### 一、RNA片段化

#### (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500 pg-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。

#### (二) 试验步骤

将4×Frag Buffer1从-20°C取出，解冻后充分混匀。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	15
4×Frag Buffer1	5
Total	20

##### (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
180~200	94°C	8 min, 4°C hold
200~300	94°C	5 min, 4°C hold
250~450	86°C	6 min, 4°C hold
450~550	86°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和1st Strand Buffer1从-20°C取出，充分混匀。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	20
1st Strand Enzyme Mix	2.5
1st Strand Buffer1	7.5
Total	30

**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预混液，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85°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下步反应。

### 三、第二链cDNA合成、末端修复与dA添加

1. 将2nd Strand Buffer3和2nd Strand Enzyme Mix2从-20°C取出，充分混匀。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	30
2nd Strand Buffer3	30
2nd Strand Enzyme Mix2	5
Total	65

2. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应，PCR热盖温度设定为85°C。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	16°C	30 min
2	65°C	15 min
3	4°C	Hold

**注意：**反应结束后立即进行下步连接步骤。

### 四、接头连接

1. 将Adapter, 4×Ligation Buffer和TIANSeq DNA Ligase1 从-20°C取出置于冰上融化，充分混匀。根据下表推荐将接头稀释至相应浓度：

Total RNA (ng)	纯化的mRNA	接头工作液浓度
1000	10 ng	1 μM
500	5 ng	0.8 μM
10-100	0.1-1 ng	0.5 μM

**注意：**本试剂盒中不含DNA文库制备测序接头 (Adapter)，请根据测序平台类型和实验需求选择合适的接头，具体的使用体系请参考接头供应商提供的使用条件。使用完整长度的文库测序接头，如TIANSeq Dual-Index Adapter (Illumina) (客户自备，TIANGEN，目录号：NG216)，进行后续文库PCR富集时，可搭配本试剂盒提供的P5/

P7 Primers Mix (10  $\mu\text{M}$  each) 使用；使用非完整长度的文库测序接头，进行后续文库富集时，请使用接头中所搭配的文库PCR富集Primers，如使用TIANSeq Dual-Index Adapter (MGI) (客户自备, TIANGEN, 目录号: NG230)，可搭配其中的Index PCR Mix。为了达到较高的连接效率，我们推荐反应体系中DNA片段与adapter的摩尔比在1: 200至1: 10之间。下表列举了不同建库DNA投入量下推荐的Adapter使用量。

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充分混匀。

组分名称	体积 ( $\mu\text{l}$ )
dA-Tailing产物	65
Adapter	5
4×Ligation Buffer	25
TIANSeq DNA Ligase 1	5
Total	100

注意：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预混液，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热盖温度设置为 $\leq 40^\circ\text{C}$ 。

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

4. 连接产物纯化及片段大小分选。

a. 纯化连接产物，推荐使用TIANSeq Size Selection DNA Beads (客户自备, TIANGEN, 目录号: NG316)，向上述接头连接产物 (100  $\mu\text{l}$ ) 中加入0.45×体积 (45  $\mu\text{l}$ ) 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45  $\mu\text{l}$ 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，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  $\mu\text{l}$ 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2-5 min，直至磁珠干燥。

**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) 如果不需要片段分选，加入22.5  $\mu$ l Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O至离心管内并使用移液器轻轻吸打磁珠至充分悬浮。室温静置5 min后，将反应管放置于磁力架上5 min，使磁珠完全贴壁后，转移约20  $\mu$ l上清至新的离心管中，用于后续的PCR富集实验。若需要片段分选，加入102.5  $\mu$ l Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O进行洗脱。并转移约100  $\mu$ l上清至新的离心管中，用于后续的DNA片段长度分选。

**注意：转移上清时请勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量。**

b. 两轮片段分选（以插入片段300 bp为例，其它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	250-350	350-450	450-550
片段化条件	94°C-5 min	86°C-6 min	86°C-6 min	86°C-5 min
第一次筛选磁珠比例	0.7 $\times$	0.65 $\times$	0.6 $\times$	0.55 $\times$
第二次筛选磁珠比例	0.15 $\times$	0.15 $\times$	0.15 $\times$	0.1 $\times$

向上述接头连接纯化产物（100  $\mu$ l）中加入0.65 $\times$ 体积（65  $\mu$ l）的磁珠进行筛选纯化，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65  $\mu$ 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，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，用移液器小心转移上清液至一个新的离心管中。
- (4) 向上清液中加入0.15 $\times$ （15  $\mu$ l）的磁珠，用移液器轻轻吸打10次充分混匀。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，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  $\mu$ 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。
- (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2-5 min，直至磁珠干燥。

**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) 加入22.5  $\mu\text{l}$  Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O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5 min，再将反应管放置于磁力架上5 min，待溶液澄清后，转移20  $\mu\text{l}$ 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°C存放。**

## 五、文库富集

1. 将2×HiFi PCR Master Mix-V1置于冰上融化，2×HiFi PCR Master Mix-V1用手指轻弹混匀。
2. 按下表设置PCR仪反应程序，开启热盖，温度设置为105°C。

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
1	98°C	45 sec	1
2	98°C	15 sec	10-18
3	60°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	1 min	1
6	4°C	hold	1

**注意：请根据RNA的质量 (RIN $\geq$ 7.0) 和上样量确定PCR循环数。对于1000 ng起始RNA，PCR富集时需要扩增10-11个循环、对于500 ng起始RNA，需要扩增12-13个循环，对于100 ng起始RNA，需要扩增14-15个循环，对于10 ng起始RNA，PCR富集时需要扩增16-18个循环。**

3. 按照下表配制PCR体系，注意此步骤需于冰浴中操作。

组分名称	体积 ( $\mu\text{l}$ )
2×HiFi PCR Master Mix-V1	25
Primer Mix	5
总体积	30

**注意：Primer Mix针对不同测序平台和不同接头类型，需选用与平台对应的Adapter和Primer Mix。使用illumina测序平台完整长度的文库测序接头，如TIANSeq Dual-Index Adapter (Illumina) (客户自备，TIANGEN，目录号：NG216)，进行后续文库PCR富集时，可搭配本试剂盒提供的P5/P7 Primers Mix (10  $\mu\text{M}$  each) 使用；使用非完整长度的文库测序接头，进行后续文库富集时，请使用接头中所搭配的文库PCR富集Primers，如使用TIANSeq Dual-Index Adapter (MGI) (客户自备，TIANGEN，目录号：NG230)，可搭配其中的Index PCR Mix。**



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

4. 将纯化后的带有adapter的文库连接产物20  $\mu\text{l}$ 转移至PCR管中，加入30  $\mu\text{l}$ 步骤3中配制好的PCR反应液，轻柔吸打8-10次混匀。

**注意：配制反应体系时，请全程将反应管置于冰上进行操作。**

5. 瞬时离心后将PCR反应管置于PCR仪内，按步骤2反应程序进行扩增。

6. PCR产物纯化

当PCR样品温度降至4 $^{\circ}\text{C}$ ，将PCR产物取出。使用0.9 $\times$ 体积（45  $\mu\text{l}$ ）TIANSeq Size Selection DNA Beads（客户自备，TIANGEN，目录号：NG316）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45  $\mu\text{l}$ 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，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  $\mu\text{l}$ 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2-5 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) 加入22.5  $\mu\text{l}$  Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O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5 min，再将反应管放置于磁力架上5 min，待溶液澄清后，转移20  $\mu\text{l}$ 上清至新的离心管中。此步纯化产物可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

**注意：转移上清时切勿吸取磁珠，以免影响后续文库质量。**

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