

## 产品概述

DNA&RNA Library Prep Kit For Illumina V2 是针对病原微生物 DNA&RNA 开发的共建库试剂盒是 DNA&RNA Library Prep Kit For Illumina 迭代版本。本产品先对 RNA 进行逆转录,接着在一个反应管内将传统建库中的 DNA/cDNA 片段化、末端修复、接头连接数个模块整合为一步反应,实现真正意义上的共建库,很大程度上降低了实验操作复杂性,缩短实验时间。产物经过接头预扩增和文库放大即可得到 DNA&RNA 基因组文库。可在 4 小时内快速完成样本的 DNA&RNA 文库构建。

## 适用范围

- 可兼容 0.5ng-100ng 核酸模板。
- 特别适用于血液、痰液、肺泡灌洗液、脑脊液、拭子多种需要进行宏基因组测序(mNGS)的临床样本。
- 可用于水源、土壤等样本的 DNA 和 RNA 合并建库,获取或鉴别样本微生物种类信息。
- 可应用于常规动植物、微生物等样本的 DNA 和 RNA 合并建库,获取样本基因组序列。
- 样本基因组覆盖度大于 95%。

## 产品信息

产品名称	货号	规格
DNA&RNA Library Prep Kit For Illumina V2	BR3C102-01	8T
DNA&RNA 共建库试剂盒	BR3C102-03	24T
	BR3C102-06	96T

## 产品组分

组分名称			8T	24T	96T
A 盒	5×FB Buffer	○	16μL	48μL	192μL
	Ada Primer Mix	○	8μL	24μL	96μL
	5×RT Buffer	●	32μL	96μL	384μL
	RT Enzyme Mix	●	16μL	48μL	192μL
	5x FP Buffer	●	48μL	144μL	576μL
	FP Enzyme Mix	●	8μL	24μL	96μL
	3×Amp DR Buffer	●	160μL	480μL	2×960μL
	AmpHifi DR Enzyme	●	8μL	24μL	96μL
B 盒	Index	○	8×3μL	12×6μL	48×6μL

备注: 8T 试剂盒自带 8 种不同 Index; 24T 试剂盒自带 12 种不同 Index; 96T 试剂盒自带 48 种不同 Index; Index 序列可根据需要定制单端或双端。Index 序列信息具体见附表。

## 保存条件

试剂盒储存于-20±5℃,有效期为 12 个月。冰袋或干冰运输。使用前请先混匀,并避免

反复冻融。

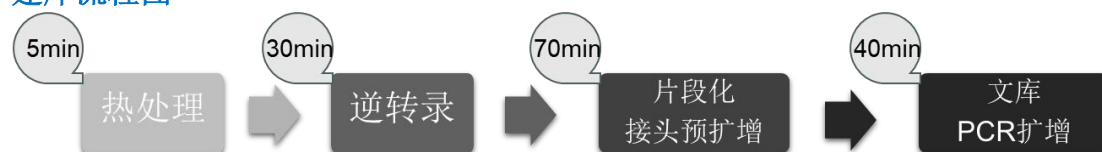
## 自备材料

需自备的试剂: 无核酸酶水(DNase、RNase free)、DNA 纯化磁珠、无水乙醇(分析纯)及 Qubit dsDNA HS Assay Kit。

需要自备的仪器设备包括: 核酸定量仪、磁力架、移液枪、PCR 扩增仪、振荡器、掌上离心机、凝胶琼脂电泳仪。

需自备的耗材: 0.2mL PCR 管(无菌且无核酸酶)、1.5mL EP 管(无菌且无核酸酶)、0.5mL Qubit 管、枪头、50mL 离心管等。

## 建库流程图



## 使用方法

### 1. RNA 热处理:

1.1 将 5×FB Buffer 和 AdaPrimer Mix 室温或冰面上解冻后震荡混匀, 瞬时离心后置于冰盒上备用。

1.2 使用无菌无核酸酶残留的 0.5mL/1.5mL EP 管按照下表在冰盒上配制反应液。如有多个样本建议将(除模板外)组分配制成 Mix 再分装, 多配制 0.2 人份。

表 1 RNA 热处理反应体系

组分名称	体积 (μL)	
5×FB Buffer	2	
Ada Primer Mix	1	
无核酸酶水	7-x	
模板 <sup>a</sup>	x	
Total	10	

注 a: 模板可兼容 0.5ng-100ng 投入量, 推荐使用 10ng-50ng 模板投入量 (X=模板投入量÷模板浓度)。

1.3 以上反应体系配完后, 使用移液器轻微吹吸混匀, 瞬时离心。

1.4 将 PCR 管置于 PCR 仪中, 按照下表的程序进行反应:

