



PROTOCOLS OF 406 MICROBIAL LABORATORY

Version2.0, Jan 2022

FREE for non-commercial use

Contributors

Jia-Min Kao, Shih-Han Wen, Chien-Yi Wu, Shu-Shuo Yeh,
Jing-Wen Michelle Wong, Emma Chen, Yan-Zhen Meng,
Hsuan-Tung Lin, Yen-Chih Lin

Contact

Shan-Hua Yang

TEL: +886-2-3366-2883

Email: shanhua@ntu.edu.tw





TABLE OF CONTENTS

1. SAMPLE PREPARATION

1.1.	Processing of coral samples.....	5
1.2.	Filtration of seawater samples.....	7
1.3.	Determination of Photosynthesis Activities.....	8
1.4.	Determination of Antioxidant Enzymes (SOD and CAT) Activities.....	9
1.5.	Cultivation	
1.5.1.	Formula of Marine Agar.....	19
1.5.2.	Formula of MMBV4 (Modified Marine Broth Version 4) Agar.....	21
1.5.3.	Formula of CHRO Agar (specify for <i>Acinetobacter</i>).....	23
1.5.4.	Formula of YM Agar (specify for yeast).....	24
1.6.	Preservation of bacteria.....	26
1.7.	Anaerobic culture apparatus and anaerobic culture.....	28

2. PHYSIOLOGICAL TEST FOR MICROBES

2.1.	Gram negative test.....	34
2.2.	Catalase Test.....	35
2.3.	Oxidase Test.....	36
2.4.	Lipase Test.....	37
2.5.	Biolog	38
2.6.	Ecoplate.....	51



3. NUCLEIC ACID EXTRACTION

3.1. Total DNA Isolation from Corals	
3.1.1. Classical (CTAB) DNA Extraction.....	57
3.1.2. DNeasy Powersoil Kit DNA Extraction.....	59
3.1.3. DNA extraction (New kit).....	61

4. AMPLIFICATION

4.1. Polymerase Chain Reaction(PCR)	
4.1.1. Bacterial PCR Program (V6-V8 region).....	63
4.1.2. Bacterial PCR Program (whole 16S).....	64
4.1.3. Eukaryotic PCR Program (ITS1F & ITS4).....	65

5. PURIFICATION

5.1. Nucleic Acid Purification	
5.1.1. QIAEX II Agarose Gel Extraction.....	66

6. OTHERS

6.1. DNeasy Powersoil Kit DNA Extraction (English Version).....	68
6.2. QIAEX II Agarose Gel Extraction (English Version).....	71
6.3. GC 使用方式.....	74
6.4. Stable isotope Probing.....	81

7. DATA ANALYSIS

7.1. 使用 R 做圖及整理生物資訊分析結果.....	87
7.2. Qiime 2 生物資訊分析.....	100



8. NEMATODE

8.1.	Isolation of Nematodes.....	113
8.2.	Observation of Nematodes.....	114
8.3.	DNA Extraction of Nematodes.....	115
8.4.	Operating microscope camera.....	116

9. Symbiodiniaceae

9.1.	Isolation of symbiodiniaceae.....	122
------	-----------------------------------	-----

10. AQUACULTURE

10.1.	珊瑚切割.....	126
-------	-----------	-----



1.1. Processing of coral samples 珊瑚樣本製備

By Jia-Min Kao

Materials :

1. 噴槍
2. 空壓機
3. 研鉢
4. EtOH buffer
5. 1X TE buffer
6. 50 ml 離心管
7. PowerBead tube

Methods :

➤ 製備組織：

1. 以骨剪剪下指節大小的珊瑚，放入8號夾鏈袋，其餘樣本重新保存於新的95% EtOH 中。
2. 將美術噴槍接上空壓機，1X TE buffer 倒入噴杯中，對著袋內噴下組職，直到珊瑚骨骼中的孔洞皆完全褪色，至少噴滿兩次噴杯(甚至更多)，完成後噴下袋壁上殘留液體，將袋內液體倒入新的50 ml tube。
3. 將剩餘EtOH的原tube室溫(15~25°C)離心12000 rpm · 5 min · 倒掉上清液，避開pellet以pipet吸乾上清液，而後吸取1 ml 1X TE buffer 將pellet回溶transfer到新噴下的50 ml tube中。
4. 整管新噴下的50 ml tube室溫(15~25°C)離心12000 rpm · 5 min · 倒掉上清液，避開pellet以pipet吸乾上清液，而後吸取1 ml 1X TE buffer 將pellet回溶transfer到新的1.5 ml tube中。
5. 1.5 ml tube室溫(15~25°C)離心12000 rpm · 5 min · 倒掉上清液，避開pellet以



pipet吸乾上清液，而後吸取PowerBead tube中液體約550 μ l，將pellet回溶transfer到PowerBead tube中。

➤ 製備骨骼：

1. 噴完組織的骨骼以滅菌過ddH₂O沖洗，以擦手紙吸乾水份後放入標記好的1號夾鏈袋冰入冰箱，若3天內會接著抽DNA冰-4°C，若長期保存則冰-20°C。
2. 將骨骼放入研鉢中磨碎成粉，以藥匙移至秤量紙上，秤取約0.3~0.5之骨骼加入PowerBead tube中。

Note :

- 採集完成之珊瑚樣本一律保存於95% EtOH中，冰於-20°C或-80°C。
- 操作時攜帶手套，並以鑷子夾取樣本。
- 每完成一組樣本，皆須以酒精消毒過器具並擦乾多餘水份。



1.2. Filtration of seawater samples 海水過濾

By Chien-Yi Wu

Materials:

1. 抽氣幫浦
2. 濾杯及塞子
3. 0.2um 濾膜
4. 鑷子(2 支)
5. 量筒
6. 廢液杯
7. 50ml 離心管
8. 消毒酒精

Methods:

1. 濾杯(已滅菌) , 裝上 0.2um 濾膜(先用 1 支乾淨的鑷子夾取) , 鎖緊濾杯。
2. 先倒一點所採集的缸水到 500ml 量筒中 , 潤洗一下後倒入廢液杯。
3. 量筒內裝滿 500ml 缸水。
4. 將量筒內的缸水倒入濾杯中 , 打開抽氣幫浦開始過濾。
5. 濾杯中的水快沒時補量筒中的缸水進去 , 直到濾完 500ml 為止。
6. 過濾完後 , 關閉抽氣幫浦 , 轉開濾杯 , 以鑷子小心取下濾膜(用另 1 支沒用過的鑷子夾取)。
7. 將濾膜放入 50ml 離心管 , 冰入-20°C 保存。
8. 第一缸水樣處理完後 , 以 75% 酒精噴灑濾杯、鑷子 , 再用擦手紙擦乾。
9. 接到第一步驟 , 以相同流程處理第二缸水樣(還未處理的水樣放在 4°C 冰箱)。



1.3. Photosynthesis Determination (PAM 測定)

By Chien-Yi Wu

Materials:

1. PAM machine
2. 頭燈(red light)
3. 擦手紙

Methods :

1. 進行 PAM 測定前，須讓珊瑚處於暗環境 1hr
2. 將 PAM machine 左側接頭旁螺旋轉鬆，插入光纖 sensor 後將螺旋轉緊
3. 參數設定 (基本上不太需要調整，用原設定參數)
4. 設定完成後，將 sensor 置於珊瑚組織表面(平面處佳)按 start，燈亮後讀取螢幕數據
5. 測完後用清水清洗 sensor，擦乾並吹乾確保沒有水氣
- 6.

Note :

△ 若螢幕數據出現：

ERROR: 須調整發射訊號，可能太低

BAT: 須將機器充電

使用光纖 sensor 務必小心注意，不可彎折以免光纖斷裂



1.4. Determination of Antioxidant Enzymes (SOD and CAT) Activities

By Chien-Yi Wu

A. Coral sample processing

Materials:

1. Sterilized seawater
2. Airbrush
3. Zipper bag
4. Bone cutter
5. Lysis buffer (50 mM phosphate, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] glycerol, pH 7.0):
 - a. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.744g
 - b. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.913g
 - c. EDTA 0.0292g
 - d. 100 ml glycerol
 - e. Add ddH₂O to 1000 ml
 - f. Sterilized by 0.2 µm filter
6. 15 ml centrifuge tube
7. 1.5 ml centrifuge tube
8. Liquid nitrogen



Methods:

1. 拿一個大冰盒，裡面裝滿碎冰 (airbrush 珊瑚時於冰上進行)。
2. 取欲採樣之珊瑚 nubbin，以滅菌海水沖洗。
3. Airbrush 裝入 6 ml 的 lysis buffer，噴下 nubbin 的組織，噴到 6 ml lysis buffer 噴完為止。
4. 噴下的珊瑚組織蒐集於夾鏈袋中，集中後裝入 15 ml 離心管，離心管先暫放冰上保存。
5. 所有樣本處理完後，組織樣本以 2000g, 4°C離心 5 min。
6. 上清液以 1ml 分裝到 1.5 ml 離心管 (15ml 離心管中的沉澱含共生藻，暫置於冰上保存，待宿主樣本處理完後再處理)。
7. 分裝好的上清液以 16000g, 4°C離心 5 min。
8. 取上清液裝入新的 1.5 ml 離心管，以液態氮急凍後放入-80°C冰箱保存。(此為之後 ROS 實驗的宿主樣本(X))
9. 15ml 離心管中的沉澱以 1 ml lysis buffer 沖洗 (pipetting or vortex)，以 2000g, 4°C離心 5 min，移除上清液。
10. 重複步驟 9 四次 (清洗四次)。
11. 700 µl lysis buffer 回融沉澱，將回融後的 solution 以 pipet 移到預先裝有 250mg, 0.5mm glass beads 的 1.5 ml 離心管中。
12. 使用 Digital Disruptor Genie with Microtube Holder, 2970 rpm, 20 min 破壞共生藻細胞壁。
13. 震動處理完的樣本以 16000g, 4°C離心 5 min。
14. 上清液 100~300 µl 分裝到 1.5 ml 離心管 (SOD 實驗需 80 µl，CAT 實驗需 160~300 µl)。
15. 樣本以液態氮急凍後放入-80°C冰箱保存。(此為之後 ROS 實驗的共生藻樣本(Y)) (以上步驟樣本皆須置於冰上)



ROS (SOD, CAT) activities 實驗

B. Determine protein concentration in the sample

Materials:

1. Bovine serum albumin standard (Thermo, 23209)
2. 96-well microplate
3. Sterilized H₂O
4. 660 nm Assay

Methods:

1. 準備 BSA 標準品：

	A	B	C	D	E	F	G
BSA μg/ml	1000	500	250	125	62.5	20.83	6.94
BSA (μl) Standar d	200	150 A	150 B	150 C	100 D	100 E	100 F
ddH ₂ O (μl)	200	150	150	150	100	200	200

配好的標準品可冰 4°C 儲存，若之後實驗標準品檢量線 r^2 值下降 (>0.995) 則應重新配製。

2. 分別將 10 μl 的標準品及宿主(X)/共生藻(Y)樣本 load 進 96 well plate，每個樣本須有三重複。(宿主/共生藻樣本



需於冰上退冰)

3. 以八爪 Pipette 加入 150 μ l 660 nm Assay 至每個 well (空的 well 不用加) (樣本間盡量避免延遲加入)。
4. 置於 25°C、黑暗中 5 min。
5. 使用 96-well microplate reader 測量 660 nm 吸光值，利用標準品吸光值製作蛋白質檢量線，計算樣本中蛋白質濃度 (Z)。





C. SOD Activity experiment (SOD determination kit, SIGMA-ALDRICH, 19160)

Materials:

Kit content:

1. WST Solution
2. Enzyme Solution
3. Buffer Solution
1. Superoxide dismutase (SOD) Standard (Sigma, S7571-15KU)
2. 96-well microplate

Preparation of working solutions:

1. WST Working Solution: Dilute 1 ml of WST Solution with 19 ml of Buffer Solution. (Can storage at 4°C for 2 months, avoid light)
2. Enzyme working Solution: Centrifuge the Enzyme Solution tube for 5 seconds. Mix by pipeting, and dilute 15 μ l of Enzyme Solution with 2.5 ml of Dilution Buffer. (Can storage at 4°C for 3 weeks)
3. SOD Standard Solution (if necessary): Dilute SOD with Dilution Buffer to prepare SOD Standard Solution as follows:
 - a. 購得的 SOD standard 為粉末狀，總重僅 3 mg，以秤重方式無法配出精準濃度。故直接以 Dilution Buffer 加入藥瓶中回溶並稀釋成 1500 U/ml (stock)，每 150 μ l 分裝後冰入 -20°C 保存。取用時置於冰上退冰後使用 (只能單次使用，勿重複凍融)。



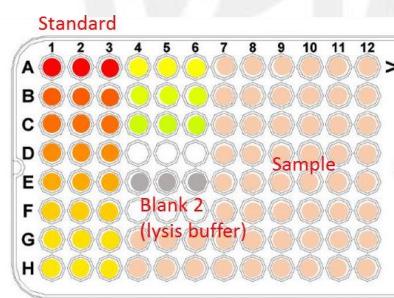
b. 依下表配置不同濃度之 SOD 標準品：

* DB = Dilution buffer

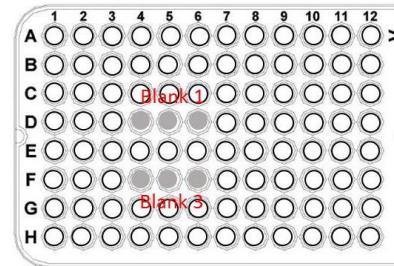
	stoc k	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
U/ml	1500	150	75	40	20	10	5	2.5	1	0.5	0.1	0.05
SOD (μ l)		100	500	640	500	500	500	500	500	500	200 I	500 J
*DB (μ l)		900	500	560	500	500	500	500	750	500	800	500

Methods:

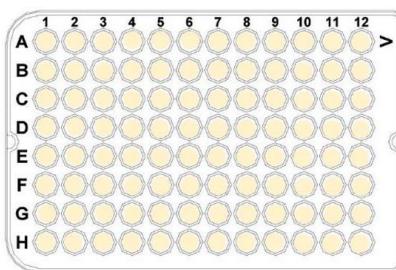
(1). Load 20 μ l sample (each three repeats)



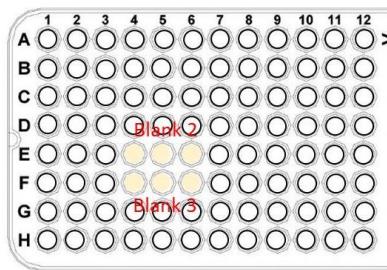
(2). Load 20 μ l ddH₂O



(3). Load 200 μ l WST working solution

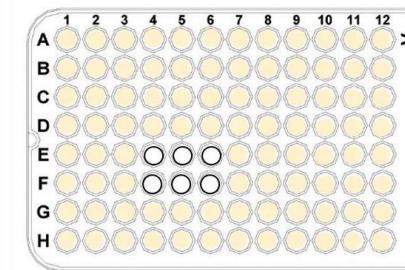


(4). Load 20 μ l Dilution buffer



(5). Load 20 μ l Enzyme working solution

*Avoid reaction time lag, use a multi-channel pipette



● : 實心代表要加 ○ : 空心代表不用加



(6) Incubate the plate at 37°C for 20 min

(7) Read the absorbance at 450 nm using a microplate reader

(8) Use sample absorbance to calculate the SOD activity (inhibition rate%)=

$$\frac{(Blank1-Blank3)-(Sample-Blank2)}{(Blank1-Blank3)} \times 100$$

Till this step, you should have: SOD standard concentration (A), SOD standard inhibition rate (B), Sample SOD inhibition rate (C)

(6) Calculate SOD calibration curve: reciprocal the SOD standard concentration (A) and its inhibition rate (B), draw a trendline base on these two parameters (1/A, 1/B) and get the trendline equation.

(7) Reciprocal the sample's SOD inhibition rate (1/C), then use the trendline equation to calculate sample's Reciprocal SOD concentration (1/D).

(8) Reciprocal back to get the sample's SOD concentration (D, U/ml), then divide it with the sample's protein concentration (Z, mg/ml) to get the sample's SOD concentration (U/mg)



D.CAT Activity experiment

Materials:

1. Potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0, 0.1mM EDTA)
 - a. K₂HPO₄ 4.672g
 - b. KH₂PO₄ 3.154g
 - c. EDTA 0.0292g
 - d. Add ddH₂O to 1000 ml
 - e. Sterilized by 0.2 µm filter
2. Quartz Cuvette
3. ddH₂O
4. H₂O₂, 320mM (For experimental final concentration 20mM)

Methods:

(1) 使用能夠測量 240nm 吸收光譜及精準度達小數點後三位的 spectrophotometer，設定每 1 秒測量一次吸光值，連續測定 80 秒。

Blank 樣本測試確定儀器正常

(2) 於 Quartz Cuvette 內裝入 740 µl 的 Potassium phosphate buffer (PPB)，將 Cuvette 置入 spectrophotometer 後按規零。

(3) 取出 Cuvette，加入 50 µl, 320mM 的 H₂O₂，使用 1 ml pipet **pipetting 10~15 次**混合均勻 (重要步驟!!!未混合均勻吸光直訊號會逐漸增加，影響準確度)。

(4) Cuvette 置入 spectrophotometer，按下測量，儀器開始紀錄 80 秒間每秒的吸光值。

(5) 結束測量後，存 txt 檔，打開檔案看 blank 樣本於 80 秒內的吸光值是否穩定不變 (± 0.001 以內可接受)，若否則應重做一次



blank 或查明原因。

(6) 測試完後用 pipet 吸除 cuvette 中樣本，以 pipet 吸取 ddH₂O 沖洗 cuvette。

測試正式樣本

(7) **宿主(X)/共生藻(Y)** 樣品先於冰上退冰。

(8) Cuvette 中裝入 740 μl PPB 及 10 μl 的樣本，以 1 ml Pipet 混合均勻 (若樣本 CAT 濃度低，則需增加樣本量，增加樣本量時 PPB 的量則減少，維持總體積 750 μl。e.g. 共生藻樣品通常 CAT 濃度較低，則可加入 80 μl 的共生藻樣品到 Cuvette 中，但 PPB 的量則須減少為 750-80=670 μl)。

(9) 將 Cuvette 置入 spectrophotometer 後按規零。

(10) 取出 Cuvette，加入 50 μl, 320mM 的 H₂O₂ (Final concentration 20 mM)，使用 1 ml pipet **pipetting 10~15 次** 混合均勻 (重要步驟!!!未混合均勻吸光直訊號會逐漸增加，影響準確度)。

(11) Cuvette 置入 spectrophotometer，按下測量，儀器開始紀錄 80 秒間每秒的吸光值 (20 mM H₂O₂ 的起始吸光值約為 0.85~0.95)。

(12) 結束測量後，存 txt 檔，若樣品中 CAT 濃度越高則吸光值應隨時間下降的越快。

(13) 測試完後用 pipet 吸除 cuvette 中樣本，以 pipet 吸取 ddH₂O 沖洗 cuvette。

(14) 測試下一個樣品，

每一個樣品應做三重複

測試。計算樣品中 **CAT**

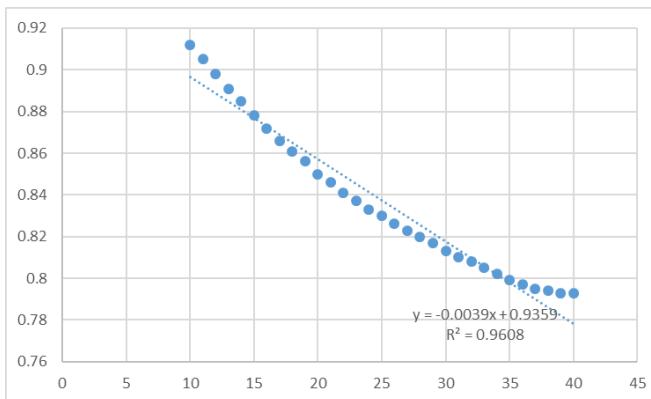
濃度

(15) 開啟 excel 表格，將 txt 檔中的時間 (秒) 及吸光值資料複製到 excel，選取第 10~40 秒的資料，以秒為 X 軸、吸光值為

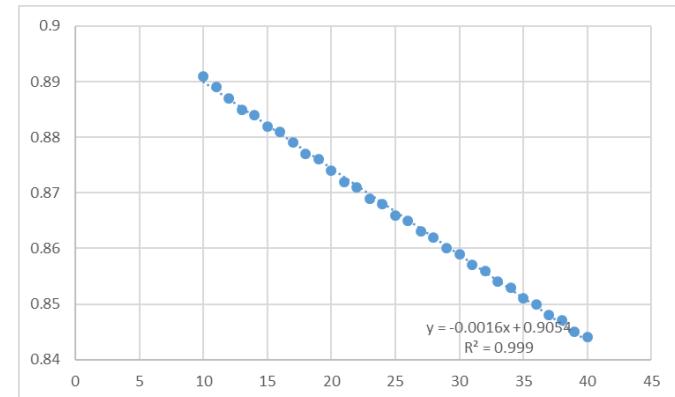
Y 軸做圖，觀察圖中資料點是否為平滑直線，若有資料點吸光值突然上升或有波動則可能為 H₂O₂ 未混合均勻 (如下圖)，算



出來的 CAT 濃度不準，應考慮不使用該測量資料。



資料點不平順，CAT 測量值不準確



資料點平順，測量值準確

- (16) 資料點加上線性趨勢線，選取趨勢線顯示公式，紀錄公式中的斜率絕對值。
- (17) 將樣本三重複測量的斜率絕對值取平均， $CAT\ activity = \text{斜率平均值} * 60\ (s) / 43.6\ (\text{常數}) * 0.0008 * 10^9\ (\text{nmol/min})$
- (18) 再將 CAT activity 除以 sample protein ($Z\ (\mu\text{g}/\mu\text{l})$) * 加入的樣本體積/1000 (mg))，再除以 1000 (μmol)，得樣本的 CAT activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)



1.5. Cultivation

1.5.1. Formula of Marine Agar

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials :

Difco™ Marine Broth 2216	18.7 g
Bacterial Agar	7.5 g
ddH ₂ O	500 ml
1M NaOH	For pH adjustment (7.8-8.0)

Methods :

1. 準備 500 ml 的再倒入 ddH₂O 至 500 ml 。先倒約 400 ml 入 800 ml 的血清瓶。
2. 血清瓶內放入攪拌子，開始攪拌和加熱（攪拌速：4，加熱度：4）。
3. 稱重 18.7g marine broth，倒入血清瓶攪拌，直至液體呈清澈的淡棕色（無粉末殘留在瓶底）。
4. 使用 pH 計，通過加入 1M NaOH 調整 pH 值至 7.8—8.0 之間。（用滴管滴入 NaOH 時要緩慢，先確保 pH 計上的值穩定後再慢慢加入 NaOH，pH 值需要一點時間才會穩定）
5. 稱重 7.5g agar，倒入血清瓶攪拌，直至無粉末殘留在瓶底）。（agar 易受潮，請用完趕緊蓋緊）再倒入 ddH₂O 至 500 ml 。
6. 將血清瓶瓶蓋轉好（勿轉緊，要留一點縫隙），用鋁箔紙把血清瓶瓶蓋包住，上面貼上滅菌膠帶，拿去滅菌。
7. 滅菌同時把水浴槽打開（設定溫度：50°C），待滅菌完成後，將血清瓶放入水浴槽降溫。
8. 準備乾淨全新的 plate， agar 降溫至約 50-60°C（用手握着瓶子時可以承受的溫度），將 agar 倒入 plate 內（覆蓋約 2/3 區域），輕輕轉圈搖晃，讓 agar 平均覆蓋整個 plate，且無氣泡和縫隙。



9. 將 plate 疊好 (10 個疊一起) 靜置在 laminar flow 角落約一晚，讓 agar 凝固。
10. 將完成的 agar plate 裝入袋子裡 (一個袋子 20 個)，在袋子上用奇異筆註明 agar 種類和製作日期 (eg. MA,20200909)，袋子用黑色夾子或膠帶密封。



1.5.2. Formula of MMBV4 (Modified Marine Broth Version 4) Agar

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials :

HEPES	5.95 g (25.0 mM)
NaCl	19.45 g (0.33 mM)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	18.79 g (92.4 mM)
Na ₂ SO ₄	3.24 g (22.8 mM)
KCl	0.55 g (7.377 mM)
CaCl ₂	0.12 g (1.08 mM)
NaHCO ₃	0.16 g (1.9 mM)
Peptone	5.0 g
Yeast Extract	1.0 g
NP cocktail stock	1.0 ml
Artificial Seawater	1.0 ml
ddH ₂ O	1.0 L
Bacterial Agar	7.5 g
1M NaOH	For pH adjustment (7.2)

NP cocktail stock (1L)

KNO ₃	89.21 g
NH ₄ Cl	47.2 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4.35 g
ddH ₂ O	1.0 L

Methods :

1. 準備 1 L 的 ddH₂O，先倒約 800 ml 入 血清瓶。
2. 血清瓶內放入攪拌子，開始攪拌和加熱（攪拌速：4，加熱度：4）。



3. 將藥品依序稱重，倒入血清瓶攪拌，直至液體呈清澈的金黃色（無粉末殘留在瓶底）。
4. 使用 pH 計，通過加入 1M NaOH 調整 pH 值至 7.2。（用滴管滴入 NaOH 時要緩慢，先確保 pH 計上的值穩定後再慢慢加入 NaOH，pH 值需要一點時間才會穩定）
5. 稱重 7.5g agar，倒入血清瓶攪拌，直至無粉末殘留在瓶底）。（agar 易受潮，請用完趕緊蓋緊）再倒入 ddH₂O 至 1 L。
6. 將血清瓶瓶蓋轉好（勿轉緊，要留一點縫隙），用鋁箔紙把血清瓶瓶蓋包住，上面貼上滅菌膠帶，拿去滅菌。
7. 滅菌同時把水浴槽打開（設定溫度：50°C），待滅菌完成後，將血清瓶放入水浴槽降溫。
8. 準備乾淨全新的 plate，agar 降溫至約 50-60°C（用手握着瓶子時可以承受的溫度），將 agar 倒入 plate 內（覆蓋約 2/3 區域），輕輕轉圈搖晃，讓 agar 平均覆蓋整個 plate，且無氣泡和縫隙。
9. 將 plate 疊好（10 個疊一起）靜置在 laminar flow 角落約一晚，讓 agar 凝固。
10. 將完成的 agar plate 裝入袋子裡（一個袋子 20 個），在袋子上用奇異筆註明 agar 種類和製作日期（eg. mmbv4,20200909），袋子用黑色夾子或膠帶密封。

