

个体基因解密实验 II

-- 文库构建

CONTENTS

01

文库构建原理

02

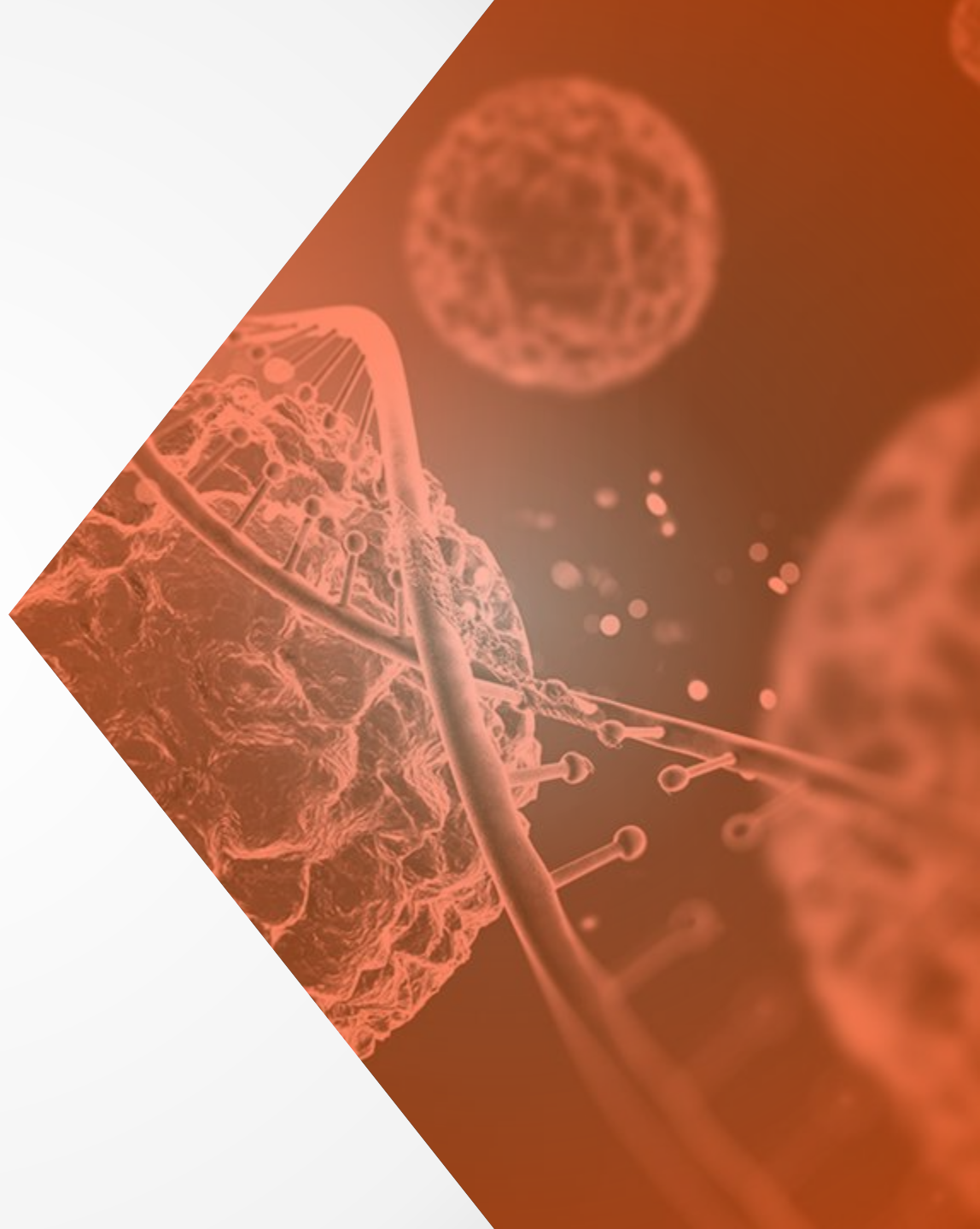
文库构建实验：定向扩增目标片段

03

文库构建实验：添加Barcode接头

/01

文库构建原理

