



Genoscan™

www.genoscan.cn

Genoscan Genetech Co., Ltd

Order: 400-876-1157

版本号: GS181120

Geno Super Stranded mRNA-Seq Library Prep Kit (illumina)

Geno Super 链特异性转录组测序文库构建试剂盒 (illumina 平台)

产品内容

产品组成	GS301-01 (24 rxn)	GS301-02 (96 rxn)
Frag/1st Strand Buffer	66 μ L	264 μ L
1st Strand Buffer	132 μ L	528 μ L
1st Strand Enzyme	53 μ L	212 μ L
2nd Strand Buffer	212 μ L	845 μ L
2nd Strand Enzyme	53 μ L	212 μ L
ER/dA Master Mix	53 μ L	212 μ L
Ligation Buffer	740 μ L	1478 μ L (x 2)
DNA Ligase	53 μ L	212 μ L
2 \times HiFi HotStart PCR Master Mix	660 μ L	1320 μ L (x 2)
*GenoPure Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module	24 rxn	96 rxn

储存条件

*GenoPure Module置于2 ~ 8°C保存, 其他试剂置于-15 ~ -25°C保存, 保质期为一年。

本产品仅供科研使用, 请勿用于临床治疗、医药、食品及化妆品等用途。

产品简介

Geno Super Stranded mRNA-Seq Library Prep Kit (illumina) 是专门针对于 illumina 高通量测序平台开发的链特异性转录组测序文库构建试剂盒。本试剂盒采用快速一管式的操作流程，可对 RNA 样本进行快速文库构建，双链 cDNA 合成后，末端修复和 dA 尾添加一步完成，所得产物无需纯化即可直接用于接头的连接。一管法的反应流程，省去多步纯化步骤，简化了操作流程，提高了文库转化效率，特别适用于动物、植物、真菌等真核生物低起始量 RNA 样本建库。与常规链特异性转录组建库不同的是，本试剂盒创新性建库流程确保文库富集扩增产物来自于 cDNA 第二链，所有最终的测序信息也都来自于 cDNA 第二链，从而保留了 mRNA 的链方向性。

适用范围：Illumina 高通量测序平台链特异性转录组测序文库构建。

适用样本量：10 ng ~ 5 µg 真核生物 Total RNA。

推荐使用试剂

1. Geno RNA-Seq Multiplex Oligos Set1 for Illumina (GS021-01/02/03) 或其他等效产品。
2. Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠等效产品。

