

Code No. NN0002

研究用

TaKaRa

16S DNA Quantitative Standard
for Microbiome

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒以外需要准备的其他试剂、器具、仪器等（主要用品）	2
● 操作上的注意事项	2
● 操作方法	2
● 结果分析	6
● 补充：关于区域划分	6
● 参考文献	6

● 制品说明

本制品是可用于下一代测序（NGS）进行 16S rRNA 菌群定量分析的人工核酸标准品。设计的 12 种不同的人工 16S rRNA 基因（rDNA）的可变区域（V1~V9），分别以既定的拷贝数混合。由于使用了自然界中不存在的人工序列，即使将本制品加入到分析样品中进行 spike-in 实验，也不会影响菌群分析，可以对所有生物样品进行 spike-in 实验（图 1）。将本制品加入到样品 DNA 中进行 16S rRNA NGS 分析时，以标准品序列 16S rDNA 的拷贝数理论值为 X 轴，以标准品序列获取的 read 数为 Y 轴，制作标准曲线，即可对以往难以开展 16S rRNA NGS 分析的菌群进行绝对定量（表 1）。另外，本制品作为对照，可以用于试验设计的性能评估和每个试验的准确性管理。

本制品操作方法中使用了 16S（V3~V4）Metagenomic Library Construction Kit for NGS（Code No. R161A）进行测序文库的制备，但由于本制品的人工序列包含 V1~V9 的全部区域，因此，16S rRNA NGS 分析的方法并不限于本制品操作方法。

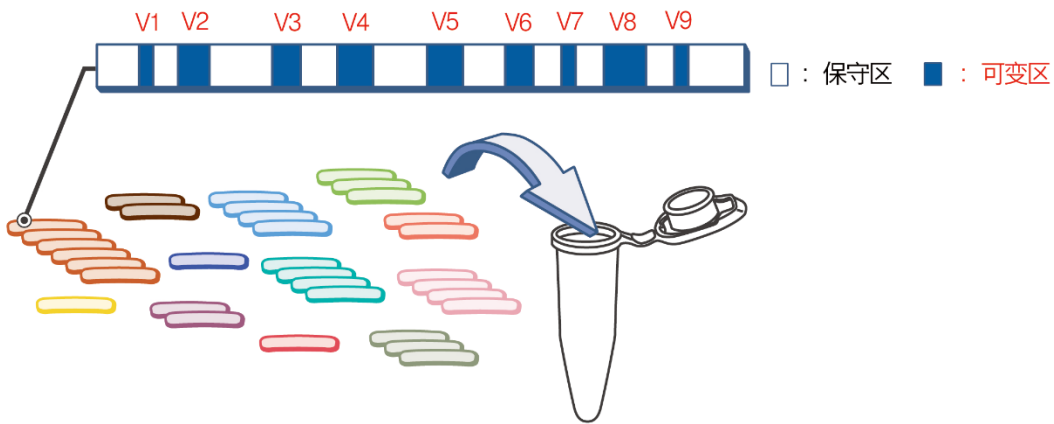


图 1. 将 12 种 16S rDNA 序列以不同拷贝数进行混合
可变区使用设计的人工序列，保守区使用 16S rDNA 序列。因此，通过在保守区设计引物，可以同时扩增菌群所具有的 16S rDNA 序列和本标准品的 16S rDNA 序列。

表 1. 原液 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^8 copies/ μ l) 的组成

identifier	GenBank accession number	16S rDNA (copies/ μ l)	16S rDNA copies (%)
Std_01	LC140931	6.31×10^7	47.39
Std_02	LC140932	3.32×10^7	24.93
Std_03	LC140933	1.75×10^7	13.14
Std_04	LC140934	9.20×10^6	6.91
Std_05	LC140935	4.84×10^6	3.63
Std_06	LC140936	2.55×10^6	1.91
Std_07	LC140937	1.34×10^6	1.01
Std_08	LC140938	7.06×10^5	0.53
Std_09	LC140939	3.72×10^5	0.28
Std_10	LC140940	1.96×10^5	0.15
Std_11	LC140941	1.03×10^5	0.08
Std_12	LC140942	5.42×10^4	0.04

● 制品内容 (200 次)

○ 16S DNA Quantitative Standard	1.3×10^8 copies/ μ l	20 μ l
16S DNA Dilution Buffer		300 μ l

