

水稻根系微生物组研究中的样本种植、取样和 16S rRNA 基因扩增子文库制备方法

Planting, Sample Collection and Library Preparation of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing for Rice Root Microbiomes

徐浩然^{1,2,3,4,#}, 张婧赢^{1,2,3,#}, 郭晓璇^{1,2,3}, 曲宝原^{1,2,3},
刘永鑫^{1,2,3}, 白洋^{1,2,3,4,*}

¹植物基因组学国家重点实验室, 种子创新研究院, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; ²生物互作卓越创新中心, 中国科学院大学, 北京; ³中国科学院-英国约翰英纳斯中心植物和微生物科学联合研究中心, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京; ⁴现代农学院, 中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: ybai@genetics.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 徐浩然, 张婧赢, 郭晓璇, 曲宝原, 刘永鑫, 白洋. (2021). 水稻根系微生物组研究中的样本种植、取样和 16S rRNA 基因扩增子文库制备方法. *Bio-101* e2003697. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003697.

How to cite: Xu, H. R., Zhang, J. Y., Guo, X. X., Qu, B. Y., Liu, Y. X. and Bai, Y. (2021). Planting, Sample Collection and Library Preparation of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing for Rice Root Microbiomes. *Bio-101* e2003697. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003697. (in Chinese)

摘要: 自然土壤中生长的植物根系富集了种类繁多的微生物, 这些微生物在植物根、根际组成了根系微生物组并在植物营养吸收 (Zhang *et al.*, 2019) 和抵抗疾病 (Paloma *et al.*, 2018) 等方面发挥着重要功能。本文以水稻为例, 从水稻田间种植、根与根际土样本的采集、16S 核糖体 RNA (rRNA) 基因扩增子文库构建等方面介绍了根系微生物组样本的获得与检测方法, 结合 Illumina 测序技术和生物信息学分析可以得到微生物组的结构组成。解析根系微生物组结构组成是阐明植物调控自身根系微生物组的机制以及探索根系微生物组与植物互作的基础, 对于提高植物生产能力具有重要意义。

关键词: 水稻, 根系微生物组, 种植, 取样, 扩增子测序

材料与试剂

1. Parafilm 封口膜 (Bemis, catalog number: PM-996)
2. 50 ml 离心管 (BD Falcon, catalog number: 352070)
3. 滤纸 (SEP, catalog number: DXLZ11F)
4. 微量离心管 (1.5, 2, 5 ml; Eppendorf, catalog number: 0030125150, 30123344, 30119401)
5. 移液器枪头 (nuclease-free, 10, 200, 1000 μ l; Axygen, catalog number: T-300, T-200-Y, T-1000-B)
6. 96 孔 PCR 板 (Jet Keen Biotechnology, catalog number: PC-0200-9B)
7. 96 孔 PCR 板封板膜 (Axygen, catalog number: PCR-TS)
8. 次氯酸钠 (Macklin, catalog number: S828471)
9. 乙醇 (SIGMA, catalog number: E7023-500ML)
10. Murashige Skoog 培养基 (含维生素) (MS, Caisson, catalog number: MSP09)
11. 蔗糖 (HuShi, catalog number: JC-SJ03064)
12. 氯化钠 (NaCl, SIGMA, catalog number: S7653-250G)
13. 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, SIGMA, catalog number: 04272-1KG)
14. 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, SIGMA, catalog number: 71504-250G)
15. 琼脂粉 (SIGMA, catalog number: A7921-100G)
16. 土壤 DNA 提取试剂盒 (FastDNATM SPIN Kit for Soil, Mpbio, catalog number: 116560200)
17. 无核酸水 (Nuclease-Free Water, Qiagen, catalog number: 129115)
18. 1x TE 缓冲液 (Coolaber, catalog number: SL2081)
19. PicoGreen DNA 定量试剂盒 (Quant-iTTM PicoGreenTM dsDNA Assay Kit, Invitrogen, catalog number: P11496)
20. PrimeSTAR 热稳定 DNA 聚合酶体系 (PrimeSTAR HS DNA Polymerase, TaKaRa, catalog number: R010A)
21. 琼脂糖 (Biowest, catalog number: G-10)
22. TAE Buffer (Thermo, catalog number: 15558026)
23. 6x Loading Buffer (TaKaRa, catalog number: 9156)

24. Beckmen Coulter Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒 (Beckman, catalog number: A63880)
25. 琼脂糖电泳凝胶纯化回收试剂盒 (Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, catalog number: A9282)
26. 核酸电泳染料 (Solarbio, catalog number: G8140)

