

AccuGen® 330 核酸多重建庫試劑盒使用說明書

規格 : 24 reactions

版本 : V2.2

目 錄

1. 產品簡介	3
2. 試劑組內容物	3
3. 實驗流程說明	4
4. 樣本類型及品質要求	4
5. 實驗清消	4
6. 操作步驟	5
6.1 RNA 反轉錄 (視情況需求)	5
6.2 第一輪 PCR : 目標序列富集	6
6.3 第一輪 PCR 產物純化	7
6.4 第二輪 PCR : 定序接頭	8
6.5 第二輪 PCR 產物純化	9
7. 附表	10

1. 產品簡介

產品名稱：AccuGen® 330 核酸多重建庫試劑盒

產品型號：231122401

產品規格：24 rxn/盒

產品用途：採用多重 PCR 方法，同時檢測多種病原微生物，輔助臨床中由病原微生物引起的感染性疾病，快速且準確的診斷可以對病情進行監控，提供有效治療，並控制疾病的蔓延。

2. 試劑組內容物

	試劑名稱	體積 (μ l)	儲存條件
Kit 1	10× RT Mix	48	-20°C
	RT Enzyme Mix	48	
	RT Primer	60	
	YN PCR Mix	468	
	TNA Primer Mix	96	
	Internal control	60	
	Negative control	240	

	內容	體積 (ml)	儲存條件
Kit 2	YN DNA Clean Beads	2.2	4°C

	內容	體積 (μ l)	儲存條件
Kit 3	i5 Index	8 / each × 3 種	-20°C
	i7 Index	3 / each × 8 種	

* 請將所有試劑儲存在指定的溫度下，以確保它們的穩定性和功能性。

3. 實驗流程說明

進行兩輪 PCR，通過特異的引子設計將 Index 和定序接頭添加到目標序列上。第一輪 PCR 是將目標序列與特異引子結合，以擴增目標序列；第二輪 PCR 則是加上帶有 Index 序列的定序接頭，進行目標序列富集，純化去除未擴增的 DNA 片段和雜質即完成文庫建構。

4. 樣本類型及品質要求

樣本類型：(1). TNA (DNA+RNA)

(2). DNA

品質要求：DNA 濃度 $> 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ；OD260/280 在 1.7 - 2.0 之間

5. 實驗清消

本實驗旨在同時檢測多種病原微生物輔助臨床診斷，故建議於操作實驗前，以 75% 酒精噴灑桌面並擦拭乾淨，再使用 DNA 去除劑（建議試劑：PCR clean，品牌：Minerva Biolabs，貨號：15-2025）噴灑桌面並擦拭乾淨，進行完善的清消步驟。

6. 操作步驟

6.1 RNA 反轉錄 (視情況需求)

取 13.5 μ l TNA 進行 RNA 反轉錄。

* 如 TNA 濃度大於 50 ng/ μ l，需先將 TNA 稀釋至 50 ng/ μ l；如 TNA 濃度小於 50 ng/ μ l，則直接進行 RNA 反轉錄。

(1) RNA 變性

反應條件：65°C 加熱 5 分鐘，置於冰上 2 分鐘。

(2) 反轉錄

依照下列反應試劑體積配製反應溶液，混合均勻後，短暫離心。

試劑名稱	體積 (μ l)
10× RT Mix*	2.0
RT Enzyme Mix	2.0
RT Primer	2.5
上一步變性 RNA	13.5
總體積	20.0

* 10× RT Mix 於低溫下可能有沉澱，使用前需恢復室溫並輕搖混勻，待沉澱重新溶解後使用。

PCR 反應條件如下 (PCR 上蓋溫度設置為 105°C)：

溫度	時間	循環數 (Cycle)
25°C	5 min	1
50°C	15 min	1
85°C	5 sec	1
Hold at 4°C		

6.2 第一輪 PCR：目標序列富集

依照下表配製第一輪 PCR 反應溶液，混合均勻後，短暫離心。

試劑名稱	體積 (μ l)
YN PCR Mix	14.0
TNA Primer Mix	4.0
Internal control	2.5
Negative control / DNA 樣本 / 步驟 5.1 反轉錄產物	20.0
Nuclease-free Water	9.5
總體積	50.0

