

**QKGEN<sup>®</sup> 16S V3-V4 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: .....	1
一、 第一步 PCR 扩增 .....	3
二、 第一步 PCR 产物片段筛选 .....	3
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 16S V3-V4 区域扩增引物信息 .....	6

## 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。本试剂盒针对细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区域设计特异性扩增引物，首先将细菌 16S rRNA 的 V3-V4 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 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)
Phusion Master Mix (2×)	15 $\mu$ L $\times$ 2	1.44 mL $\times$ 2
Panel mix	2 $\mu$ L	192 $\mu$ L

## 保存及有效期:

-20  $^{\circ}$ 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<sup>®</sup> NGS Dual Index Primers Kit for Illumina 试剂盒中提供。
7. 使用本试剂盒前，请将各组分子置于冰上解冻，解冻后颠倒混匀，短暂离心后置于冰上待用。

## 操作流程图:

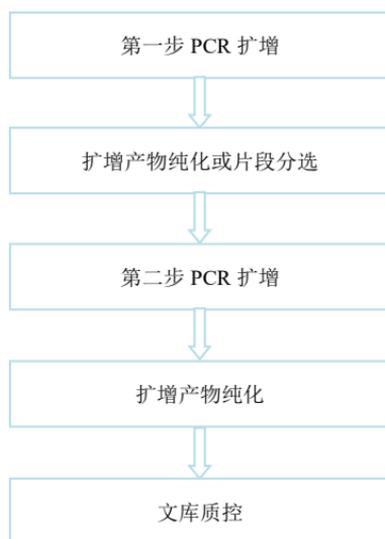


图 1. 16S rDNA V3-V4 区域文库构建操作流程图

## 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
Panel mix	2 μL
微生物 DNA (1ng/μL) *	1~10 μL
无核酸酶水	x μL
总体积	25μL

- \*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10.5 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
25 *	98°C	10s
	64°C	30s
	72°C	30s
	72°C	1min
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 2μL 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

- 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
- 将 23μL 扩增产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 77 μL NF-水补足至 100μL。
- 加入 1 倍体积 (100μL) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
- 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。

- 小心吸弃上清液，保留磁珠。
- 加入 200 $\mu$ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
- 重复步骤 6 一次。
- 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）
- 将离心管从磁力架上取下，加入 15 $\mu$ 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 11.5  $\mu$ L 至新的 1.5mL 离心管中。

### 三、第二步 PCR 扩增

- 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 $\mu$ L
i5XX*(20uM)	0.5 $\mu$ L
i7XX*(20uM)	0.5 $\mu$ L
Phusion Master Mix (2 $\times$ )	12.5 $\mu$ L
总体积	25 $\mu$ L

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。

- 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 $^{\circ}$ C	1min
7 cycles	98 $^{\circ}$ C	10s
	66 $^{\circ}$ C	30s
	72 $^{\circ}$ C	30s
	72 $^{\circ}$ C	3min
1	4 $^{\circ}$ C	$\infty$

---

#### 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  $\mu\text{L}$  连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 0.8 倍体积 (24 $\mu\text{L}$ ) 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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  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 $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。
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 区域扩增引物信息

表六 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