第一周周报

本周主要进行实验前的准备工作。通过对项目背景的学习了解，对项目的基本流程、研究内容和研究目的有了一定印象。学习了包括16s rRNA测序技术的原理和应用、细菌高通量培养与测序的流程和步骤、无菌操作的相关注意事项。

关于实验操作部分，主要完成了实验器材的整理和灭菌；计算并配置了不同TSB、丙酮酸浓度的培养基；采集植物根系，并去除根周较松散的土壤，使用无菌PBS进行冲洗获得根系微生物样本。

通过学习16s rRNA测序技术，我了解了一种快速、高效、准确地分析细菌群落结构和多样性的方法，对细菌分类学有了更深入的认识；在无菌操作相关规范的学习中，提高了自己的实验操作规范性和安全性；在配置不同TSB、丙酮酸浓度的培养基，并送往灭菌，我复习了一些基础的化学知识和计算方法，也对细菌的营养需求和代谢途径有了更细致的认识。

第二周周报

本周，我继续参与了关于植物根系微生物功能研究的项目，在上周采集和处理好的根系微生物样本的基础上，进行了细菌高通量培养和分选。在本周的工作中，我主要完成了以下几个内容：

* 将之前配置、灭菌的液体培养基分液至384孔板，并使用流式细胞仪，分离单个细菌，加入到384孔板中，准备下一步的培养。分液至384孔板需要使用无菌的移液器和枪头，按照预定的体积和顺序进行操作。使用流式细胞仪分离单个细菌是通过将根系微生物样本稀释后，通过流式细胞仪的喷嘴，形成单个细胞的液滴，然后通过荧光检测和电荷控制，将含有细菌的液滴分选到384孔板中。
* 分选共28板（96孔板），使用10%甘油 + 90% FBS冻存液，-80℃保存，同时做好标记。分选后的细菌需要用冻存液进行保护，防止冰晶对细胞造成损伤。冻存液的成分是10%甘油 + 90% FBS（Fetal Bovine Serum），甘油可以降低冰晶形成的温度，FBS可以提供营养和缓冲作用。-80℃保存是为了延长细菌的存活时间，同时减少代谢活动。标记是为了记录每板的培养基和样本信息，方便后续的处理和分析。

通过这些工作，我学习了如何进行细菌高通量培养和分选，并掌握了流式细胞仪的原理和操作。我还了解了如何对分选后的细菌进行冻存和标记，并注意防止交叉污染和误操作。这些工作为后续的细菌PCR扩增和测序做好了准备。

第三周周报

本周，我继续参与了关于植物根系微生物功能研究的项目，在上周完成的细菌高通量培养和分选的基础上，进行了细菌PCR扩增和测序。在本周的工作中，我主要完成了以下几个内容：

* 将细菌转移至PCR管，加入F引物和R引物，并进行PCR扩增。F引物标号为72-98共28种，每板相同，对应28板；R引物标号1-96，对应每板96个孔。今日做完了4板。转移细菌至PCR管是为了进行PCR扩增16s rRNA的特定区域。F引物和R引物是用来识别并扩增目标DNA片段的短链DNA。F引物和R引物的序列是根据16s rRNA的保守和变异区域设计的，可以覆盖多种细菌的16s rRNA序列。F引物标号为72-98共28种，每板相同，对应28板；R引物标号1-96，对应每板96个孔。这样可以实现多重PCR，同时扩增多种细菌的16s rRNA序列。
* 在PCR反应和琼脂糖凝胶电泳后，我将PCR产物进行回收和测量。回收PCR产物是为了去除反应液中的引物、dNTPs、DNA聚合酶等杂质，只保留目标DNA片段。测量PCR产物是为了确定目标DNA片段的浓度和纯度，为后续的测序做准备。回收和测量PCR产物的方法如下：
  + 使用试剂盒回收PCR产物。试剂盒是一种利用硅胶柱吸附DNA的工具，通过不同的缓冲液进行洗涤和洗脱，实现DNA的纯化。由于试剂盒的容量有限，我重复了两次操作，分别回收了两份PCR产物。
  + 使用纳米滴仪测量PCR产物的浓度和纯度。纳米滴仪是一种利用紫外光吸收光谱法测定DNA浓度和纯度的仪器。通过向纳米滴仪上的小孔滴加少量的PCR产物，然后按照操作步骤进行测量，可以得到DNA的浓度（ng/μL）和纯度（260/280比值）。一般来说，DNA的纯度在1.8-2.0之间为合格。
  + 将测量后的PCR产物进行混合，等待送测。混合PCR产物是为了提高测序的效率和准确性，避免因为个别PCR产物质量不佳而影响整体的结果。送测是将混合后的PCR产物交给专业的测序机构进行高通量测序，得到细菌16s rRNA序列的原始数据。