PCR 反應條件如下 (PCR 上蓋溫度設置為 105°C)：

溫度	時間	循環數 (Cycle)
95°C	10 min	1
95°C	20 sec	5
58°C	2 min	
60°C	3 min	
62°C	1 min	
72°C	1 min	
95°C	30 sec	20
66°C	3 min	
Hold at 4°C		

6.3 第一輪 PCR 產物純化

- (1) 提前 30 分鐘將 YN DNA Clean Beads 從 4~8°C 取出，靜置使其溫度達至室溫，使用前需充分混勻。
- (2) 依樣本數準備現配 80% 酒精 (每樣本約需 500 μ l)。
- (3) 取乾淨的 1.5 mL 微量離心管中加入步驟 5.2 之 PCR 產物、45 μ l YN DNA Clean Beads，低速振盪混合均勻，室溫靜置 5 分鐘，短暫離心。
- (4) 置於磁座上 2-5 分鐘，直至液體澄清，去除上清液，避免吸到磁珠。
- (5) 加入 200 μ l 80% 酒精，靜置 30 秒，去除上清液，避免吸到磁珠。
- (6) 加入 200 μ l 80% 酒精，靜置 30 秒，去除上清液，避免吸到磁珠。短暫離心並置於磁座上 1 分鐘，用 20 μ l tip 將殘留液體去除，避免吸到磁珠。
- (7) 開蓋室溫乾燥至磁珠表面不反光 (約 2-5 分鐘，不要讓磁珠乾燥至出現裂痕)。
- (8) 從磁座上取下 1.5 mL 微量離心管，加入 14.5 μ l Nuclease-free Water。蓋上蓋子，低速振盪混合均勻，室溫靜置 5 分鐘，短暫離心。
- (9) 置於磁座上 2-5 分鐘直至液體澄清，小心吸取並轉移 12.5 μ l 上清液至新的 0.2 mL PCR 反應管中，避免吸到磁珠。

6.4 第二輪 PCR：定序接頭

依照下表配製第二輪 PCR 反應溶液，混合均勻後，短暫離心。

試劑名稱	體積 (μ l)
YN PCR Mix	5.5
Sxx_mgi	1.0
Nxx_mgi*	1.0
第一輪 PCR 純化產物	12.5
總體積	20.0

* 同一批上機定序樣本，不同樣本間 Index 序列組合不能衝突，具體接頭序列資訊見附表。

PCR 反應條件如下 (PCR 上蓋溫度設置為 105°C)：

溫度	時間	循環數 (Cycle)
95°C	10 min	1
95°C	30 sec	25
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
Hold at 4°C		

6.5 第二輪 PCR 產物純化

- (1) 提前 30 分鐘將 YN DNA Clean Beads 從 4~8°C 取出，靜置使其溫度達至室溫，使用前需充分混勻。
- (2) 依樣本數準備現配 80% 酒精 (每樣本約需 500 μ l)。
- (3) 取乾淨的 1.5 mL 微量離心管中加入步驟 5.4 之 PCR 產物、30 μ l Nuclease-free Water 和 45 μ l YN DNA Clean Beads，低速振盪混合均勻，室溫靜置 5 分鐘，短暫離心。
- (4) 置於磁座上約 2-5 分鐘，直至液體澄清。去除上清液，避免吸到磁珠。
- (5) 加入 200 μ l 80% 酒精，靜置 30 秒，去除上清液，避免吸到磁珠。
- (6) 加入 200 μ l 80% 酒精，靜置 30 秒，去除上清液，避免吸到磁珠。短暫離心並置於磁座上 1 分鐘，用 20 μ l tip 將殘留液體去除，避免吸到磁珠。
- (7) 開蓋室溫乾燥至磁珠表面不反光 (約 2-5 分鐘，不要讓磁珠乾燥至出現裂痕)。
- (8) 從磁座上取下 1.5 mL 微量離心管，加入 22 μ l Nuclease-free Water。蓋上蓋子，低速振盪混合均勻，室溫靜置 5 分鐘，短暫離心。
- (9) 置於磁座上 1 分鐘，直至液體澄清，小心吸取並轉移 20 μ l 上清液至新的 1.5 mL 微量離心管中，避免吸到磁珠。
- (10) Qubit 測定文庫濃度。
- (11) 文庫檢測：文庫製備完成後，進行片段檢測，正常文庫主峰片段約為 330 bp (不同樣本的主峰長度會有差異)，並確認無接頭及大片段污染。

