

## 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  $\mu\text{L}$  Buffer PS 和 150  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  预热至 70 °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 °C，长期保存需保存于 -20 °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 °C 水浴 10 min。
- 3) 涡旋 15 s。室温下， $\geq 14,000 \text{ g}$  离心 10 min。转移 250  $\mu\text{L}$  上清至新的 1.5 mL 离心管中。

- 4) 加入 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K 和 250  $\mu\text{L}$  Buffer AL 上清液中。颠倒混匀 10 次。70 °C 水浴 10 min。
- 5) 加入 250  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  预热至 70 °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 °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  $\mu\text{L}$ ，浓度测量范围为 2-3000 ng/ $\mu\text{L}$ 。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:

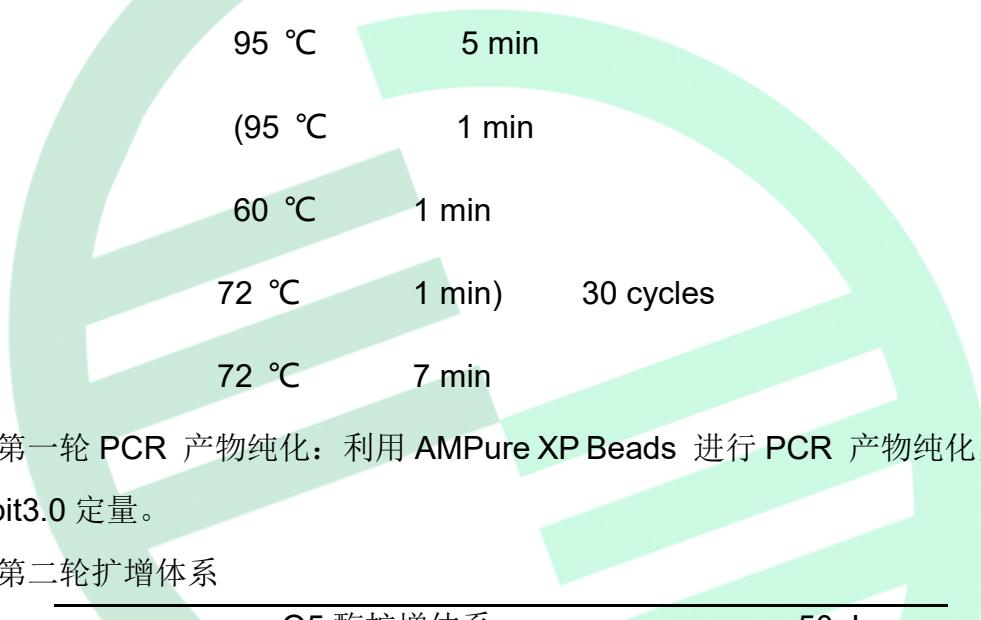
类型	区域	引物名称	引物序列	产物长度
16S	V4	515F	GTGYCAGCMGCCGCGTAA	~292
		806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	
16S	V3-V4	341F	CCTACGGGNNGCWGCAG	~466
		806R	GGACTACHVGGGTATCTAAT	
16S	V5-V7	799F	AACMGGATTAGATAACCKG	~412
		1193R	ACGTCATCCCCCACCTCC	
16S	V4-V5	515F	GTGCCAGCMGCCGCGTAA	~414
		907R	CCGTCATTCCCTTGAGTTT	
16S	V4-V5	Arch519F	CAGCMCCGCGGTAA	~416
		Arch915R	GTGCTCCCCGCCAATTCT	
18S	V4	528F	GCGGTAATTCCAGCTCAA	~260
		706R	AATCCRAGAACCAATTCT	
ITS	ITS1	ITS1_F_KYO2	TAGAGGAAGTAAAGTCGTA	~366
		ITS86R	TTCAAAGATTGATGATTAC	
ITS	ITS1	ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	~321
		ITS2	GCTGCGTTCTCATCGATGC	
ITS	ITS2	ITS3_KYO2	GATGAAGAACGYAGYRAA	~381
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

### 3. PCR 反应体系和程序 (50 μL):

#### 1) 第一轮扩增体系

<b>Q5 酶扩增体系</b>	<b>50 μL</b>
5 × Q5@ Reaction Buffer	10 μL
5 × Q5@ High GC Enhancer	10 μL
2.5mM dNTPs	1.5 μL
Primer F (10 μM)	1.5 μL
Primer R (10 μM)	1.5 μL
Q5@ High-Fidelity DNA Polymerase	0.2 μL
Template	X μL (50 ng)
H <sub>2</sub> O	Up to 50 μL

## 2) 第一轮扩增程序



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

<b>Q5 酶扩增体系</b>	<b>50μL</b>
5 × Q5@ Reaction Buffer	5 μL
2.5 mM dNTPs	1.5 μL
5 × Q5@ High GC Enhancer	1.5 μL
Index Primer (10 μM)	1 μL
Universal PCR Primer (10 μM)	1 μL
Q5@ High-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
Template	X μL (50 ng)
H <sub>2</sub> O	Up to 50 μL

## 5) 第二轮扩增程序

95 °C        5 min

(95 °C        1 min

60 °C        1 min

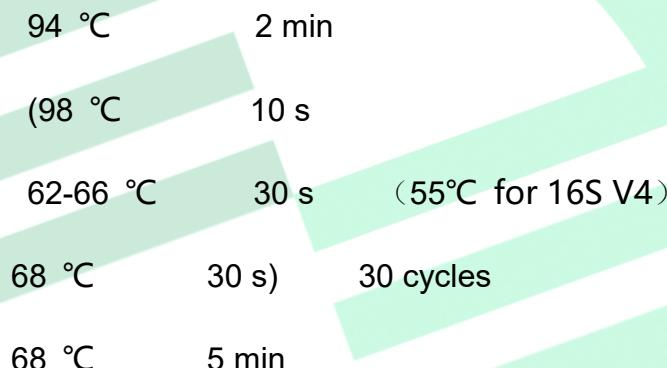
72 °C      1min)      12 cycles

72 °C      7 min

### 1) 第一轮扩增体系

KOD 酶扩增体系	50 $\mu$ L
10×Buffer KOD	5 $\mu$ L
2 mM dNTPs	5 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L
Primer F (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
Primer R (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ L
KOD 酶	1 $\mu$ L
Template	X $\mu$ L (100 ng)
H <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ L

### 2) 第一轮扩增程序



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 $\mu$ L
10×Buffer KOD	5 $\mu$ L
2 mM dNTPs	5 $\mu$ L
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L
Index Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Universal PCR Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
KOD 酶	1 $\mu$ L
Template	X $\mu$ L (100 ng)
H <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ 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。