1.5.3. Formula of CHRO Agar

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials:

CHRO powder	16.4 g
Liquid Supplement	2.0 ml
ddH ₂ O	500 ml
NaCl	15.5 g

Methods:

1. 把加熱板、1000 μ l 的 pipette 和 tip、新的 plate、溫度計、稱重計、藥勺先酒精擦拭後放入 laminar flow 照 UV。加熱板開至最大。
2. 血清瓶 (1L) 加入 400 ml 的 ddH₂O 與 stir bar，放入 80°C 水浴槽加熱。
3. 後從水浴槽取出放在加熱板，同時開始攪拌，攪拌速度約為 4。
4. 稱重加入 16.4g CHRO 粉 (32.8g/L)，再加入 2 ml liquid supplement (4 ml/L)。

注意：liquid supplement 粘稠故要慢點吸避免突衝，每取一次就換新的 tip，避免把加熱中的 agar 所產生的水汽帶入藥品中。

5. 加入 15.5 g 的 NaCl。
6. 加入 ddH₂O 直到 500 ml。
7. 加熱至 100°C，期間插入溫度計時刻注意溫度的上升。
8. 到達 100°C 之後，放入 50°C 的水浴槽降溫。
9. 準備乾淨全新的 plate，agar 降溫至約 50-60°C (用手握着瓶子時可以承受的溫度)，將 agar 倒入 plate 內 (覆蓋約 2/3 區域)，輕輕轉圈搖晃，讓 agar 平均覆蓋整個 plate，且無氣泡和縫隙。
10. 將 plate 疊好 (10 個疊一起) 靜置在 laminar flow 角落約一晚，讓 agar 凝固。將完成的 agar plate 裝入袋子裡 (一個袋子 20 個)。



1.5.4. Formula of YM Agar

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials :

Yeast Extract	1.5 g
Malt Extract	1.5 g
Peptone	2.5 g
Glucose	0.5 g
Bacterial Agar	10.0 g
ddH ₂ O	500 ml
1M HCl	3.5 ml

Methods :

1. 準備 500 ml 的再倒入 ddH₂O 至 500 ml 。先倒約 400 ml 入 800 ml 的血清瓶。
2. 血清瓶內放入攪拌子，開始攪拌和加熱（攪拌速：4，加熱度：4）。
3. 藥品依序稱重，倒入血清瓶攪拌，直至液體呈清澈的淡棕色（無粉末殘留在瓶底）。
4. 倒入 ddH₂O 至 500 ml 。
5. 將血清瓶瓶蓋轉好（勿轉緊，要留一點縫隙），用鋁箔紙把血清瓶瓶蓋包住，上面貼上滅菌膠帶，拿去滅菌。
6. 滅菌同時把水浴槽打開（設定溫度：50°C），待滅菌完成後，將血清瓶放入水浴槽降溫。
7. 準備乾淨全新的 plate， agar 降溫至約 50-60°C（用手握着瓶子時可以承受的溫度）。
8. 加入 3.5 ml HCl 入 agar 中，均勻攪拌。
9. 將 agar 倒入 plate 內（覆蓋約 2/3 區域），輕輕轉圈搖晃，讓 agar 平均覆蓋整個 plate，且無氣泡和縫隙。



10. 將 plate 疊好 (10 個疊一起) 靜置在 laminar flow 角落約一晚，讓 agar 凝固。

11. 將完成的 agar plate 裝入袋子裡 (一個袋子 20 個)，在袋子上用奇異筆註明 agar 種類和製作日期 (eg. YM,20200909)，袋子用黑色夾子或膠帶密封。





1.6. Preservation of bacteria 菌種保存

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials:

1. Glycerol
2. Marine broth
3. 試管
4. 保存管

Methods :

事前準備：

1. glycerol、marine broth 和試管事先滅菌備好。
2. 每個試管倒入 10 ml 的 marine broth，並在試管上貼上標籤註明菌種編號和日期。
3. 取 2 個 loop 的菌到試管內，vortex (5) 讓菌液充分混勻（避免菌結團沉澱在底部）。
4. 將試管放到振盪器上，開約 (100-150 rpm)，放在室溫 (25°C) 培養 16-20 小時。

保存步驟：

1. 觀察菌生長狀況，如呈混濁狀（圖一）則代表菌已經生長了。
2. 準備 2 ml 的保存管，並寫上菌種編號和日期；每個菌種都各保存 5 管。
3. 將菌液vortex (5) 充分混勻無沉澱之後取700 μ l放入保存管。
4. 加入300 μ l的glycerol。（吸取glycerol的時候要注意，glycerol太濃稠因此要緩慢吸上來避免突衝，可在吸之前把tip的尖端剪一點，讓孔變大）
5. Vortex (5) 讓菌液和 glycerol 充分混勻（注意 glycerol 是油類，必須充分混勻否則會有分層的現象）。
6. 放入紙盒中，貼上標籤註明日期和菌種編號，保存在-80°C 冰箱內。



圖一，左：剛開始培養的菌液；右：19小時之後的菌液，可見左邊清澈可透光，右邊菌液充分混合後呈混濁狀、不透光。

后续使用步骤：

1. 将管子从冰箱里取出，放入装有碎冰的盒子里。
2. 用loop刮最上面一层已解冻的菌液，然后涂盘。
3. 将菌液迅速再放入冰箱中保存。

Note :

1. 所有器材，medium都一定要先滅菌（確保菌種不會被污染）。
2. 此方法可保存菌种大约2-3年。
3. 保存之后尽量不要多次重复从冰箱里取出，而且取太多次可能会导致菌液污染。



1.7. 廢氣操作台及廢氣菌培養方法

黃競紋 Michelle Wong Jing Wen

培養厭氧菌相關資訊：

1. 可根據想要的目標菌種來添加各種元素（養分）入培養基。
 - a. 自營：無需額外加入有機碳，但可照光
 - b. 異營：需要提供額外的有機碳（yeast extract, peptone, glucose, acetate, pyruvate 等等）
2. 培養環境可以根據採樣地點的環境來調整（溫度、有無照光等等）
3. 所需養分（bicarbonate, sulphate, nitrate 等等）需要先配好 stock solution，要使用的時候就用針筒取出。

採取樣本：

1. 出野外採取樣本時，可以下列幾種方式存放樣本：
 - a. 用血清瓶直接裝滿（底泥和海水），然後鎖緊瓶蓋，儘快送到厭氧操作台置放。【風險：注意從海里拿出來時要小心瓶內壓力過大而導致血清瓶破裂】
 - b. 用氣密箱，裡面置放厭氧包（內有藥品能夠消耗空氣，達成厭氧狀態），把樣本裝了放進箱子裡。。
 - c. 用氣密袋，內放厭氧包，把樣本裝了放進袋子裡。
2. 採取樣本後需儘快培養。



厭氧操作台使用方法：

1. 操作台開關及其用途



① : 電源總開關

② : 偵測到外部混合氣 AMG 供應不足持續 30 s 時，每 15 s 會發出一長鳴並亮警示燈

③ : 自動循環控制系統，按一次會進行三次換氣，完成後 “AIRLOCK ANAEROBIC” 指示燈會亮。

- ④ : 培養室溫度
- ⑤ : 培養箱加熱指示燈
- ⑥ : 過溫保護裝置指示燈，亮起時會有警報聲，安全保護啟動，培養箱加熱器電源被截斷
- ⑦ : 自動厭氧循環時指示燈會亮起
- ⑧ : 混合氣填充到工作區時會亮起
- ⑨ : 袖套壓力循環顯示



- ① : 按住五秒會啟動自動定時厭氧循環，再按五秒會關閉該系統
- ② : 傳遞箱手動循環控制系統
- ③ : 傳遞箱循環次數選擇
- ④ : 過溫保護裝置
- ⑤ : 溫度過高警報音量調整
- ⑥ : 低混合氣警報音量調整

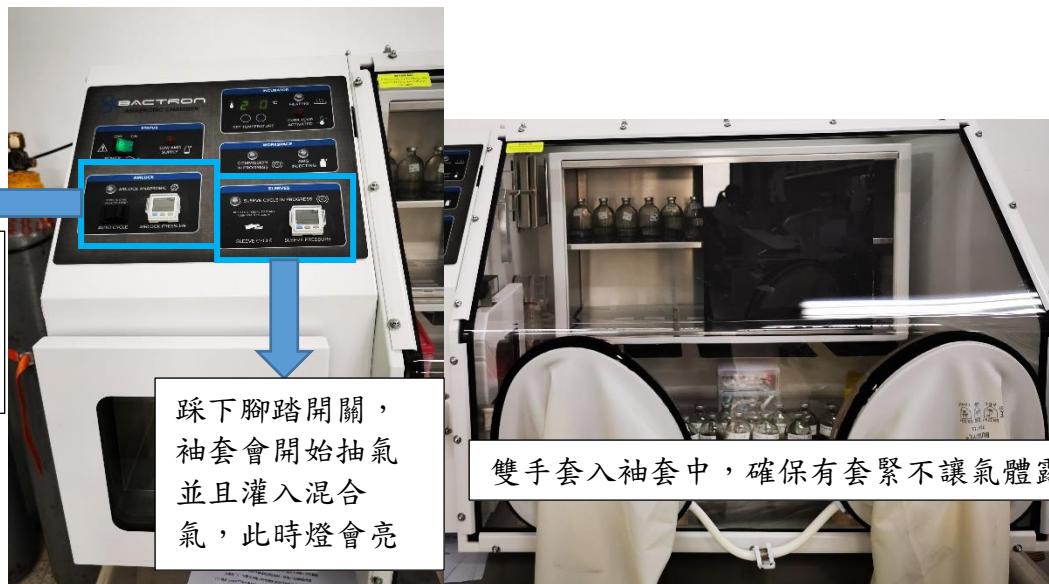


腳踏開關：改變袖套內的環境，達到所需的要



2. 雙手進入操作台方式

將所需物
品放入傳
遞艙，按
下自動循



3. 雙手離開操作台方式



4. 日常維護相關事項

- 壓力計內水位下降到低於紅線與黑線之間時，需補上 ddH₂O。
- 催化劑要定時烤並且更換（通常每使用一次厭氧操作台就換一次）。
- 每次使用操作台，記得帶氧氣指示紙到工作檯內，時刻注意指示紙的顏色變化（若變成粉紅，代表有氧氣存在）。
- 若有氧氣，可以開啓自動定時厭氧循環（注意每開一次就需要幾個小時洗氣，這非常耗費氣體）；可以等指示紙變成無色，代表無氧之後就可以關掉，無需耗費氣體直到循環結束。



培養厭氧菌：

Materials :

1. 樣本
2. 培養液及所需養分（已配製好的）
3. 厮氣瓶
4. 針筒
5. 氣密塞
6. 鋁環
7. 藥勺

Methods :

培養前置步驟：

1. 配製培養基（一般為人工海水，配方見下列列表）。
 - a. 液態：能夠大量培養，可用序列稀釋來純化菌株，但要確保獲得純菌的話可跑 qPCR 或是 cloning。
 - b. 固態：雖然無法大量培養，但能夠取得菌落。
2. 所有所需器材必須先滅菌，放入廝氣操作台內（cultivation 前 1-2 天）。

培養步驟：

1. 在廸氣瓶中裝入約 37 ml 的培養液（人工海水）（可根據需求做調整）。
2. 用藥勺挖出樣本放入瓶中（無計量，大約放就好）。
3. 用塞子把瓶子密封，接着封上鋁環（鋁環能夠防止瓶內壓力過大導致塞子爆開）。
4. 用針筒加入所需養分。
5. 放在適當的環境培養。
6. 後續純化可以通過序列稀釋的方式繼續培養。



觀察瓶中的菌：

1. 搖晃瓶子混勻，從瓶中用針筒取出 1 ml 放入 ependorf 內。
2. 離心 13.2 rpm · 5 min 。
3. 去掉上清液，只留下 pallet 。
4. 將 pallet 滴在玻片上，滴一點 ddH₂O，蓋上蓋玻片，放在顯微鏡下觀察。



2.1. Gram Negative Test

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials:

1. Bacterial cultures
2. Plastic droppers
3. Glass slides

Solution

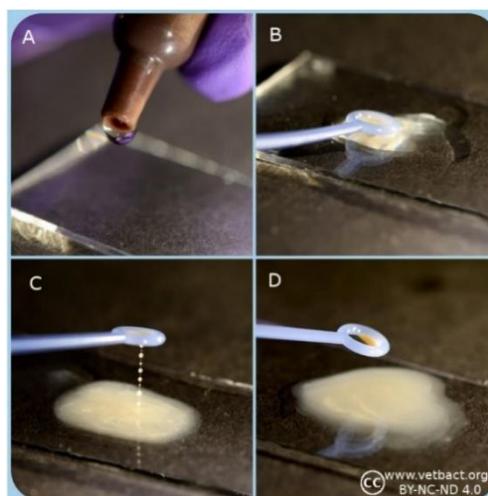
KOH (3%)	0.3 g
ddH ₂ O	10 ml

Methods:

1. Use inoculating loop to transfer generous amount of bacteria and spread on glass slide.
2. Apply 1 drop of KOH on the slide and stir carefully.
3. The solution of gram negative bacteria will be viscous and form a mucoid string within 30 sec.

Positive results: The solution with the bacteria (gram negative) will be viscous

Negative results: The solution with the bacteria (gram positive) will not be viscous



- A. Application of potassium hydroxide solution onto a microscopic slide.
- B. Bacteria are transferred and mixed with the KOH solution.
- C. Result with gram negative bacteria where the solution will be viscous and form a mucoid string.
- D. Result with gram positive bacteria where the solution will not be viscous.

2.2. Catalase Test

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials:

1. Bacterial cultures
2. Plastic droppers
3. Glass slides

Solution

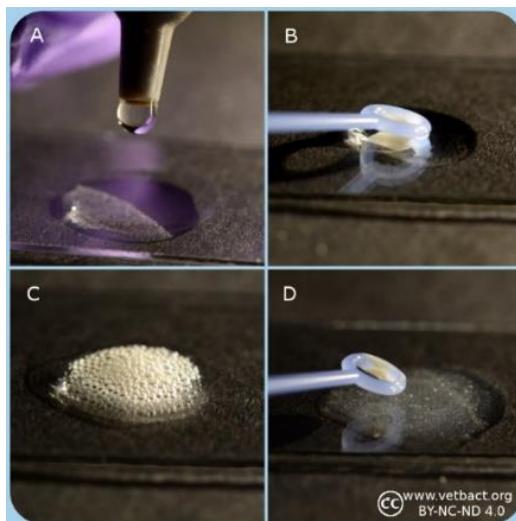
H ₂ O ₂ (1%)	1 ml
ddH ₂ O	9 ml

Methods:

1. Use inoculating loop to transfer generous amount of bacteria and spread on glass slide.
2. Add one drop of 3% H₂O₂ to the bacteria and observe the suspension (Be careful with the handling of H₂O₂ which is corrosive).

Positive test results: Gas formation (O₂) in the form bubbles shows that the bacterium has a catalase

Negative test results: No gas formation



- A. Apply one drop of 3% hydrogen peroxide on a microscopic slide.
- B. Transfer bacteria with a plastic loop to the H₂O₂ solution.
- C. Catalase positive bacteria produce gas (O₂) in form bubbles which shows that the bacterium has a catalase.
- D. Catalase negative bacteria does not have a catalase and therefore oxygen is not formed. Note the fragments of bacterial colonies, but there are no bubbles in the solutions.

2.3. Oxidase Test

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials:

1. Bacterial cultures
2. Plastic droppers
3. Glass slides

Solution

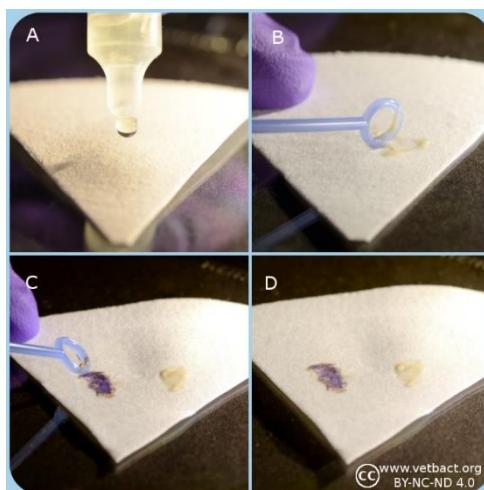
TMPD (1.2%)	0.12 g
ddH ₂ O	10 ml

Methods:

1. Draw the filter paper into 4 sections, label with bacteria code.
2. Use inoculating loop to transfer generous amount of bacteria and spread on filter paper.
3. Apply 2 drops of oxidase reagent to the bacteria and observe it.

Positive test results: Dark blue-purple colour change within 10-30 sec.

Negative test results: No colour change /colour change after more than 30 sec.



- A. Two drops of oxidase reagent is applied onto a piece of filter paper.
B and C. Colony material is transferred by a plastic loop to the spot of oxidase on the filter paper.
C. The left spot includes oxidase positive bacteria and the spot to the right oxidase negative bacteria.
D. The final results can be observed after 30 s.
Note: Exposure to oxygen may eventually turn the test blue over time.

2.4. Lipase Test

By Jing-Wen Michelle Wong

Materials:

1. Bacterial cultures
2. Marine agar with Tween 80

Methods:

1. Draw the plate into 4 sections, label with bacteria code.
2. Use inoculating loop to transfer generous amount of bacteria and spread on plate.
3. Observe the plates after the bacterial colony grow.

Positive results: There are fatty droplets surround the colony.

Negative results: Without any droplets surround the colony.



Figure above shows positive results of lipase test.

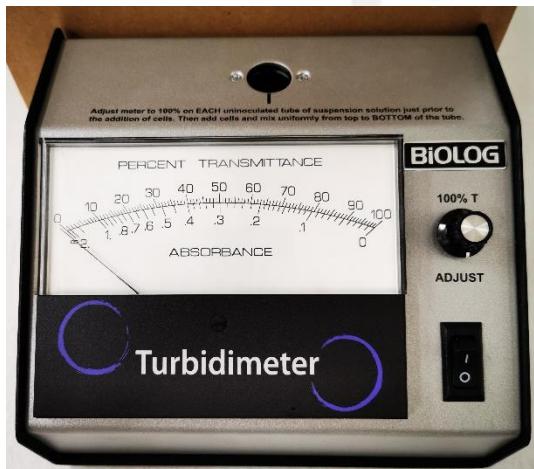
2.5. Biolog

Biolog 操作方法

By Michelle Wong Jing Wen

Materials:

1. 濁度計
2. 棉花棒
3. Pipettor
4. IF-A 接種液
5. GENIII MicroPlate
6. 測試菌株



濁度計



IF-A 接種液



GENIII MicroPlate

Methods :

準備接種源：

1. 將 IF-A 接種液試管插入濁度計，調整濁度至 100% T (control) 。
2. 以滾動棉棒的方式沾取菌種，不可取到 agar 。
3. 將棉棒在試管內壁上轉動在溶液 (液面上) ，輕輕的將菌團打散。



4. 將試管拿去 vortex，確保取得均勻的懸浮液。
5. 將試管插入濁度計，測量濁度，範圍在 90-98% T 之間。
6. 如果濁度未達到範圍值，請添加菌種來調整。

接種到 MicroPlates 上：

1. 將接種源溶液倒入無菌的容器內，用 pipettor (八爪魚) 吸取 100 μ l 的菌液，注入 MicroPlates 內 (一共 96 孔) 。
2. 蓋上蓋子。
3. 在 MicroPlates 的側面註明樣品名稱、日期等等資訊，不要在蓋子上標示。

MicroPlates 培養：

1. 放入 25°C 培養箱培養 24、48hrs。

MicroLog 軟體讀取：

1. 先打開 Biolog 儀器，暖機約 15 min。



2. 進行數據讀取。

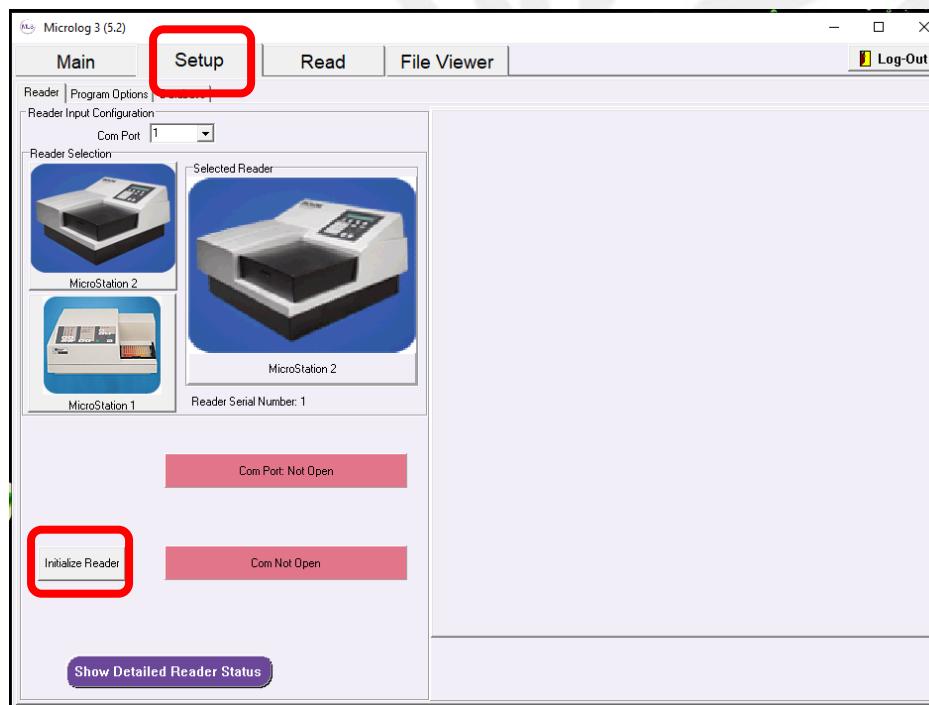


讀取菌種鑑定盤：

1. 打開 MicroLog 軟體，輸入帳號與密碼登錄。

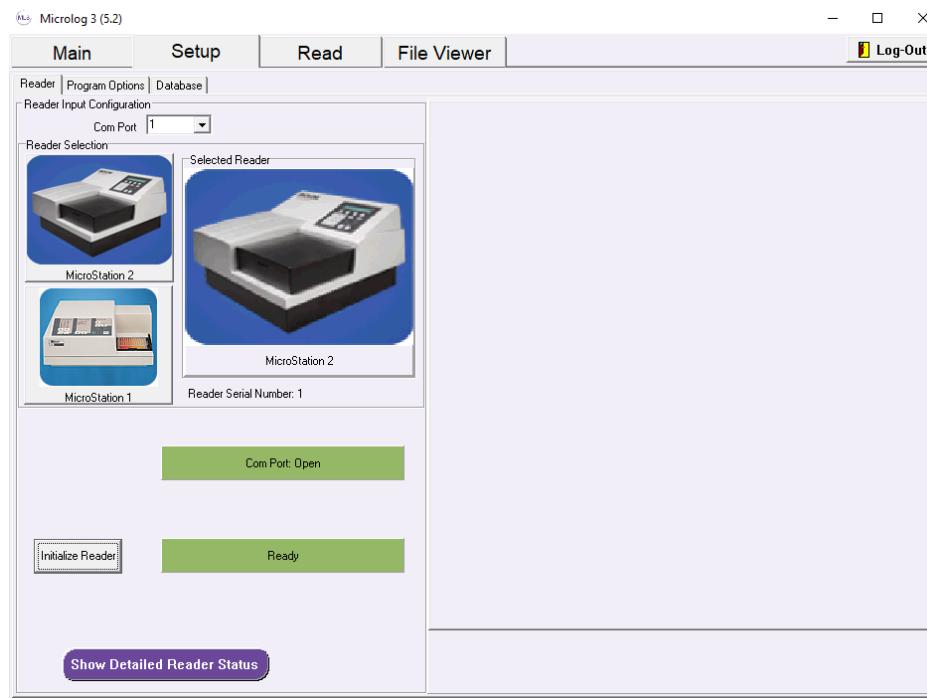


2. 點選 Setup，進入界面之後點擊 Initialize Reader（類似 blank reading 一樣）。Reader Selection 部分是 MicroStation 2（界面已自動選取，無需手動點擊）。





3. 當界面顯示 “Com Port : Open” & “Ready” , 代表 reader 已完成連接。

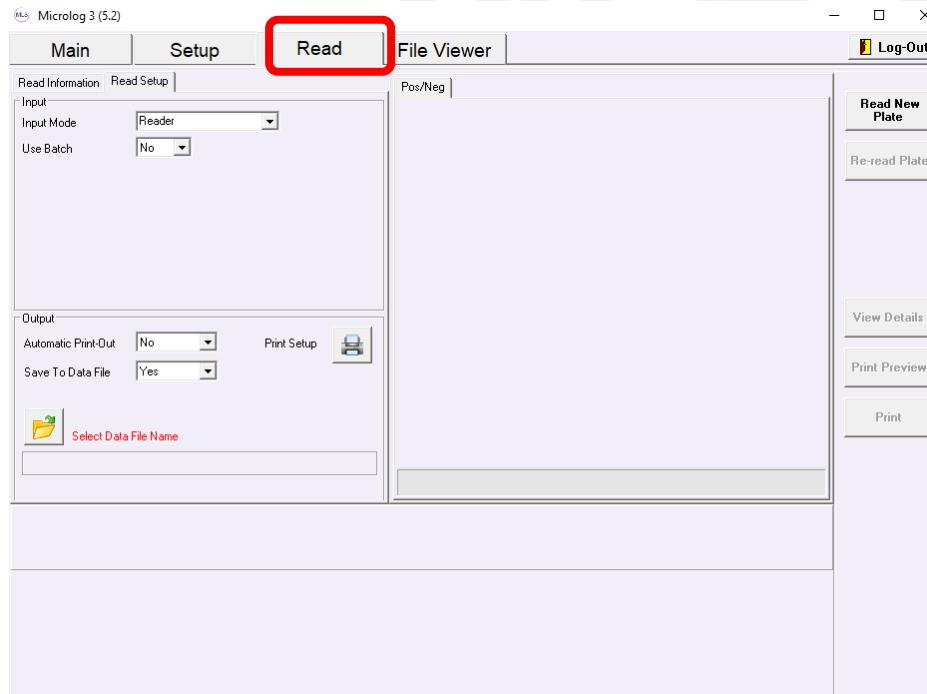


4. 點選 Read , 進入界面之後 input 無需設定 。

Output 方面 :

