

# 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**

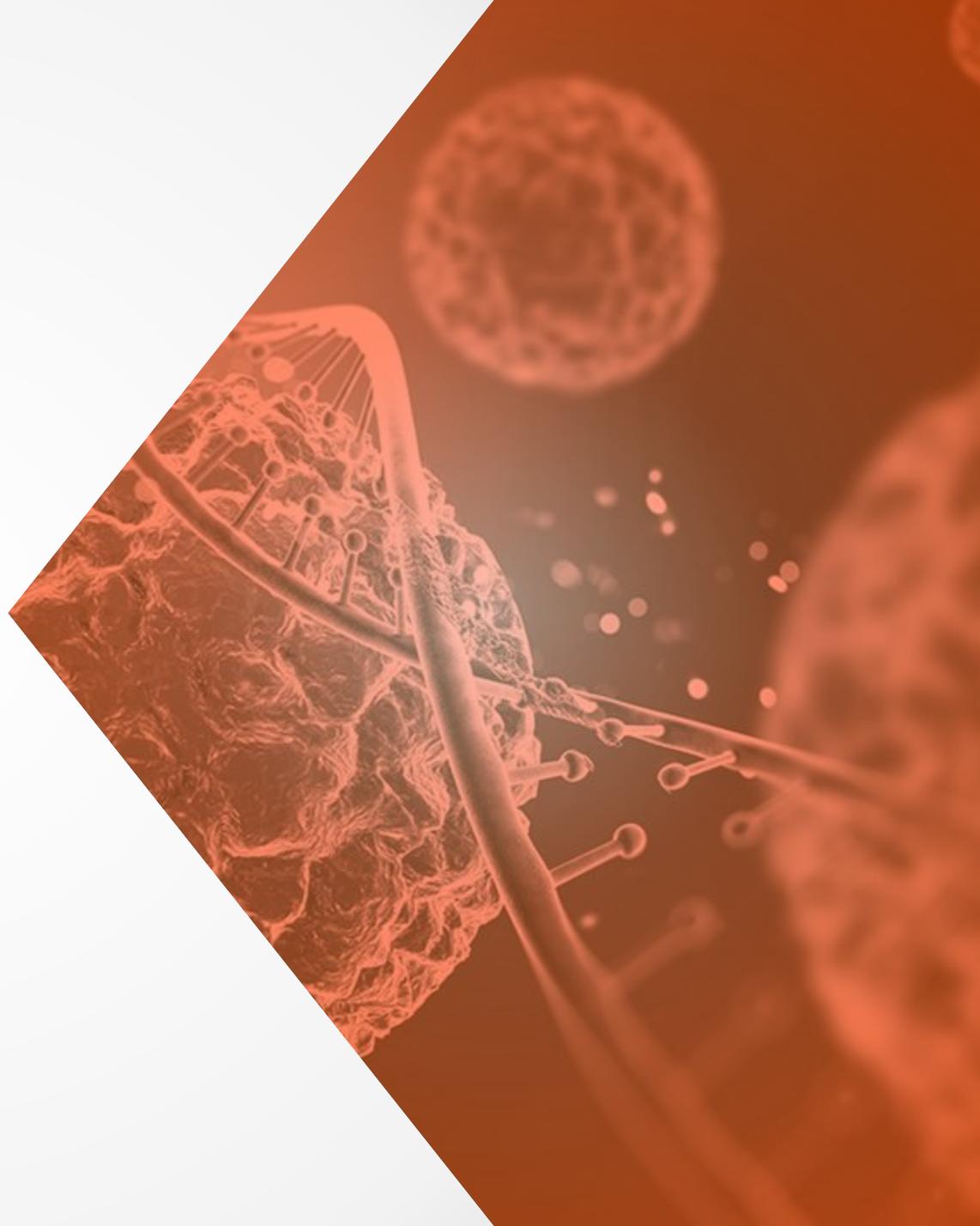
---

03

**文库构建实验：添加Barcode接头**

# /01

## 文库构建原理

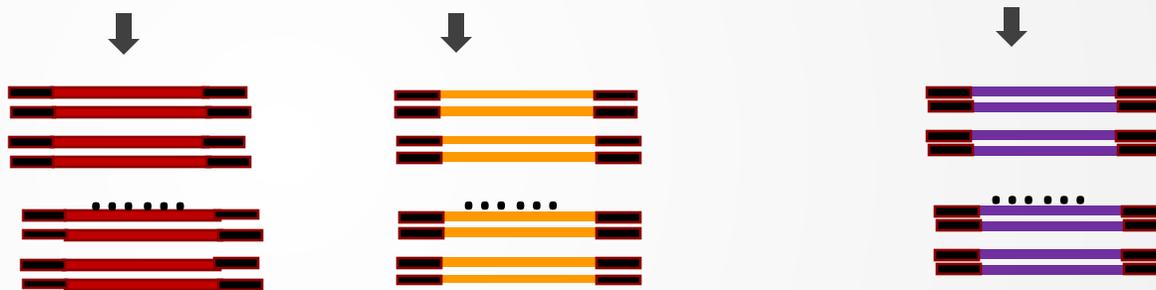


# (1) 文库构建原理

提取基因组DNA

