

TransNGS[®] Fast RNA-Seq Library Prep Kit for Illumina[®]

快速RNA文库构建试剂盒 适配illumina平台

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 6.0



目录号: KP701

保存: -18℃及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS[®] Fast RNA-Seq Library Prep Kit for Illumina[®]是针对Illumina高通量测序平台开发的专用于构建链特异性或非链特异性转录组文库的试剂盒。适用样品为0.1 ng-100 ng处理后的RNA (经mRNA磁珠捕获得到的mRNA或者经rRNA去除后得到的RNA) 构建成高质量的测序文库, 得到的文库产量高、信息完整。本试剂盒一步完成二链合成、末端修复与加A反应, 中间不需要纯化步骤, 极大地简化了操作流程, 缩短了建库时间, 可在3个小时内完成高质量测序文库的构建。

特点

- 产品中无放线菌素D, 无需避光, 无毒操作, 链特异性比率更高。
- 高文库转化率, 高文库产量, 高数据质量。

适用范围

- 全转录组测序
- 基因表达分析
- 单核苷酸变异分析
- 可变剪接检测
- 融合基因检测
- 非编码 RNA 和 RNA 前体分析

试剂盒组成

Component	KP701-01(12 rxns)	KP701-02(96 rxns)
1×RNA Fragmentation Buffer II	220 μl	2×900 μl
Library First-Strand Buffer IV	84 μl	672 μl
Library First-Strand Enzyme Mix III	24 μl	192 μl
Library SEA Buffer IV (dUTP)	300 μl	4×600 μl
Library SEA Buffer IV (dNTP)	300 μl	4×600 μl
Library SEA Enzyme Mix III	180 μl	2×720 μl
<i>TransNGS</i> [®] Adapter for Illumina [®] (16 μM)	60 μl	480 μl
Adapter Dilution Buffer	600 μl	5 ml
Adapter Ligation Buffer V	300 μl	4×600 μl
Adapter Ligation Enzyme IV	60 μl	480 μl
<i>TransNGS</i> [®] Library Amplification SuperMix II (2×)	300 μl	4×600 μl
<i>TransNGS</i> [®] Universal Primer for Illumina	60 μl	480 μl
RNase-free Water	2×1 ml	3×5 ml

注: *TransNGS*[®] Adapter for Illumina (16 μM) 和*TransNGS*[®] Universal Primer for Illumina均不含Index, 不可同时使用, 需分别与含Index的primer (如 KI241/KI251) 或含Index的adapter (如KI341/KI351) 搭配使用。



起始材料要求

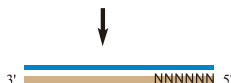
Total RNA定量推荐使用基于特异识别RNA的荧光染料法，如Qubit等。为保证建库成功率，建议使用RIN值 ≥ 8 的Total RNA进行mRNA捕获（推荐使用*MagicPure*[®] mRNA Kit，目录号：EC511）或者使用RIN值 > 7 的Total RNA进行rRNA Depletion（推荐使用*TransNGS*[®] Ribo-Cap rRNA Depletion Kit (Bacteria/Animal/Plant)，目录号：KD211/KD311/KD411）。