表 2 RNA 热处理反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105℃	/	/	10μL
1	95℃	5min	1cycle	
2	4℃	∞	/	

### 2. cDNA 合成:

2.1 将 5×RT Buffer 室温或冰面上解冻后震荡混匀，瞬时离心后置于冰盒上备用。RT Enzyme Mix 用手指轻弹混匀后瞬时离心，置于冰上备用。

2.2 使用无菌无核酸酶残留的 0.5mL/1.5mL EP 管按照下表在冰盒上配制反应液。如有多个样本建议将配制成 Mix 再分装，多配制 0.2 人份。

表 3 cDNA 合成反应体系

组分名称	体积 (μL)	
上一步反应产物	10	
5×RT Buffer	4	
RT Enzyme Mix	2	
无核酸酶水	4	
Total	20	

2.3 以上反应体系配完后，使用移液器轻微吹吸混匀，瞬时离心。

2.4 将 PCR 管置于 PCR 仪中，按照下表的程序进行反应：

表 4 cDNA 合成反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105°C	/	/	20μL
1	25°C	2min	1cycle	
2	42°C	20min	1cycle	
3	85°C	5min	1cycle	
4	4°C	∞	/	

### 3. 片段化、接头预扩增

3.1 将 5x FP Buffer 室温或冰面上解冻后震荡混匀，瞬时离心后置于冰盒上备用。FP Enzyme Mix 用手指轻弹混匀后瞬时离心，置于冰上备用

3.2 按下表在冰盒上配制片段化和预扩增反应液，如有多个样本建议将配制成 Mix 再分装，多配制 0.2 人份。。

表 5 片段化、接头预扩增反应体系

组分名称	体积 (μL)	
上一步产物	20	
5x FP Buffer	6	
FP Enzyme Mix	1	
无核酸酶水	3	
Total	30	

备注：此步骤需在冰盒或冰面上操作，以防止片段化酶在常温下提前开始反应。

3.3 使用移液器轻轻吹打混匀或轻微震荡混匀，瞬时离心将管壁反应液离心至管底。根据下表在 PCR 仪上设置程序并启动反应：

表 6 片段化、接头预扩增反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105℃	/	/	30μL
1	30℃	5min	1cycle	
2	95℃	5min	1cycle	
3	95℃	15s	12cycle (程序 3-8)	
4	15℃	50s		
5	25℃	40s		
6	35℃	30s		
7	65℃	40s		
8	75℃	30s		
9	4℃	∞	/	

3.4 实验安全暂停点: 此 PCR 程序结束后, 产物可置于-20°C 短暂保存。

#### 4. 文库扩增

4.1 将 3×Amp DR Buffer 和 Index 引物 (根据需要使用单双端 index 引物, 序列信息见本说明书附表) 从-20°C 取出, 室温或冰面上解冻后震荡混匀, 瞬时离心并置于冰上备用。AmpHifi DR Enzyme 用手指轻弹混匀后瞬时离心, 置于冰上备用。

4.2 按照下表在冰盒上配制文库扩增反应液, 如有多个样本建议将 (除 Index) 外的组分配制成 Mix 再分装, 多配制 0.2 人份。

表 7 文库扩增反应体系

组分名称	体积 (μL)	
预扩增产物	30	
3×Amp DR Buffer	20	
AmpHifi DR Enzyme	1	
Index <sup>b</sup>	3	
无核酸酶水	6	
Total	60	

备注 b: index 接头单独添加。

4.3 将预扩增产物置于冰盒上, 先往产物中添加除 Index 外的文库扩增反应液 Mix (27μL)。再单独往不同样本中添加 3μL 的 Index 引物。

4.4 以上组分添加完成后, 轻微涡旋混匀, 置于掌上离心机上离心 10s。

4.5 使用移液器轻轻吹打混匀或轻微震荡混匀, 将管壁反应液离心至管底。根据下表在 PCR 仪上设置程序并启动反应:

表 8 文库扩增反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
----	----	----	-----	------

热盖	105℃	/	/	60μL
1	95℃	3min	1cycle	
2	95℃	20s	14cycle (程序 2-4)	
3	63℃	30s		
4	72℃	40s		
5	4℃	∞	/	

