

Reseq 实验流程材料方法 (BMK-20210416 版)

一、提取方法：

使用 CTAB 法完成核酸的提取。

备注：常规植物组织提取正常使用 CTAB 提取，疑难植物（蔷薇科等多糖类植物）组织裂解前使用干扰物（清洗掉部分多糖等杂质）先清洗，清洗完之后在加裂解液；动物组织在裂解时加入 2% 的蛋白酶 K；宏基因组项目提取在裂解时加入 5%-10% 的溶菌酶。

样品处理

液氮预冷钢珠。

取大拇指甲大小的新鲜或冷冻植物组织（约 1 cm²）样品移至国产 2ml 的离心管中，加入预冷的钢珠，将取好的组织样放在液氮中。

将研磨仪的卡槽及夹板放入液氮预冷 1min，取出，将带钢珠的样品放入卡，然后将卡槽的夹板对应夹住卡槽，放入液氮冷却 10-15s。

1500rpm，研磨 40s，研磨完成后将卡槽带着两个夹板一起放入液氮中冷冻 10s-15s，取出将样品放到干冰上保存。

注意事项：一次研磨时间<40s，如果样品研磨困难，研磨 40s 后取出液氮冷冻后再进行二次研磨，直至研磨充分。

（2）将装有样品的离心管加入 1 ml 65 °C 预热的 CTAB 提取液和 2% 的巯基乙醇（如果是动物组织的话加 50ul 浓度为 20mg/ml 的蛋白酶 K），在涡旋振荡仪上震荡混匀，使样品完全悬浮，65 °C 烘箱温浴 40-60min，不能超过 1h。

（3）温浴期间摇匀 2-3 次，保证裂解充分。取出后，冷却至室温。

（4）12000 rpm 离心 5 min，取上清液 900ul 至新的 2.0 ml 无菌离心管中（。加入等体积三氯甲烷/异戊醇（24:1），上下颠倒混匀， 12000 rpm 离心 20 min。

（5）吸取上清液 700 ul 至新的 2.0 ml 无菌离心管，加入等体积三氯甲烷-异戊醇（24:1），上下颠倒混匀， 12000 rpm 离心 20 min。

（6）吸取上清液 450 ul 至新的 1.5 ml 无菌离心管中，加入上清液体积的 2/3 体积（300ul）的异丙醇和 1/10 体积（45ul）的 3M 乙酸钠，充分混匀，-20 °C 放置 1 h。

（7）12000rpm 离心 10min（如果从-20℃取出后絮状沉淀较多，可 12000rpm 离心 20s），弃上清，瞬

时离心，用 200ul 枪头吸弃多余液体。

(8) 向沉淀中加 1ml 75%的乙醇溶液，轻弹至沉淀悬浮，12000rpm 离心 5min，弃上清。

(9) 瞬时离心，用黄枪头吸弃多余液体，离心管开盖室温晾干 3-5min 至 DNA 沉淀呈半透明状。

(10) 加入 ≥ 20 ul 含 10 ng/ul RnaseA 的超纯水，根据沉淀大小决定融水体积，溶解 DNA 沉淀，37 °C 水浴锅消化 1 h 后保存在-20 °C 冰箱备用。

二、检测方法:

检测方法：使用 Qubit（厂家 invitrogen, 型号 Qubit3.0，试剂 Qubit TM dsDNA HS Assay Kit）对于提取的核酸进行浓度检测，并使用琼脂糖电泳对完整性进行检测，1%琼脂糖凝胶，。

合格指标：浓度 ≥ 5 ng/ul，总量大于等于 0.5ug，完整性主要弥散带在 5kb 以上，下面无明显杂质，核酸状态正常。

三、建库方法:

（一）、基因组打断

1、实验前，打开冷却循环组件上的温控开关，温度设置为 4°C，使循环水降温至 4°C

2、基因组打断

(1) 取适量基因组 DNA（Qubit 定量）移入 0.6mL 进口离心管，用 1×TE 补至总体积 60μL（冰上操作）

(2) 按照对称关系，将 0.6mL 进口离心管放入 0.65mL 适配器，旋紧

(3) 根据片段大小按照相应的打断条件启动打断

3、打断产物的判断

瞬时离心收集打断产物，取 6ul 打断产物电泳，检测在相应片段范围内主产物是否集中

4、打断产物纯化

(1) 将诺唯赞 DNA clean beads 提前 30min 室温平衡备用

(2) 将剩余打断产物转入 1.5mL 离心管中，加入（1X）体积已混匀的磁珠，吹吸混匀；

(3) 旋转混匀仪上，室温混匀，瞬时离心，而后置于磁力架上，静置，移弃上清液；

(4) 离心管置于磁力架上，向离心管中加入新鲜配制的 80%乙醇，磁力架上静置 30s，移弃上清液；

(5) 重复步骤（4）一次，第二次清洗后，瞬时离心，用 10 μL 枪头将上清液去除干净；

(6) 离心管置于磁力架上，打开管盖，室温干燥至磁珠表面无光泽，有细微裂纹；

(7) 取下离心管，加入 $0.1 \times TE$ ，吹吸混匀，室温静置，而后磁力架上静置，吸取上清液转入新的 0.2mL PCR 管中；

(二) 末端修复及加 A

向上述纯化产物中加入 **End Prep Mix 4**，混匀离心后放入 PCR 仪中进行反应，反应结束后，立即进行接头连接。

(三) 接头连接

在上述反应产物中加入 **Rapid ligation Buffer 2**、接头和连接酶，放入 PCR 仪中进行接头连接的反应。

(四) 连接产物片段分选纯化

- 1、向连接产物中加入一定体积的磁珠，充分混匀，室温孵育后置于磁力架上，静置，小心移除上清
- 2、向管中加入新鲜配制的 80%乙醇，磁力架上静置 30s，移弃上清液
- 3、重复步骤 2 一次，第二次清洗后，瞬时离心，用 $10\mu\text{L}$ 枪头将上清液去除干净
- 4、反应管置于磁力架上，打开管盖，空气干燥，至磁珠表面无光泽，有细微裂纹
- 5、将反应管从磁力架上取出，加入 $0.1 \times TE$ 洗脱 DNA，吹吸混匀，室温静置孵育，而后磁力架上静置，小心吸取上清至新的离心管中
- 6、吸取相应体积 ($0.6 \times$) 磁珠至步骤 5 的纯化产物中，轻轻吹吸充分混匀，室温孵育后置于磁力架上，静置，小心吸取上清液至新的离心管中，取相应体积 ($0.15 \times$) 磁珠至上清液中，轻轻吹吸充分混匀，室温孵育后置于磁力架上，静置，小心移除上清
- 7、向反应管中加入新鲜配制的 80%乙醇，磁力架上静置 30s，移弃上清液，重复该步骤 1 次
- 8、打开管盖，空气干燥至磁珠表面无光泽，有细微裂纹，加入 $0.1 \times TE$ 洗脱 DNA，吹吸混匀，室温静置，磁力架上静置，小心吸取上清至新的 PCR 管中

(五) PCR 扩增

- 1、加入 PCR 反应所需的各种试剂，混匀，离心
- 2、根据 PCR 反应条件，放入 PCR 仪中进行 PCR 扩增

(六) PCR 产物的纯化

- 1、瞬时离心 PCR 反应管，加入相应体积的磁珠，充分混匀
- 2、室温孵育，然后置于磁力架上静置，小心移除上清
- 3、向反应管中加入新鲜配制的 80%乙醇，磁力架上静置 30s，移弃上清液，重复该步骤 1 次

4、打开管盖，空气干燥至磁珠表面无光泽，有细微裂纹，加入 ddH₂O 洗脱 DNA，吹吸混匀，室温静置，磁力架上静置，小心吸取上清至新的 1.5ml 的离心管中，-20℃ 保存备用。

（七）、文库质检

文库通过 Qsep-400 进行片段质检，使用 Qubit 3.0 进行文库浓度的定量，满足如下指标即可上机检测。
浓度 ≥ 1ng/ul，质检片段中心值 430-530bp，平均值 420-580bp 之间，峰型呈正态分布，片段单一无杂峰。

附录信息：

引物接头：

引物序列：adpter3="AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC";
adpter5="AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT";

实验所需的主要试剂

- 1、文库构建试剂盒：VAHTSTM Universal DNA Library Pren Kit，货号 ND607-02
- 2、产物纯化磁珠：VAHTSTM DNA Clean Beads，货号 N411-03

所有用到的仪器（品牌、型号、生产厂家）：

PCR 仪：艾本德 Eppendorf、eppendorf6333、艾本德 Eppendorf

金属浴：天根生化科技（北京）有限公司、OSE-DB-02、天根生化科技（北京）有限公司

掌上离心机：天根生化科技（北京）有限公司、OSE-MC8、天根生化科技（北京）有限公司

漩涡震荡器：SCIENTIFICINDUSTRIES.INC、G560E、SCIENTIFICINDUSTRIES.INC

移液枪：RAININ 瑞宁

磁力架：Life

相机：索尼

冰箱：海尔

四维旋转仪：海门市其林贝尔仪器制造有限公司、BE-1100

耗材：

1.5ml 离心管：Axygen

0.2ml PCR 管：Axygen

10ul, 200ul 枪头：Axygen

四、测序方法

对于构建好的文库使用 illumina novaseq6000（产地圣迭戈（San Diego））进行上机测序。测序使用试剂盒

NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit（产地圣迭戈（San Diego））。

保密说明：此文档仅限与 **BMK** 有项目合作的客户使用，不得随意外传，谢谢！

望您遵守及谅解！

百迈客