

OSPALC 扩增子文库构建手册(10 μ l 反应体系)

2022-11-01

中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所
进化基因组学实验室

使用本手册请引用: Jiahao Ni, Jiao Pan, Yaohai Wang, Tianhao Chen, Xinshi Feng, Yichen Li, Tongtong Lin, Michael Lynch, Hongan Long, Weiyi Li. (2023) One-Step PCR Amplicon Library Construction (OSPALC, version 1). Marine Life Science & Technology #-#-#

主要试剂 (以 16S rDNA V4 区域扩增子为例)

- Vazyme 2 \times Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (Cat. No.: P520-02) (或任何其他高保真酶)
- 正向引物 16SV4F1~16SV4F8
- 反向引物 16SV4R1~16SV4R12
- 灭菌超纯水
- OMEGA E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Cat. No.: D2500-02) (或任何其他胶回收试剂盒)
- VAHTS DNA Clean Beads (Cat. No.: N411-01)
- AMPure XP Reagent for PCR Purification (Cat. No.: A63880)

设备与耗材

- Jena Biometra GmbH 846-x-070-301 Biometra TOne 96G PCR 仪 (或任何其他 PCR 仪)
- 排枪 (2, 10, 200 μ l) + 枪头 (注意更换枪头!建议使用带滤膜枪头建库)
- 0.2ml 96-well PCR Plate (AXYGEN, Cat. No.: PMI0110-07A)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical (Bio-Rad, Cat. No.: MSB1001)
- NEST PCR sealing film (NEST, Cat. No.: 410001)
- Qubit[™] 3 Fluorometer (Invitrogen, Cat. No.: Q33216)
- Qubit[™] assay tubes (Invitrogen, Cat. No.: Q32856)

建库流程

准备 OSPALC 文库构建所需基因组 DNA/环境 DNA

1. 用 96 孔板将每份 DNA 样品用灭菌超纯水稀释至 1 ng/ μ l; 稀释时要避免样品交叉污染; 稀释后将 96 孔板冰冻保存。务必增加若干孔灭菌超纯水作为阴性对照。

注意: 任何样品或试剂配制完成后, 需充分混合, 再瞬时离心使液体到管底!

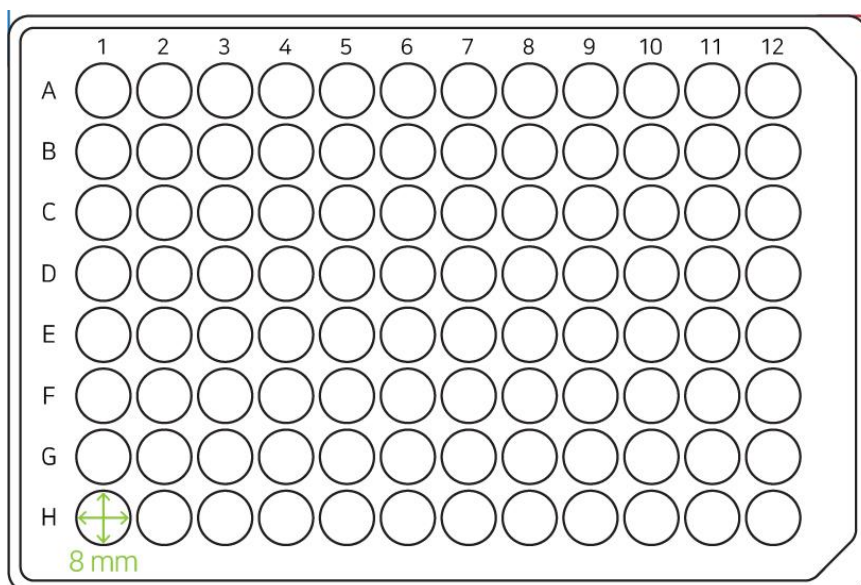
反应体系 (10 μ l)

2. 单个样品 PCR 反应体系:

Vazyme 2 \times Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)	5.0 μ l
正向引物	0.2 μ l
反向引物	0.2 μ l
灭菌超纯水	2.6 μ l
DNA	2 μ l (1ng/ μ l)
总体系	10.0μl

准备用于制备 96 个样品的预混液

3. 分别在 8 连 PCR 管与 12 连 PCR 管中混合针对 96 孔板每行与每列的试剂。



在 8 连 PCR 管中制备对应 96 孔板 A-H 行的预混液，离心后置于冰上：

正向引物 16SV4F1: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 16SV4F2: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 r 16SV4F3: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 16SV4F4: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 16SV4F5: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 16SV4F6: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 16SV4F7: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

正向引物 16SV4F8: $0.2 \times 1.3 \times 12 = 3.12 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 12 = 20.28 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 12 = 39.0 \mu\text{l}$

在 12 连 PCR 管中制备对应 96 孔板上 1-12 列的预混液，离心后置于冰上：

反向引物 16SV4R1: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R2: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R3: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R4: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R5: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R6: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R7: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$ ，灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$ ，Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R8: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$, 灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$, Vazyme $2 \times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R9: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$, 灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$, Vazyme $2 \times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R10: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$, 灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$, Vazyme $2 \times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R11: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$, 灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$, Vazyme $2 \times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

反向引物 16SV4R12: $0.2 \times 1.3 \times 8 = 2.08 \mu\text{l}$, 灭菌超纯水: $1.3 \times 1.3 \times 8 = 13.52 \mu\text{l}$, Vazyme $2 \times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus): $2.5 \times 1.3 \times 8 = 26.0 \mu\text{l}$

“1.3”是一个放大系数，以免试剂在转移过程中遗留在管壁或枪头中而导致试剂不足；所有试剂需要在冰上保持低温。

- 在冰上准备一个新的 96 孔板，使用排枪从 8 联 PCR 管中转移 $4 \mu\text{l}$ 的预混液到每行的孔中，令同一行的样品获得相同的 index。
- 用排枪将 $4 \mu\text{l}$ 的预混液从 12 联 PCR 管移至每一列的孔，使同一列的样品获得相同的 index。
- 用排枪将 $2 \mu\text{l}$ 稀释好的 DNA ($1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 转移到每个孔中。
- 用 BioRad B 密封膜将 96 孔 PCR 板紧盖，尤其要将边缘按压紧实，以免样品在 PCR 加热过程中蒸发。提前运行以下程序，等仪器预热后将 96 孔板放入 PCR 仪中开始 PCR 过程。

温度	时间	循环数
105°C	Lid	
98°C	Hold	
98°C	5 min	
98°C	30 sec	10
55°C	30 sec	
72°C	50 sec	
98°C	30 sec	10
$55^{\circ}\text{C to } 65^{\circ}\text{C}$	30 sec	
72°C	50 sec	
72°C	7 min	
4°C	Hold	

扩增子文库（PCR 反应产物）的质控与合并

- 通过琼脂糖凝胶电泳检查每个文库的大小分布，跑胶条带应该在目标区域(扩增目的基因片段与两个长引物的长度之和，每条长引物在 90bp 左右)集中分布。
- 使用 OMEGA E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Cat. No.: D2500-02) 或任何其他胶回收试剂盒对目标片段进行纯化回收。在样品过多的情况下，也可以通过磁珠纯化去除 200bp 以下的引物二聚体（每个文库加入磁珠液的体积 = $0.8 \times$ 文库体积，可以排枪操作）。
- 根据 Qubit 测量的浓度合库至 EP 管中，合并文库中每个子文库的含量应当相等，每个子文库的平均体积应约为 $1 \mu\text{l}$ 。
- 将约 $20 \mu\text{l}$ 的合并文库邮寄给测序商进行 PE250 测序。每个样本应当有 100,000 个 reads (50,000 forward reads 和 50,000 reverse reads, 即 50000 tags) 的测序量。
- 使用 Nest PCR 密封膜覆盖存放剩余文库的 96 孔板，并在 -20°C （如果用于长期储存，应当使用 -80°C ）下存储。