

环境样品中微生物群落组成和 多样性分析的两种方法

菌保中心 兰英

<http://www.cgmcc.net>; lanying@im.ac.cn

2012.5.17

主要内容

菌保
中心
CGMCC

环境样品中微生物研究的策略及方法

高通量检测技术的应用实例

保藏中心开放共享的仪器

QPix 2



WAVE 4500



仪器应用范围拓展的征集



环境样品中微生物研究的策略及方法

纯培养技术

- ❖ 传统的微生物研究方法。难以正确反映环境中微生物的实际状况。
平板纯培养、**Biolog**分析、**PLFA**

分子生物学方法

- ❖ rRNA基因序列测定、lab-on-a-chip、核酸探针杂交、**Metagenomics**
- ❖ **RFLP**、**T-RFLP**、**SSCP**、**DGGE**、**TGGE**
- ❖ **qPCR**、**RAPD**、**AFLP**、**FISH**





- 信息查阅
- 检测预约
- 审核分析
- 采购维修
- 工作状况
- 仪器状况
- 系统管理
- 流程设置

预约信息列表

委托书编号	分析项目	预约时间段	委托人	状态	付款	任务单	操作
2011-12-09-014	文库复制,克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 12月12日09点00分-12月12日17点00分,12月13日09点00分-12月13日17点00分,12月14日09点00分-12月14日17点00分		已审核	未付	编辑	
2011-11-08-002	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 11月08日12点00分-11月08日17点00分		已审核	未付	编辑	
2011-11-02-011	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 11月02日14点00分-11月02日17点00分		已审核	未付	编辑	
2011-10-09-001	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 10月09日09点00分-10月09日16点00分		已答复	已付		
2011-07-14-002	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 07月19日09点00分-07月19日17点00分		已答复	未付		
2011-04-26-005	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 04月27日09点00分-04月27日17点00分		已答复	已付		
2012-03-07-002	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 03月07日14点00分-03月07日17点00分		已审核	未付	编辑	
2012-02-14-005	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 02月15日09点00分-02月15日17点00分,02月16日09点00分-02月16日17点00分		已审核	未付	编辑	
2011-04-20-004	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 04月22日10点00分-04月22日12点00分		已审核	已付	编辑	
2011-01-29-001	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 02月14日10点00分-02月14日17点00分,02月15日10点00分-02月15日17点00分		已审核	已付	编辑	
2011-01-21-001	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 01月24日09点00分-01月24日17点00分,01月25日09点00分-01月25日17点00分		已审核	已付	编辑	
2011-04-25-004	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 04月26日09点00分-04月26日10点00分		申请撤销	未付		
2011-04-11-004	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 04月12日09点00分-04月12日10点00分		已撤销	未付		
2011-11-07-009	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 11月14日08点00分-11月14日17点00分		已完成	未付		
2011-10-27-001	克隆挑取			已完成	已付		
2011-10-24-003	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 10月27日09点00分-10月27日16点00分		已完成	已付		
2011-09-05-002	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 09月06日09点00分-09月06日12点00分		已完成	已付		
2011-07-21-008	克隆挑取			已完成	已付		
2011-05-23-002	文库复制	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 05月24日14点00分-05月24日16点00分		已完成	已付		
2011-05-05-002	克隆挑取	全自动菌落挑取复制点膜系统 Qpix 2 日期: 05月06日10点00分-05月06日16点00分		已完成	已付		

保藏中心现有基因文库

CGMCC编号	文库名称	库大小 (万克隆)	保藏人	委托单位或部门
001M20090424A718	云南洱源热泉元基因组质粒文库	5.00		
002M20090701A718	云南洱源热泉元基因组BAC文库	8.80		
003M20090701A526	荷斯坦奶牛瘤胃元基因组BAC文库	1.50		
004M20090701A526	西藏牦牛瘤胃元基因组BAC文库	6.10		
005M20090715A718	蒙古热泉微生物元基因组质粒文库	2.00		
006M20090715A718	西藏塔克架热泉微生物元基因组质粒文库	6.00		
007M20090715A718	云南腾冲热泉微生物元基因组质粒文库	2.50		
008M20090715A718	西藏古堆热泉微生物元基因组质粒文库	1.00		
009M20090715A718	荷斯坦奶牛瘤胃元基因组质粒文库	2.00		
010M20091215B404	碱性土壤元基因组文库	32.00		
011G20101126A527	江西链霉菌基因组文库	0.46		
012G20101126A527	海洋链霉菌基因组文库	0.44		
013G20101208B413	大肠杆菌基因敲除文库	0.4		
014G20110121B307	<i>Drechslerella stenobrocha</i> 菌丝体基因组文库			
015G20110121B307	青海 <i>Neocallimatis</i> sp.游动孢子			
016G20110525A527	江西农大土壤链霉菌基因组文库			
017M20111209A718	腾冲热海体验区元基因组文库			



CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

User: WADMIN
Date: Wed Feb 23 08:25:04 CST
Selection: Chromatogram + Peak

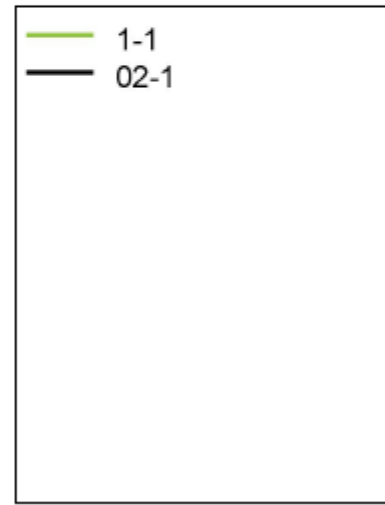
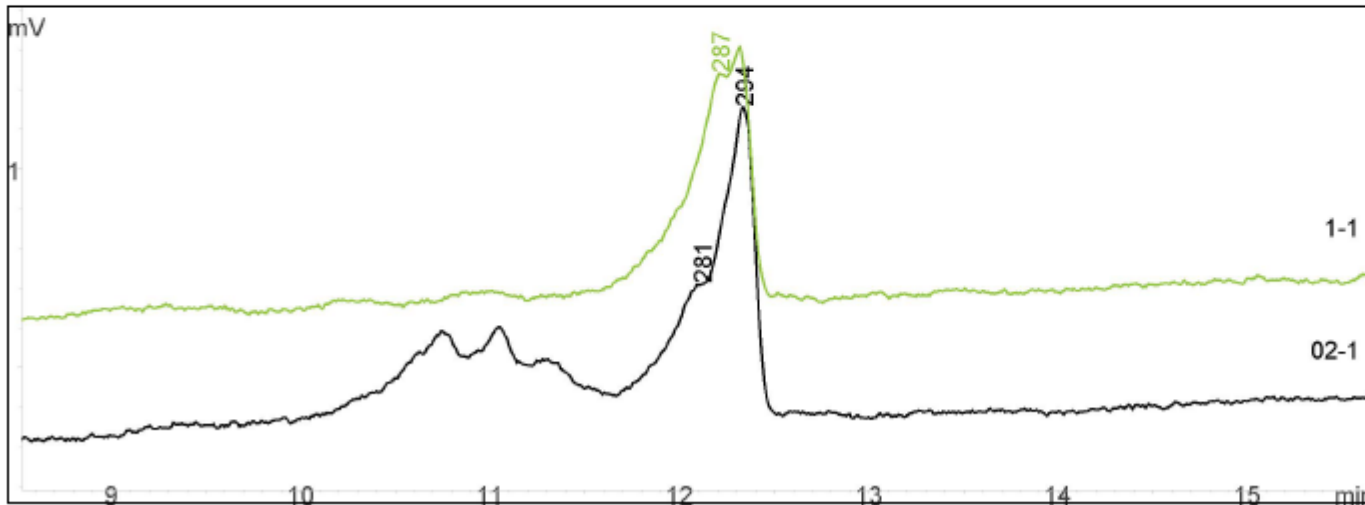


Table with 13 columns: Sample Name, Project, Tray, Vial, Application Type, Method Name, Temp, %B, Shift, Vol, BP, Dye, Mutation Call, ID, Inj. Run Date. Row 1: 1-1, 2011-0222, sl-10*, 2, Universal Linear, 50, 40, 0, 8, 0, 2617, 2011-02-22 10:34:35.0

UV TRACE table with 10 columns: Peak #, Retention, Peak Start, Peak End, Peak Height, Peak Area, Percent Area, Peak FWHM, BP Est. Rows 1-3.

Table with 13 columns: Sample Name, Project, Tray, Vial, Application Type, Method Name, Temp, %B, Shift, Vol, BP, Dye, Mutation Call, ID, Inj. Run Date. Row 1: 02-1, 2011-0222, sl-10*, 3, Universal Linear, 50, 40, 0, 8, 0, 2618, 2011-02-22 10:57:42.0

UV TRACE table with 10 columns: Peak #, Retention, Peak Start, Peak End, Peak Height, Peak Area, Percent Area, Peak FWHM, BP Est. Rows 1-5.



主要内容

菌保
中心
CGMCC

环境样品中微生物研究的策略及方法

高通量检测技术的应用实例

保藏中心开放共享的仪器

Qpix 2



WAVE 4500



仪器应用范围拓展的征集





Destination plates

Picking trays

Wash area

Qpix2 工作区



Why automated picking??

	传统人工筛选	仪器自动筛选
筛选标准	人工主观判断	仪器自动筛选
挑选时间 (10000个克隆)	2 man weeks	< 3 hours
位置精度	人工操作	$\leq 10\mu\text{m}$
重复性	低	>99.5%



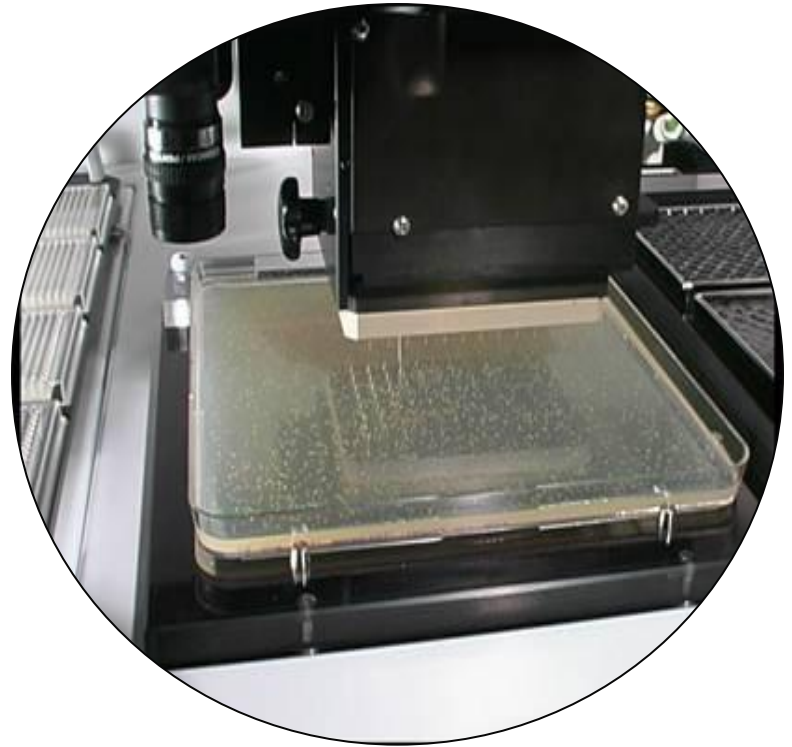
Qpix2 主要应用

- ❖ 高通量菌落挑选 (Colony Picking)
- ❖ 蓝白斑筛选(White and blue screen)
- ❖ 文库管理-复制 (Replicating) /重排 (Rearranging)
- ❖ 高通量点膜 (Gridding)



