

TransNGS® Fast RNA-Seq Library Prep Kit for MGI®

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 3.0



目录号: KP801

保存: -20℃保存一年。

产品说明

TransNGS® Fast RNA-Seq Library Prep Kit for MGI® 是针对MGI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,极大的简化了操作流程,缩短了建库时间,可在3个小时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
- 可变剪切检测
- 融合基因检测
- 非编码 RNA 和 RNA 前体分析

试剂盒组成

Component	KP801-01 (12 rxns)	KP801-02 (96 rxns)
1×RNA Fragmentation Buffer	230 µl	2×890 µl
Library First-Strand Buffer III	75 µl	580 µl
Library First-Strand Enzyme Mix II	24 µl	192 µl
Library SEA Buffer III (dUTP)	300 µl	4×600µl
Library SEA Buffer III (dNTP)	300 µl	4×600µl
Library SEA Enzyme Mix II	120 µl	960 µl
Adapter Dilution Buffer	600 µl	5 ml
Adapter Ligation Buffer IV	360 µl	4×720 µl
Adapter Ligation Enzyme III	60 µl	480 µl
<i>TransNGS</i> ® Library Amplification SuperMix (2×)	300 µl	4×600 µl
<i>TransNGS</i> ® Universal Primer for MGI	60 µl	480 µl
RNase-free Water	2×1 ml	3×5 ml

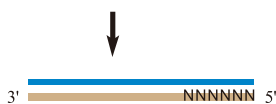


文库构建原理示意图及流程图

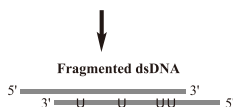
1. RNA片段化



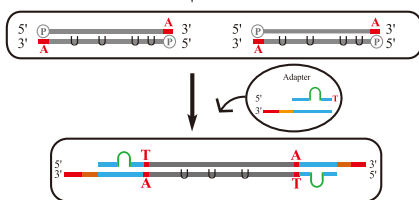
2. 一链合成



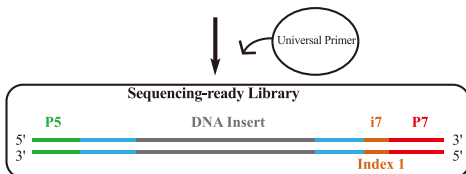
3. 二链合成、末端修复与加A



4. 接头连接

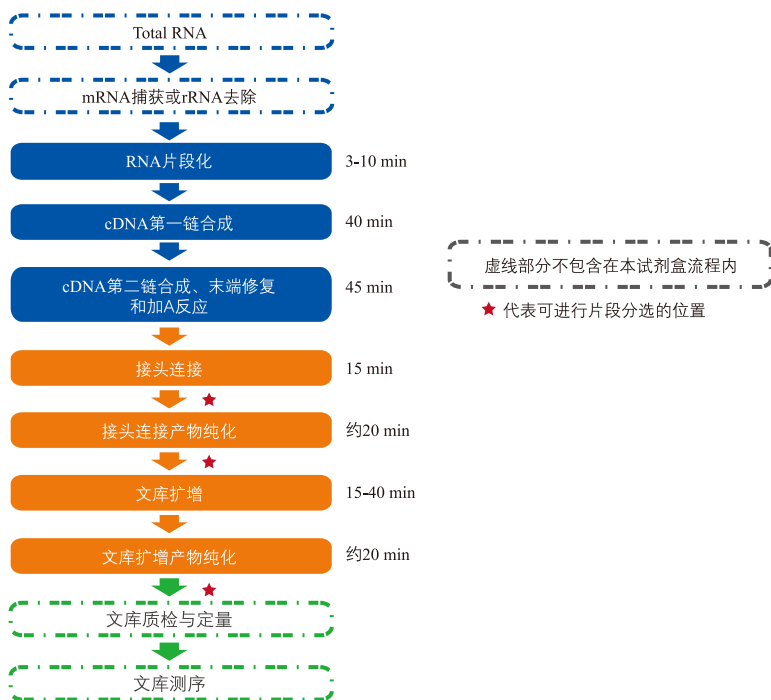


5. 文库扩增 (非含U链)



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)





