

# 高通量分离培养和鉴定植物根系细菌

## High-throughput Cultivation and Identification of Bacteria from the Plant Root Microbiota

张婧赢<sup>1, 2, 3, #</sup>, 刘永鑫<sup>1, 2, 3, #</sup>, 郭晓璇<sup>1, 2, 3</sup>, 秦媛<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 白洋<sup>1, 2, 3, 4, \*</sup>

<sup>1</sup> 植物基因组学国家重点实验室, 种子创新研究院, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; <sup>2</sup> 生物互作卓越创新中心, 中国科学院大学, 北京; <sup>3</sup> 中国科学院-英国约翰英纳斯中心植物和微生物科学联合研究中心, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; <sup>4</sup> 现代农学院, 中国科学院大学, 北京

\*通讯作者邮箱: [ybai@genetics.ac.cn](mailto:ybai@genetics.ac.cn)

#共同第一作者/同等贡献

**摘要:** 原位分离培养微生物对于揭示微生物在植物生长和健康中的功能非常重要。分离培养的微生物和无菌体系相结合, 将揭示根系微生物与植物生长表型之间的因果关系和互作机制, 是推动根系微生物组从描述向功能研究发展的重要技术。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, 采用双侧标签 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网络服务器(<http://bailab.genetics.ac.cn/culturome/>)。该方法允许任何研究组 (2-3 个实验室成员, 无需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

**背景:** 根系是植物吸收营养和水分的主要器官, 也是植物和微生物互作的主要场所。自然生长的植物根系表面及内部从土壤中富集了大量且种类繁多的微生物, 统称为根系微生物组。这些微生物包括有益、有害和中性微生物, 在植物的生长过程中扮演着重要角色。植物根系微生物组的研究主要以描述性工作为主, 利用高通量扩增子和宏基因组测序技术, 描述自然土壤中生长的各种植物根系微生物组的物种分类和基因组成。该领域正在进入快速发展期, 下一阶段必然着重研究根系微生物组在植物中的功能, 并逐渐揭示植物与根系微生物组互作过程的分子机制。目前, 阻碍根系微生物功能及植物与微生物

物互作研究的关键因素是根系微生物资源。尽管国际储备中心已经存储了成千上万的微生物，但这些微生物来自于多种环境和物种。微生物在特定生态位的定殖能力很可能在不同栖息地和不同物种根部产生分化，因此有必要从给定的土壤和宿主中分离培养原位的微生物，为根系微生物的功能及与植物的互作研究提供更好的菌种资源。

## 材料与试剂

### A. 耗材

1. 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)
2. 剪刀 (Jinzhong, catalog number: J21130)
3. 切胶刀片 (Jinzhong, catalog number: J11010)
4. 滤纸 (SEP, catalog number: DXLZ11F)
5. 50-ml 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352070)
6. 微量离心管 (1.5-, 5-ml; Eppendorf, catalog number: 0030125.150, 30119401)
7. 塑料研磨棒 (Huaaobio, catalog number: SLXMB-1.5)
8. 13-cm 方板 (Axygen, catalog number: ASJ-17-9142)
9. 60-mm 培养皿 (Corning, catalog number: 430166)
10. 96 孔 PCR 板 (Jet Keen Biotechnology, catalog number: PC-0200-9B)
11. 96 孔细胞培养板 (NEST, catalog number: 701001)
12. 96 孔酶标板 (Costar, catalog number: 3590)
13. 2.0-ml 冻存管 (NEST, catalog number: 607001)
14. Microbank 菌保管 (Prolab, catalog number: PL.170/M)
15. 12 通道移液器 (10, 100, 300  $\mu$ l; Eppendorf, catalog numbers: 3122000027, 3122000043, 3122000060)
16. 单道移液器 (10, 20, 100, 200, 1000  $\mu$ l; Eppendorf, catalog numbers: 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)
17. 移液器枪头 (nuclease-free, 10, 200, 1000  $\mu$ l; Axygen, catalog numbers: T-300, T-200-Y, T-1000-B)
18. Parafilm 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)
19. 96 孔 PCR 板封板膜 (Axygen, catalog number: PCR-TS)

60

61 B. 生物材料

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

63 2. *E. Coli* (TIANGEN BIOTECH, DH5 $\alpha$ , catalog number: CB101-03)

64

65 C. 试剂

66 1. 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB, OXOID, catalog number: CM0129)

67 2. 氯化镁 ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , SIGMA, catalog number: 63068-250G)

68 3. 氯化钠 ( $NaCl$ , SIGMA, catalog number: S7653-250G)

69 4. 磷酸氢二钠 ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , SIGMA, catalog number: 04272-1KG)

70 5. 磷酸二氢钠 ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , SIGMA, catalog number: 71504-250G)

71 6. 氢氧化钠 ( $NaOH$ , SIGMA, catalog number: S8045-500G)

72 7. 乙二胺四乙酸二钠 ( $Na_2-EDTA \cdot 2H_2O$ , Amresco, catalog number: 0105)

73 8. 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl, Genviue, catalog number: BT504-500G)

74 9. 甘油 (SIGMA, catalog number: G7893)

75 10. 琼脂粉 (SIGMA, catalog number: A7921-100G)

76 11. 琼脂糖(Biowest, catalog number: G-10)

77 12. 乙醇(SIGMA, catalog number: E7023-500ML)

78 13. 无核酸酶水(QIAGEN, catalog number: 129115)

79 14. PCR 引物 (Life Technologies)

80 15. PCR 反应体系试剂 (TAKARA, catalog number: R007Z)

81 16. 2000-bp Plus DNA 标准物 (DiNing, catalog number: DM1003)

82 17. DNA 染色剂 (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, catalog number: MG04)

83 18. 胶回收试剂盒 (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System, Promega, catalog  
84 number: A9282)

85 19. 磁珠 (Agencourt AMPure XP beads, Beckman, catalog number: A63882)

86 20. PicoGreen 荧光染料 (Invitrogen, catalog number: P7589)

87 21. 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, Vetec, catalog number: V900483-500G)

88 22. 乙酸 (Rhawn, catalog number: R049946-500ML)

23. 上样缓冲液 (TAKARA, catalog number: 9156)

## 仪器设备

1. 生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: BSC-1000IIA2)

2. 旋涡混合器 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-VS-01)

3. 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)