自动化的挑克隆过程

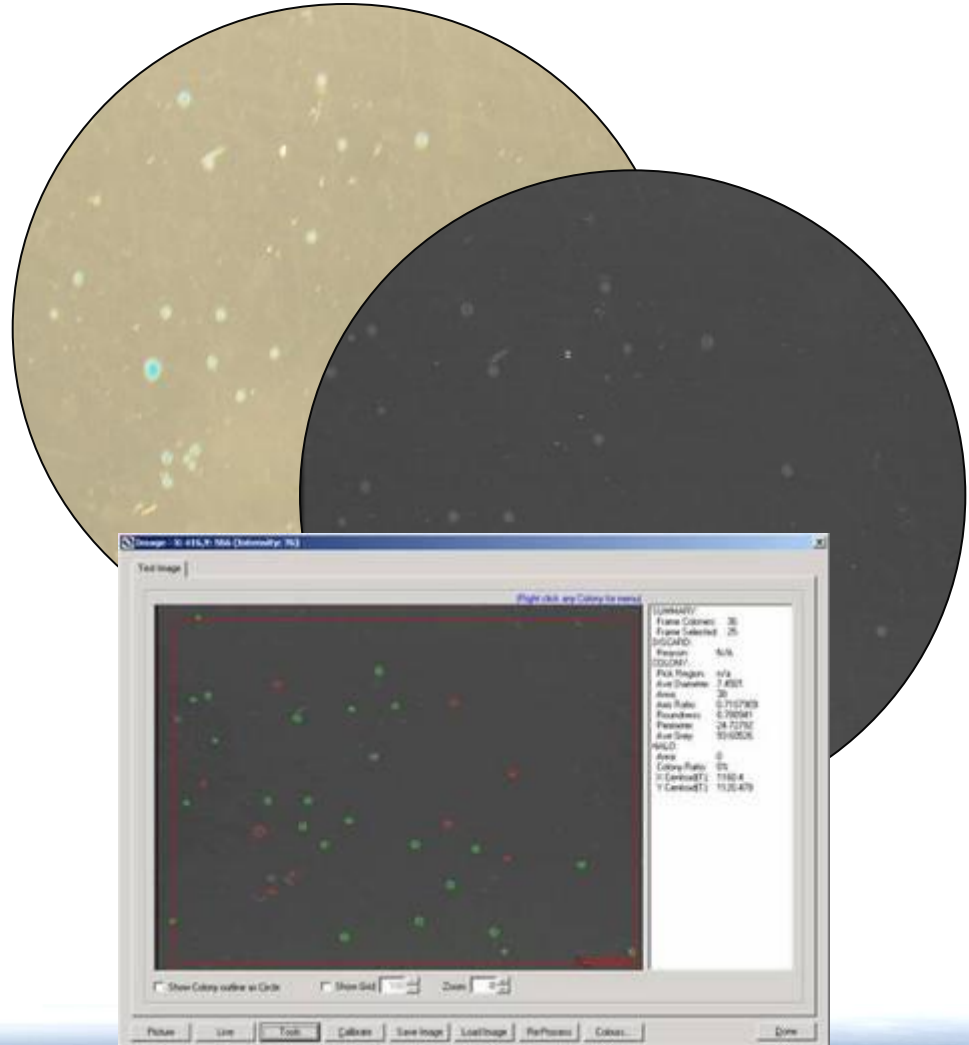
- ❖ 克隆生长在22cm QTray或9cm 培养皿
- ❖ 培养结束后，培养皿进行白光成像



自动化的挑克隆过程(1)

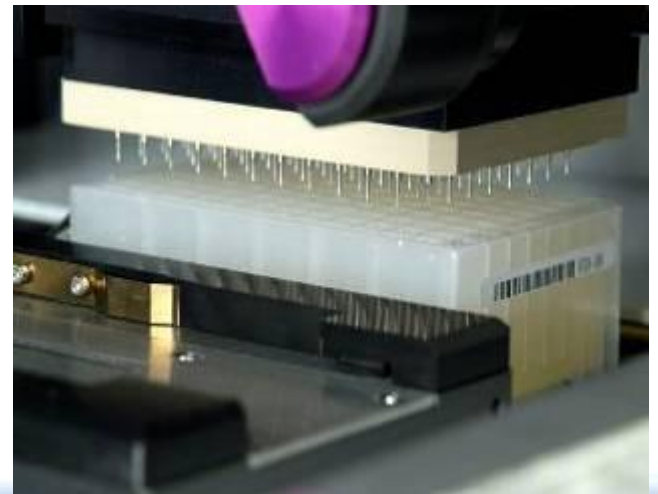
❖ 目标克隆可以根据下面的参数进行自动选择

- Size 大小
- Shape 形状
- Colour 颜色
- Roundness 圆度
- proximity to neighbours 与相邻克隆的距离



自动化的挑克隆过程(2)