通过这些工作，我学习了如何进行细菌PCR扩增和测序，并掌握了PCR反应的原理和条件，引物的设计和选择，以及PCR产物的回收和测量。我还了解了如何对PCR产物进行混合和送测，并注意防止污染和失效。这些工作为后续的细菌数据分析提供了必要的数据和材料。

第四周周报

本周，我继续参与了关于植物根系微生物功能研究的项目，在上周完成的细菌PCR扩增和测序的基础上，进行了细菌数据分析。在本周的工作中，我主要完成了以下几个内容：

* 在WSL 2.0（Ubuntu）下安装了实验所需环境，并使用示例数据进行了数据分析。WSL 2.0（Ubuntu）是一种在Windows系统下运行Linux系统的技术，可以方便地使用Linux系统下的软件和命令。数据分析的流程和软件来自白洋组的Culturome项目。Culturome是一个基于细菌高通量培养与测序技术的微生物组分析平台，可以实现细菌种类、丰度、功能、亲缘关系等多方面的分析。
* 安装Miniconda，并下载了对应的软件包。Miniconda是一种基于Python语言的软件包管理器，可以方便地安装和管理不同版本和环境下的软件包。下载对应的软件包是为了使用Culturome提供的分析流程和脚本。
* 生成Metadata Mapping File，并定义了与每板对应的Sample ID. Metadata Mapping File是一个包含样本信息和实验设计等元数据的文本文件，用于指导数据分析的过程和参数。Sample ID是一个用于标识每个样本来源和特征的字符串，用于区分不同板上不同孔位上不同培养基下不同细菌样本。
* 按照Culturome Pipeline完成数据分析，生成系统发生树。Culturome Pipeline是一个基于QIIME 2（Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2）框架开发的数据分析流程，包括以下几个步骤：
  + 导入原始测序数据，并进行质量控制和去噪。质量控制和去噪是为了去除测序数据中的低质量序列、引物序列、嵌合体序列等，提高数据的可靠性。
  + 对去噪后的序列进行聚类和代表性序列选择。聚类是为了将相似度高于一定阈值的序列归为一类，减少冗余数据。代表性序列选择是为了从每个聚类中选出一个最能代表该聚类特征的序列，作为后续分析的对象。
  + 对代表性序列进行分类注释和进化树构建。分类注释是为了将代表性序列与已知的数据库进行比对，确定其所属的分类级别和名称。进化树构建是为了根据代表性序列之间的相似度，生成一棵反映其亲缘关系的系统发生树。
  + 对样本间和样本内的多样性进行评估和比较。多样性评估是为了计算每个样本中细菌种类和丰度的多样性指标，如物种丰富度、Shannon指数、Simpson指数等。多样性比较是为了检验不同样本间或者不同实验因素下的多样性是否存在显著差异。
* 对多样性分析的结果进行可视化和统计。可视化是通过QIIME 2提供的多种插件和工具，将多样性分析的结果以各种可视化表格的形式展示出来，方便观察和比较。统计是通过QIIME 2提供的多种插件和工具，对多样性分析的结果进行假设检验、相关性分析、主成分分析等，探索不同样本、不同培养基、不同细菌之间的差异和联系。

通过这些工作，我学习了如何进行细菌数据分析，并掌握了Culturome Pipeline的流程和软件。我还了解了如何对细菌多样性进行评估和比较，并使用各种可视化和统计方法进行结果展示和解释。这些工作为后续的细菌功能分析提供了重要的依据和参考。