仪器设备

1. 超净工作台/生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 51025411)
2. 镊子 (Jinzhong, catalog number: JD5020)
3. 三角瓶 (aladdin, catalog number: T4227-500ml-1EA)
4. 130 mm 方形培养皿 (MaiSiNuo, catalog number: HZX064-1)
5. 1 L 试剂瓶 (Cleman, catalog number: CN-600-1000)
6. 电子天平 (Mettler Toledo, catalog number: AL104)
7. 高压蒸汽灭菌锅 (PHCbi, catalog number: MLS-3781-PC)
8. 剪刀 (Jinzhong, catalog number: J21130)
9. 高速离心机 (Eppendorf, model no. 5810R)
10. 平板摇床 (Kylin-Bell Lab Instruments, model no. TS-2)
11. 单道移液器 (10, 20, 100, 200, 1000 μ l; Eppendorf, catalog number: 3120000020, 3120000038, 3120000046, 3120000054, 3120000062)
12. 12 通道移液器 (10, 100, 300 μ l; Eppendorf, catalog number: 3122000027, 3122000043, 3122000060)
13. 旋涡混合器 (ZangHan, catalog number: VM100)
14. 金属水浴锅 (Dry Baths, Thermo, catalog number: 88870011)
15. 破碎仪 (Mpbio FastPrep-24TM, Mpbio, catalog number: MPFastPrep-24 5G)
16. 高速微型离心机 (Thermo Fisher Scientific, model no. Heraeus Pico 17)
17. 紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, model no. NanoDrop ND-3300)
18. 96 孔酶标板 (Costar, catalog number: 3590)
19. 酶标仪 (Molecular Devices®, model no: PARADIGM)
20. PCR 仪 (T100TM; BIO-RAD, model no. 1861096)

21. 电泳仪 (JUNYI-DONGFANG, catalog number: JY300HC)
22. 凝胶成像仪 (BIO-RAD, model no. Universal Hood II)
23. 切胶刀片 (Jinzhong, catalog number: J11010)
24. 磁力架 (Invitrogen DynaMag™-96 Side Magnet, Invitrogen DynaMag™-2 Magne, Invitrogen, catalog number: 12027, 12321D)
25. -80 °C 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific, model no. 907)
26. -20 °C 冰箱 (Haier, catalog number: DW-40L92)

实验步骤

一、种子消毒、萌发及移栽

注：以下实验需在超净台内完成。

1. 挑选饱满的水稻种子。去除水稻种子颖壳，弃去干瘪的种子，不要损伤胚，置于无菌三角瓶内。
2. 使用酒精灭菌。加入 70%酒精，液面没过种子，消毒 30 s，期间不停晃动瓶身，保证每粒种子与酒精充分接触。弃去酒精。
3. 使用次氯酸钠灭菌。加入 2.5%有效氯浓度的次氯酸钠溶液，液面没过种子，消毒 15 min，期间不停晃动瓶身。弃去次氯酸钠。此步重复 3 次。
4. 使用无菌去离子水清洗。加入无菌去离子水，液面没过种子，清洗 10 min，期间不停晃动瓶身。弃去无菌水。此步重复 3 次。
5. 接种至培养基。使用无菌镊子将种子整齐均匀的平铺于 1/2 MS 固体培养基表面，每皿可容纳 10 粒种子，胚向上放置于平板底部 1/3 处 (图 1A)。使用 Parafilm 封口膜封口。
6. 培养水稻种子。将培养皿竖直放置 (图 1B)，于 25 °C，16 h 光照，21%湿度的培养间内培养 5-7 d。

