

# 基于 DNA 宏条形码的水体微型真核生物群落测序建库方法

## Library construction for DNA metabarcoding of microeukaryotic communities in waters

莫媛媛<sup>1,2</sup>, 马国琳<sup>1,3</sup>, 薛媛媛<sup>1</sup>, 杨军<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 水生态健康研究组, 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; <sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京; <sup>3</sup> 福建农林大学, 福州, 福建

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

**摘要:** 微型真核生物是水生生态系统的重要组成部分, 具有极高的物种多样性, 在生物地球化学循环中发挥关键作用。高通量测序技术的发展和有助于我们对微型真核生物的研究和认知。为了研究水体微型真核生物多样性和群落特征, 我们可以从水体环境(海洋、河流、湖泊、水库等) 中采集样品, 提取样品总 DNA 进行文库构建及相关检测。首先以总 DNA 为模板, 选择合适的标记基因 (主要是 18S rRNA 基因的片段) 进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物通过电泳、胶回收得到纯化的目的 DNA 片段, 并测定 DNA 浓度, 最后按照等质量方式进行混样, 通常 30 份样品混为 1 个库, 检测合格的文库采用高通量测序平台 (如 Illumina HiSeq) 进行测序。

**关键词:** 微型真核生物, DNA 条形码, 环境 DNA, 建库方法, 高通量

### 材料与试剂

1. 聚碳酸酯滤膜 (Millipore, TSTP04700/ GTTP04700)
2. DNA 提取试剂盒 (MP Biomedicals, FastDNA Spin Kit)
3. 高保真 PCR 酶试剂 (New England Biolabs, Phusion High-Fidelity PCR Master Mix)
4. 18S rRNA 基因通用引物, 例如: 1) V9 可变区引物 1380F (5'-CCCTGCCHTTTGTACACAC-3') 和引物 1510R (5'-CCTTCYGCAGGTTTCACCTAC-3'); 2) V4 可变区引物 547F (5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3') 和引物 967R (5'-ACTTTTCGTTCTTGAT-3') 或引物 Ek-NSF573F (5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCA-3') 和引物 Ek-NSR951R (5'-TTGGYRAATGCTTTTCGC-3')

- 31 5. 96 孔板和封板膜 (Roche, LightCycler 480 Multiwell Plate 96)
- 32 6. 上样缓冲液 Loading buffer (Takara, 6xLoading Buffer, Cat. No. 9156)
- 33 7. 琼脂糖粉末 (Sigma, A9539-250G)
- 34 8. Tris-乙酸盐-EDTA 缓冲液 (Solarbio, 50xTAE)
- 35 9. DNA 标记 (DNA Marker) (New England Biolabs, 50bp DNA Ladder, NEB #B7025)
- 36 10. 凝胶纯化试剂盒 (南京诺唯赞, DC301-01)
- 37 11. Qubit 分子定量试剂盒 (Promega, QuantiFlour dsDNA System)

## 38 仪器设备

- 39 1. 200  $\mu\text{m}$  尼龙筛绢 (绍兴华丰, 80 目)
- 40 2. 过滤装置及配套玻璃滤杯、滤芯 (天津津腾, JTFA0214)
- 41 3. 真空泵 (上海亚荣, SHZ-III)
- 42 4. 高压灭菌锅 (TOMY, Sx-500)
- 43 5. 5 L 量杯
- 44 6. 500 mL 量筒
- 45 7. 超低温冰箱 (Thermo, ULT1386-5v)
- 46 8. 移液器 (Eppendorf, 100–1000  $\mu\text{L}$ , 10–100  $\mu\text{L}$  20–200  $\mu\text{L}$ , 2–20  $\mu\text{L}$ , 0.5–10  $\mu\text{L}$ ,
- 47 0.1–2.5  $\mu\text{L}$ )
- 48 9. 超净工作台 (苏净安泰, Airtech)
- 49 10. 均质仪 (杭州奥盛, Bioprep-24)
- 50 11. 离心机 (Eppendorf, 5417R)
- 51 12. 超微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000)
- 52 13. 干式加热器 (Labnet, D1100-230V)
- 53 14. 旋涡混合器 (海门其林贝尔, Vortex-6)
- 54 15. 200  $\mu\text{L}$  八联移液器 (Brand, 10-200  $\mu\text{L}$ )
- 55 16. 96 孔板离心机 (杭州奥盛, Mini-P25)
- 56 17. PCR 热循环仪 (Bio-Rad, S1000)
- 57 18. 电泳仪 (北京六一, DYY6C)
- 58 19. 电泳槽 (北京六一, JYCP31DN)