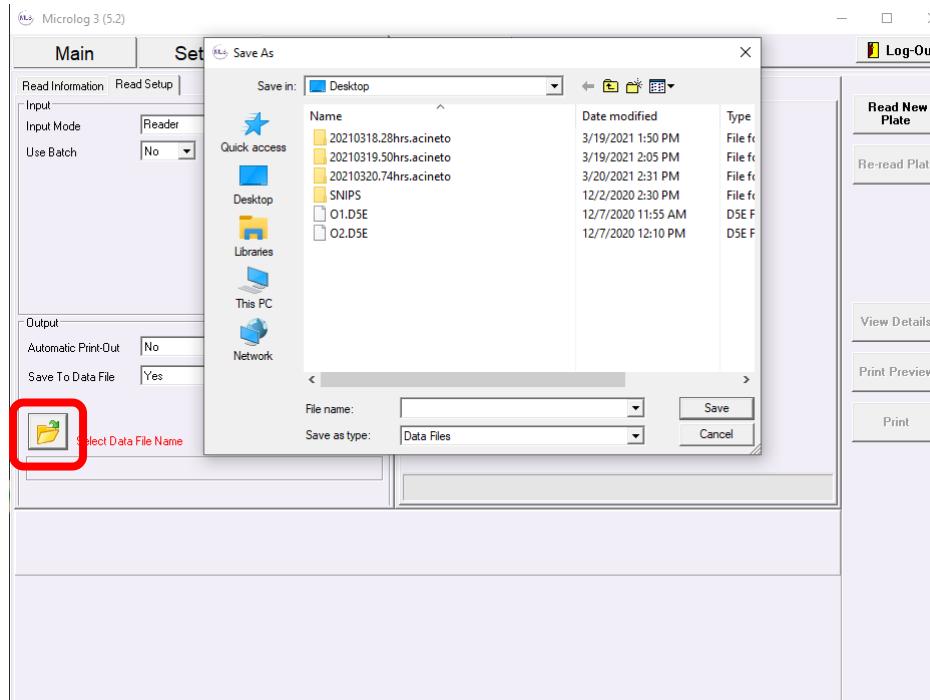
Automatic Print-Out 選擇 No (Yes 是自動列印報告)

Save to Data File 選擇 Yes 自動儲存 Data 。

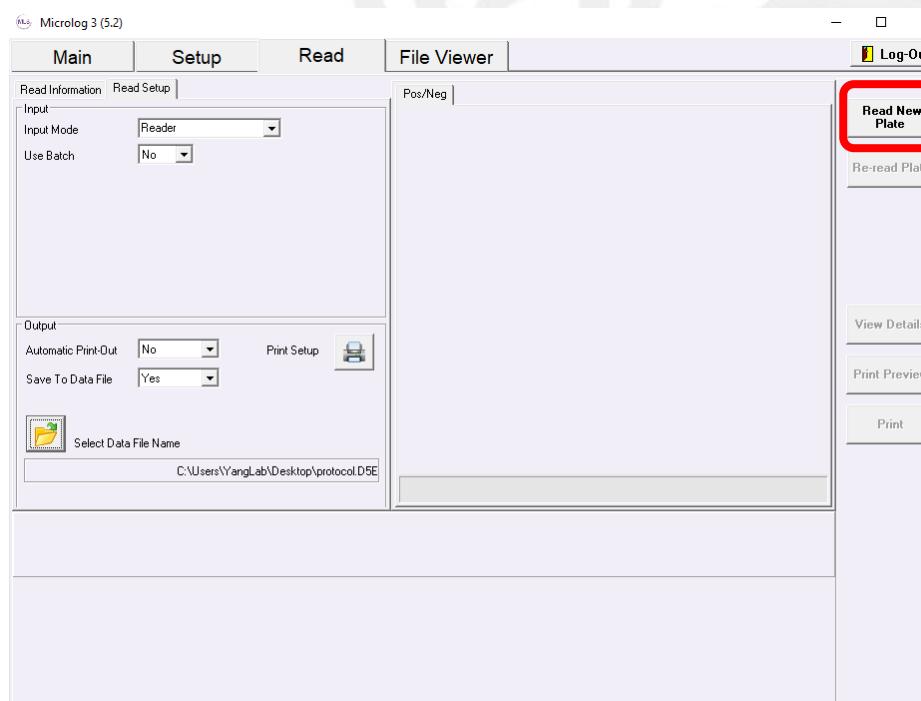




5. 點擊 Select Data File Name 隔壁黃色文件夾圖標，選擇數據要儲存在哪，輸入檔案名，儲存。



6. 點選 Read New Plate。





7. 進入界面後，填寫 Plate Information。

Plate Number: 1

Plate Type: GEN III

Protocol: A (標準流程)

Incubation hours: 1-48 hrs 自選 (超過 48 手動改掉，系統只給到 48 hrs 而已)

下面 user 資料也自行填寫 (ID, origin, date, agar, broth, conc.)。

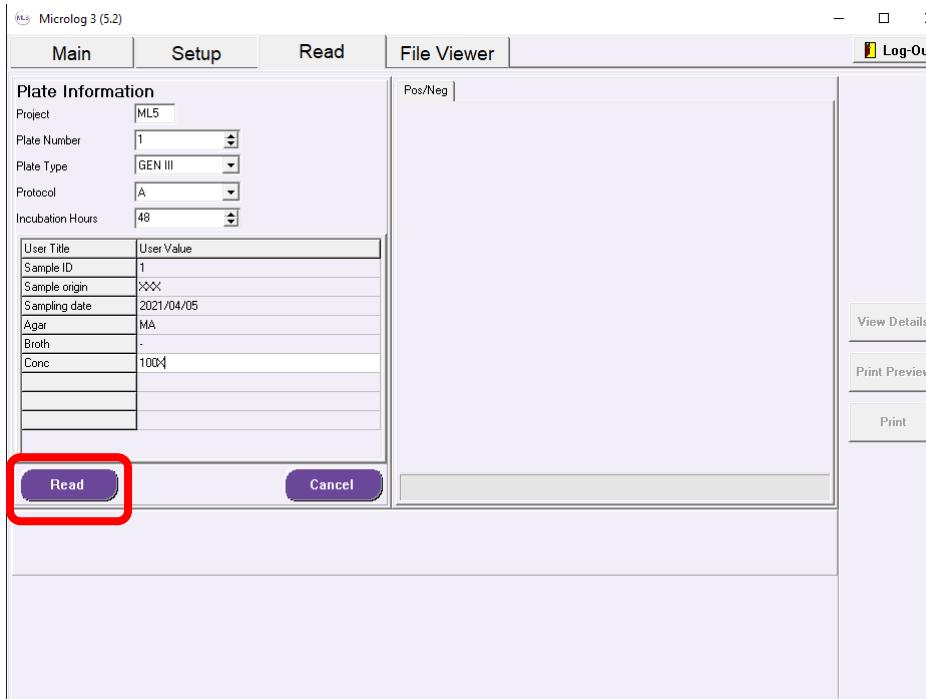
User Title	User Value
Sample ID	
Sample origin	
Sampling date	
Agar	
Broth	
Conc.	

8. 打開 reader 的蓋子，放入鑑定盤 (請注意別放反)，蓋上蓋子。

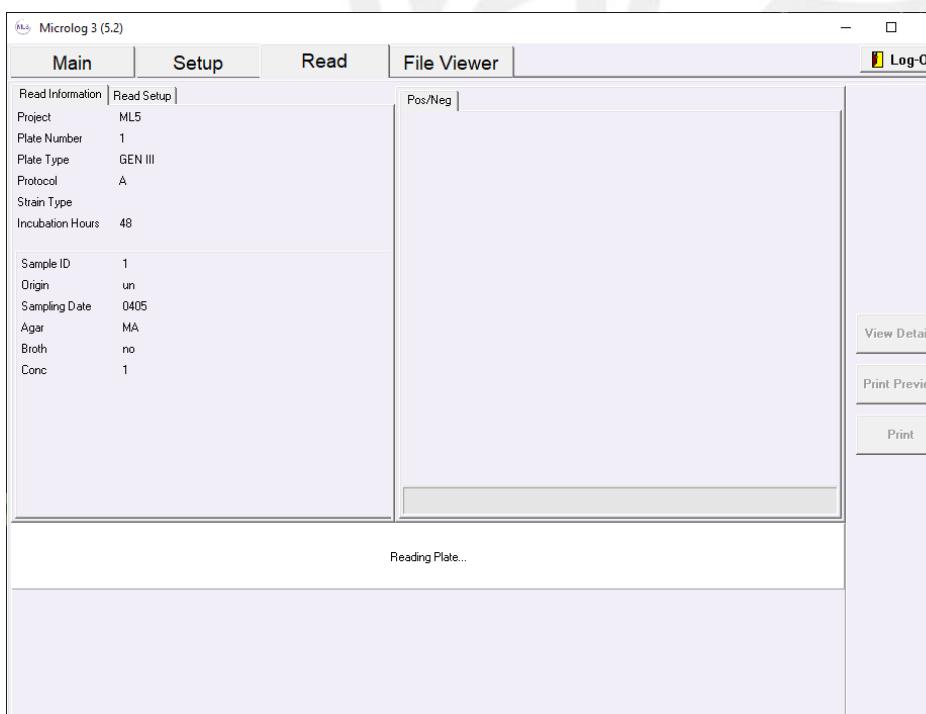




9. 放入鑑定盤之後，再按 read。



10. Reader 開始讀取鑑定盤，界面下方會顯示 “Reading Plate...” ，請耐心等待。





11. 完成讀取之後會出現以下界面，此為該鑑定盤讀取結果。

Species ID：代表最有可能的菌種（鑑定結果）

下面列表列出 4 種 prob 最高的結果。

Prob : Probability，代表是該菌種的可能性（若鑑定結果為 No ID，則 prob 不顯示數據）

Sim : Similarity，數據庫的標準反應結果與鑑定盤的反應結果相似度，代表鑑定結果的好壞，1 為最佳鑑定結果，0 表示未有鑑定結果。

Dist : Distance，代表鑑定盤 well 反應結果與資料庫比對而得之微生物之 well 標準反應結果的差異數。（exp : dist 為 7.401 代表鑑定盤內有 7 個 well 的結果與資料庫的標準結果不一致）

右側的圖代表鑑定盤每個 well 的反應結果，粉紅色為有反應（ $\geq 80\%$ positive），淺藍色代表反應較弱（20-80% positive），無色代表無反應（ $< 20\%$ positive），“+”和“—”代表鑑定盤反應結果與鑑定結果在資料庫的差異程度。

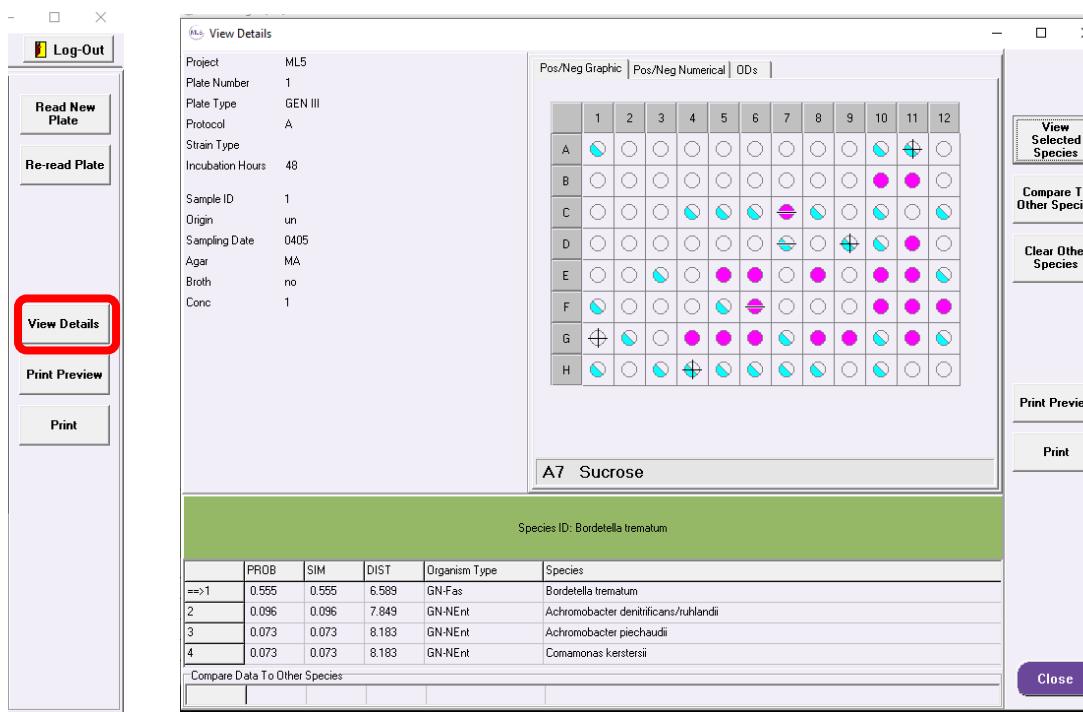
“+”代表該 well 在標準反應中應該要有陽性反應（大於 80% positive），“—”代表該 well 在標準反應中是陰性反應的（小於 20% positive）。



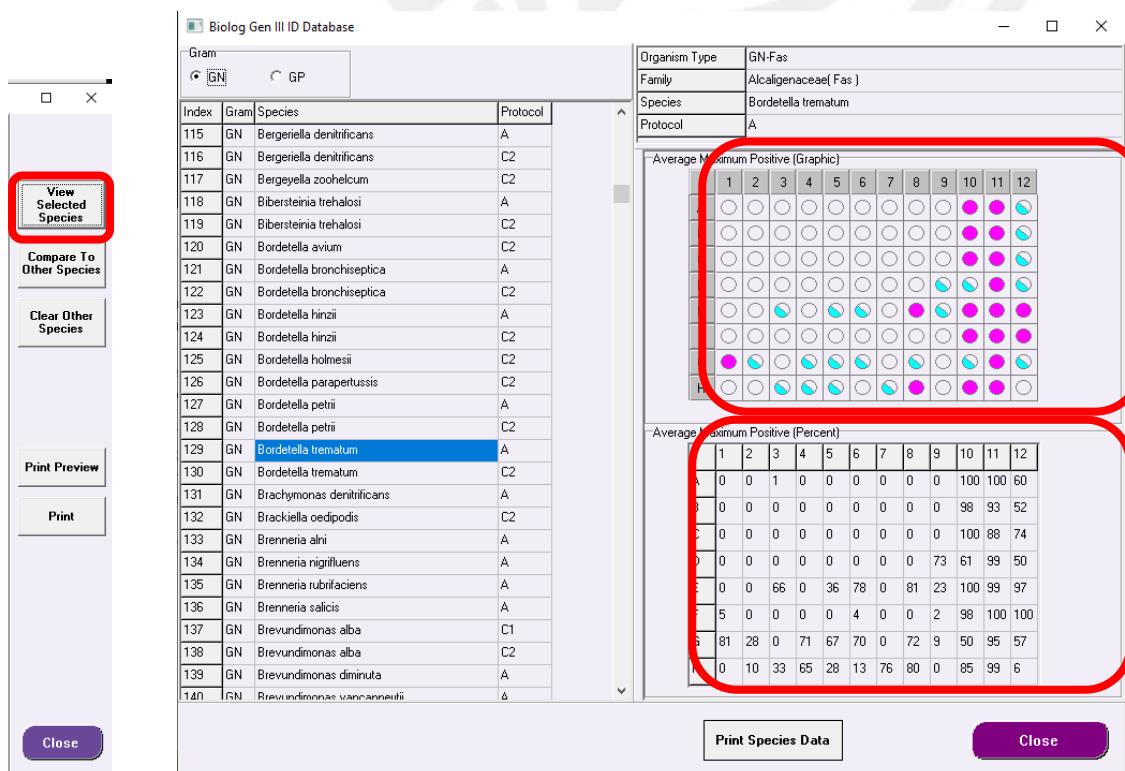


12. 點選右邊的 View Details，會進入以下界面。

點選每個 well 下面會告訴你這裡面是做什麼生化測試。



13. 點選右邊的 View Selected Species，會彈出下面的界面，給你知道鑑定結果的該菌種標準反應長怎樣。

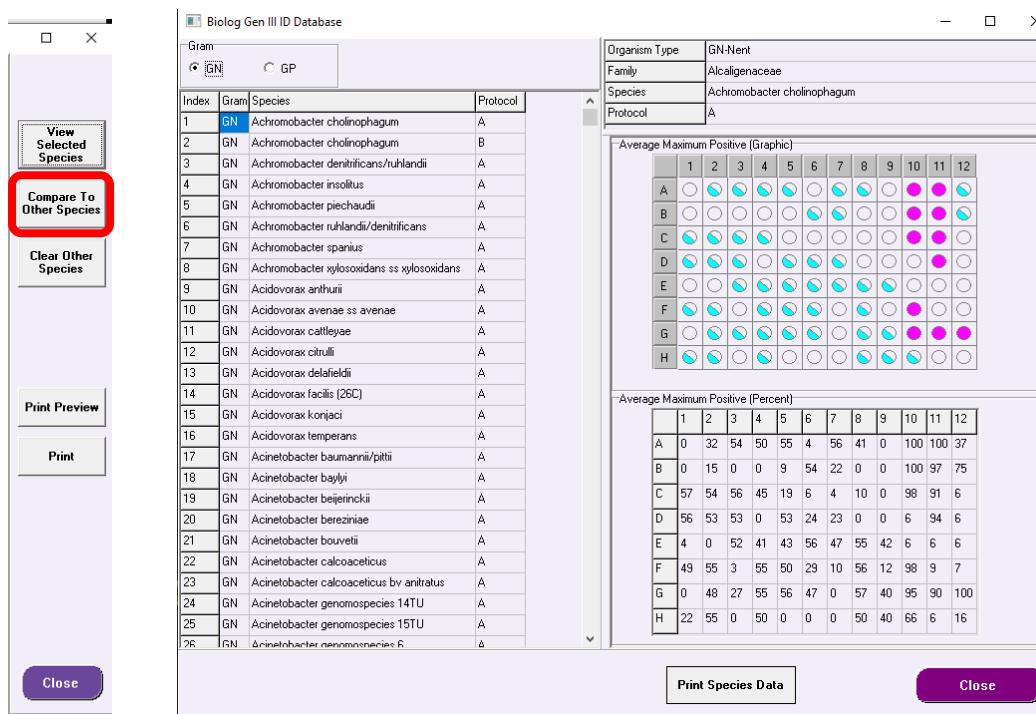


資料庫菌種的標準測試結果
(以顏色顯示)

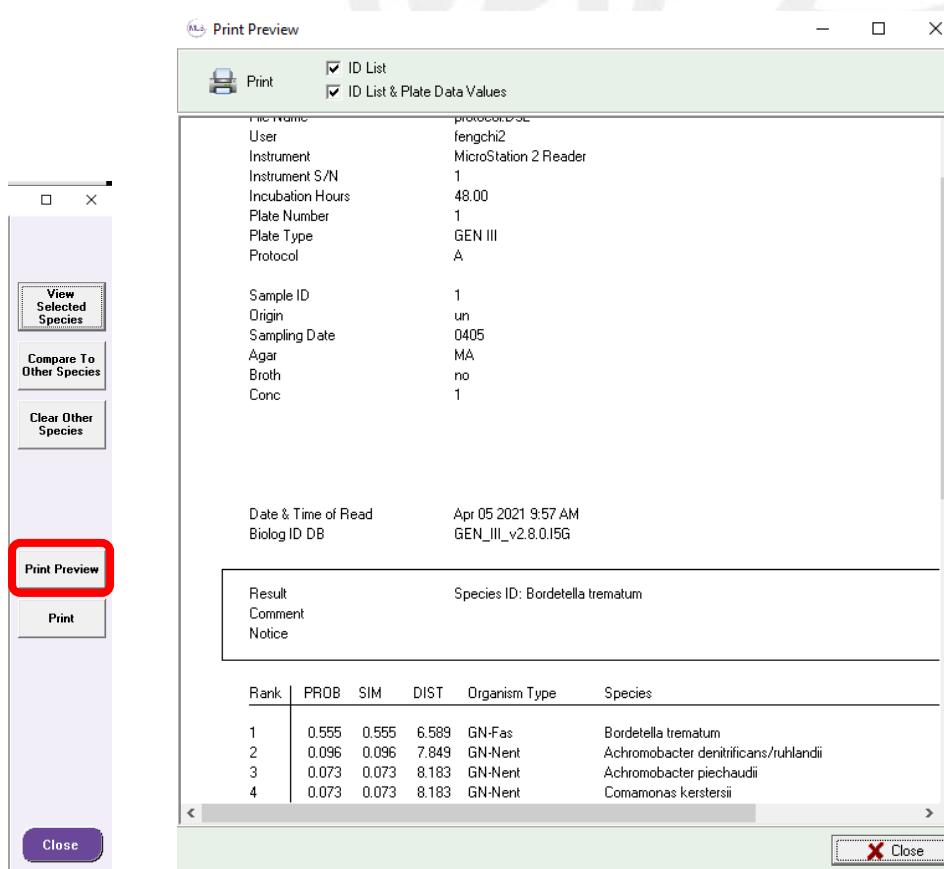
資料庫菌種的標準
測試結果
(以巴仙率顯示)



