

QKGEN[®] ITS 两步法文库构建试剂盒

(for Illumina)

使用说明书 V1.0

本产品仅供科研用途

目 录

产品简介:	1
产品信息:	1
保存及有效期:	1
注意事项:	1
操作流程图:	2
一、 第一步 PCR 扩增	3
二、 第一步 PCR 产物片段筛选	4
三、 第二步 PCR 扩增	4
四、 第二步 PCR 产物纯化	5
五、 文库质控	5
附录 1 ITS 区域扩增引物信息	6

产品简介:

本试剂盒针对真菌 ITS1 和 ITS2 区域设计特异性扩增引物, 首先将真菌 ITS1 和 ITS2 区域进行特异性扩增, 同时扩增带上下一步 PCR 的公共序列, 第二步 PCR 扩增出测序引物、样本标签等测序接头部分, 即可构建出完整的 illumina 文库。该方法步骤简单, 更易于实现自动化建库。本试剂盒目标区域约 200-600bp, 推荐使用 illumina Miseq 平台 PE300 或 Novaseq PE250 策略进行测序。

产品信息:

产品组分	用量	规格 (96T)
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL \times 3	3.6 mL
二甲基亚砷 (DMSO)	3 μL \times 2	576 μL
Panel mix 1	2 μL	192 μL
Panel mix 2	2 μL	192 μL

保存及有效期:

-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期一年。

注意事项:

1. 本试剂盒适用以下各种类型样本进行区域扩增建库, 如: 粪便、唾液、痰液、阴道分泌物等其他体液, 以及土壤、海水、河水等环境样本。
2. 本试剂盒推荐投入量为 1-10ng 微生物 DNA 样本, 高质量的 DNA 是扩增成功的先决条件, 微生物样本的 DNA 提取是关键, 提取的 DNA 尽量不要残留有蛋白、盐等杂质。
3. 为确保碱基平衡, 在测序上机时建议加入占总数据量 2%~10% 的 phi X 文库。
4. 本试剂盒推荐使用 Beckman 磁珠分选试剂 (Agencourt AMPure XP reagent)、或齐凯基因磁珠分选试剂进行产物纯化和片段分选。
5. 本试剂盒仅包含扩增及文库制备所需试剂, 其他耗材和试剂需自备。如: 1.5mL 离心管、0.2 mL PCR 管、磁力架、各规格移液器、各规格枪头、无水乙醇、无核酸酶水 (Nuclease-free Water)、low TE (10 mM Tris-HCL, pH 8.0)、纯化磁珠。
6. 本试剂盒不提供 Index 引物, 均在 QKGEN[®] NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 试剂盒中提供。
7. 使用本试剂盒前, 请将各组分置于冰上解冻, 解冻后颠倒混匀, 短暂离心后置于冰上待用。

操作流程图：

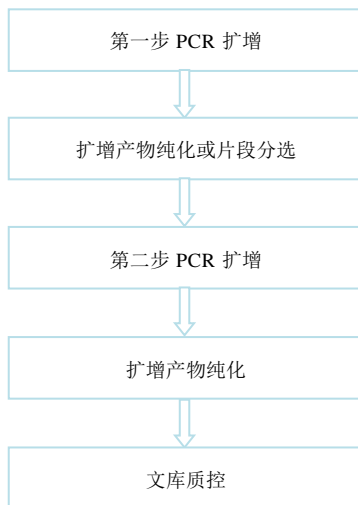


图 1. ITS 区域文库构建操作流程

一、 第一步 PCR 扩增

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管或八联 PCR 管或 96 孔 PCR 板, 根据表一和表二内容, 在冰上配制 ITS 扩增反应液:

表一 Panel 1 扩增反应液

试剂名称	体积
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL
二甲基亚砷 (DMSO)	3 μL
Panel mix 1	2 μL
微生物 DNA (1ng/μL) *	1~10 μL
无核酸酶水	x μL
总体积	25 μL

表二 Panel 2 扩增反应液

试剂名称	体积
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL
二甲基亚砷 (DMSO)	3 μL
Panel mix 2	2 μL
微生物 DNA (1ng/μL) *	1~10 μL
无核酸酶水	x μL
总体积	25 μL

- *注: a. 本试剂盒推荐投入量为1-10ng, 投入体积≥1μL。
b. 若样本DNA浓度 > 1ng/μL, 则稀释到1ng/μL后再投入。
c. 若样本质量非常低时, < 1ng/μL甚至无法检测到时, 建议投入体积为11 μL。
d. 若样本浓度非常高, 且可能包含其他物种DNA时, 直接投入5 μL 进行扩增。

2. 轻柔震荡混合均匀, 瞬时离心, 立即将 PCR 管置于提前按照表三设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表三 第一步 PCR 扩增反应程序

循环数	温度 (热盖 105°C)	时间
1	98°C	1 min
	98°C	10s
25 *	58°C	30s
	72°C	30s
1	72°C	5min
1	4°C	Hold

- *注: a. 当样本为1-10ng DNA时, 使用25个循环进行扩增。

b. 若样本质量非常低时，甚至无法检测到时，使用30个循环扩增。

3. 取 2 μL 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，目的条带在 300-600 之间，如无扩增产物，检查是否漏加某个组分，需重新进行 PCR；若由于样本质量太低导致的扩增失败，需要重新提取或重新取样。

二、 第一步 PCR 产物纯化

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
2. 将 28 μL 扩增产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 77 μL NF-水补足至 100 μL 。
3. 加入 1 倍体积 (100 μL) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2 min，直至溶液完全变澄清。
5. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
6. 加入 200 μL 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
7. 重复步骤 6 一次。
8. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
9. 将离心管从磁力架上取下，加入 15 μL 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 11.5 μL 至新的 1.5mL 离心管中。

三、 第二步 PCR 扩增

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管或八联 PCR 管或 96 孔 PCR 板，根据表四内容，在冰上配制第二步 PCR 反应液：

表四 第二步 PCR 反应液

试剂名称	体积
第一步 PCR 纯化产物	11.5 μL
i5XX*(20uM)	0.5 μL
i7XX*(20uM)	0.5 μL
Phusion Master Mix (2 \times)	12.5 μL
总体积	25 μL

注：*每个样本加入不同的Index引物i5XX和i7XX，具体引物及index序列及组合方案详见配套试剂 QKGEN® NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 接头试剂盒的说明书中。

2. 轻柔震荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表五设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表五 第二步 PCR 反应程序

循环数	温度	时间
1	98°C	1min
7 cycles	98°C	10s
	66°C	30s
	72°C	30s
1	72°C	3min
1	4°C	∞

四、第二步 PCR 产物纯化

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
2. 将 30 μ L 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 0.8 倍体积 (24 μ L) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
3. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2min，直至溶液完全变澄清。
4. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
5. 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 21 μ L low TE Buffer 重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μ L 至新的 PCR 管中。

五、文库质控

1. 浓度检测: 推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测，出库浓度应 \geq 5 ng/ μ L。
2. 片段分布检测: 推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段长度分布检测，片段长度应在 300-700bp 之间有明显主峰，且无其他杂峰。

附录 1 ITS 区域扩增引物信息

表六 ITS 区域扩增引物

引物名称	序列 (5'-3')
ITS1 上游引物	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS1 下游引物	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
扩增长度	~250-600bp
ITS2 上游引物	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS2 下游引物	TCCTCCGCTTATTGATATGC
扩增长度	~381 bp