

扩增子 微生物多样性 提取及建库方法

目录

1. DNA 提取	1
1.1 HiPure Soil DNA Kits （土壤 DNA 提取试剂盒）	1
1.2 HiPure Stool DNA Kits （粪便 DNA 提取试剂盒）	2
2. DNA 质量检测	3
3. PCR 扩增	4
4. 文库定量及测序	7

1. DNA 提取

1.1 HiPure Soil DNA Kits （土壤 DNA 提取试剂盒）

1.1.1 主要仪器：4 °C离心机（型号Eppendorf 5427R，公司德国艾本德股份公司，产地德国），移液器（型号Eppendorf，公司德国艾本德股份公司，产地德国），超纯水仪器（型号明澈™-D，公司RephiLe Bioscience Ltd.，产地中国），-80 °C 冰箱（型号DW-HL528S，公司中科美菱，产地中国），涡旋振荡器（型号米欧mix-28+，公司广州围古润仪器有限公司，产地中国），

1.1.2 主要试剂：试剂盒（型号D3142，公司广州美基生物科技有限公司，产地中国），无水乙醇（公司广州化学试剂厂，产地中国）。

1.1.3 适用范围：土壤、底泥等来自自然环境的样本

1.1.4 实验步骤：

1) 土壤的匀浆裂解

手工涡旋：在 2 mL beads Tube 中，加入 0.25-0.5 g 土壤样品和 0.6 mL Buffer SOL。在涡旋仪上最高速度涡旋 5-10 min；再加入 60 µL Buffer SDS 至样品中，涡旋均匀 15 s。

2) 进一步裂解微生物

70 °C水浴 10 min。

- 3) 短暂离心收集管壁上的液滴
- 4) 加入 200 μ L Buffer PS 和 150 μ L Absorber Solution 至裂解液中，涡旋混匀 20s，室温静置 5 min，期间偶尔颠倒 2-3 次。
- 5) 13,000 g 离心 5 min。
- 6) 小心转移上清液至 2 mL 离心管中。加入等体积 Buffer GDP。颠倒混匀。
- 7) 把 DNA 柱装在收集管中。转移一半混合液至柱子中。13,000 g 离心 30-60 s。
- 8) 倒弃滤液把柱子装回收集管。把剩余混合液转移至柱子中。13,000 g 离心 30-60 s。
- 9) 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 400 μ L Buffer GDP 至柱子上。13,000 g 离心 30-60 s。
- 10) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ L Buffer GW2 至柱子中。13,000 g 离心 30-60 s。
- 11) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。再加入 600 μ L Buffer GW2 至柱子中。13,000 g 离心 30-60 s。
- 12) 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 g，离心 2 min。
- 13) 将柱子装在 1.5 mL 离心管中。加入 50 μ L 预热至 70 $^{\circ}$ C Buffer 的 AE 至柱子的膜中央。放置 3-5 min。13,000 g 离心 1 min。
- 14) 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

1.2 HiPure Stool DNA Kits （粪便 DNA 提取试剂盒）

主要试剂：试剂盒（型号D3141，公司广州美基生物科技有限公司，产地中国），无水乙醇（公司广州化学试剂厂，产地中国）。

1.2.1 适用范围：粪便、肠道内容物等稳定环境收集的样品

1.2.2 实验步骤：

- 1) 转移 150-200 mg 粪便样品至 2 mL 离心管中，立即加入 1.2 mL Buffer SSL 至样品中，最高涡旋 1 min 充分打散样品。
- 2) 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。
- 3) 涡旋 15 s。室温下， $\geq 14,000$ g 离心 10 min。转移 250 μ L 上清至新的 1.5 mL 离心管中。

- 4) 加入 20 μ L Proteinase K 和 250 μ L Buffer AL 上清液中。颠倒混匀 10 次。70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。
- 5) 加入 250 μ L 无水乙醇至样品中，颠倒混匀 10 次。
- 6) 把 HiPure DNAMini Column I 装在 2 mL 收集管中。转移混合液至柱子中。10,000 g 离心 30-60 s。
- 7) 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ L Buffer GW1 至柱子上。10,000 g 离心 30-60 s。
- 8) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μ L Buffer GW2 至柱子中。10,000 g 离心 30-60 s。
- 9) 倒弃滤液，把柱子装回收集中。13,000 g 离心 2 min 甩干柱子。
- 10) 将柱子装在 1.5 mL 离心管中。加入 50-200 μ L 预热至 70 $^{\circ}$ C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央，室温放置 2 min。13,000 g 离心 1 min。
- 11) 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

2. DNA 质量检测

主要仪器：Nanorop 微量分光光度计（型号 NanoDrop 2000，公司赛默飞世尔科技，产地美国），琼脂糖凝胶电泳仪（型号 DYY-6C 型，公司北京六一仪器厂，产地北京），凝胶成像系统（型号 Tanon-2500，公司上海天能科技有限公司，产地中国）。

主要试剂：琼脂糖（型号 Biowest Agarose，供应商北京梦怡美商贸中心，品牌西班牙），goldview（型号 Goldview I，公司供应商北京梦怡美商贸中心，品牌 USA）。