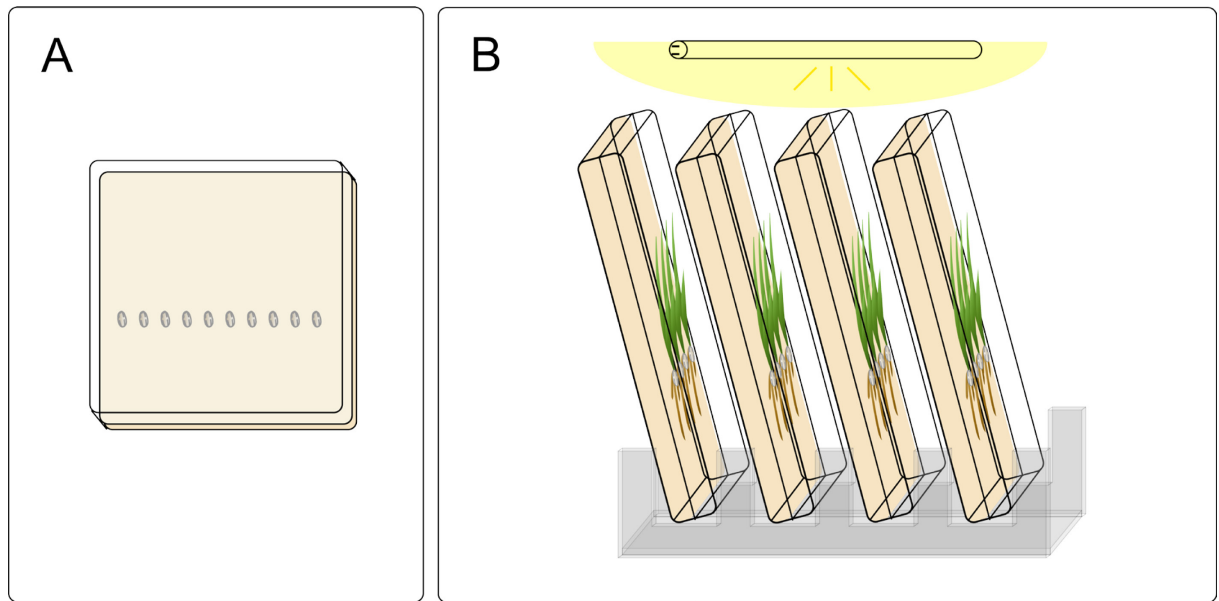


图 1. 水稻种子培养方法. A. 灭菌种子铺板位置; B. 竖直培养方法。

7. 为防止培养基中残留的营养在移栽后对植物生长发育产生影响，需去除根系残留培养基。挑选长势一致的植物无菌苗，使用无菌镊子将无菌苗从培养基中拔出，用无菌去离子水洗去根上残留的培养基。
8. 将无菌苗移栽至大田培养。将清洗干净的幼苗以 6×6 的方阵移栽至田间，每株水稻间隔 20 cm。不同品种间隔至少 30 cm。在正常的水肥条件下生长 8 周。

二、样本收取

1. 土体土壤 (Bulk soil) 样本的收取 (图 2)。于田间未种植植物的地块上使用铲子挖取 $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 的土块。于切面均匀收取各深度土壤约 10 g，此样本即土体土壤样本。
2. 根际土样本的收取 (图 2)。于水稻方阵中央 4×4 的区域中选取长势一致的水稻植株，使用铲子在其四周挖出 $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 的土块，将水稻拔离土壤。佩戴无菌手套将水稻从茎秆基部均匀的劈分成两半。使用无菌镊子和剪刀在断层中挑取 2 至 3 个分蘖的全根剪下，于 30 ml 无菌去离子水中大力摇晃至根系表面附着的土壤颗粒脱落，使用无菌镊子挑出根系弃去。剩余液体于 3,000 rpm 条件下离心 15 min。弃去部分上清至保留约 5 ml 土壤沉淀和上清液，混合均匀。此样本即根际土样本。

- 根系样本的收取 (图 2)。为了获得和水稻根系紧密联系的微生物数据, 需要获得尽可能干净的根系样本。首先佩戴无菌手套将植株根系上的大块土壤去除, 保留 3-4 个分蘖的全根; 之后使用无菌去离子水冲洗根系至无可见的土壤颗粒; 最后置于含有 35 ml 1x PBS 的 50 ml 管中, 使用平板摇床于 180 rpm 条件下清洗 15 min, 更换新管重复清洗 3 次。使用无菌滤纸吸干根系残留水分。使用无菌剪刀将根系破碎成 2 mm 长的小段, 此样本即为根系样本。