文库构建原理示意图及流程图

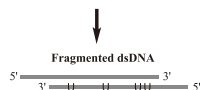
1. RNA片段化



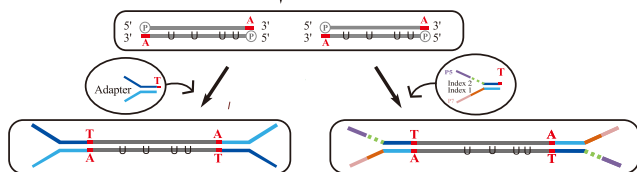
2. 一链合成



3. 二链合成、末端修复与加A



4. 接头连接



5. 去除U链

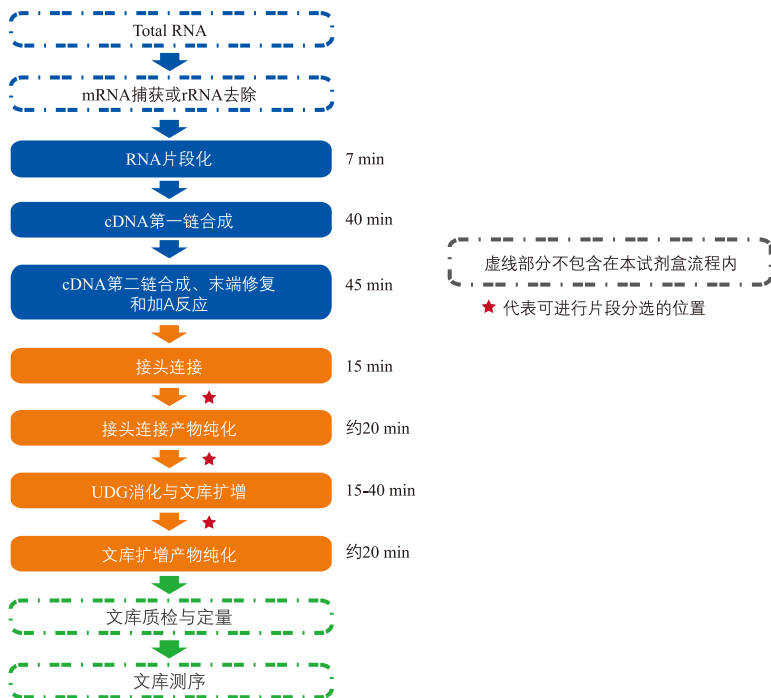


6. 文库扩增



链特异性文库构建原理示意图
(非链特异性文库二链合成时无dUTP掺入，无UDG酶消化的步骤)





链特异性文库构建流程图
(非链特异性文库二链合成时无dUTP掺入, 无UDG酶消化的步骤)

文库结构

本试剂盒使用TransNGS® Index Primers (384) Kit for Illumina® (目录号: KI241), 或TransNGS® UDI Primers (96) Kit for Illumina® (目录号: KI251), 或TransNGS® 96 UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI341), 或TransNGS® 384 UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI351), 所得文库结构如下:

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-XX
XXXXXX-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[i7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
i5: Index 2, 8 bases; i7: Index 1, 8 bases; -XXXXXXXX-: 插入序列。

推荐自备试剂

- MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)。
- TransNGS® Index Primers (384) Kit for Illumina® (目录号: KI241), 或TransNGS® UDI Primers (96) Kit for Illumina® (目录号: KI251), 或TransNGS® 96 UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI341), 或TransNGS® 384 UDI Indexed Adapter Kit for Illumina® (目录号: KI351)。
- 新鲜配制的80%乙醇等。



操作步骤

1、RNA片段化

- (1) 在mRNA捕获或rRNA去除后，将18 μ l 1 $\times$ RNA Fragmentation Buffer加到去上清的磁珠富集产物内，涡旋混匀。
- (2) 将反应管置于PCR仪中，进行以下RNA片段化程序（热盖温度105 $^{\circ}$ C），最终得到250 -450 bp的插入片段。

Temperature	Time
85 $^{\circ}$ C	6 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

*如果想获得其他长度的插入片段，片段化条件如下表：

插入片段长度	温度	时间
150-250 bp	94 $^{\circ}$ C	8 min
450-550 bp	85 $^{\circ}$ C	5 min

- (3) 样品温度降到4 $^{\circ}$ C后立即取出样品。针对带磁珠的片段化产物，将样品置于磁力架5分钟后，小心吸取16 μ l 上清至一个新的RNase-free PCR管中，并立刻进行第一链cDNA合成反应。此步骤不建议暂停。

2、cDNA第一链合成

- (1) 将上一步反应结束的PCR管置于冰上，加入以下体系。

Component	Volume
Fragmented RNA	16 μ l
Library First-Strand Buffer IV	7 μ l
Library First-Strand Enzyme Mix III	2 μ l
Total volume	25 μ l

