

DNA 提取及文库构建

1. 基因组 DNA 的提取	2
1.1 CTAB 法提取基因组 DNA	2
2. DNA 的质量检测	3
2.1 NANODROP 微量分光光度计检测	3
2.2 琼脂糖凝胶电泳检测	4
3. 文库构建	4
3.1 DNA 片段化	5
3.2 末端修复、磷酸化并加 A	5
3.3 接头连接	6
3.4 片段筛选（插入片段 300-400 BP）	6
3.5 PCR 文库富集	7
3.6 用 AMPURE XP BEADS 纯化 PCR 反应	7
4. 文库质检	8

1. 基因组 DNA 的提取

1.1 CTAB 法提取基因组 DNA

CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）是一种阳离子去污剂，可溶解细胞膜，与核酸形成复合物，可使核酸沉淀出来。通过离心将 CTAB-核酸复合物与糖类、蛋白质等分离开来。随后将复合物溶于高盐溶液中，再加乙醇使核酸沉淀，而 CTAB 溶于乙醇，从而去除 CTAB。

主要仪器：4 °C 离心机（型号 Eppendorf 5427R，公司德国艾本德股份公司，产地德国），振荡器（型号米欧 mix-28+，公司广州围古润仪器有限公司，产地中国），移液器（型号 Eppendorf，公司德国艾本德股份公司，产地德国），超纯水仪器（型号明澈 TM-D，公司 RephiLe Bioscience Ltd.，产地中国），水浴锅（型号精宏 DK-8D，公司广州合众生物科技有限公司，产地中国），-20°C 冰箱（型号 DW-YW166A，公司中科美菱，产地中国）。

主要试剂：CTAB 试剂（公司广州化学试剂厂，产地广州），β-巯基乙醇（公司广州化学试剂厂，产地广州），氯仿（公司广州化学试剂厂，产地广州），异丙醇（公司广州化学试剂厂，产地广州），无水乙醇（公司广州化学试剂厂，产地广州），异戊醇（公司广州化学试剂厂，产地广州），酚：氯仿（25:24）（公司广州化学试剂厂，产地广州），RNase-Free Water（自配）。

实验步骤：

- 1) 取样品于液氮环境下充分研磨后，转移约 100 mg 至预冷的 2 mL 离心管中；
- 2) 加入 1 mL 预热的 CTAB 和 20 μL β-巯基乙醇，颠倒混匀；
- 3) 将混匀的样品放入 65 °C 水浴锅中约 1 h，水浴期间多次取出颠倒混匀；
- 4) 取出样品，冷却至室温后常温离心，12000 rpm 10 min；
- 5) 吸取上层水相，加入等体积的氯仿:异戊醇（24:1），充分混匀后常温离心，12000 rpm 10 min；
- 6) 吸取上层水相，加入等体积的酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），充分混匀后常温离心，12000 rpm 10 min；

- 7) 吸取上层水相，加入等体积的氯仿:异戊醇（24:1），充分混匀后常温离心，12000 rpm 10 min;
- 8) 吸取上层水相，加入等体积的异丙醇或 2 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀，-20 °C 静置 30 min，常温离心，12000 rpm 10 min;
- 9) 弃上清，加 1 mL 75%乙醇，洗涤沉淀，室温离心，12000 rpm 5 min，弃上清;
- 10) 重复上一步;
- 11) 短暂离心，用移液器吸干乙醇，真空干燥 2-4 min;
- 12) 加入 50 μ L ddH₂O，室温溶解 5 min，-20 °C 保存。

2. DNA 的质量检测

主要仪器：Nanorop 微量分光光度计（型号 NanoDrop 2000，公司赛默飞世尔科技，产地美国），琼脂糖凝胶电泳仪（型号 DYY-6C 型，公司北京六一仪器厂，产地北京），凝胶成像系统（型号 Tanon-2500，公司上海天能科技有限公司，产地中国）。

主要试剂：琼脂糖（型号 Biowest Agarose，供应商北京梦怡美商贸中心，品牌西班牙），goldview（型号 Goldview I，公司供应商北京梦怡美商贸中心，品牌 USA）。

