

QKGEN[®] ITS 两步法文库构建试剂盒

(for Illumina)

使用说明书 V2.0

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
实验步骤:	3
一、 第一步 PCR 扩增	3
二、 第一步 PCR 产物纯化	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
附录 2 文库结构	6
附录 3 Index 序列及选择方案	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)	储存位置
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL × 3	3.6 mL	box 1
二甲基亚砷 (DMSO)	3 μL × 2	576 μL	
ITS1_Primer Mix	2 μL	192 μL	
ITS2_Primer Mix	2 μL	192 μL	
Index Primer (CDI-001~CDI-096)	2 μL	5 μL /孔	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、痰液等其他体液, 以及植物、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, 解冻后用离心机至少离心 1min, 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。

操作流程图：

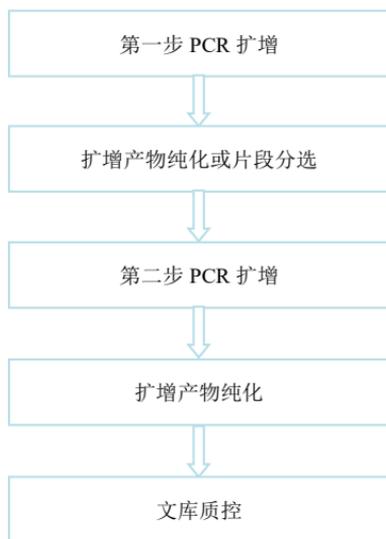


图 1. ITS 区域文库构建操作流程图

实验步骤:

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
二甲基亚砜 (DMSO)	3 μL
ITS1 Primer Mix	2 μL
微生物 DNA (1ng/μL) *	1~7.5 μL
无核酸酶水	x μL
总体积	25μL

表二 Panel 2 扩增反应液

试剂名称	体积
Phusion Master Mix (2×)	12.5 μL
二甲基亚砜 (DMSO)	3 μL
ITS2 Primer Mix	2 μL
微生物 DNA (1ng/μL) *	1~7.5 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7.5 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
	58°C	30s
	72°C	30s

1	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 2 μ L 扩增产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带在 200-600 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. 将两管 PCR 反应产物混合后, 加入 1 倍体积 (46 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 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 6 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 15 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 10.5 μ L 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	10.5 μ L
Index Primer xxx*	2 μ L
Phusion Master Mix (2 \times)	12.5 μ L
总体积	25 μ L

注: *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	1min
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 25 μ L 扩增产物转移到新的 1.5mL 离心管中，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 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 300-750bp 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	GCTGCGTTCCTCATCGATGC
扩增长度	~250-600bp
ITS2 上游引物	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS2 下游引物	TCCTCCGCTTATTGATATGC
扩增长度	~381 bp

附录 2 文库结构

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5-index] ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-inse
 rt-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [i7-index] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
 3'-TTACTATGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTG [i5-index] TGTGAGAAAGGGATGTGCTCGCAGAAGGCTAGA-in
 sert-TCTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTG [i7-index] TAGAGCATACGGCAGAAGACGAAC-5'

附录 3 Index 序列及选择方案

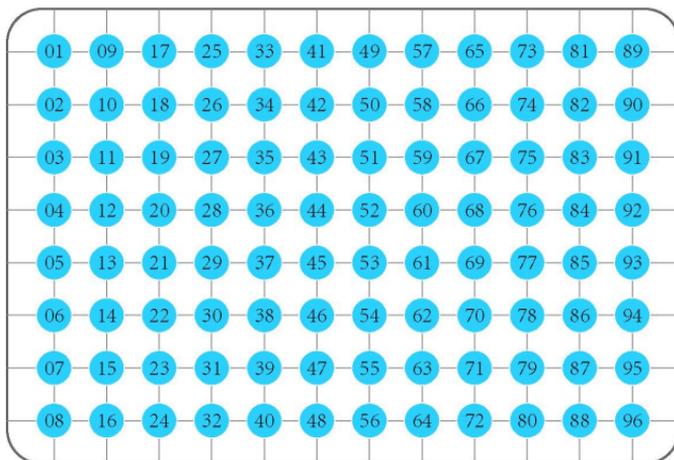


图 2: 96 种 CDI-index 引物对应的孔位关系

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	GTA CTGAC
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	GTA CTGAC
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	ACGTCCTG	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	ACGTCCTG	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	ACGTCCTG	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