注: 所有样本应置于无菌的离心管内于 -80 °C 环境保存。

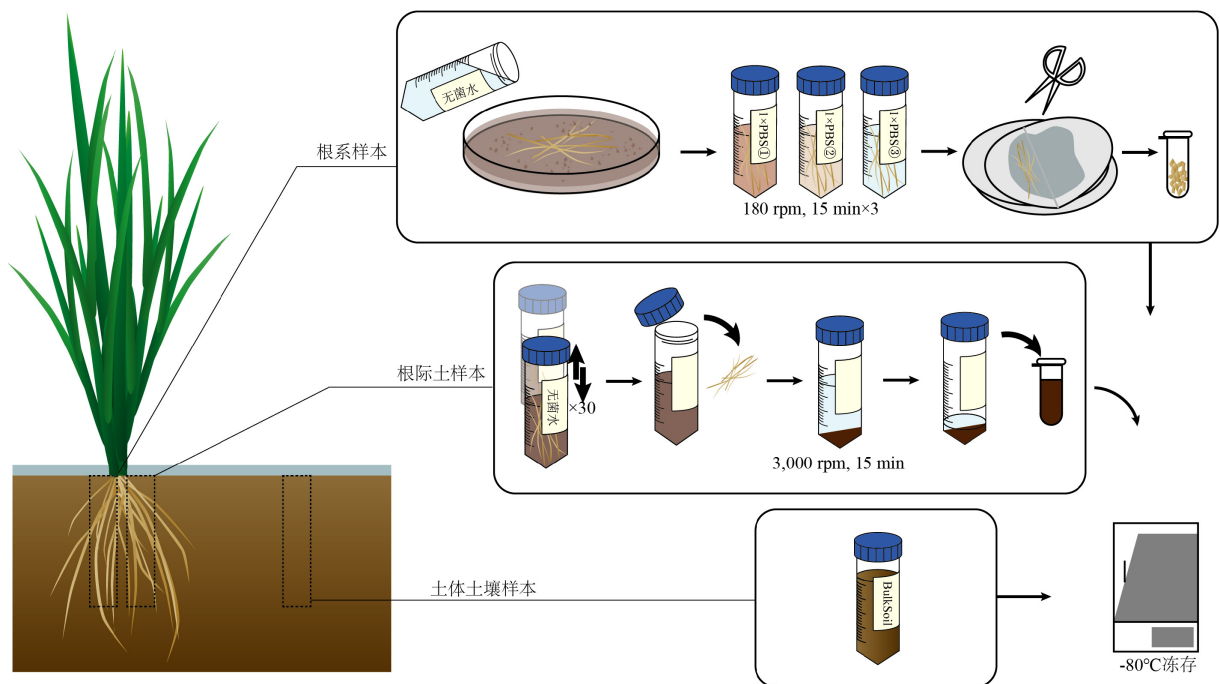


图 2. 根、根际土、土体土壤样本的收取方法

三、PCR 模板 DNA 制备

注: 以下实验应在超净台内完成。

- 确定不同类型样本的上样量。将样本转移至土壤 DNA 提取试剂盒的 Lysing Matrix E 管内。样本量为根系样本 0.2 g, 根际土样本 450 μ l, 土体土壤样本 0.3 g。将样本和 Lysing Matrix E 内研磨珠混合均匀。
- 研磨样本。将 Lysing Matrix E 置于破碎仪内, 7,200 rpm 破碎 30 s, 间隔 30 s, 再次破碎 30 s, 重复 2 次。根系样本因韧性较大, 可在 2 次重复间将 Lysing Matrix E 置于液氮中冷冻 5 s 使研磨更加充分。

3. 溶解细胞膜蛋白。向 Lysing Matrix E 中添加 978 μl 的 Sodium Phosphate Buffer 以及 122 μl 的 MT Buffer。置于破碎仪内，7,200 rpm 破碎 30 s，间隔 30 s，再次破碎 30 s，重复 2 次，使细胞充分裂解。
4. 去除不可溶杂质。将 Lysing Matrix E 置于离心机中，14,000 rcf 离心 15 min。将上清约 900 μl 转移至新 2 ml 离心管。
5. 沉淀样本中蛋白。向样本中添加 250 μl PPS，轻柔的上下翻动 20 次，室温孵化 10 min，14,000 rcf 离心 5 min。将上清转移至新 2 ml 离心管内。
6. 使用 Binding Matrix 吸附样品中 DNA。向 2 ml 管内加入 900 μl 的 Binding Matrix。于旋转混合器上慢速混合 3 至 4 min。静置 8 min。去除上清液 1100 μl 。剩余样品混合均匀后转移至 SPIN Modules 内。14,000 rcf 离心 1 min，去除滤液。
7. 再次溶解并去除样品中蛋白质。向 SPIN Modules 内添加 500 μl Concentrated SEWS-M (需按试剂盒要求添加乙醇后使用)。使用移液器吹吸混匀过滤柱内液体。14,000 rcf 离心 1 min，去除滤液。为保证滤液去除彻底，再次空管 14,000 rcf 离心 2 min，将过滤柱转移至新的 2 ml 离心管内。
8. 从 Binding Matrix 中溶解并分离 DNA。向过滤柱内添加 100 μl DES。置于金属水浴锅内，55 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 5 min。14,000 rcf 离心 1 min。弃去过滤柱。置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。
9. 粗测 DNA 浓度以确定稀释倍数。因后续流程中的 DNA 精确定量对低浓度 DNA 敏感，需提前稀释样本 DNA，定量 DNA 上样的适宜浓度为 5-20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。使用分光光度计测量 DNA 浓度以确定各样本合适的稀释倍数。
10. 稀释 DNA。将 2 μl 样本转移至 96 孔 PCR 板，按照计算好的稀释倍数添加 Nuclease-Free Water 稀释并混合均匀。
11. 制备定量 DNA 的标准曲线。使用 1x TE 稀释 PicoGreen DNA 定量试剂盒中的 λ DNA 50 倍至 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。按表 1 所示将稀释后的 λ DNA 和 1x TE 加入 96 孔酶标板中，混合均匀，每个浓度设置两个重复。