2.1 NanoDrop 微量分光光度计检测

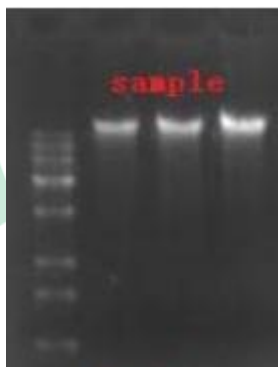
NanoDrop 检测核酸的 OD 值，A260/A280 比值应在 1.8-2.0 之间。

A260/A280<1.8 说明有蛋白质污染，>2.0 说明有 RNA 污染。

A260/230 比值在 2.2 左右，低于 1.8 表明有明显的有机物如糖、肽苯酚、盐离子等的污染。

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测

质量完好的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后,是一条单一的条带(如下图)。

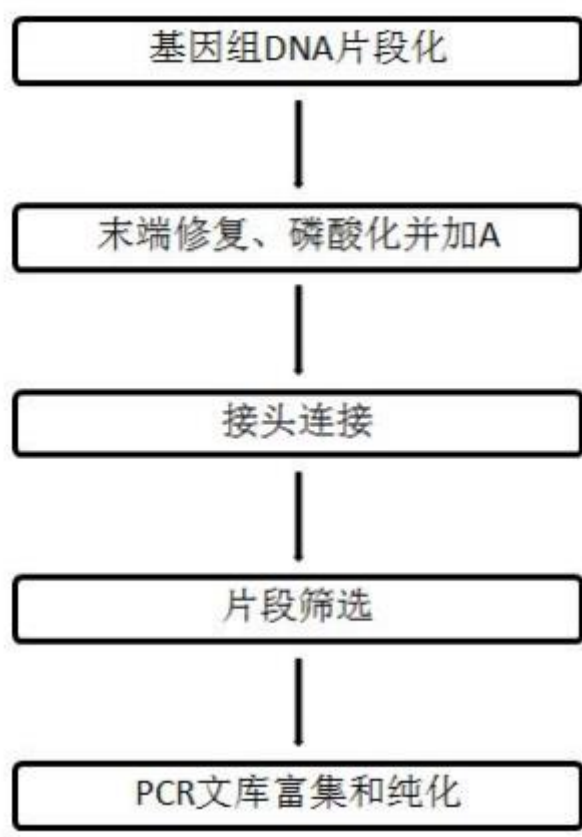


3. 文库构建

主要仪器: Hiseq2500 或 Hiseq4000 (Illumina), 移液器(型号 Eppendorf, 公司德国艾本德股份公司, 产地德国), PCR 仪(型号 ETC811, 公司东胜兴业科学仪器有限公司, 产地中国)。

主要试剂: NEB 建库试剂盒 (NEBNext® MLtra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®, NEB#7370) 无菌水(自配)。

流程图:



3.1 DNA 片段化

利用 NEBNext DNA 双链片段化酶，根据不同作用时间将 dsDNA 切割成 50-1000 bp 片段。单一片段的 PCR 扩增产物，原则上无需打断。

DNA (1 μ g)	1-16 μ L
10X Fragmentase Reaction Buffer v2	2 μ L
Fragmentase	2 μ L
Sterile Water	variable
Total volume	20 μ L

3.2 末端修复、磷酸化并加 A

1) 取新的 nuclease free 离心管，按以下体系加入试剂，移液器吹打混匀。

End Prep Enzyme Mix	3 μ L
End Repair Reaction Buffer (10X)	6.5 μ L
Fragmented DNA	55.5 μ L
Total volume	65 μ L

2) 按以下 PCR 循环条件进行反应:

20 °C	30 s
65 °C	30 s
4 °C	Forever

3.3 接头连接

1) 每个反应按如下试剂用量配制, 并充分混匀。

Blunt/TA Ligase Master Mix	15 µL
NEBNext Adaptor for Illumina	2.5 µL
Ligation Enhancer	1 µL
Total volume	83.5 µL

2) PCR 仪 20 °C 反应 15 min。

3) 在上一步混合液中加入 3 µL USER enzyme, 充分混匀, 37 °C 反应 15 min。

3.4 片段筛选 (插入片段 300-400 bp)

