



中国科学院水生生物研究所
INSTITUTE OF HYDROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

微生物16S/18S/ITS/功能基因 扩增子测序简介及应用

分析测试中心
向浩
2020.07.24

报告内容

一、基因组技术平台情况简介

二、微生物多样性研究方法

三、扩增子测序简介

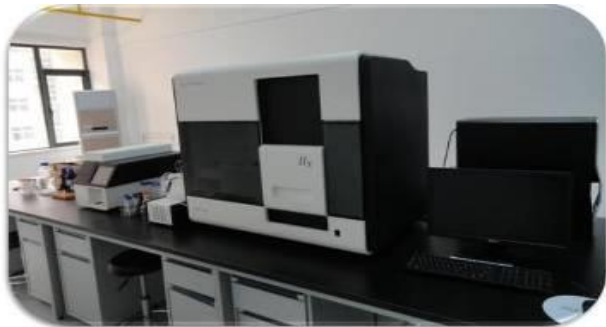
四、扩增子测序应用

五、常见问题和送样要求

报告内容

一、基因组技术平台情况简介

基因组技术平台情况简介



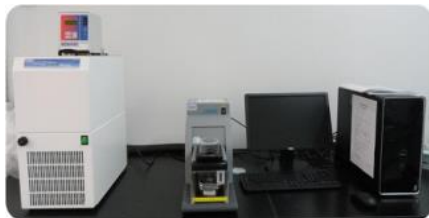
高通量DNA测序仪



Miseq 长片段高通量测序系统



Nextseq500高通量测序系统



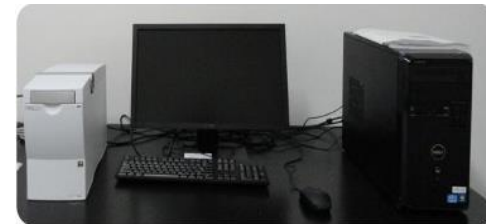
DNA剪切仪



核酸片段回收仪



脉冲场电泳系统



生物分析仪



基因组组装分析仪



Qubit荧光计

核酸提取--建库--测序--数据分析
全流程配套基因组技术服务

报告内容

二、微生物多样性研究方法

微生物多样性研究方法

- 微生物培养

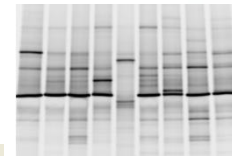


- 分子生物学技术

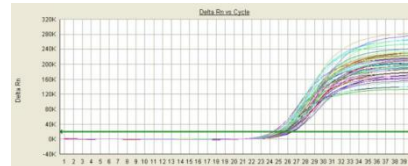
- 高通量测序：宏基因组和扩增子测序



- PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)



- 实时荧光定量PCR



- 克隆文库



- 三代测序：PacBio和Nanopore



报告内容

三、扩增子测序简介

16S扩增子测序

16S扩增子测序是指利用合适的通用引物扩增环境中微生物的16S rDNA/18S rDNA /ITS高变区或功能基因，通过高通量测序技术检测PCR产物的序列变异和丰度信息，分析该环境下的微生物群落的多样性和分布规律，以揭示环境样品中微生物的种类、相对丰度、进化关系等。



16S / 18S / ITS
目标区域扩增子
高质量的扩增子测序

宏基因组测序

宏基因组学（Metagenomics），又称元基因组学，是以特定环境中的整个微生物群落作为研究对象，无需分离培养，直接提取环境样本DNA进行测序，研究环境微生物的群落结构、物种分类、系统进化、基因功能及代谢网络等，已广泛应用于微生物领域。



16S测序和宏基因组测序有什么区别？

一、测序原理不同

16S测序是将提取好的微生物基因组DNA，通过对某一段或几段高变区序列(V4区或V3-V4区)进行PCR扩增，建库后进行测序。

宏基因组测序则是将微生物基因组DNA随机打断成300-500bp的小片段，在片段两端加入测序接头，然后进行测序。

二、物种鉴定深度不同

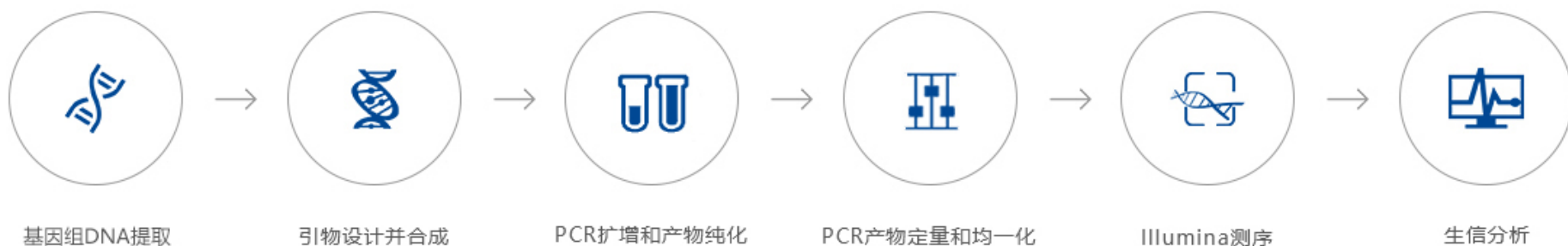
16S测序得到的序列很多注释不到种水平，而宏基因组测序则能鉴定微生物到种水平甚至菌株水平。