4. 平板摇床 (Kylin-Bell Lab Instruments, catalog number: TS-2)

5. 恒温摇床 (Shanghai Zhichu Instrument, catalog number: ZQZY-CF)

6. 微孔板离心机 (TIAGEN BIOTECH, catalog number: OSE-MP26)

7. PCR 仪 (T100™; BIO-RAD, model: 1861096)

8. 电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, catalog number: JY300HC)

9. 凝胶成像仪 (BIO-RAD, model: Universal Hood II)

10. 酶标仪 (Molecular Devices®, model: PARADIGM)

11. 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model: NanoDrop ND-2000)

12. 高速离心机 (Eppendorf, model: 5810R)

13. 磁力架 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 12321D)

14. 高速微型离心机 (Thermo Fisher Scientific, model: Heraeus Pico 17)

15. -80 °C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model: 907)

16. -20 °C 冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L92)

## 软件和数据库

个人电脑访问网络服务器 (<http://bailab.genetics.ac.cn/culturome/>)即可在线开展数据分析。本地分析可使用 VirtualBox 运行流程的镜像(<https://github.com/YongxinLiu/Culturome>)。如果需要将软件布置在自己的服务器上开展大规模或个性化分析, 需要在 64 位 Linux 系统 (如 Ubuntu 16.04+或 CentOS 7.5+, >4GB 内存, >30GB 硬盘空间) 安装以下软件和数据库。

1. 软件管理器 Conda 4.8.3+ (<https://repo.anaconda.com/miniconda>)

2. R 语言 3.4+ (<https://cran.r-project.org>)。本流程分析基于 R 3.5.1，并安装了 ggplot2( Wickham, 2016)、pheatmap(Kolde, 2015) 、dplyr 和 stringr 包。
  3. QIIME v1.9.1(Caporaso et al., 2010)<http://qiime.org> 用于混池测序根据序列标签拆分样本
  4. USEARCH v10.0.240(Edgar and Flyvbjerg, 2015)  
<http://www.drive5.com/usearch>
  5. VSEARCH v2.7.1+(Rognes 等, 2016) <https://github.com/torognes/vsearch>
  6. GraPhlAn 1.1.3-1+(Asnicar 等, 2015)绘制物种分类树
  7. Culturome v1.0 分析流程、相关和示例结果  
<https://github.com/YongxinLiu/Culturome>
- 示例测序数据：本文件使用数据保存于中国科学院基因组研究所国家生物信息中心 (China National Center for Bioinformation) (Partners, 2020)组学原始数据归档库 (Genome Sequence Archive, [GSA](https://gsa.genomics.cn)) (Wang 等, 2017)中，访问编号 [CRA002517](https://gsa.genomics.cn/CRA002517)。
- RDP 训练集 16(Cole et al., 2014)作为分类数据库，USEARCH 格式数据下载链接 <http://www.drive5.com/sintax>

