

## Pacbio 基因组实验方法

(BMK-20210416 版)

### 一、提取方法:

#### A.植物: CTAB 法(此方法试用于大部分植物)

##### 1. 所用试剂 CTAB:

氯仿/异戊醇(24:1)、异丙醇(国产自配)、乙酸钠溶液(国产自配) 75%乙醇(国产自配)、TE(国产自配)

##### 2. 实验步骤:

- 2.1. 液氮研磨样品, 分装至离心管中;
- 2.2. 向离心管中加入 CTAB, 水浴;
- 2.3. 离心后向上清中加入氯仿/异戊醇(24:1), 离心;
- 2.4. 向上清中加入异丙醇和乙酸钠溶液, 离心, 弃上清;
- 2.5. 加入 75%乙醇, 离心, 弃上清;
- 2.6. 晾干, 加入 TE 溶解 DNA, 保存在-20℃冰箱。

#### B1.动物组织: SDS 法(此方法试用于大部分动物)

##### 1. 所用试剂:

SDS 溶液氯仿/异戊醇(24:1)、NaCl 溶液 75%乙醇 Rnase、水

##### 2. 实验步骤:

- 1.1. 液氮研磨组织样, 分装至离心管中;
- 1.2. 加入 SDS 溶液, 水浴;
- 1.3. 加入 NaCl 溶液, 静置后离心;
- 1.4. 向上清中加入氯仿/异戊醇(24:1)后离心;
- 1.5. 向上清中加入异丙醇后离心, 弃上清;
- 1.6. 加入 75%乙醇, 离心, 弃上清;
- 2.7. 晾干, 加入 TE 溶解 DNA, 保存在-20℃冰箱。

## B2.动物血液：Kurabo 试剂盒法（此方法试用于大部分血液）

QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)，厂家：Kurabo，货号：40321300101

## C. QIAGEN Genomic-tip 20/G 或 QIAGEN Genomic-tip 100/G 试剂盒法

试剂盒名称：QIAGEN Genomic-tip 20/G，厂家：QIAGEN，货号：10223

试剂盒名称：QIAGEN Genomic-tip 20/G，厂家：QIAGEN，货号：10243

## D.微生物样本：

使用TGuide S96磁珠法土壤/粪便基因组DNA提取试剂盒完成核酸的提取（适用于大部分微生物样品）。

## 二、检测指标

检测方法：使用 Nanodrop（厂家：赛默飞世 Thermo 基因公司，型号 NANODROP2000）、Qubit（厂家：invitrogen，型号：QubitTM3Fluorometer）对提取的核酸进行浓度检测，并使用琼脂糖凝胶电泳（电泳仪厂家天能 Tanon，型号 EPS600；电泳槽厂家：天根生化科技（北京）有限公司，型号：HE-120）对完整性进行检测。

合格指标：

| 产品类型   | Level | c(ng/<br>uL) | m(ug)                                                      | OD260/<br>280 | OD26<br>0/230 | AGE                                 | N/Q     | 外观               |
|--------|-------|--------------|------------------------------------------------------------|---------------|---------------|-------------------------------------|---------|------------------|
| Denovo | A     | ≥150         | 满足按数据量<br>计算对总量要<br>求，一般按<br>15ug DNA 可<br>产出 50G 数据<br>计算 | 1.8-2.2       | 1.8-2.5       | size≥23K，降解条<br>带>5K，点样孔无<br>或有轻微污染 | 0.9-2.0 | 无颜<br>色、无<br>沉淀物 |
|        | B+    | ≥150         | 不完全满足按<br>数据量计算总<br>量要求                                    | 1.8-2.2       | 1.8-2.5       | size≥23K，降解条<br>带>5K，点样孔无<br>或有轻微污染 | 0.9-2.0 | 无颜<br>色、无<br>沉淀物 |

m: 总量（Total quantity），DNA 的总质量

c: 浓度（Concentration），DNA 溶液的 Qubit 检测浓度

N/Q: Nanodrop 检测浓度与 Qubit 检测浓度的比值

Size: 片段大小（Fragment size），指 DNA 分子片段主带大小

OD260/280: Nanodrop 检测中 OD260 和 OD280 的比值，反映 DNA 纯度的指标之一

OD260/230: Nanodrop 检测中 OD260 和 OD230 的比值，反映 DNA 纯度的指标之一

## 三、建库方法

### 1.DNA 打断（For 15 kb 文库）

（1）加入 15 μg gDNA，补 Elution Buffer 至 180 μL，将 gDNA 样品稀释到终浓度为 83.3 ng/μL

- (2) 小心转移到 g-TUBE 管中，4000 rpm 离心 2 分钟
- (3) 重复离心，直至全部 gDNA 样品通过 g-TUBE 孔洞
- (4) 倒置 g-TUBE 管，离心 2 分钟
- (5) 重复离心，直至全部 gDNA 样品通过 g-TUBE 孔洞，重复 6 次过孔
- (6) 收集打断好的 gDNA 样品于新的 1.5 mL 低吸附离心管中
- (7) 2100 仪器检测打断好的 gDNA 片段大小