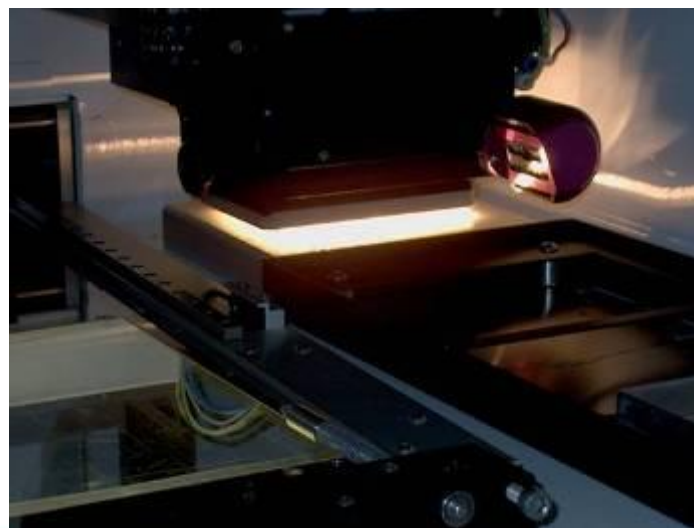
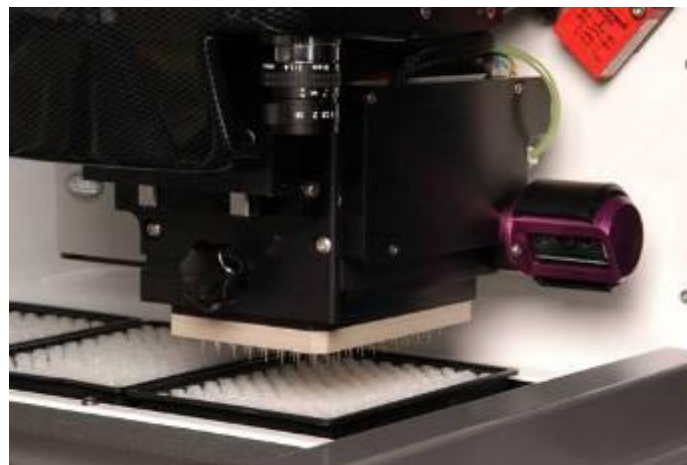
- ❖ 96针头移动至培养基
- ❖ 每根针挑取一个目标菌落
- ❖ 96根针全部挑完后，一起移动至96孔板或384孔板



自动化的挑克隆过程(3)

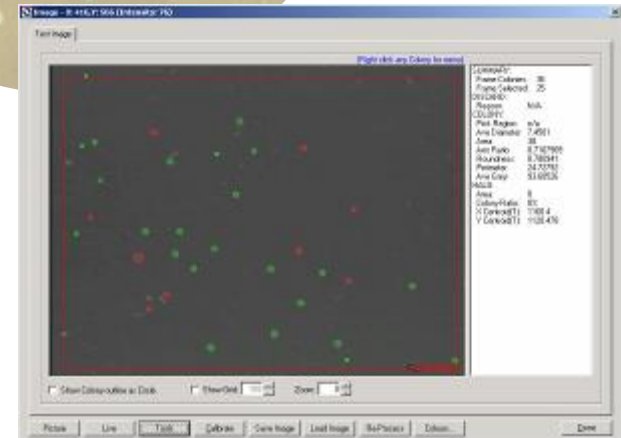
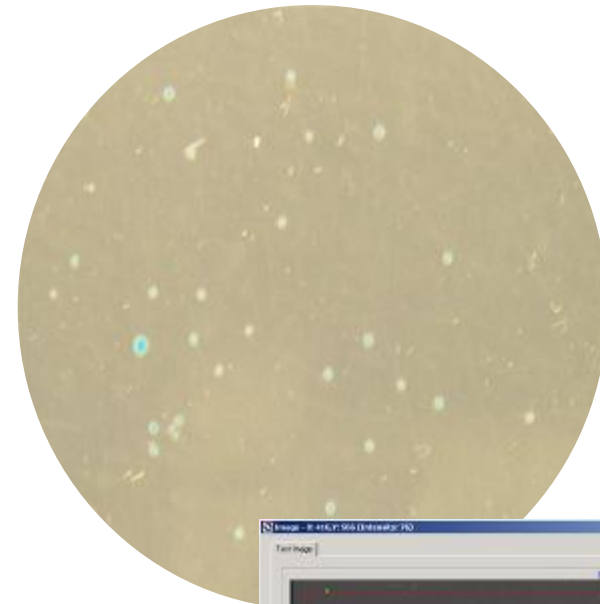
❖ 2轮之间的清洗

- 使用酒精和无菌水进行清洗
- 干燥及灭菌

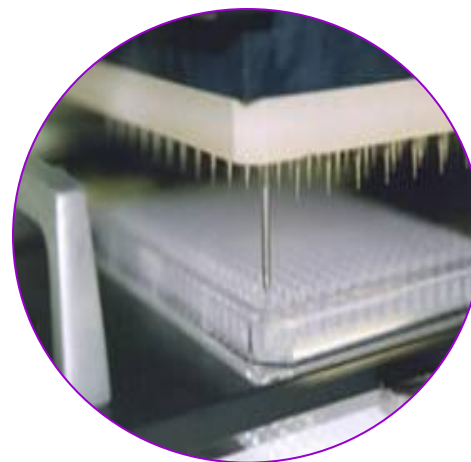
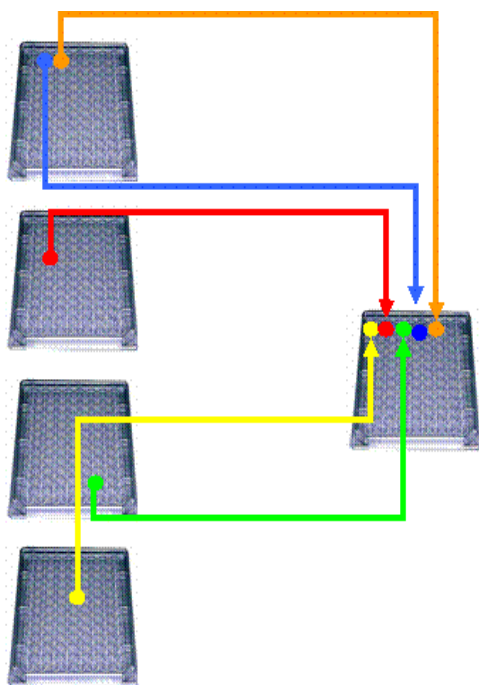