三、研究目的不同

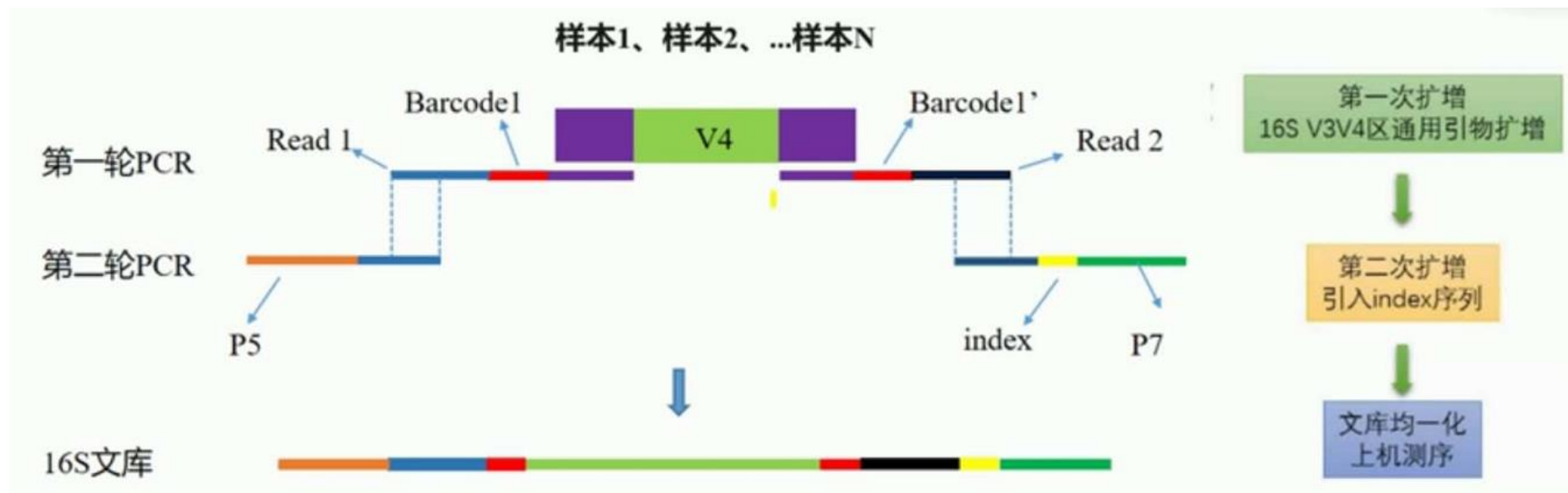
16S测序主要研究群落的物种组成、物种间的进化关系以及群落的多样性。

宏基因组测序在16S测序分析的基础上还可以进行基因和功能层面的深入研究(GO、Pathway等)。

扩增子测序实验流程



扩增子文库结构

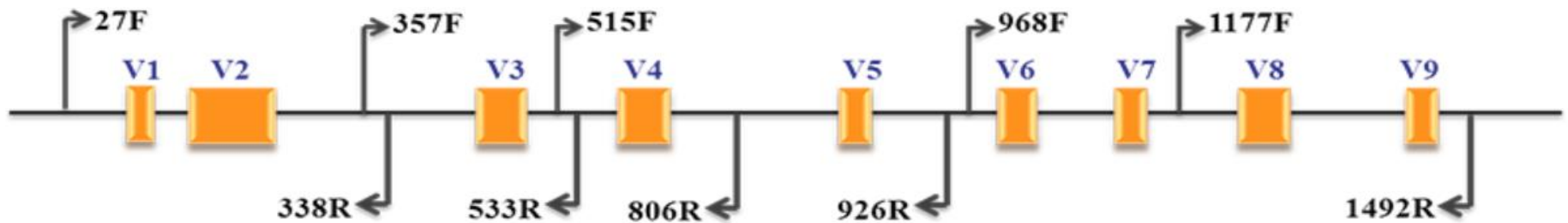


选择合适的测序区域

细菌

细菌核糖体RNA（rRNA）有三种类型：5S rRNA（120bp）、16S rRNA（约1540bp）和23S rRNA（约2900bp）。5S rRNA基因序列较短，包含的遗传信息较少，不适于细菌种类的分析鉴定；23S rRNA基因的序列太长，且其碱基的突变率较高，不适于鉴定亲缘关系较远的细菌种类；**16S rRNA普遍存在于原核细胞中，且含量较高、拷贝数较多（占细菌RNA总量的80%以上），便于获取模板，功能同源性强，遗传信息量适中，适于作为细菌多样性分析的标准。**

16S rRNA编码基因序列共有10个保守区和9个高可变区。其中，**V3-V4区其特异性好，数据库信息全，是细菌多样性分析注释的最佳选择。**



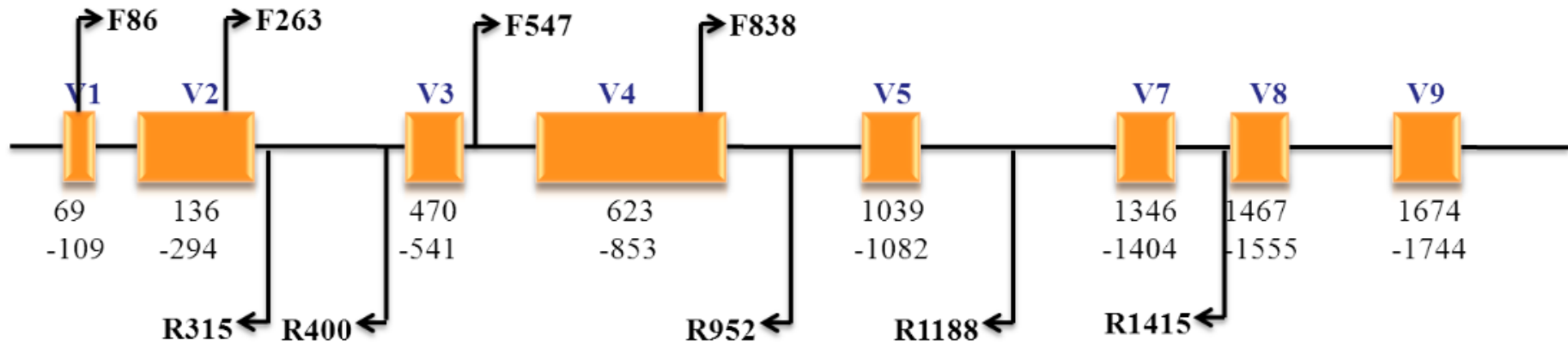
细菌16S rRNA基因序列组成及引物选择

选择合适的测序区域

真核生物

与细菌多样性分析类似，在真核微生物中也有三类核糖体RNA（rRNA），包括5.8S rRNA、18S rRNA和28S rRNA。

18S rRNA基因是编码真核生物核糖体小亚基的DNA序列，其中既有保守区，也有可变区（V1-V9，没有V6区）。保守区域反映了生物物种间的亲缘关系，而可变区则能体现物种间的差异，适用于作种级及以上的分类标准。**其中，V4区使用最多、数据库信息最全、分类效果最好，是18S rRNA基因分析注释的最佳选择。**



选择合适的测序区域

真菌

ITS序列是内源转录间隔区（Internally Transcribed Spacer），位于真菌18S、5.8S和28S rRNA基因之间，分别为ITS 1和ITS 2。

在真菌中，5.8S、18S和28S rRNA基因具有较高的保守性，而ITS由于承受较小的自然选择压力，在进化过程中能够容忍更多的变异，在绝大多数真核生物中表现出极为广泛的序列多态性。同时，ITS的保守型表现为种内相对一致，种间差异较明显，能够反映出种属间，甚至菌株间的差异。并且ITS序列片段较小（ITS 1和ITS 2长度分别为350 bp和400 bp），易于分析，目前已被广泛用于真菌不同种属的系统发育分析。