14. 點選右邊的 Compare To Other Species，會彈出以下界面，告訴你列表內剩下三個鑑定結果的菌種的標準反應長怎樣。

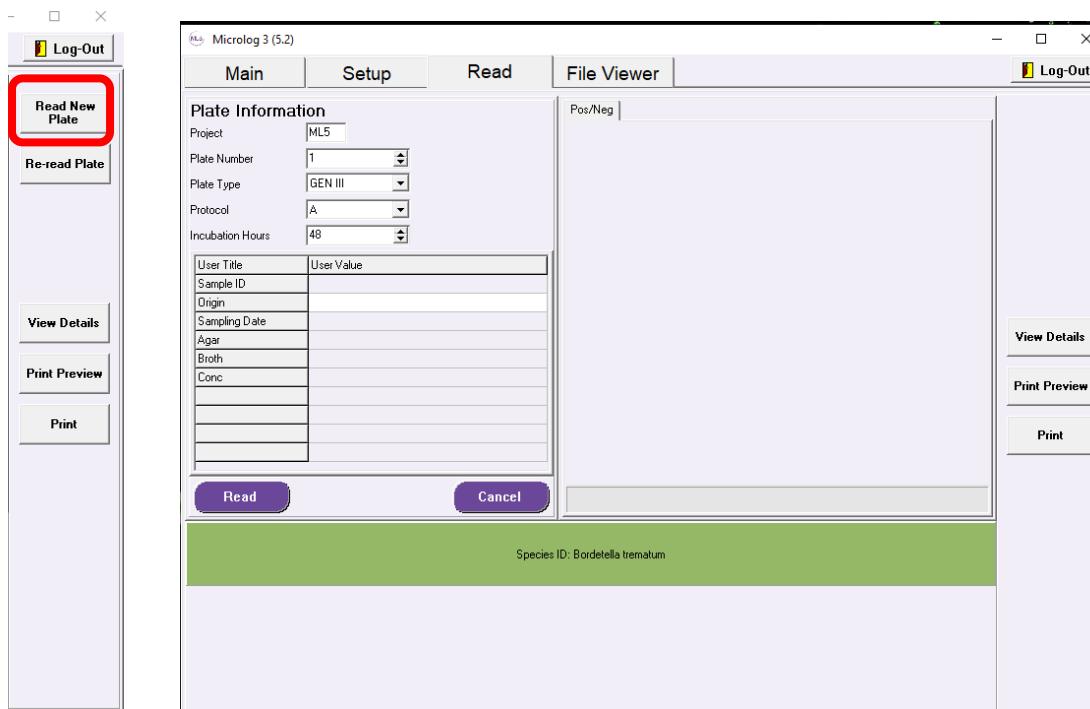


15. 點擊右邊的 Print Preview，會彈出以下界面，可以看印出來的報告長什麼樣子。

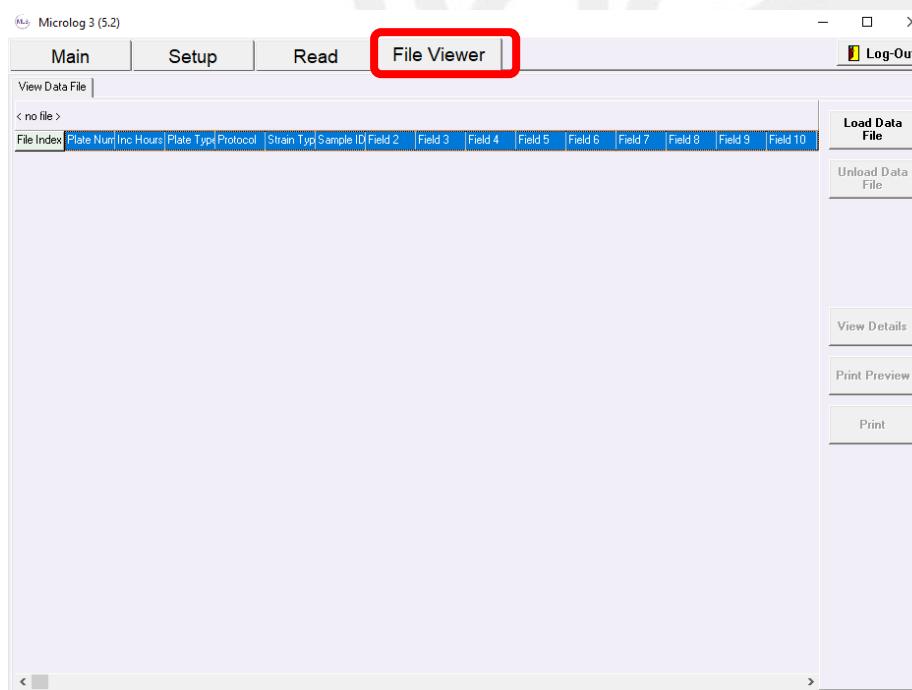




16. 點擊右邊的 Read New Plate，會彈出以下界面，可以輸入新資料，進行下一個鑑定盤的讀取。

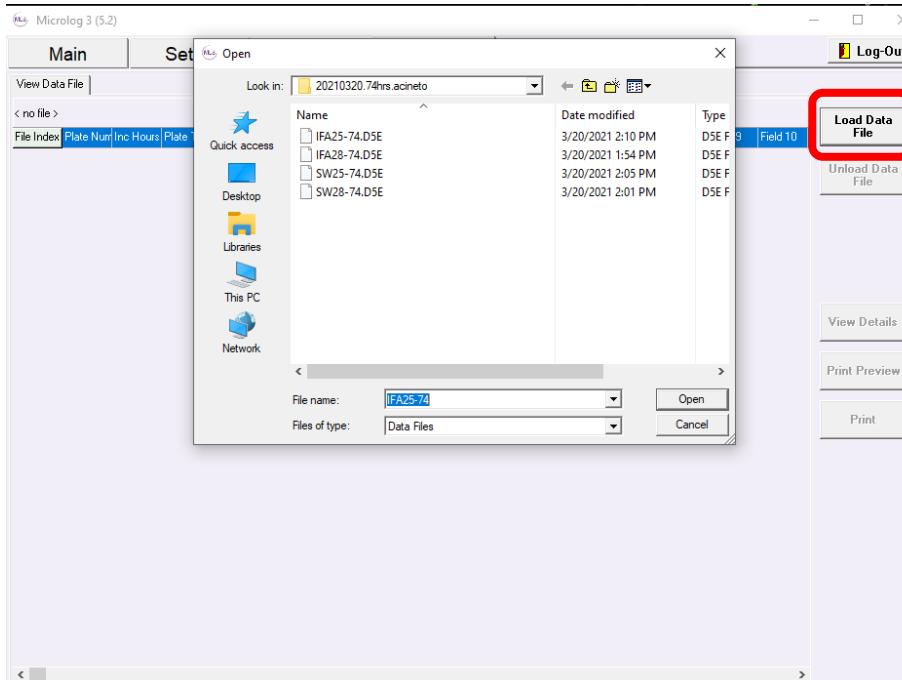


17. 點選 File Viewer，會進入以下界面。





18. 點選右邊的 Load Data File，會彈出以下畫面，點選你要開的文件（XXX.DSE）。



19. 完成之後，就會顯示以下界面，顯示你該文件內有多少筆數據。

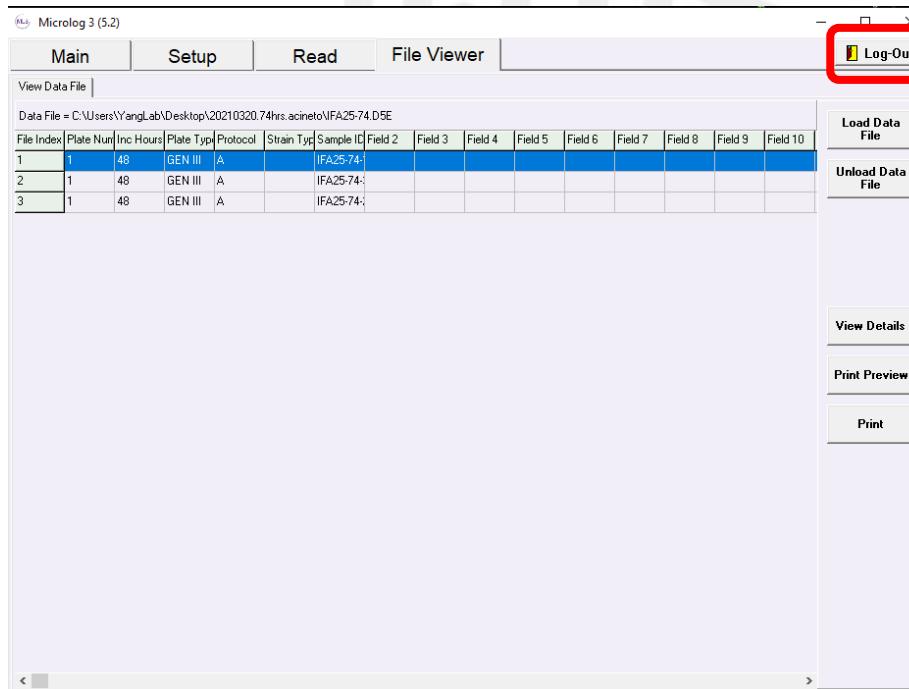
File Index	Plate Num	Inc Hours	Plate Typ	Protocol	Strain Typ	Sample ID	Field 2	Field 3	Field 4	Field 5	Field 6	Field 7	Field 8	Field 9	Field 10
1	1	48	GEN III	A		IFA25-74-									
2	1	48	GEN III	A		IFA25-74-									
3	1	48	GEN III	A		IFA25-74-									



20. 點選你要看的數據，就會彈出以下界面。



21. 使用完之後，回到主界面，點選右上角的 Log out 即可退出。





2.7. Ecoplate

Ecoplate 操作方法

By Yen-Chih , Lin

Materials:

1. Pipettor
2. 水樣
3. EcoPlate
4. 集液槽

Methods :

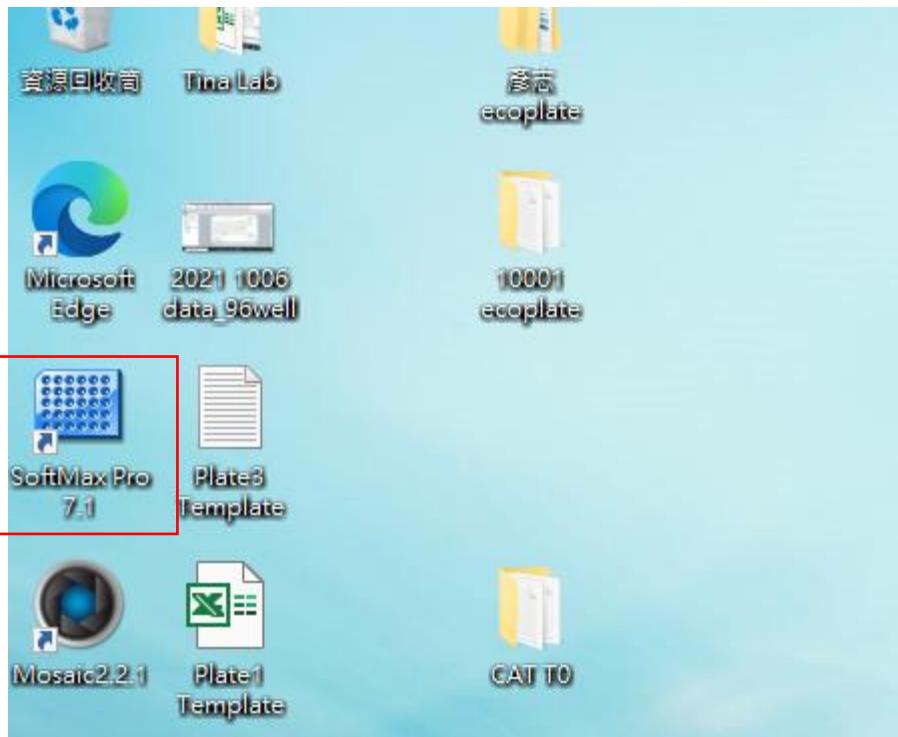
1. 將水樣倒入集液槽內，用 pipettor (八爪魚) 吸取 $100 \mu\text{l}$ 的水樣 (不要接觸到裡面的碳源) ，注入 EcoPlates 內(小心不要產生氣泡) (一共 96 孔) 。
2. 蓋上蓋子。
3. 在 EcoPlates 的側面註明樣品名稱、日期等等資訊，不要在蓋子上標示。

EcoPlates 培養：

1. 放入 25°C 培養箱培養直至 AWCD 最高值 (建議一周) 。

分光光度計讀取：

1. 先打開分光光度計軟體。

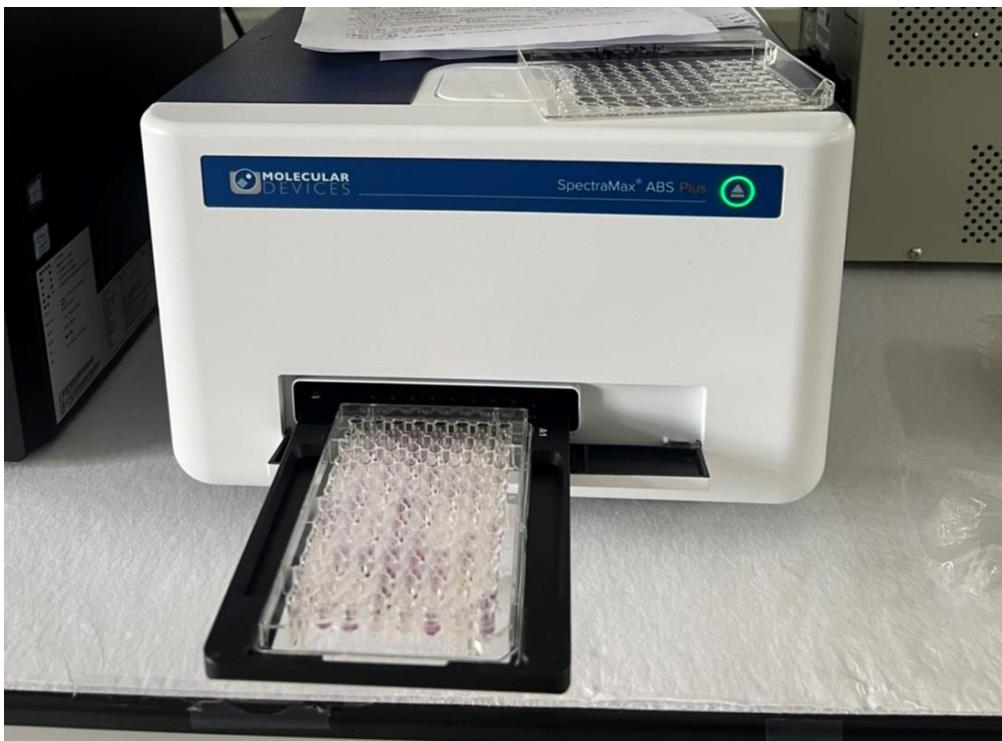


2. 打開分光光度計機器並確認與電腦有連線。

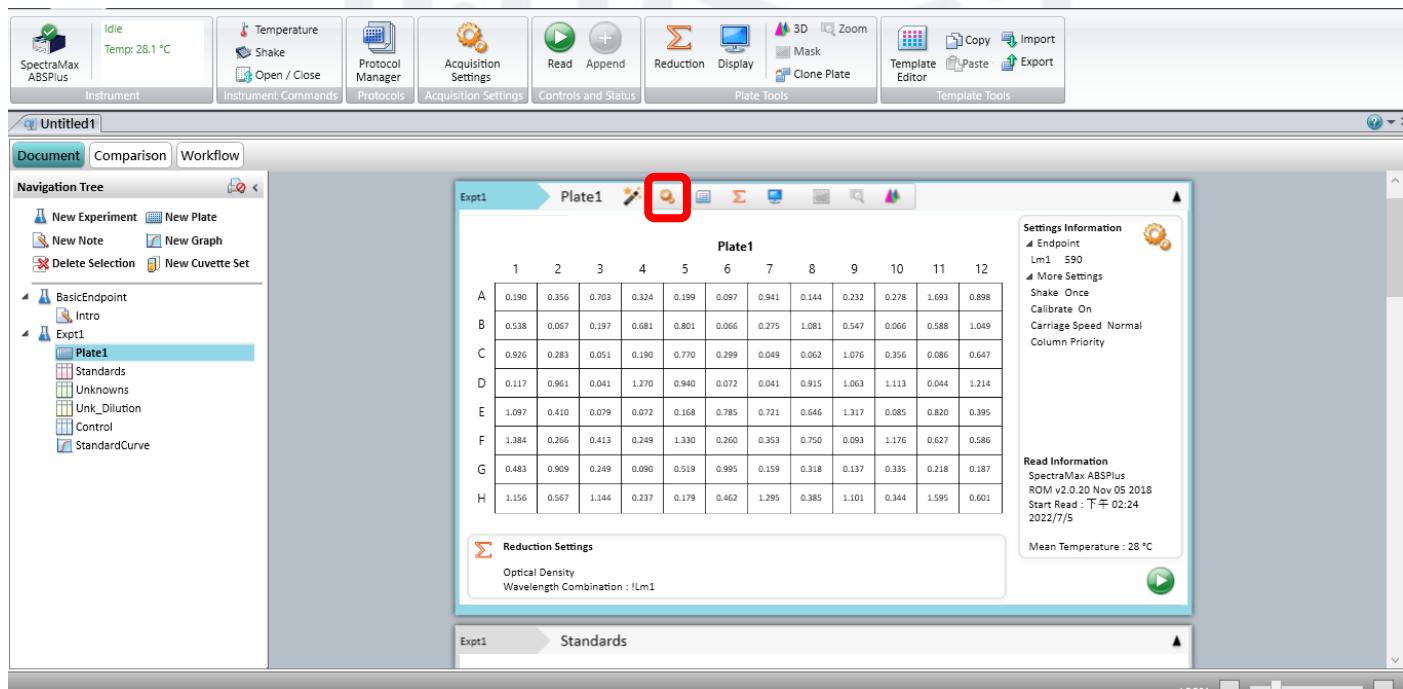
The screenshot shows the SoftMax Pro 7.1 software interface. The top menu bar includes tabs for Instrument, Temperature, Shake, Open / Close, Protocol Manager, Acquisition Settings, Read, Append, Reduction, Display, 3D, Zoom, Mask, Clone Plate, Template Editor, Copy, Import, Paste, Export, and Template Tools. The main window has tabs for Document, Comparison, and Workflow. The Navigation Tree on the left lists New Experiment, New Note, Delete Selection, BasicEndpoint, Intro, Expt1, Plate1, Standards, Unknowns, Unk_Dilution, Control, and StandardCurve. The central workspace displays a grid titled 'Plate1' with 12 columns labeled 1 through 12. The grid contains numerical values representing optical density measurements. A 'Reduction Settings' panel at the bottom shows 'Optical Density' and 'Wavelength Combination : !Lm1'. On the right, there are sections for 'Settings Information' (Endpoint Lm1 590, Shake Once, Calibrate On, Carriage Speed Normal, Column Priority) and 'Read Information' (SpectraMax ABSPlus ROM v2.0 20 Nov 05 2018, Start Read - 下午 02:24 2022/7/5). A message at the bottom right indicates a mean temperature of 28 °C.

讀取 EcoPlate :

1. 打開 Ecoplate 上蓋放入機器內。



2. 設定吸光值，先點選設定

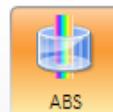


3. 點選 wavelengths，設定數值為 590nm。



Settings

Read Mode



X



Read Type



Category

Wavelengths

- Plate Type
- Read Area
- PathCheck
- Shake
- Speed Read
- More Settings

Wavelength Settings

Number of Wavelengths Lm1 590 nm

You can specify up to six different wavelengths. Type the wavelengths in the fields.

[More Information](#)

Settings Information

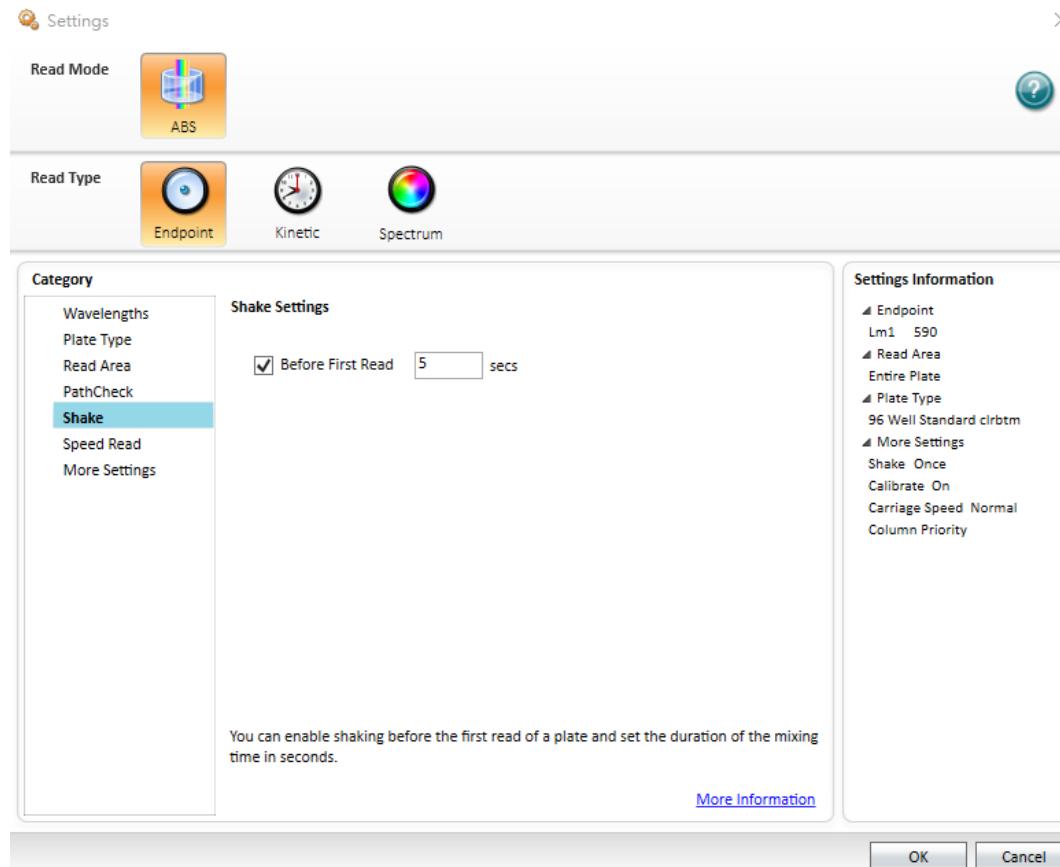
- Endpoint
Lm1 590
- Read Area
Entire Plate
- Plate Type
96 Well Standard clrbtm
- More Settings
Shake Once
Calibrate On
Carriage Speed Normal
Column Priority

OK

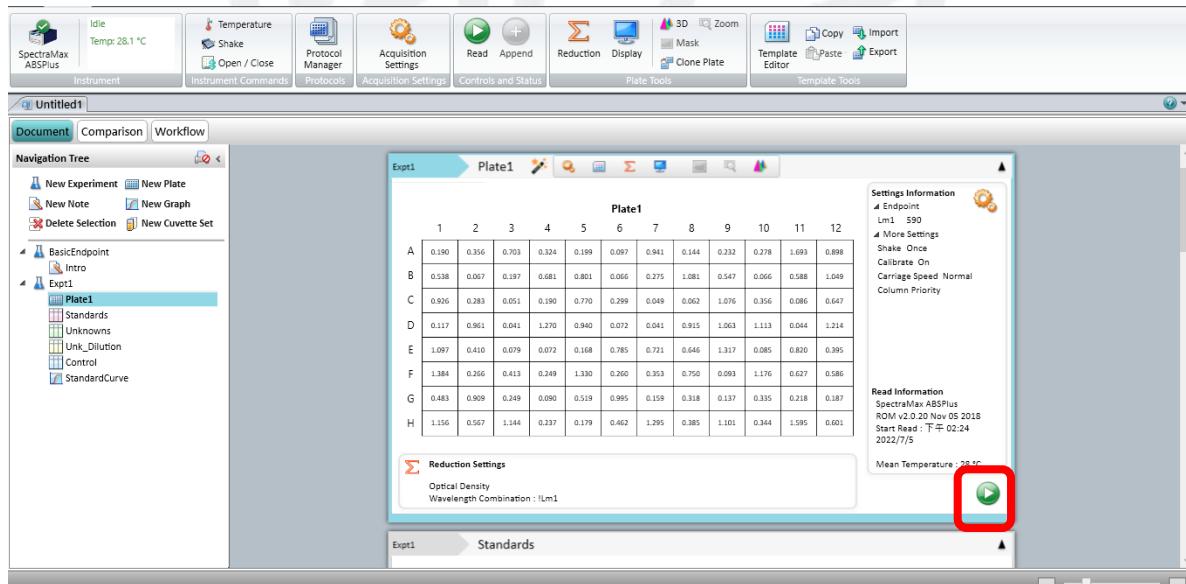
Cancel



4. 點選 Shake，設定測量前 shake5 秒。



5. 點選測量鍵開始測量。



6. 複製所有數值到記事本儲存。



7. 測量 750nm 吸光值。

Settings

X

Read Mode: ABS

Read Type: Endpoint, Kinetic, Spectrum

Category: Wavelengths, Plate Type, Read Area, PathCheck, Shake, Speed Read, More Settings

Wavelength Settings: Number of Wavelengths: 1, Lm1: 750 nm

You can specify up to six different wavelengths. Type the wavelengths in the fields.

More Information

Settings Information:

- Endpoint: Lm1 750
- Read Area: Entire Plate
- Plate Type: 96 Well Standard clrbtm
- More Settings: Shake Once, Calibrate On, Carriage Speed Normal, Column Priority

OK Cancel

8. 儲存數值到記事本。



3.1. Total DNA Isolations from Corals

3.1.1. Classical (CTAB) DNA Extraction

By Jia-Min Kao

改良自 “Current Protocols in Molecular Biology” 中“ Preparation of Genomic DNA from bacteria protocol”

Materials :

1. 1X TE buffer

Add 1 ml of 1M Tris-HCl (pH 7.5) in 98.8 ml MILIQ-water and then add 0.2 ml of 0.5M EDTA.

2. 10X TE buffer

Add 12.11 g of Tris-HCl (100mM) in 500 mL MILIQ-water and then add 3.722 g of EDTA (10mM). Adjust the pH up to 7.5 with NaOH(s), and then adjust volume to 1000mL.

3. 20 mg/ml proteinase K

4. Add 0.2 g of proteinase K in 10ml MILIQ-water.

5. RNase A

6. 10% SDS

Dissolve 20 g sodium dodecyl sulfate in MILIQ-water in a total volume of 200 ml with stirring.

7. 5M NaCl/6M NaCl

Dissolve 29.22 g (5M)/35.06 (6M) NaCl in 100ml MILIQ-water.

8. CTAB/NaCl solution

Dissolve 4.1 g NaCl in 80ml MILIQ-water and then add 10 g of CTAB with heating and stirring. Then adjust volume to 100 ml.

9. Chloroform/isoamyl alcohol(24:1) 毒性物質

10. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1) 毒性物質

11. Isopropanol

12. 70% Ethanol

13. MILIQ Water (sterilized)
14. water bath (先開至 37°C)
15. vortex
16. centrifuge

Methods :

1. 將製備好之樣本 transfer 到 2 ml tube 中。
2. pellet 用 567 μl 1X TE buffer 重新懸浮，加入 30 μl 10% SDS、3~5 μl RNase A，輕輕 vortex，水浴 37°C，60 mins。
3. 加入 3 μl proteinase K，Vortex，輕輕 vortex，水浴 50°C，30 mins。
4. 加入 100 μl 5M NaCl，快速混合均勻。
5. (使用寬口 tip) 加入 80 μl CTAB/NaCl solution，輕輕 vortex，水浴 65°C，10 mins。
- CTAB/NaCl solution 置於室溫，若結晶則水浴。
6. 加入 Chloroform/isoamyl alcohol 至 8 分滿(約 600 μl)，vortex，4°C，離心 12000 rpm，5 mins。
7. 取上清液至新的 tube，加入等比例(約 600 μl) phenol/chloroform/isoamyl alcohol(下層液)，vortex，4°C，離心 12000 rpm，5 mins。
8. 取上清液至新的 tube，加入 0.6 倍的 2-propanol (約 360 μl)，輕輕左右混勻三四次，直到液體由白色混濁狀變成透明狀，室溫離心 12000 rpm，5 mins。
9. 倒掉上清液，加入 70% 的 EtOH 300 μl，室溫離心 12000 rpm，5 mins，而後移除多餘酒精。
10. 將樣品開蓋靜置於無菌操作台，吹風乾燥約 30 mins。
11. 加入滅菌過的 1X TE buffer 或 ddH₂O，保存在 4°C 或 -20°C 冰箱裡。



3.1.2. DNeasy PowerSoil Kit DNA Extraction

By Jia-Min Kao

Materials :

1. DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN cat. # 12888)
2. dry bath (先開至 70°C) · vortex · centrifuge

Methods :

1. 取 sample 加入 PowerBead tube · 輕輕 vortex 均質化。
2. 加入 60 µl solution C1 反轉幾次混合。
- C1 若出現沉澱，於 60°C 加熱後使用。
3. 於 70°C 加熱 5 min · vortex 5 sec · 重覆 3 次。
4. 將 PowerBead tube 放置在大飛碟盤上以最高速 vortex 10 min。
5. 室溫離心 10,000 ×g · 30 sec。
6. 吸取 400-500 µl 上清液至新的 1.5 ml tube。
7. 加入 250 µl solution C2 · vortex 5 sec · 之後放置於 4°C · 5 min。
8. 室溫離心 10,000 ×g · 1 min。
9. 避開 pellet 吸取 600 µl 上清液至新的 1.5 ml tube。
10. 加入 200 µl solution C3 · vortex 5 sec · 之後放置於 4°C · 5 min。
11. 室溫離心 10,000 ×g · 1 min。
12. 避開 pellet 吸取 750 µl 上清液至新的 2 ml tube。
13. 加入 1.2 ml solution C4 · vortex 5 sec。
- C4 使用前先搖晃一下。
14. 取 675 µl 混合液注入 SpinFilter · 室溫離心 10,000 ×g · 1min · 移除濾液 · 重複 3 次直到沒有殘留液體
15. 加入 500 µl solution C5 · 室溫離心 10,000 ×g · 30 sec。
16. 移除濾液。
17. 室溫離心 10,000 ×g · 1 min。
18. 將 SpinFilter 移入新的 1.5 ml tube。



- 避免碰到任何殘留的 solution C5 。
19. 加入 30-50 μl ddH₂O 至濾膜中心上，於 50°C 加熱 30 min 。
- ddH₂O 可先拿出於 50°C 加熱
20. 室溫離心 10,000 $\times g$ · 30 sec · 移除 SpinFilter · DNA 即在管內 。
21. 以 5-10 μl 為單位分裝 DNA 後，保存在-20 或-80°C 。





3.1.3 DNA extraction (New kit)

By Hsuan-Tung Lin

Materials:

1. DNeasy PowerSoil Pro Kit (250) (QIAGEN cat. # 47016)

- Solution CD2 到達後應保存於2-8°C。
- Solution CD3若有沉澱物產生，可將其加熱至60°C，直到沉澱消失。

2. 經前處理過的樣本

Methods:

1. 將 0.25 g 的樣本與 800 μL Solution CD1 添加至 PowerBead Pro Tube，並 vortex 以均質化。

2. 於 70°C 加熱 5 min，vortex 5 sec，重覆 3 次。

3. 將 PowerBead Pro Tube 水平放置於大飛碟盤上，以最高速 vortex 10 分鐘。

(若於大飛碟盤放置超過12個樣本，可將時間再增加 5-10 分鐘)

4. 於 15,000 x g，離心 1 分鐘。

5. 吸取 500 – 600 μL 上清液至新的 2 mL tube。

6. 加入 200 μL Solution CD2，並 vortex 5 秒。

7. 於 15,000 x g，離心 1 分鐘。

8. 避開 pellet，吸取至多 700 μL 上清液至新的 2 mL tube。

9. 加入 600 μL Solution CD3，並 vortex 5 秒。

10. 取出 MB Spin Column，添加 650 μL 混合液，於 15,000 x g，離心 1 分鐘。

11. 移除濾液，重複步驟 9，直到所有混合液皆通過MB Spin Column。



12. 將 MB Spin Column 移至新的 2 mL tube。
13. 添加 500 μ L Solution EA，於 15,000 $\times g$ ，離心 1 分鐘。
14. 移除濾液，添加 500 μ L Solution C5，於 15,000 $\times g$ ，離心 1 分鐘。
15. 將 MB Spin Column 移至新的 2 mL tube。
16. 於 16,000 $\times g$ ，離心 2 分鐘。
17. 將 MB Spin Column 移至新的 1.5 mL tube。
18. 加入 30-50 μ L ddH₂O 至濾膜中心，並於 50°C 加熱 30 min。
(ddH₂O 可事先於 50°C 加熱)
19. 於 15,000 $\times g$ ，離心 1 分鐘，移除 MB Spin Column。
20. 將 DNA 保存在-20 或-80°C。



4.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1.1. Bacterial PCR Program (V6-V8 region)

By Jia-Min Kao

Bacterial 16S rRNA gene V6-V8 region (U968F & U1391R) PCR program.