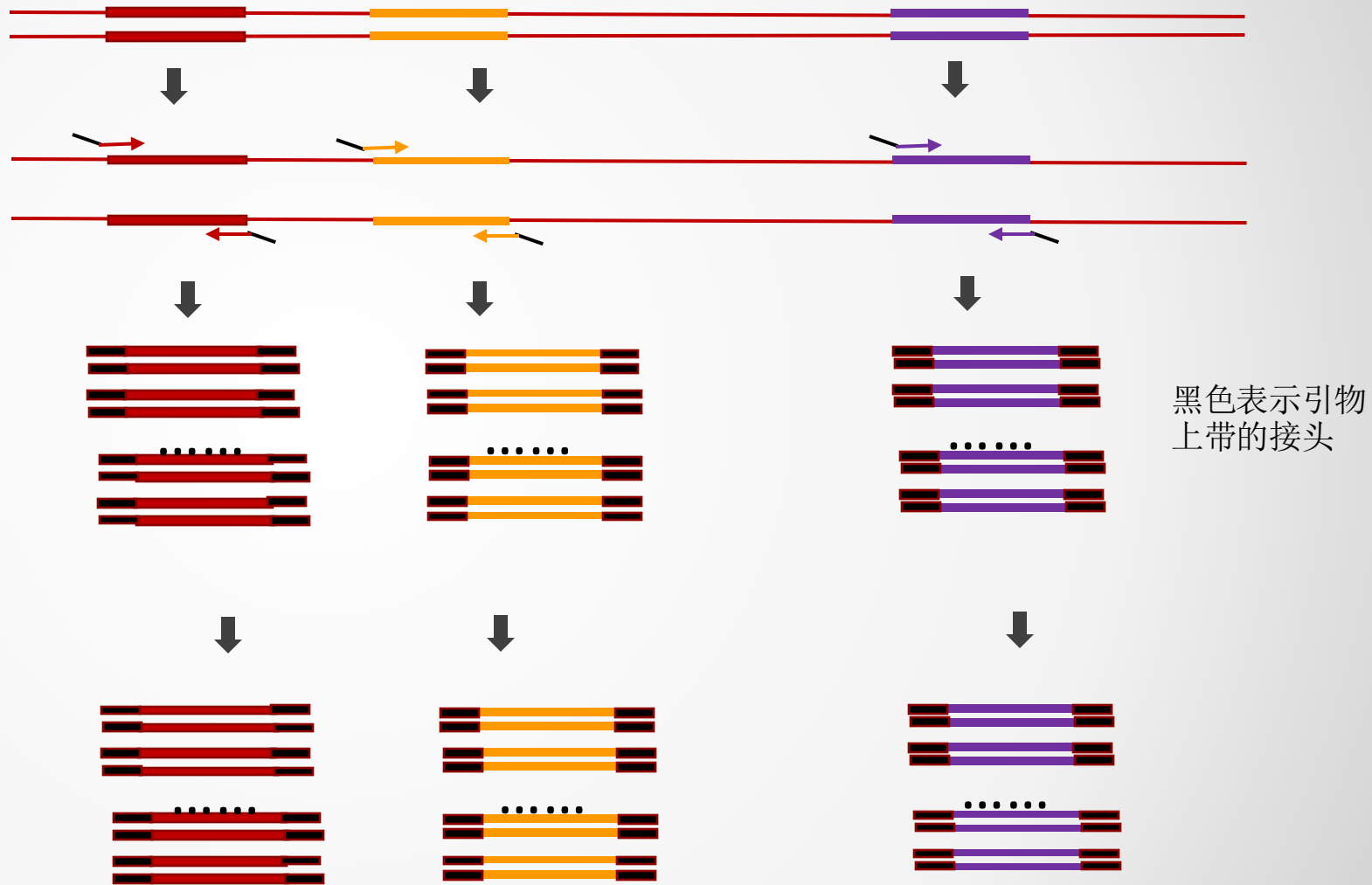


(1) 文库构建原理

提取基因组DNA

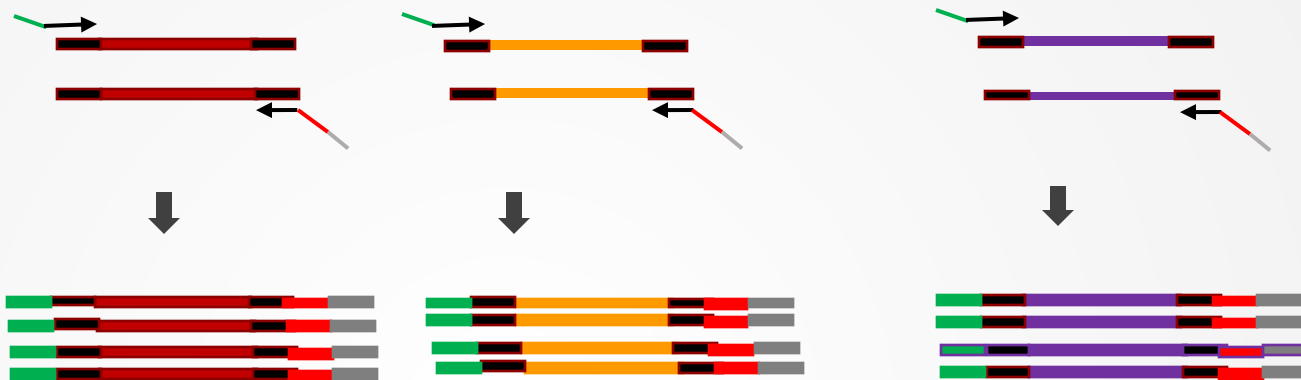
扩增目标片段

磁珠纯化



(1) 文库构建原理

添加Barcode接头
(第二轮PCR)



