**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1, 2，马国琳1, 3，薛媛媛1，杨军1\*

1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；2中国科学院大学，北京; 3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应用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′-CCTTCYGCAGGTTCACCTAC-3′)；2) V4可变区引物547F (5′-CCAGCASCYGCGGTAATTCC-3′) 和引物967R (5′-ACTTTCGTTCTTGAT-3′) 或 引物Ek-NSF573F (5′-CGCGGTAATTCCAGCTCCA-3′) 和引物Ek-NSR951R (5′-TTGGYRAATGCTTTCGC-3′)
5. 96孔板和封板膜 (Roche, LightCycler 480 Multiwell Plate 96)
6. 上样缓冲液Loading buffer (Takara, 6×Loading Buffer, Cat. No. 9156)
7. 琼脂糖粉末 (Sigma, A9539-250G)
8. Tris-乙酸盐-EDTA缓冲液 (Solarbio, 50×TAE)
9. DNA标记 (DNA Marker) (New England Biolabs, 50bp DNA Ladder, NEB #B7025)
10. 凝胶纯化试剂盒 (南京诺唯赞, DC301-01)
11. Qubit分子定量试剂盒 (Promega, QuantiFlour dsDNA System)

**仪器设备**

1. 200 µm尼龙筛绢 (绍兴华丰, 80目)
2. 过滤装置及配套玻璃滤杯、滤芯 (天津津腾, JTFA0214)
3. 真空泵 (上海亚荣, SHZ-III)
4. 高压灭菌锅 (TOMY, Sx-500)
5. 5 L量杯
6. 500 mL量筒
7. 超低温冰箱 (Thermo, ULT1386-5v)
8. 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)
9. 超净工作台 (苏净安泰, Airtech)
10. 均质仪 (杭州奥盛, Bioprep-24)
11. 离心机 (Eppendorf, 5417R)
12. 超微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000)
13. 干式加热器 (Labnet, D1100-230V)
14. 旋涡混合器 (海门其林贝尔, Vortex-6)
15. 200 μL八联移液器 (Brand, 10-200 μL)
16. 96孔板离心机 (杭州奥盛, Mini-P25)
17. PCR热循环仪 (Bio-Rad, S1000)
18. 电泳仪 (北京六一, DYY6C)
19. 电泳槽 (北京六一, JYCP31DN)
20. 凝胶成像仪 (上海培清, JS-680B)
21. 核酸测定仪 (ThermoFisher, Qubit 4.0)
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)

**实验步骤**

1. 样品采集、过滤与保存
   1. 样点设置及采样

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。

* 1. 过滤

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 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、量筒和抽滤瓶。
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0.22 µm的聚碳酸酯滤膜 (直径47 mm，Millipore，美国) 置于滤芯之上，用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面连接良好、不漏水，启动真空泵，负压为0.02 Mpa。
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，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，再用待过滤样品的原水润洗，避免样品之间出现交叉污染。
   1. 样品保存

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，并对折保存至已灭菌的 2 mL离心管，置于–80 °C的冰箱。

1. 水体样品DNA提取
   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。*

* + 1. 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。*

* + 1. 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)。
    2. 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。*

* + 1. 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。
    2. 灼烧镊子和剪刀，重复上述过程，进行下一份样品滤膜处理。
    3. 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。
  1. 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 μL 磷酸钠缓冲液 (Sodium Phosphate Buffer) 和122 μL 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 μL 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 μL上清液，用移液器吸打混匀剩余的部分，转移大约600 μL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 μL 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 μL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 °C加热5 min。
     11. 14000 *g*离心2 min，将DNA转移到新的收集管中。
  2. 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 ng/μL。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 °C保存备用。

1. PCR扩增
   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×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′-CCTTCYGCAGGTTCACCTAC-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 °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**

