

基于 DNA 宏条形码的水体浮游细菌群落测序建库方法

Library construction for DNA metabarcoding of bacterioplankton communities in waters

肖鹏¹, 续子杰^{1,2}, 杨军^{1,*}

¹水生生态健康研究组, 城市环境与健康重点实验室, 福建省流域生态重点实验室, 中国科学院城市环境研究所, 厦门, 福建; ²中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: jyang@iue.ac.cn

摘要: 浮游细菌是水生态系统的重要组成部分, 利用 DNA 分子手段可对水体环境样品中的浮游细菌种类、丰度、多样性与群落组成进行检测。本方法基于水体环境样品的总基因组 DNA, 或者提取总 RNA 后逆转录的 cDNA, 选择合适的标记基因 (主要是 16S rRNA 基因的可变区) 进行 PCR 扩增, 将扩增产物构建测序文库, 最后利用 Illumina 高通量测序技术进行测序的方法。该方法可以快速、高效、大量地获取水体环境中浮游细菌的标记基因序列, 后续再通过比对数据库, 确定这些序列对应的分类单元信息, 进而进行浮游细菌群落分析。

关键词: 水体环境, 浮游细菌, 群落组成, 建库, 高通量测序

材料与试剂

1. DNA 提取试剂盒 (MP Biomedicals, FastDNA Spin Kit)
2. 高保真 PCR 酶试剂 (New England Biolabs, Phusion High-Fidelity PCR Master Mix)
3. 96 孔板和封板膜 (Roche, LightCycler 480 Multiwell Plate 96)
4. 电泳上样缓冲液 Loading buffer (Takara, 6xLoading Buffer, Cat. No. 9156)
5. 琼脂糖粉末 (Sigma, A9539-250G)
6. TAE 溶液 (Solarbio, 50xTAE)
7. DNA Marker (New England Biolabs, 50bp DNA Ladder, NEB #B7025)
8. 凝胶纯化试剂盒 (南京诺唯赞, DC301-01)
9. Qubit 分子定量试剂盒 (Promega, QuantiFlour dsDNA System)

仪器设备

1. 移液器 (Eppendorf, 100–1000 μL , 10–100 μL 20–200 μL , 2–20 μL , 0.5–10 μL , 0.1–2.5 μL)
2. 均质仪 (杭州奥盛, Bioprep-24)
3. 离心机 (Eppendorf, 5417R)
4. 干式加热器 (Labnet, D1100-230V)
5. 超净工作台 (苏净安泰, Airtech)
6. 漩涡混合器 (海门其林贝尔, Vortex-6)
7. 200 μL 八联移液器 (Brand, 10-200 μL)
8. 96 孔板离心机 (杭州奥盛, Mini-P25)
9. PCR 热循环仪 (Bio-Rad, S1000)
10. 电泳仪 (北京六一, DYY6C)
11. 电泳槽 (北京六一, JYCP31DN)
12. 凝胶成像仪 (上海培清, JS-680B)
13. 核酸测定仪 (ThermoFisher, Qubit 4.0)
14. 其他 (移液器吸头、离心管)

实验步骤

1. 水体环境样品 DNA 提取

1.1 将超净工作台用 75%酒精擦拭干净, 再使用紫外灯灭菌 20 分钟, 将小剪刀和镊子放在酒精灯上反复灼烧灭菌后冷却至室温, 用镊子夹住滤膜 (提前过滤富集好浮游细菌), 使用剪刀将载有浮游细菌的滤膜剪成小碎片后, 全部装入 DNA 提取试剂盒的细胞破碎管中。严格参考 DNA 提取试剂盒中的步骤进行滤膜全基因组 DNA 提取 (中间会使用均质仪)。材料与试剂中的 DNA 提取试剂盒供参考, 也可使用其他品牌的试剂盒。

1.2 使用 60 μL 的无菌 TE 溶液对 DNA 进行洗脱, 提取的 DNA 样品浓度用超微量紫外分光光度计测定其含量和纯度, 然后将提取的 DNA 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。注意: 装 DNA 的离心管必须仔细标记样品 ID、滤膜粒径、过滤水样体积和采集时间, 每条信息至少标记两遍。