选择合适的测序区域

古细菌

古细菌（archaebacteria）又叫古生菌、古菌，是一类很特殊的细菌，同时具有原核生物和真核生物的某些特征。古细菌多生活在各种极端的生态环境中，它们代表了生命的极限，确定了生物圈的范围。古细菌和真细菌、真核生物一起，构成了生物的三域系统。古细菌分为泉古菌、广古菌、初古菌和纳古菌。具有代表性的古细菌有极端嗜热菌、极端嗜盐菌、极端嗜酸菌、产甲烷古菌、嗜热菌、嗜盐菌等。

研究表明引物对519F/915R和344F/915R对于古细菌的特异性最好。对于Illumina MiSeq 2×300 bp的测序平台，引物519F/915R最适合（16S V4V5区）；而引物344F/915R则更适合于Roche 454测序平台。

选择合适的测序区域

特定功能微生物

功能微生物是在自然界中由于其功能的重要性而受到广泛关注的一类微生物，如硝化细菌、反硝化菌、氨氧化细菌、硫酸盐还原菌、固氮菌、固氮菌等。每种功能微生物在分类学上可能有很大不同，但却具有相类似的基因使其能够发挥同样的功能，因此使这些功能细菌发挥这种特定功能的基因就称为功能基因，如 *nxrA*、*nirS*/*nirK*、*amoA*、*dsrB*、*nifH*、*nifH*。功能基因测序可有效研究特定环境中的功能微生物物种信息。

功能微生物	测序基因	特异引物	推荐平台
产甲烷菌	16S rRNA gene	Arch519F / Arch915R	MiSeq 2×300
硫酸盐还原菌SRB	<i>dsrB</i>	<i>dsrF</i> / <i>dsrR</i>	MiSeq 2×300
硝化细菌AOB	16S	CTO189f / CTO653r	MiSeq 2×300
氨氧化细菌AOB	<i>amoA</i>	<i>amoA</i> -1F / <i>amoA</i> -2R	MiSeq 2×300
氨氧化古菌AOA	<i>amoA</i>	Arch <i>amoA</i> F / Arch <i>amoA</i> R	454
硝化细菌NOB	16S rRNA gene	FGPS1269 / FGPS872	MiSeq 2×300
硝化细菌NOB	<i>nxrA</i>	<i>nxrA</i> F / <i>nxrA</i> R	MiSeq 2×300
厌氧氨氧化菌AMX	16S rRNA gene	Amx368 / Amx820R	MiSeq 2×300
反硝化菌	<i>narG</i>	<i>narG</i> 1960f / <i>narG</i> 2650r	454
	<i>nirK</i>	F1aCu / R3Cu	MiSeq 2×300
	<i>nirS</i>	cd3aF / R3cd	MiSeq 2×300
	<i>nosZ</i>	<i>nosZF</i> / <i>nosZR</i>	MiSeq 2×300
定鞭金藻	<i>LSU</i>	F / R	MiSeq 2×300
固碳微生物	<i>cbbL</i>	595F / 1387R	454
	<i>cbbM</i>	F / R	MiSeq 2×300
固氮微生物	<i>nifH</i>	PolF / PolR	MiSeq 2×300

上机测序仪



Illumina MiSeq测序仪

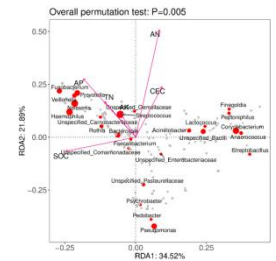
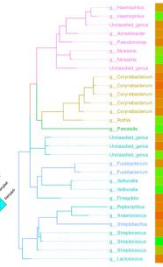
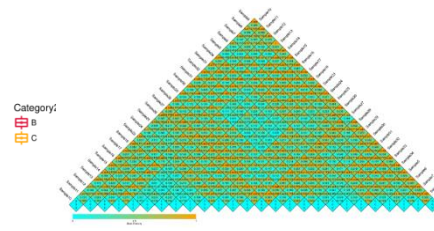
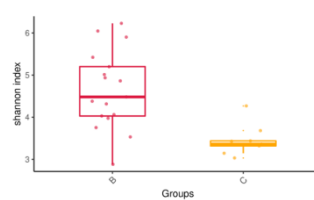
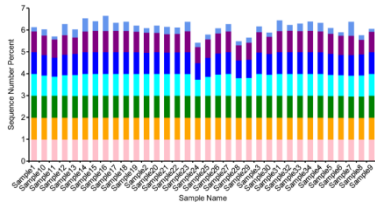
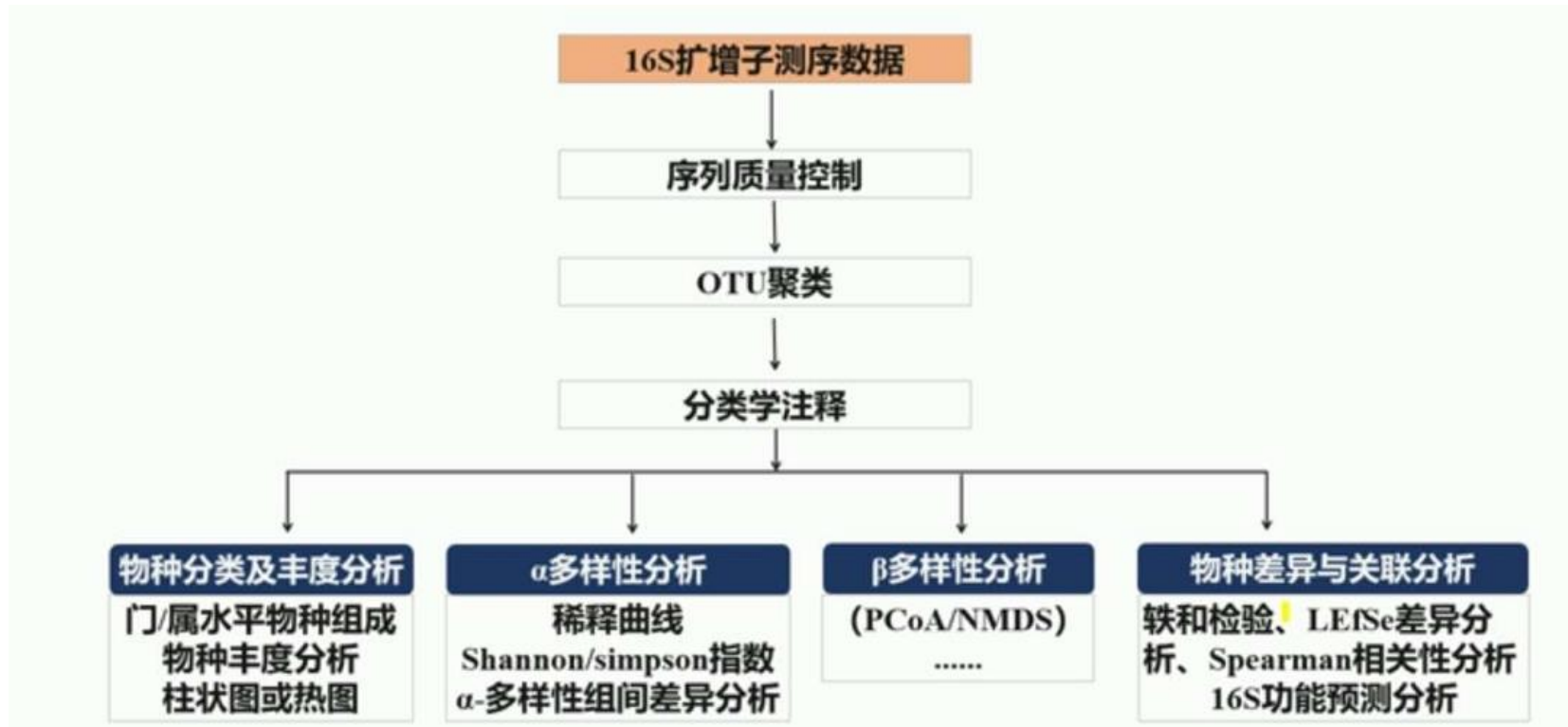
测序区域：16S/18S rRNA /ITS等

