

Reseq-ONT(20K)实验流程材料方法 (BMK-20210413 版)

一、提取方法:

A. CTAB 法

1. 所用试剂

试剂名称	厂家
CTAB	国产自配
氯仿/异戊醇 (24:1)	国产自配
异丙醇	国产
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

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

B. QIAGEN Genomic-tip 20/G 试剂盒法

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

二、检测方法:

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:

质量基本满足建库要求: 总量 ≥ 1.5 , 浓度 ≥ 50 (ng/ul), OD260/280 在 1.7-2.2 之间, OD260/230 在 1.7-2.5 之间, AGE: size ≥ 23 K, 降解条带 > 5 K, 点样孔无或有轻微污染, N/Q 在 0.9-2.0 之间, 样本粘稠、颜色异常、有浑浊或不溶物均不合格。特殊物种实验人员会根据经验进行判断, 具体请您以您的检测报告中的判断结果为准!

三、建库方法：

1. 建库流程：

- (1) 准备高质量核酸 2ug；
- (2) G-TUBE 管使核酸片段化
- (3) 使用 NEBNext FFPE DNA Repair Mix 和 NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module 完成核酸片段的损伤修复和末端修复加 A；
- (4) 使用无扩增条形码扩展试剂盒 1-12 或无扩增条形码扩展试剂盒 13-24 添加 barcode 序列；
- (5) 使用无扩增条形码扩展试剂盒 1-12 或无扩增条形码扩展试剂盒 13-24 完成测序接头的连接

2. 所用仪器、试剂

仪器名称：数字 3*32PCR 仪；厂家：Appliedbiosystems；仪器规格：proflex3*32

仪器名称：制冷型程控五段金属浴；厂家：天根生化科技（北京）有限公司；仪器规格：OSE-DB-02

试剂盒名称：g-TUBE(10)*10；货号：520079 厂家：covaris 美国

试剂盒名称：无扩增条形码扩展试剂盒 1-12；厂家：Nanopore；货号：EXP-NBD104

试剂盒名称：无扩增条形码扩展试剂盒 13-24；厂家：Nanopore；货号：EXP-NBD114

试剂盒名称：Ligation Sequencing Kit 1D (PM)（连接测序试剂盒启动装）；厂家：Nanopore；货号：SQK-LSK109

四、文库质检

Qubit 检测浓度 $X > 8\text{ng}/\mu\text{l}$

五、测序方法

1. 上机操作

- (1) 用测序芯片制备试剂盒（EXP-FLP001 PRO.6）配制 Flow cell Priming mix；
- (2) 用连接测序试剂盒(SQK-LSK109)配置上机文库。
- (3) 用 PromethION Flow Cells（FLO-PRO002）芯片，在 PromethION48 测序仪运行 MinKnow 软件，开始测序，默认运行 72 小时。

2. 所用仪器、试剂

(1) 仪器名称：PromethION48 测序仪；厂家：Nanopore；仪器规格：PromethION48

(2) 试剂盒名称：Ligation Sequencing Kit 1D (PM)（连接测序试剂盒启动装）；厂家：Nanopore；货号：SQK-LSK109

试剂盒名称：测序芯片制备试剂盒；厂家：Nanopore；货号：EXP-FLP001.PRO.6

(3) 芯片名称：PromethION Flow Cell(R9 Version)；厂家：Nanopore；货号：FLO-PRO002

3. 接头引物序列

Adapter Y top:

5'- GGCGTCTGCTTGGGTGTTTAACCTTTTTTTTTTAATGTACTTCGTTTCAGTTACGTATTGCT -3'

Adapter Y bottom:

5'- GCAATACGTAACGAACGAAGT -3'

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