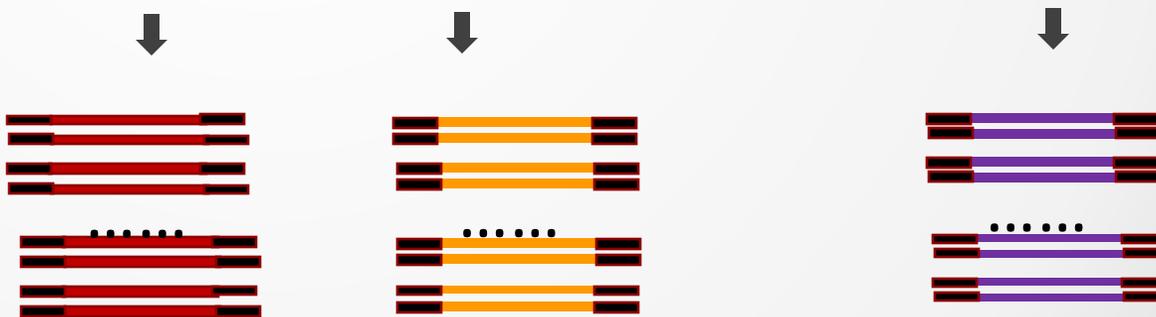


扩增目标片段



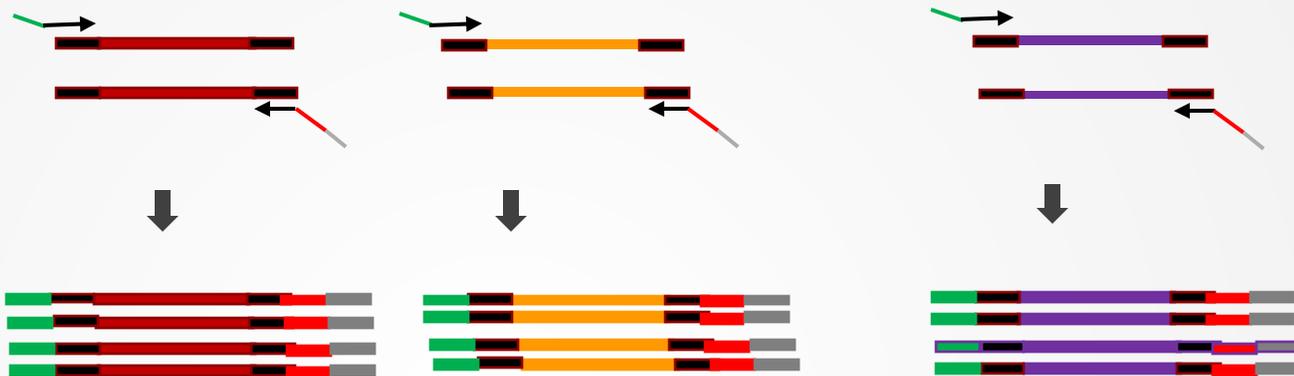
黑色表示引物  
上带的接头

磁珠纯化



# (1) 文库构建原理

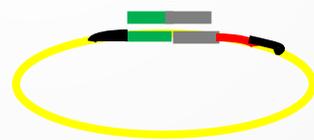
添加Barcode接头  
(第二轮PCR)



