



DNA 测序 文库构建流程



目 录

第一章 基因组 DNA 抽提 (Extract the Genomic DNA)	3
第二章 DNA 片段化 (Fragment DNA)	5
第三章 末端修复 (Perform End Repair)	6
第四章 连接接头 (Ligate the Adapters)	7
第五章 片断选择 (Size Selection)	8
第六章 PCR 扩增 (PCR Amplification)	9
第七章 文库质检 (QC the Library)	11
第八章 试剂和仪器 (Reagent and Equipment)	12



第一章 基因组DNA抽提(Extract the Genomic DNA)

1. 组织

- A. 切取 25 mg 组织, 将其放置于 1.5 mL 离心管中, 加入 180 μ L Buffer ATL。
- B. 加 20 μ L 蛋白酶 K, 振荡混匀, 56 $^{\circ}$ C 恒温放置, 其间隔不时振荡。
- C. 待组织彻底溶解后, 加入 4 μ L RNase A (100mg/mL), 振荡混匀, 室温放置 2 min, 振荡 15 s, 加入 200 μ L Buffer AL 到样品中, 振荡混匀。继续步骤 4。

2. 血液

- A. 无核细胞: 加 20 μ L 蛋白酶 K 到 1.5mL 离心管中, 加 50-100 μ L 抗凝血, 用 PBS 调节体积至 220 μ L 。
- B. 有核细胞: 加 20 μ L 蛋白酶 K 到 1.5ml 离心管中, 加 5-10 μ L 抗凝血, 用 PBS 调节体积至 220 μ L 。
- C. 培养细胞: 300 x g 离心 3 min 收集细胞 (5×10^6), 用 200 μ L PBS 悬浮细胞, 加 20 μ L 蛋白酶 K。
- D. 加入 4 μ L RNase A (100mg/mL), 振荡混匀, 室温放置 2 min 后, 加 200 μ L Buffer AL, 振荡混匀, 56 $^{\circ}$ C 恒温放置 10 min。继续抽提步骤 4。

3. 细菌

- A. 格兰氏阴性菌: 5000 g (7500 rpm) 离心 10 min 收集菌体 (菌数不超过 2×10^9), 弃上清。加入 180 μ L Buffer ATL。加 20 μ L 蛋白酶 K, 振荡混匀, 56 $^{\circ}$ C 恒温放置, 其间隔不时振荡。待组织彻底溶解后, 加入 4 μ L RNase A (100 mg/mL), 振荡混匀, 室温放置 2 min, 振荡 15 s, 加入 200 μ L Buffer AL 到样品中, 振荡混匀。继续步骤 4。
- B. 格兰氏阳性菌: 5000 g (7500 rpm) 离心 10 min 收集菌体 (菌数不超过 2×10^9), 弃上清。加入 180 μ L 酶性裂解液 (20 mM Tris.Cl, pH8.0; 2 mM sodium EDTA; 1.2% Triton X-100; add lysozyme to 20mg/mL before use)。37 $^{\circ}$ C 温育至少 30min。加入 25 μ L 蛋白酶 K 和 200 μ L Buffer AL, 混匀。56 $^{\circ}$ C 恒温放置 30min。继续步骤 4。



4. 加入 200 μL 无水乙醇, 振荡混匀。
5. 将步骤 3 的混合液 (包括沉淀) 全部加入到 DNeasy Mini 纯化柱中。13,200 rpm 离心 1min, 弃过滤液和收集管。
6. 将纯化柱放置在一个新的收集管中, 加 500 μL Buffer AW1, 13,200 rpm 离心 1min, 弃过滤液和收集管。
7. 将纯化柱放置在一个新的收集管中, 加 500 μL Buffer AW2, 13,200 rpm 离心 3 min, 弃过滤液和收集管。
8. 将纯化柱重置收集管中, 13,200 rpm 离心 1 min, 弃过滤液和收集管。
9. 将纯化柱置入一新的 1.5 mL 离心管中, 加 200 μL Buffer AE, 室温放置 1 min, 13,200 rpm 离心 1 min 洗脱。
10. 将洗脱液重新加回到纯化柱中, 重复步骤 8。
11. DNA样本质检:
 - A. 样品纯度: A260/A280 值应在 1.7~2.0 之间; A260/A230>1.5; RNA 应该去除干净; 电泳检测主带大于 20 K, 无明显降解。
 - B. 样品浓度: 最低浓度不低于 50 ng/ μL 。
 - C. 样品总量: 每个样品总量不少于 4 μg 。

第二章 DNA 片段化 (Fragment DNA)

1. 在 1.5 mL LoBind 管中, 用 1X Low TE Buffer 稀释 30ng-1 μ g 高质量的基因组 DNA 至 120 μ L。
2. 转移 120 μ L 稀释后 DNA 到 microTUBE 中, 不要在管底产生气泡。
3. 将 Covaris™ microTUBE 置于 Covaris Tube Holder 中, 用 Covaris S2 系统超声打断 DNA, 设置如下:

Setting	Value
Duty Cycle	10%
Intensity	4
Cycles per Burst	200
Time	55 seconds
Set Mode	Frequency sweeping
Temperature	6-8 $^{\circ}$ C

4. 转移超声后的样本至一个新的 1.5 mL LoBind 管中。真空浓缩至 50 μ L。
5. 此时目标 DNA 片段的长度为 300 bp。改变上述设置可得到不同长度范围的 DNA 片段。



第三章 末端修复 (Perform End Repair)

