*Trans*NGS® Fast RNA-Seq Library Prep Kit for MGI®
快速RNA文库构建试剂盒 适配MGI平台

使用前请仔细阅读说明书

北京全式金生物技术股份有限公司
www.transgen.com
trans@transgen.com
+86-400 898 0321
北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

目录号： KP801

版本号： Version 4.0

保存： -18度及其以下温度保存一年。

产品说明

*Trans*NGS® 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

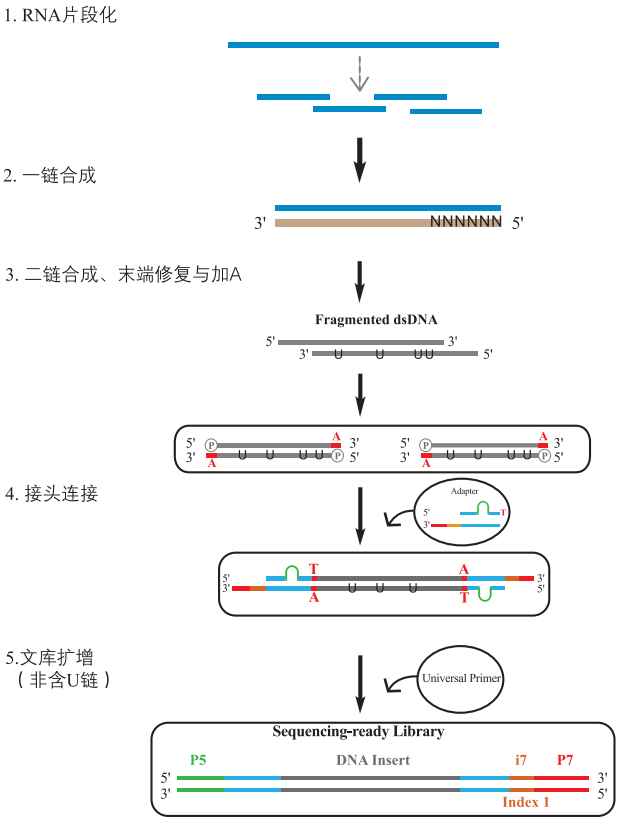
适用范围

- 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

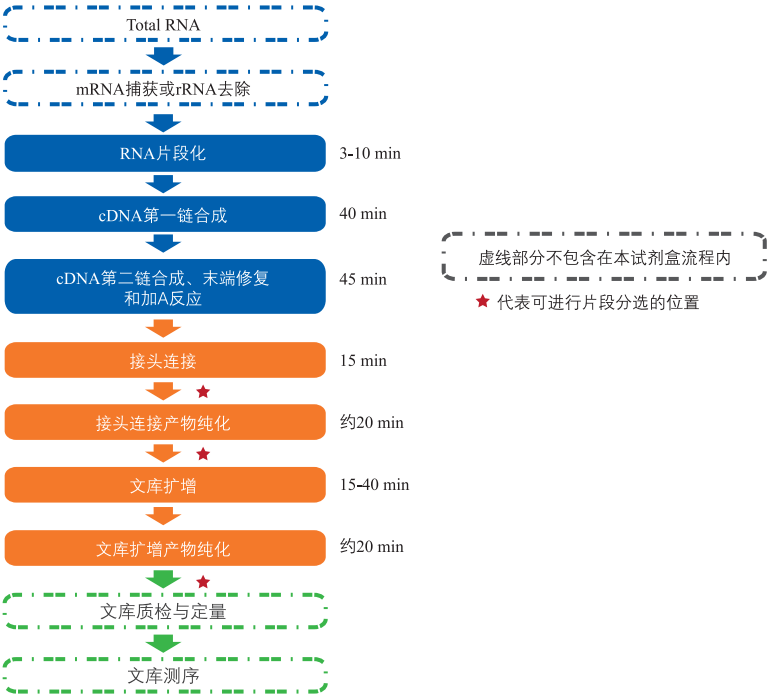
试剂盒组成

Component	KP801-01 (12 rxns)	KP801-02 (96 rxns)
1×RNA Fragmentation Buffer 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	4×600µl
Library SEA Buffer IV (dNTP)	300 µl	4×600µl
Library SEA Enzyme Mix III	180 µl	2×720 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
*Trans*NGS® Library Amplification SuperMix II (2×)	300 µl	4×600 µl
*Trans*NGS® 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



