

Code No. R161A

研究用

TaKaRa

16S(V3–V4) Metagenomic Library
Construction Kit for NGS

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒以外需要准备的其他试剂、仪器等（主要用品）	2
● 操作上的注意事项	2
● 实验操作	3
● Troubleshooting	5
● 关联产品	5
● 参考文献	5

● 制品说明

本制品是使用 Illumina 公司 MiSeq 对细菌丛 16S rRNA 进行解析时使用的 PCR 扩增试剂盒。以细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域为对象，使用对多样序列能有效扩增的 PCR 酶 Tks Gflex™ DNA Polymerase 进行扩增。

引物是采用设计在常用的高效扩增区域 (V3-V4) 上的 341F、806R (见图 1)，在引物的 5' 端连有 Illumina MiSeq 用的 overhang 序列。使用本试剂盒扩增得到 PCR 产物后，利用 Nextera XT Index Kit (Illumina 公司) 制备 MiSeq 用文库。Nextera XT Index Kit 中的引物能够在待测文库的两端接入测序用 adaptor 和用于区分各个被检测样品的 Index 序列 (见图 2)。

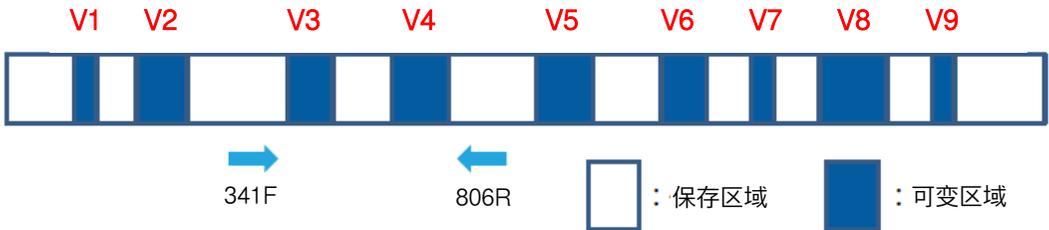


图 1. 16S rRNA 的可变区域和使用本制品的 PCR 扩增区域

以基因组 DNA 为模板，使用目的区域特异且添加 overhang adaptor 的引物进行 PCR 扩增。

Forward Primer:

Illumina 公司 Miseq 用 overhang adaptor

5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' → ← 目的区域特异的 Primer(341F)

Reverse Primer:

目的区域特异引物 (806R)

→ ← Illumina 公司 Miseq 用 overhang adaptor
5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

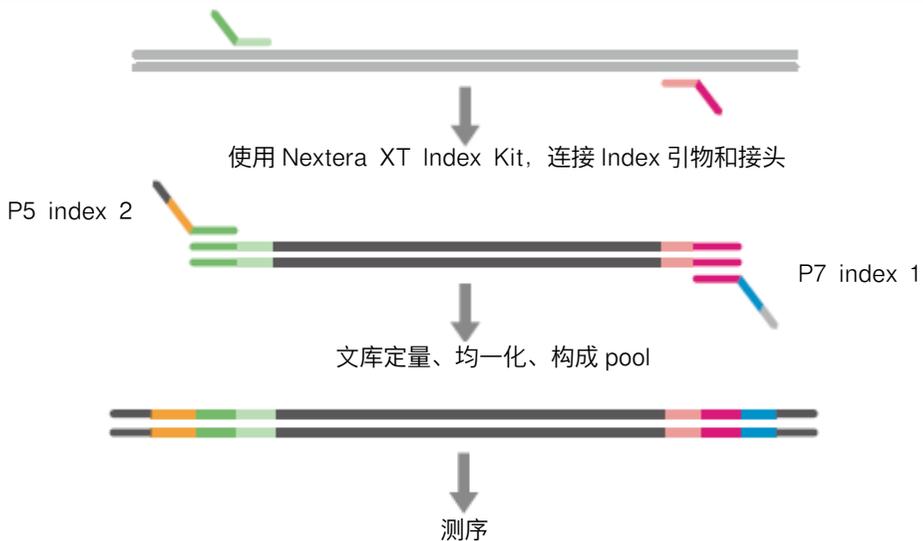


图 2. 文库制备流程

● 制品内容 (50 次量)

