



产品概述

呼吸道病原体靶向建库试剂盒是基于两轮 PCR 的多重扩增子建库方法，针对上下呼吸道 DNA 和 RNA 病原微生物的高效检测试剂盒。本产品逆转录和第一轮 PCR 反应在一管内同时完成，病原 RNA 不需要单独逆转录后再与病原 DNA 合管建库，可快速、特异地对多个目的区域进行富集，完成多种病原体的文库构建。本试剂盒适用于 Illumina 高通量测序平台。

适用范围

- 本产品适用于呼吸道病原 DNA&RNA 多重扩增建库。
- 兼容不同类型来源的病原模板，例如鼻咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、鼻咽培养物等。

产品信息

产品名称	货号	规格
呼吸道病原体靶向建库试剂盒	BR3C201-01	8T
	BR3C201-03	24T
	BR3C201-06	96T

产品组分

组分名称		8T	24T	96T
A 盒	RT Multip Enzyme	 28μL	84μL	336μL
	RT Multip PCR Buffer	 80μL	240μL	960μL
	AmpHifi RP Enzyme	 12μL	36μL	144μL
	4× Amp RP Buffer	 120μL	360μL	2×720μL
	Primer Mix 1	 48μL	144μL	576μL
	Primer Mix 2	 48μL	144μL	576μL
	Primer Mix 3	 4μL	12μL	48μL
	Negative Control	 16μL	48μL	192μL
	Reference Control	 16μL	48μL	192μL
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 序列信息具体见附录。Index 序列可根据需要定制单端或双端。

保存条件

-20℃保存，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

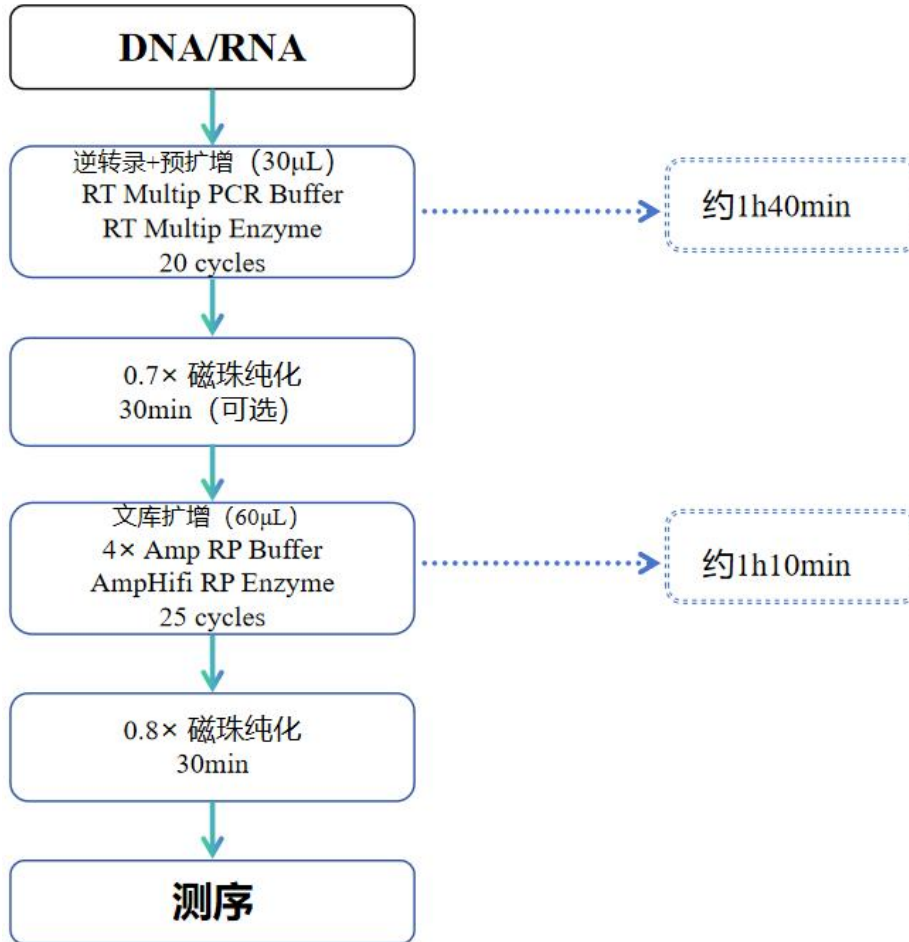
需自备的试剂：磁珠法病原微生物 DNA&RNA 共提取试剂盒（BioRi #NP504）、无核

