水稻高通量分离培养细菌和高通量鉴定

**Title（英文）**

标题要求准确、简洁且尽可能体现实验方案的专一性

英文标题要与中文标题要严格对应以方便被英文文献引用

作者11, #，作者21, 2, #, $，作者32，作者42, \*

1学院/系/研究中心，学校/研究所，城市，省；2学院/系/研究中心，学校/研究所，城市，省；学院/系/研究中心，学校/研究所，城市，省；$现工作单位：学院/系/研究中心，学校/研究所，城市，省

\*通讯作者邮箱:

#共同第一作者/同等贡献

**摘要**

培养在特定环境下生长的植物根系微生物组，对于研究根系微生物对植物生长和健康的作用至关重要。本方法从新鲜植物根系中高通量分离培养细菌，使用梯度稀释的方法增加获得单一细菌的比例，采用双边标记PCR扩增法高通量鉴定分离培养细菌的*16S rRNA*基因。为便于数据处理，开发了一个简单易用的生物信息分析流程Culturome (https://github.com/YongxinLiu/Culturome)和一个图形用户界面web服务器(http://bailab.genetics.ac.cn/culturome/)。该方法允许任何研究组(2-3个实验室成员，没有生物信息学专业知识)在8-9周内系统地培养植物根系相关细菌。

**关键词:** 根系微生物组，高通量分离，高通量鉴定，生物信息分析

**材料与试剂**

一. 生物材料

样品来源于水稻根系（*Oryza sativa* L. Nipponbare），植物材料可从作者处获得。

二. 试剂

胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB, OXOID, cat. no. CM0129)

氯化镁 (MgCl2·6H2O, SIGMA, cat. no. 63068-250G)

氯化钠 (NaCl, SIGMA, cat. no. S7653-250G)

磷酸氢二钠 (Na2HPO4·2H2O, SIGMA, cat. no. 04272-1KG)

磷酸二氢钠 (NaH2PO4·H2O, SIGMA, cat. no. 71504-250G)

氢氧化钠 (NaOH, SIGMA, cat. no. S8045-500G)

乙二胺四乙酸二钠 (Na2-EDTA, Amresco, cat. no. 0105)

三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl, Genview, cat. no. BT504-500G)

甘油 (SIGMA, cat. no. G7893)

琼脂粉 (SIGMA, cat. no. A7921-100G)

琼脂糖 (Biowest, cat. no. G-10)

乙醇 (SIGMA, cat. no. E7023-500ML)

无核酸酶水 (QIAGEN, cat. no. 129115)

PCR引物 (Life Technologies)

PCR反应体系试剂 (TAKARA, cat. no. R007Z)

2000-bp Plus DNA标准物 (DiNing, cat. no. DM1003)

DNA染色剂 (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, cat. no. MG 04)

胶回收试剂盒 (Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System, Promega, cat. no. A9282)

磁珠 (Agencourt AMPure XP beads, Beckman, cat. no. A63882)

PicoGreen荧光染料 (Invitrogen, cat. no. P7589)

三羟甲基氨基甲烷 (Tris, Vetec, cat. no. V900483-500G)

乙酸 (Rhawn, cat. no. R049946-500mL)

*E. coli* (TIANGEN BIOTECH, DH5α, cat. no. CB101-03)

上样缓冲液 (TAKARA, cat. no. 9156)

**仪器设备**

镊子 (Jinzhong, cat. no. JD5020)

剪刀 (Jinzhong, cat. no. J21130)

切胶刀片 (Jinzhong, cat. no. J11010)

滤纸 (SEP, cat. no. DXLZ11F)

50-mL离心管 (BD Falcon, cat. no. 352070)

微量离心管 (1.5-, 5-mL; Eppendorf, cat. nos. 0030125.150, 30119401)

塑料研磨棒 (Huaaobio, cat. no. SLXMB-1.5)

13-cm方板 (Axygen, cat. no. ASJ-17-9142)

60-mm培养皿 (Corning, cat. no. 430166)

96孔PCR板 (Jet Keen Biotechnology, cat. no. PC-0200-9B)

96孔细胞培养板 (NEST, cat. no. 701001)

96孔酶标板 (Costar, cat. no. 3590)

2.0-mL冻存管 (NEST, cat. no. 607001)

Microbank菌保管 (Prolab, cat. no. PL.170/M)

12通道移液器 (10, 100, 300 µL; Eppendorf, cat. nos. 3122000027, 3122000043, 3122000060)