## 实验步骤

实验主要分为四个阶段 (图 1)：1. 细菌培养，2. 标签化建库和高通量测序，3. 测序数据分析，4. 菌种保藏。

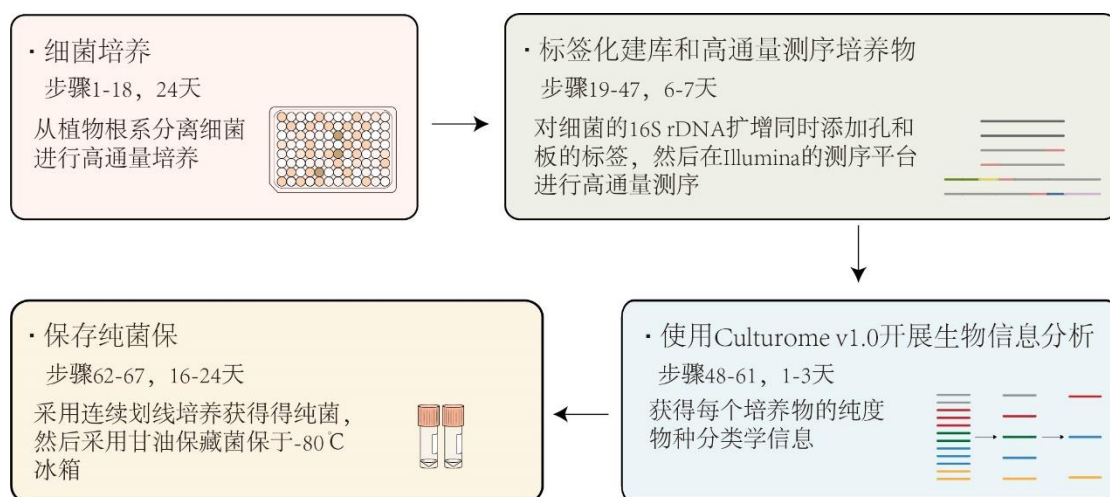


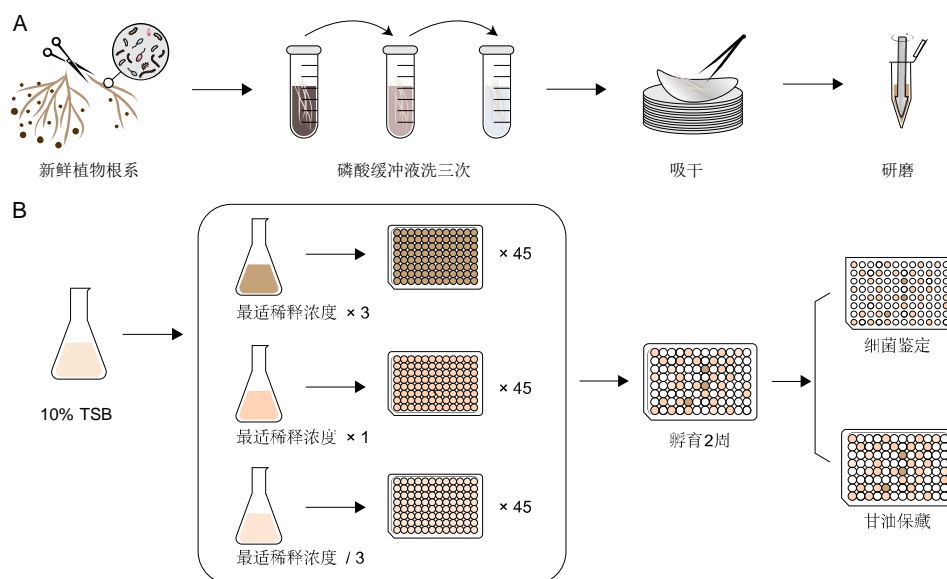
图 1. 高通量细菌分离培养和鉴定方法概述

A. 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 10 cm 的根系样品约 3 g，放入 50 ml 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 50 ml 离心管，管中加入 30 ml 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 180 rpm 的转速清洗 15 min，重复清洗 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 2 mm 的小段，并混合均匀。称取 0.02 g 的根系组织放入 1.5 ml 的无菌离心管。在生物安全柜中，向离心管中加入 200 μl 灭菌的 10 mM 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 25 ml 的 10 mM 氯化镁的 50 ml 管中，混匀，室温下静置 15 min。
5. 准备稀释梯度液。分别将 4500 μl、1500 μl、500 μl、167 μl、56 μl 和 19 μl 的根系匀浆液加入含有 1 L 10% TSB 溶液的 6 个试剂瓶中，稀释成 222×、666×、2,000×、6,000×、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 50 ml 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 160 μl，每瓶稀释液转移 3 个细胞培养板，未添加根系匀浆的 10% TSB 溶液转移 3 个细胞培养板作为阴性对照。移液时应尽量避免液体溅到孔外，否则容易造成污染。
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作为最适稀释浓度。



## B. 高通量分离培养根系微生物组 (图 2)



**图 2. 高通量分离培养根系微生物组的细菌流程。A. 样本制备(步骤 9-11); B. 梯度稀释法分离培养(步骤 12-18)。**

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 10 cm 的根系样品约 3 g，放入 50 ml 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 50 ml 离心管，管中加入 30 ml 灭菌的磷酸缓冲液，在室温条件下，放置在平板摇床上用 180 rpm 的转速清洗 15 min，重复清洗 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 2 mm 的小段，并混合均匀。称取 0.02 g 的根系组织放入 1.5 ml 的无菌离心管。在生物安全柜中，向离心管中加入 200  $\mu$ l 灭菌的 10 mM 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 0.1 g 混匀的根系组织于 -20 $^{\circ}$ C 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 25 ml 的 10 mM 氯化镁的 50 ml 管中，混匀，室温下静置 15 min。

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  $1/3 \times \text{ODC}$ 、ODC 和  $3 \times \text{ODC}$  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 6,000 $\times$ ，则分别将 500  $\mu\text{l}$ 、167  $\mu\text{l}$  和 56  $\mu\text{l}$  的根系匀浆液加入含有 1L 10% TSB 溶液的 3 个瓶中，稀释成 2,000 $\times$ 、6,000 $\times$ 和 18,000 $\times$ 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 50 ml 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 160  $\mu\text{l}$ ，每瓶稀释液转移 30-45 个细胞培养板，未添加根系匀浆的 10% TSB 溶液转移 3 个细胞培养板作为阴性对照。移液时应尽量避免液体溅到孔外，否则容易造成污染。

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 10  $\mu\text{l}$  样品移入 96 孔 PCR 板中，存储在-20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱用于后期细菌鉴定。在后续使用 PCR 板前，用微孔板离心机将板内液体离心至管底再揭开 PCR 封板膜以避免污染。

18.在 96 孔细胞培养板每孔剩余样品中添加 140  $\mu\text{l}$  的 80%灭菌甘油，存储在-80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

## C. 双侧标签两步 PCR 扩增法鉴定细菌的 16S rRNA 基因(图 3)



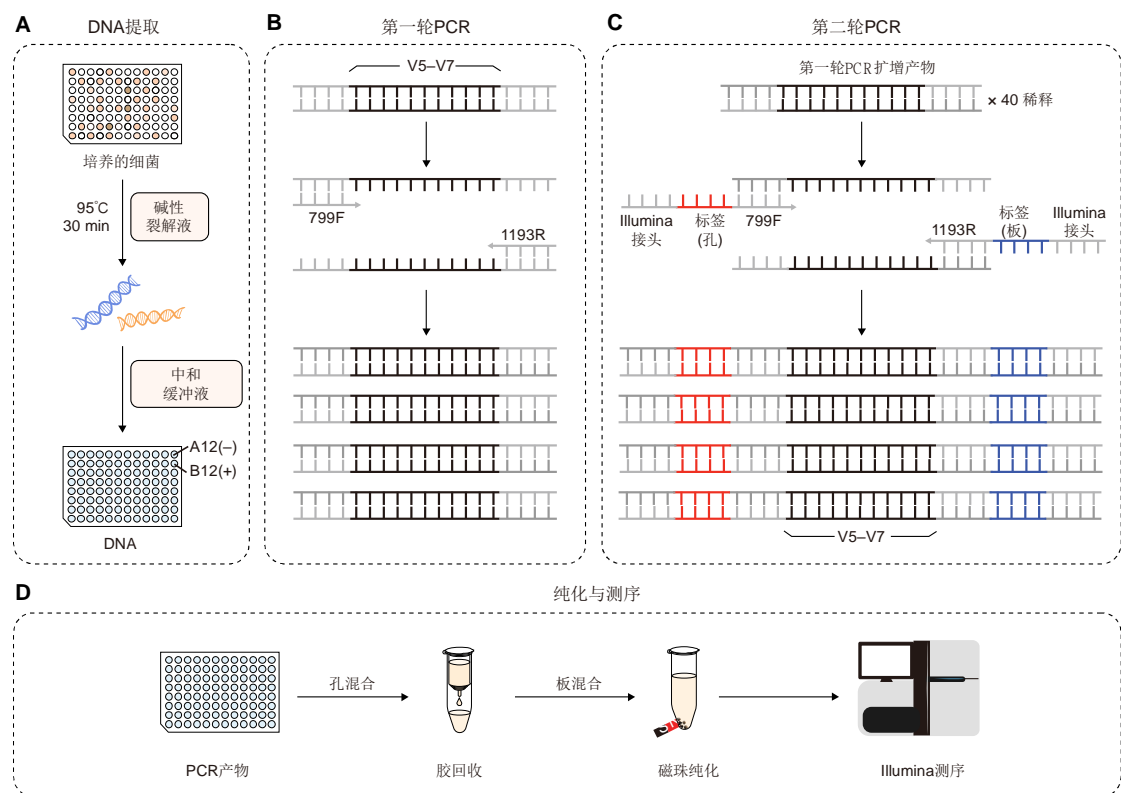


图 3. 双侧标签系统鉴定细菌。A. DNA 提取(步骤 19-21); B. 第一轮 PCR(步骤 2-25); C. 第二轮 PCR(步骤 26-28); D.(步骤 29-47)。