- (2) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。
- (3) 将反应管置于PCR仪中，进行以下第一链合成程序（热盖温度 $\geq$ 85 $^{\circ}$ C）：

Temperature	Time
25 $^{\circ}$ C	10 min
42 $^{\circ}$ C	15 min
70 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

3、cDNA第二链合成、末端修复与加A反应

- (1) 将上一步反应结束的PCR管置于冰上，加入以下体系：

Component	链特异性文库	非链特异性文库
First-Strand Product	25 μ l	25 μ l
Library SEA Buffer IV (dUTP)	25 μ l	-
Library SEA Buffer IV (dNTP)	-	25 μ l
Library SEA Enzyme Mix III	15 μ l	15 μ l
Total volume	65 μ l	65 μ l



- (2) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。
- (3) 将反应管置于PCR仪中，进行以下第二链合成程序（热盖温度 $\geq 85^{\circ}\text{C}$ ）：

Temperature	Time
16 $^{\circ}\text{C}$	30 min
65 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

4、接头连接

- (1) 冰上溶化含Index的Adapter（如KI341/KI351）或不含Index的TransNGS[®] Adapter for Illumina[®]（16 μM ），并参考下表准备合适浓度的Adapter，使用Adapter Dilution Buffer进行稀释。

Total RNA输入量	Adapter稀释倍数
1 μg - 5 μg	不稀释
200 ng - 999 ng	稀释3倍
50 ng - 199 ng	稀释10倍

*请根据需求选择Adapter。如需在接头连接中加入index，请使用含index的Adapter（如KI341/KI351）；如需在文库扩增中加入index，请使用不含index的TransNGS[®] Adapter for Illumina[®]。Adapter的质量和用量直接影响建库效率和质量，建议使用本公司的Adapter产品。提高Adapter加入量可一定程度上提高文库产出，但是过高会导致Adapter残留，形成二聚体；加入量不足则影响连接效率从而导致文库质量较差。

- (2) 将上一步反应结束的PCR管置于冰上，依次加入以下体系：

Component	Volume
ds-cDNA	65 μl
合适浓度的Adapter	5 μl
Adapter Ligation Buffer V	25 μl
Adapter Ligation Enzyme IV	5 μl
Total volume	100 μl

*切勿将Adapter与Adapter Ligation Buffer V和Adapter Ligation Enzyme IV提前混匀。

- (3) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。
- (4) 将反应管置于PCR仪中，进行以下接头连接反应程序（热盖关闭）：

Temperature	Time
20 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

5、接头连接产物纯化

推荐含Index的接头连接产物使用0.6 $\times$ MagicPure[®] Size Selection DNA Beads（目录号：EC401）进行产物纯化；不含Index的接头连接产物使用0.8 $\times$ MagicPure[®] Size Selection DNA Beads进行产物纯化。

*如RNA输入量较少，或RNA完整度较低，推荐连接产物直接分选（不进行纯化），分选条件见步骤6.2。

- (1) 从2-8 $^{\circ}\text{C}$ 取出磁珠，室温静置30分钟后备用。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取60 μl 磁珠(0.6 $\times$) 或80 μl 磁珠(0.8 $\times$) 加入上步产物中。
- (3) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。



(4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

(5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 μ l 新鲜配制的80% 乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒。弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(6) 重复步骤(5) 一次。

(7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。

*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(8) 将反应管移出磁力架，加入105 μ l RNase-free Water。移液器吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

(9) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(10) 小心吸取100 μ l 洗脱液转移到干净PCR管中，进行分选，或于-20℃保存。

注意：低浓度DNA不稳定，建议立即进行分选与扩增，不建议-20℃保存。

6.1、接头连接产物纯化后分选 (接步骤5)

推荐使用MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号：EC401) 进行产物分选。分选比例与对应的文库长度见下表。