表 1. 定量 DNA 的标准曲线的浓度及配置方法

λ DNA 浓度 (ng/ μ l)	1x TE 体积 (μ l)	2 μ g/ml λ DNA 体积 (μ l)
0.75	12.5	37.5
0.5	25	25
0.4	30	20
0.25	37.5	12.5
0.1	45	5
0.05	47.5	2.5
0.01	49.5	0.5
0	50	0

- 使用 1x TE 稀释样本 DNA。将 2 μ l 稀释好的样本 DNA 和 48 μ l 1x TE 加入 96 孔酶标板的空孔中，混合均匀。
- 添加荧光染料 PicoGreen。于避光的环境中，将试剂盒中的 PicoGreen 荧光染料使用 1x TE 稀释 200 倍，并添加 50 μ l 至标准曲线样品孔及待测样品孔内，混合均匀，孵育 5 min。
- 测量样品的荧光。使用酶标仪于 480 nm 的激发光和 520 nm 的吸收光下读取荧光值，每个样品读取 3 次，读数取平均值。
- 计算样本 DNA 的浓度。使用标准曲线的 0 ng/ μ l 的 2 个样品孔的读数平均值作为空白对照值校准标准曲线样品孔和待测样品孔的读数。根据标准曲线样品的 DNA 浓度和荧光值绘制标准曲线。将样品孔的荧光值带入标准曲线以求得 DNA 浓度。
- 稀释 DNA 模板至 3.5 ng/ μ l。根据荧光定量的 DNA 浓度计算稀释量，将 DNA 样本于 96 孔 PCR 板内使用无核酸水稀释至浓度为 3.5 ng/ μ l。

四、两步法扩增样品 16S rRNA 基因

注：以下实验应在超净台内完成。

- 引物设计及稀释。两步法扩增 16S rRNA 基因使用两对引物逐步添加用以区分同一文库中不同样本的标签 (Barcode) 序列、用以区分不同文库的索引 (index) 序列及 Illumina 测序所需序列，引物结构如图 3 所示，引物序列见附件 1，引物合成于

英潍捷公司，引物纯化方式为 HPLC 纯化。使用前需使用无核酸水将引物稀释至 100 nmol/ml。

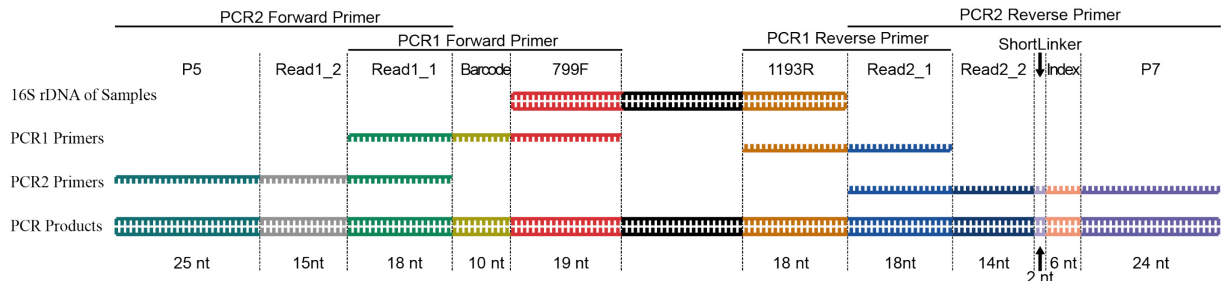


图 3. 16S rRNA 基因两步扩增所用引物的结构

2. 第一轮 PCR 扩增。第一轮 PCR 扩增通过引物在 16S rDNA 的 799 序列位置前引入了不同的 Barcode 序列用以区分同一文库中的不同样本，每个文库可承载 60 个不同的样本对应 60 个不同的 Barcode 序列。使用 PrimeSTAR 热稳定 DNA 聚合酶体系扩增，扩增体系如表 2 所示。所有样本平行扩增 3 份，同时每个样本设立一个使用无核酸水替代模板 DNA 的阴性对照，用于指示使用的实验试剂及实验过程是否存在污染。扩增条件如表 3 所示。扩增产物置于 -20 °C 环境保存。

