

微生物多样性实验流程材料方法

(BMK-20210416 版)

一、提取方法：

使用 TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒完成核酸的提取(适用于大部分微生物样品)。

备注：厂家：天根生化科技（北京）有限公司，型号：DP812

1. 样本处理

1) 土壤样本处理：

在 2 ml 离心管中加入样本 0.25-0.5 g，加入 500 μ l 缓冲液 SA、100 μ l 缓冲液 SC 和 0.25 g 研磨珠，涡旋振荡 15 min 至样本混匀或使用 TGrinder H24 组织研磨均质仪（OSE-TH-01）混匀（6M/S 的速度振荡 30s，间隔 30s，共 2 个循环）。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，转移上清液（约 500 μ l）至新的 2 ml 离心管。

注意：针对一些得率低或需提取真菌基因组的样本，建议涡旋震荡混匀或组织匀质仪震

荡混匀后 70°C 加热裂解 15 min 以提高裂解效率。

2) 粪便样本处理：

在 2 ml 离心管中加入样本 0.25-0.5 g，如果是液态样本则转移 200 μ l 至离心管中，加入 500 μ l 缓冲液 SA、100 μ l 缓冲液 SC 和 0.25 g 研磨珠，（粪便样本中可能有 RNA 残留，如果需要去除 RNA，建议再加入 10 μ l RNase A（TIANGEN，RT405-02，自备））涡旋震荡混匀或组织匀质仪震荡混匀后 70°C 加热裂解 15min 提高裂解效率。12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，转移上清液（约 500 μ l）至新的 2 ml 离心管。

注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可将温度提高至 95°C 以促进裂解。

2. 加入 200 μ l 缓冲液 SH 混匀，涡旋 5 sec，4°C 放置 10 min。

3. 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 3 min，转移上清液至新的 2 ml 离心管，加入 500 μ l 缓冲液 GFA（使用前请先检查是否已加入异丙醇），颠倒混匀。

注意：转移上清时不要移走沉淀，否则可能降低 DNA 纯度。

4. 加入 10 μ l 磁珠悬浮液 G，振荡混匀 5 min。

注意：为了确保磁珠彻底重悬，请在使用前振荡混匀

5. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，小心吸去液体。

6. 将离心管从磁力架上取下，加入 700 μ l 去蛋白液 RD（使用前请先检查是否已加入无水乙

醇），振荡混匀 5 min。

7. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，小心吸去液体。

8. 将离心管从磁力架上取下，加入 700 μ l 漂洗液 PWD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），振荡混匀 3 min。

9. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，小心吸去液体。

10. 重复步骤 8 和 9 一次。

11. 将离心管于磁力架上，室温晾干 5-10 min。

注意：乙醇残留会抑制后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间，以免难以洗脱 DNA。

12. 将离心管从磁力架上取下，加入 50-100 μ l 洗脱缓冲液 TB，振荡混匀，置于 56℃，孵育 5 min，期间震荡混匀 3 回，每回 3-5 次。

13. 将离心管放置于磁力架上静置 2 min，磁珠完全吸附后，小心将 DNA 溶液转移至一个新离心管中，并于适当条件保存。

二、检测方法：

检测方法：使用酶标仪（厂家：基因有限公司 GeneCompang Limited,型号 synergy HTX）对于提取的核酸进行浓度检测，根据进行检测扩增，扩增后 PCR 产物使用浓度 1.8%的琼脂糖进行电泳检测（厂家：北京博美富鑫科技有限公司）对完整性进行检测。

合格指标：

目的带大小	目的带检测亮度	说明 1	说明 2	核酸总量	结果判断
目的带大小正确，且检测片段<550bp；杂带比目的带弱。	目的带亮于或者接近 500bp marker	预估可以一次建库成功	总量满足 3 次及以上建库	≥ 0.3	A
目的带大小正确，且检测片段<550bp；杂带比目的带弱。	目的带亮度在 400bp marker 左右	预估建库需要扩 2-3 管；	总量满足 1 次建库	< 0.3	B