## 2.PB 纯化：

- (1) 将 gDNA 样品稀释到 100  $\mu$  L，若体积超过 100  $\mu$  L，则不需要稀释
- (2) 向样品中加入 0.45\*体积的 AMPure PB 磁珠（室温平衡 30 分钟）
- (3) 使用宽口枪头轻轻吹打 15 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒
- (4) 室温放置 30 分钟，瞬离 1 秒
- (5) 转移离心管到磁力架上，直至磁珠完全吸附，将上清液转移到新管，备用
- (6) 使用 1.5ml 新配的 80%酒精洗涤磁珠，30 秒后弃掉酒精，重复一次
- (7) 瞬离 1s，将酒精弃净
- (8) 向管中加入 100  $\mu$  L 1X Elution Buffer，使用宽口枪头轻轻吹打 15 次，进行混匀
- (9) 10-15 分钟溶解 DNA，瞬离 1 秒
- (10) 吸取 100  $\mu$  L 上清液于新的 1.5 mL 低吸附离心管中。
- (11) 1 取 1  $\mu$  L 稀释 5 倍，使用 Qubit 进行浓度测定。纯化后 DNA 样品可以在 4℃ 保存 2 个周，可以长期保存于 -20℃，但避免反复冻融。

## 3.去除单链悬突：

- (1) 1  $\mu$  L DNA Prep Additive 加入 4  $\mu$  L Enzyme Dilution Buffer。
- (2) 分别加入以下试剂：

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| DNA Prep Buffer           | 14L        |
| Sheared DNA               | 90 $\mu$ L |
| NAD                       | 2 $\mu$ L  |
| Diluted DNA Prep Additive | 2 $\mu$ L  |
| DNA Prep Enzyme           | 2 $\mu$ L  |

- (3) 使用宽口枪头轻轻吹打 10 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒
- (4) 37℃ 孵育 15 分钟，然后重新放回冰盒中，继续下步反应

#### 4.DNA 损伤修复：

(1) 分别加入以下试剂：

|                          |             |
|--------------------------|-------------|
| Reaction Mix 1           | 110 $\mu$ L |
| DNA Damage Repair Mix v2 | 4 $\mu$ L   |

(2) 2、使用宽口枪头轻轻吹打 10 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒

(3) 3、37℃孵育 30 分钟，然后重新放回冰盒中，继续下步反应

#### 5.末端修复/加 A：

(1) 分别加入以下试剂：

|                |             |
|----------------|-------------|
| Reaction Mix 2 | 114 $\mu$ L |
| End Prep Mix   | 6 $\mu$ L   |

(2) 使用宽口枪头轻轻吹打 10 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒

(3) 20℃孵育 10 分钟，65℃孵育 30 分钟，然后重新放回冰盒中，继续下步反应

#### 6.接头连接：

(1) 分别加入以下试剂：

|                     |             |
|---------------------|-------------|
| Reaction Mix 3      | 120 $\mu$ L |
| Overhang Adapter v3 | 10 $\mu$ L  |
| igation Mix         | 60 $\mu$ L  |
| Ligation Additive   | 2 $\mu$ L   |
| Ligation Enhancer   | 2 $\mu$ L   |

(2) 使用宽口枪头轻轻吹打 10 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒

20℃孵育 60 分钟，65℃孵育 10 分钟，然后重新放回冰盒中，继续下步反应

#### 7.酶处理：

(1) 分别加入以下试剂：

|                |             |
|----------------|-------------|
| Reaction Mix 4 | 194 $\mu$ L |
| Enzyme A       | 8 $\mu$ L   |
| Enzyme B       | 2 $\mu$ L   |
| Enzyme C       | 2 $\mu$ L   |
| Enzyme D       | 4 $\mu$ L   |

使用宽口枪头轻轻吹打 10 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒

(2) 37℃ 孵育 60 分钟然后重新放回冰盒中，继续下步反应

## 8.PB 纯化：

(3) 向 210  $\mu$  L 反应液 4 中加入 0.45\* 的 AMPure PB 磁珠（室温平衡 30 分钟）。

(4) 使用宽口枪头轻轻吹打 15 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒

(5) 室温放置 30 分钟，瞬离 1 秒

(6) 转移离心管到磁力架上，直至磁珠完全吸附，将上清液转移到新离，备用

(7) 使用 1.5ml 新配的 80%酒精洗涤磁珠，30 秒后弃掉酒精，重复一次

(8) 瞬离 1s，将酒精弃净

(9) 向管中加入 1X Elution Buffer，使用宽口枪头轻轻吹打 15 次，进行混匀

|         |                           |
|---------|---------------------------|
| 需要片段筛选  | 31 $\mu$ L Elution Buffer |
| 不需要片段筛选 | 11 $\mu$ L Elution Buffer |