2×Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	1.25 ml
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/μl)	62.5 U (50 μl)
16S V3-V4 Primer Mix (10×)	125 μl
H ₂ O	1 ml

● 保 存: -20℃

● 试剂盒以外需要准备的其他试剂、仪器等 (主要用品)

- 核酸提取 Kit
 - 【粪便样品】
NucleoSpin DNA Stool (Code No. 740472.10/.50)等
 - 【土壤样品】
NucleoSpin Soil (Code No. 740780.10/.50/.250)等
- PCR 产物的纯化
 - Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter 公司, Code No. A63880/A63881/A63882)
 - 0.2 ml 磁力架: Magnetic Separator-PCR Strip (Code No. 635011) 等
 - 新配的 80% 乙醇
 - 溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH8.5)
- 测序 adaptor 与 Index 序列的添加
 - Nextera XT Index Kit (Illumina Code No. FC-131-1001/FC-131-1002)
 - Nextera XT Index Kit v2 set A-D (Illumina Code No. FC-131-2001~2004)
- PCR 仪
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Gradient* (Code No. TP600) 等
- 凝胶电泳装置
 - Mupid-2plus (Code No. M-2P)
 - Mupid-exU (Code No. EXU-1) 等
- 凝胶
 - Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
 - PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A) 等
- 微量高速离心机
- 微量移液器及 Tip

● 操作上的注意事项

1. PCR 仪的操作请参考各仪器的操作说明书。
2. 从反应液的制备到检测, 建议设置以下 4 个区域, 对各个反应进行物理隔离。
请尽量避免在反应区域 4 以外的其他区域操作含有 PCR 产物的反应管。
 - 区域 1: PCR 反应液的制备、分装等操作区域。
 - 区域 2: 样品的制备 (DNA 提取等) 区域。
 - 区域 3: 向 PCR 反应液中添加模板 DNA 的区域。
 - 区域 4: 电泳、PCR 扩增产物分析区域。

● 实验操作

1. 1st PCR

以样品中提取的DNA为模板，使用本制品中的Primer和PCR酶对V3-V4区域进行扩增，使用H₂O作为阴性对照同时进行实验。

1) 在冰上配制以下反应液（在区域1操作）。

除DNA提取液和H₂O以外，依照如下组份先按反应数+ α 的量配制Master Mix，取配制好的Master Mix分装到PCR反应管中。

<1反应体系>

试剂	使用量
2×Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μ l
16S V3-V4 Primer Mix (10×)	2.5 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μ l
DNA 提取液或 H ₂ O	x μ l*
H ₂ O	9.5 - x μ l
Total	25 μ l

