

# 土壤线虫群落 DNA 提取、扩增及高通量测序

## DNA extraction, amplification and high-throughput sequencing of soil nematode community

杜晓芳<sup>1,2</sup>, 梁文举<sup>1</sup>, 李琪<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院沈阳应用生态研究所, 土壤生态与农业生态工程研究中心, 沈阳, 110016

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京, 100049

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

**摘要:** 应用高通量测序技术开展土壤线虫多样性研究, 能够克服形态学鉴定所需的时间长和专业知识的限制, 为在大尺度上开展土壤线虫生态学研究提供了技术保障。虽然高通量测序技术可以快速、高效、较为准确的分析大量土壤样品的线虫群落组成, 但利用土壤试剂盒提取线虫 DNA 并进行高通量测序得到的测序深度较低, 线虫序列占真核生物总序列的比例较小。本文针对目前利用高通量测序技术开展线虫研究存在的线虫富集以及线虫 DNA 提取等方面的问题, 对提取土壤线虫 DNA 的方法进行了改进。通过对线虫提取方法的优化和线虫试剂盒的筛选, 研究结果表明: 浅盘法结合贝尔曼漏斗法对线虫进行提取、物理去杂, 并使用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒提取线虫 DNA, 能够提高线虫的提取效率和测序深度, 这为利用高通量测序技术开展土壤线虫群落研究提供了技术参考。

**关键词:** 土壤线虫, DNA 提取, 高通量测序

### 材料与试剂

1. 一次性口罩、无菌手套
2. 无水乙醇
3. 0.5 ml 和 2 ml 的离心管
4. 10 µl、20 ~ 200 µl、1000 µl 的移液器 (Eppendorf)
5. DNeasy Blood & Tissue 线虫 DNA 提取试剂盒
6. NF1/18Sr2b 引物
7. 线虫提取富集相关材料 (18 目、60 目、500 目不锈钢网筛 (浙江上虞银河测试仪

器厂)、面巾纸、表面皿、天平、烧杯、2 L 的量杯等)

## 仪器设备

1. 4/-80 °C冰箱 (海尔)
2. 真空泵 (郑州长城科工贸有限公司 SHB-III)
3. 高压灭菌锅 (上海申安医疗器械厂 DSX-18L-I)
4. 恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司 DK-S24)
5. 无菌工作台
6. 离心机 (Eppendorf Centrifuge 5425)
7. PCR 仪 (ABI GeneAmp® 9700 型)

## 实验步骤

### 一、土壤线虫的提取富集

线虫的提取富集使用浅盘法结合贝尔曼漏斗的方法进行 (图 1)。

1. 取 100 g 鲜土倒入量杯中, 每次 1 L 水淘洗, 悬停 1 分钟, 倒入上层 60 目下层 500 目的一组网筛, 重复三次。
2. 将淘洗后 500 目网筛上得到的泥浆转移至有面巾纸的 18 目网筛中 (网筛置于浅盘), 静置 24 h。
3. 静置 24 h 后取走网筛, 将浅盘中的水全部转移至 250 ml 的烧杯中。将烧杯中的线虫悬液经玻璃棒引流转移至铺有面巾纸的漏斗中 (直径 10 ~ 15 cm), 静置 6 h 以上。
4. 打开漏斗胶管下部的弹簧夹收集线虫悬液, 静置 2 h 后用真空泵抽取上清液, 留约 5 - 10 ml 的线虫悬液在显微镜下活体计数。线虫悬液可置于 4 °C 冰箱保存一周 (或室温保存 1-2 天)。

### 二、土壤线虫 DNA 提取

1. 在提取线虫 DNA 之前, 将每个样品的线虫悬液以 1902 rcf/min 离心 10 分钟 (或线虫悬液静置 2h 以上)。弃去上清液后, 保留约 2 ml 线虫悬浮液并转移到 2 ml 离心管中。然后将 2 ml 离心管以 6010 rcf/min 离心 2 分钟, 弃去上清