磁珠纯化

单链环化+酶切去  
掉非环化的片段

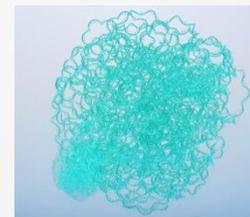
“夹板” Splint oligo



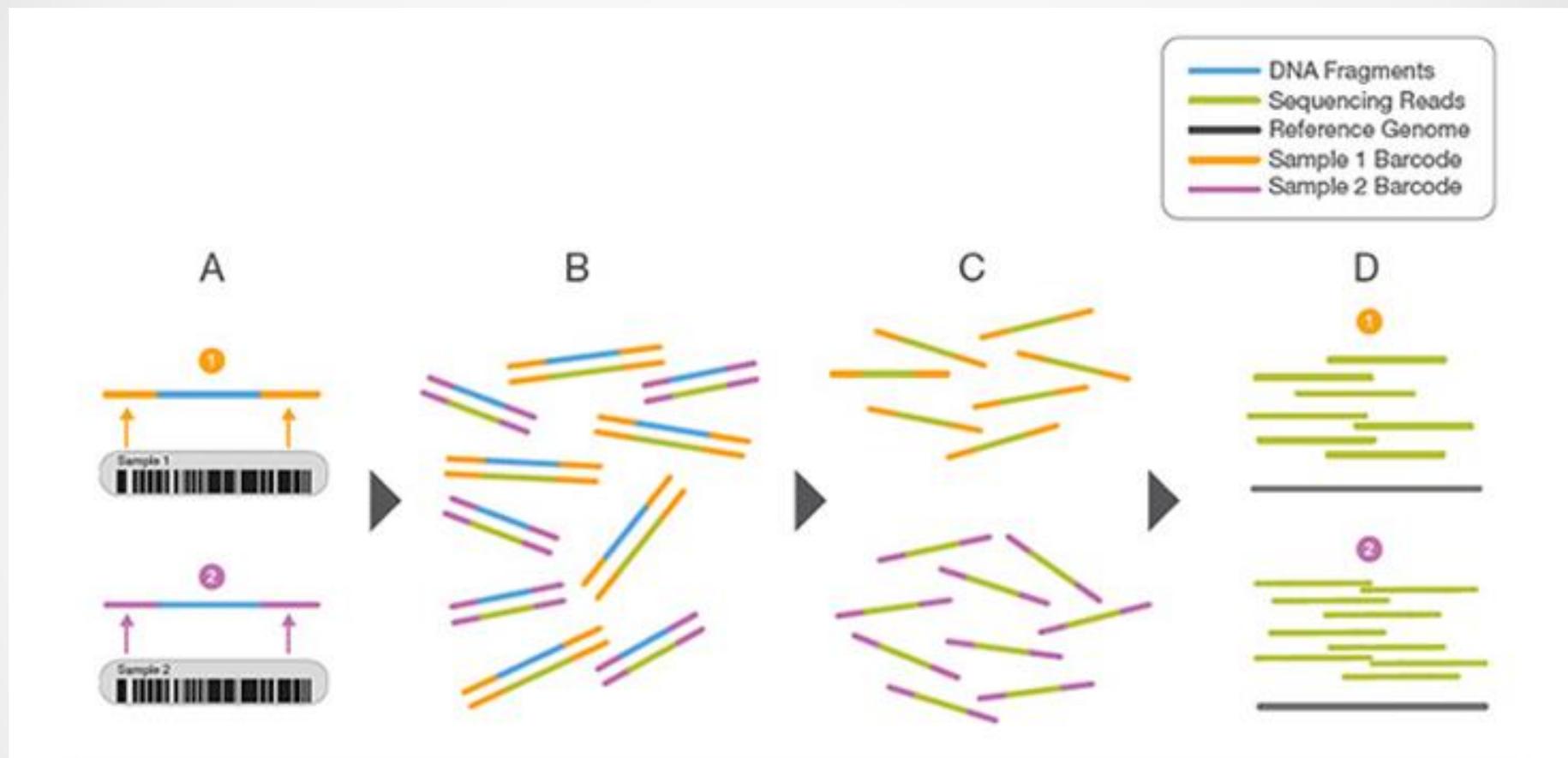
黄色代表各目标片段

简化成一步法

制作DNB



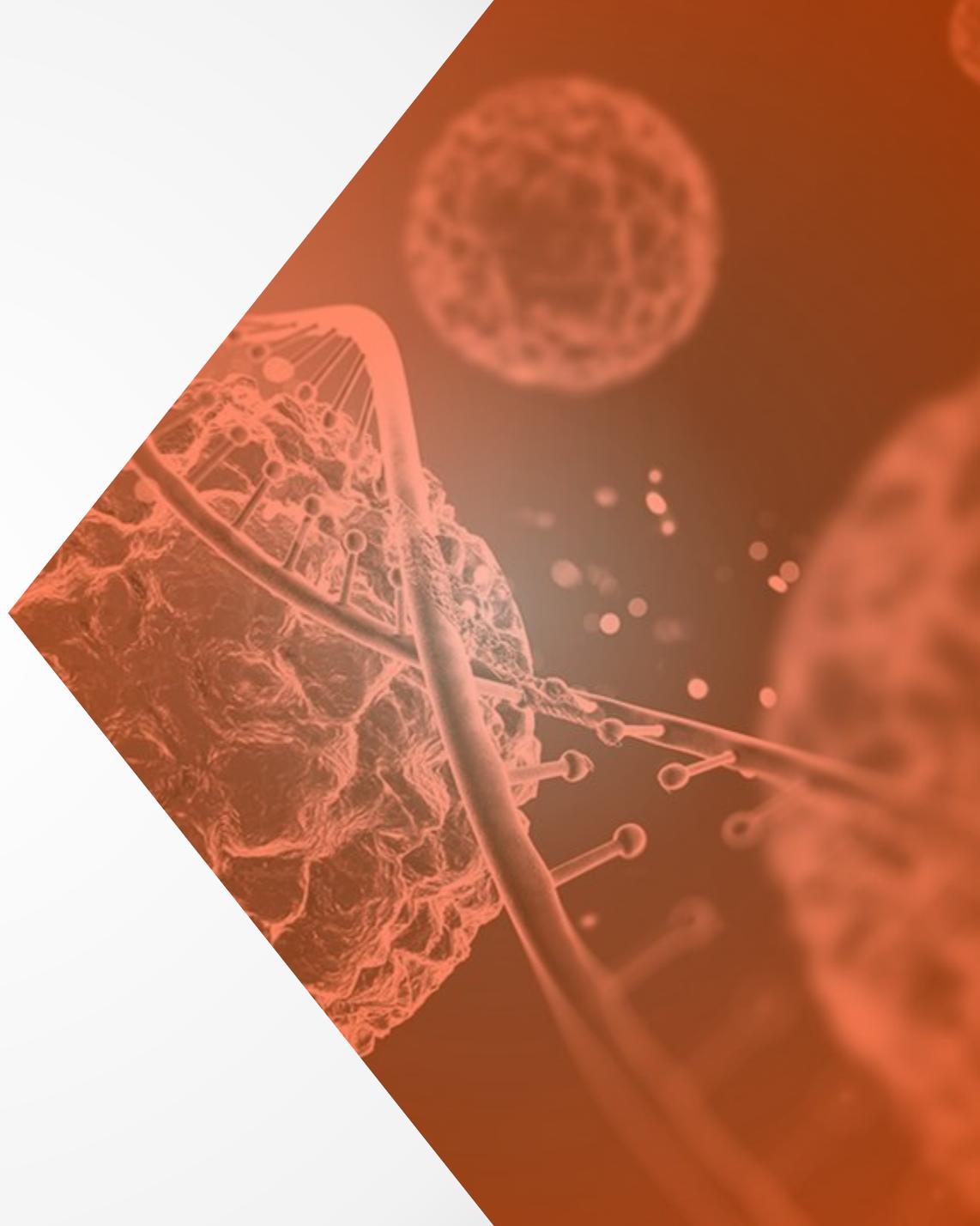
# (1) 文库构建原理



- 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  $\mu\text{L}$** 。

**注意：**若提取的DNA样本浓度大于5 ng/ $\mu\text{L}$ ，建议用TE Buffer稀释至5 ng/ $\mu\text{L}$ 后，取1 $\mu\text{L}$ 投入反应。

2. 在冰上配制第一轮PCR反应液 (25 $\mu\text{L}$ 体系)

试剂名称	一个反应标准量
PCR Enzyme Mix	12.5 $\mu\text{L}$
PCR Primer Pool	6 $\mu\text{L}$
Total	<b>18.5 <math>\mu\text{L}</math></b>

**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  $\mu\text{L}$ 配制好的PCR反应混合液 + 6.5  $\mu\text{L}$ 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  $\mu$ 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纯化常用于剔除掉文库中的接头自连和引物二聚体。

