ICS 11.220
CCS B 41

DB53

# 云 南 省 地 方 标 准

DB53/T 1057—2021

# 滇金丝猴肠道微生物组数据获取技术规程

Regulation for data acquisition of gut microbiota for *Rhinopithecus bieti*

2021 - 09 - 30 发布　　2021 - 10 - 14 实施

云南省市场监督管理局　发布

# 目　　次

前言……III
1　范围……1
2　规范性引用文件……1
3　术语和定义……1
4　基本要求……2
4.1　实验室通用要求……2
4.2　主要试剂及仪器设备……2
5　样品采集和保存……2
6　滇金丝猴肠道微生物总 DNA 提取及检测……2
6.1　试剂盒选取……2
6.2　肠道微生物总 DNA 提取……2
6.3　肠道微生物总 DNA 质量检测……2
7　肠道微生物组高通量测序……2
7.1　肠道微生物 16S　rRNA 基因引物选取及扩增……2
7.2　肠道微生物 16S　rRNA　PCR 扩增产物电泳检测及纯化……3
7.3　肠道微生物 16S　rRNA 基因测序……3
7.4　肠道微生物宏基因组测序……3
8　肠道微生物组数据获取……3
8.1　16S　rRNA 基因数据质控……3
8.2　宏基因组数据质控……3
8.3　宏基因组数据去除宿主信息……3
8.4　肠道微生物组数据获取……3
附录 A　（规范性）　主要试剂及仪器设备……4
附录 B　（规范性）　粪便样品的采集和保存方法……5
附录 C　（规范性）　总 DNA 样品的提取步骤、琼脂糖凝胶电泳检测及成像方法……8
附录 D　（规范性）　16S　rRNA　PCR 引物、反应体系、反应时间及产物纯化步骤……9

# 前　　言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由云南省林业与草原局、云南省市场监督管理局共同提出。

本文件由云南省林业标准化技术委员会（YNTC02）归口。

本文件主要起草单位：云南大学、云南省标准化研究院。

本文件主要起草人：于黎、黄艳梅、张志刚、朱勋程、李依恬、李宁、刘纯兵、徐志茹、姚雪沁、胡靖扬、吴宏、匡卫民。

# 滇金丝猴肠道微生物组数据获取技术规程

## 1 范围

本文件规定了滇金丝猴（*Rhinopithecus bieti*）肠道微生物组数据获取的基本要求、样品采集和保存、肠道微生物总DNA提取及检测、肠道微生物组高通量测序、肠道微生物组数据获取。