测序读长：2x250bp /2x300bp

测序数据量：15M/25M

检测样本数：100-200

16S扩增子数据分析流程



报告内容

四、扩增子测序应用

扩增子测序应用领域

- 医学领域**：疾病与人体微生物间关系，如代谢类疾病、消化类疾病、自身免疫性疾病、肿瘤癌症、神经类疾病及其他疾病等；
- 畜牧领域**：肠道、瘤胃等微生物群落与动物繁殖、生长发育、营养健康、免疫和疾病治疗等的互作关系；
- 农业领域**：根际微生物与植物互作、农业耕作/施肥处理与土壤微生物群落等；
- 环境领域**：某一特定环境（雾霾、沙尘等污染环境，住宅、商场等生活环境）的微生物群落组成，有机肥发酵处理、污水治理、石油降解、水体及海洋环境等微生物群落分布和组成等；
- 生物能源**：特殊功能的菌株、基因挖掘、工程菌的开发；
- 特殊极端环境**：极端环境条件下的微生物类群研究。

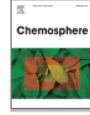
扩增子测序样本类型



淡水沉积物



Chemosphere
Volume 253, August 2020, 126740



Impact of microplastics on microbial community in sediments of the Huangjinxia Reservoir—water source of a water diversion project in western China

Changchao Li^a, Yandong Gan^b, Junyu Dong^a, Jiaohui Fang^a, Hao Chen^a, Quan Quan^c, Jian Liu^a✉

发表时间: 2020

研究对象: 西部调水工程水源地黄金峡水库

样本类型: 水底沉积物

扩增区域: 16S V3V4区

测序平台: Hiseq (PE250)

主要结论: 微塑料对微生物群落结构及组成存在显著影响；微生物群落功能预测结果表明微塑料对微生物群落的功能存在显著影响。

山东大学Chemosphere: 淡水生态系统沉积物中的微塑料及其对微生物群落的影响

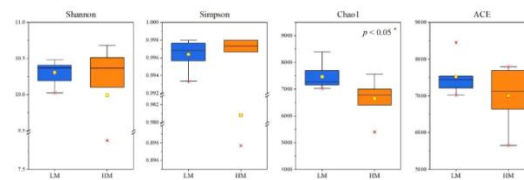
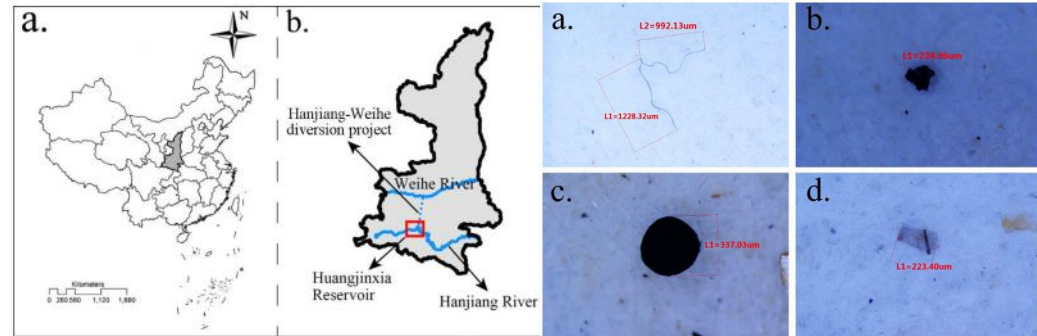


图6. HM和LM两组沉积物之间的微生物多样性指数(Shannon、Simpson、Chao1和ACE)比较。

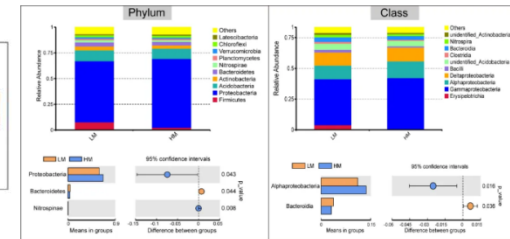


图7. HM和LM两组沉积物微生物在门和纲水平上的相对丰度以及具有显著差异的细菌类群。

水体微生物

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Front. Microbiol., 30 May 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00812>



Resilience of Freshwater Communities of Small Microbial Eukaryotes Undergoing Severe Drought Events

Marianne Simon¹, Purificación López-García^{1*}, Philippe Deschamps¹, Gwendal Restoux², Paola Bertolino¹, David Moreira¹ and Ludwig Jardillier^{1*}