- 59 20. 凝胶成像仪 (上海培清, JS-680B)
- 60 21. 核酸测定仪 (ThermoFisher, Qubit 4.0)
- 61 22. 其他 (聚乙烯塑料桶、铝箔纸、移液器吸头、离心管、剪刀、镊子、酒精灯、烧杯)

## 62 实验步骤

### 63 1. 样品采集、过滤与保存

#### 64 1.1 样点设置及采样

65 依据研究目的布设采样站位，水深大于 10 m 的水体应考虑分层采样。首先使用  
66 原位水样润洗 3 次聚乙烯塑料桶，每个样点至少采集 10 L 水样，并灌装至预先  
67 写好样品编号的聚乙烯塑料桶。采集的水样在 1 h 内运回实验室进行处理。

#### 68 1.2 过滤

69 1) 过滤前准备：将保存样品的 2 mL 离心管置于高压灭菌锅灭菌 (121 °C, 30  
70 min) 后，使用烘箱 (60 °C) 彻底烘干；用超纯水清洗干净滤杯、滤芯、量杯、  
71 量筒和抽滤瓶。

72 2) 安装过滤装置：组装好过滤装置、抽滤瓶和真空泵，使用灭菌后镊子将孔径为  
73 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜 (直径 47 mm, Millipore, 美国) 置于滤芯之上，用  
74 配套滤杯压住滤膜边缘后再用配套夹子夹紧固定滤杯，确保滤杯与滤芯接触  
75 面连接良好、不漏水，启动真空泵，负压为 0.02 Mpa。

76 3) 过滤水样：将聚乙烯塑料桶中的原水上下摇匀，并用原水润洗量杯和量筒后，  
77 使用 200 μm 尼龙筛绢过滤至量杯，接着用量筒少量、多次形式添加水样到滤  
78 杯，一般每次加样 50–400 mL，过滤总时间至少为 30 min，每次更换不同样  
79 品的水样进行过滤前必须重新用超纯水清洗滤杯、滤芯、量杯和量筒，再用待  
80 过滤样品的原水润洗，避免样品之间出现交叉污染。

#### 81 1.3 样品保存

82 过滤完成后，将载有微型真核生物的滤膜放在尺寸适宜的铝箔纸上，并对折保  
83 存至已灭菌的 2 mL 离心管，置于–80 °C 的冰箱。

### 84 2. 水体样品 DNA 提取

#### 85 2.1 剪膜

- 1) 准备实验工具并置于无菌操作台内，例如剪刀、镊子、酒精灯、装有浓度为 75%酒精的洗瓶、一次性手套、铝箔纸、废品缸。打开紫外灯灭菌 15 min。  
*注：灭菌时，勿将样品放入操作台内，因为紫外光会破坏 DNA 从而影响后续实验。*
- 2) 灭菌完成后，打开玻璃窗，打开吹风按钮，以去除臭氧。  
*注：玻璃窗口不可打开过大，以免空气进入污染操作台。*
- 3) 从超低温冰箱取出样品，核对样品编号后移入超净工作台，用 75%酒精消毒双手（戴手套）。
- 4) 点燃酒精灯，灼烧镊子和剪刀，晾凉备用。  
*注：喷洒酒精进行清洁、消毒操作，必须在酒精灯未点燃的情况下进行。*
- 5) 用镊子将离心管中载有微型真核生物的滤膜样品取出并使用剪刀将其剪碎，装入 DNA 提取试剂盒专用的裂解管 E (Lysing Matrix E) 中，并写上对应的编号。
- 6) 灼烧镊子和剪刀，重复上述过程，进行下一份样品滤膜处理。
- 7) 剪膜完成后按编号顺序暂置于冰箱-20 °C 保存，以备后续 DNA 提取。

2.2 DNA 提取：根据实验需求，选择合适的 DNA 提取试剂盒，以试剂盒 FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 为例。根据试剂盒的说明书按步骤提取水体微型真核生物 DNA，具体操作步骤如下：