2. 浮游细菌的 PCR 扩增

2.1 将提取好的环境样品 DNA（细菌 DNA）进行分组建库，30 个样品建一个库，提前记录在实验记录本上。

2.2 根据自己的实验需要，选择合适的 16S rRNA 基因通用引物，本文中以常用的 16S rDNA V3–V4 引物 341F 和 806R 为例进行介绍。预先合成带有 barcode 信息的引物序列。其中 6 bp 长的 barcode 序列分布在两条引物的 5'端。本研究中一共需要 6 条带不同 barcode 的正向引物和 6 条带不同 barcode 的反向引物，具体的 barcode 序列见表 1。

表 1. 浮游细菌群落建库测序中所用的引物序列信息，以 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区为例

引物名称	Barcode 序列	引物序列
341F_B1	ACAGTG	CCTAYGGGRBGCASCAG
341F_B2	ATCACG	CCTAYGGGRBGCASCAG
341F_B3	CGATGT	CCTAYGGGRBGCASCAG
341F_B4	GCCAAT	CCTAYGGGRBGCASCAG
341F_B5	TGACCA	CCTAYGGGRBGCASCAG
341F_B6	TTAGGC	CCTAYGGGRBGCASCAG
806R_B1	CAGATC	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
806R_B2	GATCAG	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
806R_B3	AGTTCC	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
806R_B4	GTAGAG	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
806R_B5	ATGAGC	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
806R_B6	CACGAT	GGACTACNVGGGTWTCTAAT

2.3 先将合成好的引物放入离心机中，14000 g 离心 3 分钟，在超净工作台中将 PCR 引物用无菌去离子水稀释到 10 μM 的浓度（超净台应提前按步骤 1 中的方法灭菌），使用 1.5 mL 无菌离心管，将正反引物分别取 30 μL 混合在一起，并将混合好的引物对编号。具体编号原则见表 2，由于本研究中一个库仅包括 30 个样品，这里仅混合前 30 对引物，后 6 对引物备用。

78 表 2. 不同组合引物对的编号

引物对编号	引物组合	引物对编号	引物组合
16S1	341F_B1+806R_B1	16S19	341F_B4+806R_B1
16S2	341F_B1+806R_B2	16S20	341F_B4+806R_B2
16S3	341F_B1+806R_B3	16S21	341F_B4+806R_B3
16S4	341F_B1+806R_B4	16S22	341F_B4+806R_B4
16S5	341F_B1+806R_B5	16S23	341F_B4+806R_B5
16S6	341F_B1+806R_B6	16S24	341F_B4+806R_B6
16S7	341F_B2+806R_B1	16S25	341F_B5+806R_B1
16S8	341F_B2+806R_B2	16S26	341F_B5+806R_B2
16S9	341F_B2+806R_B3	16S27	341F_B5+806R_B3
16S10	341F_B2+806R_B4	16S28	341F_B5+806R_B4
16S11	341F_B2+806R_B5	16S29	341F_B5+806R_B5
16S12	341F_B2+806R_B6	16S30	341F_B5+806R_B6
16S13	341F_B3+806R_B1	16S31	341F_B6+806R_B1
16S14	341F_B3+806R_B2	16S32	341F_B6+806R_B2
16S15	341F_B3+806R_B3	16S33	341F_B6+806R_B3
16S16	341F_B3+806R_B4	16S34	341F_B6+806R_B4
16S17	341F_B3+806R_B5	16S35	341F_B6+806R_B5
16S18	341F_B3+806R_B6	16S36	341F_B6+806R_B6

79

80 2.4 在超净工作台中配制 PCR 反应试剂,按 PCR 高保真酶的要求,加入适量的酶、

81 缓冲液、dNTP、和无菌去离子水,反应试剂总量按 100 个反应量配制,先不加

82 引物和 DNA 模板,使用漩涡震荡仪进行混匀后,14000 g 离心 2 分钟。

83 2.5 在超净工作台中取出无菌的 96 孔 PCR 板,放入合适的 96 孔板冰盒中,在 96

84 孔板的第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列的每个孔中分别加入 54 μ L 上述步