三、建库方法：

MCD 引物列表

类型	扩增区域	引物名称	引物序列
细菌	细菌 16S V3+V4	338F	5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'
		806R	5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'
	细菌 16S V4+V5	515F	5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'

		926R	5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'
	细菌 16S V4	515F	5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
		806R2	5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'
	内生细菌 16S V3+V4	335F	5'-CADACTCCTACGGGAGGC-3'
		769R	5'-ATCCTGTTTGMTMCCCVCRC-3'
真菌	真菌 ITS1	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
		ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
	真菌 ITS2	ITS2F	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
		ITS2R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
	真菌 ITS2 区（半巢式）	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
fITS7		5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3'	
古菌	古菌 16S V3+V4	Arch349F	5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3'
		Arch806R	5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'
真核生物	18S V4	TAReuk454FWD1	5'-CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC-3'
		TAReukREV3	5'-ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A-3'
	18S V7	960F	5'- GGCTTAATTTGACTCAACRCG-3'
		NSR1438	5'- GGGCATCACAGACCTGTTAT-3'
氮循环功能基因	氮循环功能基因 nifH	POI F	5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3'
		POI R	5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'
	氮循环功能基因 nifH（巢式）	nifh3	5'-TTYTAYGGNAARGGNGG
		nifh4	5'-ATRTTRTTNGCNGCRTA-3'
		nifh1	5'-TGYGAYCCNAARGCNGA-3'
		nifh2	5'-ADNGCCATCATYTCNCC-3'
	氨氧化古菌 AOA （amoA）	amoA26F	5'-GACTACATMTTCTAYACWGAYTGGGC-3'
		amoA417R	5'-GGKGTCA TRTATGGWGGY AAYGTTGG-3'
	氨氧化细菌 AOB （amoB）	AOB-F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'
		AOB-R	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'
	氮循环功能基因 nirS	Cd3aF	5'- GTSAACG TSAAGGARACSGG-3'
		R3cdR	5'- GASTTCGGRTGSGTCTTGA-3'
	氮循环功能基因 nirK	nirKF	5'- ATCATGGTSCTGCCGCG-3'
		nirKR	5'- GCCTCGATCAGRTTGTGGTT-3'
氮循环功能基因 nosZ	nosZ-F	5'- CGCRACGGCAASAAGGTSMSSTG-3'	
	nosZ-R	5'- CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA-3'	
碳循环功能基因	甲烷氧化菌 pmoA	pmoAF325	5'- TGGGGYTGGACCTAYTTCC-3'
		pmoAAR643	5'- CCGGCRCRACGTCCTTACC-3'
	产甲烷菌 mcrA	MLf	5'- GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWACAGC-3'
		MLr	5'- TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3'

丛枝菌根	丛枝菌根 AMF	AMV4.5NF	5'-AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3'
		AMDGR	5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3'

检测建库实验所需试剂

物料名称	厂家	存货代码	规格
KOD FX Neo(TOYOBO)	北京百灵克生物科技有限责任公司	KFX-201S	20μL/支
VnF (10uM)	苏州泓迅生物科技股份有限公司	-	-
VnR (10uM)	苏州泓迅生物科技股份有限公司	-	-
TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase	北京全式金生物技术有限公司	AP231-12	200ul/支
Phusion HF MM	北京百灵克生物科技有限责任公司	M0544L	6250μL/包
Mpp1-n1 (10uM)	苏州泓迅生物科技股份有限公司	-	-
Mpp1-n2 (10uM)	苏州泓迅生物科技股份有限公司	-	-
e.Z.N.A.TM Cycle-Pure Kit (omega)	北京鸿跃创新科技有限公司	D6492-02	200 次/盒
Monarch DNA Gel Extractionn	北京鸿跃创新科技有限公司	T1020L	250 次/盒
TE 缓冲液 (PH8.0)	北京博美富鑫科技有限公司	T1120	500ml/瓶
琼脂糖 (西班牙)	北京博美富鑫科技有限公司	-	100g/瓶
EB(红色荧光核酸染料)	青岛拓邦生物科技有限公司	E1020-100ml	100ml/瓶
Tris base	北京博美富鑫科技有限公司	-	500g/瓶
EDTA 二钠	北京博美富鑫科技有限公司	-	250g/瓶
乙酸 (冰醋酸)	北京博美富鑫科技有限公司	-	500mL/瓶
100 bp DNA Ladder Marker	北京六合通经贸有限公司	3422A	500μL/支
无水乙醇	青岛拓邦生物科技有限公司		500mL/瓶
去离子水	天根生化科技 (北京) 有	RT120-02(天根)	500ml/瓶