- 19.采用碱性裂解法提取培养细菌的 DNA。向第 B9 步留存的 96 孔 PCR 板每孔的 10  $\mu$ l 样品中加入 16.6  $\mu$ l 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°C，30 min。
- 21.冷却降温后，向每孔中加入 16.6  $\mu$ l 中和缓冲液，混匀并离心，存储于-20  $^{\circ}$ C 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 (表 1):

表 1. 第一轮 PCR 反应体系

成分	体积 ( $\mu$ l)
----	---------------

10× Buffer	3
dNTPs (2.5 mM each)	2.4
799F (10 μM)	0.3
1193R (10 μM)	0.3
HS taq (5U/μl)	0.15
gDNA	3
Qiagen water	20.85
总计	30

23. 第一轮 PCR 反应程序如表 2:

表 2. 第一轮 PCR 反应程序

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 3 μl 阴、阳性对照的 PCR 产物, 分别与 3 μl D NA 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 400 bp 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(2 μl 的第一轮 PCR 扩增的产物添加至 78 μl 无核酸酶水)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 扩增使用带有标签(Barcode)和测序所需接头的 799F 和 1193R 引物, 实现在目的片段 3' 和 5' 端添加标签和 Illumina 测序所需序列。PCR 反应体系见表 3:

表 3. 第二轮 PCR 反应体系

成分	体积 (μl)
10× Buffer	3
dNTPs (2.5 mM each)	2.4

Reverse barcoded primer (10 $\mu$ M)	0.6
Forward barcoded primer (10 $\mu$ M)	0.6
HS taq (5U/ $\mu$ l)	0.15
gDNA (diluted by 40 times of PCR1)	3
Qiagen water	20.25
总计	30

27. 第二轮 PCR 反应程序如表 4:

表 4. 第二轮 PCR 反应程序

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, 5 min

28. 第二轮 PCR 扩增结束后, 吸取 5  $\mu$ l 阴、阳性对照的 PCR 产物, 分别与 5  $\mu$ l D  
NA 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 500 bp 的  
条带, 阴性对照无条带, 表明第二轮 PCR 扩增合格。

#### D. 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 5 ml 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 40  $\mu$ l, 与 10  $\mu$ l 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 2 mm 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°C 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 2  $\mu$ l 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  $\lambda$  DNA 和  $1\times$ 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。体系配制如表 5：

表 5. 标准曲线配制体系

$\lambda$ DNA 浓度 (ng/ $\mu$ l)	$1\times$ TE 体积 ( $\mu$ l)	2 $\mu$ g/ml $\lambda$ DNA 体积 ( $\mu$ l)
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)，配制体系如表 6：

表 6. 样品添加体系

成分	体积 ( $\mu$ l)
PCR 产物	2
$1\times$ 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。

281 v. 根据标准曲线导出方程  $y = ax$  ( $R^2 \geq 0.99$ ), 将样品读数分别带入公式  
282 并乘以 DNA 相应的稀释倍数得出样品最终的浓度。

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

285 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°C 冰  
286 箱中取出, 室温孵育 30 min。

287 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  
288 混匀, 用移液器上下混匀 20 次, 室温静置 10 min。

289 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。

290 38. 用移液器去除上清, 尽量避免吸到磁珠, 减少 DNA 的损失。

291 39. 加入 200  $\mu$ l 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,  
292 孵育 30 s 后去除乙醇。重复此步 1 次。

293 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, 等待残留乙醇挥发  
294 干净, 但要避免磁珠过于干燥。

295 41. 撤去磁力架, 在每个离心管中加入 100  $\mu$ l 的 1  $\times$  TE 缓冲液洗脱 DNA, 用移  
296 液器上下吹打 30 次, 室温静置 5 min。

297 42. 将离心管重新置于磁力架吸附 5 min 后, 吸取 96  $\mu$ l 上清液至新的 1.5 ml 无菌  
298 离心管, 完成第一次纯化浓缩。

299 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 86.4  $\mu$ l 磁  
300 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  
301 移液器去除上清液。加入 200  $\mu$ l 80%乙醇 (现配现用), 孵育 30 s 后去除乙醇,  
302 此步重复 1 次。室温干燥约 4 min 去除残留乙醇。

303 44. 撤去磁力架, 加入 50  $\mu$ l 的 1  $\times$  TE 缓冲液洗脱 DNA, 用移液器上下吹打 30  
304 次, 室温静置 5 min。