表 2. 第一轮 PCR 扩增体系

试剂名称	添加体积 (μl)
Nuclease-Free Water	16.8
5x PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	6
dNTP Mixture	2.4
正反向引物	0.75
3.5 ng/μl 的 DNA 模板	3
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.3

表 3. 第一轮 PCR 扩增条件

步骤	温度 (°C)	时间
1	98	30 s
2	98	10 s
3	55	15 s
4	72	1 min
重复步骤 2 至 4 共 25 个循环		
5	72	5 min
6	12	保温

- 通过琼脂糖电泳进行第一轮 PCR 的质量控制。将平行扩增的样本混合均匀后吸取 5 μ l 与 1 μ l 6x Loading Buffer 混合加入 1%琼脂糖凝胶中进行电泳。若阴性对照无条带 (错误范例见图 4B), 各样品间条带亮度一致 (错误范例见图 4C), 位置位于 400 bp 左右, 则扩增质量合格 (图 4A)。

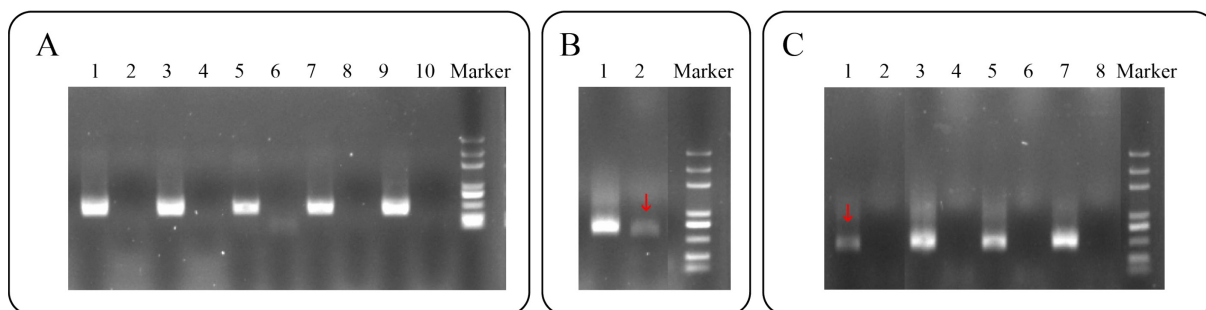


图 4. 利用琼脂糖电泳对 PCR 过程进行质量控制的范例

图中单数泳道为样品 PCR 扩增产物, 双数泳道为前一泳道样本的阴性对照; A. 质量合格的 PCR 扩增产物的电泳条带; B. 阴性对照出现扩增条带的错误范例; C. PCR 产物 DNA 浓度低导致条带亮度不一致的错误范例。

- 使用磁珠结合 PCR 产物中的 DNA。将 Beckmen Coulter Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒中的磁珠放置于室温环境孵育 30 min。取 50 μ l PCR 产物和 50 μ l 磁珠于 96 孔 PCR 板内混匀, 室温放置 10 min。

5. 去除 PCR 产物中的杂质以纯化 DNA。将混合了磁珠的 PCR 产物置于磁力架上，放置 5 min。使用移液器小心吸出 96 孔 PCR 板内的液体，注意不要触碰磁珠。向每个样品孔中加入 80%乙醇 100 μ l 洗涤样品 30 s，吸出乙醇，重复洗涤 2 次。将 96 孔 PCR 板取下磁力架，置于操作台上晾干 5 min 至酒精挥发完全。
6. 洗脱纯化的 DNA。向每个样品孔中加入 50 μ l 1x TE 缓冲液，吹吸混匀至管壁上无黏附的磁珠。室温放置 5 min。将 96 孔 PCR 板置于磁力架上 5 min 使磁珠吸附在管壁。将 96 孔 PCR 板内液体吸出转移至新板，吹吸混匀。纯化后的 DNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 环境保存。
7. 第二轮 PCR 模板 DNA 的稀释。使用分光光度计对磁珠纯化后的 DNA 进行浓度测定，并使用无核酸水将 DNA 稀释至 10 ng/ μ l。
8. 第二轮 PCR 扩增。第二轮 PCR 扩增在反向引物 1193R 后端添加了不同的 index 序列用以区分不同文库。使用 PrimeSTAR 热稳定 DNA 聚合酶体系扩增，扩增体系如表 4 所示。所有样本平行扩增 3 份，同时每个样本设立一个使用第一轮 PCR 阴性对照的 PCR 产物替代模板 DNA 的阴性对照，用于指示使用的实验试剂及实验过程是否存在污染。扩增条件如表 5 所示。扩增产物置于 -20 $^{\circ}$ C 环境保存。

