



GENESEED® RNA-seq Library Prep Kit for Illumina

产品简介

GENESEED® RNA-seq Library Prep Kit for Illumina 是一款应用于全转录组链特异性文库构建的专用试剂盒。试剂盒采用优化的流程以及反应体系，提高了文库的转化效率，对不同起始量的 RNA 都有均一的覆盖度，4h 可完成文库制备。试剂盒可以衔接 Poly(A)法富集 mRNA 试剂盒和 rRNA 去除试剂盒构建测序文库。使用高保真 DNA 聚合酶无法扩增含尿嘧啶的 DNA 模板，实现链特异性。本试剂盒提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度保证了文库构建的稳定性和重复性。

适用范围

GENESEED® RNA-seq Library Prep Kit for Illumina 适用于完整性良好的动、植物及真菌等真核生物总 RNA、经 Poly(A)法富集的 mRNA、经 rRNA 去除后的 RNA 链特异性文库构建。不同样品的 Total RNA 中 mRNA、lncRNA 和 circRNA 的含量差异较大。投入量与前端模块有关：
Ribomoval® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (#S0103) : 0.1 ~ 1 µg Total RNA
Ribomoval® rRNA Depletion Kit (Plant) (#S0203) : 0.1 ~ 2 µg Total RNA

产品组分

组分名称	S0501(12 rxns)	S0502(24 rxns)	S0503(48 rxns)	S0504(96 rxns)
2× Frag/Prime Buffer	132 µL	264 µL	528 µL	1056 µL
1st Strand Buffer	108 µL	216 µL	432 µL	864 µL
1st Enzyme Mix	12 µL	24 µL	48 µL	96 µL
2nd Strand Buffer	72 µL	144 µL	288 µL	576 µL
2nd Enzyme Mix	36 µL	72 µL	144 µL	288 µL
Rapid Ligation Buffer	240 µL	480 µL	960 µL	1920 µL
Ligase Mix	36 µL	72 µL	144 µL	288 µL
2× HotStar PCR Mix	150 µL	300 µL	600 µL	1200 µL

运输与保存

干冰运输，-30°C ~ -15°C 保存，有效期一年。

自备材料

DNA 纯化磁珠、Nuclease-free ddH₂O、无水乙醇、低吸附吸头、Nuclease-free PCR 管、磁力架、PCR 仪、Qubit、Agilent 2100 Bioanalyzer 等。

实验流程

1、Total RNA 片段化

1) 按表 1 在一个 Nuclease-free PCR 管中以实际反应数 1.1 倍配制 RNA 片段化反应混合液：



表 1: RNA 片段化反应体系

组分	体积
2× Frag/Prime Buffer	11 μL
Nuclease-free ddH ₂ O	11 μL

2) 将样品从磁力架上取出, 加入 22 μL Frag/Prime Buffer(1×), 用移液器吹打 10 次以充分混匀, 室温静置 3 min, 在磁力架上静置 5 min, 待溶液澄清后, 小心吸取 20 μL 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。

3) 将样品置于 PCR 仪中, 按照表 2 程序, 进行 RNA 片段化反应, 热盖温度 105°C。

表 2: RNA 片段化反应程序

插入片段大小	打断程序
250 ~ 450 bp	85°C, 4 min 30 sec

2. 1st Strand Synthesis

1) 按照表 3 配制 1st Strand Synthesis 反应混合液:

表 3: 1st Strand Synthesis 反应混合液

组分	体积
上一步产物	20 μL
1st Strand Buffer	9 μL
1st Enzyme Mix	1 μL
Total	30 μL

2) 用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将样品收集至管底。

3) 将样品置于 PCR 仪中, 按照表 4 程序, 进行 1st Strand Synthesis 反应, 热盖温度 105°C。

表 4: 1st Strand Synthesis 反应程序

温度	时间
25°C	10 min
42°C	15 min
70°C	15 min
4°C	Hold

3. 2nd Strand Synthesis and dA-tailing

1) 按照表 5 配制 2nd Strand Synthesis and dA-tailing 反应混合液:

表 5: 2nd Strand Synthesis and dA-tailing 反应混合液

组分	体积
上一步产物	30 μL
2nd Strand Buffer	6 μL
2nd Enzyme Mix	3 μL
Nuclease-free ddH ₂ O	21 μL
Total	60 μL

2) 用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将样品收集至管底。

3) 将样品置于 PCR 仪中, 按照表 6 程序, 进行 2nd Strand Synthesis and dA-tailing 反应, 热盖温度 105°C。