● 保 存: -20℃

● 试剂盒以外需要准备的其他试剂、器具、仪器等 (主要用品)

【试剂】

- 核酸提取试剂盒
[粪便样品]
NucleoSpin DNA Stool (Code No. 740472.10/.50/.250) 等
[土壤样品]
NucleoSpin Soil (Code No. 740780.10/.50/.250) 等
- PCR产物的纯化
NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (Code No. 744970.5/.50/.500)等
80%乙醇
洗脱液 (10 mM Tris-HCl, pH8.5)
- 16S rRNA Sequence Library建库试剂盒
16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (Code No. R161A)
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation (v3)
(Illumina, Code No. 20091654/20091656/20091658/20091660)

【实验器具】

- 0.2 ml磁力架
- 微量移液器及枪头
- PCR反应管等

【仪器】

- PCR仪
Clontech PCR Thermal Cycler GP (Code No. WN400) 等
- 微量高速离心机

● 操作上的注意事项

1. 从反应液的配制到检测, 建议设定以下 4 个区域, 并进行物理隔离 (参照“补充: 关于区域划分”), 请避免在区域 4 以外的地方开关装有扩增产物的反应管, 避免产生污染。
 - 区域 1: 进行 PCR 反应液的配制及分装。
 - 区域 2: 进行样品的制备 (DNA 提取等)。
 - 区域 3: 向 PCR 反应液中添加模板 DNA。
 - 区域 4: 电泳等方法进行 PCR 扩增产物的解析。
2. PCR 仪的操作请参考各仪器说明书。

● 操作方法

使用16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (Code No. R161A) 对16S rRNA 基因进行定量分析的方法如下所示。

【注意】对于10 ng的DNA样品, 使用混合 1.3×10^7 copies的16S DNA Quantitative Standard, 可制作较多菌群都适用的标准曲线。如果DNA样品因含有大量的宿主基因等而偏离标准曲线, 请通过增加

DNA样品量等操作进行调整。

I. 10倍稀释的16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^7 copies/ μ l) 的制备

用16S DNA Dilution Buffer十倍稀释16S DNA Quantitative Standard。(在区域3进行)

【注意】· 在使用时制备稀释液。

· 使用5 μ l以上的16S DNA Quantitative Standard(1.3×10^8 copies/ μ l) 原液进行制备。

[制备示例]

1. 将45 μ l的16S DNA Dilution Buffer用1.5 ml反应管进行分注。

2. 添加5 μ l的16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^8 copies/ μ l) 充分混合, 进行离心。

II. 1st PCR

将从检测样品提取的DNA作为模板, 使用16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (Code No. R161A) 进行V3~V4区域的扩增。

1. 在冰上制备Master Mix 1。(在区域1进行)

制备所需反应数 (DNA样品数+阴性对照) + α 量的Master Mix 1。 α 为必要反应数的10%左右。

< Master Mix 1 (每个反应) >

试剂	使用量
2X Gflex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	12.5 μ l
16S V3-V4 Primer Mix (10X)	2.5 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μ l
Total	15.5 μ l

2. 对于阴性对照, 在PCR反应管中分取15.5 μ l的Master Mix 1, 加入9.5 μ l的16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS (Code No. R161A) 中的H₂O, 盖紧管盖。

3. 在冰上制备Master Mix 2。(在区域3进行)

向2.中分取剩余的Master Mix 1中, 添加所需数量 (DNA样品数量) + α 量10倍稀释的16S DNA Quantitative Standard, 以制备Master Mix 2, 并将其以16.5 μ l分取至每个PCR反应管。

< Master Mix 2 (每个反应) >

试剂	使用量
Master Mix 1	15.5 μ l
10倍稀释的 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^7 copies/ μ l)	1.0 μ l
Total	16.5 μ l

4. 添加DNA样品、加入H₂O至25 μ l。(在区域3进行)

※ 最适DNA样品添加量为每个反应10 ng左右。不足10 ng时, 请添加至最大容纳体积量 (8.5 μ l)。

Master Mix 2	16.5 μ l
DNA 样品	x μ l (10 ng)
H ₂ O	up to 25 μ l

5. 在以下条件下进行反应。

<初期变性>

94°C 1分钟

<PCR: 28 cycles>

98°C 10 秒

50°C 15 秒

68°C 15 秒

< Hold >

4°C Hold

III. 扩增产物的纯化

使用NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (Code No. 744970.5/.50/.500) 对1st PCR 的扩