Front. Microbiol.: 小型真核生物淡水群落在严重干旱事件中的恢复力

发表时间: 2016

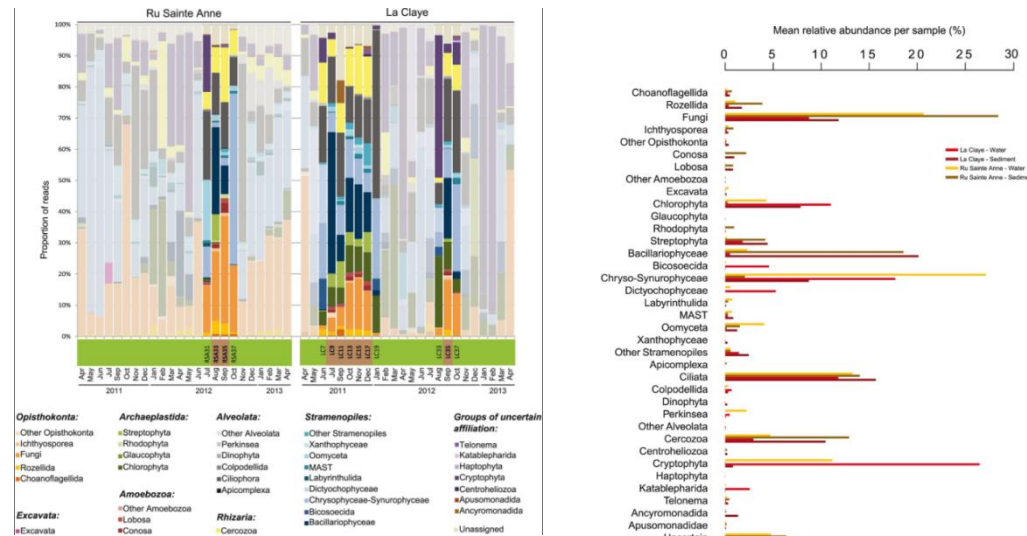
研究对象: 一个池塘和一条小溪

样本类型: 水样（滤膜）和水底沉积物

扩增区域: 18S V4区

测序平台: 罗氏454

主要结论: 干旱后沉积物中的真核生物群落与水体中差异很大。但是补水后，水生原生生物群落在一个月内恢复了原有结构。



水体活性污泥微生物

> Environ Sci Technol. 2020 May 5;54(9):5884-5892. doi: 10.1021/acs.est.9b07950. Epub 2020 Apr 16.

Biogeography and Assembly of Microbial Communities in Wastewater Treatment Plants in China

Bing Zhang¹, Daliang Ning², Joy D Van Nostrand², Chenxiang Sun¹, Yunfeng Yang¹, Jizhong Zhou^{1,2}, Xianghua Wen¹

Affiliations + expand

PMID: 32259441 DOI: 10.1021/acs.est.9b07950

发表时间: 2020

研究对象: 污水处理厂

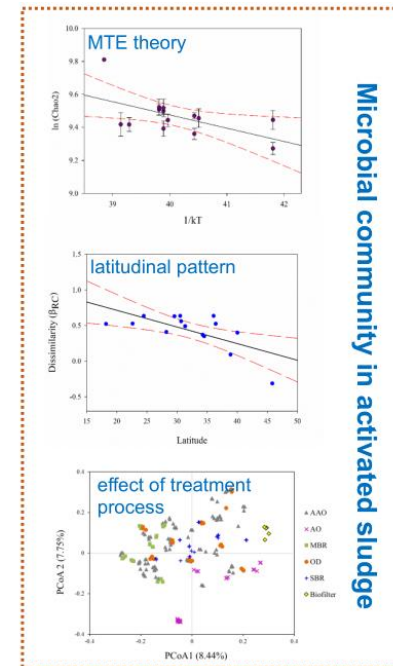
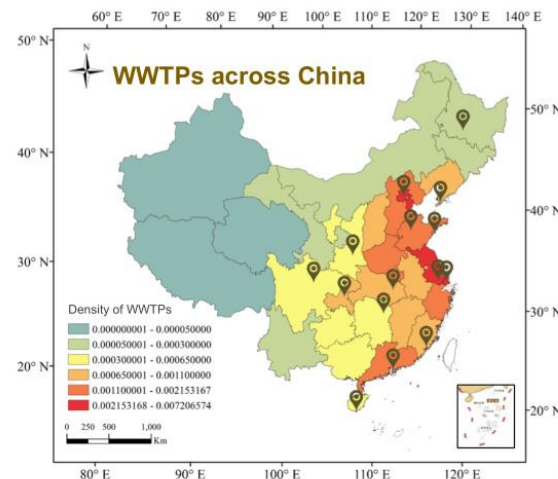
样本类型: 活性污泥

扩增区域: 16S V4区

测序平台: Miseq (PE250)

主要结论: 低纬度的污水处理厂往往拥有更多种类的微生物，年平均温度是影响微生物群落结构的最重要因素。

Environ Sci Technol.: 中国污水处理厂微生物群落的生物地理学与组合



ACS Paragon Plus Environment

鱼肠道微生物

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Effects of hydrolyzed fish protein and autolyzed yeast as substitutes of fishmeal in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet, on fish intestinal microbiome

S. Rimoldi¹, E. Gini¹, J. F. A. Koch², F. Iannini¹, F. Brambilla³ and G. Terova^{1*}

发表时间: 2020

研究对象: 金枪鱼

样本类型: 肠道消化物

扩增区域: 16S V3V4区

测序平台: Miseq (PE300)

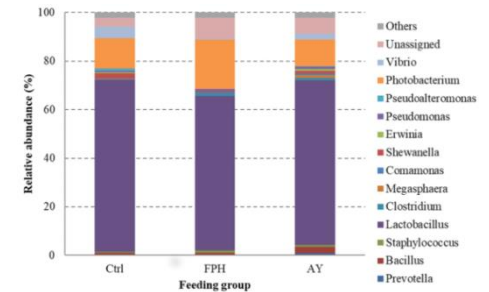
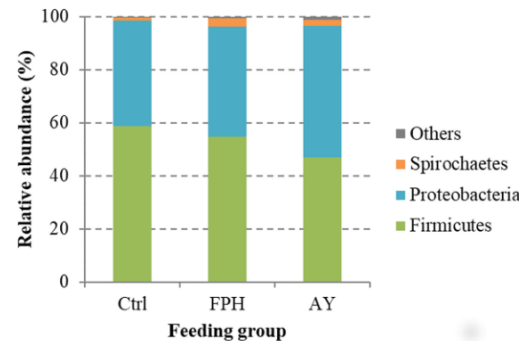
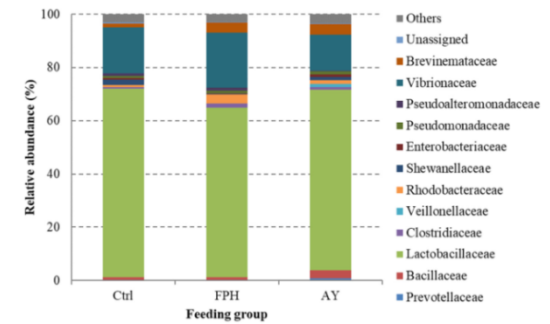
主要结论: 与对照组相比, 投喂酵母显示出在杆菌和梭状芽孢杆菌中的富集, 而投喂FPH (鱼蛋白水解物) 显示出显著低于其他两个喂养组的属于交替单胞菌和肠杆菌的细菌数量。

BMC Veterinary Research: 水解鱼蛋白和自溶酵母替代鱼粉对金枪鱼肠道微生物的影响

Table 1 Alpha diversity metrics of gut microbial communities in sea bream fed with three experimental diets

Items	Ctrl	DIETS FPH	AY
Reads	52,248 ± 14,709	49,553 ± 17,950	53,334 ± 15,413
Observed OTUs	53.0 ± 4.2	47.4 ± 8.8	49.0 ± 6.1
Good's coverage	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00
PD whole tree	6.1 ± 0.4 ^{ab}	5.4 ± 1.0 ^b	6.5 ± 0.9 ^a
Chao1	56.2 ± 4.9	49.6 ± 9.4	52.5 ± 7.9
Shannon	1.8 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.2 ^b
Simpson	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1

All data are reported as mean values (n = 15) ± SD. Different superscript letters on the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).



