

# 反刍动物瘤胃原虫 18S rRNA 测序分析技术

## 18S rRNA Sequencing and Analysis of Ruminant Protozoa

高健, 甄永康, 王梦芝\*

动物科学与技术学院, 扬州大学, 扬州, 江苏

\*通讯作者邮箱: [mengzhiwangyz@126.com](mailto:mengzhiwangyz@126.com)

**摘要:** 反刍动物瘤胃中含有大量原虫, 其在保持瘤胃微生态环境稳定、促进饲料分解与发酵等方面起着重要的作用。在其相关研究中, 利用高通量测序 (High-throughput sequencing) 技术可以准确获得原虫的区系组成、相对丰度变化及种群多样性差异等, 进而为研究原虫种群关系变化及其与宿主之间关系提供了支持。本文以 18S rRNA 基因序列分析为基础, 介绍了利用高通量测序分析瘤胃内原虫区系组成和相对丰度变化的方法。

**关键词:** 瘤胃原虫, 18S rRNA, 高通量测序

### 材料与试剂

1. 2 mL 螺帽离心管
2. 2 mL 无菌离心管
3. 1.5 mL 无菌离心管
4. 0.1 mm 的铅珠和 0.5 mm 的铅珠
5. 粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Germany)
6. 异丙醇
7. 乙醇
8. NaCl
9. Tris-HCl
10. EDTA
11. 十二烷基硫酸钠 (SDS)
12. 乙酸铵
13. 细胞裂解液 (见溶液配方)
14. 10 mM 乙酸铵溶液 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 1,000 mL 容量瓶
2. Mini-Beadbeater 研磨器 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA)
3. 高速离心机
4. NanoDrop 1000 超微量分光光度计 (Nyxor biotech, Paris, France)

## 软件和数据库

1. UPARSE 软件 (Version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>)
2. RDP Classifier 软件 (Version 11.5, <http://rdp.cme.msu.edu/>)
3. Silva 数据库 (Version 11.9, <https://www.arb-silva.de>)
4. QIIME 软件 (Version 1.9.0, <http://qiime.org>)

## 实验步骤

### 1. 微生物总 DNA 提取 (Yu 和 Morrison, 2004)

#### 1.1 细胞裂解

- 1) 称取 0.25 g 瘤胃内容物加入无菌的 2 mL 螺帽离心管, 加入 1 mL 裂解液和 0.4 g 无菌的氧化锆珠 (0.1 mm 的锆珠 0.3 g 和 0.5 mm 的锆珠 0.1 g);
- 2) 在 Mini-Beadbeater 研磨器以最大速度匀浆 3 min;
- 3) 70 °C 孵育 15 min, 每 5 min 用手缓慢振荡一次;
- 4) 使用高速离心机于 4 °C, 16,000 × g 离心 5 min, 转移上清液至无菌的 2 mL 离心管;
- 5) 沉淀中加入 300 µL 新鲜裂解液, 重复上述(2) ~ (4)步, 收集上清液。

#### 1.2 核酸收集

- 1) 收集的上清液加入 260 µL 乙酸铵 (10 mM), 混匀, 在冰上孵育 5 min;
- 2) 使用高速离心机于 4 °C, 16,000 × g 离心 10 min;
- 3) 吸取上清液到 2 个 1.5 mL 无菌离心管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 在冰上孵育 30 min;
- 4) 使用高速离心机于 4 °C, 16,000 × g 离心 15 min, 使用移液枪去除上清液, 沉淀物 (核酸) 使用 70% 乙醇溶液清洗并放置在真空条件下干燥 3 min;

- 5) 核酸沉淀使用 100  $\mu$ L TE 缓冲液 (Tris-EDTA) 重新溶解, 合并提取的核酸溶液样品。

### 1.3 DNA 纯化

- 1) 核酸溶液样品中加入 2  $\mu$ L RNA 酶溶液 (10 mg/ml, 无 DNA 酶), 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min;
- 2) 样品中加入 15  $\mu$ L 蛋白酶 K 和 AL 缓冲液 (QIAamp DNA Stool Mini Kit), 混匀, 于 70  $^{\circ}$ C 孵育 10 min;
- 3) 样品中加入 200  $\mu$ L 乙醇, 混匀, 转移至 QIAamp 柱, 使用高速离心机于 16,000  $\times g$  离心 1 min;
- 4) 弃收集管中的液体, 在 QIAamp 柱中加入 500  $\mu$ L AW1 缓冲液 (Qiagen), 室温下于 16,000  $\times g$  离心 1 min;
- 5) 弃收集管中的液体, 在 QIAamp 柱中加入 500  $\mu$ L AW2 缓冲液 (Qiagen), 室温下于 16,000  $\times g$  离心 1 min;
- 6) 弃收集管中的液体, 将 QIAamp 柱在室温下于 16,000  $\times g$  离心 1 min 去除残留液体;
- 7) 在 QIAamp 柱中加入 200  $\mu$ L AE 缓冲液 (Qiagen), 室温孵育 2 min。室温下于 16,000  $\times g$  离心 1 min 收集 DNA 溶液。