85 骤配制好的 PCR 反应试剂。

86 2.6 在超净工作台中分别将步骤 2.3 中混合好的 30 对引物依次加入到 96 孔板中,

87 每个引物对加入 3 μ L,具体加入的位置见图 1。其中 NG 代表阴性对照,任选

88 6 对引物对,6 个孔中每个孔加入 1 μ L,并在实验记录本上做好记录,下一次

89 PCR 时更换没测试过的 6 对阴性引物对。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1			7			13			19		
B	2			8			14			20		
C	3			9			15			21		
D	4			10			16			22		
E	5			11			17			23		
F	6			12			18			24		
G	25			27			29			NG	NG	NG
H	26			28			30			NG	NG	NG

图 1.30 对引物加入的位置图（其中数字序号 1–30 代表第 1 到第 30 组混合引物）

2.7 在超净工作台中将 2.1 中提前分组的 30 个样品 DNA 模板分别加入 96 孔板序号 1–30 的孔中，每个孔中加入 3 μ L，注意 NG 孔中不要加入任何 DNA 模板。

2.8 在超净工作台中使用 200 μ L 八联移液器，量程设置为 50 μ L，选择“mix”模式，分别对 96 孔板中第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列（前 6 个孔）进行吹打混匀，吹打次数不少于 10 次，将移液器吸头放到液面以下，尽量避免生成气泡。用八联移液器分别从第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列（前 6 个孔）中吸取 20 μ L 反应液到第 2–3 列、第 5–6 列、第 8–9 列和第 11–12 列，贴上 96 孔板封板膜，用硬纸片将封板膜与 96 孔板压紧，贴牢，再使用 96 孔板离心机离心 5 分钟。

2.9 将离心后的 96 孔板放入 PCR 仪中，设置反应条件进行 PCR 扩增。PCR 条件主要依据所使用的 Taq 酶、产物长度、引物退火温度以及 DNA 模板浓度来决定。本示例中的 PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 5 分钟后，进行 25–30 个循环（循环数依据 DNA 模板的浓度来决定，不宜超过 30 次，防止非特异性扩增）。包括 95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟后降温到 4 $^{\circ}$ C，PCR 反应完成。

3. PCR 结果电泳检测

3.1 将 PCR 反应后的 96 孔板使用 96 孔板离心机离心 5 分钟，去掉封板膜。

3.2 使用八联移液器，分别将第 2–3 列、第 5–6 列、第 8–9 列和第 11–12（前 6 排孔）的样品分别转移回第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列（前 6 个孔）中。

3.3 分别往 96 孔板第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列（前 6 个孔）中加入 10 μ L 的 loading buffer 染料，分别混合均匀。最后 6 个阴性对照孔中分别加入 4 μ L 的 loading buffer，分别混合均匀。

3.4 使用 1 \times TAE 溶液和琼脂糖粉末，配置 2%质量体积比的琼脂糖凝胶，配置时，初始 TAE 溶液可以适量加多一点，防止微波加热蒸发损失。例如，2.8 g 琼脂糖粉末加入到 150 mL 1 \times TAE 溶液中，混合均匀后，微波炉中火加热 10 分钟，待琼脂糖完全溶化后加入 10 μ L 电泳染料，选择合适的制胶梳子制作成琼脂糖凝胶，确保凝胶中每个孔至少可以容纳 50 μ L PCR 产物。

3.5 待琼脂糖凝胶完成凝固后，将其放置于装有 1 \times TAE 溶液的电泳槽中，凝胶需要完全浸泡在 TAE 溶液中。分别将 50 μ L 加好 loading buffer 的 PCR 产物加入凝胶孔中，每加好一个样品要间隔一个孔，凝胶上每一排最后一个孔需要加入 10 μ L 的 DNA Marker。最后将 6 个阴性对照样品全部加入凝胶孔中，每个对照之间要间隔一个孔。选择 80 V、100 mA 的电泳条件电泳 30 分钟。