蓝白斑筛选

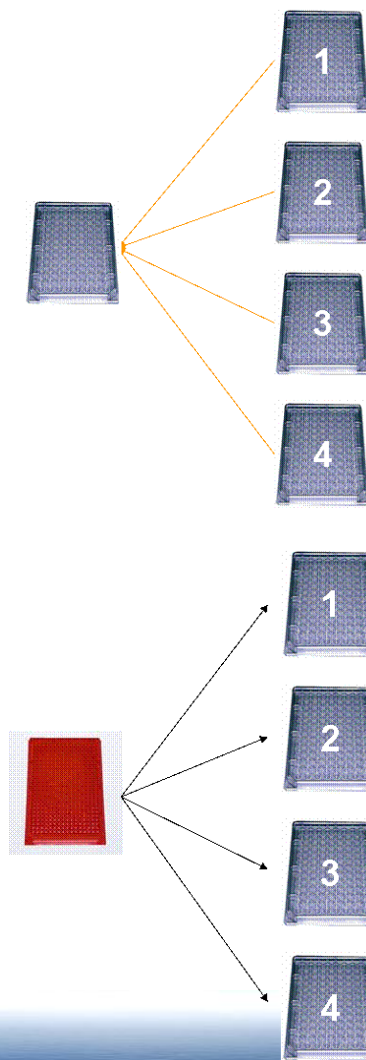
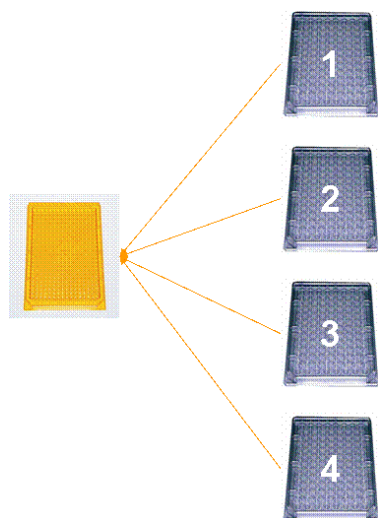
- ❖ 提供X-Gal and IPTG 使得蓝白斑容易区分
- ❖ 成像以及克隆选择软件可以使得蓝白斑挑选非常容易



文库管理-Re-arraying



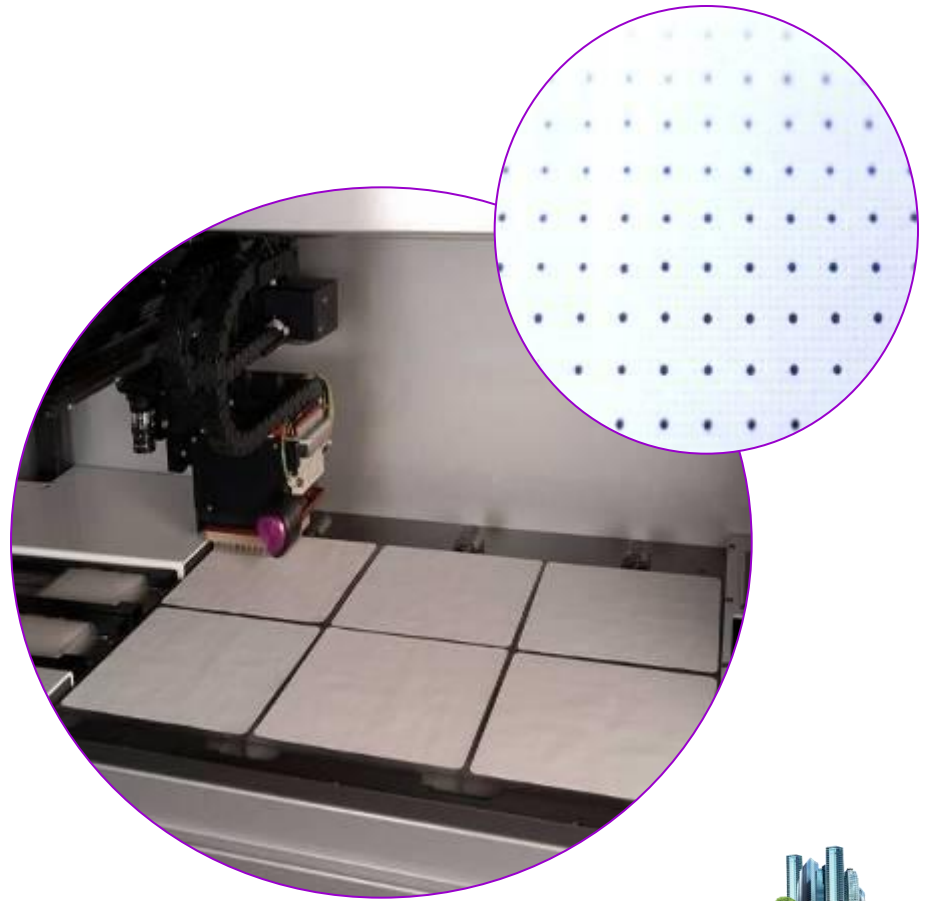
文库管理-复制 (Replicating)



