

大豆根系微生物的基因鉴定与基因功能预测

——竞赛单元“2-1 基因组”

团队名称：水哥微生物小队

指导老师：郑金水

团队成员：张敦彪，张子栋，颜旭，姚代洪

摘要

高通量培养与鉴定可用于从给定环境和植物物种的本地根微生物组样本中建立一个分类学上全面的细菌培养收集，通过 16S rRNA 基因扩增子测序对根样品的细菌多样性进行评价，筛选出具有相应 16S rRNA 基因序列的培养菌。通过对大豆根系微生物的高通量培养筛选可以鉴定其基因的类型，进而对其基因功能进行预测。

关键字：高通量培养，基因鉴定，功能预测

1 引言

1.1 根系微生物群

根系微生物是指生活在植物根系附近的微生物群落，包括细菌、真菌和古菌等。它们与植物根系形成一种共生关系，相互作用并互利共生。根系微生物可以对植物生长和健康产生积极影响。研究根系微生物对于促进植物生长健康、提高作物产量质量、维护土壤生态系统健康以及发掘新的生物资源具有重要意义。

1.2 高通量培养

高通量培养是一种用于微生物的培养和筛选的技术，通过该技术可以大大提高微生物的培养效率和筛选速度，同时也有助于扩展微生物资源库，挖掘未知微生物代谢产物等领域的研究。

传统的微生物培养方法是基于单个菌落的分离和培养，但是由于绝大部分微生物无法在常规培养条件下生长，很多微生物资源依然无法被发现和利用。而高通量培养可以利用微型板或微流控芯片等设备将微生物单个分离后进行多重并行培养，以大幅提高微生物的培养效率。此外，高通量培养还可以借助自动化解决方案，实现对大量微生物的快速筛选。

2 材料与方法

2.1 培养基的制作

实验中需要三种不同的培养基（三种培养基均高压蒸汽灭菌）：

表 1 实验所需培养基

培养基类型	配置方法
TSB 培养基	30 g/L TSB, 蒸馏水定容
10% TSB 培养基	TSB 培养基按照体积分数 10% 进行稀释
10% TSB 培养基 + 丙酮酸钠	30 g/L TSB, 10 mM/L 丙酮酸钠, 蒸馏水定容

2.2 大豆根系菌群的获取

在华中农业大学 BMB 课题组大豆孢囊线虫大棚中摘取自然条件下生长、表型正常的未开花的大豆，在取样前不宜过多浇水，以免造成大豆根系附着较多土壤，不易除去。用手轻轻拨去大豆根系的土壤以去除大量土壤团聚体，此后将大豆根系置于手掌虎口处轻轻抖动，去除碎土。

2.2.1 根际样本

超净工作台中将大豆根系置于无菌滤纸上，使用无菌刀片截取其下方约 3cm 的根系，总共截取 3g 的大豆根系样本。拿取 10x PBS 溶液，按照体积分数的 10% 稀释为 1x PBS 溶液约 100 mL 置于两个 50 mL 的离心管中。将截取的根系样本置于 50 mL 的 1x PBS 溶液中来回水平摇匀，将其以 1800 rpm 的速度震荡 20 min，取出其中的根系，将溶液过 500 目筛，获得根际样本。

2.2.2 根内样本

按照上述方法新截取约 3 g 的大豆根系，使用无菌水持续冲洗，直至除去所有的土壤颗粒。将根系转移至一个新的含有 50 mL 的 1x PBS 溶液的离心管中，以 1800 rpm 的速度震荡处理 20 min，从离心管中取出根系，使用无菌滤纸吸干，从根表面除去 PBS 溶液，使用无菌水冲洗三次，将根系置于含有 50 mL 无菌水的离心管中，进行超声处理 5 min，将根系取出置于含有 50 mL 的 75% 体积分数的酒精溶液的离心管中，震荡 1 min，取出根系，使用无菌水冲洗三次，将根系悬浮在 50 mL 的 10 mMol/L 的无菌 MgCl₂ 溶液中，使用无菌研钵研碎根系直至其均匀，将研钵内液体过 500 目筛获取根内样本。

根内样本与根际样本均置于 4°C 储存。

2.3 分液与流式细胞分选

用分液仪将液体培养基分装到 60 个 384 孔板，每孔 7 μL，再用流式细胞分选仪将根际与根内样本转移到每个孔中并做好标记。

2.4 PCR 扩增与电泳鉴定

将得到的八连管每个孔中按比例加入 1 μl F 引物、1 μl R 引物、7 μl 无菌水、10 μl mix 与原 1 μl 菌液形成 20 μl 体系，按照对应程序（如表 1）将八连管放入 pcr 仪器处理。

表 2 PCR 反应体系

成分	体积 (μL)
F 引物	1
R 引物	1
ddH ₂ O	7
Mix	10
原样液	1

表 3 PCR 程序设定

循环数	流程	温度	时间
1	预变性	98°C	10 min
	变性	95°C	30 s
2-36	复性	55°C	30 s
	延伸	72°C	90 s
37	终延伸	72°C	5 min