**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, 6×Loading Buffer, Cat. No. 9156)
5. 琼脂糖粉末 (Sigma, A9539-250G)
6. TAE溶液 (Solarbio, 50×TAE)
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. 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。
   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 oC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
   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. 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 |

* 1. 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。

**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 |

* 1. 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、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。
  2. 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 μL上述步骤配制好的PCR反应试剂。
  3. 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，每个引物对加入3 μL，具体加入的位置见图1。其中NG代表阴性对照，任选6对引物对，6个孔中每个孔加入1 μL，并在实验记录本上做好记录，下一次PCR时更换没测试过的6对阴性引物对。



**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）

* 1. 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 μL，注意NG孔中不要加入任何DNA模板。
  2. 在超净工作台中使用200 μL八联移液器，量程设置为50 μL，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 μL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。
  3. 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 oC 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 oC变性30秒、55 oC退火30秒和72 oC延伸30秒，最后再72 oC延伸5分钟后降温到4 oC，PCR反应完成。

1. PCR结果电泳检测
   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。
   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. 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 μL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 μL的loading buffer，分别混合均匀。
   4. 使用1×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×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 μL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 μL PCR产物。
   5. 待琼脂糖凝胶完成凝固后，将其放置于装有1×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 μL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 μL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。
   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。
2. PCR目标条带回收纯化
   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。
   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 μL，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 oC冰箱保存或直接进行后续浓度测定。
3. 纯化DNA浓度测定及混库
   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。
   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。
   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200 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。
   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×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÷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。
4. DNA测序策略
   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调查专项（2017FY100300）的资助。

**参考文献**

* + - 1. Liu, M., Liu, L. M., Chen, H. H. Yu, Z., Yang, J. R., Xue, Y. Y., Huang, B. Q. and Yang, J. (2019). [Community dynamics of free-living and particle-attached bacteria following a reservoir. Microcystis bloom.](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.414) *Sci Total Environ* 660: 501–511.
      2. Liu, L. M., Yang, J., Yu, Z. and Wilkinson, D. M. (2015). [The biogeography of abundant and rare bacterioplankton in the lakes and reservoirs of China.](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.29) *ISME J* 9: 2068–2077.