通量点膜（gridding）

96或384点样针

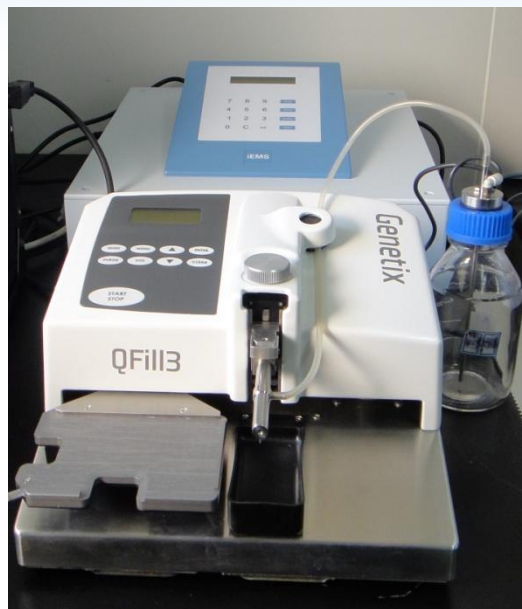
55,926 克隆/22cm膜



- standard 1kb to 9kb shearing assembly;
- 650bp to 5,000bp shearing assembly;
- 4kb to 40kb shearing assembly ;



HydroShear DNA 片段化仪



QFill 3 分液仪及微孔板孵育震荡器



Thermo Scientific ALPS 25 手动热封仪



仪器预约及使用



中国科学院 仪器设备共享管理平台
CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

LOGIN

用户名:

密码:

登录 → 单位介绍



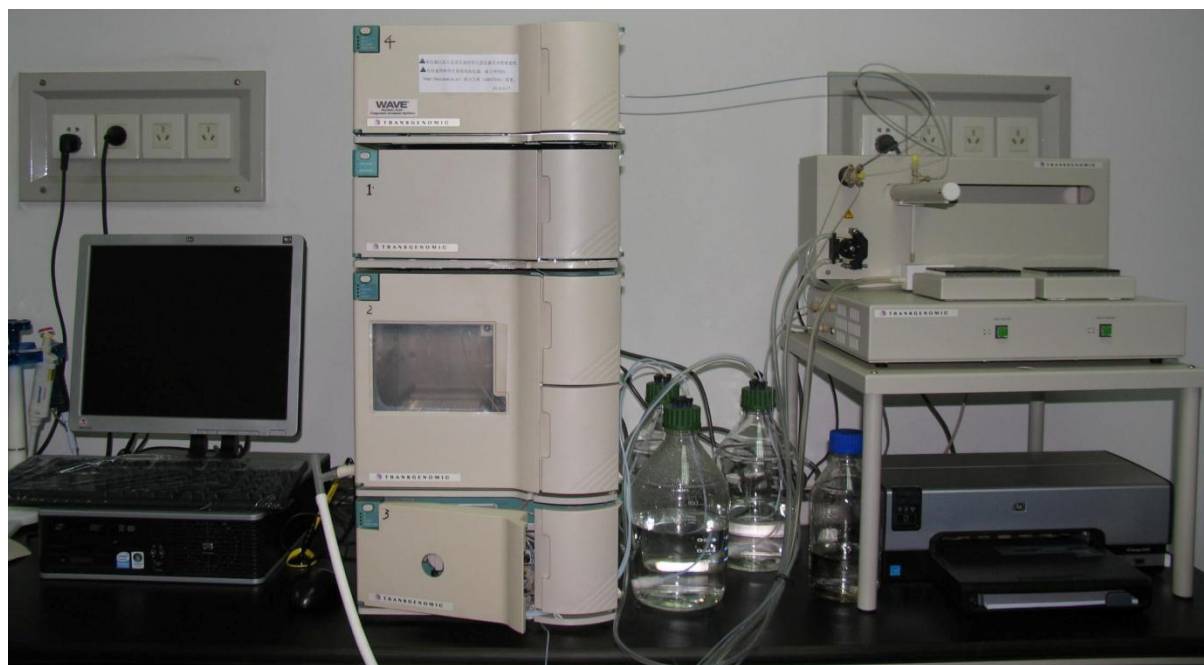
B404
64807850

使用前，所有管道系统、加液头、试剂瓶及**PURGE**盒等高压灭菌**8磅，15分**；
配制**80%**乙醇溶液、无菌水、培养基。

注意：微孔板一定要与仪器匹配（**Genetix** 原装或按此规格仿制的）



WAVE Microbial Analysis System



变性高效液相层析DHPLC



DNAsep 分离柱是**WAVE**系统的“心脏”

- n 双链 DNA 片段大小
- n 寡核苷酸纯化和质控
- n 突变检测
- n RNA 分析和纯化
- n 基因分型
- n 微生物鉴定



三种工作模式

1、非变性条件: 50 °C (大小依赖, 序列不依赖)

双链DNA大小分析 (最大到 2000bp)

微卫星不稳定分析, 杂合性缺失分析

PCR 产物的检测和纯化

结合多重PCR扩增对大片段的缺失和重复进行基因剂量分析

2、部分变性条件: 52-78 °C (大小和序列依赖)

整个基因的突变筛查

单核苷酸多态 (SNP) 发现

3、完全变性条件: 78-80 °C (大小和序列依赖)