Expected size: 424 bp.

Component (TaKaRa formular)	Volume (final concentration)		
1. sterilized ddH ₂ O	50 - () =	100 - () =	25 - () =
2. 10X Taq Buffer	5 (1X)	10	2.5
3. 2.5 mM dNTP Mixture	4 (0.8 mM)	8	2
4. 10 μM U968F	1 (0.2 μM)	2	0.5
5. 10 μM U1391R	1 (0.2 μM)	2	0.5
6. 5 U/μl Ex Taq	0.3 (1.5 U)	0.6	0.15
7. Template	__(<500 ng)	__(<500 ng)	__(<500 ng)
Total volume	50	100	25

Create / Select a PCR program (machine ____ directory ____)

Stage	Step	Temp.	Dwell Time	Cycles
1	Step 01	94 °C	5 min	1
2	Step 01	94 °C	30 sec	30
	Step 02	52 °C	20 sec	
	Step 03	72 °C	45 sec	
3	Step 01	72 °C	10 min	1
4	Step 01	10 °C	Hold	—



4.1.2. Bacterial PCR Program (whole 16S)

By Jing-Wen Michelle Wong

Bacterial whole 16S rRNA gene (U27F & U1492R) PCR program. Expected size: 1466 bp.

Component (TaKaRa formular)	Volume (final concentration)		
1. sterilzd ddH ₂ O	50 - () =	100 - () =	25 - () =
2. 10X Taq Buffer	5 (1X)	10	2.5
3. 2.5 mM dNTP Mixture	4 (0.8 mM)	8	2
4. 10 μM U27F	1 (0.2 μM)	2	0.5
5. 10 μM U1492R	1 (0.2 μM)	2	0.5
6. 5 U/μl Ex Taq	0.3 (1.5 U)	0.6	0.15
7. Template	__(<500 ng)	__(<500 ng)	__(<500 ng)
Total volume	50	100	25

Create / Select a PCR program (machine____directory____)

Stage	Step	Temp.	Dwell Time	Cycles
1	Step 01	94 °C	5 min	1
2	Step 01	94 °C	30 sec	30
	Step 02	52 °C	20 sec	
	Step 03	72 °C	45 sec	
3	Step 01	72 °C	10 min	1
4	Step 01	10 °C	Hold	—



4.1.3. Eukaryotic PCR Program (ITS1F & ITS4)

By Chien-Yi Wu

Fungus primer-PCR program (ITS1F & ITS4. Expected size:)

Create / Select a PCR program (machine ____ directory ____)

Stage	Step	Temp.	Dwell Time	Cycles
1	Step 01	94 °C	5 min	1
2	Step 01	94 °C	30 sec	
	Step 02	48 °C	30 sec	
	Step 03	72 °C	60 sec	
3	Step 01	72 °C	10 min	1
4	Step 01	10 °C	Hold	—

5.1. Nucleic Acid Purification

5.1.1. Gel Extraction by QIAEX II Gel Extraction Kit

By Jia-Min Kao

Materials :

3. QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN cat. # 20051)
4. water bath (先開至 50°C) · vortex · centrifuge

Methods :

I. 跑電泳及切膠

1. 製作新鮮的 agarose gel · loading 時 sample 不可溢出，避免造成汙染，以未曾使用過的 1X TAE buffer 跑電泳，可設定較低電壓長時間。
2. 開藍光照膠並用乾淨刀片將目標 DNA 的 gel 切下裝入 1.5 ml tube · 切完後可用 UV 光照膠確認切割位置無誤，先將 tube 扣重，以稱得 gel 重量。

II. 純化

1. 依 gel 的重量加入不同容量的 QXI Buffer。
 - 每 100 mg gel 加入 300 µl QXI Buffer。
2. 依 sample DNA 的濃度加入不同容量的 QIAEX II Buffer。
 - QIAEX II Buffer 使用前先 vortex 30 sec。

≤ 2 µg DNA	10 µl QIAEX II
2-10 µg DNA	30 µl QIAEX II
each additional 10 µg DNA	additional 30 µl QIAEX II

3. 放置於 50°C · 10 min · 直到 gel 完全溶解。每 1-2 分鐘 vortex 一次，保持 QIAEX II 懸浮於液體中。
 - 確認混合液體為黃色 ($\text{pH} \leq 7.5$)，若為橘色、紫色 ($\text{pH} > 7.5$)，則需加 10 µl 3M sodium acetate ($\text{pH} 5.0$) · 混合均勻 · 並再次放置至少 5 分鐘，直到顏色轉為黃色。
4. 室溫離心 13,000 rpm · 1 min · 並用 pipet 小心移除上清液。
5. 加入 500 µl QXI Buffer 後 vortex 以 wash pellet。



6. 室溫離心 13,000 rpm · 1 min · 並用 pipet 小心移除上清液。
7. 加入 500 µl PE Buffer 後 vortex 以 wash pellet。
8. 室溫離心 13,000 rpm · 1 min · 並用 pipet 小心移除上清液。重複步驟 7、8。
9. air-dry pellet 25-30 min 或者更久，直到變成不透明白色，但不可 overdrying。
10. 加入 30 µl 的 10 mM Tris-Cl 或 TE buffer 或 ddH₂O (確定此溶劑的 pH 7.0-8.5) elute DNA · vortex 後依 DNA 的片段大小在不同溫度靜置。

≤ 4 kb DNA	室溫 (15-25°C) · 5 min
4-10 kb DNA	50°C · 5 min
> 10 kb DNA	50°C · 5 min

11. 室溫離心 13,000 rpm · 1 min · 避開 pellet 吸取上清液至新的 1.5 ml tube · DNA 即在管內。
 - 可重複步驟 10、11 · 增加 DNA 產量約 10-15%。
12. 以 5-10 µl 為單位分裝 DNA 後 · 保存在-20 或-80°C。

6.1. DNeasy Powersoil Kit DNA Extraction (English Version)

By Emma Chen

Methods:

1. Add g sample to *PowerBead tube*, gently vortex to mix
 1. 0.3-0.5g for soft coral, ≤0.3 for hard coral
 2. For bacteria → a loop full
2. Add 60μl C1, invert several times to mix
 1. If C1 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves
3. Heat tubes at 70°C for 5min, then vortex for 5 sec → repeat 3x
 1. ***after this, set dry heat bath to 50°C*
 2. During this free time: can preemptively add C2, C3, C4 to Epps (see note at end of protocol)
4. Vortex tubes @ max speed (10) for 10min
5. Centrifuge @room temp: 10,000 x g, 30sec
 1. Small centrifuge takes time to get up to speed — if using this one, pick 10,000 x g, 1 min program (takes ~30 sec to get to 10,000)
 - i. In display: pick the correct program
 2. Large centrifuge: don't need to pick longer program
 - i. Can't pre-set programs, no need to check and adjust each time used. Also, only allows for times to be set in increments of 1 min, so set 30-sec protocols to 1min instead
6. Add 500μl of sample to 1.5ml Epp tube
 1. Take only clear part (not bottom/bubbles)
 2. Can toss PowerBead tubes after this
7. Add 250μl C2 to the tubes, vortex 5 sec (if not already added)
8. Put tubes in 4°C fridge for 5 min



1. Can leave them in there for ~30min-1hr if you wanna take a break — just write down how long you left them in fridge
9. Then centrifuge at room temp: 10,000 x g, 1min
10. Avoiding pellet, take 600µl supernatant → into 2nd 1.5ml tube
11. Add 200µl C3 (if not already added), vortex 5 sec, in 4°C fridge for 5min
 1. Same thing as pre-C2 addition*****
12. Centrifuge @room temp: 10,000 x g, 1 min
13. Avoiding pellet, take 750µl supernatant → into 2ml tube
 1. If not enough, just stop and DON'T take pellet
14. Add 1.2 ml C4 to 2ml Epp tube (if not already added), vortex 5 sec
 1. B/c it's over 1ml, just add 0.6µl twice
 2. **Shake C4 before use (good to shake other C solns too before use)
15. Load 675µl into a *SpinFilter*, centrifuge @room temp at 10,000 x g, 1min → DO THIS 3 TIMES
 1. After each time, empty the bottom level of spin filter
16. Add 500µl C5, centrifuge @room temp 10,000 x g, 30sec, then empty bottom level
17. Centrifuge @room temp 10,000 x g, 1min
18. Put SpinColumn into a *new 1.5ml tube*
 1. Avoid touching any remaining C5
19. Add 30µl ddH₂O right onto center of filter (right on top b/c there's just a tiny bit of it)
 1. Get ddH₂O from 4°C fridge (can be taken out earlier and put into 50°C to warm up)
20. Put them on 50°C heat dry bath for 30min
21. Centrifuge at room temp for 10,000 x g, 30 sec
22. Take out the SpinFilter & toss it, DNA should be in the bottom tube
23. Get 4 10µl Epp tubes per sample



1. Add 6.0μl of DNA sample into each 10μl Epp
 2. There's ~30μl per tube, so the last one will be more than 6μl (just put in the rest of it)
24. Store in -20°C or -80°C freezer





6.2. QIAEX II Agarose Gel Extraction (English Version)

By Emma Chen

Methods:

1. Take pics of all gels (GE samples & \oplus/\ominus control) → place back into plastic molds, bring to small room

In small room:

2. Slide gel out of plastic mold onto clear board, turn on light
 - a. Use orange shield to see gel bands (look from directly above to avoid cutting wrong part of gel)
3. **Cut each GE sample** (big band) out of gel
 - a. Use one disposable knife per GE sample → back into wrapper to dispose of it
 - b. Cut long sides first, then short sides, as close to the illuminated parts as possible
 - i. Make sure you cut deeply/fully so it comes out smoothly (w/o tearing)
4. Stab gel diagonally from the top long side to pick it up → place **into a 1.5ml Epp tube**

In hood/bench:

5. Add **700μl Q1** to each tube
 - a. Can take 1-2hr break after this step *only* if needed (samples → 4C fridge)*
6. Gently **vortex** the Q2 for ~30sec (due to its viscosity) → vortex @3.5
7. Add **10μl Q2** to each tube
 - a. Add this volume b/c we're working w/ $\leq 2\mu\text{g}$ DNA
8. Places tubes in floater divide in the **50C water bath** for **12 min** total
 - a. (official protocol = 10 min, JiaMin always does 12 min instead)

- b. Invert couple times every 1-2 min (in lieu of vortexing, as official protocol calls for)
 - c. After 12 min: make sure it's fully dissolved (not in bits) → dry off w/ paper towel
9. Centrifuge at 13,000 rpm / 2 min
- a. (official prot says 1min, JiaMin always does 2min for centrifuge steps)
 - b. Pipette out as much supernatant as possible (set pipette to ~700μl)
10. Add 500μl Q1, gently vortex
11. Centrifuge at 13,000 rpm / 2 min
- a. Pipette out as much supernatant as possible
12. Add 500μl PE Buffer, gently vortex
- a. PE Buffer comes as powder → 1st user must add ethanol (from kit, see volume on label), date it
13. Centrifuge at 13,000 rpm / 2 min
- a. Pipette out as much supernatant as possible
14. Add another 500ul PE Buffer
- a. ***DON'T VORTEX***this time!! → invert a couple times to wash pellet, BUT *ensure pellet's intact!!!*
15. Centrifuge at 13,000 rpm / 2 min
- a. Pipette out as much supernatant as possible (use blue then yellow pipettes to get it all out)
 - i. Will help air-drying proceed more quickly
16. Air-dry pellets: set tubes upside down on rack, place over airflow at the back of the hood for 25-30 min
- a. Place ddH₂O into 50C dry OR water bath to warm up for next step
 - b. ***Avoid over-drying!!!*** → set timer for 25 min, check → if not dry yet, wait another 5 min
 - i. When dry: pellets should be white (not translucent), w/ clearly defined edges



17. After dry: add 35µl ddH₂O
 - a. Can add 30µl or 35µl depending on which samples used (for QianYi' s → add 35µl)
18. Leave in hood for 30 min, gently vortex
 - a. Can leave at room temp b/c we're working w/ ≤ 4kb DNA (V6-V8 region = 424bp)
 - b. (official prot says 1min, JiaMin always does 30min) → BUT can leave ~1hr if need a break*
19. Centrifuge at 13,000 rpm / 2 min
 - a. DNA will be in the supernatant!!
20. End up w/ 20+µl supernatant, pipette it into two 10µl tubes, avoiding the pellet!!
 - a. One 10µl = 20µl, other 10µl = the rest of the volume
21. Measure DNA quality & concentration w/ NanoDrop

Store in -80C fridges on 2nd floor



6.3. Gas Chromatography (GC) 使用流程

By Michelle Wong Jing Wen

Methods:

1. 開機

-一般開機需要 20-30 min，故可以提早在實驗前就開好等待。

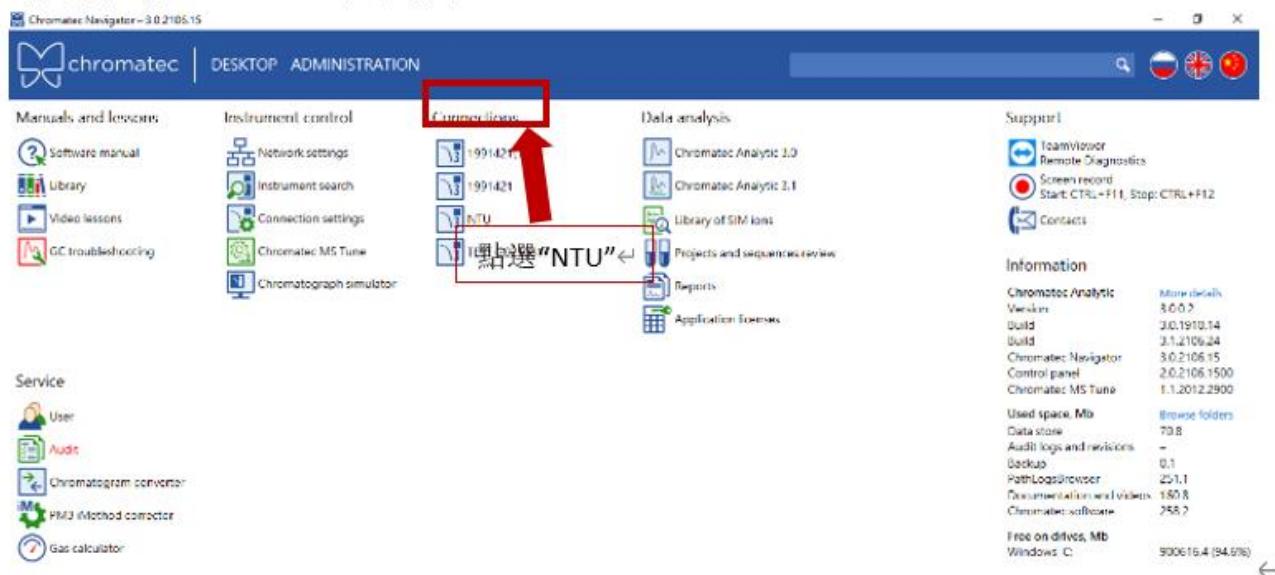
-開機須注意 GC 的三個開關次序。←



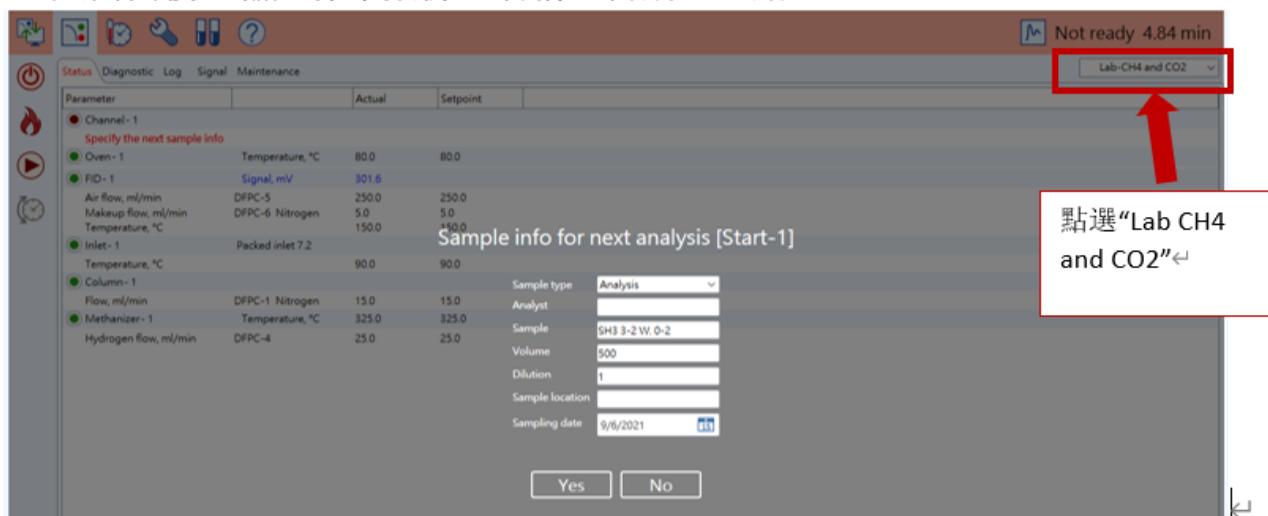


2. 開始實驗

-打開軟件 ，進入頁面。



-進入頁面後，輸入樣本數據（名稱、日期），點選“YES”。



-看到右上角顯示“Not Ready”，等待直到轉成“Ready”後再開始實驗。





-針筒抽屜內，取出並且插入樣品中取 $500 \mu\text{L}$ 樣本。←

←

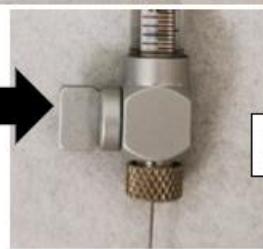


取樣本方式: ←

先開閥，垂直插入血清瓶
中，取 $500 \mu\text{L}$ ，再關閥←



這樣為打開←



這樣為關閉←



此刻閥為關
閉狀態，樣
本在內不會
漏出來←

-將樣本注入 GC，開始分析（每個樣本分析時間為 6 min ）。←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←