305 45. 置于磁力架吸附 5 min, 吸取 48  $\mu$ l 上清液于新的 1.5 ml 无菌离心管。

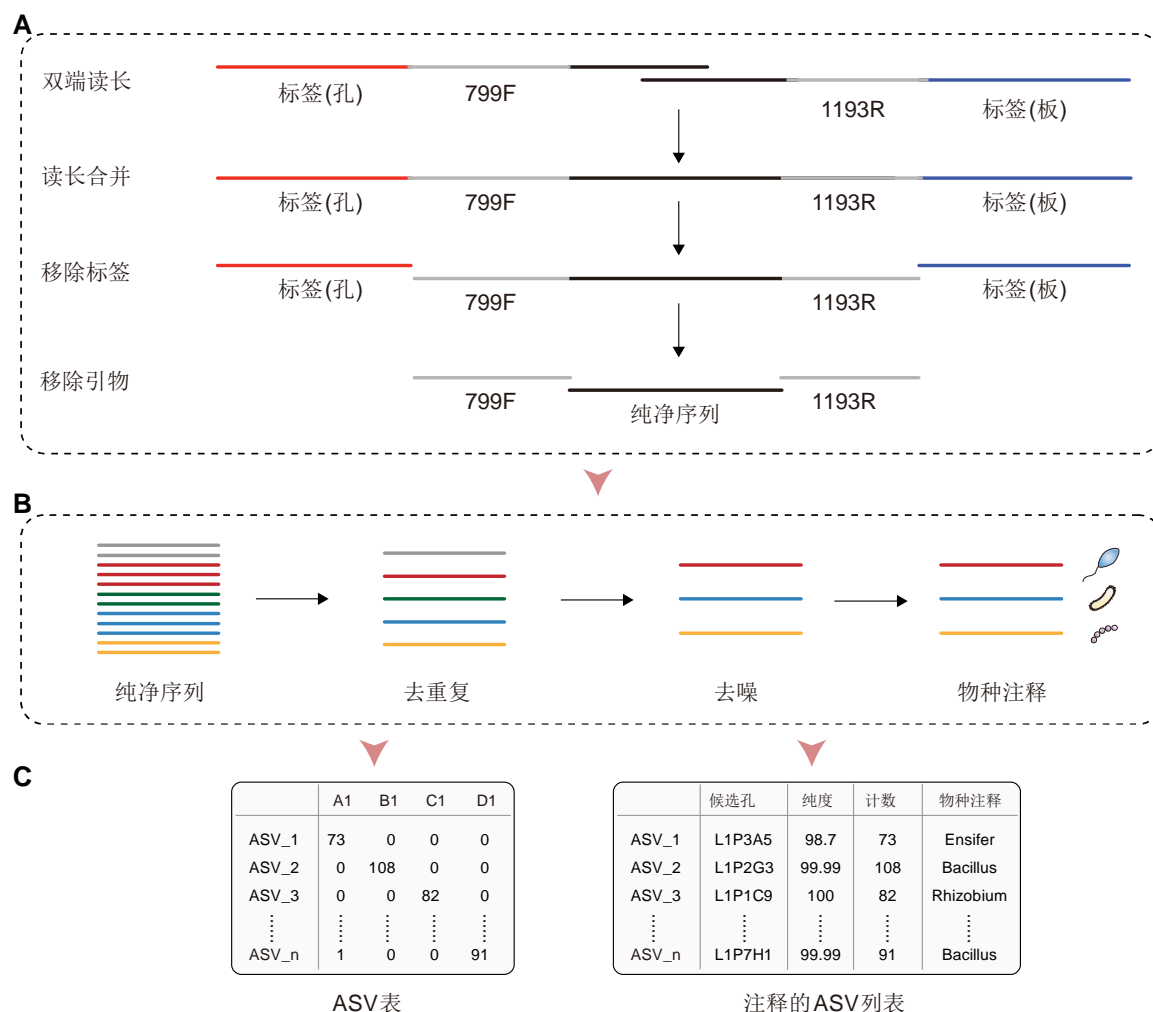
306 46. 采用 bPicoGreen 荧光染料法检测磁珠纯化产物。

307 47. 取 1,500 ng 的纯化 PCR 产物进行 Illumina 测序。

308

309 E. 生物信息分析鉴定分离培养的细菌 (图 4)

310



311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

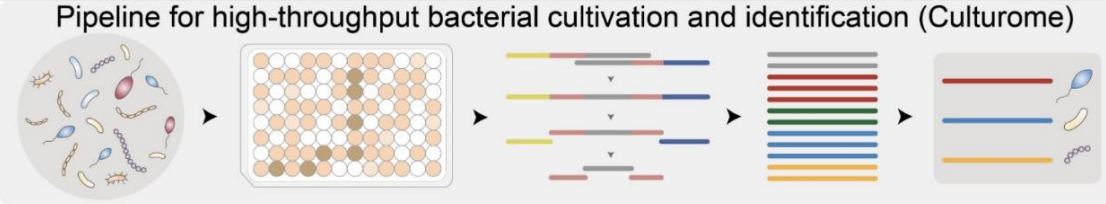
**图 4. 生物信息分析流程鉴定培养的细菌** A. 从原始序列获得扩增区域的纯净序列；  
B. 鉴定扩增序列变体 (ASV) 和物种注释；C. 96 孔板中培养菌的序列和物种注释表。

数据分析可以在网络服务器 <http://bailab.genetics.ac.cn/culturome> 上进行(图 5), 只需提供数据下载链接、样本元数据和邮箱即可。详细的使用说明详见网页 <http://bailab.genetics.ac.cn/culturome/manual.html>。

注: 使用者提供的文件名和样本名必须符合要求, 才能成功使用在线分析流程。



Pipeline for high-throughput bacterial cultivation and identification (Culturome)



Paste links of input files in FASTQ format line by line: [Manual](#)

ftp://download.big.ac.cn/gsa3/CRA002517/CRR127980/CRR127980\_f1.fq.gz  
L1\_1.fq.gz  
ftp://download.big.ac.cn/gsa3/CRA002517/CRR127980/CRR127980\_r2.fq.gz  
L1\_2.fq.gz

Upload mapping file: [Example](#)

Drag the file here, or Click on the upload

Please enter email address

Submit

图 5. 培养组数据分析(Culturome)网络服务器主页截图

Culturome 网址: <http://bailab.genetics.ac.cn/culturome> (图 5), 输入为测序数据下载链接(可上传任意公共数据中心获取)、样本元数据(可选)和邮箱。提交后计算完成会发送结果报告至邮箱。

48. 对于本地流程的使用, 请确认软件和数据库部分已经按照软件官网说明完成部署 (<https://github.com/YongxinLiu/Culturome>)。

49. 准备分析扩增子数据的元数据 (mapping file)。元数据包括样本名、正反向标签和引物序列等。虽然元数据可以按照 QIIME 的要求手动编写, 但由于 45 个培养板多达 4320 个孔的信息, 手动编写确定板、孔的位置、标签序列等而且不出错是巨大的挑战。我们编写了脚本 (write\_mapping\_file.pl) 可以根据输入板、孔标签序列文件 (-i, -b), 正反向引物 (-F, -R), 以及其他详细信息 (-L, -p, -v, -c, -m, -s) 快速生成元数据 (附表 1 和 2)。查看脚本参数的详细信息, 可执行 write\_mapping\_file.pl -h。

```
write_mapping_file.pl \
-i script/barcodeF96.txt \
-b script/barcodeR48.txt \
-F AACMGGATTAGATACCKG \
```

```

343 -R ACGTCATCCCCACCTTCC \
344 -L L1 -p 45 -v Nipponbare -c Root -m TSB -s Rice \
345 -o L1.txt