人肠道微生物

GUT MICROBES
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1747329>



RESEARCH PAPER/REPORT



Altered gut microbial profile is associated with abnormal metabolism activity of Autism Spectrum Disorder

Zhou Dan^{a,b,c,d*}, Xuhua Mao^{e*}, Qisha Liu^{a,b,c*}, Mengchen Guo^{a,b,c}, Yaoyao Zhuang^{a,b,c}, Zhi Liu^{a,b,c}, Kun Chen^{a,b,c}, Junyu Chen^{a,b,c}, Rui Xu^{a,b,c}, Junming Tang^e, Lianhong Qin^f, Bing Gu^g, Kangjian Liu^h, Chuan Su^g, Faming Zhang^d, Yankai Xia^h, Zhibin Hu^h, and Xingyin Liu^{a,b,c,d}

^aDepartment of Pathogen-Microbiology Division, State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Center of Global Health, Nanjing Medical University, Nanjing, China; ^bKey Laboratory of Pathogen of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing, China; ^cKey Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing, China; ^dKey Laboratory of Holistic Integrative Enterology, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, China; ^eDepartment of Clinical Laboratory, Affiliated Yixing People's Hospital, Jiangsu University, Wuxi, China; ^fChildren Growth Center of Bo'ai Homestead in Yixing, Yixing, China; ^gMedical Technological College of Xuzhou Medical University, Xuzhou, China; ^hState Key Laboratory of Reproductive Medicine, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, China

发表时间: 2020

研究对象: 孤独症患者

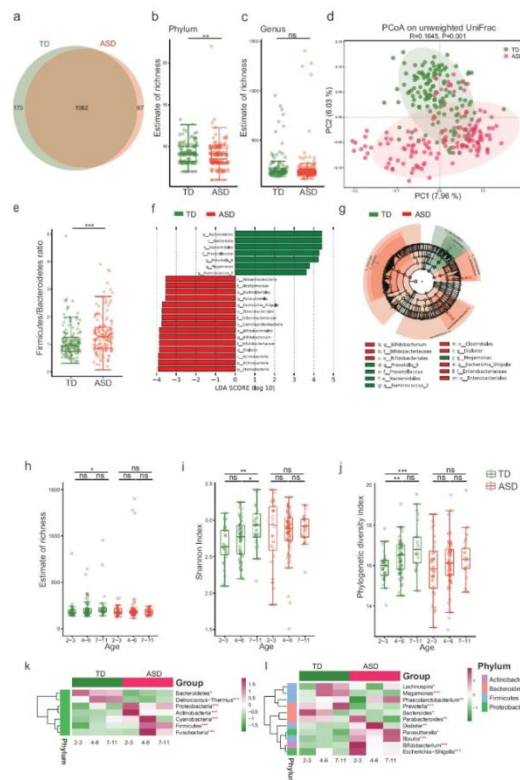
样本类型: 粪便

扩增区域: 细菌16S V4

测序平台: Hiseq

主要结论: 孤独症组的 α 多样性系数随着年龄的增加无显著的变化，而健康组的 α 多样性系数同年龄呈正相关，暗示孤独症患者肠道菌群发育处于相对停滞的状态。便秘孤独症患者组（C-ASD）的物种多样性降低，Sutterella、Prevotella和Bacteroides可能参与便秘孤独症患者的致病机制。

Gut Microbes: 南医大刘星吟团队揭示肠道微生物谱的改变与孤独症谱系障碍的异常神经递质代谢活动相关



叶际微生物

nature

Article | Published: 08 April 2020

A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere

Tao Chen, Kinya Nomura, Xiaolin Wang, Reza Sohrabi, Jin Xu, Lingya Yao, Bradley C. Paasch, Li Ma, James Kremer, Yuti Cheng, Li Zhang, Nian Wang, Ertao Wang, Xiu-Fang Xin & Sheng Yang He

发表时间: 2020

研究对象: 拟南芥

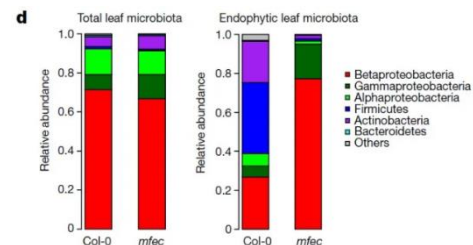
样本类型: 叶片

扩增区域: 细菌16S

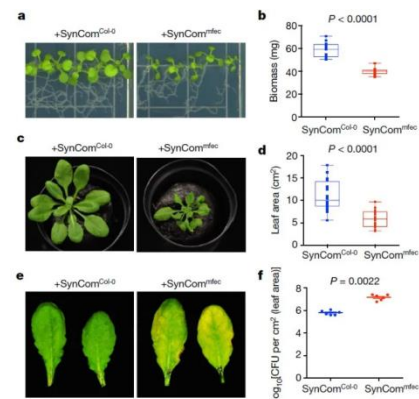
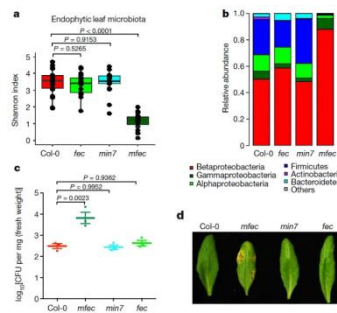
测序平台: Miseq(PE300)

主要结论: 结果表明，健康叶片和不健康叶片的总微生物组的多样性没有显著差异，但是叶内微生物组的丰度和多样性均有显著的变化，不健康的叶片内部微生物的多样性降低，从Firmicute-rich的群体转化为Proteobacteria-rich的群体。

Nature: 何胜洋和辛秀芳组发表植物叶际微生物组稳态机制



a, Col-0 and mfec phenotypes; b, Col-0 and mfec leaf and total leaf bacterial counts; c and d, microbial community analysis of Col-0 and mfec leaf and total leaf bacterial diversity and relative abundance.



