



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: NR251024

- 将纯化后的带有adapter的文库连接产物20  $\mu$ l转移至PCR管中，加入30  $\mu$ 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。

- 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℃，将PCR产物取出。使用0.9×体积（45  $\mu$ 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：

- 将磁珠置于室温平衡20 min。
- 涡旋使磁珠充分悬浮，加入45  $\mu$ l磁珠至PCR产物溶液中，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。
- 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。
- 重复步骤（4）一次。
- 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。
- 加入22.5  $\mu$ 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  $\mu$ l上清至新的离心管中。此步纯化产物可在-20℃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。

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

## 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<br>(8 rxn) | NR122-02<br>(24 rxn) | NR122-03<br>(96 rxn) |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| 4×Frag Buffer1                      | 40 $\mu$ l          | 120 $\mu$ l          | 480 $\mu$ l          |
| 1st Strand Enzyme Mix               | 20 $\mu$ l          | 60 $\mu$ l           | 240 $\mu$ l          |
| 1st Strand Buffer1                  | 60 $\mu$ l          | 180 $\mu$ l          | 720 $\mu$ l          |
| 2nd Strand Buffer3                  | 240 $\mu$ l         | 720 $\mu$ l          | 2×1.44 ml            |
| 2nd Strand Enzyme Mix2              | 40 $\mu$ l          | 120 $\mu$ l          | 480 $\mu$ l          |
| TIANSeq DNA Ligase1                 | 40 $\mu$ l          | 120 $\mu$ l          | 480 $\mu$ l          |
| 4×Ligation Buffer                   | 200 $\mu$ l         | 600 $\mu$ l          | 2×1.2 ml             |
| 2×HiFi PCR Master Mix-V1            | 200 $\mu$ l         | 600 $\mu$ l          | 4×600 $\mu$ l        |
| P5/P7 Primers Mix (10 $\mu$ M each) | 40 $\mu$ l          | 120 $\mu$ l          | 480 $\mu$ l          |
| 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 µg；mRNA样本的起始模板量低至100 pg。

适用样本量：10 ng-1 µg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≥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。

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 µl 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 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。此步纯化产物可在-20℃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℃。

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

注意：请根据RNA的质量（RIN≥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 (µl) |
|--------------------------|---------|
| 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 and 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 µM 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。

(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 µl 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 µl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 µl Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O进行洗脱。并转移约100 µl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×       | 0.65×      | 0.6×       | 0.55×      |
| 第二次筛选磁珠比例   | 0.15×      | 0.15×      | 0.15×      | 0.1×       |

向上述接头连接纯化产物（100 µl）中加入0.65×体积（65 µl）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 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，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×（15 µl）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 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

## 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℃。

| 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℃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℃。

| 反应步骤 | 反应温度 | 反应时间   |
|------|------|--------|
| 1    | 16℃  | 30 min |
| 2    | 65℃  | 15 min |
| 3    | 4℃   | 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℃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 μM 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 (μl) |
|---------------------|---------|
| dA-Tailing产物        | 65      |
| Adapter             | 5       |
| 4×Ligation Buffer   | 25      |
| TIANSeq DNA Ligase1 | 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≤40℃。

| 操作步骤 | 温度  | 时间     |
|------|-----|--------|
| 1    | 20℃ | 15 min |
| 2    | 4℃  | 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 μl）中加入0.45×体积（45 μl）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 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，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 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。
- (5) 重复步骤（4）一次。