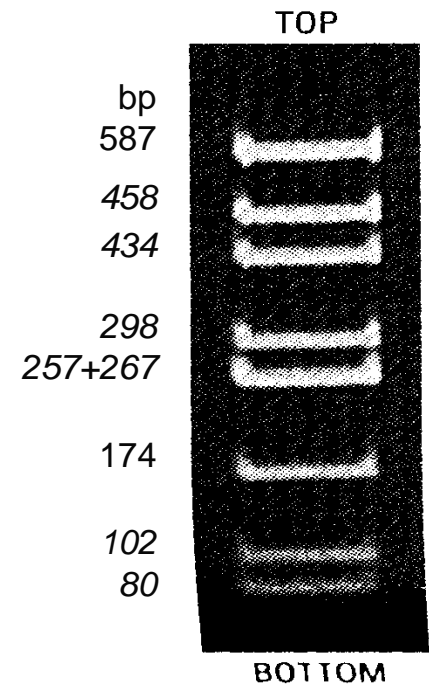
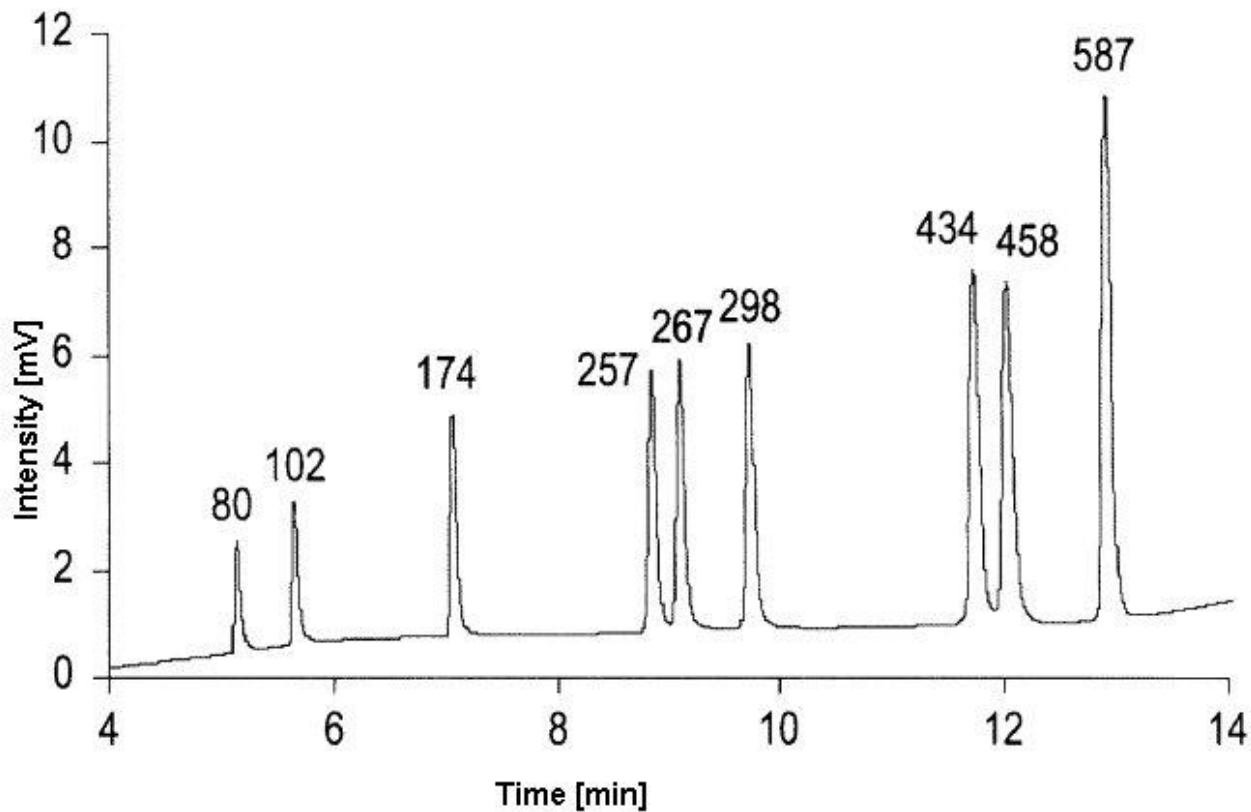
通过单引物延伸进行基因分型