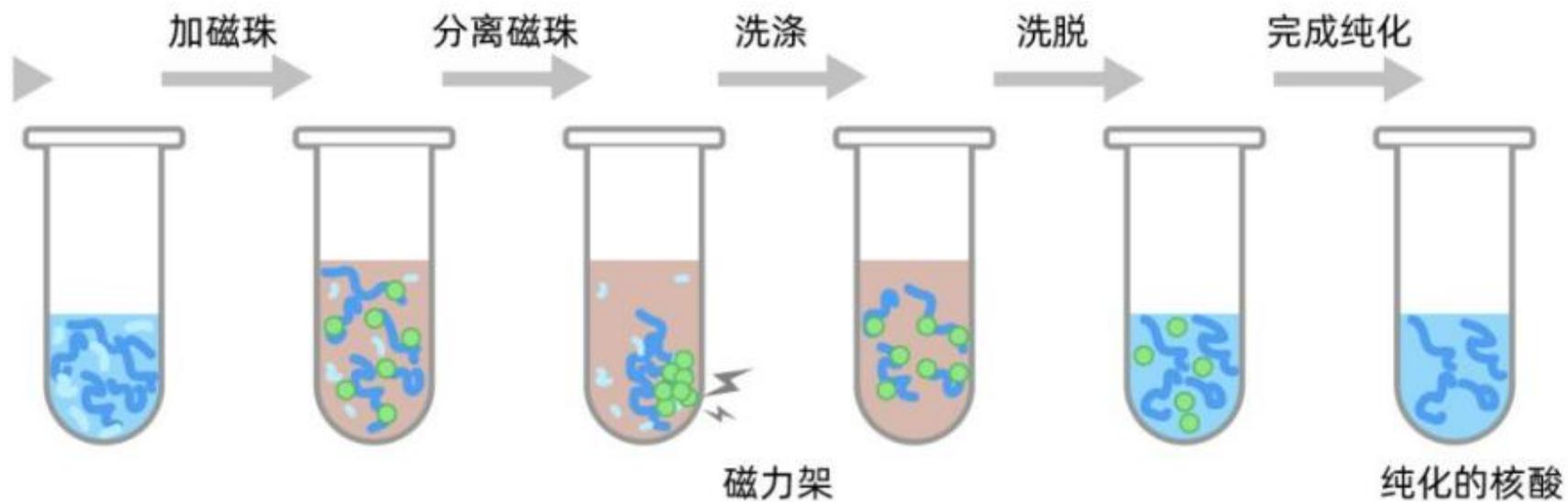
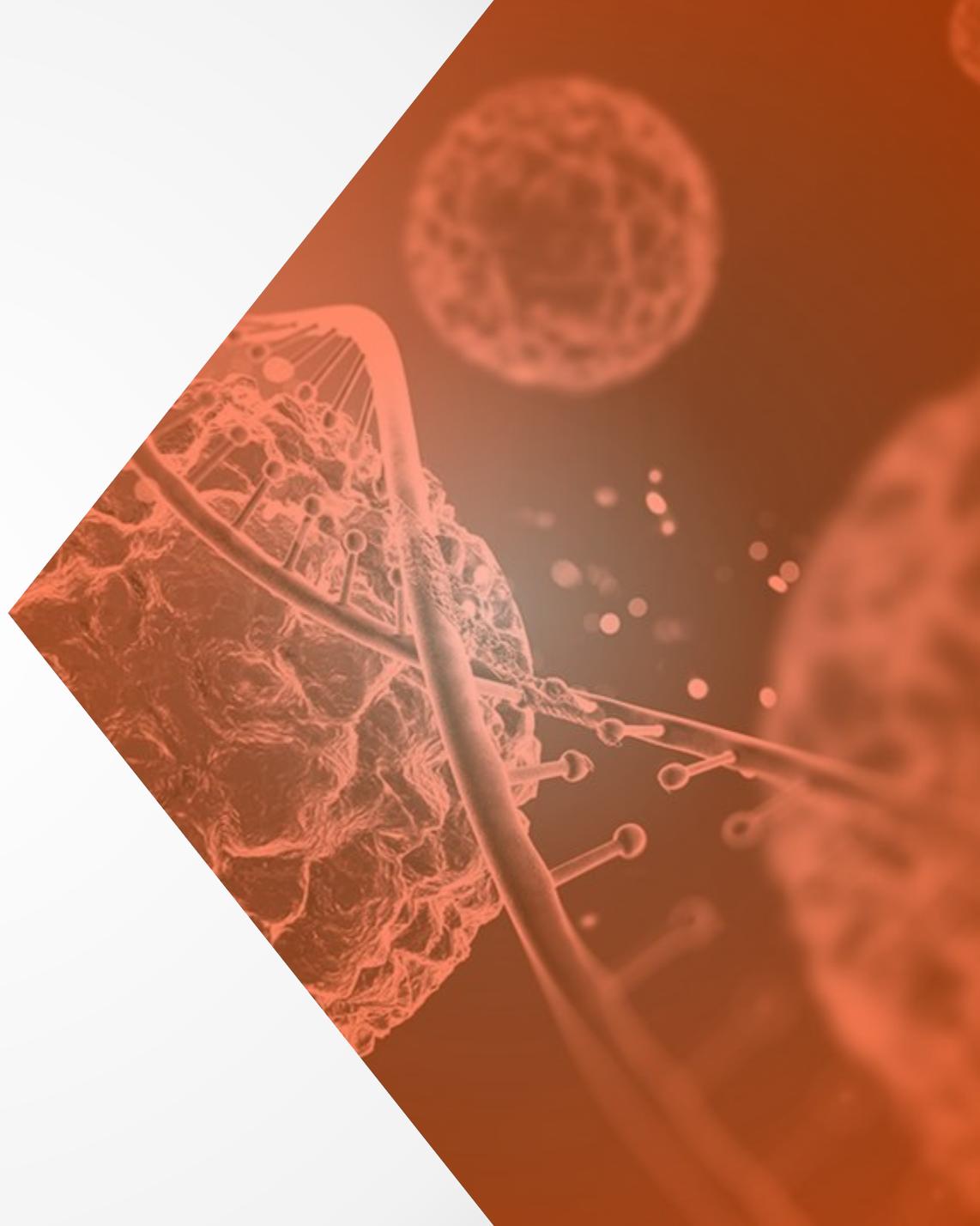


图1、DNA纯化操作流程图

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  $\mu$ L 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 $\mu$ L
PCR Block	3 $\mu$ L
PCR Dual Barcode Primer F	2 $\mu$ L
PCR Dual Barcode Primer R	2 $\mu$ L
Total	19.5 $\mu$ L

- 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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 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( $\text{ng}$ ) =  $500 \text{ ng}/N$ ，单个文库取样体积( $\mu\text{L}$ ) = 单个文库取样量( $\text{ng}$ ) / 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。