## 2. DNA 浓度和纯度鉴定

使用 NanoDrop 1000 超微量分光光度计 (Nyxor biotech, Paris, France)测定提取的 DNA 样品浓度及纯度, 取 2  $\mu$ L DNA 溶液进行凝胶电泳检验 DNA 质量, DNA 溶液 -20  $^{\circ}$ C 保存待测序。

## 3. PCR 扩增

扩增前, 每个样品都将合成一组特异的由 8 个核苷酸组成的 barcodes 序列, 用于区分不同的样品。瘤胃原虫 18S rRNA 扩增引物使用 316f (GCTTTCGWTGGTAGTGTATT)和 539r (CTTGCCCTCYAATCGTWCT)。PCR 扩增后, PCR 产物使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, Germany)纯化回收。

## 4. 瘤胃原虫 18S rRNA 基因文库构建

- 4.1 在剪切酶的作用下, 先将 18S rRNA 基因片段化;
- 4.2 然后对基因片段进行末端补平并磷酸化, 在 3'端加碱基 A;

4.3 连接“Y”形接头；

4.4 对 DNA 进行片段选择，使用磁珠筛选，去除接头自连片段；

4.5 使用 NaOH 将双链 DNA 片段变性为单链 DNA 片段；

4.6 利用 PCR 扩增进行文库模版的富集；

4.7 再次进行片段选择，纯化文库备用。

## 5. Illumina 平台的 Miseq 双末端测序

使用 Illumina MiSeq PE 300 平台测序。具体流程如下：

5.1 DNA 片段的一端与引物碱基互补，固定在芯片上；

5.2 另一端随机与附近的另外一个引物互补，也被固定住，形成“桥 (bridge)”；

5.3 PCR 扩增，产生 DNA 簇；

5.4 DNA 扩增子线性化成为单链；

5.5 加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，每次循环只合成一个碱基；

5.6 用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类；

5.7 将“荧光基团”和“终止基团”化学切割，恢复 3'端粘性，继续聚合第二个核苷酸；

5.8 统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段的序列。

## 6. 数据处理

下机数据原始格式为 Fastq 格式，使用 QIIME 软件 (Version 1.9.0, <http://qiime.org>) 筛选后得到高质量序列，使用 UPARSE 软件 (Version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>) (Edgar, 2013)，根据 97%的相似度对序列进行归并为可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)后进行聚类分析，在聚类分析过程中去除嵌合体，得到 OTU 代表序列。利用 RDP Classifier 软件 (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释，对比 Silva 数据库 (Version 11.9, <https://www.arb-silva.de>) (Lin, 2019 and Wallace, 2019)。获得相对丰度信息表后，进行后续统计分析。群落多样性指标包括 Alpha 多样性指数 (Chao、ACE、Shannon、Simpson 指数)，Beta 多样性指数 (bray curtis、Unifrac 距离等)，多元统计分析 (寻找组间具有显著差异的物种，比较组内差异和组间差异的大小)。

## 溶液配方

### 1. 细胞裂解液

溶液含有 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA 和 4% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 使用无菌无酶水配制, 调整 pH 至 8.0。

### 2. 10 mM 乙酸铵溶液

称取 0.77 g 乙酸铵, 加蒸馏水溶解, 转移至 1,000 mL 容量瓶, 定容至刻度, 混合均匀, 过滤除菌。

## 致谢

1. 感谢国家自然科学基金 (30771567) 对本实验的支持。
2. 王梦芝, 蔡缪荧, 史成林, 张柏松, 郝志敏, 王洪荣. ITS1 rDNA 序列用于瘤胃原虫研究可行性的探讨 [J]. 饲料工业, 2010 (S2): 109-116.
3. 王梦芝. 山羊瘤胃原虫与细菌吞噬关系和微生物 AA 变化机制的研究[D]. 扬州大学, 2008.
4. 感谢扬州大学动物科学与技术学院王梦芝所做的研究工作, 对本实验提供了很大的帮助。

## 参考文献

1. Yu, Z. and Morrison, M. (2004). [Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples](#). *Biotechniques* 36(5): 808-812.
2. Edgar, R. C. (2013). [UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads](#). *Nat Methods* 10(10): 996-998.
3. Lin, L., Xie, F., Sun, D., Liu, J., Zhu, W. and Mao, S. (2019). [Ruminal microbiome-host crosstalk stimulates the development of the ruminal epithelium in a lamb model](#). *Microbiome* 7(1): 83.
4. Wallace, R. J., Sasson, G., Garnsworthy, P. C., Tapio, I., Gregson, E., Bani, P., Huhtanen, P., Bayat, A. R., Strozzi, F., Biscarini, F., Snelling, T. J., Saunders, N., Potterton, S. L., Craigon, J., Minuti, A., Trevisi, E., Callegari, M. L., Cappelli, F. P., Cabezas-Garcia, E. H., Vilkkilä, J., Pinares-Patino, C., Fliegerova, K. O., Mrazek, J., Sechovcova, H., Kopečný, J., Bonin, A., Boyer, F., Taberlet, P., Kokou, F., Halperin, E., Williams, J. L., Shingfield, K. J. and Mizrahi, I. (2019). [A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions](#). *Sci Adv* 5(7): eaav8391.