液后，最终保留 0.5 ml 线虫悬液使用 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒（Qiagen）进行线虫 DNA 提取。

2. 根据 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒的说明书，我们对实验方法进行了微调，为了得到更多的线虫 DNA，我们使用双倍的裂解缓冲液（360  $\mu$ l Buffer ATL, 40  $\mu$ l 蛋白酶 K）来充分浓缩和裂解线虫，消化时间延长至 1.5 h。具体的操作步骤如下：

① 在保留 0.5 ml 线虫悬液的离心管中加入 360  $\mu$ l Buffer ATL，40  $\mu$ l 蛋白酶 K，涡旋 15 s 后水浴消化 1.5h，水浴消化期间间断振荡（每隔 15min 上下颠倒几次）；

② 涡旋 15 s，加入 400  $\mu$ l Buffer AL，涡旋混匀后加入 400  $\mu$ l（96%-100%）的酒精，涡旋混匀；

③ 用移液器将 2 ml 离心管中的所有液体转移至带有滤柱的 2 ml 收集管中（分几次转移视情况而定），6010 rcf 离心 1 min，弃去离心液及收集管；

④ 将滤柱转移到一个新的收集管中，加入 500  $\mu$ l Buffer AW1，6010 rcf 离心 1 min,弃去滤出液和收集管；

⑤ 将滤柱转移到一个新的收集管中，加入 500  $\mu$ l BufferAW2，18407 rcf 离心 3 min 干燥滤柱，弃去滤出液和收集管；

⑥ 将滤柱置于一个 1.5 ml 的离心管中，加入 100  $\mu$ l（一般为 50  $\mu$ l-200  $\mu$ l）Buffer AE，室温孵化 1 min 后 6010 rcf 离心 1min 最终得到线虫 DNA；