- 1) 在已灭菌的超净工作台中将 978  $\mu$ L 磷酸钠缓冲液 (Sodium Phosphate Buffer) 和 122  $\mu$ L MT 缓冲液 (MT Buffer) 加入至裂解管 E 中；
- 2) 利用均质仪震荡混匀，时间 40 s，转速 6 m/s；
- 3) 将裂解管 E 中的样品进行 14000 g 离心 10 min；
- 4) 将裂解管 E 中上清液完全转移至新的 2 mL 灭菌离心管中，然后加入 250  $\mu$ L PPS 溶液，手动上下颠倒 10 次混匀；
- 5) 14000 g 离心 5 min 至形成沉淀，将上清液完全转移至新的 5 mL 灭菌离心管中，同时加入 1 mL 结合基质悬浮液 (Binding Matrix Suspension)。  
*注：结合基质悬浮液使用过程中应确保充分地上下混匀。*
- 6) 手动上下翻转 2 min，使 DNA 附着在基质上，将离心管水平地于架子上静置 3 min。

- 7) 小心去除 500  $\mu\text{L}$  上清液，用移液器吸打混匀剩余的部分，转移大约 600  $\mu\text{L}$  的混合液到吸附柱中，14000  $g$  离心 1 min，倒出收集管中的液体。重复上述过程直至剩余的混合液全部转移完。
- 8) 加入 500  $\mu\text{L}$  SWWS-M 溶液到吸附柱中，14000  $g$  离心 1 min，倒出收集管中的液体，再用 14000  $g$  离心 2 min，去除基质中的 SWWS-M 溶液。
- 9) 将吸附柱转移到新的收集管中，室温下风干 5 min。
- 10) 加入 60  $\mu\text{L}$  无核酸酶/无热原的超纯水 (DNase/Pyrogen-free water)，用移液器的吸头轻轻搅动或者用手指轻弹，使沉淀混合后，放入金属浴中 55  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min。
- 11) 14000  $g$  离心 2 min，将 DNA 转移到新的收集管中。

## 2.3 DNA 浓度测定及保存

提取的 DNA 样品浓度用超微量紫外分光光度计测定，一般要求浓度不低于 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。OD260 nm/OD280 nm 值应在 1.7–1.9 范围内，表示 DNA 纯度较高，数值过低表明蛋白质含量较多、过高表明样品中含有 RNA。最后将 DNA 样品置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 3. PCR 扩增

3.1 PCR 的反应体系根据 PCR 高保真酶说明书配置。PCR 反应条件主要取决于实验过程中使用的引物长度、Taq 酶、引物退火温度和 DNA 模板浓度。每份样品必须进行 3 次重复的 PCR 扩增，根据 PCR 产物浓度进行等量混样，充分混匀后使用 1 $\times$ TAE 质量百分浓度为 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物。具体步骤如下：

- 1) 将每个库 (一般包括 30 份样品) 进行编号，并做好实验记录。
- 2) 选择 18S rRNA 基因通用引物，本文以真核生物核糖体小亚基 DNA 序列的 V9 可变区引物 1380F (5'-CCCTGCCHTTTGTACACAC-3') 和 1510R (5'-CCTTCYGCAGGTTACCTAC-3') 为例进行 PCR 扩增 (Amaral-Zettler 等., 2009)。为了区别每个库中的 30 份样品，需合成 6 条携带不同 barcode 的 1380F 和 6 条携带不同 barcode 的 1510R，并分别连接于引物的 5' 端，最后可两两配对得到 36 对不同的引物对。存放于  $-40^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。Barcode 详细信息可参考如下表 1。

表 1. 微型真核生物群落建库中所用的引物序列信息，以 18S rRNA 基因 V9 区为例

引物名称	Barcode 序列	引物序列
1380F_B1	CGATGT	CCCTGCCHTTTGTACACAC
1380F_B2	ATCACG	CCCTGCCHTTTGTACACAC
1380F_B3	TGACCA	CCCTGCCHTTTGTACACAC
1380F_B4	ACAGTG	CCCTGCCHTTTGTACACAC
1380F_B5	GCCAAT	CCCTGCCHTTTGTACACAC
1380F_B6	TTAGGC	CCCTGCCHTTTGTACACAC
1510R_B1	ACTGAG	CCTTCYGCAGGTTACCTAC
1510R_B2	AGTAGA	CCTTCYGCAGGTTACCTAC
1510R_B3	CAACGT	CCTTCYGCAGGTTACCTAC
1510R_B4	GAGATT	CCTTCYGCAGGTTACCTAC
1510R_B5	GTCTAT	CCTTCYGCAGGTTACCTAC
1510R_B6	GTCTCG	CCTTCYGCAGGTTACCTAC

