

中文版 Method

仅供客户在文章写作时参考，分析内容和方法请以结题报告为准，请客户自行承担文章查重等相关风险。

1 实验流程

1.1 样本检测

详见样本检测报告。

1.2 PCR产物获取

引物对应区域：

16SV4区引物 (515F和806R)：鉴定细菌多样性；18SV4区引物 (528F和706R)：鉴定真核微生物多样性；ITS1区引物 (ITS5-1737F和ITS2-2043R)：鉴定真菌多样性。此外，扩增区域还包括 16SV3-V4/16SV4-V5/16SV5-V7；古菌16SV4-V5/古菌 16SV8；18SV9 和 ITS2 区。

所有 PCR 混合液加入 15 μ L Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs)、0.2 μ M 引物和 10ng 基因组 DNA模板，在 98℃ 下进行 1 分钟的第一次变性，然后在 98℃ (10s)、50℃ (30s) 和 72℃ (30s) 下进行 30 次循环，最后在 72℃ 下保持 5 分钟。

1.3 文库构建及上机测序

DNA样品扩增检测合格后，进行PCR产物的混合和纯化，再经末端修复、加A尾、加测序接头、纯化等步骤完成整个文库制备工作。库检合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求pooling后进行双末端测序。

2 生物信息分析

2.1 数据质控

2.1.1 数据拆分：根据Barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据。

2.1.2 双端数据拼接：截去Barcode和引物序列后使用FLASH (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Magoc T et al.,2011)，对每个样本的reads进行拼接，得到的拼接序列为原始Tags数据 (Raw Tags)。

2.1.3 数据质控：使用fastp软件对拼接得到的Raw Tags经过严格的过滤处理得到高质量的Tags数据 (Clean Tags) (Bokulich NAetal.,2012)。

2.1.4 去除嵌合体：经过以上处理后得到的Tags需要进行去除嵌合体序列的处理，Tags序列通过与物种注释数据库 (Silva database <https://www.arb-silva.de/> for 16S/18S, Unite database <https://unite.ut.ee/> for ITS) 进行比对检测嵌合体序列，并最终去除其中的嵌合体序列，得到最终的有效数据 (Effective Tags) (Edgar RC etal.,2011)。

3 Reference

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*. 2012;10(1):57-59. doi:10.1038/nmeth.2276.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27(16):2194-2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.

Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011;27(21):2957-2963. doi:10.1093/bioinformatics/btr507.