1) NanoDrop 微量分光光度计检测

NanoDrop 检测需要样品量为 2 μ L，浓度测量范围为 2-3000 ng/ μ L。NanoDrop 检测核酸的 OD 值，目的是测定核酸的纯度。A260/A280 比值应在 1.8-2.0 之间最好。DNA 260/280 < 1.8 说明有蛋白质污染，>2.0 说明有 RNA 污染。另一个衡量核酸纯度的指标是 A260/A230 比值，其值应该在 2.2 左右，低于 1.8 表明有明显的有机物如糖、肽、苯酚、盐离子等的污染。很有可能是在吸上层水相时将有机相吸入。

2) 琼脂糖凝胶电泳检测

对核酸样本进行琼脂糖凝胶电泳的目的是检验核酸样本的完整性，是否发生降解，是否有蛋白等污染。质量完好的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后，应当是单一的条带。

3. PCR 扩增

3.1 主要仪器：PCR 仪（型号 ETC811，公司东胜兴业科学仪器有限公司，产地中国北京），Qubit 3.0（公司 ThermoFischer Scientific，产地美国）。

3.2 主要试剂：PCR 相关试剂（公司 New England Biolabs，产地美国）；回收纯化试剂：AMPure XP 磁珠（公司美国贝克曼库尔特公司，产地美国）。

1. 模板：稀释过的基因组 DNA。

2. 引物：根据所选测序区域，用带有 barcode 的特异引物扩增 16s rDNA /ITS /18S rDNA 的目标区域。引物序列如下表：

类型	区域	引物名称	引物序列	产物长度
16S	V4	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	~292
		806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	
16S	V3-V4	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	~466
		806R	GGACTACHVGGGTATCTAAT	
16S	V5-V7	799F	AACMGGATTAGATACCKG	~412
		1193R	ACGTCATCCCACTTCC	
16S	V4-V5	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	~414
		907R	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	
16S	V4-V5	Arch519F	CAGCMGCCGCGGTAA	~416
		Arch915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	
18S	V4	528F	GCGGTAATTCAGCTCAA	~260
		706R	AATCCRAGAATTCACCTCT	
ITS	ITS1	ITS1_F_KYO2	TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA	~366
		ITS86R	TTCAAAGATTCGATGATTCAC	
ITS	ITS1	ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	~321
		ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
ITS	ITS2	ITS3_KYO2	GATGAAGAACYAGYRAA	~381
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

3. PCR 反应体系和程序（50 μ L）：

1) 第一轮扩增体系

Q5 酶扩增体系	50 μ L
5 \times Q5@ Reaction Buffer	10 μ L
5 \times Q5@ High GC Enhancer	10 μ L
2.5mM dNTPs	1.5 μ L
Primer F (10 μ M)	1.5 μ L
Primer R (10 μ M)	1.5 μ L
Q5@ High-Fidelity DNA Polymerase	0.2 μ L
Template	X μ L (50 ng)
H ₂ O	Up to 50 μ L

2) 第一轮扩增程序

95 $^{\circ}$ C	5 min	
(95 $^{\circ}$ C	1 min	
60 $^{\circ}$ C	1 min	
72 $^{\circ}$ C	1 min)	30 cycles
72 $^{\circ}$ C	7 min	

3) 第一轮 PCR 产物纯化：利用 AMPure XP Beads 进行 PCR 产物纯化，纯化后用 Qubit3.0 定量。

4) 第二轮扩增体系

Q5 酶扩增体系	50 μ L
5 \times Q5@ Reaction Buffer	5 μ L
2.5 mM dNTPs	1.5 μ L
5 \times Q5@ High GC Enhancer	1.5 μ L
Index Primer (10 μ M)	1 μ L
Universal PCR Primer (10 μ M)	1 μ L
Q5@ High-Fidelity DNA Polymerase	1 μ L
Template	X μ L (50 ng)
H ₂ O	Up to 50 μ L

5) 第二轮扩增程序

95 $^{\circ}$ C	5 min
(95 $^{\circ}$ C	1 min
60 $^{\circ}$ C	1 min

72 °C 1min) 12 cycles

72 °C 7 min

1) 第一轮扩增体系

KOD 酶扩增体系	50 μ L
10 \times Buffer KOD	5 μ L
2 mM dNTPs	5 μ L
25 mM MgSO ₄	3 μ L
Primer F (10 μ M)	1.5 μ L
Primer R (10 μ M)	1.5 μ L
KOD 酶	1 μ L
Template	X μ L (100 ng)
H ₂ O	Up to 50 μ L

2) 第一轮扩增程序

94 °C 2 min

(98 °C 10 s

62-66 °C 30 s (55°C for 16S V4)

68 °C 30 s) 30 cycles

68 °C 5 min

3) 第一轮 PCR 产物纯化：利用 AMPure XP Beads 进行 PCR 产物纯化，纯化后用 Qubit3.0 定量。

4) 第二轮扩增体系

KOD 酶扩增体系	50 μ L
10 \times Buffer KOD	5 μ L
2 mM dNTPs	5 μ L
25 mM MgSO ₄	3 μ L
Index Primer (10 μ M)	1 μ L
Universal PCR Primer (10	1 μ L
KOD 酶	1 μ L
Template	X μ L (100 ng)
H ₂ O	Up to 50 μ L

5) 第二轮扩增程序

94 °C	2 min	
(98 °C	10 s	
65 °C	30 s	
68 °C	30 s)	12 cycles
68 °C	5 min	

4. 文库定量及测序

使用 AMPure XP Beads 对第二轮扩增产物进行纯化，用 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies，产地美国）进行定量，根据 Novaseq 6000 的 PE250 模式 pooling 上机测序。