3) 将存放于-40 °C 冰箱的 PCR 引物取出，置于离心机进行离心，条件为 14 000 g 离心 3 min。在已灭菌的超净工作台中，用无菌去离子水稀释正向、反向引物至 10 μM/μL 浓度，并将正反引物分别用移液器取出 20-30 μL (视实验需求而定) 混于 1.5 mL 无菌离心管中，标上编号，最后移至离心机中进行短暂离心使正反引物混匀。需注意的是，此操作仅混前 30 对引物，后 6 对引物 (灰色字体) 为备用 (详见表 2)。

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
18S1	1380F_B1+1510R_B1	18S19	1380F_B4+1510R_B1
18S2	1380F_B1+1510R_B2	18S20	1380F_B4+1510R_B2
18S3	1380F_B1+1510R_B3	18S21	1380F_B4+1510R_B3
18S4	1380F_B1+1510R_B4	18S22	1380F_B4+1510R_B4
18S5	1380F_B1+1510R_B5	18S23	1380F_B4+1510R_B5
18S6	1380F_B1+1510R_B6	18S24	1380F_B4+1510R_B6

18S7	1380F_B2+1510R_B1	18S25	1380F_B5+1510R_B1
18S8	1380F_B2+1510R_B2	18S26	1380F_B5+1510R_B2
18S9	1380F_B2+1510R_B3	18S27	1380F_B5+1510R_B3
18S10	1380F_B2+1510R_B4	18S28	1380F_B5+1510R_B4
18S11	1380F_B2+1510R_B5	18S29	1380F_B5+1510R_B5
18S12	1380F_B2+1510R_B6	18S30	1380F_B5+1510R_B6
18S13	1380F_B3+1510R_B1	18S31	1380F_B6+1510R_B1
18S14	1380F_B3+1510R_B2	18S32	1380F_B6+1510R_B2
18S15	1380F_B3+1510R_B3	18S33	1380F_B6+1510R_B3
18S16	1380F_B3+1510R_B4	18S34	1380F_B6+1510R_B4
18S17	1380F_B3+1510R_B5	18S35	1380F_B6+1510R_B5
18S18	1380F_B3+1510R_B6	18S36	1380F_B6+1510R_B6

4) 根据实际样品数 (每个库 30 份样品), 在超净工作台中配制适宜的 PCR 反应试剂, 基于 PCR 高保真酶说明书, 加入适量浓度为 1.25U/25 $\mu$ L 酶、2 mM/ $\mu$ L Mg<sup>2+</sup>缓冲液、0.2 mM/ $\mu$ L dNTP、无菌去离子水于已灭菌的 2 mL 离心管中配制反应体系, 切记勿加入引物和 DNA 模板。

5) 在灭菌超净工作台中, 将无菌 96 孔 PCR 板置于冰盒上, 接着分别将 54  $\mu$  L 反应试剂加至第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列的每个板孔中。之后分别将混合好的 30 对引物加入第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列的每个孔中, 每个引物对加入 3  $\mu$ L, 具体布板见图 1。接着分别将 DNA 模板加入第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列的每个板孔中, 每个 DNA 模板加入 3  $\mu$  L。其中 NG 为阴性对照, 从所有引物对中任选 6 对, 每个 NG 孔中分别加入 1  $\mu$ L, 并在实验记录本上做好记录, 以便后续 PCR 时更换其他引物对。