```

50. 验证元数据。元数据有严格的格式要求(附表 2)，存在错误会影响后续分析。使用 QIIME 流程中的 `validate_mapping_file.py` 脚本验证元数据是否符合格式要求。

```

349 validate_mapping_file.py -m L1.txt -o temp/
350 如果运行显示"No errors or warnings were found in mapping
351 file", 表示元数据格式正确。否则根据输出结果报告修改元数据文件。详见失败
352 原因 3。

```

51. 双端读长合并为单端读长。本研究的测序通常使用 Illumina HiSeq2500/NovaSeq6000 平台产出双端 250-bp 读长，将依赖序列末端反向互补原则进行合并。

```

356 vsearch \
357 -fastq_mergepairs L1_1.fq \
358 -reverse L1_2.fq \
359 -fastqout temp/L1.fq

```

52. 按序列标签进行样本拆分 (附表 1/2)。

根据样本元数据，使用 QIIME 的 `extract_barcode.py` 脚本切除板和孔的标签，然后使用 `split_libraries_fastq.py` 根据标签与元数据对应关系重命名读长 USE ARCH 兼容格式。

```

364 extract_barcode.py \
365 -f temp/L1.fq -m L1.txt \
366 -c barcode_paired_stitched --bc1_len 10 --bc2_len 6 \
367 -a --rev_comp_bc2 \
368 -o temp/L1
369 split_libraries_fastq.py \
370 -i temp/L1/reads.fastq -b temp/L1/barcodes.fastq \
371 -m L1.txt -q 19 --max_barcode_errors 0 \
372 --barcode_type 16 --phred_offset 33 \
373 -o temp/L1

```

```
374 cut -f 1 -d ' ' temp/L1/seqs.fna | sed 's/_/./' > temp/qc.fa
```

375 53. 可视化每板扩增子测序成功与否和均匀度。详细参数帮助文档，请运行  
376 stat\_split\_bar.R -h 查看。结果分布不均匀原因见失败经验 4。

```
377 mkdir -p result/split
```

```
378 tail -n+16 temp/L1/split_library_log.txt | head -n-4 \
```

```
379 > result/split/L1.txt
```

```
380 stat_split_bar.R \
```

```
381 -i result/metadata.txt \
```

```
382 -d result/split/L1.txt \
```

```
383 -o result/split/
```

384 54. 移除正反向引物序列。

```
385 usearch \
```

```
386 -fastx_truncate temp/qc.fa \
```

```
387 -stripleft 19 -stripriht 18 \
```

```
388 -fastaout temp/filtered.fa
```

389 55. 使用 VSEARCH 去重复和 USEARCH 去噪鉴定扩增序列变体(附表 3)。

```
390 vsearch \
```

```
391 --derep_fulllength temp/filtered.fa \
```

```
392 --relabel Uni --minuniquesize 8 --sizeout \
```

```
393 --output temp/uniques.fa
```

```
394 usearch \
```

```
395 -unoise3 temp/uniques.fa \
```

```
396 -zotus temp/Zotus.fa
```

```
397 format_ASVID.sh -i temp/Zotus.fa -o result/ASV.fa
```

398 56. 定量每孔中 ASV 丰度。使用 VSEARCH 比对所有纯净序列至 ASV，获得特征表  
399 (附表 4)。

```
400 vsearch \
```

```
401 --usearch_global temp/filtered.fa \
```

```
402 --db result/ASV.fa --id 0.97 \
```

```
403 --otutabout temp/ASV_table.txt
```

57. 去除背景噪音。扩增子测序每个孔很容易被来自试剂、环境的低丰度 DNA 污染或测序错误产生的噪音。去除比负对照中测序量还少的孔可以有效去除背景噪音。在每个板中，A12 是无核酸水的负对照，B12 是大肠杆菌 DNA 的正对照。

```
negative_threshold.R \
--input temp/ASV_table.txt --metadata L1.txt \
--threshold 1 --negative A12 --positive B12 \
--output result/fdr.txt
usearch -otutab_trim temp/otutab.txt \
-output result/otutab.txt \
-min_sample_size `cat result/fdr.txt`
```

58. 物种注释 ASV 序列。采用 USEARCH 的 `sintax` 命令基于 RDP 数据库进行物种注释，结果整理为制表符分隔的表格(附表 3)。

```
usearch \
-sintax result/ASV.fa \
-db rdp_16s_v16_sp.fa \
-tabbedout temp/ASV.fa.tax \
-sintax_cutoff 0.6 -strand both
tax_sum.sh -i temp/ASV.fa.tax \
-d result/ASV_table.txt \
-o result/
```

59. 鉴定每个 ASV 序列对应的候选菌株。此步包括整合 ASV 和物种注释表、评估 ASV 多样性的饱和度、ASV 或属水平种类的分布、以及每个孔中培养菌的纯度。输出结果主要包括两个表：ASV 列表(isolate\_ASV.txt, 附表 5)包括 5 个最佳候选菌孔位置信息、纯度和测序量；孔列表(isolate\_well.txt)包括 ASV 的纯度、测序量和物种注释信息。

```
identify_isolate.R --input result/ASV_table.txt \
--taxonomy result/taxonomy_8.txt \
--output result/isolate
plot_purity.sh -i result/isolate_well.txt -l L1 \
-o result/purity
```

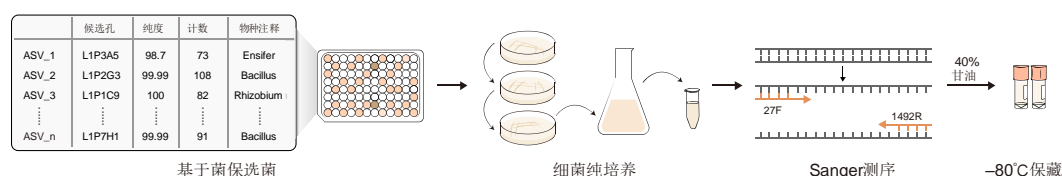
60. 使用 GraPhlAn 绘制培养菌物种分布图。

```
graphlan_prepare.R \
--input result/ASV_table.txt \
--output result/graphlan/ \
--taxonomy result/taxonomy_8.txt \
--abundance 0 --number 1000
graphlan_plot.sh -i ./ -o result/graphlan
```