土壤



RESEARCH ARTICLE
Ecological and Evolutionary Science



Space Is More Important than Season when Shaping Soil Microbial Communities at a Large Spatial Scale

Kaoping Zhang,^{a,b} Manuel Delgado-Baquerizo,^c Yong-Guan Zhu,^{d,e} Haiyan Chu^{a,b}

^aState Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, China

^bUniversity of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

^cDepartamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales, Universidad Pablo de Olavide, Seville, Spain

^dKey Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen, China

^eState Key Lab of Urban and Regional Ecology, Research Centre for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

mSystems: 南土所褚海燕组揭示了大空间尺度下空间比季节对土壤微生物群落的影响大

发表时间: 2020

研究对象: 麦田

样本类型: 土壤

扩增区域: 16S V4和ITS2区

主要结论: 麦田土壤细菌和真菌群落的alpha多样性和beta多样性在冬天和夏天呈现出显著差异,但是空间距离对土壤细菌和真菌群落的alpha多样性和beta多样性的影响远大于季节的影响。

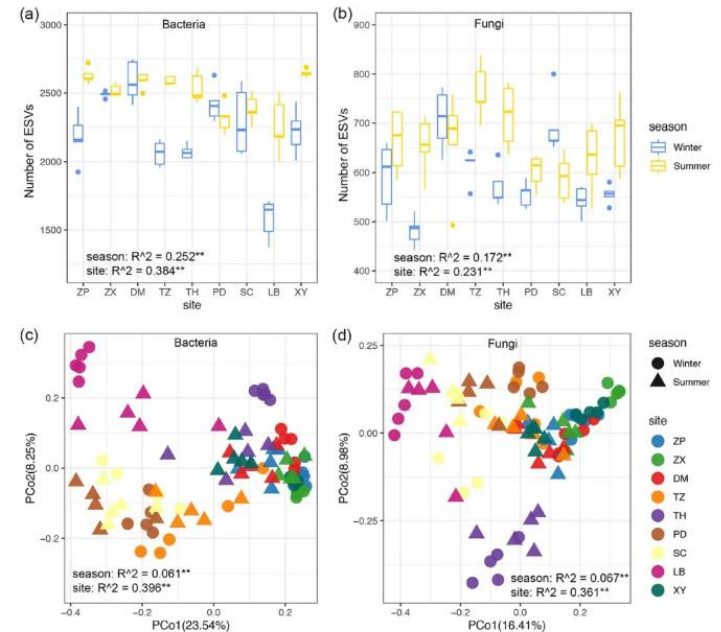


图 1 细菌和真菌的alpha多样性的时空变异及细菌和真菌的beta多样性的时空变异

土壤

Soil Biology and Biochemistry 144 (2020) 107759



Contents lists available at ScienceDirect

Soil Biology and Biochemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/soilbio>



SBB: 不同植被土壤中细菌古菌的群落分布模式比较

Similar drivers but different effects lead to distinct ecological patterns of soil bacterial and archaeal communities

Guangshan Wei^{a,b,c,f,1}, Mingcong Li^{a,b,c,1}, Wencong Shi^{a,b}, Renmao Tian^{h,i}, Chunyan Chang^d, Zhuoran Wang^d, Ningxin Wang^g, Gengxing Zhao^{d,*}, Zheng Gao^{a,b,c,*}

发表时间: 2020

研究对象: 黄河三角洲不同植被覆盖下的土壤

样本类型: 土壤

扩增区域: 细菌16S V3V4和古菌16S V4V5

测序平台: Miseq(PE300)

主要结论: 植被覆盖及土壤环境参数与细菌和古菌的丰度、多样性、群落组成与功能密切相关。细菌和古菌对多种环境参数（特别是盐度），表现出显著相关关系，但它们与两者的关系却呈现相反的趋势。细菌在营养丰富且盐分较少的农业土壤中起主要作用，而古菌则在高盐的盐碱土壤中呈现重要作用。

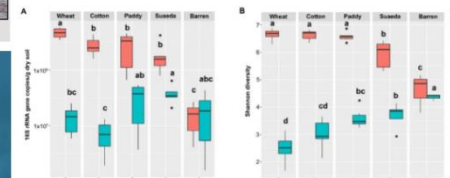


图2. 不同植被覆盖下的细菌及古菌16S rRNA基因丰度 (A) 和α-多样性 (B)

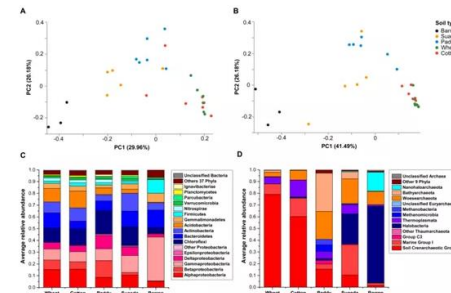


图3. 不同植被覆盖下土壤微生物的β-多样性 (otu水平) 和群落组成 (门水平)
图A, B, C, D分别代表细菌β-多样性、古菌β-多样性、细菌和古菌群落组成柱状图。

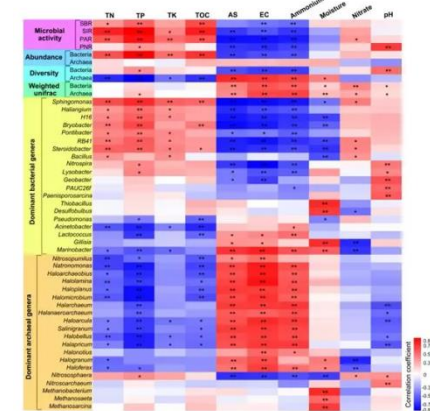


图4. 微生物活性、丰度、α/β多样性及优势属与土壤理化因子的相关性分析

土壤

Environment International 141 (2020) 105795



Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint



Simulated warming enhances the responses of microbial N transformations to reactive N input in a Tibetan alpine meadow



Yi Zhang^{a,*}, Nan Zhang^a, Jingjing Yin^a, Yexin Zhao^a, Fei Yang^a, Zhongquan Jiang^a, Jinjin Tao^a, Xuebin Yan^a, Yunpeng Qiu^a, Hui Guo^a, Shuijin Hu^{a,b,*}

^a Ecosystem Ecology Lab, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

^b Department of Entomology & Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA

发表时间: 2020

研究对象: 西藏高寒草甸

样本类型: 土壤

扩增区域: AOA (氨氧化古菌) 和 AOB (氨氧化细菌)

测序平台: Miseq(PE300)