单道移液器 (10, 20, 100, 200, 1000 µL; Eppendorf, cat. nos. 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)

移液器枪头 (nuclease-free, 10, 200, 1000 µL; Axygen, cat. nos. T-300, T-200-Y, T-1000-B)Parafilm封口膜 (Bemis, cat. no. PM-996)

96孔PCR板封板膜 (Axygen, cat. no. PCR-TS)

生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. BSC-1000IIA2)

旋涡混合器 (TIAGEN BIOTECH, cat. no. OSE-VS-01)

电子天平 (Mettler Toledo, cat. no. AL104)

平板摇床 (Kylin-Bell Lab Instruments, model no. TS-2)

恒温摇床 (Shanghai Zhichu Instrument, cat. no. ZQZY-CF)

微孔板离心机 (TIANGEN BIOTECH, cat. no. OSE-MP26)

PCR仪 (T100TM; BIO-RAD, model no. 1861096)

电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, cat. no. JY300HC)

凝胶成像仪 (BIO-RAD, model no. Universal Hood II)

酶标仪 (Molecular Devices®, model no: PARADIGM)

紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model no. NanoDrop ND-2000)

高速离心机 (Eppendorf, model no. 5810R)

磁力架 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 12321D)

高速微型离心机 (Thermo Fisher Scientific, model no. Heraeus Pico 17)

–80°C超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model no. 907)

–20°C冰箱 (Haier, cat. no. DW-40L92)

**软件和数据库【可选】**

软件/数据库名称 (版本, 下载链接)

提供此实验所需的全部软件和数据库的版本，无版本可提供下载日期和文件大小。实验中软件安装和使用的异常处理，可在**失败经验**部分详细撰写。

**实验步骤**

一. 预实验初步确定最适稀释浓度

1.从自然土壤中采集植物新鲜根系样品。将水稻连根拔出，采集水稻10cm的根系样品约3g，放入50mL的无菌离心管中。

2.将根系样品表面的土壤颗粒及连接不紧密的微生物清洗掉。为了获得与根系紧密联系的微生物，首先用无菌水将肉眼可见的大块土壤颗粒洗掉。接着将根系转移至新的50mL离心管，管中加入30mL灭菌的磷酸缓冲液（1×PBS），在室温条件下，放置在平板摇床上用180rpm的转速清洗15min，清洗3遍后，用无菌滤纸吸取根系残留液体。

3.将根系研磨成匀浆。用无菌剪刀将洗净并吸水后的根系组织剪成2mm的小段，并混合均匀。称取0.02g的根系组织放入1.5mL的无菌离心管。在生物安全柜中，向离心管中加入200µL灭菌的10mM的氯化镁溶液，用无菌研磨棒研磨根系直至成匀浆状。

4.将根系匀浆液转移至含有25mL的10mM氯化镁的50mL管中，混匀，室温下静置15min。

5.准备稀释梯度液。分别将4500µL、1500µL、500µL、167µL、56µL和19µL的根系匀浆液加入含有1L 10% TSB溶液的6个试剂瓶中，稀释成222×、666×、2000×、6000×、18,000×和54,000×的梯度稀释液。

6.将稀释液分装进96孔细胞培养板。在生物安全柜里，摇匀每瓶稀释液，将50mL稀释液倒入13-cm无菌方皿中，用排枪吸取液体移入96孔细胞培养板的每个孔中，每孔160µL，每瓶稀释液转移3个细胞培养板。

7.用Parafilm将每一个细胞培养板封口。将培养板堆叠放置在室温下暗培养1周。

8.初步确定用于高通量分菌步骤中的最适稀释浓度（ODC）。1周后观察96孔细胞培养板中细菌的生长情况，将培养板中有约30%的孔呈现肉眼可见的浑浊状态的稀释浓度最为最适稀释浓度。

二. 高通量分离培养根系微生物组

9.从自然土壤中采集植物新鲜根系样品。将水稻连根拔出，采集水稻10cm的根系样品约3g，放入50mL的无菌离心管中。

10.将根系样品表面的土壤颗粒及连接不紧密的微生物清洗掉。为了获得与根系紧密联系的微生物，首先用无菌水将肉眼可见的土壤颗粒洗掉。接着将根系转移至新的50mL离心管，管中加入30mL灭菌的磷酸缓冲液，在室温条件下，放置在平板摇床上用180rpm的转速清洗15min，清洗3遍。最后，用无菌滤纸吸取根系残留液体。