61.(可选)交叉比对确定可培养比例，需要样本的扩增子测序结果。分菌样本通常会进行非培养的 16S rDNA 扩增子测序，以确定微生物群的全貌，此次将分菌样本扩增子测序结果中的序列和特征表作为输出，与分菌的 ASV 序列比较，以确定分菌样本中可培养的种类和相对丰度信息。

```
cross_reference.sh \
-i script/profiling_ASV.fa \
-d script/profiling_ASVtab.txt \
-r result/ASV.fa \
-o result/cross_reference.txt
```

## F. 分离培养细菌的纯化及菌种保藏 (图 6)



**图 6. 培养细菌的保藏** 基于 16S 序列信息对 96 孔板中的细菌进行选择、连续划线培养纯化、Sanger 测序验证，最后采用-80 °C 甘油保藏。

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。此步再重复 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 180 rpm，摇培 5-7 天。

65. 当菌液浑浊后，吸取 10 µl 的细菌培养物至 PCR 管中，用碱性裂解法提取细菌 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 30 ml 菌液用 2,900 x g 离心 10 min，弃去上清液至剩余 1 ml，重悬菌体，吸取 800 µl 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 °C。

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 18 h 后，弃去菌保液，将菌保管保存至 -80 °C。

## 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 2,000×，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×、2,000× 和 6,000×。培养 2 周后，稀释倍数为 2,000× 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 (图 7E)。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 (图 7A)。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 (图 7B)。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 (图 7C)。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 (图 7D)。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 主要属于变形菌



门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 四个门 (图 7F)。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, 为后续研究根系微生物功能和与植物的互作机制提供了重要资源。

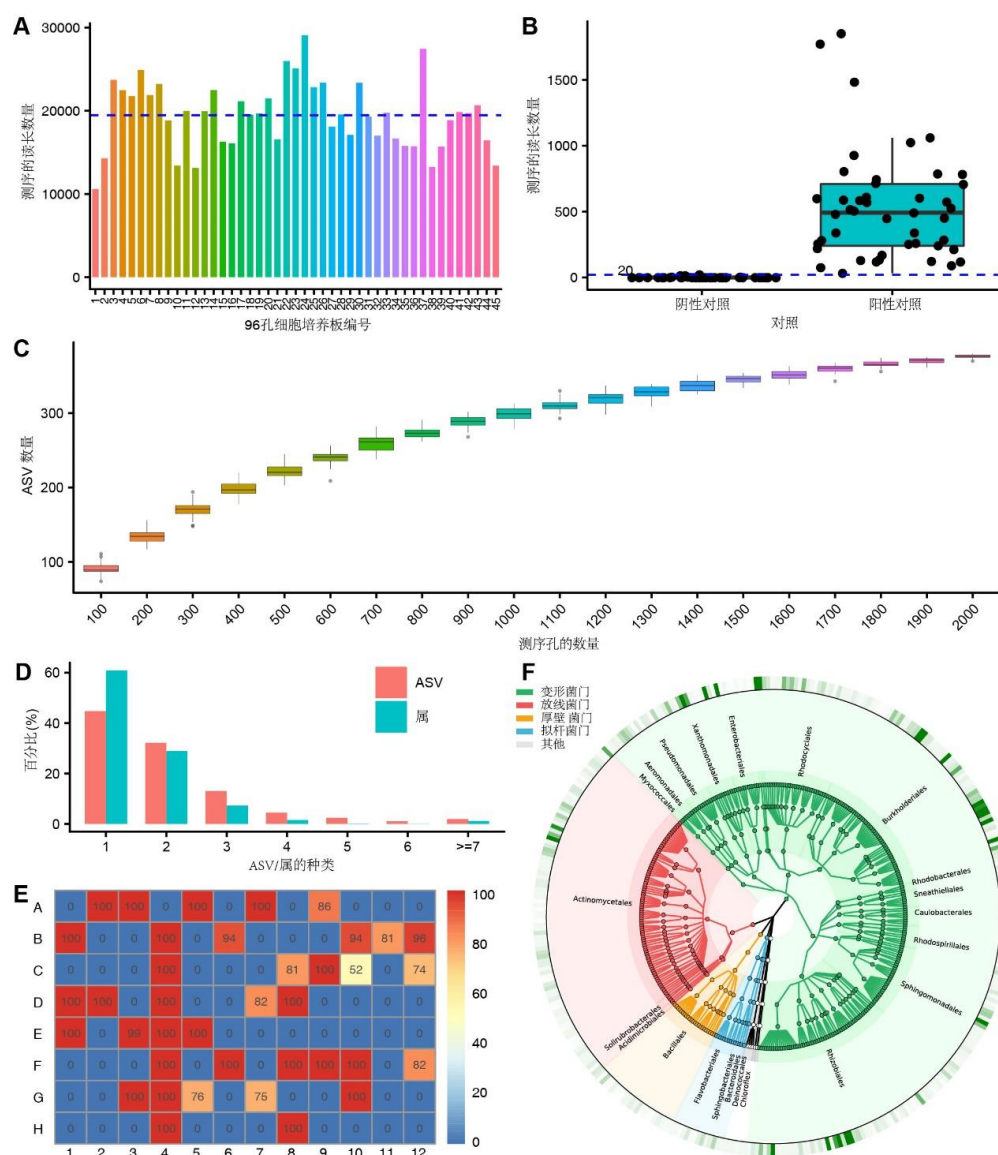


图 7. 水稻根系细菌培养的 4320 个孔(45 板)的测序分析结果。A. 柱状图展示每板 (96 孔) 测序的读长数量; B. 正对照(大肠杆菌)和负对照(无菌水)的读长数量, 用于控制扩增和测序中的假阳性结果; C. 稀释箱线图展示分离物序列多样性与分离物总量的关系; D. 分离物中包括 ASV 和属种类的分布; E. 热图展示每个孔中的序列纯度, 以一板为例; F. 获得可培养细菌的分类学组成。图中 a-f 的数据对应附表 6a-f。

## 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, 可能是元数据文件(mapping file)的格式不正确, 重新仔细检查元数据文件。
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 7 天后未浑浊, 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 3 g TSB 药品溶解于 1 L 去离子水中, 121°C 高压灭菌 15 分钟, 在 4°C 条件下

