



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 $\mu$ L	264 $\mu$ L
1st Strand Buffer	132 $\mu$ L	528 $\mu$ L
1st Strand Enzyme	53 $\mu$ L	212 $\mu$ L
2nd Strand Buffer	212 $\mu$ L	845 $\mu$ L
2nd Strand Enzyme	53 $\mu$ L	212 $\mu$ L
ER/dA Master Mix	53 $\mu$ L	212 $\mu$ L
Ligation Buffer	740 $\mu$ L	1478 $\mu$ L (x 2)
DNA Ligase	53 $\mu$ L	212 $\mu$ L
2 $\times$ HiFi HotStart PCR Master Mix	660 $\mu$ L	1320 $\mu$ 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。

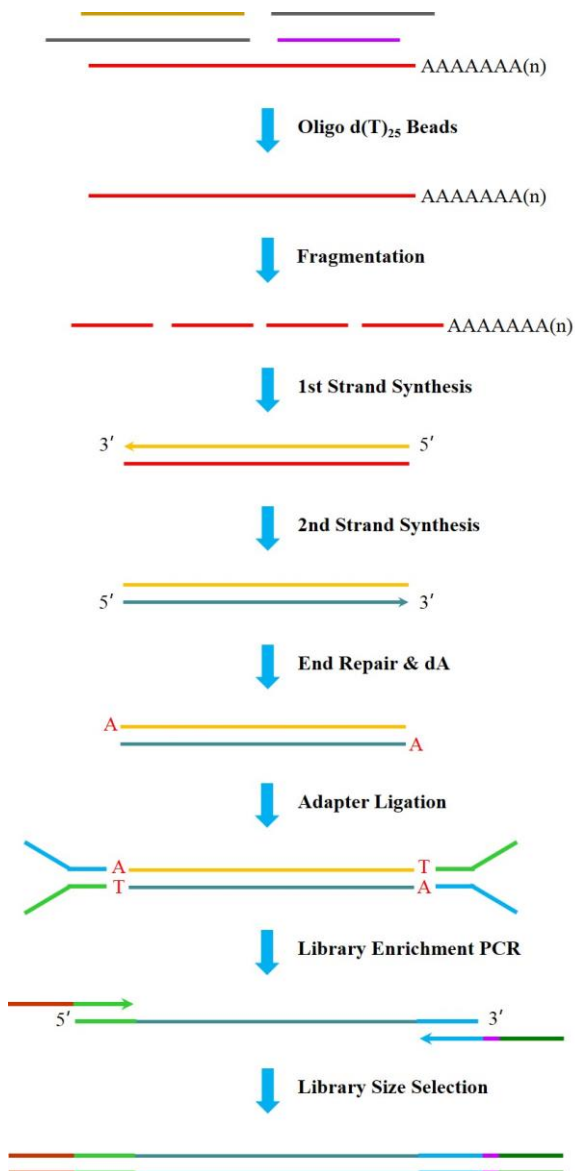
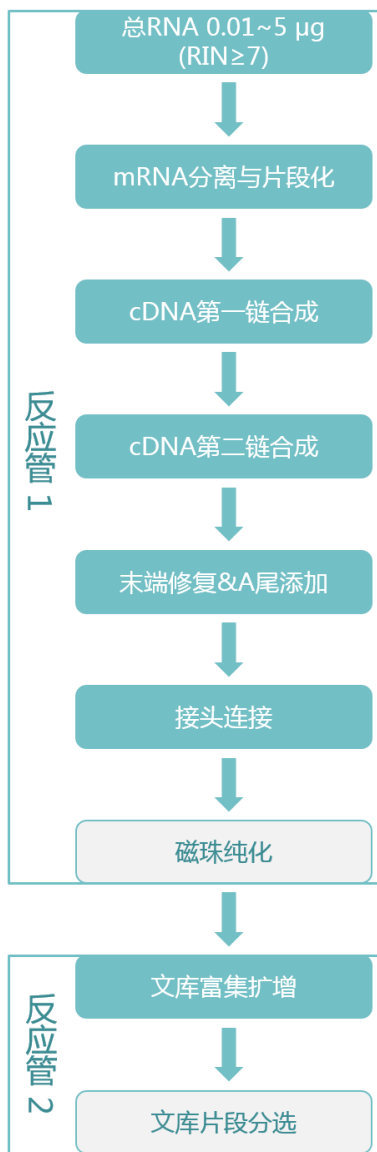
## 产品特点

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 $\geq 7.0$ ，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 $-20^{\circ}\text{C}$ 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)<sub>25</sub> Beads, RNA Binding Buffer, Wash Buffer, Tris Buffer, Nuclease-free H<sub>2</sub>O) 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 H<sub>2</sub>O 补足体积至 50 μL, 冰上放置备用。
- 1-3. 将 Oligo d(T)<sub>25</sub> 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 ( $\mu\text{L}$ )
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  $\mu\text{L}$ )。

组分名称	体积 (μL)
1st Strand Buffer	5
1st Strand Enzyme	2
Nuclease-Free H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 ( $\mu$ 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  $\mu$ 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 ( $\mu\text{L}$ )
Ligation Buffer	28
DNA Ligase	2
Nuclease-Free $\text{H}_2\text{O}$	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  $70^\circ\text{C}$ 。启动反应程序当 PCR 仪降温到  $20^\circ\text{C}$  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	$20^\circ\text{C}$	15 min
2	$70^\circ\text{C}$	15 min
3	$4^\circ\text{C}$	保持温度

5-3. 反应结束后将连接产物取出，加入  $0.8\times$  体积 ( $80\ \mu\text{L}$ ) 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  $80\ \mu\text{L}$  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  $200\ \mu\text{L}$  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  $25\ \mu\text{L}$  Nuclease-Free  $\text{H}_2\text{O}$  或  $10\text{mM}$  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  $22\ \mu\text{L}$  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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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。