转录组文库构建流程图

文库结构

本试剂盒使用 *TransNGS*[®] Indexed Adapter Kit for MGI[®] (目录号: KI401), 所得单 Barcode 文库结构如下:
 5'-GAACGACATGGCTACGATCCGACTT-XXXXXXXX-AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAA
 [i7]CAACTCCTTGGCTCACA-3'

i7: Index 1, 10 bases;

-XXXXXXXX-: 插入序列。

起始样品要求

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 捕获或者使用 RIN 值 > 7 的 Total RNA 进行 rRNA Depletion。

文库构建

自备试剂: 新鲜配制的 80% 乙醇, *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401), *TransNGS*[®] Indexed Adapter Kit for MGI[®] (目录号: KI401)。



1、RNA 片段化

- (1) 在 mRNA 捕获或 rRNA 去除后,将 18.5 μl 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, 进行以下孵育步骤 (热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$):

RNA 片段化程序 (插入片段 250 bp-350 bp) 如下:

Temperature	Time
94 $^{\circ}\text{C}$	7 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

如果想获得其它长度的插入片段, 片段化条件如下表:

插入片段长度	温度	时间
150-250 bp	94 $^{\circ}\text{C}$	8-10 min
250-450 bp	94 $^{\circ}\text{C}$	3-7 min

- (3) 样品温度降到 4 $^{\circ}\text{C}$ 后立即取出样品, 立刻进行第一链 cDNA 合成反应, **不建议暂停**。

* 针对含磁珠的片段化的操作, 待样品温度降到 4 $^{\circ}\text{C}$ 后立即取出样品, 置于磁力架 5 分钟, 小心吸取 17 μl 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, **不建议暂停**。

2、cDNA 第一链合成

- (1) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上, 依次加入

Component	Volume
Fragmented RNA	17 μl
Library First-Strand Buffer III	6 μl
Library First-Strand Enzyme Mix II	2 μl
Total volume	25 μl

- (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, 进行以下孵育步骤 (热盖温度 $\geq 85^{\circ}\text{C}$), 第一链合成程序如下:

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

反应完成后取出样品并置于冰上, 建议立刻进行下步操作。

3、cDNA 第二链合成、末端修复与加 A 反应

- (1) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上, 依次加入

Component	链特异性文库	非链特异性文库
First-Strand Product	25 μl	25 μl
Library SEA Buffer III (dUTP)	25 μl	-
Library SEA Buffer III (dNTP)	-	25 μl
Library SEA Enzyme Mix II	10 μl	10 μl
Total volume	60 μl	60 μl

- (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，进行以下孵育步骤（热盖温度 $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ），第二链合成程序如下：

Temperature	Time
16 $^{\circ}\text{C}$	30 min
72 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

4. 接头连接

(1) 冰上溶化 *TransNGS*[®] Indexed Adapter for MGI[®]，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	稀释 5 倍
200 ng-999 ng	稀释 10 倍
50 ng-199 ng	稀释 25 倍

Adapter 的质量和用量直接影响建库的效率和质量。建议使用 TransGen 的 Adapter。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 或 Adapter dimer 的残留（可通过纯化或分选去除）；加入量不足则影响连接效率从而导致文库质量较差（如插入片段自连导致嵌合体的形成）。

(2) 将上步反应结束的 PCR 管置于冰上，依次加入

Component	Volume
上步反应产物	60 μl
合适浓度的 Adapter	5 μl
Adapter Ligation Buffer IV	30 μl
Adapter Ligation Enzyme III	5 μl
Total volume	100 μl

建议先将 Adapter 与上步反应产物混匀，再加入 Adapter Ligation Buffer IV 与 Adapter Ligation Enzyme III 的混合液。

(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，20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。连接产物可立即进行纯化，或于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5. 接头连接产物纯化

推荐使用 0.6 $\times$ *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads（目录号：EC401）进行产物纯化。

注：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 $\times$) 加入上步产物中。

(3) 移液器吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(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。

注意：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 μl 新鲜配制的 80% 乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒。弃上清。

注意：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。

注意：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 μl 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。



注意：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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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。根据下表的分选条件，以文库长度 480 bp 的分选条件为例进行分选。

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 $\times$	0.65 $\times$	0.60 $\times$	0.55 $\times$
第二次体积比 (DNA Beads : DNA)	0.15 $\times$	0.15 $\times$	0.15 $\times$	0.15 $\times$