链特异性文库构建原理示意图
（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*Trans*NGS® 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），*Trans*NGS® 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 μl 1×RNA Fragmentation Buffer II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℃)：

RNA片段化程序(插入片段250 bp-450 bp)如下：

Temperature	Time
85℃	6 min
4℃	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℃	8 min
450-550 bp	85℃	5 min

(3) 样品温度降到4℃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℃后立即取出样品，置于磁力架5分钟，小心吸取16 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	16 μl
Library First-Strand Buffer IV	7 μl
Library First-Strand Enzyme Mix III	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≥85℃**)，第一链合成程序如下：

Temperature	Time
25℃	10 min
42℃	15 min
70℃	15 min
4℃	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 IV (dUTP)	25 μl	-
Library SEA Buffer IV (dNTP)	-	25 μl
Library SEA Enzyme Mix III	15 μl	15 μl
Total volume	65 μl	65 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≥80℃**)，第二链合成程序如下：

Temperature	Time
16℃	30 min
65℃	15 min
4℃	Hold

4、 接头连接

(1) 冰上溶化*Trans*NGS® 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**
50 ng-199 ng	稀释25倍
200 ng-999 ng	稀释10倍
1 μg-5 μg	稀释5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	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

建议先将 Adapter 与上步反应产物混匀，再加入Adapter Ligation Buffer V与Adapter Ligation Enzyme IV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℃孵育15分钟。连接产物可立即进行纯化，或于-20℃保存。

5、 接头连接产物纯化

推荐使用0.6×*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℃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×)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 μl 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。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)	~ 330	~ 380	~ 430	~ 480
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×

(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60 μl磁珠(0.6×)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 μl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 μl磁珠(0.15×)。

(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 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。

(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 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。

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 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℃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×)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 ul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 μl磁珠(0.15×)。

(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 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。

(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 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。

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 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) 将无菌PCR管放在冰上，依次加入

Component	Volume
上步纯化产物	20 μl
*Trans*NGS® Library Amplification SuperMix II (2×)	25 μl
*Trans*NGS® Universal Primer for MGI	5 μl
Total volume	50 μl

(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℃**)

98℃	45 sec	
98℃	15 sec	10-16 cycles*
60℃	30 sec	
72℃	30 sec	
72℃	1 min	
4℃	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 μg	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×*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×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22 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20 μl洗脱液转移到干净1.5 ml离心管中，产物可于-20℃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℃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×)到PCR管中，将上步产物用RNase-free Water稀释至100 μl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 μl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 μl磁珠(0.15×)。

(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 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。

(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 μl 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× 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 μl洗脱液转移到干净1.5 ml离心管中，产物可于-20℃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×*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。

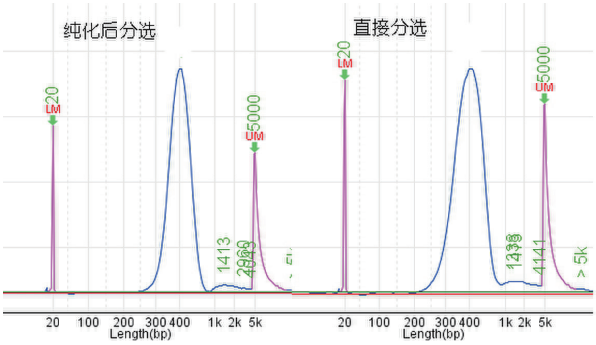


图1 文库片段长度分布示意图

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号：V4-202505
服务电话 +86-10-57815020
服务邮箱 complaints@transgen.com