

版本号: NG210831

## TIANSeq RNA Frag/cDNA Synthesis Module

### TIANSeq RNA片段化及cDNA合成模块

目录号: NG308

#### 产品内容

产品组成	NG308-01 (24 rxn)	NG308-02 (96 rxn)
Frag/1st Strand Buffer	120 $\mu$ l	480 $\mu$ l
1st Strand Enzyme Mix	40 $\mu$ l	160 $\mu$ l
2nd Strand Buffer	240 $\mu$ l	960 $\mu$ l
2nd Strand Enzyme Mix	90 $\mu$ l	360 $\mu$ l
Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> O	2 $\times$ 1 ml	8 $\times$ 1 ml

#### 保存条件

请将试剂盒置于-30~-15 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。保质期为一年。

---

## 产品简介

TIANSeq RNA Frag/cDNA Synthesis Module是匹配illumina高通量测序平台下非定向RNA文库构建中RNA的片段化及cDNA合成的模块，进行双链cDNA的合成反应。

本试剂盒适用的起始样本既可为从总RNA中去除rRNA的RNA，也可为从总RNA中直接分离获得的mRNA。本试剂盒包括RNA片段化及第一链、第二链cDNA合成的全套酶和反应缓冲液，精心优化的反应体系具有高效的逆转录活性及cDNA合成效率，并具有良好的实验兼容性。

适用范围：适用于illumina高通量测序平台RNA文库构建中RNA的片段化及双链cDNA的合成反应。

适用样本量：10 ng~1 µg的总RNA；低至（500 pg）起始的动、植物及真菌的mRNA。

## 推荐使用的其他试剂

1. TIANSeq核糖体RNA去除试剂盒（人/小鼠/大鼠）（NR101）
2. TIANSeq RNA纯化磁珠（NG307）
3. TIANSeq DNA片段分选磁珠（NG306）

## 产品特点

**样本广泛：**既可针对mRNA，也可针对去除rRNA的RNA进行片段化及双链cDNA合成；

**高效转化：**优化的反应体系保证产品的稳定性及高效的双链cDNA合成效率；

**操作简便：**集成化的反应流程，简化操作步骤；

**兼容性好：**试剂盒反应产物双链cDNA经纯化可直接用于RNA-Seq文库的构建。

## 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RNase的枪头、离心管进行试验；
3. 试验开始前，请清洁操作台，并使用RNase清除试剂，如RNase Away（Molecular BioProducts, Inc）处理台面，确保没有RNase的污染；
4. 试验前请仔细阅读说明书，可暂停步骤需按照说明书操作进行样品保存；
5. 建议使用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，否则会影响后需的RNA片段化及cDNA合成效率。

## 操作步骤

### 一、RNA 片段化及随机引物结合

#### (一) 试验准备:

1. 将去除 rRNA 的总 RNA 或 mRNA 样品从  $-80^{\circ}\text{C}$  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 1~100ng。

**注意:** 确定去除 rRNA 的总 RNA 或 mRNA 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 Frag/1st Strand Buffer 从  $-30\sim-15^{\circ}\text{C}$  取出置于冰上, 解冻后涡旋混匀, 在 PCR 管中建立如下反应体系, 用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀, 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 ( $\mu\text{l}$ )
去除 rRNA 的总 RNA 或 mRNA	5
Frag/1st Strand Buffer	5
Total	10

2. 按照下表选择片段化条件, PCR 热盖温度设定为  $105^{\circ}\text{C}$ 。

插入片段大小 (bp)	反应温度	反应时间
150~200	$94^{\circ}\text{C}$	15 min, $4^{\circ}\text{C}$ hold
200~300	$94^{\circ}\text{C}$	10 min, $4^{\circ}\text{C}$ hold
300~400	$94^{\circ}\text{C}$	6 min, $4^{\circ}\text{C}$ hold
400~500	$94^{\circ}\text{C}$	5 min, $4^{\circ}\text{C}$ hold

**注意:** 选择插入片段大小 150~200bp 范围时, 后续实验无需片段分选, 文库在预计大小范围内有相对较窄的峰, 如需插入片段范围大于 200 bp, 则在文库富集前需要进行片段分选步骤, 具体操作步骤参见下文文库片段筛选步骤。

## 二、第一链 cDNA 合成

1. 将 1st Strand Enzyme Mix 从 -30~-15°C 取出，轻弹混匀，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	10
1st Strand Enzyme Mix	1.5
Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> O	8.5
Total	20

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 1st Strand Enzyme Mix 和 Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O 的混合液，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 80°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 cDNA 第二链的合成反应。

## 三、第二链 cDNA 合成

1. 将 2nd Strand Buffer 和 2nd Strand Enzyme Mix 从 -30~-15°C 取出，轻弹混匀，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	20
2nd Strand Buffer	8.5
2nd Strand Enzyme Mix	3.5
Nuclease-Free ddH <sub>2</sub> O	48
Total	80

2. 在PCR仪中进行第二链cDNA合成反应，PCR热盖温度设定为 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ：

反应步骤	反应温度	反应时间
1	$16^{\circ}\text{C}$	60 min
2	$4^{\circ}\text{C}$	hold

**注意：**反应结束后，cDNA第二链的合成产物可在 $4^{\circ}\text{C}$ 暂存1小时，但是建议反应结束后立即进行下一步纯化步骤。

#### 四、双链 cDNA 纯化

向上述反应产物(80  $\mu\text{l}$ )中加入  $1.8 \times$  体积(144  $\mu\text{l}$ )TIANGEN DNA 片段分选磁珠(NG306)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 144  $\mu\text{l}$  磁珠至步骤三、2 的 cDNA 双链合成产物溶液中，用移液器轻轻吸打 10 次充分混匀。
3. 室温孵育 5 min 后，将反应管置于磁力架上 5 min。待磁珠完全贴壁后，用移液器小心吸弃上清。
4. 将反应管置于磁力架上，用 200 ~ 500  $\mu\text{l}$  (没过磁珠即可) 80% 乙醇 (现用现配) 洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打 3 ~ 5 次 (不要吹散磁珠)。磁力架上静置 30sec 后，用移液器小心吸弃上清。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 将反应管置于磁力架上，打开离心管盖于室温条件下晾置 5 ~ 10 min 或至磁珠干燥为止。

**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，用 10  $\mu\text{l}$  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. 将 PCR 管从磁力架中取出，加入 37.5  $\mu\text{l}$  Nuclease-Free ddH<sub>2</sub>O 进行洗脱，使用移液器吹打 10 次充分混匀。室温静置 5 min 后，置于磁力架上 5min，待磁珠完全贴壁后，转移 35  $\mu\text{l}$  上清至新的离心管中，用于后续实验。

**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  $-20^{\circ}\text{C}$  存放。







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

# 浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

## TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品