酸酶水(DNase、RNase free)、DNA 纯化筛选磁珠、无水乙醇(分析纯)等。

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、微型离心机等。

需要自备的耗材包括: 0.5mL Qubit 管、1.5mL 离心管、0.2mL PCR 管、枪头、50mL 离心管等。

操作流程



使用方法

1. 一步法逆转录和扩增

1.1 将 RT Multip PCR Buffer 室温或冰面上解冻后, 轻微震荡混匀后瞬时离心。RT Multip Enzyme 用手指轻弹混匀瞬时离心后置于冰上备用。根据临床样本数量 N 计算各组分添加量, 计算公式为: 各组分体积 $\times (N+1+0.2)$, 其中 1 代表阴性质控品 Negative Control, 0.2 表示液体富余量, 保证各反应分装时液体足够。如第一轮多重扩增后进行纯化, 则按照表 1 在 RNase-free 离心管中配制反应液; 如第一轮多重扩增后选择不纯化直接进行文库扩增, 则按照表 2 进行反应体系配制:

表 1 RT PCR 反应体系 (产物纯化体系)

组分名称	体积 (μL)	
RT Multip PCR Buffer	10	
RT Multip Enzyme	3.5	
Primer Mix 1	6	
Reference Control	2	
RNase-free ddH ₂ O	8.5-X	
模板 ^a	X	
Total	30	

表 2 RT PCR 反应体系 (产物不纯化体系)

组分名称	体积 (μL)	
RT Multip PCR Buffer	3.3	
RT Multip Enzyme	1.2	
Primer Mix 1	2	
Reference Control	2	
RNase-free ddH ₂ O	1.5-X	
模板 ^a	X	
Total	10	

注: a 模板总量按照实验实际需要添加, 可兼容 0.5-500ng 核酸投入量。

1.2 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将管壁反应液离心至管底, 在 PCR 仪上进行如下反应:

表 3 反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105℃	/	/	10μL（不纯化） 30μL（纯化）
1	50℃	15min	1 cycle	
2	95℃	3min	1 cycle	
3	95℃	30s	5 cycle (程序 3-5)	
4	62℃	2min		
5	72℃	30s		
6	95℃	30s	15 cycle (程序 6-8)	
7	58℃	2min		
8	72℃	30s		
9	72℃	1min	1cycle	
10	4℃	∞	/	

1.3 反应结束后, 提供两种可选的文库扩增方案, 其一为扩增产物纯化后进行文库扩增 (使用表 1 反应体系), 此为推荐方案, 进行第 2 步操作后进行第 4 步文库扩增; 其二为扩增产物不纯化, 直接执行第 4 步文库扩增。两种方案的性能差异见【性能】内容。

2. 扩增产物磁珠纯化 (推荐选项)

- 2.1 扩增结束后, 推荐纯化, 若不纯化, 直接将扩增结束后产物加入文库扩增体系。
- 2.2 扩增产物补水至 50 μ L, 涡旋混匀室温平衡 30min 的 DNA 磁珠, 添加 0.7 $\times$ (35 μ L) 磁珠至 PCR 产物中, 涡旋混匀, 室温静置 5min;
- 2.3 短暂离心, 将样本置于磁力架上 2min 至液体澄清, 小心吸弃上清;
- 2.4 加入 200 μ L 80%乙醇, 静置 10s, 小心吸弃上清;
- 2.5 重复步骤 2.4 一次;
- 2.6 短暂离心后, 小心吸弃残液, 室温烘干至磁珠表面哑光;
- 2.7 加入 30 μ L 无核酸酶水, 涡旋混匀 10s, 确保磁珠混匀, 室温静置 2min;
- 2.8 短暂低速离心后置于磁力架上 2min 至液体澄清, 小心吸取 25 μ L 上清溶液至下一步文库扩增反应体系中。

3. 扩增产物不纯化直接文库扩增 (可选项)

3.1 第 1 步多重扩增结束后 (使用表 2 反应体系), 将产物从 PCR 仪上取下置于冰盒上。第 4 步的文库扩增反应液配制完成后, 分别往多重产物 PCR 管中添加相应体积的文库扩增反应液, 移液器吹打混匀后, 瞬时离心, 将 PCR 管置于 PCR 仪上, 按照文库扩增程序进行文库扩增。

4. 文库扩增

4.1 将 4 $\times$ Amp RP Buffer 室温或冰面上解冻后, 轻微震荡混匀后瞬时离心。AmpHifi RP Enzyme 用手指轻弹混匀瞬时离心后置于冰上备用。按照表 4 在 RNase-free 离心管中配制反应液:

表 4 文库扩增反应体系

组分名称	体积 (μ L)	备注
上一步扩增产物 ^b	25/10	纯化或不纯化产物
4 $\times$ Amp RP Buffer	15	
AmpHifi RP Enzyme	1.5	
Primer Mix 2	6	
Primer Mix 3	0.5	
Index ^c	3	
RNase-free ddH ₂ O	9/24	纯化产物加 9 μ L 水
Total	60	

注 b: 若第一轮扩增结束后纯化, 加入纯化后产物 25 μ L, 若产物不纯化, 则 10 μ L 产物直接文库扩增。

注 c: 本试剂盒提供 illumina 平台测序接头, 具体序列信息详见附录。

4.2 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将管壁反应液离心至管底，在 PCR 仪上进行如下反应：