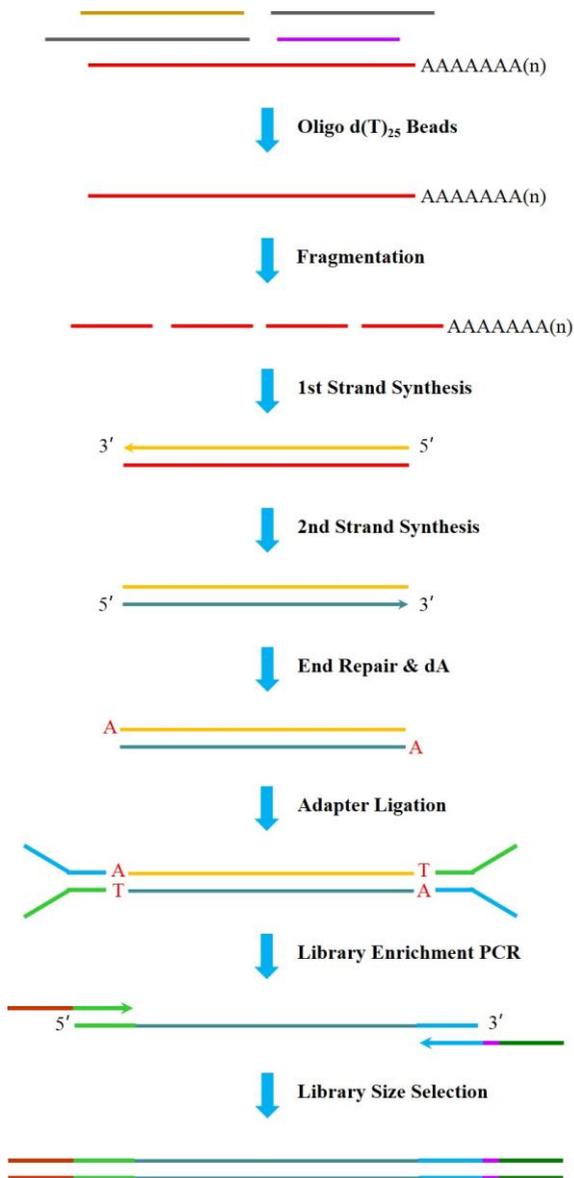
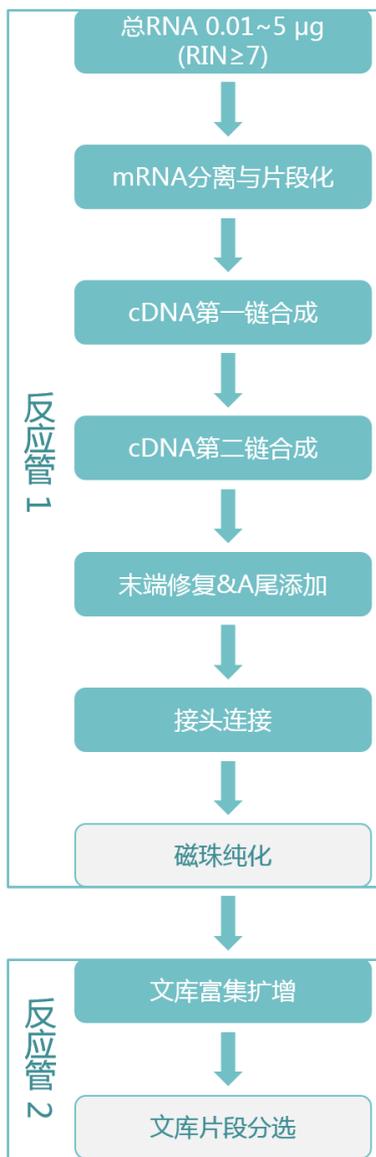
产品特点

1. 创新性链特异性转录组建库流程，操作简单、便捷，一管完成从 mRNA 富集到接头连接反应，无需纯化步骤，特别适用于低起始量 RNA 建库，整个建库流程仅需~5 小时。
2. 创新性链特异性转录组建库流程，确保 RNA 转化率最大化同时，有效避免接头自连。
3. 创新性链特异性转录组建库流程，确保所有最终的测序信息都来自于 cDNA 第二链。
4. 经定向优化的高保真文库扩增预混液，保证文库富集扩增效率高、碱基偏好小。

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 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行实验。
3. 实验开始前，请清洁操作台，并使用 RNA 酶及 DNA 酶清除试剂，如 RNase Away (Molecular BioProducts, Inc) 处理台面。确保没有 RNA 酶和 DNA 酶的污染。
4. 使用 RIN 值 ≥ 7.0 ，完整性较好的高质量的总 RNA 样本进行 mRNA 的分离。
5. 实验前请仔细阅读说明书，如果需要暂停实验，可根据说明书推荐将实验产物保存于 -20°C 并安排后续实验。