←



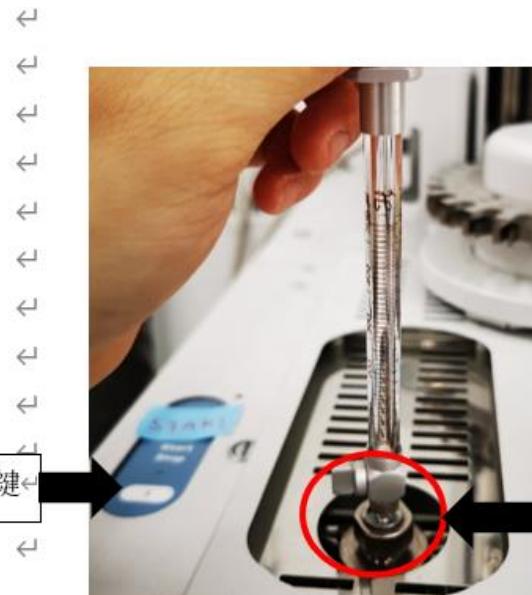
注入樣本的地方在此←

（內有墊片，用久了會有泄漏的問題，
需定期更換）←



墊片 be like: ←





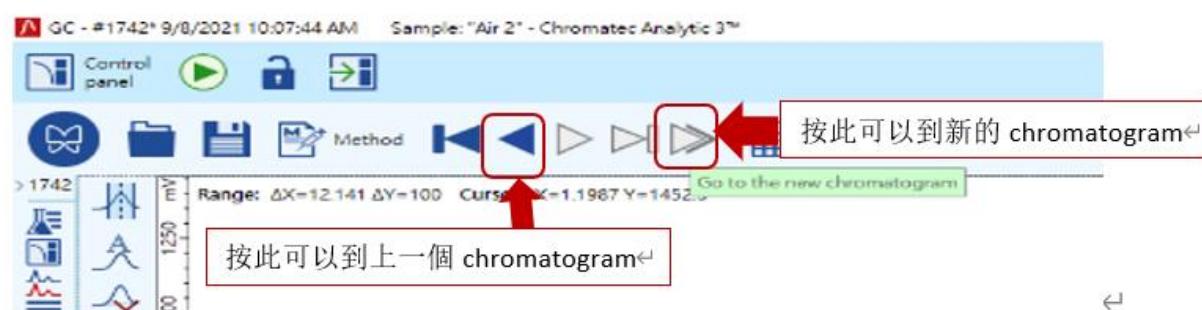
注入樣本時手指要抵着活塞柄，因為剛注入時會有負壓產生（有回推的感覺）。 ↵

將針頭插到底，注入樣本後即可按開始，再把針頭拔出 ↵

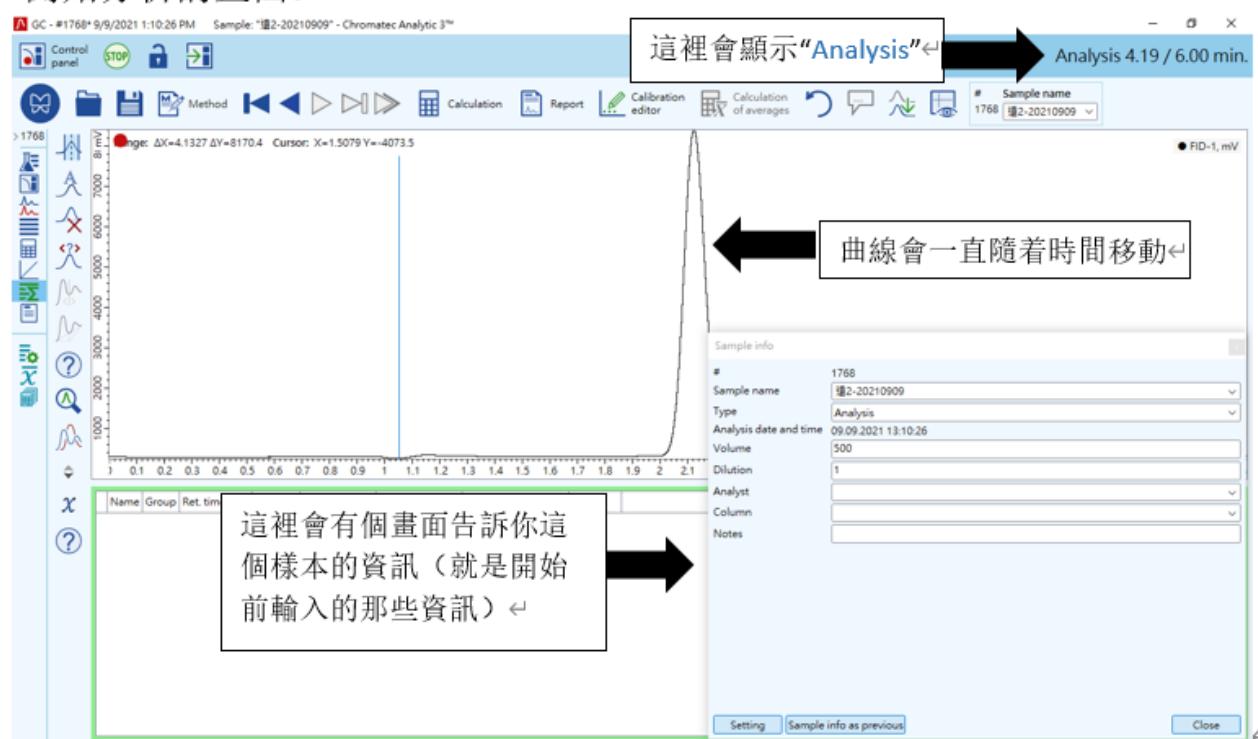
針頭插入後要打開閥 ↵



-開始後的畫面： ↵

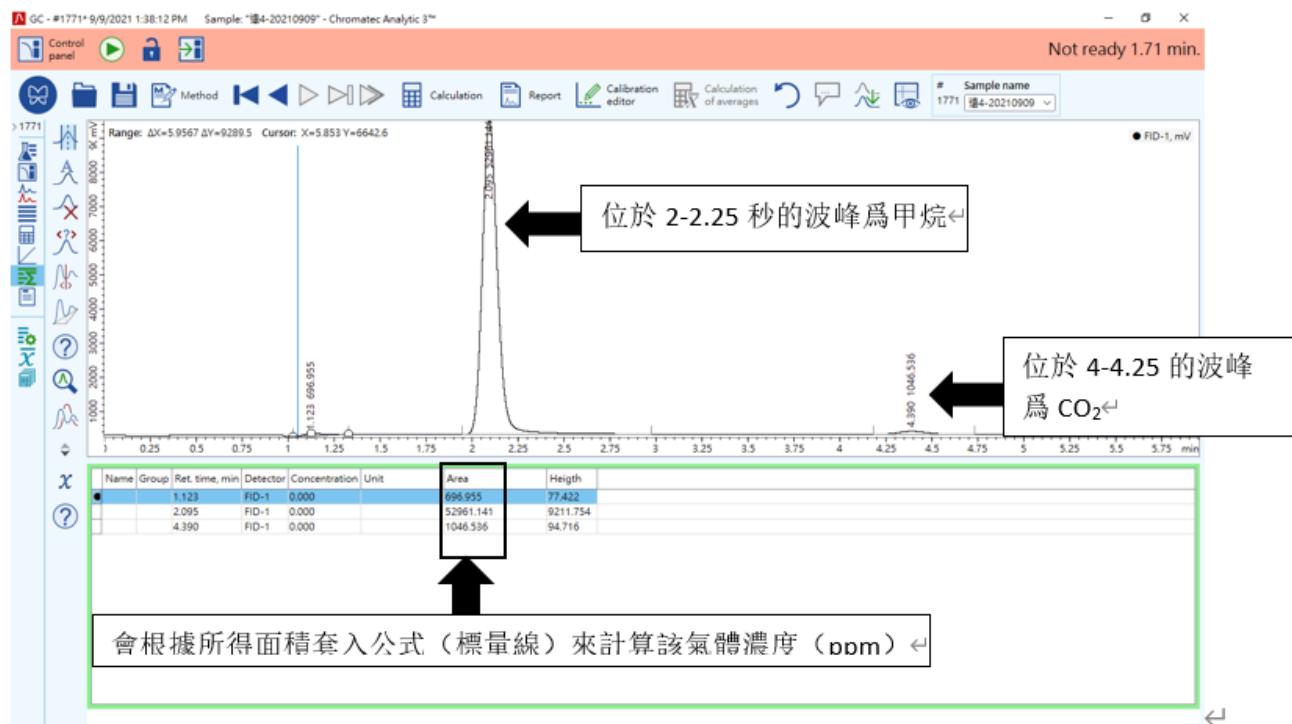


-開始分析的畫面： ↵





-跑完後的畫面: ↵

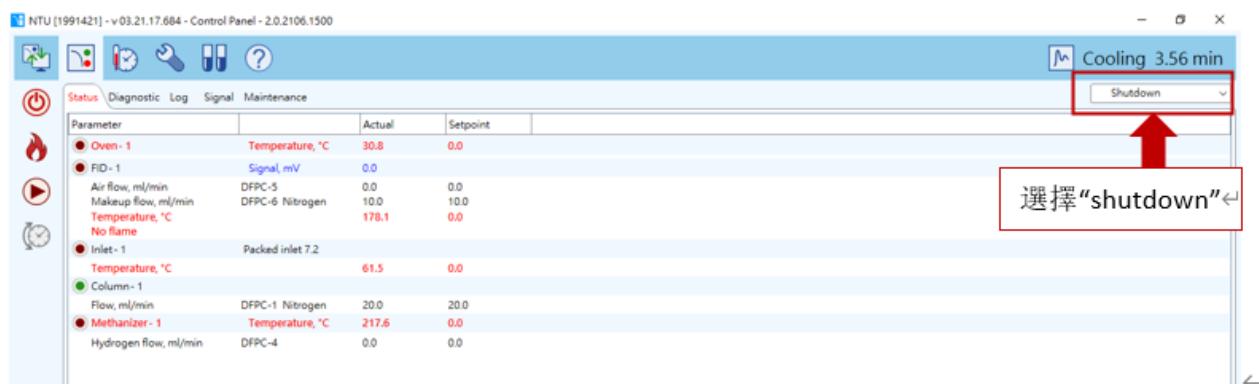


3. 關機 ↵

-關機分為兩階段: ↵

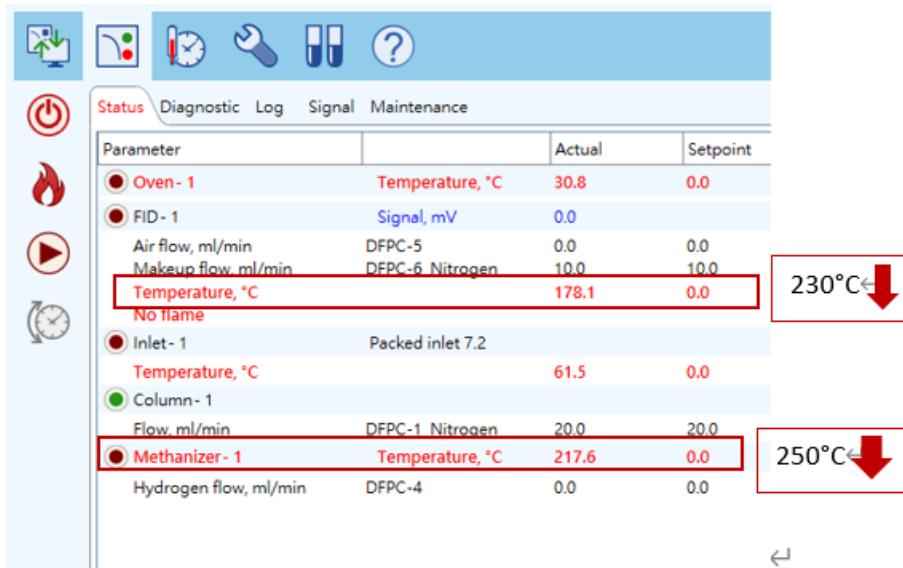
第一階段=>shutdown (FID-1 降溫至 230°C, Methanizer-1 降溫至 250°C) ↵

第二階段=>cooling down (FID-1 降溫至 150°C, Methanizer-1 降溫至 100°C) ↵





NTU [1991421] - v 03.21.17.684 - Control Panel - 2.0.2106.1500

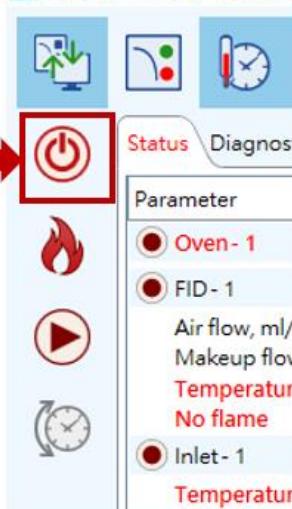


←

-待降溫至指定溫度後，開啓第二階段降溫。←

NTU [1991421] - v 03.21.17.684 - Control Panel - 2.0.2106.1500

點選此按鈕
進入下個頁面 ←



NTU [1991421] - v 03.21.17.684 - Control Panel - 2.0.2106.1500

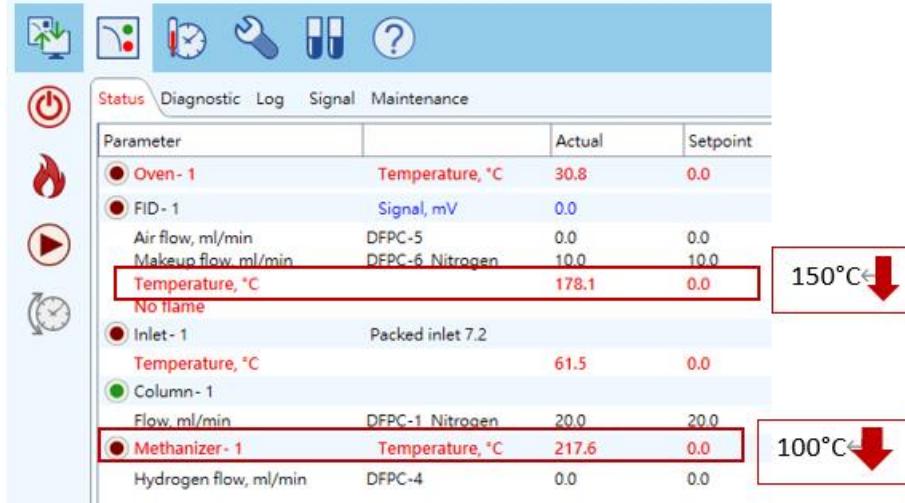


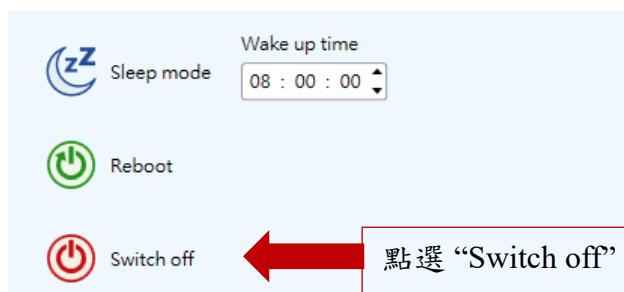
←

←

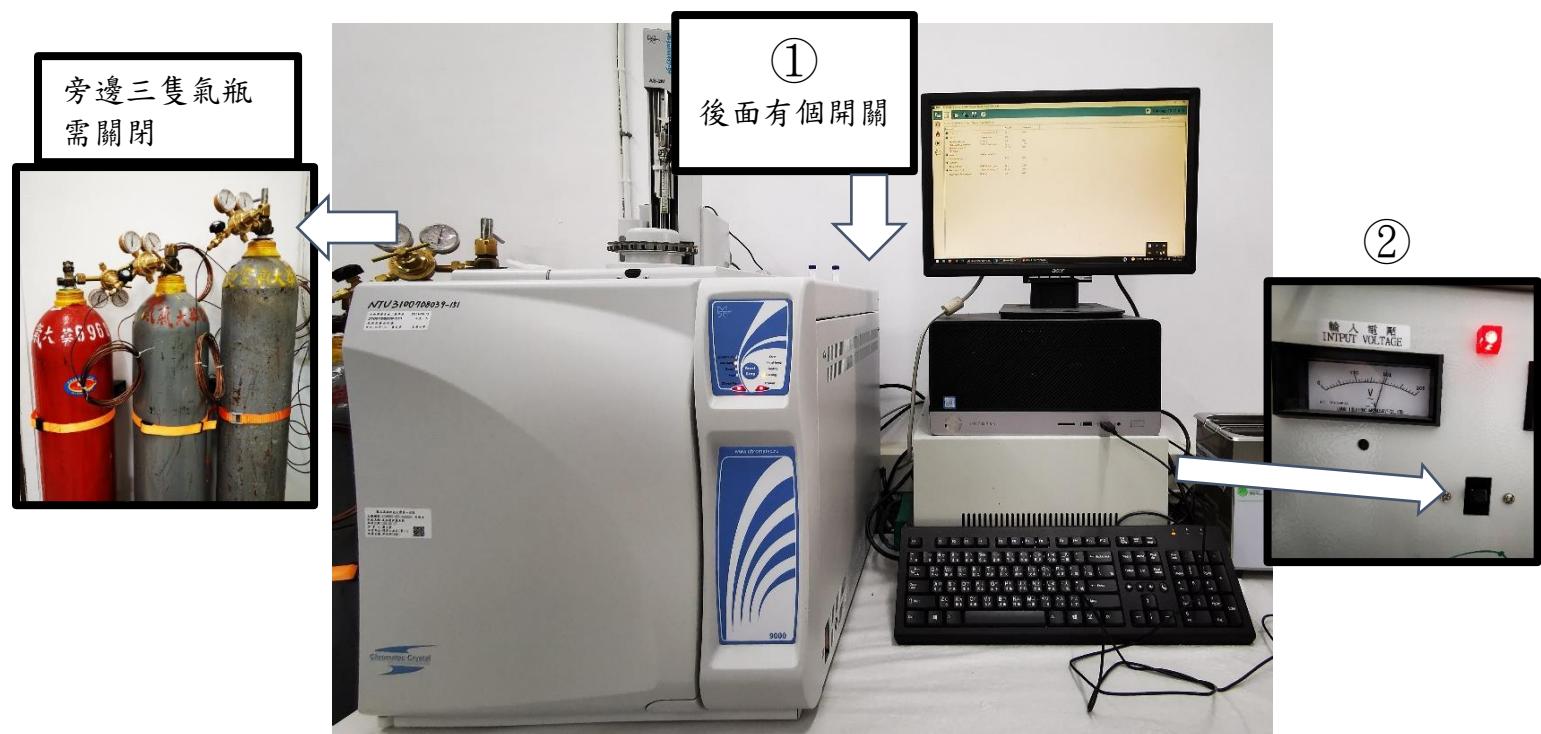
-待降溫至指定溫度後，即可關機。←

NTU [1991421] - v 03.21.17.684 - Control Panel - 2.0.2106.1500





-關機須注意 GC 的兩個開關次序。





6.4. Stable Isotope Probing (SIP) 技術

By Michelle Wong Jing Wen

Materials :

1. 1.5 mL 离心管
2. 垂直离心管
3. 加热器
4. 恒流泵
5. 干浴槽
6. GB buffer
7. CsCl solution
8. PEG6000 solution
9. 70% ethanol

Methods :

超高速離心前置作業：

1. 進行 7-14 天的 cultivation 。
2. 預約生科館三樓 TechComm 的超高速離心機使用時段 。
3. 實驗所需 15 mL 离心管、1.5 mL 离心管需事先滅菌備用 。
4. gradient buffer (GB) 、CsCl solution 、PEG6000 solution 、70% ethanol 需事先配製 。
5. 垂直離心管需稱重，取 16 管重量相似的做實驗（這樣才能 balance ）。



樣本準備：

1. 超高速離心機每輪可放 16 個樣本，離心 44 小時，加上減速 2 小時，一共 46 小時，由於後續分層純化工作需要非常多時間，故上機時間需仔細規劃，留足夠時間做後續實驗。
2. 每個樣本的 total DNA 要 $2 \mu\text{g}$ ，代表每個樣本的 DNA 濃度約 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，總體積為 $90\text{-}100 \mu\text{L}$ 。
 - DNA 濃度最好別相差太多，如果太高，取的體積太低，就需要加入大量 GB，會導致折射率降低。
 - 如果 DNA 濃度太低，可以在抽 DNA 時進行濃縮。
3. 加入 $100 \mu\text{L}$ DNA 到新的 15 mL 離心管（若 DNA 體積不足 $100 \mu\text{L}$ ，則加入適量 GB 讓體積達到 $100 \mu\text{L}$ ）；加入 4.9 mL CsCl 及 0.9 mL GB，此時總體積為 5.9 mL 。將樣本進行劇烈 vortex 1 分鐘讓溶液充分混合均勻。
 - Total DNA 本身非常重，容易沉澱在離心管底部，故吸取時可以先 vortex 一下並且 pipeting 數次使 DNA 在溶液中混合均勻。

GB 和 CsCl 為黏性流體，可讓 DNA 不易移動，如此便可確保在高速離心時 DNA 不會全都甩到管壁上，而是根據 DNA 分子的重量來進行分層。

由於 buffer 是黏性流體，故不易混合均勻，所以 vortex 是為了確保 DNA 能夠均勻分布在 buffer 中，後續才不會因 DNA 都堆積在某一處而在取 5.1 mL 到垂直離心管時根本只有少量或沒有 DNA 在其中。
4. 測試樣本的折射率（取 $3\text{-}4 \mu\text{L}$ ），確保折射率在 1.4029 ± 0.0002 範圍內。若折射率太高，加入適量 GB 降低折射率；若折射率太低，加入適量 CsCl 提高折射率。
 - 校正時滅菌水折射率為 1.3329 ± 0.0002 。
5. 將針筒的活塞拔掉，針頭插入垂直離心管內（針頭傾斜靠着管壁，可以減少氣泡產生）；將樣本倒入針筒，讓其緩緩流入離心管內，裝到管口中間位置即可，垂直離心管體積為 5.1 mL 。
 - 確保千萬不要有氣泡在離心管內！會影響實驗結果。
 - 垂直離心管不能做任何標記，會影響其重量。故在實驗過程中需自行記得或在置放離心管的架子上做標記確保每個位置所對應的樣本是什麼。
6. 使用加熱機將管口封住，再用鐵製夾子將管口夾緊。
 - 鐵製夾子使用前需要稱重。

7. 將裝填好的垂直離心管進行稱重，確保每一管的重量都要相同至小數點後三位；如果無法做到每一管都一樣重量，至少對稱的兩兩樣本需要相同至小數點後三位。

- 壓緊每個管蓋確保不會漏出來。
- 若不即時離心可把樣本放入冰箱暫存。



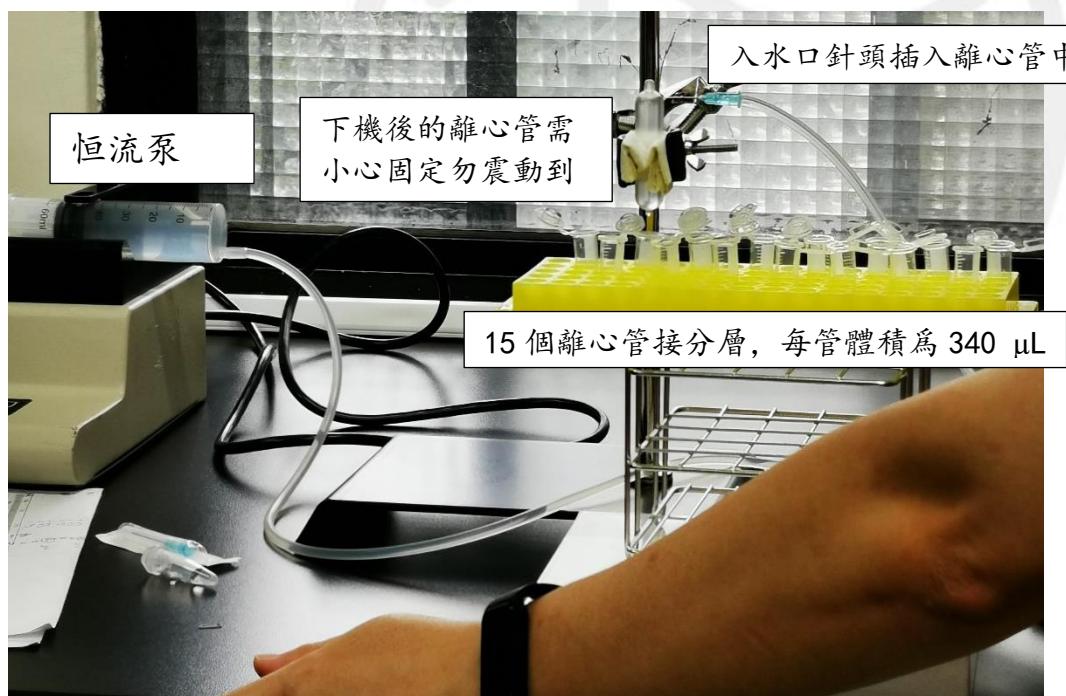
超高速離心機上機：

1. 將樣本及 rotter 運到生科館三樓的 TechComm，進行超高速離心 $190000 \text{ xg}/45000 \text{ rpm}$ ， $44 \text{ hrs} \cdot 20^\circ\text{C}$ 。降速需要大約 2 hrs ，故總時長為 46 hrs 。

- 上機時間最好在中午 12. 之前，如此兩天後大約 10. 即可下機進行分層及純化（由於樣本多，此步驟最耗時間，因此需估算好自己是否可以有一整天的時間來處理這些樣本）

分層：

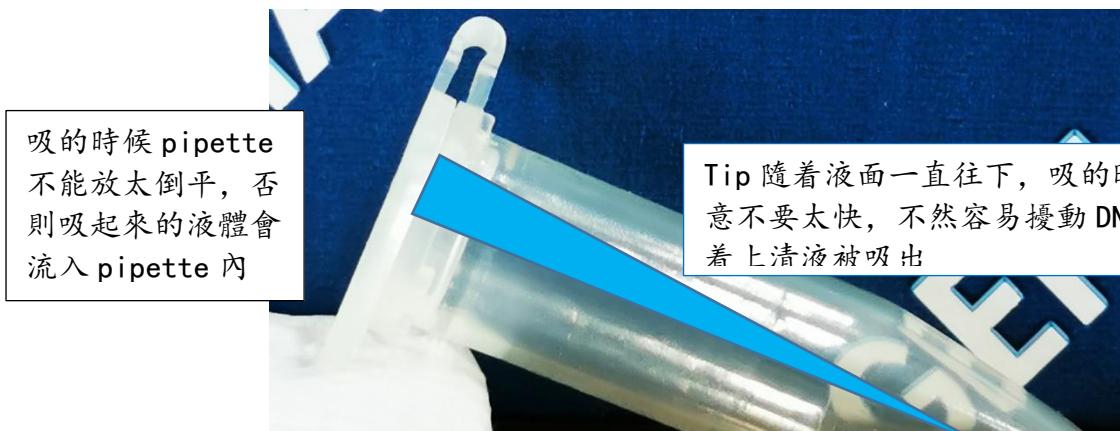
1. 樣本下機後，將樣本固定在鐵架臺上。準備 15 個 1.5 mL 離心管，並且標好順序。
2. 將恒流泵的入水口針頭扎入離心管肩部，針頭切面向上抵住管壁。
3. 在離心管底部扎一個小孔，通過調整恒流泵的流速，控制每個離心管收集 340 μL ，一共 15 管（也就是把樣本分成 15 層）。
 - 可以調成 1.02 mL/min，每 20 s 就有 340 μL ；也可以根據自己的需求調整流速。恒流泵通過固定流速在離心管內灌入水讓樣本分層被推動而從底部流出。
 - 這裡一定要非常專注，千萬別分心而導致每管離心管內的體積不同。
 - 注意：由於我們是從下方收集，所以編號為 1 的第一管其實是最後第 15 層，也就是編號越大，層數越小，重量越輕。
4. 測試樣本的折射率，通常折射率會隨著分層而下降，從最開始第一層（約 1.4）到後面第 12、13 層下降成約 1.3 多左右。
5. 最後每個樣本都會有 13 個分層樣品（第一層和最後一層不要）。





純化：

1. 先打開干浴槽，設置 37°C 預熱。
2. 在每層樣品中加入 550 μL PEG6000 溶液，用手倒置 3-5 次混合均勻（切勿 vortex），放入 37°C 干浴槽加熱 1 hrs。
 - PEG6000 溶液最多可放樣品體積的兩倍。此溶液為有機溶劑，可幫助 DNA 沉降下來。
3. 在 15-20°C 下離心 13,000 xg · 30 min。
4. 離心後先別把所有樣本取出放在離心管架上，先讓其繼續留在離心機內呈現傾斜的狀態，如此 DNA 才不會因為受到震盪而移動。
5. 先用 1000 μL 的 pipette（調整到 850 μL），吸取大部分的上清液。注意 tip 要隨著液面往下走。再用 200 μL 的 pipette（調整到 100 μL）吸取剩餘的上清液。
 - 1000 μL 的 tip 可以重複使用，但是 200 μL 的 tip 需要每吸一管換一個。
6. 加入 500 μL 70% ethanol 清洗 DNA 沉澱，再離心 13,000 xg · 10 min。
7. 移除上清液，重複步驟 6。
 - 先用 1000 μL 的 pipette（調整到 420 μL），吸取大部分的上清液。注意 tip 要隨著液面往下走。再用 200 μL 的 pipette（調整到 100 μL）吸取剩餘的上清液。
 - 此步驟可以進一步去除 CsCl（會 degrade DNA）及 PEG 6000 solution。
8. 將離心管打開蓋子，靜置在室溫下 30 min，讓殘留液體揮發乾淨。
 - 不要靠近風大的地方，會很容易把 DNA 吹走；確保風乾的環境是乾淨無灰塵的（可以在 laminar flow 內靜置）。
9. 用 30 μL 的 TE buffer 溶解 DNA，vortex 使其混合均勻。
10. 測 DNA 濃度後，放在-20°C 保存。



液體儘量吸掉，大概看到有點溼潤就可以了，但是切記勿碰到 DNA 所在位置

DNA 所在地方
(我們無法用肉眼看到有 pellet 所以要)



Tip 最多可到達這裡，再往下就會碰到 DNA 了



7.1. 使用 R 做圖及整理生物資訊分析結果

By Shu-Shuo Yeh

使用R做圖 及整理生物資訊分析結果

製作人：葉書碩

Email: samuel27921919@gmail.com

台大漁科所404 楊姍樺老師實驗室

前言

- ◆ 此篇主要是關於如何利用R studio來整理前面分析產生的 OTU table 及Taxonomy table
- ◆ 做圖方法因人而異，很多方法都可以做到相同的結果，這之間的差異取決於個人的美感還有細膩程度，這邊只會介紹一些常見的方法，可以多利用網路的資源去做改進



大綱

- ◆ R、R studio的安裝及更新
- ◆ 資料的前處理
- ◆ 匯入資料
- ◆ 整理匯入的資料
- ◆ 做圖
- ◆ 輸出資料及圖片

R、R studio的安裝及更新



R 的安裝前置作業

- 點選以下連結 <https://cran.r-project.org>
- 選擇 CRAN 底下的 Mirrors
- 找到離你所在地最近的國家（以台灣為例）點下面的連結



Taiwan

<https://cran.csie.ntu.edu.tw/> ←

National Taiwan University, Taipei

R 的安裝與更新

- 跳轉到新的右面之後上面會有三個選項
- 選擇自己的作業系統
- 點進去之後選擇最上面的base
- 下一個頁面就會有下載點，選擇最新版進行下載安裝

Download and Install R
Precompiled binary distributions of the base
one of these versions of R:

- [Download R for Linux](#)
- [Download R for \(Mac\) OS X](#)
- [Download R for Windows](#)

Subdirectories:

[base](#)

[contrib](#)

[old_contrib](#)

[Rtools](#)

3

[Download R 4.0.3 for Windows](#) (85 megabytes, 32/64 bit)
[Installation and other instructions](#)
[New features in this version](#)