11.将根系研磨成匀浆。将清洗并吸水后的根系组织用无菌剪刀剪成2mm的小段，并混合均匀。称取0.02g的根系组织放入1.5mL的无菌离心管。在生物安全柜中，向离心管中加入200µL灭菌的10mM的氯化镁溶液，用无菌研磨棒研磨根系直至成匀浆状。另保存0.1g混匀的根系组织于–20℃冰箱用于后期检测根系微生物组。

12.将根系匀浆液转至含有25mL的10mM氯化镁的50mL管中，混匀，室温下静置15min。

13.准备梯度稀释液。依据预实验中初定的最适稀释浓度（ODC），分别按1/3×ODC、ODC和3×ODC稀释浓度用10% TSB溶液配制稀释液。例如：若预实验中观察到的最适稀释浓度为6000×，则分别将500µL、167µL和56µL的根系匀浆液加入含有1L 10% TSB溶液的3个瓶中，稀释成2000×、6000×和18,000×的梯度稀释液。

14.将稀释液分装进96孔细胞培养板。在生物安全柜中，摇匀每瓶稀释液，将50mL稀释液倒入13-cm无菌方皿中，用排枪吸取液体移入96孔细胞培养板的每个孔中，每孔160µL，每瓶稀释液转移30-45个细胞培养板。

15.用Parafilm将每一个细胞培养板封口。将培养板放置在室温下孵育2周。

16.2周后观察96孔细胞培养板中细菌的生长情况，保留约30%的孔呈现肉眼可见的浑浊状态的培养板。

17.用排枪从保留的培养板每孔中吸取10µL样品移入96孔PCR板中，存储在–20℃冰箱用于后期细菌鉴定。

18.在96孔细胞培养板每孔剩余样品中添加140µL的80%灭菌甘油，存储在–80℃冰箱。

三. 双边标记两步PCR扩增法鉴定分离培养细菌的16S rRNA基因

19.采用碱性裂解法提取培养细菌的DNA。向第17步留存的96孔PCR板每孔的10µL样品中加入16.6µL碱性裂解液。

20.将上述体系用排枪吹打混匀后用封板膜封板。将 PCR板放于PCR仪，在碱性环境中高温裂解菌体，程序设置为 95℃，30min。

21.冷却降温后，向每孔中加入16.6µL中和缓冲液，混匀并离心，存储于–20℃冰箱。

22.第一轮PCR体系，使用未标记的引物799F和1193R。将原96孔PCR板A12和B12孔的样品去掉，分别替换成无核酸酶水和大肠杆菌*E. coli*的DNA作为每个板上的负对照和正对照。在生物安全柜中按下表配制第一轮PCR反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| **成分** | **体积 (µL)** |
| 10× Buffer | 3 |
| dNTPs (2.5 mM each) | 2.4 |
| 799F (10 mM) | 0.3 |
| 1193R (10 mM) | 0.3 |
| HS taq (5U/µL) | 0.15 |
| gDNA | 3 |
| Qiagen water | 20.85 |
| Total | 30 |

23.第一轮PCR反应程序如下表：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **循环数** | **变性** | **退火** | **延伸** |
| 1 | 94°C, 2 min |  |  |
| 2–31 | 94°C, 30 s | 55°C, 30 s | 72°C, 1 min |
| 32 |  |  | 72°C, 5 min |

24.第一轮PCR扩增结束后，吸取3µL阴、阳性对照的PCR产物，分别与3µLDNA上样缓冲液混合，经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。阳性对照产生约400bp的条带，阴性对照无条带，表明第一轮PCR扩增合格。

25.将第一轮PCR扩增产物用无核酸酶水稀释40倍(2µL的第一轮PCR扩增的产物添加至78µL Nuclease-Free Water)作为第二轮PCR扩增的模板，阳性和阴性对照同样稀释40倍使用。

26.第二轮 PCR扩增使用带有Barcode和测序所需列的799F和1193R，在目的片段3’和5’端添加 Barcodea和 Illumina测序所需序列。PCR反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| **成分** | **体积 (µL)** |
| 10× Buffer | 3 |
| dNTPs (2.5 mM each) | 2.4 |
| Reverse barcoded primer (10 mM) | 0.6 |
| Forward barcoded primer (10 mM) | 0.6 |
| HS taq (5U/µL) | 0.15 |
| gDNA (diluted by 40 times of PCR1） | 3 |
| Qiagen water | 20.25 |
| Total | 30 |