实验流程



实验步骤

一、mRNA分离与片段化

- 1-1. 将 GenoPure Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (Oligo d(T)₂₅ Beads, RNA Binding Buffer, Wash Buffer, Tris Buffer, Nuclease-free H₂O) 从 2~8°C 取出, 平衡至室温。
- 1-2. 将 Total RNA (RIN≥7.0) 取出冰上溶解, 吸取 10 ng ~ 5 μg 至 Nuclease-free PCR 管中, 加入 Nuclease-free H₂O 补足体积至 50 μL, 冰上放置备用。
- 1-3. 将 Oligo d(T)₂₅ Beads 缓慢涡旋混匀, 吸取 20 μL 到一个 Nuclease-free PCR 管中。加入 100 μL RNA Binding Buffer, 轻轻吸打混匀, 磁力架上静置 3 min, 至溶液变澄清, 小心吸弃上清。
- 1-4. 取下反应管加入 100 μL RNA Binding Buffer, 轻轻吸打混匀, 磁力架上静置 3 min, 至溶液变澄清, 小心吸弃上清。
- 1-5. 取下反应管加入 50 μL RNA Binding Buffer, 轻轻吸打混匀, 加入步骤 1-2 准备好的 50 μL Total RNA 样本, 轻轻吸打充分混匀。
- 1-6. 将反应管置于 PCR 仪中 65°C 孵育 5 min, 4°C 保温 (热盖 70°C)。PCR 仪运行到 4°C 后取出反应管, 轻轻吸打混匀, 室温静置 5 min, 再次吸打混匀, 室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min, 至溶液变澄清, 小心吸弃上清。
- 1-7. 取下反应管, 加入 200 μL Wash Buffer, 轻轻吸打混匀, 置于磁力架上 3 min, 至溶液变澄清, 小心吸弃上清。重复此步一次。
- 1-8. 取下反应管加入 50 μL Tris Buffer, 轻轻吸打混匀。将反应管置于 PCR 仪 80°C 孵育 2 min, 25°C 保温 (热盖 80°C)。PCR 仪运行到 25°C 后取出反应管, 加入 50 μL RNA Binding Buffer, 轻轻吸打混匀, 室温静置 5 min, 再次吸打混匀, 室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min, 至溶液澄清, 小心吸弃上清。

1-9. 取下反应管加入 200 μL Wash Buffer, 轻轻吸打混匀。磁力架上静置 3 min, 至溶液变澄清, 彻底吸弃上清。**注: 请用 10 μL 吸头彻底吸弃上清, 以免残留液体干扰后续反应。**

1-10. 取下反应管加入 10 μL Tris Buffer, 轻轻吸打混匀。将反应管置于 PCR 仪 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 (热盖 80 $^{\circ}\text{C}$)。PCR 仪运行到 25 $^{\circ}\text{C}$ 后立即取出反应管并置于磁力架上 3 min, 至溶液澄清, 吸取 7.5 μL 上清至一个 Nuclease-free PCR 管中, 按下表配制反应体系, 吸打混匀。

组分名称	体积 (μL)
Frag/1st Strand Buffer	2.5
RNA Sample	7.5
Total	10

1-11. 将反应管置于 PCR 仪中, 参照下表目标片段大小, 设置并运行 PCR 反应程序。开启顶盖加热, 温度设置为 105 $^{\circ}\text{C}$ 。

片段大小	反应温度	反应时间
100 ~ 350 bp	94 $^{\circ}\text{C}$	10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温
150 ~ 450 bp	94 $^{\circ}\text{C}$	8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温
200 ~ 600 bp	94 $^{\circ}\text{C}$	5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温

1-12. 片段化反应结束后取出反应管, 置于冰上并立即进行下一步 cDNA 第一链合成。**注: 从片段化到 cDNA 第一链合成过程中不可停留, mRNA 在该体系下容易降解。**

二、cDNA第一链合成

2-1. 将 1st Strand Buffer 和 1st Strand Enzyme 从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 取出, 轻弹混匀。将 PCR 管置于冰上按下表建立反应体系, 轻轻吸打 >15 次充分混匀, 短暂离心后加到步骤 1-12 反应体系中, 再次吸打混匀, 短暂离心后置于冰上备用 (总体积 20 μL)。

组分名称	体积 (μL)
1st Strand Buffer	5
1st Strand Enzyme	2
Nuclease-Free H ₂ O	3
Total	10

2-2. 按下表设置 PCR 仪反应程序, 开启热盖, 温度设置为 70°C。将步骤 2-1 反应管放入 PCR 仪中并启动反应程序。反应结束后立即进行下一步反应。

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	保持温度

三、cDNA 第二链合成

3-1. 将 2nd Strand Buffer 和 2nd Strand Enzyme 从-20°C取出, 轻弹混匀, 将 PCR 管置于冰上按下表建立反应体系, 轻轻吸打混匀后短暂离心。在冰上, 将 30 μL 反应体系加到步骤 2-2 反应产物中, 轻轻吸打>15 次充分混匀, 短暂离心后置于冰上备用 (总体积 50 μL)。

组分名称	体积 (μL)
2nd Strand Buffer	8
2nd Strand Enzyme	2
Nuclease-Free H ₂ O	20
Total	30