(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 (0.6 $\times$) 到加入上步产物中。

(3) 吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(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 155 μ l 上清到新的 PCR 管中**，弃磁珠。

注意：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) 吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(7) 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，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。

注意：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。

注意：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。

注意：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。

(13) 小心吸取 20 μ l 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 $^{\circ}$ C 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，推荐连接产物直接分选（不进行纯化）。

步骤 4 的连接产物直接分选（不进行纯化），需调整分选条件，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，以文库长度 430 bp 的分选条件为例，具体分选操作如下：

(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 25 μ l 磁珠 (0.25 $\times$) 到接头连接产物中。



(3) 吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(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 μ l 上清到新的 PCR 管中**，弃磁珠。

注意：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) 吹吸混匀，室温静置 5 分钟。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

(7) 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，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。

注意：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。

注意：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。

注意：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。

(13) 小心吸取 20 μ l 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 $^{\circ}$ C 保存。

7、文库扩增

(1) 将无菌 PCR 管放在冰上，依次加入

Component	Volume
上步纯化产物	20 μ l
TransNGS [®] Library Amplification SuperMix (2 $\times$)	25 μ l
TransNGS [®] Universal Primer for MGI	5 μ l
Total volume	50 μ l

(2) 移液器吹吸混匀，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 $^{\circ}$ C**）

98 $^{\circ}$ C	3 min	} 10-16 cycles*
98 $^{\circ}$ C	10 sec	
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	3 min	
4 $^{\circ}$ C	Hold	

* 针对不同的 RNA 起始样品量，扩增循环数如下表：

Total RNA 起始量	推荐扩增循环数	
	链特异性文库	非链特异性文库
1 μ g	11-12	10-11
200 ng	13-14	12-13
50 ng	15-16	14-15



8、文库扩增产物纯化

推荐使用 $0.9\times$ MagicPure® Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行产物纯化, 可根据需要增大 (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 $0.9\times$ 磁珠纯化的具体操作如下:

(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 $45\ \mu\text{l}$ 磁珠 ($0.9\times$) 加入上步产物中。

(3) 移液器吹吸混匀, 室温静置 5 分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(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。

注意: 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 $200\ \mu\text{l}$ 新鲜配制的 80% 乙醇, 不要吹吸磁珠, 室温静置 30 秒, 弃上清。

注意: 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。

注意: 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 $22\ \mu\text{l}$ 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。

注意: 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 $20\ \mu\text{l}$ 洗脱液转移到干净 $1.5\ \text{ml}$ 离心管中, 产物可于 -20°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, 亦可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 的分选条件为例进行分选。

(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 $60\ \mu\text{l}$ 磁珠 ($0.6\times$) 到 PCR 管中, 将上步产物用 RNase-free Water 稀释至 $100\ \mu\text{l}$ 后加入。

(3) 吹吸混匀, 室温静置 5 分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(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 $155\ \mu\text{l}$ 上清到新的 PCR 管中, 弃磁珠。

注意: 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 $15\ \mu\text{l}$ 磁珠 ($0.15\times$)。

(6) 吹吸混匀, 室温静置 5 分钟。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(7) 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, 弃上清。

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

注意: 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。

注意：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。

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

(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。

注意：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。

(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°C 保存。

10、文库质量检测

建议使用 Qubit 等进行浓度检测，使用生物分析仪（如 Agilent 2100、Qsep 等）进行片段长度分布检测。

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 82 bp 左右出现尖峰（adapter-dimer 污染），需用 $0.9\times$ 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 μ l 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。

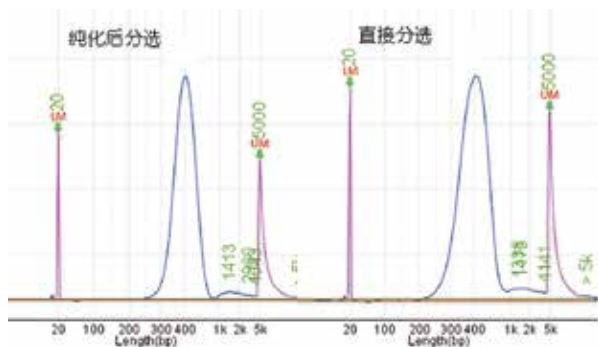


图 1 文库片段长度分布示意图

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V3-202403

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