⑦ 提取的线虫 DNA 储存在-80  $^{\circ}$ C 冰箱用于后续的 PCR 扩增和测序。

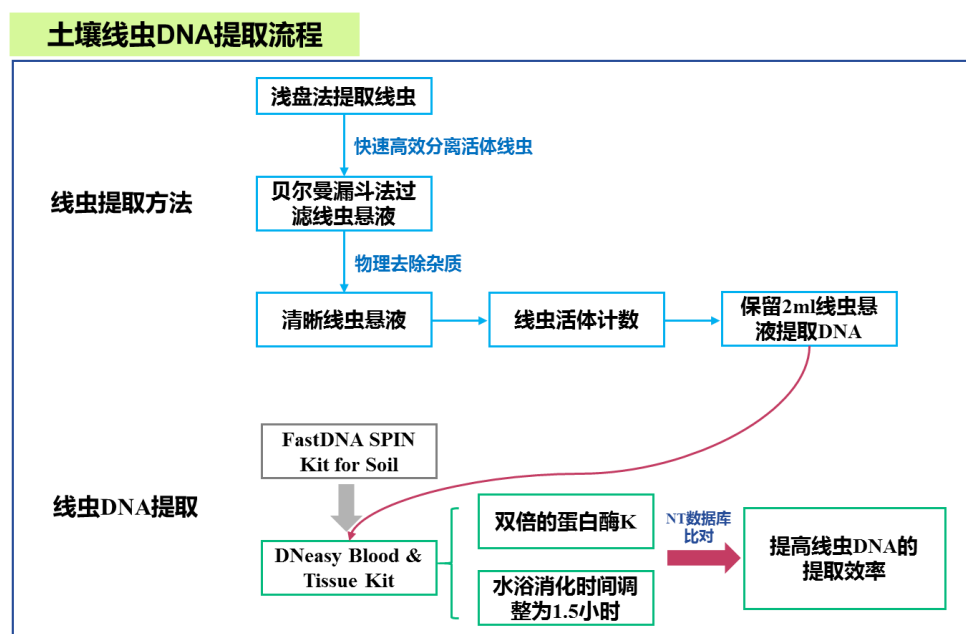


图 1. 土壤线虫 DNA 提取流程示意图。（相关结果来自课题组先前发表的文章（Du *et al.*, 2020））

### 三、线虫群落的扩增测序

1. 使用引物 NF1-F/18Sr2b-R（Porazinska *et al.*, 2009）对线虫 18S rDNA V4 区进行扩增。PCR 采用 TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20  $\mu$ l 反应体系: 5  $\times$  FastPfu Buffer 4  $\mu$ l, 2.5 mM dNTPs 2  $\mu$ l, Forward Primer (5 $\mu$ M) 0.8  $\mu$ l, Reverse Primer (5 $\mu$ M) 0.8  $\mu$ l, FastPfu Polymerase 0.4  $\mu$ l, BSA 0.2  $\mu$ l, Template DNA 10 ng, 最后使用灭菌 PCR 水补足至 20  $\mu$ l。
2. 线虫（NF1FF/18Sr2bR）PCR 反应参数为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 次循环后最终在 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增之后, PCR 产物使用 2 % 琼脂糖凝胶电泳进行可视化（图 2），使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒（Axygen Biosciences, Union City, CA, USA）进行纯化, 并使用 QuantiFluor™-ST（Promega, USA）对回收产物进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台（Illumina, San Diego, USA）标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 300 文库。PCR 文库构建是在引物上合成 barcode, 采用混合样品建库的模式。具体构建文库的步骤为: （1）连接“Y”字形接头; （2）使用磁珠筛选去除接头自连片段; （3）利用 PCR 扩增进

行文库模板的富集；（4）氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行双端测序。原始数据已上传至 NCBI 数据库（序列号：PRJNA580055）。



| 编号              | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| PCR产物浓度 (ng/μl) | 4.82 | 5.69 | 3.90 | 5.87 | 4.53 | 5.71 | 5.20 | 7.04 | 4.67 | 5.30 | 3.04 | 4.00 | 5.47 | 3.85 |
| 编号              | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   |
| PCR产物浓度 (ng/μl) | 4.21 | 3.54 | 3.82 | 4.11 | 3.84 | 3.55 | 3.93 | 5.08 | 2.67 | 3.82 | 5.74 | 6.72 | 4.71 | 3.59 |

图 2. 利用 NF1 和 18Sr2b 引物对进行 PCR 扩增的电泳图谱及 PCR 产物浓度。（相关结果来自课题组先前发表的文章（Du *et al.*,2020））

## 结果与分析

### 一、生物信息分析

#### 1. 数据优化

使用 Trimmomatic 软件对原始测序序列进行质控，使用 FLASH

（<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7）软件进行拼接：

（1）过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基及质控后 200bp 以下的 reads，去除含 N 碱基的 reads；

（2）根据 PE reads 之间的 overlap 关系，将成对 reads 拼接成一条序列，最小 overlap 长度为 10bp；

（3）拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2，去除无法拼接的序列；

（4）根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品，并调整序列方向，barcode

需精确匹配，引物允许 2 个碱基的错配。

## 2. OTU 聚类

使用 UPARSE 软件 (<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类, 具体流程如下:

- (1) 提取优化序列中的非重复序列, 去除没有重复的单序列;
- (2) 按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 代表序列;
- (3) 将所有优化序列 map 至 OTU 代表序列, 选出与 OTU 代表序列相似性在 97% 以上的序列, 生成 OTU 表格。

## 3. 分类学分析

通过 Blast 搜索, 比对 NCBI NT 数据库对物种进行分类注释。

## 二、线虫 DNA 提取效率和测序深度比较

利用浅盘法结合贝尔曼漏斗法提取富集线虫后, 利用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒提取线虫 DNA, 注释的线虫序列占总序列的 68.40%, 平均每个样本的测序深度达到 28978/样本。相比前人的研究结果 (Sapkota et al., 2015; Peham et al., 2017; Griffiths et al., 2018; Treonis et al., 2018) (表 1), 经过对线虫的物理分离、富集以及试剂盒提取方法的改进, 提高了线虫 DNA 的提取效率和测序深度, 为利用高通量测序技术开展土壤线虫群落研究提供了技术参考。

