

## 宏基因组测序方法流程

### 1、基因组 DNA 的提取：

采用与样本类型相符的提取方法对样本的基因组 DNA 进行提取：

CTAB 抽提法：滤膜、水体等微生物含量少的样本；

天根磁珠试剂盒：粪便、土壤等。

### 2、DNA 样品检测：

1) 利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测（AGE）分析 DNA 的纯度和完整性；

2) 使用 Qubit® dsDNA Assay Kit in Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, CA, USA)

对 DNA 进行定量。

3) 取适量样本于离心管中，用无菌水稀释样品至 OD 值在 1.8-2.0 之间。

### 3、文库构建和上机测序：

取样本的 1  $\mu$ g 基因组 DNA，使用 NEBNext® Ultra

DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, USA) 进行文库的构建，用 Covaris 超声波破碎仪随机打断成长度约为 350bp 的片段，经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。

文库构建完成后，先使用 Qubit2.0 进行初步定量，稀释文库至 2ng/ $\mu$ l，随后使

用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测，insert size 符合预期后，使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量（文库有效浓度  $>3$ nM），以保证文库质量。

库检合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina PE150 测序。

---