

中文版 Method

仅供客户在文章写作时参考，分析内容和方法请以结题报告为准，请客户自行承担文章查重等相关风险。

1. 实验流程

1.1 基因组DNA提取

土壤、粪便、肠道内容物样品采用磁珠法，对基因组DNA进行提取（土壤和粪便基因组DNA提取试剂盒，目录号：DP712）。其他样品类型采用CTAB方法，对基因组DNA进行提取，之后利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度，取适量的样本DNA于离心管中，使用无菌水稀释样本至1ng/μL。

1.2 PCR产物的获取

引物对应区域：

16S V4区引物（515F和806R）：鉴定细菌多样性

18S V4区引物（528F和706R）：鉴定真核微生物多样性

ITS1区引物（ITS5-1737F和ITS2-2043R）：鉴定真菌多样性

此外，扩增区域还包括16S V3-V4/16S V4-V5/16S V5-V7；古菌16S V4-V5/古菌16S V8；18S V9和ITS2区。

所有PCR混合液加入15μL Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix（New England Biolabs）、0.2μM引物和10ng基因组DNA模板，在98℃下进行1分钟的第一次变性，然后在98℃（10s）、50℃（30s）和72℃（30 s）下进行30次循环，最后在72℃下保持5分钟。

1.3 PCR产物的混样和纯化

PCR产物使用2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测；对检测合格的PCR产物进行磁珠纯化，采用酶标定量，根据PCR产物浓度进行等量混样，充分混匀后使用2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，对目的条带使用通用型DNA纯化回收试剂盒(天根，目录号:DP214)回收产物。

1.4 文库构建和上机测序

使用NEB Next® Ultra™ II FS DNA PCR-free Library Prep Kit（NEB/E7430L）建库试剂盒进行文库构建，构建好的文库经过Qubit和Q-PCR定量，文库合格后，使用NovaSeq 6000进行PE 250 上机测序。

2. 生物信息分析

2.1 数据质量控制

2.1.1 数据拆分

根据Barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据。

2.1.2 双端数据拼接

截去 Barcode 和 引物序列后使用 FLASH (Version 1.2.11 , <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Magoc T et al.,2011) , 对每个样本的reads进行拼接, 得到的拼接序列为原始Tags数据 (Raw Tags) 。

2.1.3 数据质控

使用fastp软件 (Version 0.23.1) 对拼接得到的Raw Tags经过严格的过滤处理得到高质量的Tags数据 (Clean Tags) (Bokulich NA et al.,2012) 。

2.1.4 去除嵌合体

经过以上处理后得到的Tags需要进行去除嵌合体序列的处理, Tags序列通过与物种注释数据库 (Silva database <https://www.arb-silva.de/> for 16S/18S, Unite database <https://unite.ut.ee/> for ITS) 进行比对检测嵌合体序列, 并最终去除其中的嵌合体序列, 得到最终的有效数据 (Effective Tags) (Edgar RC et al.,2011) 。

3. Reference

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*. 2012;10(1):57-59. doi:10.1038/nmeth.2276.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27(16):2194-2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.

Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011;27(21):2957-2963. doi:10.1093/bioinformatics/btr507.