扩增产物进行纯化。

1. 准备

- 1) NucleoMag NGS Bead Suspension需在使用30分前恢复至室温。
- 2) 充分混合以分散NucleoMag NGS Bead Suspension的磁珠。

2. 扩增产物与NucleoMag NGS Bead Suspension的结合

- 1) 按照以下比例，向PCR产物中添加NucleoMag NGS Bead Suspension。

PCR 产物			25 μ l
NucleoMag	NGS	Bead	20 μ l
suspension			

- 2) 立即充分混合。
- 3) 在室温下静置5分钟。
- 4) 离心，放置在磁性支架上，静置5分钟。
- 5) 去除上清液。

3. 清洗

第1次清洗

- 1) 将反应管放置在磁性支架上，加入200 μ l的80%乙醇。
- 2) 在室温下静置30秒。
- 3) 去除上清液的80%乙醇。

第2次清洗

按照「第1次清洗」再次进行相同操作。

4. 磁珠的干燥

将反应管放置在磁性支架上，在室温下静置5~15分钟。

5. 扩增产物的溶出

- 1) 添加30 μ l的溶出液（10 mM Tris-HCl, pH8.5），盖上盖子。
- 2) 从磁性支架上取下反应管，轻弹充分混合。
- 3) 在室温下静置2~5分钟。
- 4) 放置在磁性支架上，静置5分钟。
- 5) 将上清液回收到新反应管中。

※ 根据需要纯化后，通过电泳确认得到了扩增产物。（在区域4进行）

※ 扩增链长约550 bp。

SAFE STOPPING POINT:

如果不能立即进行“IV. 2nd PCR”，请在-20℃下保存。

IV. 2nd PCR

将用III.纯化的1st PCR扩增产物作为模板，进行2nd PCR。2nd PCR使用了16S（V3-V4）Metagenomic Library Construction Kit for NGS（Code No. R161A）的PCR试剂以及Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A-D, Tagmentation（v3）（Illumina）或同类产品。进行2nd PCR，根据DNA每个样品，组合不同的Index primer。

1. 在冰上制备Master Mix。（在区域1进行）

- 1) 制备所需反应数（DNA样品数+阴性对照）+ α 量进行配制。 α 为必要反应数的10%左右。向PCR用管中分注18 μ l。

< Master Mix 1 (每个反应) >

试剂	使用量
2X Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μl
Tks Gflex DNA Polymerase	0.5 μl
H ₂ O	5.0 μl
Total	18 μl

- 2) 向每个DNA样品添加5 μl不同的Index primer。
2. 添加2 μl的1st PCR纯化产物。(在区域3进行)
3. 按照以下的条件进行反应。

<初期变性>

94℃ 1分钟

<PCR: 8 cycles>

98℃ 10 秒

60℃ 15 秒

68℃ 15 秒

<Hold>

4℃ Hold

V. 扩增产物的纯化

按照「III. 扩增产物的纯化」相同的操作，对2nd PCR扩增产物进行纯化。

※ 请于-20℃保存纯化的文库。

VI. QC确认扩增产物

纯化后，通过浓度测定和电泳确认扩增得到的产物正确。

※ 扩增片段长度约为600~800 bp。(在区域4进行)

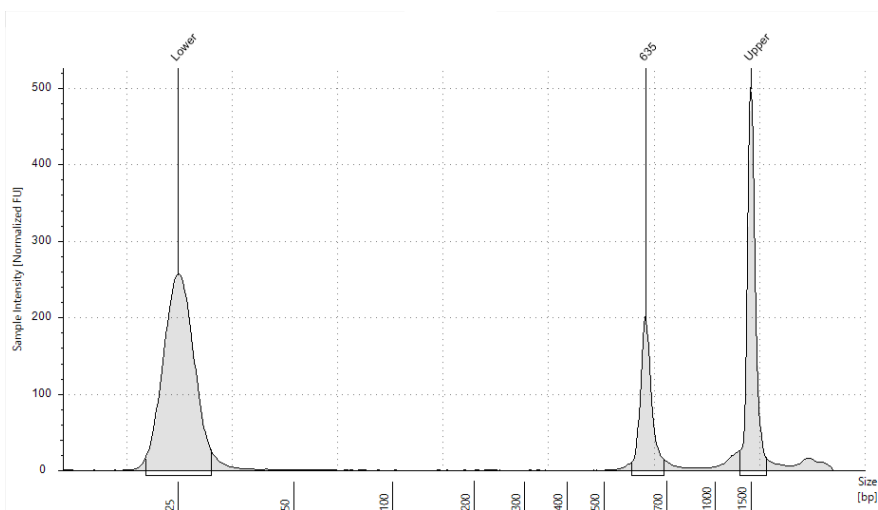


图2. 纯化文库的大小分布实例

对于根据本制品操作方法制作的文库，使用TapeStation D1000 (Agilent) 检测扩增产物的大小。良好的文库中，在600~800 bp附近可确认到尖峰。