长接头连接产物分选条件				
产物平均长度 (bp)	~ 380	~ 430	~ 480	~ 530
插入片段长度 (bp)	~ 250	~ 300	~ 350	~ 400
第一次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.70×	0.65×	0.60×	0.55×
第二次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.15×	0.15×	0.15×	0.15×

短接头连接产物分选条件				
产物平均长度 (bp)	~ 310	~ 360	~ 410	~ 460
插入片段长度 (bp)	~ 250	~ 300	~ 350	~ 400
第一次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.75×	0.70×	0.65×	0.60×
第二次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.15×	0.15×	0.15×	0.15×

现以文库长度~430 bp 的分选条件为例来说明 (推荐长接头文库使用如下分选比例)。

(1) 从2-8℃取出磁珠，室温静置30 分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取65 μ l 磁珠(0.65×) 加入到上步100 μ l 产物中。

(3) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。

(4) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约5分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。小心转移160 μ l 上清到干净的PCR管中。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终的分选效果。

(5) 在上清中重新加入15 μ l 磁珠 (0.15×)。

(6) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。



- (7) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约5分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。
- (8) 保持PCR管在磁力架上，向管中加入200 μl 新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

- (9) 重复步骤(8) 一次。

- (10) 保持PCR管在磁力架上，室温晾干磁珠。

*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

- (11) 将PCR管移出磁力架，加入22 μl RNase-free Water。吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

- (12) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约3分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟。

- (13) 小心吸取19 μl 或者20 μl 洗脱液转移到干净PCR管中，进行下一步文库扩增反应，或于-20℃保存。

6.2、接头连接产物直接分选（接步骤4）

如RNA输入量较少，或RNA完整度较低，推荐连接产物不纯化直接分选。以此方法分选建库的主峰大小无显著差别，产量显著提升，峰型略宽。现以文库长度~430 bp 的分选条件为例来说明。

- (1) 从2-8℃取出磁珠，室温静置30分钟后备用。

- (2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取25 μl 磁珠 (0.25 $\times$) 到接头连接产物中。

- (3) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。

- (4) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，取122 μl 上清到新的PCR管中，弃磁珠。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终的分选效果。

- (5) 在上清中重新加入15 μl 磁珠 (0.15 $\times$)。

- (6) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。

- (7) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约5分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

- (8) 保持PCR管在磁力架上，向管中加入200 μl 新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

- (9) 重复步骤(8) 一次。

- (10) 保持PCR管在磁力架上，室温晾干磁珠。

*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

- (11) 将PCR管移出磁力架，加入22 μl RNase-free Water。吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

- (12) 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟。

- (13) 小心吸取19 μl 或者20 μl 洗脱液转移到干净PCR管中，进行下一步文库扩增反应，或于-20℃保存。

7、文库扩增

- (1) 请根据需要配制文库扩增体系。当使用含index的adapter (如KI341/351) 时，按下表加入：

Component	Volume
上步纯化产物	20 μl
TransNGS® Library Amplification SuperMix II (2 $\times$)	25 μl
TransNGS® Universal Primer for Illumina	5 μl
Total volume	50 μl



当使用不含index的TransNGS® Adapter for Illumina时，需搭配含index的i5/i7 primer (KI241/KI251)，按下表加入：

Component	Volume
上步纯化产物	20 µl
TransNGS® Library Amplification SuperMix II (2×)	25 µl
i5 primer*	2.5 µl
i7 primer*	2.5 µl
Total volume	50 µl

*TransNGS® Index Primers (384) Kit for Illumina® (目录号：KI241) 提供16种i5 primer和24种i7 primer；
TransNGS® UDI Primers (96) Kit for Illumina® (目录号：KI251) 提供96种UDI primers，请根据需要自行选择。

(2) 移液器吹吸混匀数次，点甩离心收集管壁上的液体。

(3) PCR仪中进行以下扩增程序 (热盖温度105℃)：

98℃	45 sec	} 10-16 cycles*
98℃	15 sec	
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	1 min	
4℃	Hold	