磁珠纯化

单链环化+酶切去
掉非环化的片段

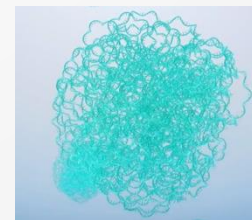
“夹板” Splint oligo



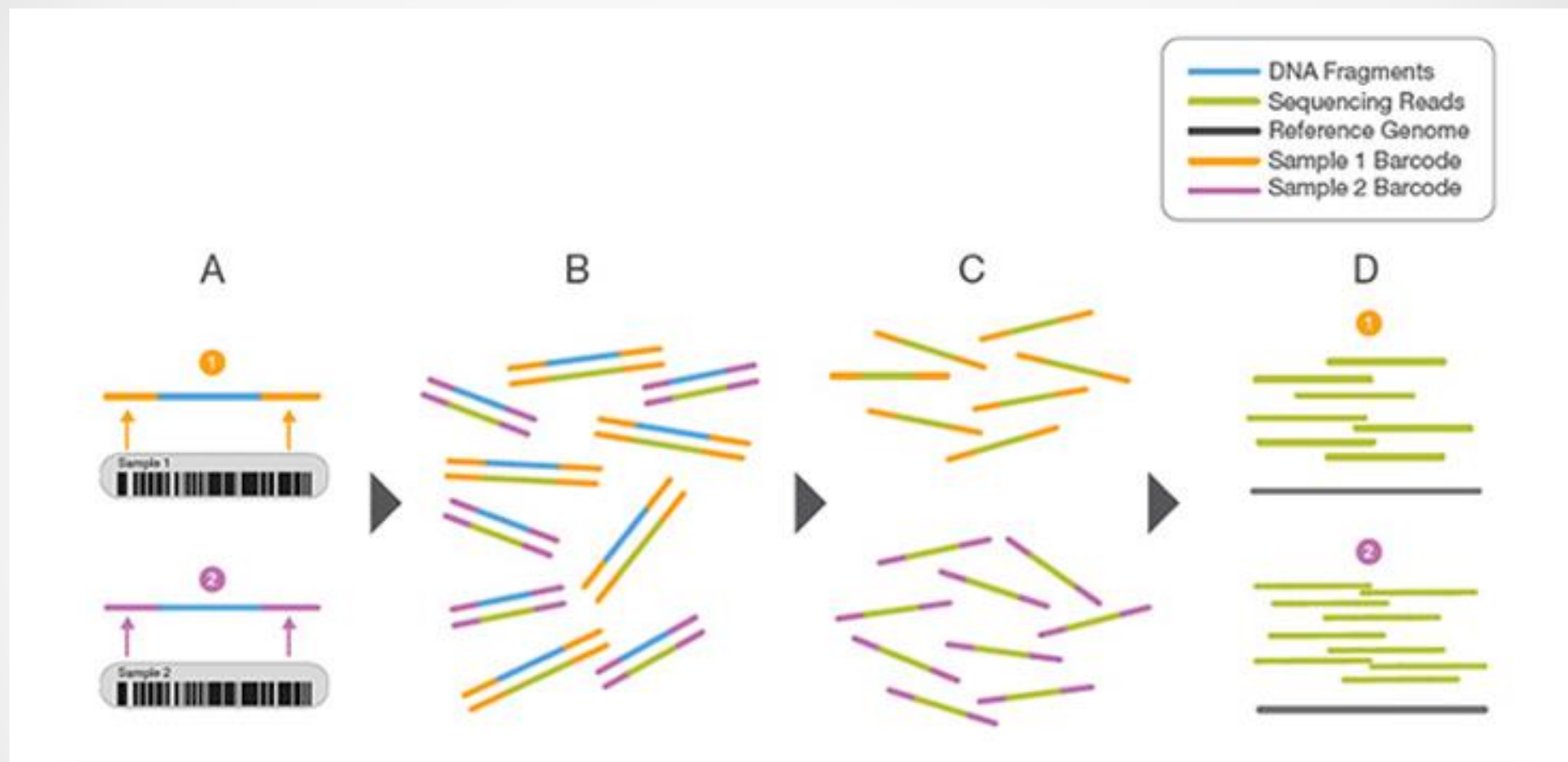
黄色代表各目标片段

简化成一步法

制作DNB



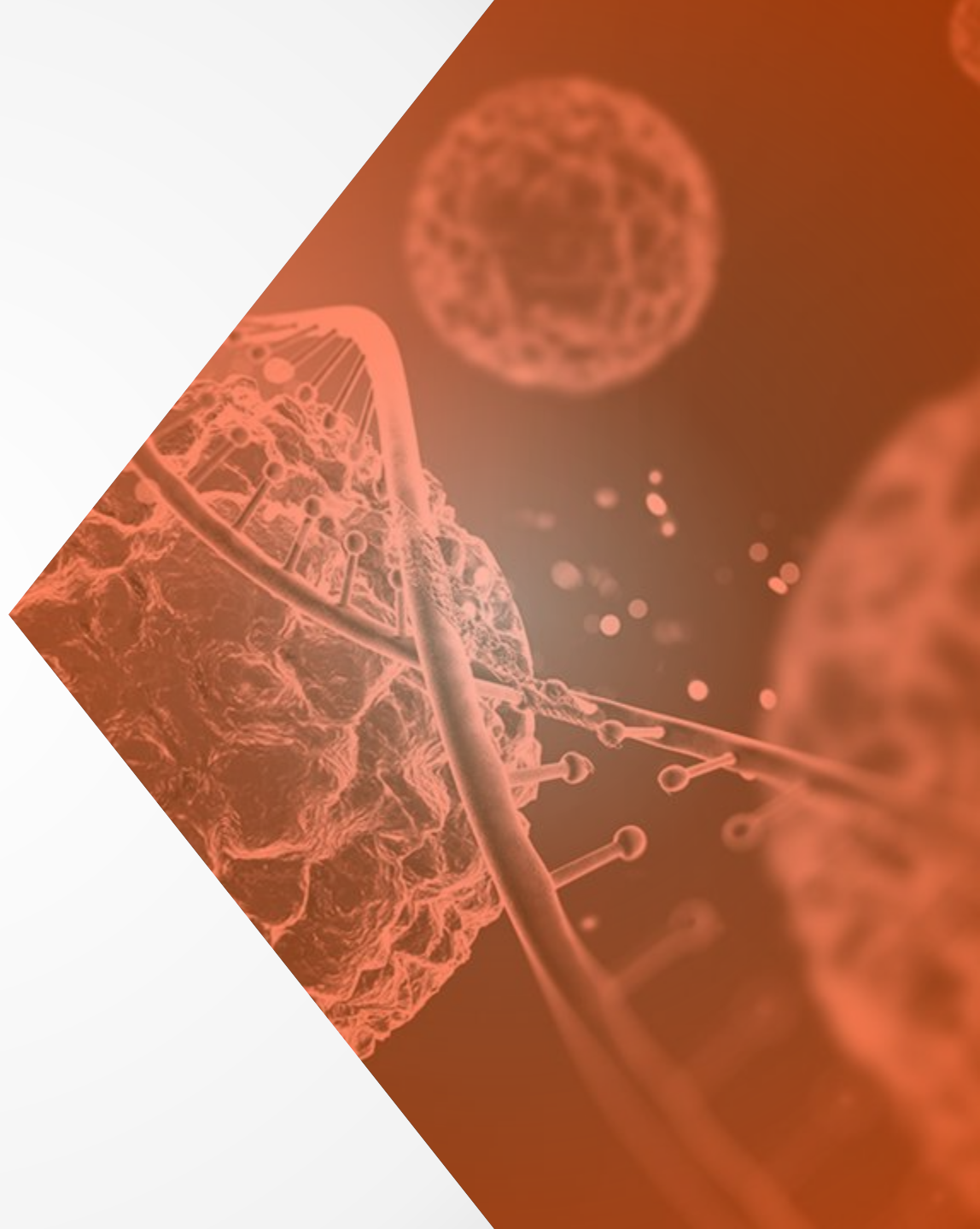
(1) 文库构建原理



- Two representative DNA fragments from two unique samples, each attached to a specific barcode sequence that identifies the sample from which it originated.
- Libraries for each sample are pooled and sequenced in parallel. Each new read contains both the fragment sequence and its sample-identifying barcode.
- Barcode sequences are used to de-multiplex, or differentiate reads from each sample.
- Each set of reads is aligned to the reference sequence.

/02

文库构建实验：定向扩增目标片段



(2) 文库构建流程

基因测序流程总览

课时	内容	目的