VII. 2nd PCR产物的混合

将每个PCR产物混合到一个反应管中，使其达到等摩尔浓度，并使用Illumina公司的测序仪器获得碱基序列。

※PCR产物的浓度测定，建议使用Qubit dsDNA BR Assay Kit或Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific公司) 等对双链DNA进行定量。

● 结果分析

1. 从获得的序列读取构建 OTU（操作分类单位：Operational Taxonomy Unit）。
2. 从构建的 OTU 中提取代表序列，对 OTU 进行菌群系统分类。
3. 获得系统分类菌群和人工 16S rRNA 基因核酸标准品的 read 数。
4. 将各标准品序列的 16S rDNA 拷贝数理论值绘制为 X 轴，将各标准品序列获得的 read 数绘制为 Y 轴，制作标准曲线，根据各菌群的 read 数计算 16S rDNA 拷贝数（表 2）。

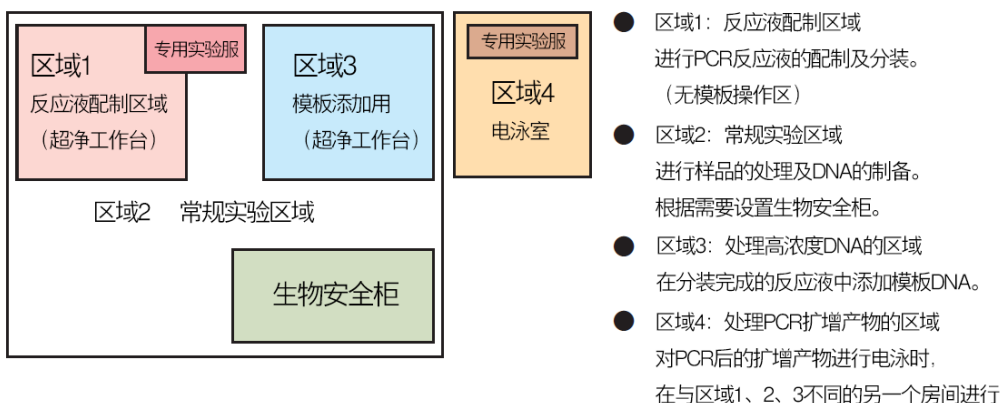
表 2. 10 倍稀释 16S DNA Quantitative Standard (1.3×10^7 copies/ μ l) 的组成

identifier	GenBank accession number	16S rDNA (copies/ μ l)	16S rDNA copies (%)
Std_01	LC140931	6.31×10^6	47.39
Std_02	LC140932	3.32×10^6	24.93
Std_03	LC140933	1.75×10^6	13.14
Std_04	LC140934	9.20×10^5	6.91
Std_05	LC140935	4.84×10^5	3.63
Std_06	LC140936	2.55×10^5	1.91
Std_07	LC140937	1.34×10^5	1.01
Std_08	LC140938	7.06×10^4	0.53
Std_09	LC140939	3.72×10^4	0.28
Std_10	LC140940	1.96×10^4	0.15
Std_11	LC140941	1.03×10^4	0.08
Std_12	LC140942	5.42×10^3	0.04

<标准曲线评估要点>

- 各 16S rDNA 序列的 16S rDNA 拷贝数和 read 数的 pearson 相关系数 ≥ 0.96 。
- $Y=aX+b$ 的近似式、决定系数 $R^2 > 0.90$ 。

● 补充：关于区域划分



● 参考文献

- 1) Klindworth A, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7, 41(1):e1.

- 2) Caporaso JG, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012 Aug, **6**(8): 1621–1624.
- 3) Tourlousse D, *et al.* Synthetic spike-in standards for high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2017 Feb 28; **45**(4): e23.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202507Da