4.6 实验安全暂停点: 此 PCR 程序结束后, 产物可置于-20°C 短暂保存。

## 5. 文库纯化

- 5.1 提前将 DNA 纯化磁珠从冰箱中取出, 室温平衡 20-30 分钟, 涡旋振荡离心备用。
- 5.2 按照无水乙醇:无核酸酶水=8:2 比例配制成 80%乙醇备用, 例如: 每 8mL 无水乙醇和 2mL 无核酸酶水混合配成 10mL 80%乙醇, 注意: 80%乙醇需现配现用。
- 5.3 往产物中添加 40 μL 的无核酸酶水, 总体积补充至 100 μL。**
- 5.4 振荡混匀纯化磁珠 3 次, 每次 5s, 接着取 45μL (0.45×) 纯化磁珠加入到产物中, 涡旋振荡, 室温静置 5 分钟, 瞬时离心, 将反应管置于磁力架上静置 2min, 或至液体澄清, 用移液器小心吸取上清液至新的离心管中。
- 5.5 往上清液中添加 30μL (0.3×) 纯化磁珠, 涡旋振荡, 室温静置 5 分钟, 瞬时离心, 将反应管置于磁力架上静置 2min, 或至液体澄清, 用移液器小心弃上清液。**
- 5.6 往管中加入 200μL 80%乙醇, 使液面完全盖过磁珠, 将反应管继续留在磁力架上孵育 30s, 用移液器小心吸弃上清。
- 5.7 重复步骤 5.6 一次。
- 5.8 将上述反应管从磁力架取下瞬时离心 3 秒, 再置于磁力架上, 用 10μL 移液器小心吸弃全部废液。注意: 不要触碰到磁珠。
- 5.9 打开上述八联管或 PCR 管管盖, 室温晾干 5 分钟。注意: 如天气干燥, 则观察磁珠表面无明显反光水膜时即可, 无需 5 分钟, 避免磁珠过度干燥。
- 5.10 将上述八联管从磁力架上取下, 加入 22μL 无核酸酶水, 振荡重悬磁珠 5 秒, 重复 2-3 次, 室温静置 2 分钟, 瞬时离心。
- 5.11 将上述八联管或 PCR 管置于磁力架上至溶液澄清, 小心吸取 20μL 上清到新的八联管或 0.2mL PCR 管中, 即为构建好的文库, 文库于-20±5°C 保存, 此条件下可保存 12 个月。

## 6. 文库质检

- 6.1 文库浓度测定: 使用 Qubit 4.0 Fluorometer 及 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测文库浓度。
- 6.2 文库片段分布检测: 将制备好的文库在 LabChip GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer); Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies); Fragment Analyze (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备进行检测或通过琼脂糖凝胶电泳进行片段分布检测。文库片段主要分布在 250-750bp 之间。
- 注: 纯化后的文库若不能立即上机测序, 可置于-20°C 保存。



## 注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
2. 配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀或轻轻振荡，剧烈振荡可能会造成文库产率下降。
3. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
4. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
5. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5% 次氯酸钠或 10% 漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
6. 本产品仅作科研用途！
7. 关于 Index 序列方向说明

- 经本试剂盒构建后带双端 Index 文库结构如图 1 所示（单端 Index 文库不含 I5 Index）

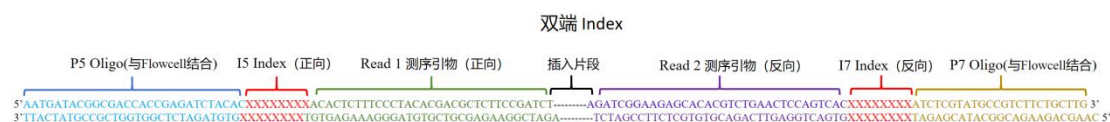


图 1 文库结构图

- 本试剂盒自带 I5 index 的合成方向如下：

5' AATGATACGGCGACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'

- 本试剂盒自带 I7 index 的合成方向如下：

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3'

- 录样时按不同测序平台要求对 I5 和 I7 index 进行填写，**以下为填写建议，最终以实验室使用为准。**

双端 Index	测序平台	I5 端方向（以 B001 为例）	I7 端方向（以 B001 为例）
	NovaSeq、Miseq、HiSeq2000/2500	合成方向（AGCGCTAG）	反向互补（TAAGGCGA）
	iSeq、MiniSeq、NextSeq、HiSeq3000/4000	反向互补（CTAGCGCT）	反向互补（TAAGGCGA）
	真迈平台	合成方向（AGCGCTAG）	反向互补（TAAGGCGA）
	塞陆测序平台	合成方向（AGCGCTAG）	反向互补（TAAGGCGA）
单端 Index	测序平台	I5 端方向（以 Index1 为例）	I7 端方向（以 Index1 为例）
	NovaSeq、Miseq、HiSeq2000/2500	/	反向互补（TAAGGCGA）
	iSeq、MiniSeq、NextSeq、HiSeq3000/4000	/	反向互补（TAAGGCGA）
	真迈平台	/	反向互补（TAAGGCGA）
	塞陆测序平台	/	反向互补（TAAGGCGA）