文库构建I：利用引物定向扩增目标片段	第一轮PCR建库实验	使用引物定向扩增目标片段
	DNA纯化实验	纯化目标片段
文库构建II：添加Barcode接头	第二轮PCR建库实验	给目标片段加Index接头
	DNA纯化实验	纯化加接头后的目标片段
基因测序	制备DNB	扩大测序信号
	测序仪上机	测序

文库构建I (利用引物定向扩增目标片段)

第一轮PCR反应

1. 取**5ng**待测基因组DNA于PCR管中，用TE Buffer补齐总体积至**6.5 μL** 。

注意：若提取的DNA样本浓度大于5 ng/ μL ，建议用TE Buffer稀释至5 ng/ μL 后，取1 μL 投入反应。

2. 在冰上配制第一轮PCR反应液 (25 μL 体系)

试剂名称	一个反应标准量
PCR Enzyme Mix	12.5 μL
PCR Primer Pool	6 μL
Total	18.5 μL

注意：PCR Primer Pool使用前务必充分混匀，涡旋振荡5~6次，每次3~5秒。

3. 18.5 μL 配制好的PCR反应混合液 + 6.5 μL 配置好的基因组DNA样本，用移液器缓慢吹打3~5次混匀后，瞬时离心将反应液收集至管底。

4. 将上述所述PCR管置于PCR仪上，按下表的条件进行第一轮PCR反应。

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	
98°C	5 min	1 循环
98°C	15 s	14 循环
64°C	1 min	
60°C	1 min	
72°C	30 s	
72°C	2 min	1 循环
4°C	Hold	