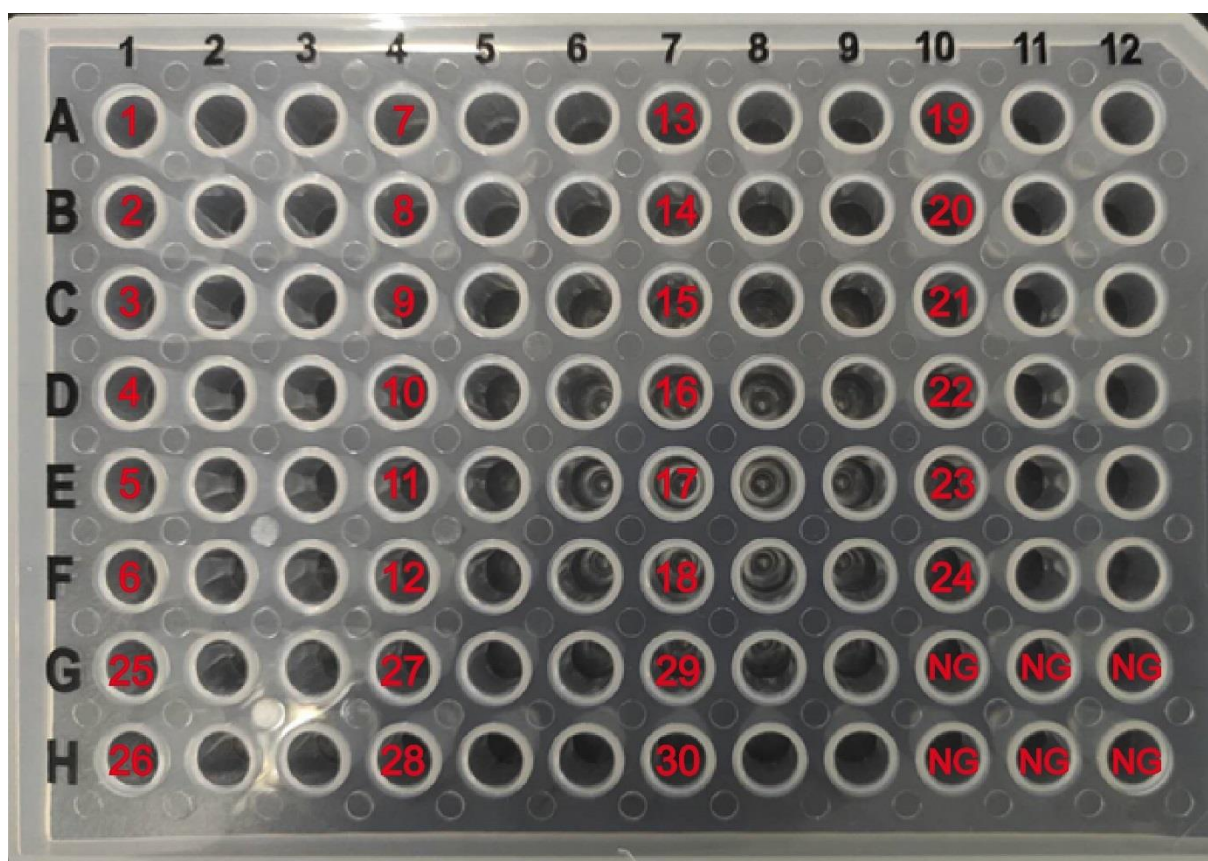


图 1.30 对引物对布板图 (数字序号 1—30 代表第 1 到第 30 组混合引物)

- 6) 使用 200  $\mu\text{L}$  八联移液器，量程设为 50  $\mu\text{L}$ ，调至“mix”模式，分别对 96 孔板中第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列进行吸打、混匀至少 10 次后，吸取 20  $\mu\text{L}$  反应体系到第 2–3 列、第 5–6 列、第 8–9 列和第 11–12 列，并贴上 96 孔板封板膜，用硬卡片将封板膜与 96 孔板紧贴，移至 96 孔板离心机离心 5 min。
- 7) 转至 PCR 热循环仪 (提前开机) 中，进行 PCR 扩增。可参考本文 PCR 反应条件：预变性 98  $^{\circ}\text{C}$ ，1 min；30 个循环为 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s、50  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s；最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

#### 4. 电泳

- 4.1 首先配置 1X TAE 溶液，接着使用 1X TAE 溶液和琼脂糖粉末，配置 2% 质量百分浓度的琼脂糖凝胶于烧杯中。将烧杯放入微波炉中，中火加热 9–12 min，琼脂糖完全溶化后立刻加入 10  $\mu\text{L}$  电泳染料，并轻轻摇动混匀，倒入制胶板，切勿产生气泡。最后，将其在常温下静置约 60 min，确保完全凝固。



4.2 待 PCR 扩增完成后，将 96 孔板置于 96 孔板离心机离心 5 min 后，去除封板膜。使用 200  $\mu$ L 八联移液器，分别将第 2–3 列、第 5–6 列、第 8–9 列和第 11–12 列的样品分别转移至第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列板孔中。

