

QKGEN®细菌 16S V3-V4 区一步法

文库构建试剂盒

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:	2
一、 16S rDNA V3-V4 区域一步法扩增	2
二、 PCR 产物纯化或片段筛选	3
三、 文库质控	4
附录 1 16S 区域扩增引物信息	5
附录 2 文库结构	5
附录 3 Index 序列及选择方案	5

产品简介:

本试剂盒是专门为细菌 16S rDNA 的 V3-V4 区域设计的二代测序文库制备试剂盒,适用于 illumina 平台。本试剂通过一步 PCR 即可实现 16S rDNA V3-V4 区域的特异性扩增并接上包含 index 的接头,构建出完整的 illumina 文库。该步骤流程更加简单快速,更适用于自动化建库。本试剂盒目标区域约 450bp,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)	储存位置
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL	1.2 mL	box 1
V34_Panel mix	2 μL	192 μL	
DMSO	2.5 μL	240 μL	
Index Primer (CDI-001~CDI-096)	2μL	3μL/孔×96	box 2

保存及有效期:

-20 °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. 本试剂盒提供的 CDI-index 引物为 8 种 i5 和 12 种 i7 组合得到的 96 种不同 index 的引物,并已分装到 8 联管中,具体编号机序列信息详见附录 3。
5. 本试剂盒使用前请将各组分置于冰上解冻,解冻后用离心机短暂离心,保证所有的液体均甩到管底,避免损失,然后置于冰上待用,切勿将试剂长时间置于高温 (>25°C) 环境,应避免反复冻融。
6. 取用 CDI-index 引物时,小心打开 8 联管管盖,注意避免交叉污染。
7. 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。
8. 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。

操作流程:

一、16S rDNA V3-V4 区域一步法扩增

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 16S rDNA V3-V4 扩增反应液:

表一 一步法扩增反应液

试剂名称	体积
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL
V34_Panel mix (5μM each)	2 μL
DMSO	2.5 μL
Index Primer xxx*	2 μL
微生物 DNA (1ng/μL) *	x μL
无核酸酶水	6 - x μL
总体积	25 μL

- *注:
- 本试剂盒推荐投入量为1-10ng的纯细菌DNA, 投入体积≥1μL。
 - 若样本纯细菌DNA浓度 > 6ng/μL, 则稀释到1ng/μL后再投入。
 - 若样本包含大量非细菌DNA, 无法正确定量细菌DNA时, 或样本质量非常低时, 甚至无法检测到时, 建议投入体积为6 μL。
 - 每个样本加入不同的Index引物, 具体引物及index序列及组合方案详见附录3。

2. 轻柔震荡混合均匀, 瞬时离心, 立即将 PCR 管置于提前按照表二设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表二 一步法 PCR 扩增反应程序

循环数	温度 (热盖 105°C)	时间
1	95°C	5 min
10	95°C	15s
	60°C	30s
	72°C	1min
	95°C	15s
4	80°C	30s
	60°C	30s
	72°C	1min
	95°C	15s
11	60°C	30s
	72°C	1min
	95°C	15s
10	80°C	30s

	60°C	30s
	72°C	1min
1	4°C	Hold

二、PCR 产物纯化或片段筛选

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min 以上。
2. 加入 0.8 倍体积 (20 μ L) 的纯化磁珠, 用移液器轻柔吹打混匀, 室温静置孵育 10 min。
3. 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。
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 22 μ L 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 20 μ L 至新的 1.5mL 离心管中, 保存备用。

备注: 如产物需进行片段筛选, 可按照以下步骤进行。

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min 以上。
2. 将扩增产物转移到 1.5mL 离心管中, 加入 75 μ L 无核酸酶水, 补足体积至 100 μ L。
3. 加入 0.6 倍体积 (60 μ L) 的纯化磁珠, 用移液器轻柔吹打混匀, 室温静置孵育 15 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. 小心将上清液转移到新的离心管中, 丢弃磁珠。
6. 向上清液加入 0.2 倍体积 (20 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。
7. 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。
8. 重复步骤 7 一次。
9. 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)
10. 将离心管从磁力架上取下, 加入 22 μ L 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 20 μ L 至新的 1.5mL 离心管中, 保存备用。

三、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 ≥ 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 400-700bp 之间有明显主峰, 且无其他杂峰。

附录 1 16S 区域扩增引物信息

16S V3-V4 区域扩增引物

引物名称	序列 (5'-3')
上游引物	CCTAYGGGRBGCASCAG
下游引物	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
扩增长度	465bp

附录 2 文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5-index] ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-*inse*
rt-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAAGTACAC [i7-index] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
 3'-TTACTATGCCCGTGGTGGCTCTAGATGTG [i5-index] TGTGAGAAAGGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAGA-*in*
sert-TCTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTGA [i7-index] TAGAGCATAACGGCAGAAGACGAAC-5'