3-2. 按下表设置 PCR 仪反应程序, 开启热盖, 温度设置为 70°C。启动反应程序当 PCR 仪降温到 16°C 后将步骤 3-1 反应管放入 PCR 仪中继续反应。反应结束后立即进行下一步反应。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	16°C	30 min
2	37°C	30 min
3	70°C	15 min
4	4°C	保持温度

四、末端修复&A 尾添加

4-1. 将 ER/dA Master Mix 从-20°C 取出冰上融化，轻弹混匀，不要涡旋。在 200 μ L PCR 管中按下表配制反应体系，轻轻吸打>15 次充分混匀，短暂离心后置于冰上备用。

组分名称	体积 (μ L)
ds cDNA Reaction Mix (步骤 3-2 产物)	50
ER/dA Master Mix	2
Total	52

4-2. 按下表设置 PCR 仪反应程序，开启热盖，温度设置为 70°C。将步骤 4-1 反应管置于 PCR 仪中并启动反应程序。反应结束后立即进行下一步反应。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	37°C	15 min
2	70°C	15 min
3	4°C	保持温度

五、接头连接

5-1. 将 Adapter, Ligation Buffer 和 DNA Ligase 从-20°C取出冰上融化，轻弹混匀。向步骤 4-2 反应产物中加 1.5 μ L Adapter 溶液 (Geno RNA-Seq Multiplex Oligos Set1 for Illumina, GS021-01/02/03) 吸打混匀，短暂离心后置于冰上。在 PCR 管中按下表配制反应体系，轻轻

吸打混匀，短暂离心后加到步骤 4-2 反应产物中，轻轻吸打充分混匀，短暂离心后置于冰上。

组分名称	体积 (μL)
Ligation Buffer	28
DNA Ligase	2
Nuclease-Free H ₂ O	16.5
Total	46.5

5-2. 按下表设置 PCR 仪反应程序，开启热盖，温度设置为 70°C。启动反应程序当 PCR 仪降温到 20°C 后将步骤 5-1 反应管放入 PCR 仪中继续反应。

反应步骤	反应温度	反应时间
1	20°C	15 min
2	70°C	15 min
3	4°C	保持温度

5-3. 反应结束后将连接产物取出，加入 0.8× 体积 (80 μL) Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠进行纯化。具体操作如下：

- (1) 将 AMPure XP 磁珠置于室温平衡 30 min。
- (2) 涡旋混匀磁珠，加入 80 μL Agencourt AMPure XP 磁珠到连接产物中，轻轻吸打混匀。
- (3) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器吸弃上清。
- (4) 在磁力架上向反应管内加入 200 μL 80% 乙醇 (现配现用)，静置 30 秒，吸弃上清。
- (5) 重复洗涤步骤(4)一次，并彻底弃上清。
- (6) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置 5 ~ 10 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成得率降低。**
- (7) 将反应管从磁力架上取出，加入 25 μL Nuclease-Free H₂O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后转移 22 μL 上清至

新的离心管中用于文库富集扩增。**注：如不立即进行下一步反应，可将纯化后得到的 cDNA 文库于-20°C保存一周时间。**

六、文库富集扩增

6-1. 将 2× HiFi HotStart PCR Master Mix 和 Index Primer Mix (Geno RNA-Seq Multiplex Oligos Set1 for Illumina, GS021-01/02/03) 从-20°C取出冰上融化，短暂混匀。在 PCR 管中按下表配制反应体系，轻轻吸打>15 次混匀，短暂离心收集管壁液体。

组分名称	体积 (μL)
cDNA Library	22
2× HiFi HotStart PCR Master Mix	25
Index Primer Mix (10 μM)	3
Total	50

6-2. 按下表设置 PCR 反应程序，开启热盖，温度设置为 105°C。将步骤 6-1 反应管置于 PCR 仪中并启动反应程序。*** 注：请根据 RNA 输入量确定 PCR 循环数。对于 1 μg 总 RNA 文库起始建库，PCR 富集时建议扩增 14 个循环，其他 RNA 输入量建议在此基础上按照 PCR 扩增富集的倍数减少或增加 2~4 个循环。**

步骤	温度	时间	循环数
1	98°C	45 sec	1
2	98°C	15 sec	12 ~ 18*
3	65°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	1 min	1
6	4°C	保持温度	1

6-3. **(文库磁珠纯化)** 文库扩增结束后加入 1.0×体积 (50 μL) Agencourt AMPure XP 或 GenoPure DNA Clean Beads (GS901-01/02/03) 磁珠进行纯化, 具体操作步骤如下:

- (1) 将 Agencourt AMPure XP 磁珠置于室温平衡 30 min。
- (2) 涡旋使磁珠充分悬浮, 加入 50 μL Agencourt AMPure XP 磁珠至步骤 6-2 扩增产物中, 用移液器充分吸打混匀。
- (3) 室温静置 5 min 后, 将反应管置于磁力架上 3 min, 待溶液澄清后, 用移液器吸弃上清。
- (4) 将反应管置于磁力架上, 向反应管内加入 200 μL 80%乙醇 (现配现用), 静置 30 秒, 吸弃上清。
- (5) 重复洗涤步骤(4)一次, 并彻底弃上清。
- (6) 将反应管置于磁力架上, 开盖室温放置 5 ~ 10 min, 晾干至磁珠表面无反光即可。**注: 不要过分干燥磁珠, 否则会造成文库得率降低。**
- (7) 将反应管从磁力架上取出, 加入 105 μL Nuclease-Free H₂O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 轻轻吸打混匀, 室温静置 5 min。将反应管放置于磁力架上 3 min, 待溶液澄清后转移约 100 μL 上清至新的离心管中。**注: 如不立即使用, 请将样品冻存于-20°C。**

6-4. **(文库片段分选)** RNA 片段化后文库插入片段大小较不集中, 建议对文库进行片段分选。先将反应产物按步骤 6-3 使用 1.0×体积 AMPure XP 磁珠纯化并溶于 100 μL Nuclease-Free H₂O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 再根据目标文库大小, 参考下表中的磁珠添加比例进行片段分选。**注: 文库富集扩增后比插入片段长度增加 ~100bp。**

文库参数			磁珠加入比例	
片段化条件	插入片段	目标文库	第一次筛选	第二次筛选
94°C, 10 min	150 ~ 250 bp	250 ~ 350 bp	0.7×	0.1×
94°C, 8 min	250 ~ 350 bp	350 ~ 450 bp	0.6×	0.1×
94°C, 5 min	300 ~ 550 bp	400 ~ 650 bp	0.55×	0.1×

-
- 以目标文库大小为 250 ~ 350 bp 的情况为例，先加入 1.0×体积 AMPure XP 磁珠纯化并溶于 100 μL Nuclease-Free H₂O 或 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 后再进行片段分选。分选操作如下：
- (1) 将 AMPure XP 磁珠置于室温平衡 30 min。
 - (2) 涡旋使磁珠充分悬浮，加入 70 μL (100 μL × 0.7 = 70 μL) AMPure XP 磁珠至 100 μL 已纯化的文库富集扩增产物中，充分吸打混匀。
 - (3) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器小心吸取上清并转移至另一新的离心管中。
 - (4) 向上清中加入 10 μL (100 μL × 0.1 = 10 μL) AMPure XP 磁珠，用移液器吹打混匀。
 - (5) 室温静置 5 min 后，将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，用移液器吸弃上清。
 - (6) 在磁力架上向反应管内加入 200 μL 80%乙醇 (现配现用)，静置 30 秒，吸弃上清。重复此洗涤步骤一次，并彻底弃上清。
 - (7) 将反应管置于磁力架上，开盖室温放置 5 ~ 10 min，晾干至磁珠表面无反光即可。**注：不要过分干燥磁珠，否则会造成文库得率降低。**
 - (8) 将反应管从磁力架上取出，加入 25 μL Nuclease-Free H₂O 或 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)，轻轻吸打混匀，室温静置 5 min。将反应管置于磁力架上 3 min，待溶液澄清后，转移约 22 μL 上清至新的离心管中。**注：如不立即使用，请将样品冻存于-20℃。**
- 6-5. 上机测序前可使用 Qubit (Geno dsDNA HS Assay Kit for Qubit, GS911-01/02) 和 Agilent Bioanalyzer 对 DNA 文库的浓度及大小进行鉴定。