5. 第一轮PCR反应完成后，瞬时离心将反应液收集至管底，每个样本吸取**20 μL**反应液转移至新的1.5ml离心管中。

第一轮PCR产物纯化

此操作请不要放置于冰盒上

6. 提前30 min取出DNA Clean Beads置于室温，使用前充分振荡混匀，分别吸取**24 μ L磁珠**加至转移至新管的第一轮PCR产物中。
7. 用移液器快速吹打8~10次混合均匀，过程中应避免产生气泡。
8. 室温孵育5 min。
9. 置于磁力架，静置2~5 min至液体澄清，用移液器小心吸弃上清。

第一轮PCR产物纯化

1.DNA纯化

磁珠会优先结合大片段，所以通过加一定比例的磁珠吸附特定大小以上的DNA片段，弃掉上清中非目标片段，再将磁珠吸附的DNA进行洗脱。DNA纯化常用于剔除文库中的接头自连和引物二聚体。

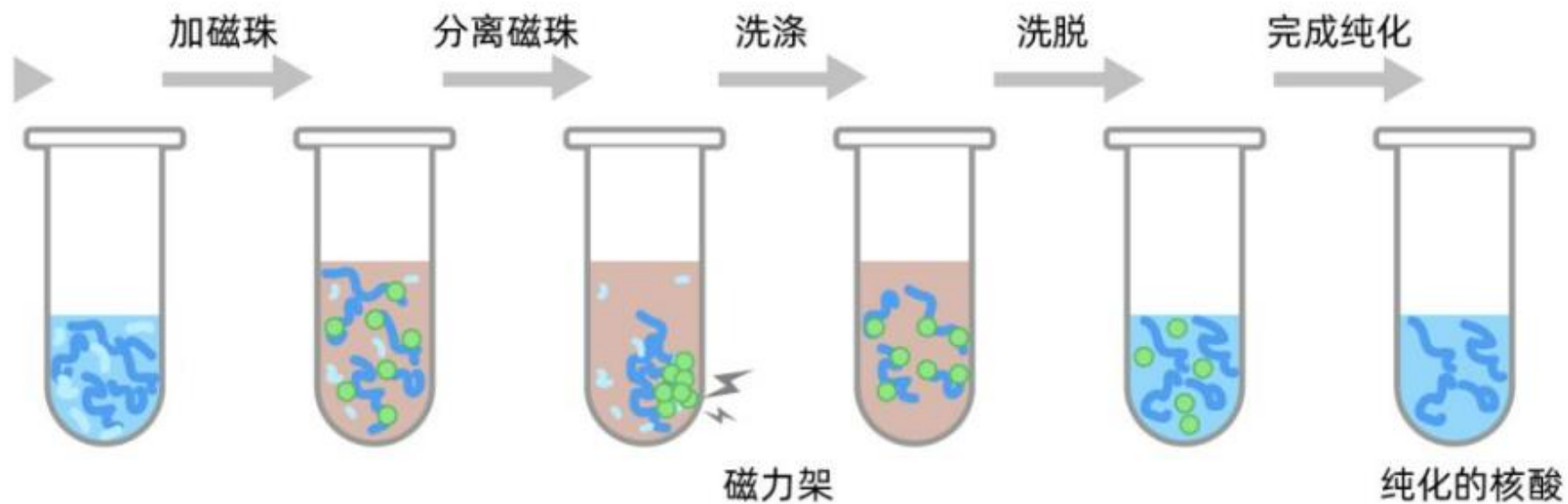
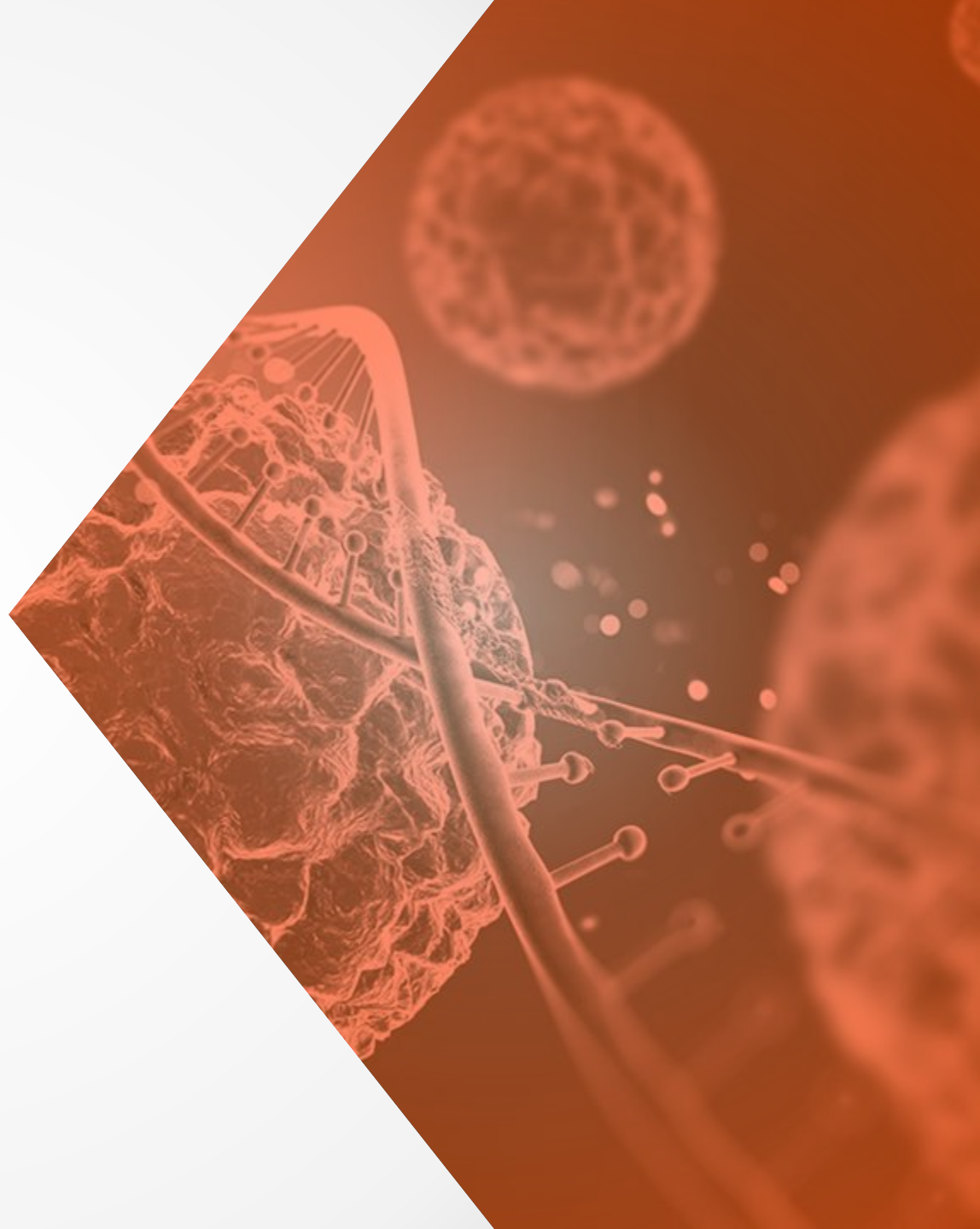