本文件适用于野外及圈养滇金丝猴微生物组数据获取。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

**肠道微生物** gut microbiota

动物肠道中存在的数量庞大的微生物，并帮助宿主完成多种生理生化功能的微生物群落。

3.2

**肠道微生物总 DNA** gut microbiota total DNA

肠道内所有微生物DNA和部分宿主DNA的总和。

3.3

**宏基因组** metagenome

特定环境下所有生物的遗传物质的总和，其中包括了样品中所有微生物的遗传信息。

3.4

**16S 核糖体 RNA （16S rRNA）**

细菌染色体上编码核糖体RNA亚基的一个基因，存在于所有细菌的基因组中。

3.5

**16S 核糖体 RNA V3-V4 区 （16S rRNA V3-V4）**

16S rRNA基因序列中高度变化的区域。

3.6

**聚合酶链式反应** polymerase chain reaction，PCR

以一对寡核苷酸引物、四种脱氧核糖核苷酸(dNTPs)为原料，在合适的温度、离子条件和耐热DNA聚合酶催化下，在体外人工合成特异的DNA片段的过程。

3.7

**基因组测序** genome sequencing

对生物体的基因组序列进行测定，以获得基因组信息。

3.8

**高通量测序** high-throughput sequencing

能一次并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定的技术。

3.9

**读长** reads

高通量测序平台产生的序列读长称为reads，即测序读到的碱基序列片段，是测序的最小单位。

3.10

**宿主** host

给微生物提供营养和场所的生物，本标准中指滇金丝猴。

## 4 基本要求

### 4.1 实验室通用要求

实验室应满足GB 19489中生物安全实验室的要求。

### 4.2 主要试剂及仪器设备

主要试剂及仪器设备见附录A。

## 5 样品采集和保存

肠道微生物从滇金丝猴粪便样品中获取，粪便样品的采集和保存方法见附录B。

## 6 滇金丝猴肠道微生物总 DNA 提取及检测

### 6.1 试剂盒选取

选取滇金丝猴粪便样品中提取肠道微生物总DNA，有多种商用试剂盒可供选择。

### 6.2 肠道微生物总 DNA 提取

参照商用试剂盒说明书进行总DNA提取，提取步骤见附录C。

### 6.3 肠道微生物总 DNA 质量检测

使用微量分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳进行DNA浓度检测。粪便样品提取的总DNA 260/280在1.7～2.1之间，浓度超过2 ng/μL，总量超过0.25 μg的DNA样品为合格。琼脂糖凝胶电泳检测及成像方法见附录C。

## 7 肠道微生物组高通量测序

### 7.1 肠道微生物 16S rRNA 基因引物选取及扩增

16S rRNA基因引物选择V3-V4区的引物338F及806R。扩增区域为16S rRNA基因V3-V4区。引物序列及反应条件见附录D。

### 7.2 肠道微生物 16S rRNA PCR 扩增产物电泳检测及纯化

7.2.1 PCR 扩增完成后，取 PCR 产物 3 μL，经 2%琼脂糖凝胶电泳检测，如电泳条带清楚、片段大小正确，表明 PCR 扩增成功。不符合质量要求的产物，可重新进行 PCR 扩增。每个样本进行 3 个 PCR 重复，需将 3 个重复的 PCR 产物混合，以达到测序量。

7.2.2 PCR 产物纯化，流程参照商用试剂盒纯化流程。纯化步骤见附录 D。

### 7.3 肠道微生物 16S rRNA 基因测序

16S rRNA基因测序使用高通量测序平台进行。根据所使用的建库试剂盒构建文库。根据高通量测序试剂盒和测序仪操作说明完成试剂装载，设置测序参数进行测序。

### 7.4 肠道微生物宏基因组测序

宏基因组测序可使用高通量测序平台进行。根据所使用的建库试剂盒构建文库。根据高通量测序试剂盒和测序仪操作说明完成试剂装载，设置测序参数进行测序。

## 8 肠道微生物组数据获取

### 8.1 16S rRNA 基因数据质控

16S rRNA基因测序数据，通过生物信息学软件进行质控，获取16S rRNA基因数据。质控去除双端引物序列和基因条形码序列，过滤拼接后序列长度小于400 bp的序列，可使用QIIME2软件“quality-filter”默认设置进行初始质量筛选，“Deblur”去除低丰度序列以及剪切序列末端，统一获得前400 bp区段的高质量序列，获得滇金丝猴肠道微生物16S rRNA基因数据。

### 8.2 宏基因组数据质控

宏基因组测序数据，通过生物信息学软件进行质控。宏基因组数据质控标准为碱基平均质量阈值高于20，最短reads长度大于50 bp。

### 8.3 宏基因组数据去除宿主信息

使用滇金丝猴全基因组数据作为参考基因组，宏基因组质控数据使用BWA软件的MEM算法默认参数，与滇金丝猴全基因组序列比对，去除比对上的序列，获取滇金丝猴肠道微生物宏基因组数据。

### 8.4 肠道微生物组数据获取

质控后的16S rRNA基因数据以及质控、去除宿主信息后的宏基因组数据即为滇金丝猴肠道微生物组数据。

# 附　录　A
（规范性）
主要试剂及仪器设备

## A.1　主要试剂

A.1.1　50×TAE缓冲液(TAE Buffer)：Tris碱242 g和57.1 mL冰醋酸，用双蒸水定容到1 L。

A.1.2　GeneFinder核酸染料，用于凝胶成像显示条带。

A.1.3　6×上样缓冲液（Loading Buffer），含有溴酚蓝，用于电泳和凝胶成像。

A.1.4　2.5 mM dNTP试剂：dATP、dCTP、dGTP和dTTP的预混溶液。

A.1.5　5×PCR Buffer。

A.1.6　FastPfu 酶。

A.1.7　无菌水：$ddH_2O$。

A.1.8　琼脂糖。

A.1.9　1%琼脂糖凝胶：用于DNA质量检测。1 g琼脂糖与100 mL 1×TAE缓冲液，加热融化均匀，60 ℃时，倒入胶槽，插上样品梳。室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳。