表 4. 第二轮 PCR 扩增体系

试剂名称	添加体积 (μ l)
Nuclease-Free Water	13.8
5x PrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	6
dNTP Mixture	2.4
正反向引物	0.75
10 ng/ μ l 的 DNA 模板	6
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.3

表 5. 第二轮 PCR 扩增条件

步骤	温度 (°C)	时间
1	98	30 s
2	98	10 s
3	55	15 s
4	72	1 min
重复步骤 2 至 4 共 8 个循环		
5	72	5 min
6	12	保温

- 通过琼脂糖电泳进行第二轮 PCR 的质量控制。将平行扩增的样本混合均匀后吸取 5 μ l 样本与 1 μ l 6x Loading Buffer 混合加入 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳。质量检测标准同第一轮 PCR。

五、PCR 产物的纯化、混合及 Illumina 测序

- 利用琼脂糖电泳纯化 PCR 产物。因不同的样本已添加了不同的 barcode 及 index 序列，可以合并样本进行纯化回收。将同一 index 的文库中的样本每 3 个各取 25 μ l 第二轮 PCR 产物混合，添加 15 μ l 6x Loading Buffer，吹吸混匀。置于 1.2% 的琼脂糖电泳凝胶中，125 V 电压下电泳约 40 min，至条带距离胶孔约 5 cm。
- 切胶并溶解。将 400 bp 位置的条带用干净的手术刀切下，置于 2 ml 离心管内，称量胶块的重量，以每 10 mg 凝胶添加 10 μ l 的琼脂糖电泳凝胶纯化回收试剂盒中的 Embrane Binding Solution 的比例向离心管内添加 Embrane Binding Solution。置于 50-65 °C 金属水浴锅中 10 min 至胶块溶解，期间每间隔 2 min 取出离心管颠倒混匀以加速胶块溶解。
- 分离胶液并洗涤 DNA。将融化的胶液冷却至室温，添加至带有 SV Minicolumn 过滤柱的 Collection Tube 中，孵育 1 min。16,000 rcf 离心 1 min。弃去 Collection Tube 中滤液。加入 700 μ l Membrane Wash Solution (需按试剂盒要求添加乙醇后使用)。16,000 rcf 离心 1 min。弃去 Collection Tube 中滤液。再次加入 500 μ l Membrane Wash Solution。16,000 rcf 离心 5 min。弃去 Collection Tube，将 SV Minicolumn 置入新的 1.5 ml 离心管，开盖干燥 1 min 以挥发酒精。

4. 洗脱纯化的 DNA。向离心管内添加 50 μl 无核酸水，静置 3 min。16,000 rcf 离心 1 min。弃去 SV Minicolumn。得到的纯化 DNA 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境保存。
5. 切胶回收 DNA 的定量。使用 PicoGreen DNA 定量试剂盒对胶回收产物进行定量，方法参照步骤 20-26。
6. 混合同一文库样本。带有同一 index 的样本按照每个胶回收产物 200 ng DNA 的量混合入 1.5 ml 离心管内。
7. 文库样本的纯化。使用 Beckmen Coulter Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒对文库 DNA 进行纯化以获得纯净的文库 DNA 样本，方法参照第一轮 PCR 产物的纯化。注意体系更换为 1.5 ml 离心管，应更换对应磁力架；DNA 样品和磁珠的添加比例从 1:1 调整为 1:0.9；使用 80%酒精洗涤时体积调整为 200 μl 以没过磁珠；本次纯化进行两次以得到尽可能纯净的文库样本。纯化后的文库样本置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境保存。
8. 测量各文库样本的 DNA 浓度。使用分光光度计测量混合好并纯化了了的文库样本的 DNA 浓度。
9. 测序样本的混合。按照每个文库 1200 ng DNA 的量混合所有的待测序文库至 1.5 ml 离心管。若部分文库样品不满 60 个，应按比例减少其混样量。单次测序至少需要 1500 ng DNA，测序由测序供应商处理。每个文库在 Illumina HiSeq2500 或 NovaSeq6000 平台采用双端 250 bp 模式测序，数据量 $> 3\text{ GB}$ ，即平均每个样本 10 万条读长 (10 万条/样 \times 60 个样 \times 250 bp \times 2 端 = 3 GB)。剩余文库样本和混合测序样本置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境保存。