7. 附表

I5 接頭序列

名稱	序列
S502_mgi	CTCTCTAT (HiSeq/MiSeq) ATAGAGAG (NextSeq/miniseq)
S510_mgi	CGTCTAAT (HiSeq/MiSeq) ATTAGACG (NextSeq/miniseq)
S516_mgi	CCTAGAGT (HiSeq/MiSeq) ACTCTAGG (NextSeq/miniseq)
S517_mgi	GCGTAAGA (HiSeq/MiSeq) TCTTACGC (NextSeq/miniseq)
S518_mgi	CTATTAAG (HiSeq/MiSeq) CTTAATAG (NextSeq/miniseq)
S520_mgi	AAGGCTAT (HiSeq/MiSeq) ATAGCCTT (NextSeq/miniseq)

I7 接頭序列

名稱	序列
N11_mgi	ATCACGTT
N12_mgi	CGATGTTT
N13_mgi	TTAGGCAT
N14_mgi	TGACCACT
N15_mgi	ACTTGATG
N16_mgi	TAGCTTGT
N17_mgi	GGCTACAG
N18_mgi	CTTGTACT
N19_mgi	TCTCGGTT
N20_mgi	TAAGCGTT
N21_mgi	GGTGAGTT
N22_mgi	TGTACCTT

名稱	序列
N23_mgi	GTCGCTAT
N24_mgi	TTCTGTGT
N25_mgi	TCTGCTGT
N26_mgi	TTGGAGGT
N27_mgi	TCGAGCGT
N28_mgi	TGATACGT
N29_mgi	GAGGTGCT
N30_mgi	GCATGGCT
N31_mgi	GTTAGCCT
N32_mgi	TGCATAGT
N33_mgi	TTGACTCT
N34_mgi	TTACTCGC
N35_mgi	TTGCGTAC
N36_mgi	TAGACGGA
N37_mgi	TGTGAAGA
N38_mgi	TGCGTGAA
N39_mgi	GATCTCTT
N40_mgi	GACGGATT
N701_mgi	TAAGGCGA
N702_mgi	CGTACTAG
N703_mgi	AGGCAGAA
N704_mgi	TCCTGAGC
N705_mgi	GGACTCCT
N706_mgi	TAGGCATG
N707_mgi	CTCTCTAC
N710_mgi	CGAGGCTG
N711_mgi	AAGAGGCA
N712_mgi	GTAGAGGA
N714_mgi	GCTCATGA

名稱	序列
N715_mgi	ATCTCAGG
N716_mgi	ACTCGCTA
N718_mgi	GGAGCTAC
N719_mgi	GCGTAGTA
N720_mgi	CGGAGCCT
N721_mgi	TACGCTGC
N722_mgi	ATGCGCAG
N723_mgi	TAGCGCTC
N724_mgi	ACTGAGCG
N726_mgi	CCTAAGAC
N727_mgi	CGATCAGT
N728_mgi	TGCAGCTA
N729_mgi	TCGACGTC

Health GeneTech Corp
service@genebook.com.tw
www.genebook.com.tw

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
Copyright © 2024 康健基因科技 Health GeneTech Corp. All Rights Reserved.