*针对不同RNA起始投入量，推荐扩增循环数如下表。请根据建库的物种和RNA完整度适当调整循环数。

Total RNA起始量	链特异性文库	非链特异性文库
1 µg	11-12 cycles	10-11 cycles
200 ng	13-14 cycles	12-13 cycles
50 ng	15-16 cycles	14-15 cycles

8、文库扩增产物纯化

推荐使用0.9×MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号：EC401) 进行产物纯化，可以根据需要增大(获得含更短插入片段的文库) 或者减小磁珠比例(减少引物残留) 。

使用0.9×磁珠纯化的具体操作如下：

- (1) 从2-8℃取出磁珠，室温静置30分钟后备用。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取45 µl 磁珠(0.9×) 加入上步产物中。
- (3) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。
- (4) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。



(5) 保持反应管在磁力架上，向管中加入200 μ l 新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(6) 重复步骤(5) 一次。

(7) 保持反应管在磁力架上，室温晾干磁珠。

*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(8) 将反应管移出磁力架，加入22 μ l RNase-free Water。移液器吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

*如文库需长时间保存，建议使用 0.1 $\times$ TE 溶液进行洗脱。

(9) 将反应管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约2分钟)。使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(10) 小心吸取20 μ l 洗脱液转移到干净1.5 ml离心管中，产物可于-20 $^{\circ}$ C保存。

9、文库扩增产物分选 (可选)

对于低起始量或低质量RNA，也可以考虑在文库扩增后进行片段分选。推荐使用MagicPure[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化。根据6.1步表格的分选条件，以文库长度~480 bp 的分选条件为例来说明 (推荐长接头文库使用如下分选比例) 。

(1) 从2-8 $^{\circ}$ C取出磁珠，室温静置30 分钟后备用。

(2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取60 μ l 磁珠(0.60 $\times$) 到PCR管中，将上步产物用RNase-free Water稀释至100 μ l 后加入。

(3) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。

(4) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约5分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。取 155 μ l 上清到新的 PCR 管中，弃磁珠。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终的分选效果。

(5) 在上清中重新加入15 μ l 磁珠 (0.15 $\times$) 。

(6) 移液器充分吹吸混匀，室温静置5分钟。

(7) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约5分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

(8) 保持PCR管在磁力架上，向管中加入200 μ l 新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。

*一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

(9) 重复步骤(8) 一次。

(10) 保持PCR管在磁力架上，室温晾干磁珠。

*晾干至磁珠失去光泽但未开裂为宜；切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(11) 将PCR管移出磁力架，加入22 μ l RNase-free Water。吹吸或涡旋充分混匀磁珠，室温静置2分钟。

(12) 将PCR管置于磁力架上，室温静置约3分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

*管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至5分钟。

(13) 小心吸取20 μ l 洗脱液转移到干净1.5 ml离心管中，产物可于-20 $^{\circ}$ C保存。

10、文库质量检测



片段化合适的文库主峰应在350-470 bp之间，如图1所示。如果在135 bp左右出现尖峰 (adapter-dimer污染)，需用0.8×*MagicPure*® Size Selection DNA Beads (目录号：EC401)将文库产物再次纯化，将文库用 RNase-free Water稀释到50 µl后，纯化方法参照步骤8的 (2)-(10)，纯化后可再用进行峰型检测。

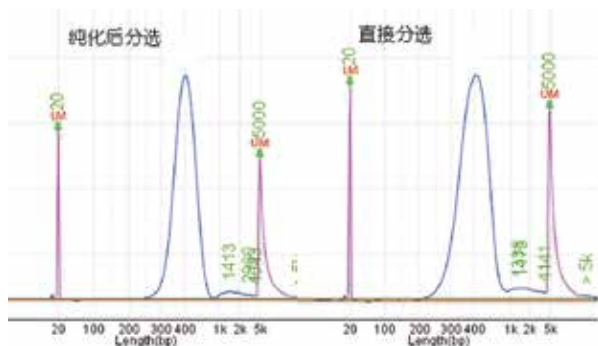


图1 文库片段长度分布示意图

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V6-202504

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