27.第二轮PCR反应程序如下表：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **循环数** | **变性** | **退火** | **延伸** |
| 1 | 94°C, 2 min |  |  |
| 2–26 | 94°C, 30 s | 55°C, 30 s | 72°C, 1 min |
| 27 |  |  | 72°C, 5min |

28.第二轮PCR扩增结束后，吸取5µL阴、阳性对照的PCR产物，分别与5µLDNA上样缓冲液混合，经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。阳性对照产生约500bp的条带，阴性对照无条带，表明第二轮PCR扩增合格。

四. PCR产物的混合、纯化及Illumina测序

29.完成两轮PCR扩增后，我们将一个96孔PCR板1-12列的PCR产物混合至1个5mL的无菌离心管中。每个板都按此方法混合。

30.将每个板的混合产物分别吸取40µL，与10µL的DNA上样缓冲液混合。

31.配制1.2%的琼脂糖凝胶，电压设置126V，将样品和2000-bp DNA标准物同时电泳40min。

32.切取约500-bp的扩增片段以及该片段上下2mm凝胶内的所有片段，将胶块装入2 mL无菌离心管。使用胶回收试剂盒对胶块中的DNA进行回收，回收产物保存在–20℃冰箱。

33.切胶回收的DNA产物可以用Nanodrop仪器（A）或者PicoGreen荧光染料法（B）进行定量。

（A）采用Nanodrop分光光度计测量：吸取2µL无核酸酶水作为空白对照，再测量样品中DNA浓度。

（B）采用PicoGreen荧光染料法测量：

（ⅰ）配制标准曲线实验体系，将稀释后的λ DNA和 1×TE按照一定比例加入96孔酶标板中的反应孔。每块酶标板均需要设置标准曲线，设置 2次重复。体系配制如下表：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| λ **DNA浓度 (ng/μL)** | **1× TE体积 (μL)** | **2 μg/mL** λ **DNA体积 (μL)** |
| 0.75 | 12.5 | 37.5 |
| 0.5 | 25 | 25 |
| 0.4 | 30 | 20 |
| 0.25 | 37.5 | 12.5 |
| 0.1 | 45 | 5 |
| 0.05 | 47.5 | 2.5 |
| 0.01 | 49.5 | 0.5 |
| 0 | 50 | 0 |

（ⅱ）在其它孔中加入需要检测的样品（若样品浓度太高，可适当进行稀释），配制体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| **成分** | **体积 (µL)** |
| PCR产物 | 2 |
| 1× TE | 48 |

（ⅲ）在标准曲线孔及含有样品的孔中加入稀释200倍的PicoGreen荧光染料，由于PicoGreen荧光染料遇光易降解，所以配制过程中需要用锡箔纸包裹避光。混匀后用锡箔纸包裹整个酶标板，避光。

（ⅳ）用酶标仪进行读数，激发光波长：480 nm，吸收光波长：520 nm；每块酶标板读数3次，计算时取平均值。

（ⅴ）根据标准曲线导出性方程y = ax (R2 ≥ 0.99)，将样品读数分别带入公式并乘以DNA相应的稀释倍数得出样品最终的浓度。

34.每个PCR产物检测DNA浓度后，各取70ng移入一个1.5mL离心管中，混合均匀。

35.采用AMPure磁珠对混合后的DNA样品进行纯化和浓缩。将磁珠提前从4℃冰箱中取出，室温孵育30 min。

36.按照磁珠加入量：样品体积 = 0.9 : 1 的比例在样品中加入磁珠，用移液器上下混匀 ，用移液器上下混匀 20 次，室温静置 10 min。

37.将 1.5 mL离心管置于磁力架吸附 5 min，磁珠被吸附至离心管的侧壁。

38.用移液器去除上清，尽量避免吸到磁珠，减少 DNA 的损失。

39.加入 200µL 80%乙醇 (现配现用)，乙醇的加入量需要完全覆盖侧壁吸附的磁珠，孵育 30s 后去除乙醇。重复此步1次。

40.室温干燥约4 min去除残留乙醇，磁珠表面的液体层消失后示残留乙醇挥发干净，避免磁珠过于干燥。

41.撤去磁力架，在每个离心管中加入100µL 的1 × TE 缓冲液洗脱 DNA，用移液器上下吹打 30 次，室温静置 5 min。

42.将离心管重新置于磁力架吸附5 min后，吸取96µL上清液至新的 1.5 mL 无菌离心管，完成第一次纯化浓缩。

43.为了进一步纯化和浓缩PCR产物，在第一次纯化浓缩的样品中添加86.4µL磁珠，用移液器上下混匀20 次，室温静置 10 min。置于磁力架吸附 5 min，用移液器去除上清液。加入 200µL 80%乙醇 (现配现用)，孵育 30 s 后去除乙醇，此步重复1次。室温干燥约 4 min去除残留乙醇。