附录 3 Index 序列及选择方案

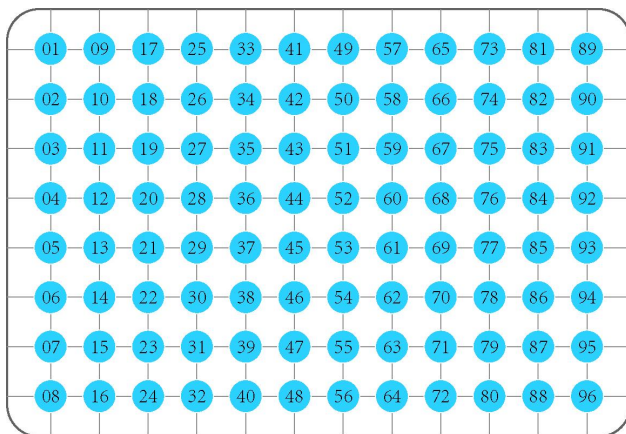


图 2: 96 种 CDI-index 引物对应的孔位关系

Index 序列:

接头编号	i7_index 名称	i7 index (all Illumina® systems)	i5_index 名称	i5 index (HiSeq® 2000/2500, MiSeq®, NovaSeq® v1.0 systems)	i5 index (HiSeq® 3000, 4000, HiSeq® X, NextSeq®, MiniSeq®, NovaSeq® v1.5 systems)
CDI-001	Index i701	ATTACTCG	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-002	Index i701	ATTACTCG	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-003	Index i701	ATTACTCG	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-004	Index i701	ATTACTCG	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-005	Index i701	ATTACTCG	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-006	Index i701	ATTACTCG	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-007	Index i701	ATTACTCG	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-008	Index i701	ATTACTCG	Index i508	GTCAGTAC	GTACTGAC
CDI-009	Index i702	TCCGGAGA	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-010	Index i702	TCCGGAGA	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-011	Index i702	TCCGGAGA	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-012	Index i702	TCCGGAGA	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-013	Index i702	TCCGGAGA	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-014	Index i702	TCCGGAGA	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-015	Index i702	TCCGGAGA	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-016	Index i702	TCCGGAGA	Index i508	GTCAGTAC	GTACTGAC
CDI-017	Index i703	CGCTCATT	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-018	Index i703	CGCTCATT	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC

CDI-019	Index i703	CGCTCATT	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-020	Index i703	CGCTCATT	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-021	Index i703	CGCTCATT	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-022	Index i703	CGCTCATT	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-023	Index i703	CGCTCATT	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-024	Index i703	CGCTCATT	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-025	Index i704	GAGATTCC	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-026	Index i704	GAGATTCC	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-027	Index i704	GAGATTCC	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-028	Index i704	GAGATTCC	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-029	Index i704	GAGATTCC	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-030	Index i704	GAGATTCC	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-031	Index i704	GAGATTCC	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-032	Index i704	GAGATTCC	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-033	Index i705	ATTCAGAA	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-034	Index i705	ATTCAGAA	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-035	Index i705	ATTCAGAA	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-036	Index i705	ATTCAGAA	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-037	Index i705	ATTCAGAA	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-038	Index i705	ATTCAGAA	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-039	Index i705	ATTCAGAA	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-040	Index i705	ATTCAGAA	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-041	Index i706	GAATTCGT	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-042	Index i706	GAATTCGT	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-043	Index i706	GAATTCGT	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-044	Index i706	GAATTCGT	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-045	Index i706	GAATTCGT	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG

CDI-046	Index i706	GAATTCGT	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-047	Index i706	GAATTCGT	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-048	Index i706	GAATTCGT	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-049	Index i707	CTGAAGCT	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-050	Index i707	CTGAAGCT	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-051	Index i707	CTGAAGCT	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-052	Index i707	CTGAAGCT	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-053	Index i707	CTGAAGCT	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-054	Index i707	CTGAAGCT	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-055	Index i707	CTGAAGCT	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-056	Index i707	CTGAAGCT	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-057	Index i708	TAATGCGC	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-058	Index i708	TAATGCGC	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-059	Index i708	TAATGCGC	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-060	Index i708	TAATGCGC	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-061	Index i708	TAATGCGC	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-062	Index i708	TAATGCGC	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-063	Index i708	TAATGCGC	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-064	Index i708	TAATGCGC	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-065	Index i709	CGGCTATG	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-066	Index i709	CGGCTATG	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-067	Index i709	CGGCTATG	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-068	Index i709	CGGCTATG	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-069	Index i709	CGGCTATG	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-070	Index i709	CGGCTATG	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-071	Index i709	CGGCTATG	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-072	Index i709	CGGCTATG	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC

CDI-073	Index i710	TCCGCGAA	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-074	Index i710	TCCGCGAA	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-075	Index i710	TCCGCGAA	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-076	Index i710	TCCGCGAA	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-077	Index i710	TCCGCGAA	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-078	Index i710	TCCGCGAA	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-079	Index i710	TCCGCGAA	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-080	Index i710	TCCGCGAA	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-081	Index i711	TCTCGCGC	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-082	Index i711	TCTCGCGC	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-083	Index i711	TCTCGCGC	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-084	Index i711	TCTCGCGC	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-085	Index i711	TCTCGCGC	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-086	Index i711	TCTCGCGC	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-087	Index i711	TCTCGCGC	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-088	Index i711	TCTCGCGC	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-089	Index i712	AGCGATAG	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-090	Index i712	AGCGATAG	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-091	Index i712	AGCGATAG	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-092	Index i712	AGCGATAG	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-093	Index i712	AGCGATAG	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-094	Index i712	AGCGATAG	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-095	Index i712	AGCGATAG	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-096	Index i712	AGCGATAG	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC