



One-Step Bacteria 16S rRNA Library

Prep Kit 一步法细菌16S rRNA建库试剂盒

Magicbio # M317



产品介绍

One-Step Bacteria 16S Library Prep Kit是针对illumina测序平台开发的16S测序文库构建试剂盒。试剂盒采用了优化的dual-index扩增策略，特异性扩增微生物样本16S rRNA gene的V3-V4区(319F-806R)，使用一步PCR扩增获得完整的测序文库，可直接用illumina MiSeq平台进行PE300测序或者HiSeq2500平台进行PE250测序。试剂盒操作简单、快速、灵活，dual-index策略允许更多样本混合测序。

试剂盒组成

产品成分	M3171 (96次)	M3172 (4*96次)	保存条件
2×Hifi PCR Master Mix	1ml	4×1 ml	-20°C
16S PCR Primer F	8管×12次	12管×32次	-20°C
16S PCR Primer R	12管×8次	24管×16次	-20°C
DNA Clean Beads	2×1 ml	7×1 ml	4°C

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成。
2. 请使用高质量的DNA样品。低质量样品可能导致建库失败。
3. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
4. 实验所用磁珠应提前30分钟自4°C环境中取出，平衡至室温。所有磁珠操作均需置于室温。
5. 80%乙醇需现配现用。

需自备材料

无水乙醇；Nuclease-Free H₂O；200uL PCR管；1.5mL离心管；磁力架；PCR仪等。

操作步骤

- 1 在新的PCR管中配制如下反应体系：

组份	体积
DNA样品(10-100ng)	X uL
2×Hifi PCR Master Mix	10 uL
16S PCR Primer F	2 uL
16S PCR Primer R	2 uL
Nuclease-Free H ₂ O	6-X
总体积	20.0 uL

* PCR Primer F和PCR Primer R分别具有12和24种index序列为可供选择使用，在使用时，请先用移液器轻轻吹打，混合均匀，然后每个样本单独加入。

2 移液器轻轻吹打20次充分混匀，放入PCR仪按照以下程序扩增

温度	时间	循环数
98°C	10 min	
98°C	10s	} 30 Cycles*
58°C	30s	
72°C	30s	
72°C	5min	
4°C	∞	

3 用磁珠纯化片段化产物，步骤如下：

1. 将室温放置的30min后的DNA Clean Beads涡旋震荡混匀，并吸取16 uL至PCR产物中，移液器轻轻吹打10次充分混匀，室温孵育5分钟。
2. 将反应管短暂离心并置于磁力架上，放置5min，待溶液澄清，移除上清。
3. 保持离心管始终处于磁力架中，加入200 uL新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30秒后移除上清。
4. 重复步骤3，总计漂洗两次。
5. 保持离心管始终处于磁力架中，开盖晾干。
6. 将离心管从磁力架中取出，加入22 uL Nuclease-Free H₂O洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置2 min。
7. 将反应管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体。待溶液澄清吸取20uL上清至新的PCR管中，进行文库质检或-20°C保存。

文库质检

推荐使用凝胶电泳或安捷伦2100生物分析仪、Qubit检测文库片段大小和浓度。

引物序列

引物序列结构如下：

16S PCR Primer R

5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
NNNNNNNNNNNN GGACTACHVGGGTWTCTAAT

16S PCR Primer F

5'- CAAGCAGAAGACGGCAT [ACGAGAT] GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
XXXXXXXXXXXXX ACTCCTACGGGAGGCAGCAG -3'

注：ACGAGAT为测序Index，本试剂盒所构建文库均包含此I7 index。

NNNNNNNNNNNN和XXXXXXXXXXXXX index分别位于read1和read2序列的前端，用于数据分析时区分样本。Index序列见附表

参考文献：Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Microbiome. 2014 Feb 24;2(1):6. doi: 10.1186/2049-2618-2-6.

附表 Index 序列

名称	Index序列		名称	Index序列
F-13	GTTACGTGGTTG		R-7	TGTTGCGTTTCT
F-14	TACCGCCTCGGA		R-8	ATGTCCGACCAA
F-15	CGTAAGATGCCT		R-9	AGGTACGCAATT
F-16	TACCGGCTTGCA		R-10	ACAGCCACCCAT
F-17	ATCTAGTGGCAA		R-11	TGTCTCGCAAGC
F-18	CCAGGGACTTCT		R-12	GAGGAGTAAAGC
F-19	CACCTTACCTTA		R-13	GTTACGTGGTTG
F-20	ATAGTTAGGGCT		R-14	TACCGCCTCGGA
F-21	GCACTTCATTTC		R-15	CGTAAGATGCCT
F-22	TTAACTGGAAGC		R-16	TACCGGCTTGCA
F-23	CGCGGTTACTAA		R-17	ATCTAGTGGCAA
F-24	GAGACTATATGC		R-18	CCAGGGACTTCT
R-1	CCTAAACTACGG		R-19	CACCTTACCTTA
R-2	TGCAGATCCAAC		R-20	ATAGTTAGGGCT
R-3	CCATCACATAGG		R-21	GCACTTCATTTC
R-4	GTGGTATGGGAG		R-22	TTAACTGGAAGC
R-5	ACTTTAAGGGTG		R-23	CGCGGTTACTAA
R-6	GAGCAACATCCT		R-24	GAGACTATATGC