44.撤去磁力架，加入50µL的 1 × TE 缓冲液洗脱DNA，用移液器上下吹打 30 次，室温静置 5 min。

45.置于磁力架吸附 5min，吸取 48µL上清液于新的1.5 mL无菌离心管。

46.采用33步（B）的PicoGreen荧光染料法检测磁珠纯化产物。

47.取1,500ng的纯化PCR产物进行Illumina测序。

五. 鉴定分离培养的细菌及数据分析

48-61数据分析

六. 分离培养细菌的纯化及菌种保藏

62.对于每个ASV，选择2-3个包含对应细菌种类的96孔细菌培养板上的候选孔，并且尽可能来源于不同的植株。用无菌枪头从冰冻的表面挑取细菌培养物，转移至1/2 TSB固体平板上。

63.在室温下培养3-5天，挑取单菌落转移至新的1/2 TSB固体平板上。此步重复2次。

64.在平板上纯化3次后，挑取第3次平板上的单菌落，用1/2 TSB液体培养基进行摇菌，在28℃条件下转速180rpm，摇培5-7天。

65.当菌液浑浊后，吸取10µL 的细菌培养物至PCR管中，用19-21步的方法提取细菌DNA。

66.用引物 27F和 1492R 扩增 16S rRNA基因，最后使用引物 1492R 进行反向 Sanger测序。

67.与高通量测序结果一致的细菌，可按照以下两种方法制备成高质量的菌保。

（A）室温下，将30mL菌液用2900g离心10min，弃去上清液至剩余1mL，重悬菌体，吸取800µL的重悬菌液移入冻存管，加入等体积80%的无菌甘油，混匀，保存至-80℃。

（B）用无菌枪头从第3次纯化平板上挑取单菌落转入Microbank菌保管中，上下翻转混匀4-5次，室温放置18h后，弃去菌保液，将菌保管保存至-80℃。

**结果与分析**

以水稻品种日本晴（*Oryza sativa* L. Nipponbare）为生物材料，我们采集了生长8周的水稻根系样品。通过预实验初步确定最佳稀释浓度为2000倍，在高通量分离培养根系细菌过程中，我们设置了3个稀释梯度：666倍、2000倍和6000倍。培养2周后，稀释倍数为2000的96孔细胞培养板呈现45%左右的孔中出现浑浊，所以我们对这45个96孔细胞培养板每个孔中的细菌进行鉴定。每个细胞培养板的测序深度相对均匀，约为19,454条序列，能够高效和无偏差的鉴定培养的细菌。对每个板上阴性对照进行检测，阴性对照孔中测出的序列基本小于20，表明PCR鉴定体系合格且测序质量较高。对所测得的细菌种类分析后发现，培养细菌的种类多样性随着板数的增加逐渐增多，在我们培养45个板中，细菌种类已达到了饱和，表明在我们设置的培养体系中已分离到了足够多种类的细菌。44.8%的孔中包含唯一的细菌序列，即100%纯度的ASV，78.1%的孔中含有95%相同的序列。包含有超过95%相同序列的孔与剩余孔的比例为3.6:1。通过多次细菌平板复苏实验，我们发现当一个孔包含超过95%相同序列时，该孔中的菌可认为是纯菌。我们分离了45个96孔细胞培养板，共包含2,073个孔，分离出278个不同的ASV，这些ASV主要属于Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes和Bacteroidetes四个门。与根系微生物组16S rRNA基因检测数据比对，共分离出了57.6%的细菌种类，约占总丰度的78.4%。因此，我们建立了水稻根系微生物组资源库，为后续研究微生物功能和与植物的互作机制提供了重要资源。