A.1.10　2%琼脂糖凝胶：用于PCR产物检测。2 g琼脂糖与100 mL 1×TAE缓冲液，加热融化均匀，60 ℃时，倒入胶槽，插上样品梳。室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳。

A.1.11　牛血清白蛋白（BSA）：球蛋白，PCR反应过程中起到稳定扩增酶、降低PCR抑制物的作用。

A.1.12　所使用的试剂盒中的相关试剂。

## A.2　仪器设备

A.2.1　PCR仪。

A.2.2　低温高速离心机。

A.2.3　单道可调移液器（2 μL，10 μL，200 μL，1 000 μL）。

A.2.4　电子天平（量程0.01 mg～10 000 mg）。

A.2.5　水浴恒温振荡器。

A.2.6　普通离心机。

A.2.7　超纯水器。

A.2.8　高压灭菌器。

A.2.9　电泳仪。

A.2.10　凝胶成像系统。

A.2.11　磁力搅拌器。

A.2.12　超低温冰箱（−80 ℃）。

A.2.13　低温冰箱（−20 ℃）。

# 附　录　B
（规范性）
粪便样品的采集和保存方法

## B.1　采样

### B.1.1　基本要求

采样时，应符合实验动物的福利和伦理的相关要求。

### B.1.2　采样工具、标本容器标准以及人员要求

#### B.1.2.1　圈养滇金丝猴采样工具

记录表格、一次性PE手套、封口袋、5 mL塑料样品管、无水乙醇、记号笔、铅笔、标签纸、剪刀、镊子、注射器、酒精棉等。

#### B.1.2.2　野外滇金丝猴采样工具

在B.1.2.1的基础上，增加北斗定位系统、罗盘、地形图等。

#### B.1.2.3　标本容器的标准

盛粪便标本的容器应清洁、干燥、有盖，无吸水和渗漏。细菌学检查，粪便标本应采集于灭菌、有盖的容器内。

#### B.1.2.4　采样人员要求

样本采集人员应是经过专业培训的人员，严格穿戴个人防护装备。

## B.2　粪便新鲜程度判定

以滇金丝猴粪便表面的完整程度、湿度颜色以及气味等条件判断滇金丝猴粪便的新鲜程度。新鲜的粪便样品表面完整光滑无杂质，微微湿润有光泽感，呈绿色或深绿色。

## B.3　粪便样品的选取原则

B.3.1　采集滇金丝猴新鲜粪便，同一堆粪便只采集一份样品，两堆样品的距离应大于3 m。

B.3.2　滇金丝猴母幼粪便样品，应分开采集；依据母猴和幼猴的粪便大小有明显差异作出判断，并在备注栏记录。

B.3.3　采集3 g～5 g新鲜粪便。

## B.4　样品采集方法

B.4.1　采集粪便内部的样品，并佩戴一次性PE手套。每次采样时应更换新的PE手套，以避免样品间的交叉污染。

B.4.2　采集时，直接剥取分离新鲜粪便的内部部分，分别放入盛有无水乙醇的样品管中，拧紧盖子后上下用力摆动数次，使样品得到充分湿润，并检查是否有液体渗漏。贴上样品标签纸，标识样品编号和坐标，将样品管放入自封袋，并再次写上样品编号，以避免无水乙醇漏出导致编号丢失。

## B.5　样品记录与编号

在采集粪便样品时，应填写《滇金丝猴粪便样品采集记录表A》（见表B.1）和《滇金丝猴粪便样品采集记录表B》（见表B.2）。记录采样包括样品编号、采集管数、种群、采集地点、采集日期、采集人、经纬度、海拔、新鲜程度、粪粒大小等信息。

表 B.1　滇金丝猴粪便样品采集记录表 A

| 样品编号 | 采集管数 | 种群 | 采集地点 | 采集日期 | 采集人 |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