溶液配方

1. 10x PBS (Phosphate Buffer Saline) 存储液：1.3 M NaCl、70 mM Na_2HPO_4 和 30 mM NaH_2PO_4 (pH = 7)。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，可在室温 (22-25 $^{\circ}\text{C}$) 存储 2 个月。
2. 1x PBS 工作液：用无菌去离子水将 10x PBS 存储液稀释 10 倍。可在室温下存储 1 个月。
3. 无菌去离子水：1 L 去离子水装入 1 L 试剂瓶内，121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。在室温条件下可储存 1 个月。

4. 2.5%有效氯浓度的次氯酸钠溶液：将 200 ml 次氯酸钠溶液溶解于 120 ml 无菌去离子水中。现用现配。
5. 70%乙醇溶液：将 70 ml 无水乙醇溶解至 30 ml 无菌去离子水中。现用现配。
6. 80%乙醇溶液：将 80 ml 无水乙醇溶解至 20 ml 无菌去离子水中。现用现配。
7. 1x TAE：将 20 ml 50x TAE 溶解至 980 ml 无菌去离子水中。在室温条件下可储存 1 个月。
8. 1x TE Buffer：将 5 ml 20x TE Buffer 溶解至 95 ml 无菌去离子水中。在-4 °C 条件下可储存 1 个月。

失败经验

1. 控制环境微生物污染。微生物在环境中普遍存在的特性导致实验过程中样本容易受到环境微生物的污染。因此所有操作应尽量在超净工作台内完成，收样过程等不能在超净工作台内完成的步骤应使用 70%酒精对实验环境进行消毒；流程中所使用的所有耗材应进行高温高压灭菌并烘干后使用，实验过程中应全程佩戴手套并使用 70%酒精对手套消毒；所有流程使用的试剂应保证无菌。
2. 控制样本的交叉污染。收样过程中不同处理的样本易产生交叉污染，应在更换不同处理的样本时，使用新的或消毒所用耗材（如手套、剪刀、镊子、铲子等）。
3. 防止 DNA 提取过程引入差异。样本破碎质量会影响 DNA 提取的整体性，进而在后续数据中引入差异。应保证所有样本破碎至匀浆状态、无可见大颗粒，保证 DNA 提取的完整。
4. 防止文库构建过程引入差异。为防止 PCR 过程中引物偏好性引入差异，PCR 过程进行 3 组平行扩增并混合；为防止扩增效率不同引入差异，同类样本的 PCR 产物浓度、电泳条带亮度应在一定范围内保持一致，避免出现 2 倍以上的差异；为防止切胶回收过程引入差异，应保证所有切下的胶块重量差异在 10 mg 内，并且切下的胶块在凝胶上位于同一水平线上。

致谢

本项目由中国科学院战略先导专项（编号：XDA24020104）、中国科学院前沿科学重点研究项目（编号：QYZDB-SSW-SMC021）、国家自然科学基金项目（编号：

31772400, 31761143017, 31801945, 31701997) 和中国科学院青年创新促进会 (编号: 2020101, 2021092) [Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Precision Seed Design and Breeding, No. XDA24020104), the Key Research Program of Frontier Sciences of the Chinese Academy of Science (No. QYZDB-SSW-SMC021), the National Natural Science Foundation of China (No. 31772400, 31761143017, 31801945, 31701997), the Youth Innovation Promotion Association CAS (No. 2020101, 2021092)] 支持。此实验方法已经在 *Nature Biotechnology* (Zhang *et al.*, 2019) 等国际顶级期刊发表文章中使用。

参考文献

1. Zhang, J. Y., Liu, Y. X., Zhang, N., Hu, B., Jin, T., Xu, H. R., Qin, Y., Yan, P. X., Zhang, X. N., Guo, X. X., Hui, J., Cao, S. Y., Wang, X., Wang, C., Wang, H., Qu, B. Y., Fan, G. Y., Yuan, L. X., Garrido-Oter, R., Chu, C. C. and Bai, Y. (2019). [NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice.](#) *Nat Biotechnol* 6: 676-689.
2. Paloma, D., Thorsten, T., Ruben, G., Matthew, A., Eric, K., Paul S. L. and Stephane, H. (2018). [Microbial interkingdom interactions in roots promote Arabidopsis survival.](#) *Cell* 175: 973-983.