532 可存储 1 周

533 4. 1/2 液体 TSB 培养基

534 将 15 g TSB 药品溶解于 1 L 去离子水中，121°C 高压灭菌 15 分钟，在 4°C 条件  
535 下可存储 1 周

536 5. 1/2 固体 TSB 培养基

537 将 15 g TSB 药品和 20 g 琼脂粉溶解于 1 L 去离子水中，121°C 高压灭菌 15 分  
538 钟，在 4°C 条件下可存储 1 周

539 6. 10 mM MgCl<sub>2</sub>

540 将 20.33 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶解于 100 ml 去离子水中，配置成 1 M MgCl<sub>2</sub> 溶液。用  
541 去离子水将 1 M MgCl<sub>2</sub> 稀释 100 倍，过滤灭菌后可在 4°C 条件下存储 1 个月

542 7. 80% (vol/vol) 甘油

543 将 800 ml 甘油与 200 ml 去离子水混合均匀，121°C 高压灭菌 15 分钟，可在室温  
544 存储 1 个月

545 8. 碱性裂解缓冲液

546 25 mM NaOH 和 0.2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA(pH = 12)。121°C 高压灭菌 15 分钟，可在 4°  
547 C 条件下存储 2 个月

548 9. 中和缓冲液

549 40 mM Tris-HCl(pH = 7.5)。121°C 高压灭菌 15 分钟，可在 4°C 条件下存储 2 个  
550 月

551 10. 80% (vol/vol) 乙醇

552 将 1 份的无核酸酶水与 4 份无水乙醇混合均匀，现配现用

553 11. 50× TAE 溶液

554 将 242 g Tris 和 37.2 g Na<sub>2</sub>-EDTA·2H<sub>2</sub>O 溶解于 800 ml 去离子水中，加入 57.1 ml  
555 乙酸至药品完全溶解，再定容至 1 L，可在室温存储 2 个月

556

557 **致谢**

558 感谢易汉博基因科技 (北京) 有限公司的陈同博士、刘宇和王金星先生帮助搭建网络服  
559 务器。本项目得到中国科学院战略先导专项 (编号: XDA24020104)、中国科学院前沿  
560 科学重点研究项目 (编号: QYZDB-SSW-SMC021)、国家自然科学基金项目 (编号: 3

1772400, 31761143017, 31801945, 31701997) 和中国科学院青年创新促进会 (编号: 2020101, 2021092)资助[Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Precision Seed Design and Breeding, No. XDA24020104), the Key Research Program of Frontier Sciences of the Chinese Academy of Science (No. QYZDB-SSW-SMC021), the National Natural Science Foundation of China (No. 31772400, 31761143017, 31801945, 31701997), Youth Innovation Promotion Association CAS (No. 2020101, 2021092)]. 此实验方法已经在 *Nature* (Bai *et al.*, 2015)、*Nature Biotechnology* (Zhang 等, 2019)、*Science* (Huang 等, 2019)、*Cell* (Durán 等, 2018)等国际顶级期刊发表文章中使用, 也被相关综述中被提及(刘永鑫等, 2019; Liu 等, 2020)。本文为我们最新发表 *Nature Protocols* 文章(Zhang 等, 2021)的中文版, 如使用此方法建议引用 *Nature Protocols* 英文原文。

## 参考文献

1. Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T. L., Huttenhower, C. and Segata, N. (2015). [Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn](#). *PeerJ* 3: e1029. 2.
2. Bai, Y., Müller, D. B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., Dombrowski, N., Münch, P. C., Spaepen, S., Remus-Emsermann, M., Hüttel, B., McHardy, A. C., Vorholt, J. A. and Schulze-Lefert, P. (2015). [Functional overlap of the \*Arabidopsis\* leaf and root microbiota](#). *Nature* 528(7582): 364-369.
3. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J. and Knight, R. (2010). [QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data](#). *Nature Methods* 7(5): 335-336.

4. Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C  
T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R. and Tiedje, J. M. (2014). [Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis](#). *Nucleic Acids Res* 42(D1): D633-D642.
5. Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P. and Hacquard, S. (2018). [Microbial interkingdom interactions in roots promote Arabidopsis survival](#). *Cell* 175(4): 973-983.e914.
6. Edgar, R. C. and Flyvbjerg, H. (2015). [Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads](#). *Bioinformatics* 31(21): 3476-3482.
7. Huang, A. C., Jiang, T., Liu, Y.-X., Bai, Y.-C., Reed, J., Qu, B., Goossens, A., Nützmann, H.-W., Bai, Y. and Osbourn, A. (2019). [A specialized metabolic network selectively modulates Arabidopsis root microbiota](#). *Science* 364(6440): eaau6389.
8. Kolde, R. (2015). pheatmap: Pretty Heatmaps.
9. Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X. and Bai, Y. (2020). [A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data](#). *Protein Cell* 11.
10. Partners, N. G. D. C. M. (2020). [Database Resources of the National Genomics Data Center in 2020](#). *Nucleic Acids Res* 48(D1): D24-D33.
11. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. and Mahé, F. (2016). [VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics](#). *PeerJ* 4: e2584.
12. Wang, Y., Song, F., Zhu, J., Zhang, S., Yang, Y., Chen, T., Tang, B., Dong, L., Ding, N., Zhang, Q., Bai, Z., Dong, X., Chen, H., Sun, M., Zhai, S., Sun, Y., Yu, L., Lan, L., Xiao, J., Fang, X., Lei, H., Zhang, Z. and Zhao, W. (2017). [GSA: Genome Sequence Archive\\*](#). *Genomics Proteomics Bioinformatics* 15(1): 14-18.
13. Wickham, H. (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis, Springer.
14. Zhang, J., Liu, Y.-X., Guo, X., Qin, Y., Garrido-Oter, R., Schulze-Lefert, P. and Bai, Y. (2021). [High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota](#). *Nat Protoc* 16(2): 988-1012.

- 625 15. Zhang, J., Liu, Y.-  
 626 X., Zhang, N., Hu, B., Jin, T., Xu, H., Qin, Y., Yan, P., Zhang, X., Guo, X., Hui, J  
 627 ., Cao, S., Wang, X., Wang, C., Wang, H., Qu, B., Fan, G., Yuan, L., Garrido-  
 628 Oter, R., Chu, C. and Bai, Y. (2019). [NRT1.1B is associated with root microbiot](#)  
 629 [a composition and nitrogen use in field-grown rice](#). *Nat Biotechnol* 37(6): 676-  
 630 684.
- 631 16. 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*  
 632 41(9): 845-826.  
 633  
 634