表 6: 2nd Strand Synthesis and dA-tailing 反应程序

温度	时间
16°C	30 min
62°C	10 min
4°C	Hold

4、Adapter Ligation

1) 按照表 7 配制 Adapter Ligation 反应混合液:

表 7: Adapter Ligation 反应混合液

组分	体积
上一步产物	60 μ L
Rapid Ligation Buffer	20 μ L
Ligase Mix	3 μ L
Adapter	1 μ L
Nuclease-free ddH ₂ O	16 μ L
Total	100 μ L

2) 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将样品收集至管底。

3) 将样品置于 PCR 仪中，按照表 8 程序，进行 Adapter Ligation 反应，热盖温度 105°C。

表 8: Adapter Ligation 反应程序

温度	时间
20°C	15 min
4°C	Hold

5、连接产物纯化

1) 将磁珠从-4°C冰箱中取出，室温平衡至少 30 min;

2) 用 Nuclease-free ddH₂O 配制 80%乙醇;

3) 旋涡震荡充分混匀磁珠;

4) 吸取 73 μ L (0.73 $\times$) 磁珠至接头连接产物中，吹打混匀，室温静置 5 min，转移 PCR 管至磁力架上，直至溶液变澄清，小心移除上清;

5) 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 sec，小心移除上清;

6) 重复步骤 5) 一次，用 10 μ L 移液器彻底吸干残留液体;

7) 保持 PCR 管在磁力架上，干燥磁珠 5 ~ 10 min;

8) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 22 μ L Nuclease-free ddH₂O，用移液器吹打混匀，室温静置 5 min;

9) 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后，小心吸取 20 μ L 上清至新的 Nuclease-free PCR 管中，然后加入 16 μ L (0.8 $\times$) 磁珠，吹打混匀，室温静置 5min，转移 PCR 管至磁力架上，直至溶液变澄清，小心移除上清;

10) 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 sec，小心移除上清;

11) 重复步骤 5) 一次，用 10 μ L 移液器彻底吸干残留液体;

12) 保持 PCR 管在磁力架上，干燥磁珠 5 ~ 10 min;

13) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 12 μ L Nuclease-free ddH₂O，用移液器吹打混匀，室温静置 5 min;

14) 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后，小心吸取 10 μ L 上清至新的 Nuclease-free PCR 管中备用。



6. Library Amplification

1) 按照表 9 配制 Library Amplification 反应混合液:

表 9: Library Amplification 反应混合液

组分	体积
纯化后产物	10 μ L
2 $\times$ HotStar PCR Mix	12.5 μ L
I5	1.25 μ L
I7	1.25 μ L
Total	25 μ L

2) 用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将样品收集至管底。

3) 将样品置于 PCR 仪中, 按照表 10 程序, 进行 Library Amplification 反应, 热盖温度 105 $^{\circ}$ C。

表 10: Library Amplification 反应程序

温度	时间	循环数
98 $^{\circ}$ C	45 sec	1
98 $^{\circ}$ C	15 sec	10~14
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	1

4) 推荐循环数

Total RNA 起始量	推荐循环数
100 ~ 250 ng	13~14
250 ~ 500 ng	12~13
500 ~ 1000 ng	10~12

7. PCR 产物纯化

1) 将磁珠从-4 $^{\circ}$ C冰箱中取出, 室温平衡至少 30 min;

2) 用 Nuclease-free ddH₂O 配制 80%乙醇;

3) 旋涡震荡充分混匀磁珠;

4) 吸取 22.5 μ L (0.9 $\times$) 磁珠至 PCR 产物中, 吹打混匀, 室温静置 5 min, 转移 PCR 管至磁力架上, 直至溶液变澄清, 小心移除上清;

5) 保持 PCR 管在磁力架上, 加入 200 μ L 80%乙醇, 静置 30s, 小心移除上清;

6) 重复步骤 5) 一次, 用 10 μ L 移液器彻底吸干残留液体;

7) 保持 PCR 管在磁力架上, 干燥磁珠 5 ~ 10 min;

8) 将 PCR 管从磁力架上取出, 加入 20 μ L Nuclease-free ddH₂O, 用移液器吹打混匀, 室温静置 5 min;

9) 将 PCR 管置于磁力架上, 待溶液澄清后, 小心吸取 18 μ L 上清至新的 Nuclease-free 离心管中。

8. 文库质检

用 Qubit 检测文库浓度, Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库的片段分布。