4

[R-4.0.3.pkg](#) (notarized and signed)
SHA1-hash: 8402f586aeffdb12c6e34c73b286f87318fb1be
(ca. 85MB)

4



R studio的安裝與更新

- 點選以下連結 <https://rstudio.com/products/rstudio/download/>
- 下拉會看到以下畫面，選擇自己電腦的版本下載並安裝

All Installers				
OS	Download	Size	SHA-256	
Windows 10/8/7	RStudio-1.4.1103.exe	156.96 MB	c3384189	
macOS 10.13+	RStudio-1.4.1103.dmg	152.77 MB	20148bd6	
Ubuntu 16	rstudio-1.4.1103-amd64.deb	119.26 MB	f0857e27	
Ubuntu 18/Debian 10	rstudio-1.4.1103-amd64.deb	120.30 MB	76864349	
Fedora 19/Red Hat 7	rstudio-1.4.1103-x86_64.rpm	138.02 MB	8fc2b2d9	
Fedora 28/Red Hat 8	rstudio-1.4.1103-x86_64.rpm	138.01 MB	e2bf11e9	
Debian 9	rstudio-1.4.1103-amd64.deb	120.45 MB	4a4d159c	
OpenSUSE 15	rstudio-1.4.1103-x86_64.rpm	122.02 MB	fdc33ff7a	

Windows 用戶的另一個更新方法

- ◆ 可以到以下網站看看如何用 R studio 更新 R
- ◆ <https://www.r-statistics.com/2015/06/a-step-by-step-screenshots-tutorial-for-upgrading-r-on-windows/>

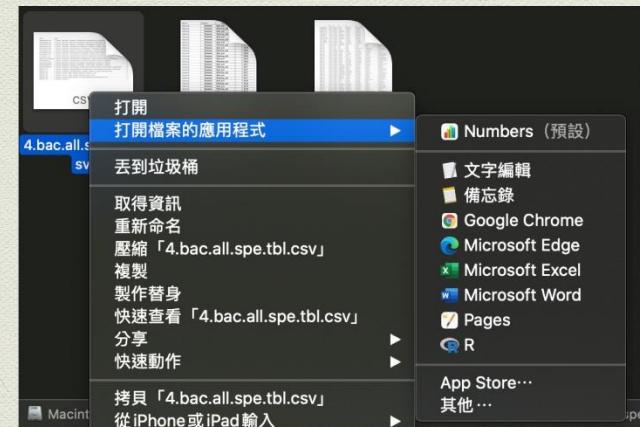


資料的前處理

9

OTU table

- ◆ 選擇 OTU table 的.csv 檔
- ◆ 右鍵選擇用 Excel 開啟





OTU table

◆ 將 Species 整列刪去

◆ 記得存檔

A	B	C	D
OTU.ID	Species	D001-16S	D002-16S
1 AAAA02042586.1650.3157	d_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Sphingobacteriales;f_Sphingobacteriaceae;g_Sphingobacterium;g_Sphingobacterium;s_Sphingobacterium_	0	0
2 AAAA02048270.689.2185	d_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Flavobacteriales;f_Flavobacteriaceae;g_Flavobacterium;g_Flavobacterium;s_Flavobacterium_	0	0
4 AACY020170354.114.1617	d_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Chitinophagales;f_Chitinophagaceae;g_Chitinophagum;g_Chitinophagum;s_Chitinophagum_	0	0
5 AACY020170993.10.1544	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Delta proteobacteria;o_Deltaproteobacteria;f_Deltaproteobacteria;g_Deltaproteobacteria;s_Deltaproteobacteria_	4	0
5 AACY023372270.147.1550	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gamma proteobacteria;o_Gammaproteobacteria;f_Gammaproteobacteria;g_Gammaproteobacteria;s_Gammaproteobacteria_	0	0
5 AACY02342050.90.1593	d_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Cytophagales;f_Cytophagaceae;g_Cytophagum;g_Cytophagum;s_Cytophagum_	0	0
8 AACY02376576.251.1545	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Alphaproteobacteria;f_Alphaproteobacteria;g_Alphaproteobacteria;s_Alphaproteobacteria_	1	0
9 AACY023846778.1.1273	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Alphaproteobacteria;f_Alphaproteobacteria;g_Alphaproteobacteria;s_Alphaproteobacteria_	0	0
0 AACY023937660.1.1380	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Delta proteobacteria;o_Deltaproteobacteria;f_Deltaproteobacteria;g_Deltaproteobacteria;s_Deltaproteobacteria_	0	0
1 AAQJ02000001.641042.64251	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gamma proteobacteria;o_Gammaproteobacteria;f_Gammaproteobacteria;g_Gammaproteobacteria;s_Gammaproteobacteria_	0	0
2 ATTN01001290.251.1721	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Alphaproteobacteria;f_Alphaproteobacteria;g_Alphaproteobacteria;s_Alphaproteobacteria_	0	0
3 AATOO1000159.4838.6332	d_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Chitinophagales;f_Chitinophagaceae;g_Chitinophagum;g_Chitinophagum;s_Chitinophagum_	0	0
4 AATO01000250.4290.5782	d_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Flavobacteriales;f_Flavobacteriaceae;g_Flavobacterium;g_Flavobacterium;s_Flavobacterium_	0	0
5 AAXS01000094.4846.6337	d_Bacteria;p_Patescibacteria;c_Saccharimonadiae;o_Saccharimonadiae;f_Saccharimonadiae;g_Saccharimonadiae;s_Saccharimonadiae_	0	0
6 AB000700.1.1501	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Gammaproteobacteria;f_Gammaproteobacteria;g_Gammaproteobacteria;s_Gammaproteobacteria_	0	0
7 AB001521.1.1560	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Gammaproteobacteria;f_Gammaproteobacteria;g_Gammaproteobacteria;s_Gammaproteobacteria_	0	0
8 AB002642.1.1436	d_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillales;g_Bacillus;g_Bacillus;s_Bacillus_	0	0
9 AB002644.1.1485	d_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillales;g_Bacillus;g_Bacillus;s_Bacillus_	0	0
0 AB002648.1.1383	d_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_The_bacilli;g_The_bacilli;s_The_bacilli_	1	0
1 AB003167.1.1439	d_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Oxyphotobacteria;o_Oxyphotobacteria;f_Oxyphotobacteria;g_Oxyphotobacteria;s_Oxyphotobacteria_	0	0
2 AB003457.1.1441	d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Alphaproteobacteria;f_Alphaproteobacteria;g_Alphaproteobacteria;s_Alphaproteobacteria_	0	0
3 AB004731.31.1484	d_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Micrococcales;f_Micrococcaceae;g_Micrococcus;g_Micrococcus;s_Micrococcus_	0	0

Metadata

◆ 使用 Excel 自製 Metadata

◆ 第一列是sample的名稱

◆ 剩下的分組可以自己編輯

Species	Treatment	Soil_type	Sampling_date
D001-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0703
D002-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0703
D003-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0703
D004-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0703
D005-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0703
D006-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0703
D007-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0710
D008-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0710
D009-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0828
D010-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0828
D011-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0904
D012-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0904
D013-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0904
D014-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0904
D015-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0911
D016-16S	Diseased	Rhizome_soil	T_0911
D017-16S	Diseased	Bulk_soil	T_0911



Taxonomy table

- ◆ 開啟 taxonomy table
- ◆ 將 Consensus 整列刪去
- ◆ 存檔

A	B	C
#Feature ID	taxonomy	Consensus
9e6aeee08fa09496f539aa8f67fa47447		1
52a1e1487f0d	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Cyanobacteria;D_2_Chloroplast	0.6
b03c694affd	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Chlorobi;D_2_Chlorobia;D_3_C	0.6
973052f1b55	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteo	0.6
140499b564	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	1
9fdeccaeed1t	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	0.9
3c6f8f0ea30	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Cyanobacteria;D_2_Chloroplast	1
b68784f16e1	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Chlamydiae;D_2_Chlamydiae;D_	1
b479458ac97	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	0.8
5d5fb37689	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	1
365803a2a46	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	0.6
4966c2916ff	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Chloroflexi;D_2_Chloroflexia;D	0.9
fb8137e0dbf	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Chloroflexi;D_2_Chloroflexia;D	0.9
496dd9cf5ca	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Cyanobacteria;D_2_Cyanobacteri	0.90909091
ea4af7b448	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	0.7
e1726a30a45	Bacteria;D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteob	0.9

Taxonomy table

- ◆ 文字編輯開啟 taxonomy
- ◆ 複製裡面的 tab
- ◆ 或是自己打一個然後複製



```
#Feature ID      taxonomy      C
9e6aeee08fa09496f539aa8f67fa47447
                           1.0
52a1e1487f0d
bb6867b2118cd84cc17f
```



資料的前處理

- ◆ 搜尋 ";"，貼上剛剛複製的 tab，全部取代
- ◆ 另存成 .csv 檔

```
#Feature ID      taxonomy          Consensus
9e6aeee08fa09496f539aa8f67fa47447      D_0__Bacteria;D_1__Cyanobacteria;D_2__Chloroplast
1.0
52a1e1487f0dbb6867b2118cd84cc17f
D_0__Bacteria;D_1__Chlorobi;D_2__Chlorobia;D_3__Chlorbiales;D_4__Chlorobiaceae;D_5__Chlor
obium  0.6
b03c694affd44e4ed1e0dcfde3f49c5d
D_0__Bacteria;D_1__Chlorobi;D_2__Chlorobia;D_3__Chlorbiales;D_4__Chlorobiaceae;D_5__Chlor
```

匯入資料



匯入資料

- ◆ 如果沒有範例檔的話，先至以下連結下載 R script
- ◆ <https://drive.google.com/drive/folders/1XklJBIryA1DedlTjz5mFPUxzAj02vo2v?usp=sharing>
- ◆ 裡面都有用英文做簡單的說明，這邊主要會講解一些路徑的問題，還有可以自行修改的地方

匯入資料

- ◆ working directory 最好是跟自己的三個要匯入的檔案相同，這樣再匯入檔案時就不用在前面加上路徑名稱，可以直接打檔名 + 副檔名

```
####Import data#####
#set working directory
getwd()
setwd("/Users/samuel/Desktop/404/資料分析/Metagenome/第二波定序/mine/output/255-205
/for analysis")
```

```
#import taxonomy table
tax <- read.csv(file = "taxonomy.csv", row.names = 1, header = T, check.names = T)
tax <- as.matrix(tax)
TAX <- tax_table(tax)
```



整理匯入的資料

19

整理匯入的資料

- ◆ subset_taxa 可以篩選出想要 / 不想要的項目，如果有一些物種或是 sample想要刪掉的話可以使用這個指令
- ◆ 如果要對同一筆資料作多次動作，記得後面的 object 要改！

```
#filter data
#match the column and target, taxa in OTU table will decrease in every filter
filtered_physeq <- subset_taxa(physeq, Kingdom != "Unassigned")
filtered_physeq <- subset_taxa(filtered_physeq, Class != "Chloroplast")
filtered_physeq
```



整理匯入的資料

- ◆ tax_grom 可以將同樣一個 level 下名稱相同的資料合併，能同時整合 Taxonomy table 以及 OTU table 中的數據，這個動作會跑有點久

```
#merge same name in 1 in targrt taxonomy level(Phylum as example) for barplot, rest  
of the level will be "NA"  
filtered_physeq_abd_P <- tax_grom(filtered_physeq_abd, taxrank = rank_names  
(filtered_physeq_abd)[2])  
tax_table(filtered_physeq_abd_P)
```

整理匯入的資料

- ◆ transform_sample_counts 可以將資料轉成百分比
- ◆ rarefy_even_depth 可以將資料切在特定的大小 (sample.size)

```
#####transfer sample count and rarefy####  
filtered_physeq_abd_P <- transform_sample_counts(filtered_physeq_abd_P, function(x)  
x / sum(x))  
  
filtered_physeq_abd_P_rarefy <- rarefy_even_depth(filtered_physeq_abd_P,  
sample.size = min(sample_sums(filtered_physeq_abd_P  
)),  
replace = F)
```



做圖

23

做圖

- ◆ 裡面包含Raracurve, barplot, Alpha diversity, PCoA, NMDS的做法
- ◆ 做圖的參數有非常多可以修改的空間，可以上網參考其他人的做法

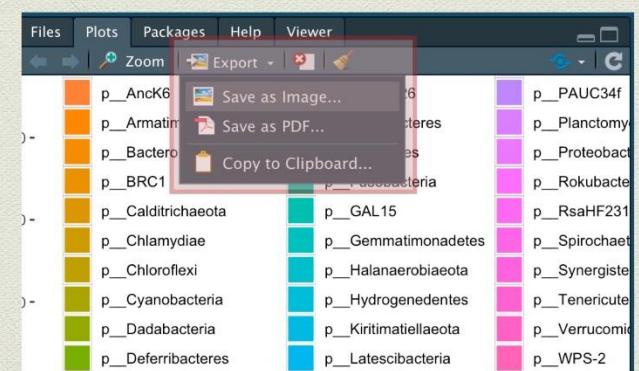


輸出資料及圖片

25

輸出資料及圖片

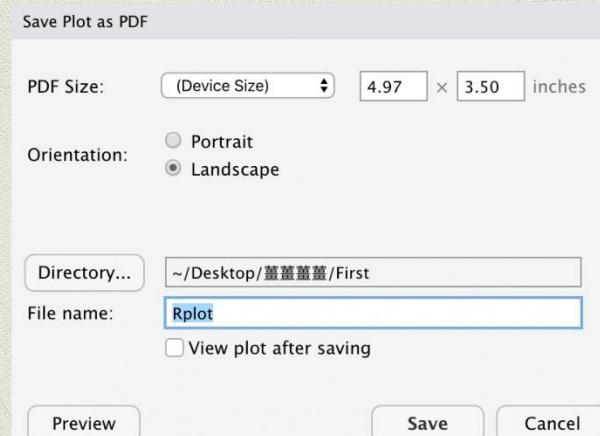
- ◆ 當圖片做好之後可以用code做輸出，也可以直接選擇界面上指令
- ◆ 輸出的類型我通常會選擇PDF檔，點陣圖放大縮小之後不會糊掉
- ◆ Plots > Export > Save as PDF





輸出資料及圖片

- ◆ 可以自由選擇圖片的大小、路徑、檔名



輸出資料及圖片

- ◆ 利用 write_phyloseq 可以將整理過的 OTU table, Taxonomy table, Metadata 輸出成 .csv 再做一些編輯或是利用 Excel 做圖

```
library(microbiome)
write_phyloseq(filtered_physeq_abd, path = "/Users/samuel/Desktop/404/資料分析
/Metagenome/第二波定序/mine/output/255-205/for analysis/123/AWT/Filtered 12:21
/abd_")
```



<http://www.lifescipy.net/RcodeDB/MARco.html>

一些很有用的參考資料



7.2. Qiime 2 生物資訊分析

By Shih-Han Wen



連結伺服器

- 因Qiime2 沒辦法在一般個人筆電環境下運作，所以操作需連結至實驗室伺服器中執行，網址如下:<http://www.lifescipy.net:8185/ide.html>
- 帳號:mucus 密碼:mucus1234
- 成功登入後介面如右圖



伺服器操作

開啟操作介面，如右方上圖紅線表示，
所有指令皆在該視窗進行。

注意！請勿使用別人正在操作的介面！
新操作介面如右方下圖

```
note.md          bash - "PoYuServer" x
14 metagenome_pipeline.py -i otu_table_useard \
15                                         -o EC_metagenome_out \
16 metagenome_pipeline.py -i otu_table_useard \
17                                         -o KO_metagenome_out \
18
19
20 convert_table.py EC_metagenome_out/pred_me \
21                                         -c contrib_to_legacy \
22                                         -o EC_metagenome_out/pred \
23
24 convert_table.py KO_metagenome_out/pred_metagenome_contrib.tsv.gz \
25                                         -c contrib_to_legacy \
26                                         -o KO_metagenome_out/pred_metagenome_contrib.legacy.tsv.gz \
27
28
29 pathway_pipeline.py -i EC_metagenome_out/pred_metagenome_contrib.tsv.gz \
30                                         -o EC_pathway_out/pred_pathway_contrib.legacy.tsv.gz
```

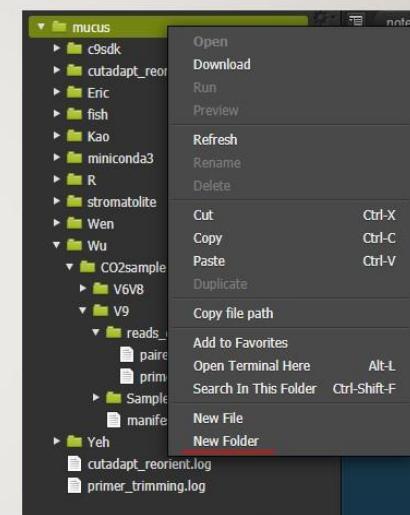


```
note.md          bash - "PoYuServer" x bash - "mucus@PoYu" x
(base) mucus@PoYuServer:~$
```

個人資料夾建立

- 點選mucus資料夾右鍵建立個人專屬檔案夾，
如右圖紅線處所示。

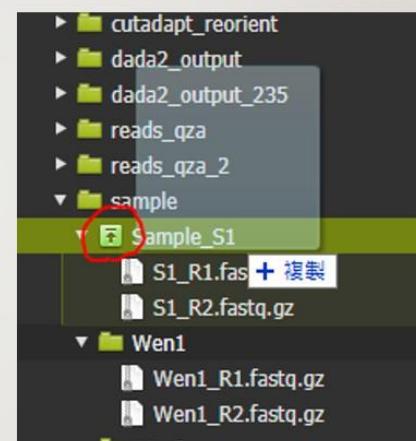
請確認路徑是否位於mucus下方，請勿放置在
別人資料夾內。





匯入資料

- 把廠商給的.gz上傳到伺服器中
檔案拉進自己的資料夾中就會上傳



開始執行QIIME2

- 建議所有指令都先在記事本內編輯好在貼上操作介面執行
- 貼上 conda activate qiime2-2019.10 須注意版本問題
接下來的內容在不同版本之前執行指令會有所不同

```
(base) mucus@PoYuServer:~$ conda activate qiime2-2019.10
(qiime2-2019.10) mucus@PoYuServer:~$
```



製作樣本BARCODE表

- 每個.gz檔都需要有專屬的barcoding txt檔，需區分forward reverse
格式如右圖，>sample名，下一行 ^barcode 序列。

- 編輯完TXT檔後一樣上傳至伺服器個人資料夾內。

```
>POBD1
^AACCAAACGCGAAGAACCTTAC
>POBD3
^AACGAACGCGAAGAACCTTAC
>POBD4
^AAGAAAACGCGAAGAACCTTAC
>POBD5
^AAGTAACGCGAAGAACCTTAC
>POBD6
^AAGCAACGCGAAGAACCTTAC
>POBD7
^AAGGAACGCGAAGAACCTTAC
>POBD8
^ATAAAACGCGAAGAACCTTAC
```

用BARCODING表區分樣本

以下開始皆以一行code一行解說為主

`cutadapt -g file:Wen1_barcode_F.1.fa \`

黃色處改成自製的barcode 表之檔名，後面加上.1.fa之格式。

`-error-rate 0 --minimum-length 1 \`

這邊是比對的正確率和長度設定，照抄即可。

`-o Wen/cutadapt_reorient/Wen1/{name}.1.fastq.gz --untrimmed-`

`output Wen/cutadapt_reorient/sty1/untrimmed_forward.fastq.gz \`

黃色部分是比對成功的序列產生的檔案位置，自行設定路徑在個人資料夾內；紅色的部分是設定沒有比對到的序列都放進同一個檔案中(沒barcode到的序列統一集中的意思)



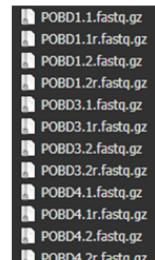
用BARCODING表區分樣本

```
-G file:Wen1_barcode_R.1.fa -p Wen/cutadapt_reorient/Wen1/{name}.2.fastq.gz \
-untrimmed-paired-output cutadapt_reorient/sty1/untrimmed.reverse.fastq.gz \
-G 是反向讀取的指令，因為廠商定序過程序列有一半的機率會顛倒，黃色部分跟前一張
投影片的內容相同，自己更改路徑。
Wen/Sample/Wen1_R1.fastq.gz \
Wen/Sample/Wen1_R2.fastq.gz >> cutadapt_reorient.log
黃色部分放入廠商提供的檔案位置
```



用BARCODING表區分樣本

```
cutadapt -g file:Wen_barcode_F.1.fa \
--error-rate 0 --minimum-length 1 \
-o Wen/cutadapt_reorient/Wen1/{name}.1r.fastq.gz --untrimmed-output
Wen/cutadapt_reorient/Wen1/untrimmed.forward.fastq.gz \
-G file:Wen1_barcode_R.1.fa -p Wen/cutadapt_reorient/Wen1/{name}.2r.fastq.gz \
--untrimmed-paired-output Wen/cutadapt_reorient/Wen1/untrimmed.reverse.fastq.gz \
Wen/Sample/Wen1_R1.fastq.gz \
Wen/Sample/Wen1_R2.fastq.gz >> cutadapt_reorient.log
```



Reverse再讀取一次注意黃色區塊的更動

正反讀取序列合併

```
mkdir Wen/cutadapt_merge
新建資料夾存放merge後檔案
cat Wen/cutadapt_reorient/Wen1/POBD1.1.fastq.gz
Wen/cutadapt_reorient/Wen1/POBD1.1r.fastq.gz > Wen/cutadapt_merge/POBD1.1.fastq.gz
cat Wen/cutadapt_reorient/Wen1/POBD1.2.fastq.gz
Wen/cutadapt_reorient/Wen1/POBD1.2r.fastq.gz > Wen/cutadapt_merge/POBD1.2.fastq.gz
將相同的檔案合併 每個sample都有兩個所以要操作兩次。
黃色部分是路徑 自行更改
```



Manifest檔製作

這個檔案需自行先在個人電腦裡編輯，檔案格式如下

第一行 sample-id,absolute-filepath,direction

樣本名,該樣本的路徑,forward/reverse

POBD1,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD1.1.fastq.gz.forward

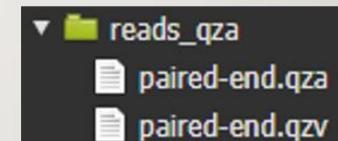
範例如上行

全部編輯完畢後上傳至伺服器中自己的資料夾內。

```
sample-id,absolute-filepath,direction
POBD1,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD1.1.fastq.gz,forward
POBD1,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD1.2.fastq.gz,reverse
POBD3,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD3.1.fastq.gz,forward
POBD3,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD3.2.fastq.gz,reverse
POBD4,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD4.1.fastq.gz,forward
POBD4,/home/mucus/Wen/cutadapt_merge/POBD4.2.fastq.gz,reverse
```

確認Sequence品質

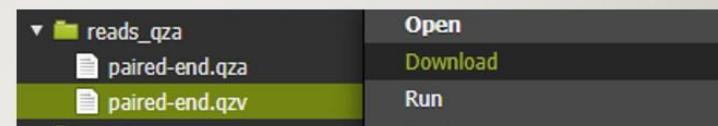
```
qiime tools import \
    -type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
    -input-path Wen/manifest \
    黃色是上一頁製作的manifest檔位置
    -output-path Wen/reads_qza/paired-end.qza \
    -input-format PairedEndFastqManifestPhred33
    黃色區塊是輸出檔案的位置跟檔名自行更改路徑
    qiime demux summarize \
        -i-data Wen/reads_qza/paired-end.qza \
        -o-visualization Wen/reads_qza/paired-end.qzv
    將qza轉檔成qzv檔
```





確認品質結果

下載qzv檔案 如右圖



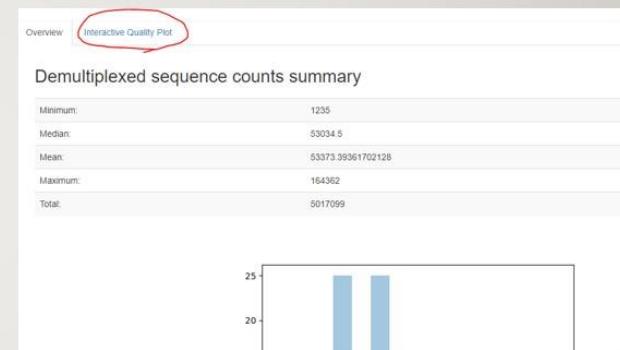
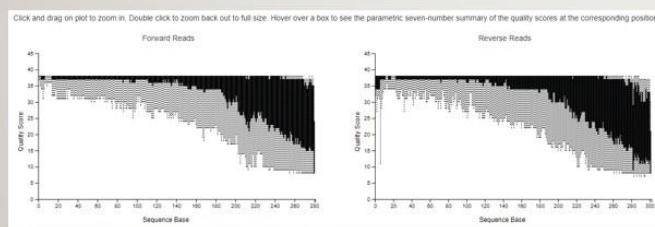
然後到瀏覽器上搜尋Qiime2 view

將下載完的qzv檔丟入紅色圈起處

確認品質結果

會進到右圖畫面點選紅色圈起處

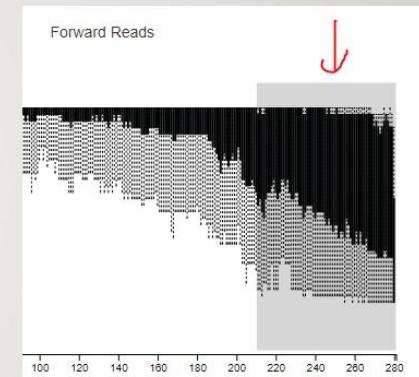
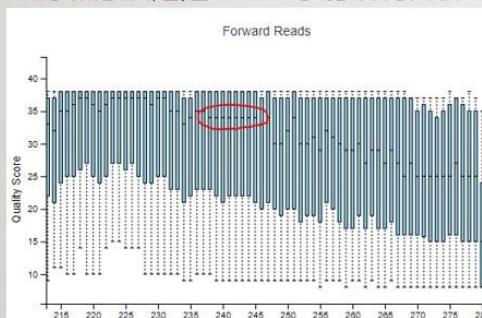
會看見下圖的forward & reverse 品質結果