(10) 室温 10-15 分钟溶解 DNA，瞬离 1 秒

(11) 吸取上清液于新的 1.5 mL 低吸附离心管中。

(12) 取 1  $\mu$  L 稀释 5 倍，使用 Qubit 进行浓度测定。纯化后 DNA 样品可以在 4℃ 保存 2 个周，可以长期保存于 -20℃，但避免反复冻融。

## 9.片段选择（BluePippin）：

(1) 向 30  $\mu$  L DNA 样品中加入 10  $\mu$  L Loading Solution（室温平衡 10 分）

(2) 选择适合的程序进行切胶。

(3) 收集回收液于新的 1.5 mL 的离心管中，向回收孔中加 40  $\mu$  L 0.1% TWEEN-20

(4) 溶解 10 分钟，反复吹打混匀 10 次，加入上述离心管中，续下步反应。

## 10.PB 纯化：

(1) 向 80  $\mu$  L 中加入 40  $\mu$  L (1\*) 的 AMPure PB 磁珠（室温平衡 30 分钟）。

(2) 使用宽口枪头轻轻吹打 15 次，混匀上述样品，瞬离 1 秒

(3) 室温放置 30 分钟，瞬离 1 秒

(4) 转移离心管到磁力架上，直至磁珠完全吸附，将上清液转移到新离，备用

(5) 使用 1.5ml 新配的 80%酒精洗涤磁珠，30 秒后弃掉酒精，重复一次

(6) 瞬离 1s，将酒精弃净

(7) 向管中加入 11  $\mu$  L 1X Elution Buffer，使用宽口枪头轻轻吹打 15 次，进行混匀

- (8) 室温放置 10-15 分钟溶解 DNA，瞬离 1 秒
- (9) 吸取 11  $\mu$ L 上清液于新的 1.5 mL 低吸附离心管中。
- (10) 取 1  $\mu$ L 稀释 5 倍，使用 Qubit 进行浓度测定。
- (11) 0.6%琼脂糖胶/2100 进行片段大小检测
- (12) 检测合格的文库，保存于 4℃

#### 四、测序方法

最终文库通过浓度（Qubit）及大小（Agilent 2100）的检测，总量需要大于 Smrtlink 计算值；

使用 PacBio Binding kit (Pacbio, USA) 对上机文库进行上机前的结合，使文库结合上 Primer (Pacbio, USA) 及 Polymerase (Pacbio, USA)；将最终的反应产物进行 AMPure PB Beads (Pacbio, USA) 纯化后置于 Sequel II (Pacbio, USA) 测序仪上进行上机测序；

#### 四、附录

接头引物序列：

试剂与仪器：

检测建库实验所需试剂

| 物料名称                                                                      | 厂家       | 存货代码        | 规格          |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|-------------|-------------|
| SMRTbell® Express Template Prep Kit 2.0                                   | PACBIO   | 100-938-900 | 18 次/盒      |
| g-TUBE                                                                    | Covaris  | g-TUBE      | 10 个/盒      |
| SMRTbell Enzyme Clean Up Kit                                              | PACBIO   | 101-746-400 | 18 次/盒      |
| DNA 预制胶试剂盒 (1-18K)                                                        | ELF sage | ELD7510     | 10 块/箱      |
| 2100 芯片及试剂 DNA                                                            | Agilent  | 5067-1508   | 25 张/箱      |
| Quant-iT™ Mds DNA HS Reagent and HS Buffer                                | 英潍捷基     | Q32854      | 500 次/盒     |
| AMPure PB (5ml)(纯化磁珠)                                                     | PACBIO   | 100-265-900 | 5ml/瓶       |
| sequel II binding kit2.0andintemal control1.0kitbinding2.0for insert> 3kb | PACBIO   | 101-842-900 | 200ul/盒     |
| Sequel II Sequencing 2.0 Bundle (5 pack of 4 rxn plates)                  | PACBIO   | 101-849-000 | 20 次/bundle |
| SMRT Cell 8M                                                              | PACBIO   | 101-389-001 | 4 张/盒       |

## 实验所需仪器

| 仪器名称       | 生产厂家                     | 型号                    |
|------------|--------------------------|-----------------------|
| 瞬时离心机      | 天根生化科技（北京）有限公司           | OSE-MC8               |
| - 20℃度冰箱   | 青岛海尔特种电冰柜有限公司            | BC/BD-629HK           |
| 4℃ 冰箱      | 海尔                       | HYC-360               |
| 涡旋振荡器      | SCIENTIFICINDUSTRIES.INC | vortex-2G560E         |
| 基因扩增仪      | Appliedbiosystems        | veriti96well9902      |
| Megaruptor | Megaruptor               | Megaruptor 2.0        |
| 恒温金属浴      | Eppendorf                | ThermoMixer F1.5      |
| 磁力架        | 赛默飞世尔                    | DynaMag96Side skirted |

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！  
请您遵守及谅解！