*此处不添加DNA提取液。

取上面反应管中的一个作为阴性对照，在反应管中加入H₂O后将管盖压紧。

2) 添加DNA提取液（在区域3操作）。

※ DNA的适宜添加量是一个反应加入10 ng。样品不足10 ng时，请加入最大体积量（9.5 μ l）的DNA提取液。

3) 按以下条件进行PCR反应。

<初期变性>

94°C 1分钟

<PCR: 28 cycles>

98°C 10秒

50°C 15秒

68°C 15秒

<Hold>

4°C Hold

2. 1st PCR产物的纯化

使用Agencourt AMPure XP（Beckman Coulter公司）对1st PCR扩增产物进行纯化。

1) 准备

将Agencourt AMPure XP磁珠充分打散，混匀。

2) 扩增产物与Agencourt AMPure XP磁珠的结合。

· 按以下比例在PCR产物中加入Agencourt AMPure XP。

PCR 产物	25 μ l
Agencourt AMPure XP	20 μ l

· 充分混匀

· 室温孵育15分钟

· 轻轻离心

· 放置磁力架上静置5分钟

· 去除上清液

- 3) 第一次清洗
 - 将反应管放置在磁力架上不动，加入200 μ l 新配的80%的乙醇。
 - 室温静置30秒
 - 去除80%的乙醇
- 4) 第二次清洗
 - 重复一次上述 3) 第一次清洗操作
 - 轻轻离心
 - 磁力架上放置1分钟
 - 去除残留的80%的乙醇
- 5) 磁珠的干燥
 - 室温干燥1分钟
- 6) 扩增产物的溶出
 - 加入30 μ l 的溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH8.5)
 - 轻轻地上下吸打混匀
 - 室温孵育5分钟
 - 将反应管放置磁力架上，静置5分钟
 - 回收上清液

※ 需要将纯化后的PCR产物进行电泳检测，以确认是否得到扩增产物。

※ 扩增产物长度约550 bp。

3. 2nd PCR

以操作 2.中纯化得到的 1st PCR 产物为模板，进行 2nd PCR。2nd PCR 是使用本制品的 PCR 试剂和 Nextera XT Index Kit (Illumina 公司) 的引物。使用 Nextera XT Index Kit 时，可对检测样品添加不同组合的 Index primer。

1) 在冰上配制以下反应液 (在区域 1 操作)。

除 1st PCR 纯化产物以外，依照如下组份先按反应数+ α 的量配制 Master Mix，取配制好的 Master Mix 分装到 PCR 反应管中。

试剂	使用量
2 \times Gflex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	12.5 μ l
Index 1 primer	2.5 μ l
Index 2 primer	2.5 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μ l
1st PCR 纯化产物	2 μ l*
H ₂ O	5 μ l
Total	25 μ l

*此处不添加 1st PCR 纯化产物。

2) 加入 1st PCR 纯化产物。(在区域 3 操作)

3) 按以下条件进行 PCR 反应。

<初期变性>

94 $^{\circ}$ C 1 分钟

<PCR: 8 Cycles>

98 $^{\circ}$ C 10 秒

60 $^{\circ}$ C 15 秒

68 $^{\circ}$ C 15 秒

<Hold>

4°C Hold

4) 2nd PCR 产物的纯化

与【2. 1st PCR 产物的纯化】进行相同的操作，对 2nd PCR 产物进行纯化。

※ 纯化后，将产物进行电泳检测，以确认是否获得扩增产物。

※ 扩增产物长度约 600 bp。

5) 2nd PCR 产物的混合

将各 PCR 产物等摩尔量添加到 1 个反应管中充分混合。

※ PCR 产物的浓度测定推荐使用 Qubit dsDNA BR Assay Kit 或 HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) 等针对双链 DNA 定量的仪器。

※ 可以使用 Illumina 公司提供的其他 Protocol 进行等摩尔混合。详细请参考 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B (参考文献 3) 中第 16 页的内容。

※ 测序推荐使用 Sequence Read 后半部分测序品质较高的 MiSeq 250 bp pair-end 来进行。

● Troubleshooting

1. PCR 扩增未得到产物

未得到 PCR 产物时，需考虑 PCR 阻碍物的混入。进行 1st PCR 前将用于扩增的基因组 DNA 样品使用 AMPure 或柱子进行纯化。柱子纯化推荐使用 NucleoSpin gDNA Clean-up XS (Code No. 740904.10/.50/.250)。

2. 不能获得各个检测样品分开的测序数据

此种情况请确认 2nd PCR 中 Index 序列的组合添加。Index 序列的组合添加相关内容请参考 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B 第 23–25 页内容。

● 关联产品

NucleoSpin DNA Stool (Code No. 740472.10/.50) 等

NucleoSpin Soil (Code No. 740780.10/.50/.250) 等

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch (Code No. TP350)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)

NucleoSpin gDNA Clean-up XS (Code No. 740904.10/.50/.250)

● 参考文献

1. Klindworth A, *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7, **41**(1): e1.
2. Caporaso JG, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012 Aug, **6**(8): 1621–1624.
3. 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B
http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

Tks Gflex, Thermal Cycler Dice, and PrimeGel are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201908Da