

# Marine Life Science & Technology (MLST)

- 2017.6: MLST新刊申办获“**中国科技期刊**国际影响力提升计划D类项目资助”
- 2018.6: 获批CN:37-1519/Q, ISSN:2096-6490
- 2019.5: 第一届编委会成立
  - 主编: 宋微波 院士
  - 常务副主编: 张晓华 教授
  - 编委: 97人 (国内44人, 国际53)
- **2019.11: 首期正式出版**
- 2021.5: ESCI收录
- 2021.7: Scopus收录
- **2021.12: SCIE收录**
- **2022.6: 发布首个 $IF_{2021}$ -5.0;**
- **JCR 海洋与淡水生物学1区**
- 2022.8: 第4卷, 第3期出版





# Thanks for your attention!

自营网站: Website: <http://mlst.ouc.edu.cn>

投审稿系统: Online submission via: <https://mc03.manuscriptcentral.com/mlst>

施普林格期刊主页: <https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/42995>

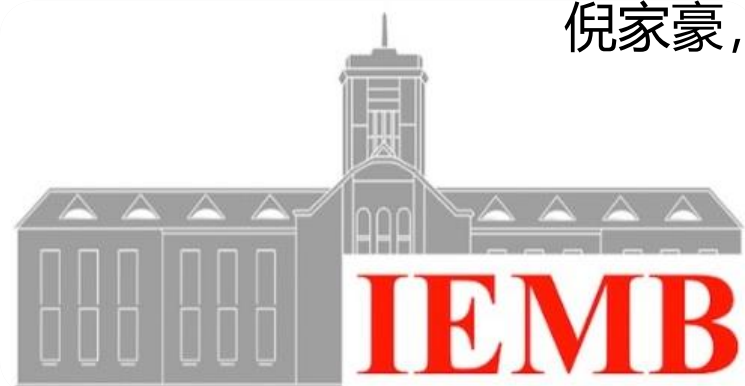


MLST欢迎您的参与，共筑这一学术交流平台

# One-Step PCR Amplicon Library Construction (OSPALC ver. 1)

## 扩增子文库一步构建法

倪家豪, 潘娇, 王瑶海, 陈天浩, 冯新时, 李翌辰, 林彤彤,  
Michael Lynch, 龙红岸, 李唯一\*



海洋生物多样性与进化研究所  
进化基因组学实验室  
2022-11-01



# 目录

## CONTENTS

- ① 文库
- ② 测序公司建库服务
- ③ OSPALC方法
- ④ OSPALC优势

# 文库构建

高通量测序上机前需要对DNA进行文库构建 (Library construction)



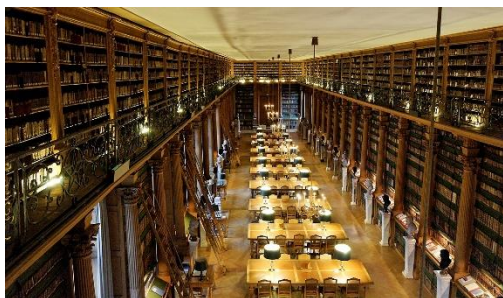
文库?



Library?

# 文库构建

高通量测序上机前需要对DNA进行文库构建 (Library construction)



包含信息

信息便于人类读取

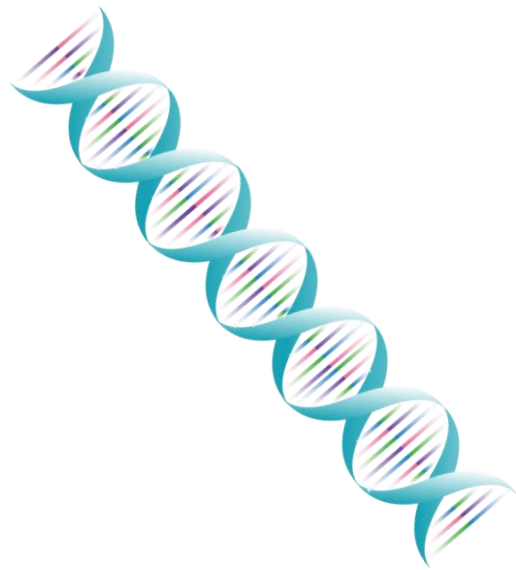
书籍带有标签



DNA文库

# 文库构建

高通量测序上机前需要对DNA进行文库构建 (Library construction)



文库包含DNA的所有/部分遗传信息

文库让测序仪对DNA可读

文库让样品得以区分

特定的序列结构：加接头

## 扩增子文库

扩增子 (amplicon) 为DNA或RNA扩增后的一段核苷酸序列

扩增子文库同样必须满足特定结构要求:

P5/P7	测序芯片连接序列
Barcode	测序反应引物
Index	样品条形码标签
Target primer	目标引物

常用的扩增子文库制备方法:

- 1) 一步法: 长引物一步扩增
- 2) 两步法: 两段引物, 分步扩增
- 3) 连接酶法: 接头直接连接

经过扩增的子文库: 不包含DNA的全部信息



## 成本高昂

成本高昂：每个样品 ¥ 150- ¥ 200不等

一个扩增子样品的分析需求：50,000对 PE250 reads（双端共100,000 reads；50,000 tags）

¥ 200：Illumina PE250 1,000,000 reads（双端共2,000,000 reads；一百万tags）

¥ 200：可测序20个样品——单个样品测序费用 ¥ 10

# 沟通不畅：销售回答技术问题

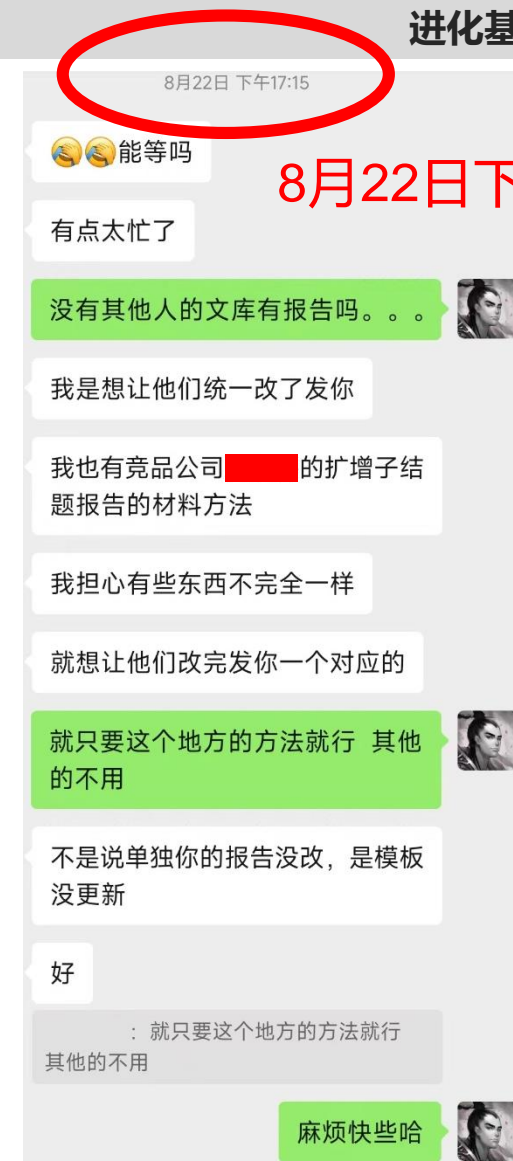
一个连竞品公司材料方法都有的销售

一个只想知道试剂盒货号的用户

8.19-8.22, 耗时三天半



8月19日中午12:24



8月22日下午17:15

# 技术黑箱：仅凭报告很难复制实验流程

## 2.3 PCR产物的定量和定性

将1× loading buffer (含SYBR green) 与PCR产物等量混合，在2%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。选择主带亮度在400-450bp之间的样品进行进一步实验。

## 2.4 PCR产物的混样和纯化

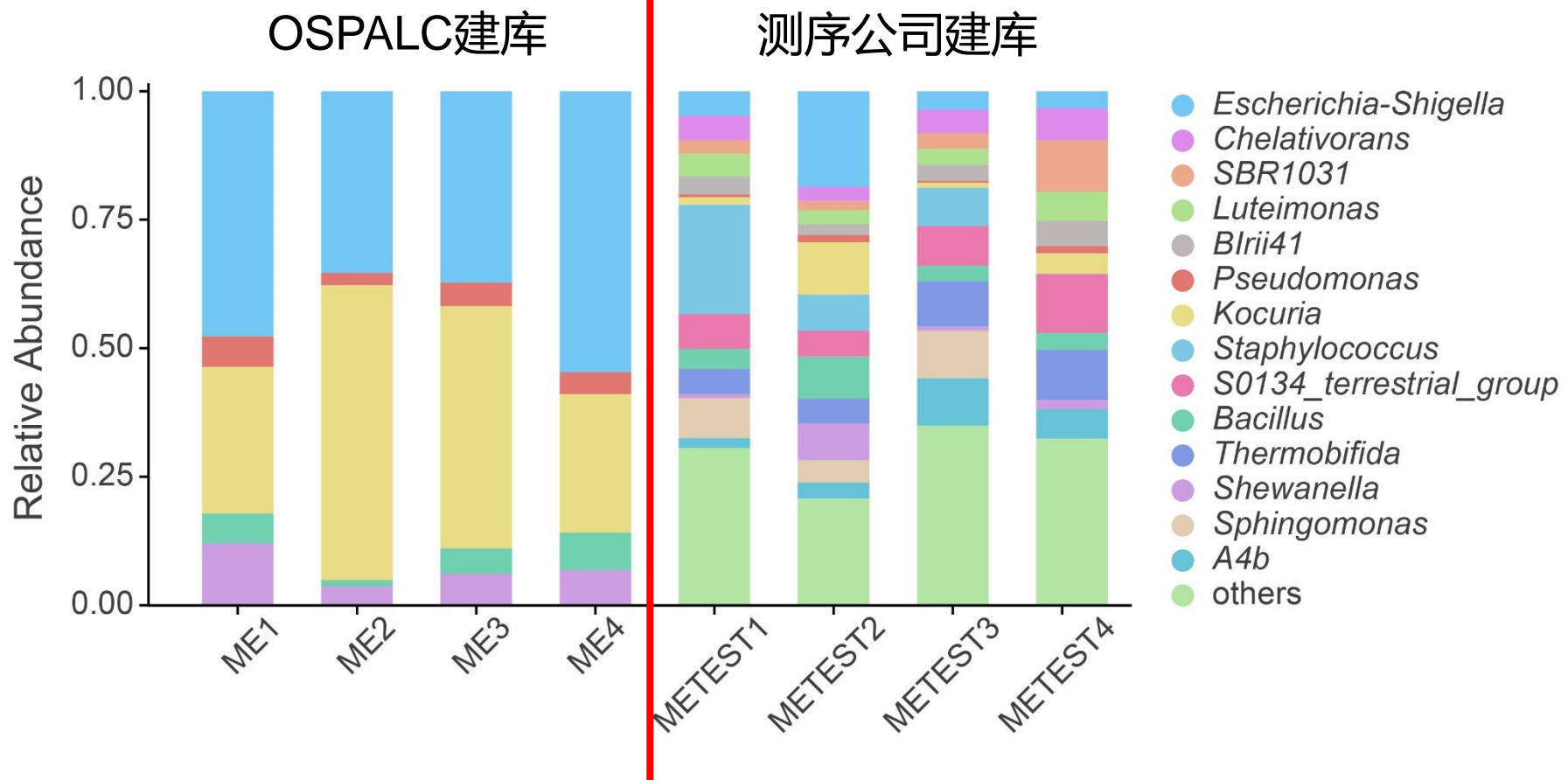
根据PCR产物浓度进行等浓度混样，并使用TIANGel Purification Kit (TIANGEN Biotech)进行纯化，纯化产物用于制备Illumina DNA文库。