4.3 分别将 10  $\mu$ L 的上样缓冲液（loading buffer）染料加至 96 孔板第 1 列、第 4 列、第 7 列和第 10 列中，并混合均匀。其中 6 个阴性对照孔中分别加入 4  $\mu$ L 的上样缓冲液，并混合均匀。注意，这一操作过程需避光。

4.4 将制作的琼脂糖凝胶放置于装有 1X TAE 溶液的电泳槽中，并确保凝胶完全浸泡于溶液中。用 100  $\mu$ L 移液器将 PCR 产物加入凝胶孔中，每一排第一个或者最后一个孔加入 10  $\mu$ L 的 DNA 标记 (DNA Marker)。接着 6 个阴性对照应分别加入 6 个凝胶孔中。设置条件为 80 V、100 mA 电泳 30 min。

4.5 将完成电泳的凝胶放置于凝胶成像仪中，打开电源，并适当调整光圈和焦距以及凝胶的位置，观察 6 个阴性对照是否存在条带，若其中一个阴性对照样本出现清晰条带，则必须重新对全体样品进行 PCR 实验。反之，如果阴性对照没有发现条带，再以 DNA 标记为参照，观察 30 份样品的 PCR 产物是否有目标条带，若出现单一且清晰的目标条带，则 PCR 实验成功；若出现无条带或有杂带的样品，这些样品需要重新进行 PCR。

## 5. 纯化 PCR 目标条带

5.1 提前准备 2 mL 无菌离心管、并写上样品编号，接着用 75%酒精擦拭切胶刀片，在凝胶成像仪中将全部样品 (30 份) 的目标条带逐一切下来，尽量将全部能看见的亮带都切下来，减少人为操作上的误差。逐一放入 30 个 2 mL 无菌离心管。

5.2 根据纯化试剂盒说明书中的步骤，逐步完成。将纯化后的 DNA 装于 1.5 mL 灭菌离心管，并直接进行后续实验或者存放于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

## 6. 纯化 DNA 浓度测定及混库

6.1 基于 Qubit 分子定量试剂盒说明书中的步骤，每份样品配置染料 200  $\mu$ L。

6.2 准备 650  $\mu$ L 的离心管，并在管盖和管壁上写清楚样品信息，将配制好的 200  $\mu$ L 染料加入离心管中，并在每个离心管中加入 2  $\mu$ L 纯化的 PCR 产物 (DNA)，旋涡震荡混匀，10000 g 离心 2 min。

6.3 用无菌去离子水将 Qubit 分子定量试剂盒中的 100 ng/μL DNA 标准品稀释为 4 个浓度，即 50、25、10 和 5 ng/μL，再将已稀释的 2 μL DNA 标准品分别加入 4 个不同的 200 μL 染料中。制作 Qubit 核酸测定仪的 DNA 标曲，采用两点定标法，即加入 1 个空白 (不加 DNA 的染料) 和 1 个最高浓度标准品；因为纯化后的 DNA 浓度没有检测，所以选择 50 ng/μL 浓度标准品制作标曲，随机检测 5–7 份样品，根据得到的结果调整高浓度标准品的浓度再重新制作标曲。

6.4 提前在实验记录本上写好每个库的样品编号，每测一份样品，立刻记录其浓度。统计每个库中样品的最高浓度和最低浓度之间的差异倍数，若大于 5–10 倍，则需将低浓度的样品重新进行 PCR 扩增与纯化后再定量；若小于 5–10 倍，则可进行后续实验。

6.5 混库需满足条件为：每份样品的 DNA 总量=最低浓度样品的 DNA 浓度×其样品体积 (按 14 μL 计算)。即以浓度最低样品的混库体积 14 μL 为标准，计算其他样品的混库体积，具体计算方法为 DNA 总量÷样品的 DNA 浓度。最后用移液器将 30 份样品按上述计算得到的体积全部加入到一个无菌 1.5 mL 离心管中，并在管盖和管壁上写清楚样品信息和定量日期。

## 致谢

感谢国家自然科学基金(91851104)、福建省自然科学基金(2019J02016)、厦门市科技计划项目(3502Z20172024)的资助。

## 参考文献

1. Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W. and Huse, S. M. (2009). [A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes](#). *PLoS One* 4: e6372.
2. Xue, Y. Y., Chen, H. H., Yang J. R., Liu, M., Huang, B. Q. and Yang, J. (2018). [Distinct patterns and processes of abundant and rare eukaryotic plankton communities following a reservoir cyanobacterial bloom](#). *ISME J* 12: 2263–2277.