图1、DNA纯化操作流程图

10. 保持离心管置于磁力架上，加入**100 μL新鲜配制的80%乙醇**漂洗磁珠及管壁，轻轻吹打3次后小心吸弃上清。
11. 重复步骤10，尽量吸干管内液体，若管内仍残留液体，可短暂离心后用10 μL 枪头吸净底部残留液体。
12. 保持离心管固定于磁力架上，室温干燥至磁珠表面**无反光、无开裂**。
13. 将离心管从磁力架上取下，加入5.5 μL TE Buffer进行DNA洗脱，应保证加入的TE Buffer充分浸润磁珠，防止磁珠过分晾干导致PCR产物损失。
14. 室温静置 5 min。
15. 第一轮PCR纯化后产物，如果需要短时间保存，可置于4°C冰箱储存。

/03

文库构建实验：添加Barcode接头



(2) 文库构建流程

基因测序流程总览

课时	内容	目的
文库构建I：利用引物定向扩增目标片段	第一轮PCR建库实验	使用引物定向扩增目标片段
	DNA纯化实验	纯化目标片段
文库构建II：添加Barcode接头	第二轮PCR建库实验	给目标片段加Index接头
	DNA纯化实验	纯化加接头后的目标片段
基因测序	制备DNB	扩大测序信号
	测序仪上机	测序

