

## AccuGen<sup>®</sup> 330 核酸多重建庫試劑盒使用說明書

規格：48 reactions

版本：V1.0

## 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：251124801

產品規格：48 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 ( $\mu$ l )  | 儲存條件  |
|--------------------|-----------------|-------|
| 10× RT Mix         | 96              | -20°C |
| RT Enzyme Mix      | 96              |       |
| RT Primer          | 120             |       |
| YN PCR Mix         | 984             |       |
| TNA Primer Mix     | 336             |       |
| Internal control   | 72              |       |
| Negative control   | 240 × 2         |       |
| i5 Index           | 16 / each × 3 種 |       |
| i7 Index           | 4 / each × 12 種 |       |
| YN DNA Clean Beads | 4200            | 4°C   |

\* 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 ng/μl ; 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 20  $\mu$ l TNA 進行 RNA 反轉錄。

- \* 如 TNA 濃度大於 50 ng/ $\mu$ l，需先將 TNA 稀釋至 50 ng/ $\mu$ l；  
如 TNA 濃度小於 50 ng/ $\mu$ 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 ( $\mu$ l ) |
|---------------|----------------|
| 10× RT Mix*   | 2.0            |
| RT Enzyme Mix | 2.0            |
| RT Primer     | 2.5            |
| 上一步變性 RNA     | 20.0           |
| 總體積           | 26.5           |

\* 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 ( $\mu$ l ) |
|---------------------------------------------|----------------|
| YN PCR Mix                                  | 15.0           |
| TNA Primer Mix                              | 7.0            |
| Internal control                            | 1.5            |
| Negative control / DNA 樣本<br>/ 步驟 5.1 反轉錄產物 | 26.5           |
| 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℃        | 3 min  | 1             |
| 95℃        | 30 sec | 18            |
| 58℃        | 30 sec |               |
| 60℃        | 30 sec |               |
| 62℃        | 2 min  |               |
| 95℃        | 30 sec | 4             |
| 68℃        | 2 min  |               |
| Hold at 4℃ |        |               |

### 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 µl )。
- (3) 取乾淨的 1.5 mL 微量離心管中加入步驟 5.2 之 PCR 產物、25 µl 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。
- (5) 將上清液吸取至另一乾淨的 1.5 mL 微量離心管，加入 25 µl YN DNA Clean Beads，低速振盪混合均勻，室溫靜置 5 分鐘，短暫離心。
- (6) 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。
- (7) 加入 200 µl 80%酒精，靜置 30 秒，去除上清液，避免吸到磁珠。
- (8) 加入 200 µl 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 µl tip 將殘留液體去除，避免吸到磁珠。
- (9) 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 )。
- (10) 從磁座上取下 1.5 mL 微量離心管，加入 14.5 µl 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。
- (11) 置於磁座上 2-5 分鐘直至液體澄清，小心吸取並轉移 12.5 µl 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 ( $\mu$ l ) |
|--------------|----------------|
| YN PCR Mix   | 5.5            |
| i5 Index     | 1.0            |
| i7 Index     | 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        | 3 min  | 1             |
| 95°C        | 20 sec | 15            |
| 60°C        | 30 sec |               |
| 72°C        | 30 sec |               |
| 72°C        | 2 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  $\mu$ 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  $\mu$ l Nuclease-free Water 和 37.5  $\mu$ 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  $\mu$ l 80%酒精，靜置 30 秒，去除上清液，避免吸到磁珠。
- (6) 加入 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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) 、<br>ATAGAGAG ( NextSeq/miniseq )  |
| S510_mgi | CGTCTAAT (HiSeq/MiSeq) 、<br>ATTAGACG ( NextSeq/miniseq ) |
| S516_mgi | CCTAGAGT (HiSeq/MiSeq) 、<br>ACTCTAGG ( NextSeq/miniseq ) |
| S517_mgi | GCGTAAGA (HiSeq/MiSeq) 、<br>TCTTACGC ( NextSeq/miniseq ) |
| S518_mgi | CTATTAAG (HiSeq/MiSeq) 、<br>CTTAATAG ( NextSeq/miniseq ) |
| S520_mgi | AAGGCTAT (HiSeq/MiSeq) 、<br>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 | CTTGTA CT |
| 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 |

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

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.  
Copyright © 2025 康健基因科技 Health GeneTech Corp. All Rights Reserved.