寡核苷酸的质控和纯化

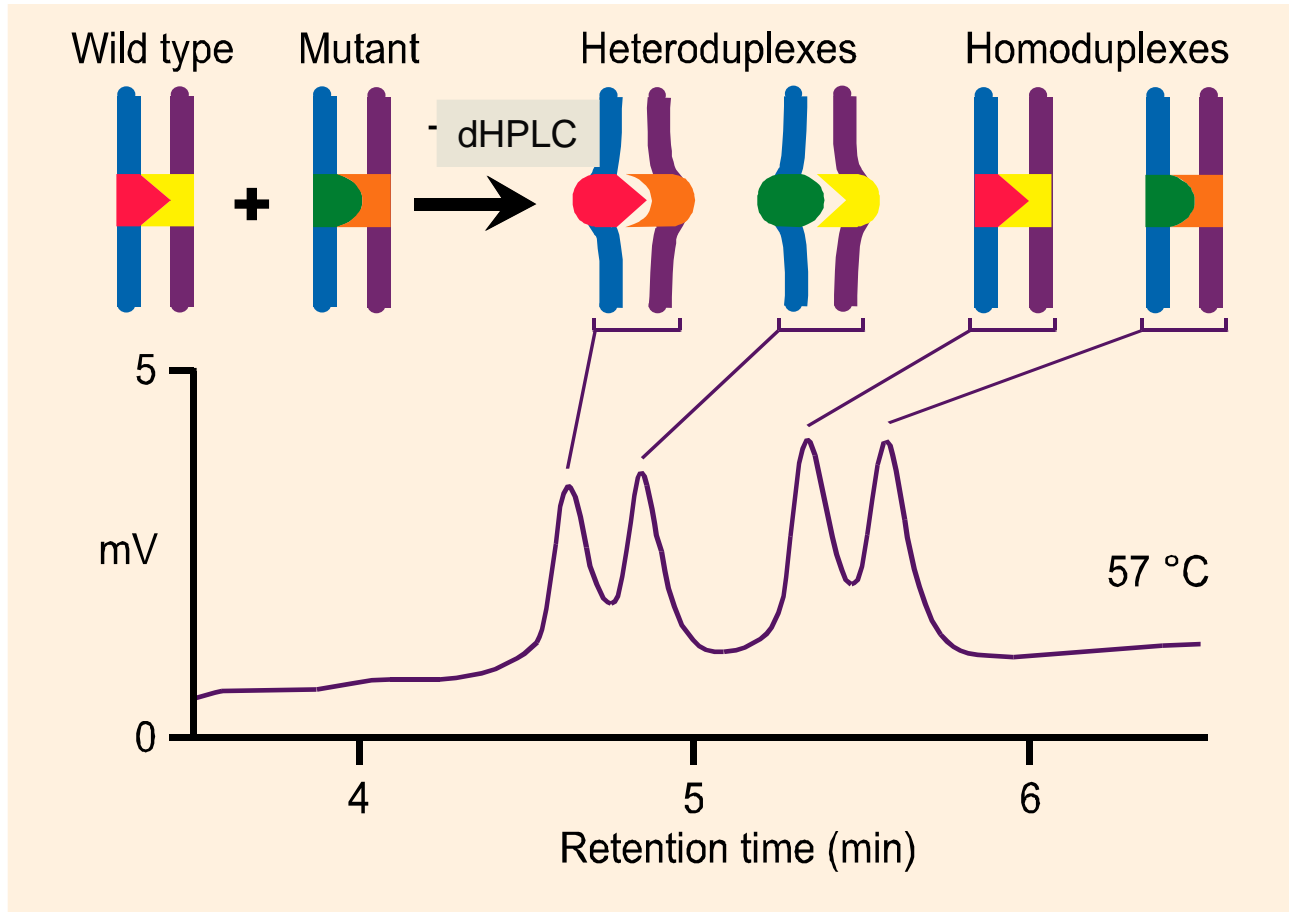


非变性条件 **DNA** 片段分离

质粒 pUC18 由限制性内切酶 *Hae*III 切割，9 个片段经 WAVE® 系统分离。在 0.8% 琼脂糖胶上，257 和 267 bp 片段分离不开。



Mutation Detection by dHPLC



Why DHPLC? ?

Requirement for Routine Lab Testing method:

- ❖ Accuracy
- ❖ Reproducibility
- ❖ Automation
- ❖ Low Running Cost
- ❖ Rapidity
- ❖ Sufficient Throughput
- ❖ Known and Unknown Species



DHPLC技术进行细菌鉴定的原理

利用DHPLC灵敏检测DNA序列差异的特性结合细菌16s rDNA基因分型的原理在属和种的水平上进行细菌鉴定，在部分难以鉴定的菌种间，辅以其它细菌DNA靶点进行进一步的分析，不同的细菌显示特异的DHPLC峰型。



Software screen capture

Navigator Connection: WADMIN@den-dev

File Setup Help

User DNA Injection Ad Hoc Analysis MIRU Analysis Maintenance

Project: MIRU Samples

Tray Name: Patient Samples Oct-23-20...
 Serial No: AE300234
 Instrument: 3500HT
 Tray Type: 96 Well Tray Row-Front

Method Results Fragment Collection

Estimated Run Time 10.8

Gradient Name	Time	%A	%B	%C
Loading	0	85	35	
Start Gradient	1	60	40	
Stop Gradient	5.5	28	72	
Start Clean	5.6	0	100	
Stop Clean	6.6	0	100	
Start Equilibrate	6.7	85	35	
Stop Equilibrate	6.7	65	35	

Time 5.4 %A 43.6 %B 56.4 %C 0.0

Display %B Pump Detector

Gradient Parameters Method Detail Method Description

Slope (%B per min) 5.0 Loading Duration 1.0 Clean Duration 1.0
 Drop for Loading 5.0 Gradient Duration 4.5 Equilibration Duration 2.0

	Vial	Volume	Application Type	Sample Name	Dyes	Oven Temp	Base Pairs	Method Name	%B	Time Shift	Ch1	Ch2
1	1	5	Universal Linear	Sizing Ladder #1		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
2	2	5	Universal Linear	Sizing Ladder #2		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
3	3	5	Universal Linear	Sizing Standard Locus 2 + 20		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
4	4	5	Universal Linear	SUBID: 10023 Locus 2 + 20		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
5	5	5	Universal Linear	SUBID: 10024 Locus 2 + 20		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
6	6	5	Universal Linear	SUBID: 10025 Locus 2 + 20		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
7	7	5	Universal Linear	SUBID: 10026 Locus 2 + 20		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
8	8	5	Universal Linear	SUBID: 10027 Locus 2 + 20		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
9	25	5	Universal Linear	Sizing Ladder #1		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		
10	26	5	Universal Linear	Sizing Ladder #2		50	0	MIRU Rapid Sizing	40	0		

主要内容

菌保
中心
CGMCC

环境样品中微生物研究的策略及方法

高通量检测技术的应用实例

保藏中心开放共享的仪器

Qpix 2



WAVE 4500



仪器应用范围拓展的征集



A close-up photograph of a pink lotus flower bud, showing the intricate texture of its petals. The petals are a vibrant pink color with some darker red tones at the edges. The flower is set against a dark background, with several large green leaves visible around it. The lighting is soft, highlighting the delicate structure of the flower.

Thank You Very Much!