表 1. 基于高通量测序不同提取方法线虫测序深度比较

| 线虫 DNA 提取试剂盒  | 测序深度<br>(序列数) | 线虫占<br>真核生物比例 | 参考文献                         |
|---|---------------|---------------|------------------------------|
| the PowerLyzer™ Power Soil® DNA Isolation Kit       | 3994/样本       | 64.40%        | Sapkota and Nicolaisen, 2015 |
| PowerSoil® DNA Isolation Kit                        | 未提到           | 2.50%         | Peham et al., 2017           |
| PowerMax Soil DNA isolation kit                     | 2175/样本       | 未提到           | Griffiths et al., 2018       |
| PowerSoil® DNA Isolation Kit                        | 2175/样本       |               |                              |
| MO BIO UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation kit | 32568/样本      | 19.9%         | Treonis et al., 2018         |
| DNeasy Blood & Tissue Kit                           | 28978/样本      | 68.40%        | Du et al., 2020              |

## 138 注意事项

- 139 1. 针对不同的土壤选择合适的土壤线虫提取方法是提取线虫 DNA 的关键步骤，在保证  
140 线虫富集效率的同时还要保证线虫悬液样本的清晰，土壤线虫提取方法的选择可参考  
141 张晓珂 等（2013）。
- 142 2. 线虫引物和试剂盒在未来可能会进一步优化，需关注最新的研究进展选择合适的引  
143 物和试剂盒进行研究。
- 144 3. 线虫高通量测序数据的处理可根据需求灵活分析，也可使用 Usearch 软件对原始测  
145 序序列进行质控，聚类，生成 OTU 表。
- 146 4. 用于线虫分析的数据库对于分子技术在线虫领域的应用十分重要，今后需进一步补  
147 充和完善现有的线虫数据库。

## 149 致谢

150 本研究成果主要来源于课题组先前发表的相关文章(Du *et al.*,2020)。相关研究得  
151 到了国家科技基础资源调查专项项目(2018FY100304)、中国科学院国际合作局  
152 对外合作重点项目(151221KYSB20200014)和国家自然科学基金项目(41877047)  
153 的资助。

## 155 参考文献

- 156 1. 张晓珂, 梁文举, 李琪. (2013) 长白山森林土壤线虫. 北京: 中国农业出版  
157 社.
- 158 2. Du, X. F., Li, Y. B., Han, X., Ahmad, W. and Li, Q. (2020). [Using high-throughput  
159 sequencing quantitatively to investigate soil nematode community composition in  
160 a steppe-forest ecotone](#). *Appl Soil Ecol.* 152: 103562.
- 161 3. Griffiths, B. S., de Groot, G. A., Laros, I., Stone, D. and Geisen, S. (2018). [The  
162 need for standardisation: exemplified by a description of the diversity, community  
163 structure and ecological indices of soil nematodes](#). *Ecol. Indic.* 87: 43-46.
- 164 4. Peham, T., Steiner, F. M., Schlick-Steiner, B. C., and Arthofer, W. (2017). [Are we  
165 ready to detect nematode diversity by next generation sequencing?](#). *Ecol Evol.* 7:  
166 4147-4151.



5. Porazinska, D. L., Giblin-Davis, R. M., Faller, L., Farmerie, W., Kanzaki, N., Morris, K., Powers, T. O., Tucker, A. E., Sung, W., and Thomas, W. K. (2009). [Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity](#). *Mol Ecol Resour.* 9: 1439-1450.
6. Sapkota, R. and Nicolaisen, M., (2015). [High-throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA extractions](#). *Bmc Ecol* 15: 3.
7. Treonis, A. M., Unangst, S. K., Kepler, R. M., Buyer, J. S., Cavigelli, M. A., Mirsky, S. B. and Maul, J. E. (2018). [Characterization of soil nematode communities in three cropping systems through morphological and DNA metabarcoding approaches](#). *Sci Rep-Uk.* 8: 2004.