文库构建II（利用引物定向扩增目标片段）

第二轮PCR反应

1. 请提前了解PCR Dual Barcode排列顺序，清晰记录样本编号与Barcode位置的对应关系，并配制第二轮PCR反应体系。将试剂分别加至上节课制备的**5.5 μL PCR产物**中，涡旋振荡混匀3次，每次3s，瞬时离心。

试剂名称	一个反应标准量
PCR Enzyme Mix	12.5 μL
PCR Block	3 μL
PCR Dual Barcode Primer F	2 μL
PCR Dual Barcode Primer R	2 μL
Total	19.5 μL

- 注意：**
1. 第二轮PCR反应需**带磁珠进行反应**，无需进行磁力吸附及转移上清。
 2. **PCR Block使用前务必充分混匀**，涡旋振荡5~6次，每次3~5 s。
 3. 本试剂盒内含PCR Dual Barcode Primer F及PCR Dual Barcode Primer R（包含 96个barcode），使用前请清晰掌握关于PCR Dual Barcode Primer R的使用。

2. 将离心管移至PCR仪，并按下表的第二轮PCR反应程序进行PCR反应。

温度	时间	循环数
105°C热盖	on	
98°C	5 min	1循环
98°C	15 s	16 循环
64°C	30 s	
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	2 min	1循环
4°C	Hold	

3. 第二轮PCR反应完成后，振荡使磁珠混合均匀后短暂离心，用移液器转移**20 μL**带有磁珠的反应液至新的1.5ml离心管进行第二轮纯化。

第二轮PCR产物纯化

4. 提前30 min取出**DNA Clean Beads**置于室温，使用前充分振荡混匀，吸取22 μL 磁珠至步骤3的离心管中。
5. 用移液器快速吹打8~10次混合均匀，过程中应避免产生气泡。
6. 室温孵育5 min。
7. 置于磁力架，静置2~5 min 至液体澄清，用移液器小心吸弃上清。
8. 保持离心管置于磁力架上，加入**100 μL 新鲜配制的80%乙醇**漂洗磁珠及管壁，轻轻吹打3次后小心吸弃上清。
9. 重复步骤8，尽量吸干管内液体，若管内仍残留液体，可短暂离心后用10 μL 枪头吸净底部残留液体。

10. 保持离心管固定于磁力架上，室温干燥至磁珠表面**无反光、无开裂**。
11. 将离心管从磁力架上取下，加入**23 μL TE Buffer**进行DNA洗脱，用移液器快速吹打至少10次至完全混匀，过程中应避免产生气泡。
12. 室温下孵育5 min。
13. 将离心管置于磁力架上，静置2~5 min至液体澄清，将**21 μL 上清液**转移到新的1.5ml离心管中。

第二轮PCR产物质检

1. 使用Qubit对第二轮PCR纯化后产物进行定量。要求最终PCR产物的**浓度 $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$** 。
2. 后续步骤需将所有样本（**不超过16个**）混合后进行Make DNB。在定量后进行不同Barcode样本混合，**混合总量为500 ng，总体积 $\leq 48 \mu\text{L}$** 。

注意： N个样本文库进行混合时，我们需要保证每个等质量混合，以确保测序获得的数据量一致。单个文库取样量(ng) = $500 \text{ ng}/N$ ，单个文库取样体积(μL) = 单个文库取样量(ng) / 单个文库的浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)，当样本量大时，为减少取样误差，可进行X倍的混合文库方案后，取 $1/X$ 进行后续的步骤。

举例： 如果我们需要对12个样本进行混样，那么每个样本需要混入的质量为 $500/12=41.67 \text{ ng}$ 。如果样本1的第二轮PCR产物纯化后文库的浓度为 $35.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，那么需吸取 $41.67/35.6\approx 1.2 \mu\text{L}$ 的样本1混入下一轮实验的样本。