3.6 将电泳完毕的凝胶放置于凝胶成像仪中，调整光圈和焦距以及凝胶的位置，检查 6 个阴性对照中是否存在目标条带，若任一阴性样品有条带则丢弃凝胶，必须分析细菌污染原因、回顾实验过程，优化改进后重新进行 PCR。若 6 个阴性样品全都没有条带，再基于 DNA Marker 检查 30 个样品的 PCR 产物是否有目标条带，如果全部 30 个样品都有单一、清晰的目标条带，则继续后续实验；若有部分样品无条带或有杂带则该样品需要重新 PCR。

4. PCR 目标条带回收纯化

4.1 用 75%酒精棉球擦拭切胶刀片后，在凝胶成像仪中将 30 个样品的目标条带小心地切下来，每切完一个样品要重新用棉球擦拭，放置于 2 mL 无菌离心管中。

4.2 严格按照“凝胶纯化试剂盒”参考手册中的步骤进行凝胶纯化，最终纯化 DNA 的洗脱体积为 20 μ L，在最终的离心管上写明样品编号信息，做好双重标记，放置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存或直接进行后续浓度测定。

5. 纯化 DNA 浓度测定及混库

5.1 按照 Qubit 分子定量试剂盒参考手册中的步骤进行染料配制，一个样品需要配制染料溶液 200 μL ，一般按样品总需求量的 110%比例配制。

5.2 将 200 μL 配制好的染料加入到 650 μL 的小离心管中，离心管盖和管壁上都标上相应的样品编号，在相应的离心管中加入 2 μL 纯化好的 PCR 产物 DNA，漩涡震荡混匀后，10000 g 离心 2 分钟。

5.3 将 Qubit 分子定量试剂盒中 100 ng/ μL 的 DNA 标准品用无菌去离子水稀释到 50、25、10 和 5 ng/ μL ，再分别将 2 μL 稀释好的 DNA 标准品加入不同的 20 μL 染料工作液中。Qubit 核酸测定仪的 DNA 浓度标曲是两点定标法，即只需要加入 1 个空白（不加 DNA 的染料工作液）和 1 个最高浓度标准品，由于不确定样品纯化后的 DNA 浓度，所以可以先用 50 ng/ μL 浓度标准品做标曲，随机测定几个样品，根据结果调整高浓度标曲的浓度再重新做标曲。

5.4 测定完一个库的 30 个样品的 DNA 浓度之后，计算最高浓度和最低浓度之间的差异倍数，若差异倍数小于 10，则进行后续混库；若差异倍数大于 10，需要将相应低浓度的样品重新进行 PCR 扩增与纯化后，再定量。混库标准为：每个样品的 DNA 总量=最低浓度样品的 DNA 浓度 \times 其样品体积（按 14 μL 算）。然后浓度最低样品的混库体积为 14 μL ，剩余样品的混库体积为 DNA 总量 \div 样品的 DNA 浓度，将所有样品按上述计算的体积加入到一个新的无菌 1.5 mL 离心管中，在离心管盖和离心管壁上做好双重标记。

6. DNA 测序策略

6.1 根据 PCR 产物（目标 DNA 片段）的大小，选择合适的测序策略进行高通量测序。如果 DNA 片段全长小于 280 bp，建议选用二代 Illumina PE150 测序，如果 DNA 片段大于 280 bp、小于 480 bp，建议选用二代 Illumina PE250 测序，如果 DNA 片段大于 480 bp 小于 580 bp，建议选用二代 Illumina PE300 测序，如果 PCR 产物大小 580 bp，建议选用三代 PacBio 测序。

致谢

本研究获得国家自然科学基金（91851104，31672312）以及科技部国家科技基础资源

167 调查专项（2017FY100300）的资助。

168 **参考文献**

- 169 1. Liu, M., Liu, L. M., Chen, H. H. Yu, Z., Yang, J. R., Xue, Y. Y., Huang, B. Q. and
170 Yang, J. (2019). [Community dynamics of free-living and particle-attached bacteria](#)
171 [following a reservoir. Microcystis bloom. Sci Total Environ](#) 660: 501–511.
- 172 2. Liu, L. M., Yang, J., Yu, Z. and Wilkinson, D. M. (2015). [The biogeography of](#)
173 [abundant and rare bacterioplankton in the lakes and reservoirs of China. ISME J](#)
174 9: 2068–2077.

175

176