表 5 反应程序

程序	温度	时间	循环数	反应体积
热盖	105℃	/	/	60μL
1	95℃	3min	1 cycle	
2	95℃	30s	5 cycle (程序 2-4)	
3	60℃	35s		
4	72℃	30s		
5	95℃	30s	20 cycle (程序 5-6)	
6	68℃	1min		
7	72℃	5min	1 cycle	
8	4℃	∞	/	

5. 文库磁珠纯化

- 5.1 扩增结束后，补水至 100μL，涡旋混匀室温平衡 30min 的 DNA 磁珠，添加 0.8×磁珠至 PCR 产物中，涡旋混匀，室温静置 5min；
- 5.2 短暂离心，将样本置于磁力架上 2min 至液体澄清，小心吸弃上清；
- 5.3 加入 200μL 80%乙醇，静置 10s，小心吸弃上清；
- 5.4 重复步骤 5.3 一次；
- 5.5 短暂离心后，小心吸弃残液，室温烘干至磁珠表面哑光；
- 5.6 加入 22μL 无核酸酶水，涡旋混匀 10s，确保磁珠混匀，室温静置 2min；
- 5.7 短暂离心后置于磁力架上 2min 至液体澄清，小心吸取 20μL 上清溶液至新的离心管中。

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，浓度≥1ng/μL 方可进行后续实验。
 - 6.2 文库片段分布检测：将制备好的文库在 Qsep1 全自动核酸蛋白分析仪上或通过琼脂糖凝胶电泳进行片段分布检测，200bp~500bp 范围内应有明显条带。
- 注：**纯化后的文库若不能立即上机测序，可置于-20℃保存。

7. 文库定量

7.1 文库定量

- 7.1.1 推荐使用 qPCR 进行准确文库定量，使用 qPCR 定量时，按照 qPCR 定量试剂盒说明书进行文库定量，文库平均大小可按 350bp 进行计算。
- 7.1.2 如使用 Qubit4.0 质量浓度进行摩尔浓度换算定量时，建议使用如下公式进行换算：



文库摩尔浓度 (nM)≈文库浓度*10⁶/ [660× DNA 平均长度 (350bp)]/摩尔系数，其中，第一轮多重产物纯化后进行文库扩增，则摩尔系数=2；第一轮多重产物不纯化，直接进行文库扩增，则摩尔系数=3。

注：由于 tNGS 引物用量大，单次磁珠纯化不能完全去除引物残留，残留引物不影响测序，因此，使用质量浓度换算摩尔浓度时，需除以摩尔系数。摩尔系数可根据第一次测序数据产出进行适当调整。

7.2 推荐按照下列计算公式对文库进行 pooling：文库取样体积=样本投入量(nM)/文库摩尔浓度 (nM)。每个文库测序数据量建议≥2M。

性能参考

参考品病原	病原qPCR检测CT值			实验编号与样本类型				
				2	3	4	9	11
	阳性参考品2	检测限参考品1	检测限参考品2	阳性参考品2	检测限参考品1	检测限参考品2	阳性参考品2	阳性参考品2
数据处理：100k reads均一化数据 (0.1M)								
肺炎支原体	30.4	32.9	35.1	430	137	39	689	716
大肠埃希菌	31.5	34.2	35.2	1923	755	381	184	133
肺炎克雷伯菌	31.4	33.4	37	3316	1183	215	1923	1799
铜绿假单胞菌	40	NoCt	NoCt	259	88	23	279	241
新型冠状病毒	31.9	33.9	37.8	100	40	3	68	48
白色念珠菌	31.8	34.2	36.2	1991	485	156	1467	766
外参	33	33	33	55685	55351	57451	8565	6745
人源背景	10 ⁵ copies/mL							

注：实验方案：编号2-4为第一轮纯化体系；编号9/11为第一轮不纯化体系，其中9取3uL不纯化产物进行文库扩增，11取100%不纯化产物进行文库扩增

注意事项

1. 请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清理。
2. 文库构建所需要的其他试剂需自备或另外购买。
3. 本产品仅用作科研用途。
4. 本产品提供单独 index 或双端 index 选择，根据附录单双端 index 进行确认。
5. 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）
- 双端 Index

P5 Oligo(与Flowcell结合)

I5 Index (正向)

Read 1 测序引物 (正向)

插入片段

Read 2 测序引物 (反向)

I7 Index (反向)

P7 Oligo(与Flowcell结合)

5'AATGATACGGCGACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT3'
3'TTACTATGCGCTGGTGCTCTAGATGTGXXXXXXXXXGTGTGAGAAAGGAGTGTGCTGCGAAGAGCTAGA-----TCTAGCTTCTCGTGTGACAGCTGAGGTGAGTGTGXXXXXXXXXAGAGCATACGGCGAGAGACGAAC5'
- 图 1 文库结构图
- 本试剂盒自带 I5 index 的合成方向如下：

5'AATGATACGGCGACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT3'
- 本试剂盒自带 I7 index 的合成方向如下：

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT3'
- 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

双端接头 编号	I5 index 序列 (5'to3')	I7 index 序列 (5'to3')	双端接头 编号	I5 index 序列 (5'to3')	I7 index 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	GCTTGTCA
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。