- 1) 室温放置 AMPure XP beads, 使其温度平衡至室温。
- 2) 加入 13.5 µL dH₂O 到连接产物中, 使溶液总体积为 100 µL。
- 3) 加入 40 µL AMPure XP beads 到结合反应溶液中, 移液器轻柔吹打至充分混匀。
- 4) 室温静置 5 min。
- 5) 反应管置于磁力架上 5 min; 待溶液澄清后, 始终保持样品于磁力架上, 小心转移上清至新的 nuclease free 离心管。
- 6) 吸取 20 µL AMPure XP beads 至上清中, 移液器轻柔吹打至溶液充分混匀。
- 7) 室温静置 5 min。
- 8) 反应管置于磁力架上 5 min; 待溶液澄清后, 始终保持样品于磁力架上, 小心转移上清至新的 nuclease free 离心管。
- 9) 保持样品始终处于磁力架上, 加入 200 µL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠, 室温孵育 30 s, 小心移除上清。
- 10) 保持样品始终处于磁力架上, 开盖空气干燥磁珠 5-10 min。

- 11) 将样品从磁力架中取出，加入 28 μL 10 mM Tris-HCl 或 0.1X TE(pH8.0) 进行 DNA 洗脱。移液器吹打充分混匀。
- 12) 室温静置 2 min。
- 13) 将反应管置于磁力架上，静置 5 min，待溶液澄清后，小心吸取 23 μL 上清至一个新的 nuclease free 离心管中，请勿触碰 AMPure XP beads。

3.5 PCR 文库富集

- 1) 按以下反应体系配制溶液，用移液器轻柔上下吹打混匀。

Adaptor Ligated DNA Fragments	23 μL
NEBNext High Fidelity 2X PCR Master Mix	25 μL
Index Primer	1 μL
Universal PCR Primer	1 μL
Total volume	50 μL

- 2) PCR 循环条件：

98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
(98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 75 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) 12 cycles
72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
4 $^{\circ}\text{C}$ Forever

3.6 用 AMPure XP Beads 纯化 PCR 反应

- 1) 室温平衡 AMPure XP beads 30 min，静置使其温度平衡至室温。
- 2) 颠倒或旋涡振荡使 AMPure XP beads 充分混匀，吸取 50 μL (1 $\times$) 加到 PCR 产物中，使用移液器轻柔吹打 10 次充分混匀。
- 3) 室温放置 5 min。
- 4) 反应管在磁力架上静置 5 min; 待溶液澄清后，保持样品始终处于磁力架上，小心移除上清。
- 5) 保持管在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温放置 30 s，然后小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5)。
- 7) 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5-10 min。

8) 将样品从磁力架中取出, 加入 33 μL 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 或 0.1X TE 进行 DNA 洗脱。

9) 移液器吹打使充分混匀, 室温静置 2 min。

10) 将反应管短暂离心并置于磁力架上, 静置 5 min,

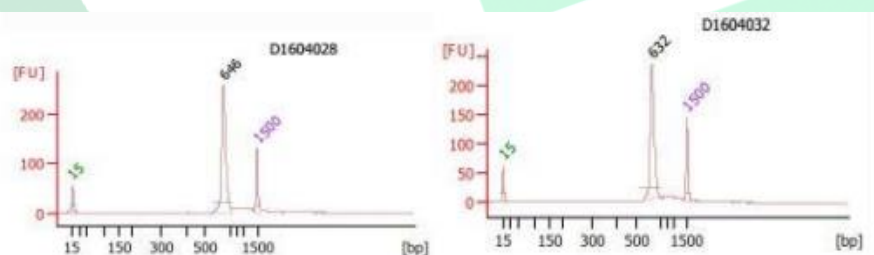
11) 待溶液澄清后, 小心吸取 28 μL 上清至一个新的 nuclease free 离心管中, 储存于 -20°C 中。

4. 文库质检及测序

主要仪器: 安捷伦 2100 (型号 Agilent 2100 Bioanalyzer, 公司 Agilent Technologies, 产地 Germany)。

主要试剂: 质检试剂盒 DNA 1000 assay Kit 或 High Sensitivity DNA assay Kit (公司 Agilent Technologies, 产地 Lithuania), ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (公司 Life Technologies, 产地美国)。

文库 2100 质检结果其峰图应为狭窄的单峰 (如下图所示), 其片段大小根据插入片段大小而定。



最后利用 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) 进行定量, 根据 Hiseq2500 的 PE150 模式 Pooling 上机序。