表 B.2　滇金丝猴粪便样品采集记录表 B

| 样品编号 | 经度 | 纬度 | 海拔（m） | 新鲜程度 | 粪粒大小（g） | 备注 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

## B.6　样品的临时保存

野外样品采回后，应仔细检查核对标签和记录，并补充无水乙醇至样品完全浸没。无水乙醇中的样品可以室内常温保存；有条件时可进行冷藏或冷冻保存。

## B.7　样品的运输及验收

### B.7.1　运输材料、设备和仪器

B.7.1.1　样本容器：容器仅指直接盛放样本的瓶子、管子等小型容器。

B.7.1.2　运输设备和器材：指车载冰箱、冰盒、冰袋、干冰。

### B.7.2　运输要求

B.7.2.1　送样时，样品应尽量使用冰盒（泡沫盒＋干冰＋冰袋）盛装，以保证运输过程中的低温条件。由于保存DNA的无水乙醇是易燃易爆的化学品，样品应通过专用汽车运送，并注意车内通风，车内不应吸烟。运输过程中样品应远离火源，避免挤压。

B.7.2.2　填写《样本运输纪录表》，具体见表B.3。

表 B.3　样本运输记录表

| 样本编号 | 运输方式 | 货单号 | 样本容器 | 运输设备及器材 | 样本完整性 |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |

### B.7.3　样本验收

B.7.3.1　样本接收时，应观察样本容器的外观，检查有无破损，并记录外观状态。

B.7.3.2　查看《样本运输纪录表》，核对样本数量及运输方式。

B.7.3.3　如箱内有温度记录设备，应优先取出核对箱内温度记录。

B.7.3.4　样本取出后，应立即转移进入预制冷的低温存储设备中，并逐一登记入库。

## B.8　样本实验室保存

B.8.1　粪便样本应放于−80 ℃冰箱进行低温保存，若条件不允许，可短期（1个月内）在−20 ℃冰箱中冷冻保存。注意在样本冻存期间，请勿反复冻融。

B.8.2　样本的储存容器应有标定的使用温度，并能长时间密封储存在−80 ℃低温环境下。本文件推荐使用冻存管。

# 附　录　C
（规范性）
总 DNA 样品的提取步骤、琼脂糖凝胶电泳检测及成像方法

## C.1　总DNA样品的提取步骤

本文件选取常用商品试剂盒进行总 DNA 样品的提取，可选取其他试剂盒进行总 DNA 提取，按试剂盒说明进行提取，常用提取步骤如下（若试剂盒有特殊说明则按试剂盒说明进行）：

a）添加 500 mg 磁珠、0.5 g 样品和 1 mL SLX- Mlus Buffer 到 2 mL 离心管中，粉碎研磨仪 45 HZ 震荡 250s；
b）加入 100 μL DS Buffer，颠倒混匀；
c）70℃孵育 10min，95 ℃孵育 2min；
d）室温 13 000 rpm/min，离心 5min；
e）转移 800 μL 上清至新的 2 mL 离心管中，加入 270 μL P2 Buffer 以及 100 μL HTR Reagent；
f）颠倒混匀，–20 ℃孵育 5min；
g）室温 13 000 rpm/min 离心 5min；
h）转移上清至新 2 mL 离心管，加入等量 XP5 Buffer 及 40 μL 磁珠，上下颠倒混匀 8min；
i）磁力架吸附，弃去残液，取下管子，加入 500 μL XP5 Buffer，混匀；
j）磁力架吸附，弃去残液，取下管子，加入 600 μL PHB，混匀；
k）磁力架吸附，弃去残液，取下管子，加入 600 μL SPW Wash Buffer，混匀；
l）磁力架吸附，弃去残液，取下管子，加入 600 μL SPW Wash Buffer，混匀；
m）磁力架吸附，弃去残液，室温 13 000 rpm/min，离心 10s；
n）磁力架吸附，用移液枪弃去残液，室温静置 8min；
o）加入 100 μL Elution Buffer，混匀，静置 5min；
p）磁力架吸附，转移上清至新的 1.5 mL 离心管，得到总 DNA。