1. 混合如下试剂：

Reagent	Volume(μ L)
Sheared DNA	55.5
End Repair Reaction Buffer(10X)	6.5
End Repair Enzyme Mix	3
Total Volume	65

2. 放置在 PCR 仪上， 20 $^{\circ}$ C， 30min \rightarrow 65 $^{\circ}$ C， 30min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C， 暂停



第四章 连接接头 (Ligate the Adapters)

1. 混合如下试剂:

Reagent	Volume(μ L)
End Prep reaction mixture	65
Blunt/TA Ligase Master Mix	15
NEBNext Adaptor for Illumina	2.5*
Ligation Enhancer	1
Total Volume	83.5

*起始 DNA 在 100ng 以下时, 按 1: 10 稀释 NEBNext Adaptor 到 1.5nM 终浓度再使用

2. 在 PCR 仪上 20 $^{\circ}$ C 孵育 15min。
3. 在上述反应物中加入 3 μ L USER 酶。
4. 混匀后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min。

第五章 片断选择 (Size Selection)

1. 准备好 AMPure XP 磁珠。
2. 补 13.5 μL 水至上步反应物中, 使总体积达到 100 μL 。

插入片段长度 (bp)	150	250	300-400	400-500
文库长度 (bp)	270	400	400-500	500-600
第一次磁珠用量 (μL)	65	45	40	35
第二次磁珠用量 (μL)	25	25	20	15

注: 常规使用插入片段长度为 250bp

3. 按照上表根据需要的片断长度选择不同的纯化磁珠组合, 本文以 250bp 的目的片段为例:
4. 加入 45 μL 重悬的 AMPure XP 磁珠, 混匀。
5. 室温放置 5min。
6. 置于磁力架上, 待液体清澈后 (大约 1-2min), 转移清液至另一新管 (**注意: 不要丢弃清液!**), 丢弃吸附了大片断的磁珠。
7. 上述清液中加入 25 μL AMPure XP 磁珠, 混匀, 室温放置 5min。
8. 置于磁力架上, 待液体清澈后 (大约 1-2min), 丢弃含杂质的清液 (**注意: 不要丢弃磁珠!**), 小心保留吸附了待选片段的磁珠。
9. 保持在磁力架上, 加入 200 μL 80% 新鲜配制的乙醇洗涤磁珠, 室温静置 30s, 丢弃清液。
10. 重复上步一次。
11. 使磁珠在空气中晾干, 大约 5-10min。
12. 加入水 28 μL , 用震荡器或枪头混匀, 放置在磁力架上。待液体清澈后 (大约 1-2min), 取清液 23 μL 用于后续的 PCR 反应。

第六章 PCR扩增 (PCR Amplification)

1. 扩增测序文库:

A. 在 PCR 管中混和以下反应物

Reagent	Volume(μ L)
Adaptor Ligated DNA Fragments	23
HiFi 2x PCR Master Mix	25
Index Primer	1
Universal Primer	1
Total	50

B. PCR 条件

Cycle Step	Temp($^{\circ}$ C)	Time(sec)	Cycles
Initial Denaturation	98	30	1
Denaturation	98	10	
Annealing	65	30	6-15*
Extension	72	30	
Final Extension	72	300	1
Hold	4	∞	

*对于 1 μ g DNA 起始量用 6 cycles, 50ng 用 10 cycles

- 利用 AMPure XP Beads 纯化。注意: 预先将 AMPure XP Beads 拿出室温平衡 30 min。
- 充分混匀磁珠, 加入 50 μ L AMPure XP Beads 到含有 50 μ L 扩增产物的 EP 管中。充分混匀, 室温放置 15 min。
- 将含有样品的离心管放置在磁力架上吸附 2 min 左右, 确保所有的磁珠都已吸附在磁力架的一边。
- 弃去 95 μ L 的上清液, 加入 200 μ L 的新鲜配制的 80% EtOH。等待 30 second, 弃去上清液。
- 重复步骤 5 一次。注意: 将酒精尽量吸尽。



7. 将含有磁珠的EP管取出磁力架，在室温放置15 min，使其充分晾干。
8. 待其晾干之后，加入32.5 μL 的 Resuspension Buffer，用移液器轻轻吹打10次，充分混匀，室温放置2 min。
9. 将含有磁珠的EP管放置在磁力架上吸附2 min，确保所有的磁珠都已吸附在磁力架的一边。
10. 待上清液完全澄清，用移液器吸取至少30 μL 的扩增产物到新的1.5ml EP管中。此扩增产物即为待质检的测序文库。



第七章 文库质检（QC the Library）

1. 使用Aglient 2100系统检测文库的大小和纯度。
2. 若文库扩增后产物含有较多引物，可用 Agencourt AMPure XP Beads 纯化。
3. 使用Qubit® 2.0 Fluoromete 和 Qubit™ dsDNA HS试剂盒检测文库浓度。

第八章 试剂和仪器 (Reagent and Equipment)

所需试剂

产品/试剂	生产商	货号
NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina	NEB	E7370S/L
Agencourt® AMPure XP Beads	Beckman	A63881
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen	Q32854
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626

仪器设备

仪器	生产商	货号
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen	Q32866
Magnetic Stand-96	Life Technologies	AM10027
GeneAmp PCR System 9700	Life Technologies	4314878
MicroCentrifuge	Eppendorf	5418
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2939AA
ThermalStat Plus	Eppendorf	5352 000.088