確認品質結果

*通常會剔除 25 分以下的
 *DADA2 要求至少要有 20bp 的
 overlapping

可以將後面區塊放大檢視如右圖
 會得到下圖，紅色圈起處的黑線是中位線，通常選擇中位數大於 30 的長度進行切割與合併，forward 與 reverse 總和必須超過 460，才能順利合併。



DADA2去噪及切割合併

time qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs Wen/read_qza/paired-end.qza \
 黃色部分為qza檔路徑

-p-trunc-len-f 230 \ 黃色位置是forward切割長度

-p-trunc-len-r 230 \ reverse同上

可多試幾個不同位置比較結果

-p-n-threads 8 \ CPU 使用數量 mucus 就8核

-output-dir Wen/dada2_output 檔案輸出位置

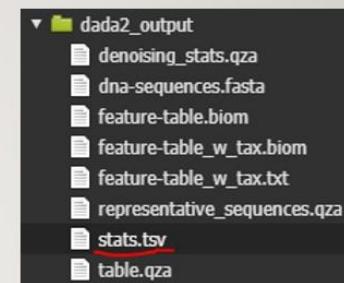
qiime tools export --input-path Wen/dada2_output/denoising_stats.qza --output-path
 Wen/dada2_output

qiime tools export --input-path Wen/dada2_output/representative_sequences.qza --output-path
 Wen/dada2_output 黃色部分是生成檔案之路徑



DADA2結果確認

打開DADA2輸出產物找到右圖標示處的檔案並下載
用Excel開啟(方便檢視其實直接在伺服器內打開也可)
確認數值，找輸出後保留片段比例最高的進行後續操作



輸入數量 過濾後數量 保留比例 去噪後數量 合併後數量 剩餘比例 去嵌合體後 最後剩餘比例

sample-id #q2:types	input numeric	filtered numeric	percentage of input numeric	pdenoised numeric	merged numeric	percentage of input numeric	non-chimeric numeric	percentage of input non-chimeric numeric
POBD1	41989	25541	60.83	23978	21402	50.97	20451	48.71
POBD10	43800	27578	62.96	26658	24757	56.52	23412	53.45
POBD11	35269	22151	62.81	21519	20413	57.88	18926	53.66
POBD12	32575	21006	64.49	19800	17410	53.45	16555	50.82
POBD13	42983	26092	60.7	23923	19705	45.84	18887	43.94

物種分類

需先拿到要比對的資料庫檔案，本範例使用 SILVA 128 16S 之資料庫

```
qiime feature-classifier classify-consensus-vsearch \
-i-query Wen/dada2_output_240-240/representative_sequences.qza \
-i-reference-reads Wen/database/Silva_128_99_16SRepSeq.qza \
-i-reference-taxonomy Wen/database/Silva_128_99_16STaxonomy.qza \
-p-threads 8 \
-verbose \
-output-dir Wen/taxa_coral
```

輸出路徑

```
qiime tools export --input-path Wen/taxa_coral/classification.qza --output-path
Wen/taxa_coral
```

路徑



轉檔及輸出資料

```
sed -i -e '1 s/Feature/#Feature/' -e '1 s/Taxon/taxonomy/' Wen/taxa_coral/taxonomy.tsv  
biom add-metadata -i dada2_output/feature-table.biom -o dada2_output/feature-table_w_tax.biom  
--observation-metadata-fp taxa_coral/taxonomy.tsv --sc-separated taxonomy  
biom convert -i dada2_output/feature-table_w_tax.biom -o dada2_output/feature-table_w_tax.txt --  
to-tsv --header-key taxonomy
```

黃色部分是已有的檔案路徑，紅色是新生成的檔案輸出的路徑

Qiime2 操作到這邊結束



8.1. Isolation of Nematodes

Isolation of Nematodes 分離線蟲

By Hsuan-Tung Lin

Materials :

1. 不同篩目之篩網 (最小篩目為 $75\mu\text{m}$)
2. 2L量杯
3. 洗瓶裝ddH₂O
4. 50 ml 離心管
5. 底泥/土壤樣本
6. 盆子

Methods :

於水槽內進行，將盆子放入水槽避免底泥阻塞水槽：

1. 事先混勻底泥，秤取適量倒入量杯中，並加入自來水懸浮底泥顆粒。
2. 篩網以孔徑大至小組合，將底泥懸浮液倒上篩網 (大顆粒不需倒入以免阻塞)。
3. 再次用自來水懸浮底泥顆粒，並重複步驟二。
4. 拆除篩網組合，從孔徑大小第二與最小的篩網上收集底泥，收集方式為：傾斜篩網，用洗瓶沖洗其中的底泥，使其流至篩網的一邊，最後倒入50 mL離心管中。
5. 標示離心管 (採樣地點與日期)



8.2. Observation of Nematodes

Observation of Nematodes 觀察線蟲

By Hsuan-Tung Lin

Materials :

1. 挑針
2. 直徑6 cm petri dish
3. 解剖顯微鏡
4. 複式顯微鏡
5. 蓋玻片與載玻片
6. 篩完線蟲的底泥/土壤樣本
7. ddH₂O

Methods :

1. 事先在載玻片上滴ddH₂O。
2. 搖晃樣本並將適量樣本倒至petri dish，於解剖顯微鏡下尋找線蟲。
3. 找到後，用挑針挑至載玻片(可用解剖顯微鏡觀察載玻片，以確認是否有蟲)。
4. 蓋上蓋玻片，使用複式顯微鏡觀察玻片，並拍照做紀錄(建議一次挑3隻)。
5. 紀錄建議格式：

線蟲編號	拍照與否	抽DNA與否	型態特徵
8n_001	✓	✓	彎曲，角質層厚

6. 抽單一線蟲DNA。



8.3. DNA Extraction of Nematodes

DNA Extraction of Nematodes 線蟲DNA抽取

By Hsuan-Tung Lin

Materials :

1. PCR tube (10 μ L)
2. 0.25M NaOH
3. 0.5M Tris-HCl (pH 8.0)
4. 1.25M HCl
5. 2% Triton X-100
6. nematodes on a slide
7. 挑針

Methods :

1. 事先在PCR tube中加入20 μ L 0.25M NaOH。(In laminar flow)
2. 將玻片移至解剖顯微鏡下，確認線蟲的位置，眼睛緊盯線蟲的同時，於玻片邊緣滴水，使蓋玻片懸浮。
3. 使用挑針挑起單一線蟲，於解剖顯微鏡下小心地將線蟲放入PCR tube中(視覺上會看到一縷線從離開挑針)，並於管蓋寫下編號。
4. 置於室溫24 hr (土壤中線蟲3-16小時即可)
5. 置於95°C，3分鐘。
6. 依序加入10 μ L 0.5M Tris-HCl、4 μ L 1.25M HCl、5 μ L Triton X-100 (In laminar flow)
7. 置於95°C，3分鐘。
8. 置於-20°C冰箱中保存。



8.4. Operating microscope camera

Operating microscope camera 顯微鏡相機操作與線蟲拍照要點

By Hsuan-Tung Lin

Materials :

- 複式顯微鏡(Motic BA210)與相機(TrueChrome Metrics)
- 軟體 Mosaic2.2.1

詳細使用說明:

https://drive.google.com/file/d/11ia16wbtm95LSZmm7MIWgnN0CIDOqKM_V/view?usp=sharing

- (玻片)樣本

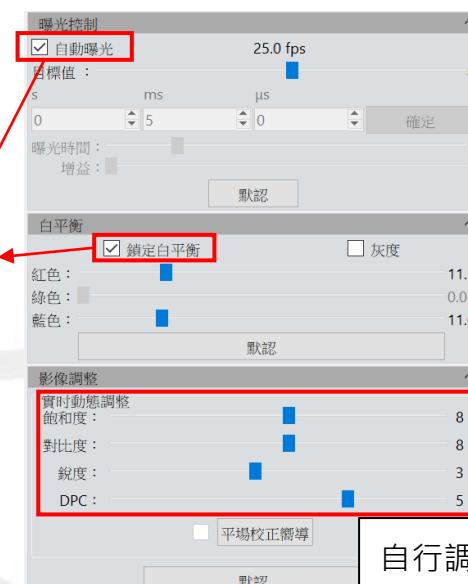
Methods :

顯微鏡相機使用：

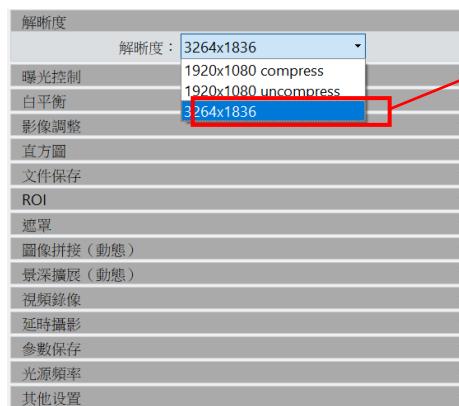
- 將樣本置於複式顯微鏡視野下，打開相機，藍色燈亮起即為開機狀態。
- 於筆電桌面點擊軟體 Mosaic2.2.1。(注意：只有在相機啟動時，才能成功開啟此軟體。)



3. 調整圖片檔名、格式、保存位置(預設: 桌面/Image)



4. 影像調整(解析度、曝光、白平衡...)



固定

自行調整

5. 特殊功能 - 圖像拼接

1. 將解析度調到1920x1080。



3. 緩慢轉動 x, y 軸以移動樣本，當拼接結果出現紅框時，代表移動過快。

即時影像

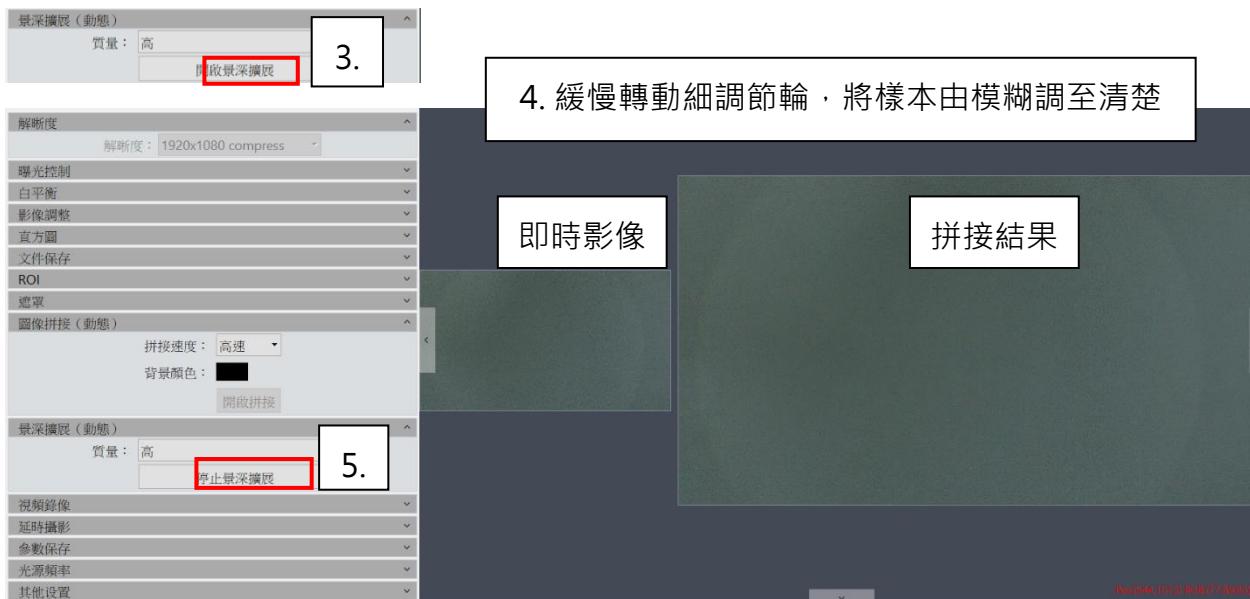
拼接結果

6. 特殊功能 - 景深擴張(疊圖)

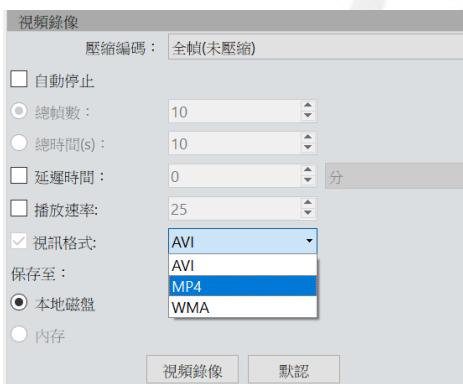
1. 將解析度調到1920x1080。



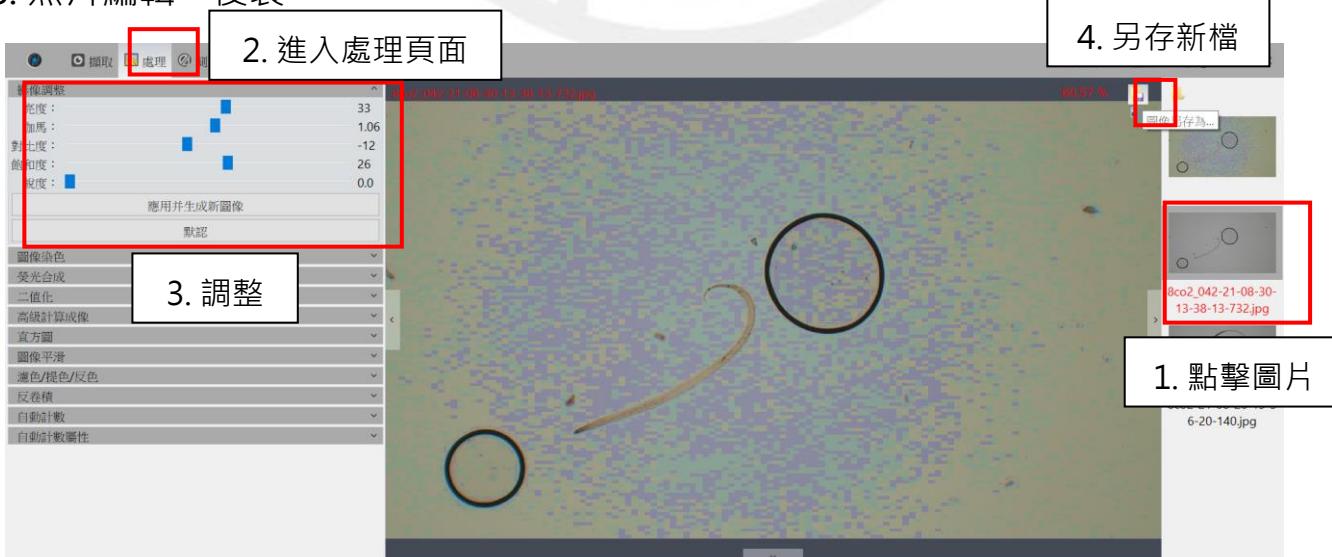
調整細調節輪，使影像模糊。



7. 特殊功能 - 影像錄製



8. 照片編輯 - 後製



9. 比例尺添加



2. 進入測量頁面

1. 點擊圖片

2. 進入測量頁面

3. 點選校準表並設定倍率

4. 勾選顯示比例尺並自行進行調整

5. 另存新檔

當前	名稱	長度	總像素	單位	單位/像素	解晰度
<input checked="" type="checkbox"/> 2	4X	500.000	347.215	μm	1.440	1920x1080
<input type="checkbox"/> 3	10X	100.000	172.007	μm	0.581	1920x1080
<input type="checkbox"/> 4	40X	50.000	345.000	μm	0.145	1920x1080

10. 測量(務必完成9)

1. 點擊圖片

2. 進入測量頁面

3. 選擇測量方法

4. 調整

5. 點擊照片進行測量

6. 輸出結果

7. 另存新檔

類型	名稱	長度_μm	寬度_μm	高度_μm	周長_μm	面積_μm ²	半徑_μm	直徑_μm	角度_°	斜率	距離_μm	長
1	折線2	1131.888										

11. 計數



2. 進入測量頁面

The screenshot shows the measurement software interface with various windows and toolbars. A red box highlights the '測量' (Measurement) button in the top toolbar. Another red box highlights the '開啟計數器' (Open Counter) dialog box in the left sidebar, which lists three categories: '類1' (Category 1), '類2' (Category 2), and '類3' (Category 3). A third red box highlights the '另存新檔' (Save As New File) button in the top right corner of the main window. A fourth red box highlights the '導出到Excel表' (Export to Excel Table) button in the bottom right corner of the counter dialog. Step 1: Click on the image. Step 2: Enter the measurement page. Step 3: Open the counter (add category and check the category you want to calculate). Step 4: Click on the image to perform calculations. Step 5: Output results. Step 6: Save as new file.

200.000 μm

長度: 1131.888 μm

6. 另存新檔

3. 開啟計數器 (添加類別並勾選擬計算的類別)

4. 點擊照片進行計算

5. 輸出結果

1. 點擊圖片

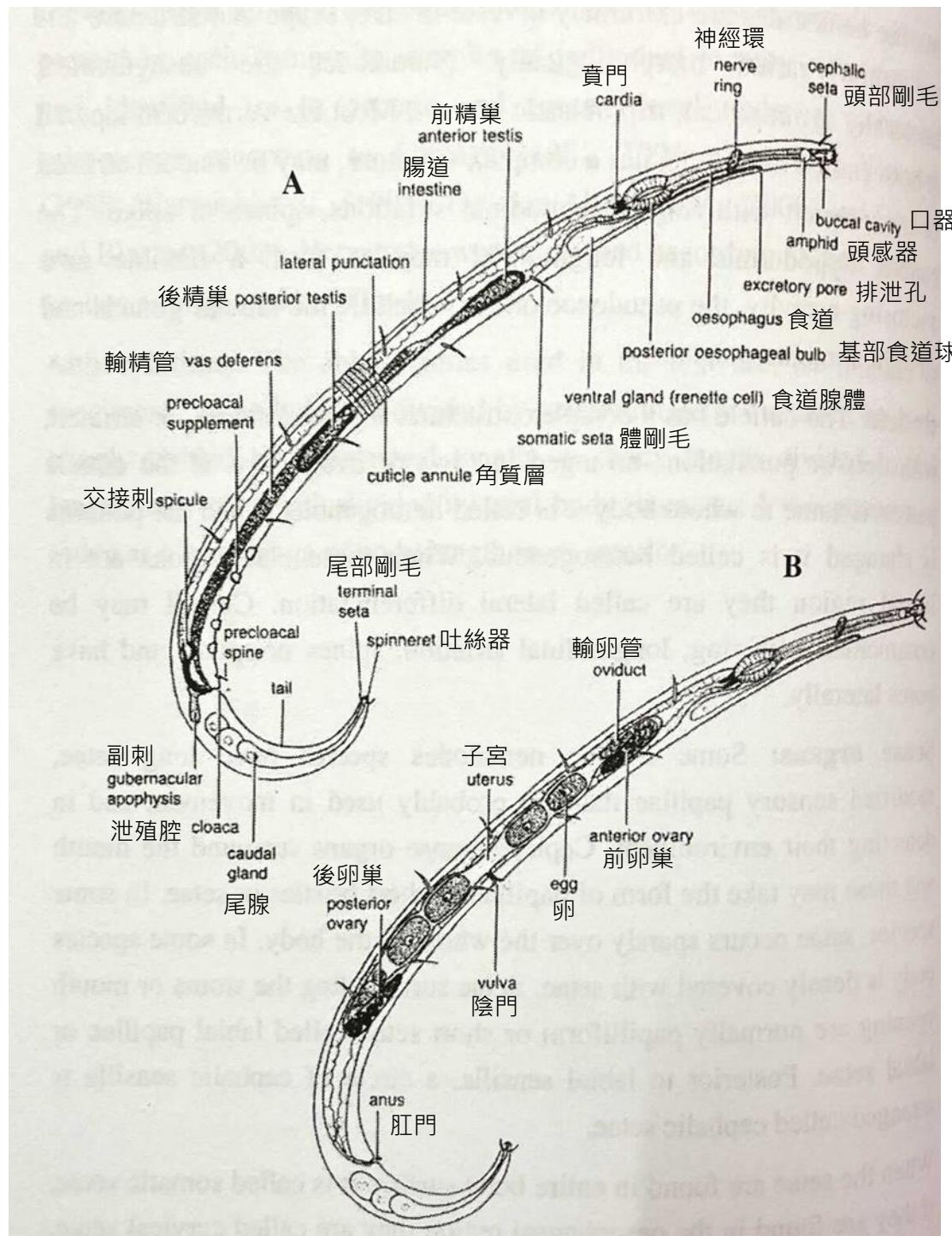
名稱	總數	百分比
1 類1	2	100.00%
2 類2	0	0.00%
3 類3	0	0.00%

總類數: 3
總數: 2
導出到Excel表

注意：在8、9、10、11步驟後，一定要另存新檔才會進行照片儲存。未儲存時，照片下方會空白；儲存後，照片下方才會顯示檔名。

線蟲拍照要點

1. 需要拍攝：全長(使用拼接功能)、amphid、口器構造、食道球、食道與腸道交接處、生殖構造(雄蟲：交接刺、副刺、bursa、精巢...；雌蟲：陰門、卵巢、卵、子宮...)、肛門/泄殖腔、尾部、剛毛。



2. 適當使用景深擴展功能



9.1. Isolation of symbiodiniaceae

Isolation of Symbiodiniaceae

Aiptasia coldshock

By Yan-Zhen Meng

Materials :

1. 燒杯
2. 滅菌海水
3. 鋁箔紙(遮光用)

Methods :

1. 事先準備4°C的滅菌海水放入燒杯中。
2. 將剪下的樣本放入含4°C的滅菌海水的燒杯中，避光冰至4°C冰箱4小時。
3. 將樣本拿出後倒出冰海水並馬上換成 300ml 室溫滅菌海水。
4. 至於黑暗處避光，讓樣本慢慢排出共生藻，會觀察到吐出棕色共生藻。
(期間維持每天更換海水)
5. 吸出棕色顆粒即可收集共生藻。

*因應不同樣本，溫度和時間可調整



Isolation of Symbiodiniaceae

Menthol-induced

By Yan-Zhen Meng

Materials :

1. Menthol

2. 100%乙醇

3. 滅菌海水

Methods :

1. 將20g Menthol溶進100ml 100%酒精中製成20%(w/v) Menthol stock solution(-20°C保存)。
2. 將Menthol stock solution用滅菌海水稀釋成0.19mM/0.38mM/0.58mM的Menthol solution。
3. 將5cm*5cm 大小的珊瑚斷肢放進300ml的Menthol solution中，保持曝氣，原有的光照和溫度。
4. 每泡8hr就重回ASW中休息16hr(休息時可配合光照週期不照光)。
5. 將300mlMenthol solution 860xg離心3分鐘收集排出的共生藻。
6. 可重複 3-4步驟多次。

* 濃度有 0.19mM/0.38mM/0.58mM，越高共生藻排出越快、但死亡率也更高，依物種不同可接受的濃度也不同，ex:Aiptasia 使用 0.38mM 的死亡率 > 50%，0.58mM 為 Isopora/Stylophora 適用，可從濃度低的開始，並給予休息時間、觀察樣本的情況。



Culturelation of Symbiodiniaceae

By Yan-Zhen Meng

Materials :

1. Daigo's IMK medium of marine microalgae
2. 0.22 μm 濾膜
3. 抽氣機
4. 人工海水
5. 滅菌海水
6. Penicillin
7. Streptomycine
8. T25 FLASK
9. 血球計數盤
10. 複式顯微鏡



Methods :

1. 加入2.56g IMK 粉末到1L人工海水中製成10×IML stock solution。
2. 以0.22 μm 過濾10×IMK stock solution(含有營養素不建議使用滅菌釜)
(無菌台操作，4°C保存，使用前再回室溫)
3. 10×IMK stock solution加上滅菌海水製備成1×培養液再加上抗生素 (Penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Streptomycine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。
(無菌台操作，包上鋁箔遮光 4°C保存，使用前再回室溫)
4. 將共生藻與培養液至於 T25 FLASK 中，每星期更換一次培養液(1/5~1/2 量)
(若是從宿主剛分離的可以 3 天就更換一次)。



*無菌操作臺操作，搬運過程中盡量避免搖晃培養瓶，以維持共生藻沉積於瓶子底層

5. 27°C照白光($10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ~ $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

12hr light/12hr dark 培養

鏡檢觀察：

共生藻密度太高可能會影響其分裂生長($<9 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ ，超過可進行繼代培養)
或是增加汙染的可能(一開始可採用序列稀釋避免汙染)

1. 以顯微鏡檢視計數方格，計數位於四個角落的共生藻數，將所得數目除以四，
即得知樣本中，每 0.1 立方毫米含有多少共生藻，之後再乘以 10^4 ，推算每 1 毫升
含多少共生藻。



10.1. 珊瑚切割

珊瑚切割：

組裝珊瑚切割機，將海綿墊在線鋸會經過的位子(需沾濕使其泡軟)，將線鋸組裝上去，卡在滑輪的軌道中後，確定線鋸有對齊凹槽的縫、確認有線鉗(粗糙面為切割的位置)卡好，裝好後鎖好螺絲(不能太緊，會斷掉)且切割機內有裝些許海水(潤滑用)

備好：

1.乾淨海水，帶珊瑚切下來後潤洗用

2.珊瑚基座，在四邊個切一刀、底部切十字，用來吊掛卡繩子用兩手固定好珊瑚慢慢往鋸帶方向推進，就可以把珊瑚鋸下來了



黏珊瑚：

黏珊瑚的話就將水下膠擠在基座表面或珊瑚橫切面平整處，然後黏起來(泡儀下水、拿出水面、再泡一下水，重複以上動作直到珊瑚不會掉落)

綁珊瑚：

將基座上已切好的割線卡入釣魚線，底部十字也卡進去，都卡好後再掛入缸中作微調

敷豐年蝦：

將 10g 豐年蝦卵、2 公升海水放入專門敷豐年蝦的桶子內，打氣裝置接上去(不要太大)

收豐年蝦：

在收蝦前半小時按照比例添加滋養液(比例為 40ml 調配好的海水 + 1.5ml 滋養液)，收蝦時先將打氣關掉，然後用黑布或紙箱罩住孵蝦桶，目的是利用豐年蝦的趨光性收集豐年蝦，紙箱蓋上後將光源固定於蝦桶最底部並計時 5 分鐘，之後打開調節閥讓蝦流出，讓蝦流到網子內，再用乾淨海水稍微潤洗幾次(不能直接沖，沿著網子邊緣緩緩倒入)