	限公司		
VAHTSTM DNA Clean Beads	南京诺唯赞生物科技有限 公司	N411-03	450000μL/瓶

PCR 的酶：KOD FX Neo (TOYOBO) , TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase, Phusion (NEB)

过柱纯化 (混样后切胶前纯化)：OMEGA DNA 纯化试剂盒

切胶后纯化：Monarch DNA 胶回收试剂盒

实验所需仪器

仪器名称	生产厂家	型号
瞬时离心机	天根生化科技 (北京) 有限公 司	OSE-MC8
- 20℃ 度冰箱	青岛海尔特种电冰柜有限公司	BC/BD-629HK
4℃ 冰箱	海尔	HYC-360
涡旋振荡器	SCIENTIFICINDUSTRIES,INC	vortex-2G560E
梯度基因扩增仪	Appliedbiosystems	veriti96well9902
24 孔离心机	Sartorius	3-16P
四维旋转混匀仪	海门市其林贝尔仪器制造有限 公司	BE-1100
磁力架	赛默飞世尔	DynaMag96Side skirted

1、流程

(1) 目标区域 PCR(10ul 体系)

试剂名称	用量
基因组 DNA	5-50ng
*Vn F (10μM)	0.3
*Vn R (10μM)	0.3
KOD FX Neo Buffer	5
dNTP (2 mM each)	2
KOD FX Neo	0.2
ddH2O	补至 10μl

按上表配置反应试剂：

注：Vn F 和 Vn R 是根据任务单中要求的扩增区域进行选择

需要根据样品检测报告中的 PCR 预实验结果来判定样品合格标准，所以请建库人员实验前根据检测报告中 PCR 预扩增结果选择扩增条件。注意：当检测报告中显示样品基因组 DNA 浓度 > 50ng/μl 或基因组 DNA 浓度 < 50ng，检测时并未稀释，但检测目的条带明显弥散严重时，建库人员应稀释后进行建库。将样品选择并排布好后，将上表配置好的试剂添加进去。

PCR 反应条件:

95°C 5min

95°C 30sec
50°C 30sec
72°C 40sec

25 cycles

72°C 7min

4°C ∞

(2) 目标区域 PCR 产物纯化

目标区域 PCR 产物 (10ul 体系) 与磁珠按照 1:1 混匀后进行磁珠筛选片段, 8-10ul 洗脱。目标区域 PCR 产物 (10ul 体系) 中加入 10ul 的 VAHTSTM DNA Clean Beads 磁珠, 混匀室温 5min 后, 置于磁力架上 5min, 去上清; 加入 200ul 的 80%乙醇清洗磁珠, 室温 30s 后弃上清, 重复此步骤一次; 置磁力架上干燥 3min, 用 8-10ul ddH₂O 重悬磁珠, 室温孵育 2min, 置于磁力架上 2min, 吸取 8-10ul 上清至新的 PCR 管中。

(3) Solexa PCR (20ul 体系)

试剂名称	浓度	用量
目的区域 PCR 纯化产物	-	5ul
*MPPI-a	2μM	2.5ul
*MPPI-b	2μM	2.5ul
2×Q5 HF MM		10ul
Total		20ul

反应条件:

98°C 30sec

98°C 10sec
65°C 30sec
72°C 30sec

10cycles

72°C 5min

4°C ∞

2. 电泳检测

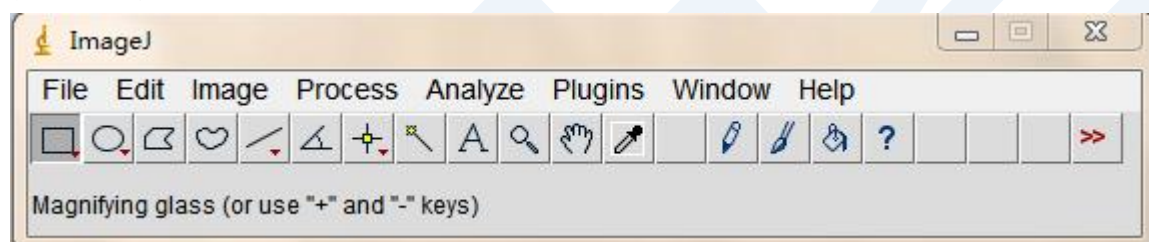
- (1) 制备 1.8%的检测胶。
- (2) 上样量：100 bp Marker 点 3.5 μ l，每 5 μ l PCR 产物加入 2 μ l 二甲苯氰，配置新的缓冲液，新胶（注胶不要放太久），电压 120V，40 -45min。每 10 个样品用 marker 隔开。
- (3) 凝胶成像：电泳结束后胶块置于染色液中染色 20 min，凝胶成像仪下观察电泳结果。
- (4) 照胶要求：染胶时间 10~20min，照胶前用自来水清洗干净染胶液。照胶时确保同一排的 marker 亮度一致。若不一致从新照，直到 marker 曝光度一致。

3.电泳定量及混样

(1) ImageJ 软件定量

- (1) 提前将电泳图用胶图软件编辑好实验编号并调正，尤其是目的条带两边的 marker 尽量保持在一条直线上。
- (2) 根据电泳结果用 ImageJ 软件定量。

窗口显示如下：



算混样浓度时以 marker 的波峰面积作为混样的基准，因为 marker 的总量已知，所以根据样品的波峰面积值，可以算出该样品的总量，用总量除以点样体积，就是该样品的定量浓度。

具体算法如下：

基准(marker 条带) 的总量 = marker 浓度 $\times$ 体积。

样品目的带浓度 = (样品条带波峰面积/基准波峰面积) $\times$ 基准总量/点样体积。

(3) 混样

每个样品取样 150ng 进行混样，混合之后将混样充分混匀；针对浓度高的样品，吸取的体积小于 1.5 μ l 时，为了避免吸取误差，将每个样品吸取量上调到 300ng 或 600ng，吸取量上调原则：混样样品中吸取的最小体积大于 1.5 μ l，最大体积不超过 14 μ l（根据洗脱体积而定）。**注：**相同区域可根据比例混在一起。

4.混样过柱纯化

使用 e.Z.N.A.TM Cycle-Pure Kit (omega) 柱子将混好的样品进行切胶前纯化。

5.切胶回收

- (1) 提前配好 1.8%琼脂糖 (BIOWEST) 并铺好胶块（此处胶块配置时使用 13 孔 0.15mm 的薄齿梳子，一块胶可插两排梳子，电泳跑胶时使用 12cm（横向）*6cm（纵向）即可，无需电泳时间太长）；
- (2) 配制新的 1 $\times$ TAE 缓冲液，倒入干净的电泳槽中，将制好的胶块放入其中；
- (3) 向上步混样中每 5 μ l 加入 1 μ l Loading buffer（二甲苯氰），混匀后加入上述胶块的点样孔中（如果混样后体积较大，可以点样 2-3 个孔进行回收）；样品相邻的一侧点样孔加入 3.5 μ l 100 bp DNA Ladder Marker，100V 90min 电泳；
- (4) 用 Monarch DNA 胶回收试剂盒。

四、文库检测

文库通过 Qsep-400 方法进行质检，满足如下指标即可上机检测。

等级	评判标准	判定结果	上机影响	申请上机原则
A	峰图完全符合上机标准	合格	无影响	正常上机
B	有少量问题存在，但不影响测序	合格	影响可忽略	正常上机

五、测序方法

对于构建好的文库使用 illumina novaseq6000（novaseq6000，illumina）进行上机测序。

保密说明：此文档仅限与 BMK 有项目合作的客户使用，不得随意外传，谢谢！
望您遵守及谅解！