## 附录：【接头引物序列信息表】

单端 Index 序列信息表

单端接头编号	序列 (5'to3')	单端接头编号	序列 (5'to3')
Index1	TCGCCTTA	Index25	CTATCGCT
Index2	CTAGTACG	Index26	TTAATCGC
Index3	TTCTGCCT	Index27	TTCTGAAT
Index4	GCTCAGGA	Index28	GATTATTC
Index5	AGGAGTCC	Index29	CTGATTAA
Index6	CATGCCTA	Index30	AATGAGCG
Index7	GTAGAGAG	Index31	TTCGCGGA
Index8	CCTCTCTG	Index32	CGAGTAAT
Index9	AGCGTAGC	Index33	TAAGCAGT
Index10	CAGCCTCG	Index34	AGCCGCAT
Index11	TGCCTCTT	Index35	AGAGAGGC
Index12	TCCTCTAC	Index36	CCTACGGC
Index13	TAGATCGC	Index37	CCGCGGTT
Index14	CTCTCTAT	Index38	TTATAACC
Index15	TATCCTCT	Index39	GGACTTGG
Index16	AGAGTAGA	Index40	AAGTCCAA
Index17	GTAAGGAG	Index41	ATCCACTG
Index18	ACTGCATA	Index42	GCTTGTCA
Index19	AAGGAGTA	Index43	CAAGCTAG
Index20	CTAAGCCT	Index44	TGGATCGA
Index21	TCTCCGGA	Index45	AGTTCAGG
Index22	AGCTTCAG	Index46	GACCTGAA
Index23	GAGCTACG	Index47	TCTCTACT
Index24	ACGAATTC	Index48	CTCTCGTC

注: Index 序列方向为引物合成方向

双端 Index 序列信息表

双端 index 引 物编号	I5index 序列 (5'to3')	I7index 序列 (5'to3')	双端 index 引 物编号	I5index 序列 (5'to3')	I7index 序列 (5'to3')
B001	AGCGCTAG	TCGCCTTA	B025	AGCGCTAG	CTATCGCT
B002	GATATCGA	CTAGTACG	B026	GATATCGA	TTAATCGC
B003	CGCAGACG	TTCTGCCT	B027	CGCAGACG	TTCTGAAT
B004	TATGAGTA	GCTCAGGA	B028	TATGAGTA	GATTATTC
B005	AGGTGCGT	AGGAGTCC	B029	AGGTGCGT	CTGATTAA
B006	GAACATAC	CATGCCTA	B030	GAACATAC	AATGAGCG
B007	ACATAGCG	GTAGAGAG	B031	ACATAGCG	TTCGCGGA
B008	GTGCGATA	CCTCTCTG	B032	GTGCGATA	CGAGTAAT
B009	TGCTTATC	AGCGTAGC	B033	TGCTTATC	TAAGCAGT
B010	CCTAATAG	CAGCCTCG	B034	CCTAATAG	AGCCGCAT
B011	GTACGCCA	TGCCTCTT	B035	GTACGCCA	AGAGAGGC
B012	AAGGCGGT	TCCTCTAC	B036	AAGGCGGT	CCTACGGC
B013	AGCGCTAG	TAGATCGC	B037	AGCGCTAG	CCGCGGTT
B014	GATATCGA	CTCTCTAT	B038	GATATCGA	TTATAACC
B015	CGCAGACG	TATCCTCT	B039	CGCAGACG	GGACTTGG
B016	TATGAGTA	AGAGTAGA	B040	TATGAGTA	AAGTCCAA
B017	AGGTGCGT	GTAAGGAG	B041	AGGTGCGT	ATCCACTG
B018	GAACATAC	ACTGCATA	B042	GAACATAC	GCTTGTC A
B019	ACATAGCG	AAGGAGTA	B043	ACATAGCG	CAAGCTAG
B020	GTGCGATA	CTAAGCCT	B044	GTGCGATA	TGGATCGA
B021	TGCTTATC	TCTCCGGA	B045	TGCTTATC	AGTTCAGG
B022	CCTAATAG	AGCTTCAG	B046	CCTAATAG	GACCTGAA
B023	GTACGCCA	GAGCTACG	B047	GTACGCCA	TCTCTACT
B024	AAGGCGGT	ACGAATTC	B048	AAGGCGGT	CTCTCGTC

注：Index 序列方向为引物合成方向。