## C.2　琼脂糖凝胶电泳检测及成像方法

C.2.1　配制浓度为1%的琼脂糖凝胶（即1×TAE电泳缓冲液100 mL加1 g琼脂糖），加热融化混匀，冷却至60 ℃左右，加入浓度为0.005% Goldenview核酸染料（按每100 mL琼脂糖溶液中加入5 μL核酸染料溶液的比例），混匀后倒入胶槽，插上样品梳。配置2%琼脂糖凝胶需1×TAE电泳缓冲液100 mL加2 g琼脂糖。

C.2.2　室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳，将琼脂糖凝胶和胶板置于电泳槽中，使样本孔位于电场负极，向电泳槽中加入1×TAE电泳缓冲液。

C.2.3　取3 μL DNA，加2 μL上样缓冲液并混匀，然后依次将DNA分子量标准、检测样品上样到点样孔中。电泳电压为130 V，当上样缓冲液中的溴酚蓝条带迁移至凝胶1/2的位置，停止电泳。最后取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪成像拍照、保存。

# 附　录　D
（规范性）
16S rRNA PCR 引物、反应体系、反应时间及产物纯化步骤

## D.1　PCR反应引物序列

表D.1给出PCR反应引物序列。

表 D.1　PCR 反应引物序列

| 引物名称 | 序列 |
|---|---|
| 338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG |
| 806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |

## D.2　PCR反应体系

可使用多种PCR扩增酶进行扩增，本标准使用FastPfu酶。表D.2给出PCR反应体系。

表 D.2　PCR 反应体系（20 μL）

| 组分 | 用量（μL） |
|---|---|
| 无菌水($ddH_2O$) | 6.8 |
| 5×PCR Buffer | 4 |
| 2.5 mM dNTP | 2 |
| 338F (5 μM) | 0.8 |
| 806R (5 μM) | 0.8 |
| Taq 酶（2.5 U/μL） | 0.4 |
| 牛血清白蛋白（20 mg/μL） | 0.2 |
| 模板（总 DNA 2.0 ng/μL） | 5 |

## D.3　PCR反应时间

D.3.1　表D.3给出PCR反应时间。

表 D.3　PCR 反应时间

| 温度 | 时间 | 循环 |
|---|---|---|
| 95 ℃ | 3min | 1 个循环 |
| 95 ℃ | 30s | 27 个循环 |
| 55 ℃ | 30s | |
| 72 ℃ | 45s | |
| 72 ℃ | 10min | 1 个循环 |
| 4 ℃ | ∞ | 1 个循环 |

D.3.2　PCR反应程序为：95 ℃预变性3min；95 ℃变性30s，最适退火温度55 ℃变性30s，72 ℃延伸45s，设置27个循环反应，72 ℃后延伸10min。

## D.4 PCR产物纯化步骤

D.4.1 可使用多种试剂盒进行PCR产物纯化，本文件使用的试剂盒是AxyPrep DNA Gel Extraction Kit。

D.4.2 在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量，该重量作为一个凝胶体积（100 mg=100 μL体积）。

D.4.3 加入3个凝胶体积的Buffer DE-A，混合后与75 ℃加热，间断混合，直至凝胶完全融化。

D.4.4 加0.5个Buffer DE-B，混合均匀。

D.4.5 吸取步骤3中的混合液，转移到DNA制备管中，10 000 rpm/min离心1min，弃滤液。

D.4.6 将制备管置回2 mL离心管，加500 μL Buffer W1，12 000 rpm/min离心30s，弃滤液。

D.4.7 将制备管置回2 mL离心管，加700 μL Buffer W2，12 000 rpm/min离心30s，弃滤液，以同样的方法用700 μL Buffer W2洗涤1次，12 000 rpm/min离心1min。

D.4.8 将制备管置回2 mL离心管，12 000 rpm/min离心1min。

D.4.9 将制备管置于洁净的1.5 mL离心管，在制备膜中央加25 μL～30 μL 去离子水，室温静置1min，12 000 rpm/min离心1min洗脱DNA。

云南省政府标准化行政主管部门
DB53
地方标准