**失败经验**

1.将梯度稀释液分装至96孔细胞培养板后，放置在室温培养2周可能会出现板的边缘孔中的液体体积减少，可能是未完全封好板，将板边缘封紧而且不要放置超过4周的时间。

2.如果第一轮或第二轮PCR产物检测时发现阴性对照出现条带，可能是PCR体系中的试剂或水被污染，应在生物安全柜中用新的试剂和水配制PCR反应体系。

3.数据分析过程中出现错误，可能是mapping file的格式不正确，重新仔细检查mapping file。

4.测序结果中每个板的测序量不同，可能是在混合PCR产物时每个板混入的量不一致，应重新检测PCR产物浓度再进行混合。

5.在制作菌保过程中，有些菌摇培7d后未浑浊，可能是接菌量过低或者是一些在液体培养基中生长缓慢的菌，可以增加接菌量或者在平板上富集后直接用菌体进行PCR检测。

6.菌保的复苏率较低，不同细菌对冷冻的敏感度不同，在制作菌保时增加细菌浓度以及避免菌保的反复冻融。

**溶液配方**

1. 10× PBS 存储液：1.3 M NaCl、70 mM Na2HPO4和30 mMNaH2PO4 (pH = 7)。121°C高压灭菌15分钟，可在室温 (22–25°C)存储2个月。
2. 1× PBS 工作液：用无菌去离子水将10× PBS 存储液稀释10倍。可在室温下存储1个月。
3. 10% 液体TSB培养基：将3g TSB药品溶解于1L去离子水中，121°C高压灭菌15分钟，在4°C条件下可存储1周。
4. 1/2 液体TSB培养基：将15g TSB药品溶解于1L去离子水中，121°C高压灭菌15分钟，在4°C条件下可存储1周。
5. 1/2 固体TSB培养基：将15g TSB药品和20g 琼脂粉溶解于1L去离子水中，121°C高压灭菌15分钟，在4°C条件下可存储1周。
6. 10 mM MgCl2：将20.33g MgCl2·6H2O溶解于100mL去离子水中，配置成1M MgCl2溶液。用去离子水将1M MgCl2稀释100倍，过滤灭菌后可在4°C条件下存储1个月。
7. 80% (vol/vol) 甘油：将800mL甘油与200mL去离子水混合均匀，121°C高压灭菌15分钟，可在室温存储1个月。
8. 碱性裂解缓冲液：25 mM NaOH和0.2 mM Na2-EDTA（pH = 12）。121°C高压灭菌15分钟，可在室温存储2个月。
9. 中和缓冲液：40 mM Tris-HCl（pH = 7.5）。121°C高压灭菌15分钟，可在室温存储2个月。
10. 80% (vol/vol) 乙醇：将1份的无核酸酶水与4份无水乙醇混合均匀，现配现用。
11. 50× TAE 溶液：将242g Tris和37.2 g Na2-EDTA溶解于 800 mL去离子水中，加入57.1 mL 乙酸至药品完全溶解，再定容至1L，可在室温存储2个月。

**致谢**

输入正文

此部分可包含(但并不仅限于)以下内容:

1. 作者应致谢支持其工作的经费来源渠道。
2. 列出已发表的使用过本实验方案的文章。
3. 若实验方案摘自或改编自毕业论文或先前发表的文章，请在此致谢先前的研究工作。

**参考文献**

建议作者按照以下格式列出所有相关参考文献:

蒲琦，李素珍，李盼. (2012) [植物锌铁转运蛋白 ZIP 基因家族的研究进展.](http://biotech.caas.cn/CN/abstract/abstract6578.shtml) 生物技术通报, 10: 15-19.

Kang, H. W., Cho, Y. G., Yoon, U. H. and Eun, M. Y. (1998). [A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed.](https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007418606098) *Plant Mol Biol Rep* 16: 1-9.

输入正文，推荐使用Endnote插入引文。添加bio-protocol.ens文件格式至EndNote安装目录中的styles文件中，即可选择bio-protocol的样式自动格式化，如下：

中文引文示例(刘永鑫*等，* 2019)；英文示例(Liu*等，* 2019)；

1. Liu, Y.-X., Qin, Y. and Bai, Y. (2019). Reductionist synthetic community approaches in root microbiome research. *Curr Opin Microbiol* 49: 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.010>

2. 刘永鑫, 秦媛, 郭晓璇 and 白洋 (2019). 微生物组数据分析方法与应用. *遗传* 41(9): 845-826. <https://doi.org/10.16288/j.yczz.19-222>