

宏基因组实验流程材料酶切方法

(BMK-20210607 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动物（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。

取大约 500mg 组织样品移至国产 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%的巯基乙醇和 10%的溶菌酶，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 ≥ 1 ng/ul，总量大于等于 0.1ug，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)、基因组酶切打断及末端修复

1、取基因组 DNA 10ng (Qubit 定量) 移入 96 孔板中，用 Unclease-free Water 补至相应的体积，最后加入相应的酶切试剂 (冰上操作)，使用移液器吹打混匀，瞬时离心，立即至于 PCR 仪中进行反应。

2、向酶切产物中加 **Rapid Ligation Buffer** 3、连接酶以及 index，吹吸混匀并瞬时离心，放入 PCR 仪中进行反应。

(二)、连接产物纯化

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 μ 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 Unclease-free Water 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 PCR 管中

(三) 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

(四) PCR 产物片段筛选

1、瞬时离心 PCR 反应管，加入相应体积(0.6 $\times$)的磁珠，充分混匀

2、室温孵育，然后置于磁力架上静置，小心转移上清液至新的 PCR 管中

3、吸取相应体积 (0.12×)磁珠至步骤 2 的上清液中，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

4、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

5、打开管盖，空气干燥至磁珠表面无光泽，有细微裂纹，加入 Unclease-free Water 洗脱 文库，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。

（五）、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 $\geq 1\text{ng}/\mu\text{l}$ ，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：VAHTS® Universal Plus DNA Library Pren Kit for Illumina，货号 ND617-C3-02

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！