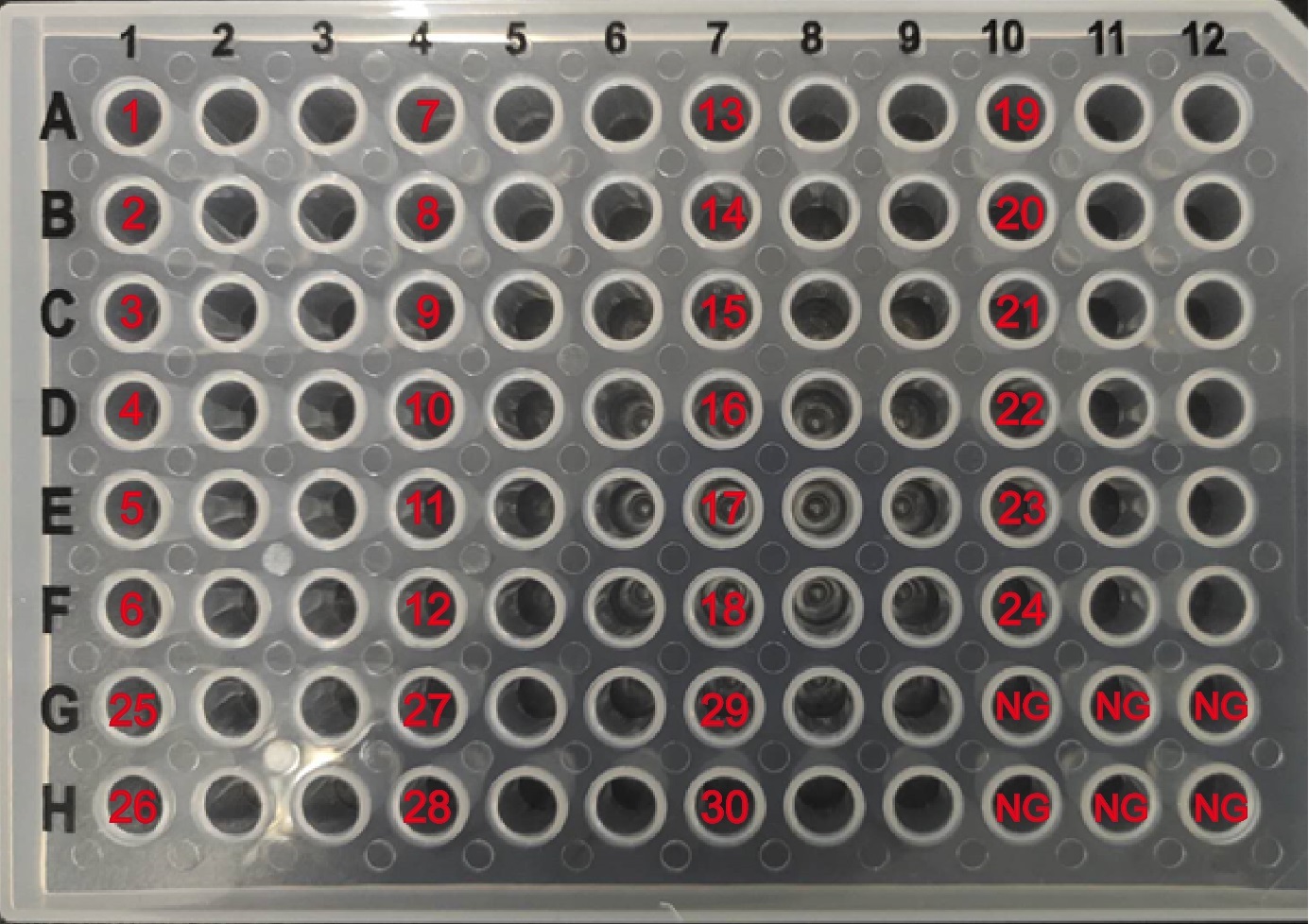
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | Barcode序列 | 引物序列 |
| 1380F\_B1 | CGATGT | CCCTGCCHTTTGTACACAC |
| 1380F\_B2 | ATCACG | CCCTGCCHTTTGTACACAC |
| 1380F\_B3 | TGACCA | CCCTGCCHTTTGTACACAC |
| 1380F\_B4 | ACAGTG | CCCTGCCHTTTGTACACAC |
| 1380F\_B5 | GCCAAT | CCCTGCCHTTTGTACACAC |
| 1380F\_B6 | TTAGGC | CCCTGCCHTTTGTACACAC |
| 1510R\_B1 | ACTGAG | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 1510R\_B2 | AGTAGA | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 1510R\_B3 | CAACGT | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 1510R\_B4 | GAGATT | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 1510R\_B5 | GTCTAT | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 1510R\_B6 | GTCTCG | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |

* + 1. 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14000 *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 |

* + 1. 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/25μL酶、2 mM/μL Mg2+缓冲液、0.2 mM/μL 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。
    2. 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 μL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 μL，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 μL。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 μL，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)

* + 1. 使用200 μL八联移液器，量程设为50 μL，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 μL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。
    2. 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 °C，1 min；30个循环为98 °C变性10 s、50 °C退火30 s、72 °C延伸30 s；最后72 °C延伸5 min。

1. 电泳
   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 μL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。
   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 μL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。
   3. 分别将10 μL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 μL的上样缓冲液，并混合均匀。注意，这一操作过程需避光。
   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 μL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 μL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。
   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。
2. 纯化PCR目标条带
   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。
   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 oC冰箱中。
3. 纯化DNA浓度测定及混库
   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 μL。
   2. 准备650 μL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 μL染料加入离心管中，并在每个离心管中加入2 μL纯化的PCR产物 (DNA)，旋涡震荡混匀，10000 *g*离心2 min。
   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。
   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。
   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.](https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006372) *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.](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0159-0) *ISME J* 12: 2263–2277.