实习总结

在本次实习中，我参与了一个关于植物根系微生物功能研究的项目，学习和了解了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，以及16s rRNA测序技术在细菌分类学中的应用。我通过参与实验操作和数据分析，掌握了相关的理论知识和实践技能，同时也收获了很多宝贵的经验和感悟。

在实验操作方面，我主要完成了以下几个步骤：

配置各种不同TSB、丙酮酸浓度的培养基，并送往灭菌。配置培养基需要根据所需的培养基体积和浓度，计算出所需的TSB和丙酮酸的质量，并将其溶解于蒸馏水中，调节pH值。然后将培养基装入无菌的试管或者培养瓶中，封口。最后将培养基送往高压蒸汽灭菌器进行灭菌，灭菌时间为15分钟。

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。采集根系需要注意避免污染，并尽快处理。使用无菌PBS进行冲洗获得根系微生物样本是通过将无菌PBS装入无菌喷瓶中，将去除土壤后的根系放入无菌容器中，用无菌PBS对根系进行冲洗，收集冲洗液。然后将冲洗液离心，沉淀为根系微生物样本。

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。

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。

在等待测序结果的过程中，我在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。

在数据分析方面，我主要完成了以下几个步骤：

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 。

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。

通过以上的数据分析步骤，我得到了一系列的分析结果和报告，包括代表性序列、特征表、分类结果、进化树、多样性指标、可视化图表等。其中，最能反映细菌分类学应用的结果是系统发生树。系统发生树是一种以树状结构表示细菌之间亲缘关系的图形，其中每个节点代表一个细菌或者一个细菌类群，每个分支代表一个进化事件或者一个进化距离。通过系统发生树，我可以清楚地看到不同板上不同孔位上不同培养基下不同细菌的分类位置和亲缘关系，以及不同TSB和丙酮酸浓度对细菌分类的影响。

总之，在本次实习中，我深入地学习了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，以及16s rRNA测序技术在细菌分类学中的应用。我不仅掌握了相关的理论知识和实践技能，而且也体会到了科研工作的乐趣和挑战。我感谢我的导师和同伴们对我的指导和帮助，让我在这段时间里收获了很多。我希望我能够将我在实习中学到的东西运用到我的未来学习和工作中，为微生物学领域做出贡献。