主要结论: 单独增温对大多数参数没有显著影响,但是它增强了氮输入对土壤氮含量和AOB丰度的影响,并且在整个生长季产生了一系列的连锁反应,增加了潜在的硝化速率 (+83%), 土壤硝态氮 (+200%) 和氧化亚氮 (+412%) 的释放。

Environ. Int.: 模拟增温会增加微生物氮转换对活性氮输入响应

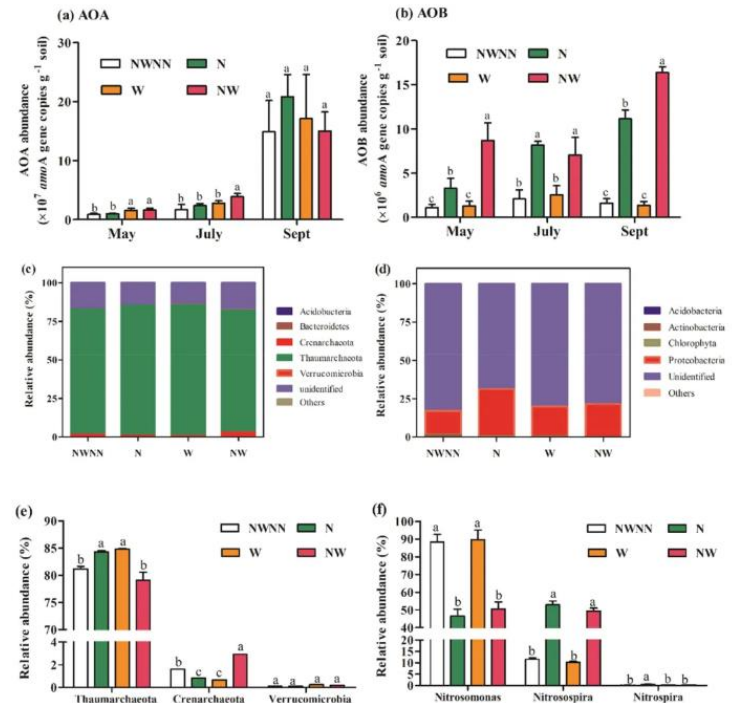


图3 氮添加 (N), 增温 (W) 以及它们的交互作用 (NW) 对生长季 AOA (a) 和 AOB (b) 丰度, AOA 门 (c) 和 AOB 门 (d) 相对丰度, AOA 优势门占比 (e), 以及 AOB 中隶书于 Proteobacteria 门, Nitrosomonadaceae 科的优势属的占比 (f)。

报告内容

五、常见问题和送样要求

常见问题

Q: 16S相关文章中选择的测序区域各不相同（如V4, V3-V4, V1-V3, V3等），选择的依据是什么，选择哪个区域比较好？

A: 不同物种不同区域多样性不同，选择不同区域测序结果会有不同，可能会造成物种多样性的低估或高估。在非全长16S测序的情况下，测序区域也并非越长越好，跟全长16S结果最相近的测序区域即是最优选择。

如无特殊要求，我们一般推荐V3-V4区测序，根据我们大量的项目经验，目前测序项目较多的区域为V4, V1-V3, V3-V4, V4-V5, V5-V6，具体项目测序区域也可参考相关文献进行选择。

Q: 若关注环境中的真核微生物多样性，18S测序和ITS测序哪个更好？

A: ITS测序主要是针对真菌多样性的研究，注释准确度高；18S测序针对的是真核微生物，注释到的范围广，但是就真菌来说精确度相对较低；可根据研究目的合理选择测序方案。

Q: 样本送到后多久可以拿到结果？

A: 自样本检测合格之后开始计算周期，包括建库、测序、数据分析、结题，扩增子周期最快一周。

Q: 我的样本检测合格了，样本量也达到了推荐样本量要求，却建库失败了，可能是什么原因造成的，有没有什么解决方案？

A: 这种情况常见于宿主微生物样本，该类样本通常还有大量的宿主DNA，由于样本检测中不能区分宿主和微生物DNA，实际检测到的DNA其实绝大多数都是宿主DNA，导致检测到的样本量很高，却建库失败的情况。

对于这类样本，推荐在样本制备过程中进行特殊处理，尽量减少宿主DNA含量。目前市面上有可以去宿主DNA的试剂盒（如QIAamp DNA Microbiome Kit），对于宿主含量较高的样本如唾液、粘膜样本等，可以选择对应的试剂盒处理。

Q: 16S测序一般推荐多少样本量？

A: 16S样本多样性及组间差异分析是基于统计结果进行的分析，一般样本数越多，统计结果越准确。最低样本数要求如下：样本间多样性分析（ $n \geq 4$ ），组间多样性分析样本（组别 ≥ 2 ，每组样本数 $n \geq 3$ ）。

Q: 扩增子测序能满足的测序长度是多少？

A: Miseq PE300平台测序长度为600bp，但其测序质量较差，质控需要过滤掉超过100bp质量较差的序列；PE250平台测序质量较好，但测序总长度为500bp，去掉barcode和部分质量较差的序列之后只剩460bp左右。所以保守起见，扩增子片段长度不能超过460bp，否则双端测序结果将无法进行拼接，在引物选择时应引起注意。

送样要求

一、16S/18S/ITS等扩增子测序	
常见环境样品	使用干冰或冰袋运送；
	土壤、淤泥、沉积物≥3 g；
	粪便≥1g；
	组织样本≥1 g；
	水体送样为过滤后的滤膜（最适滤膜直径3-4cm），孔径大小一般选择0.22μm或 0.45μm。
	拭子样本≥2个。
DNA样品	使用干冰或冰袋运送；
	浓度≥10 ng/μl；
	总量≥500 ng；
	DNA 要有明显主带，无降解，无 RNA、蛋白质等杂质污染。
二、宏基因组测序	
常见环境样品	使用干冰或冰袋运送）；
	土壤、淤泥、沉积物≥5 g；
	粪便≥2 g；
	组织样本≥1 g；
	水体送样为过滤后的滤膜（最适滤膜直径3-4cm），孔径大小一般选择0.22μm或 0.45μm。
	拭子样本≥2个。
DNA样品	使用干冰或冰袋运送；
	DNA：浓度≥50 ng/μl；
	总量≥2 ug；
	OD260/280：1.8~2.0，无降解，无 RNA、蛋白质等杂质污染。
DNA文库样品	使用干冰运送；
	浓度≥10 ng/μl；
	总量≥150 ng；
	插入片段大小≤600 bp；
	无接头污染。

谢 谢!



乔志仙

TEL: 68780783

MAIL: qzhxian@ihb.ac.cn

柴晓翠

TEL: 68780783

MAIL: chaixiaocui@ihb.ac.cn

向浩

TEL: 68780783

MAIL: 563982746@qq.com