## 2.5 文库构建和上机测序

使用TIANSeq快速DNA文库构建试剂盒 (illumina平台) (TIANGEN Biotech) 构建测序文库，构建好的文库经过Qubit定量和Agilent2100文库检测，合格后，使用Illumina平台进行PE250bp测序，得到250bp的双端测序 reads。

# 未知风险

同一份模拟群落DNA



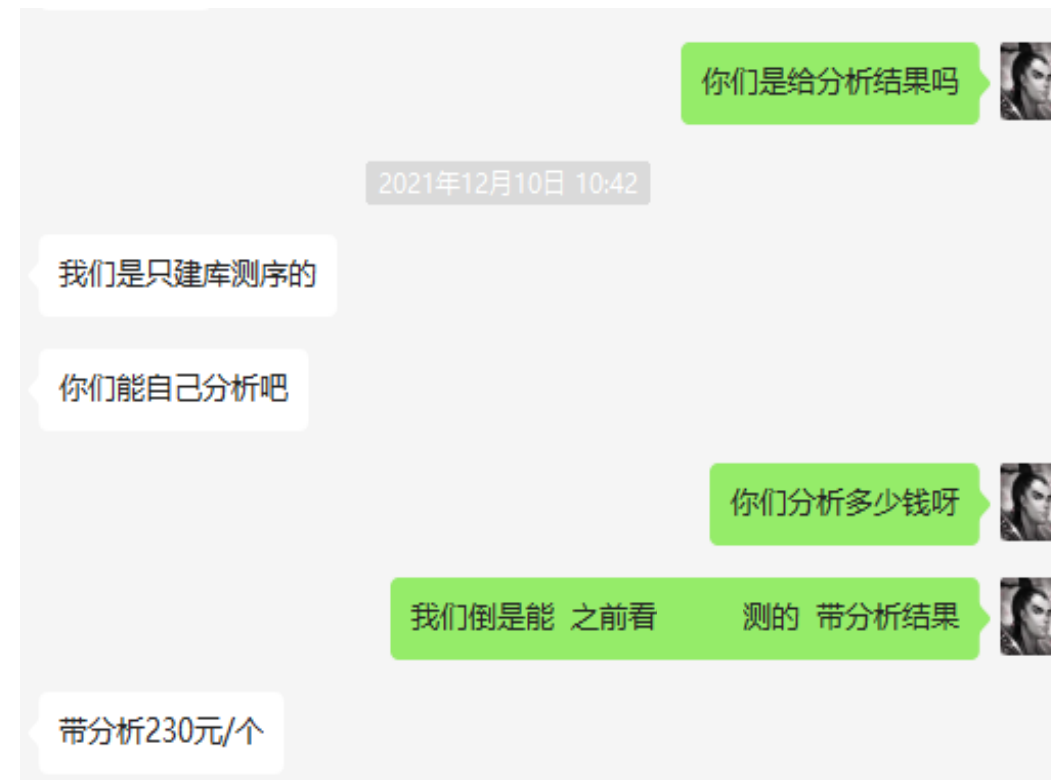
## 其他可能限制

样品数量受限：最少n个样品起测

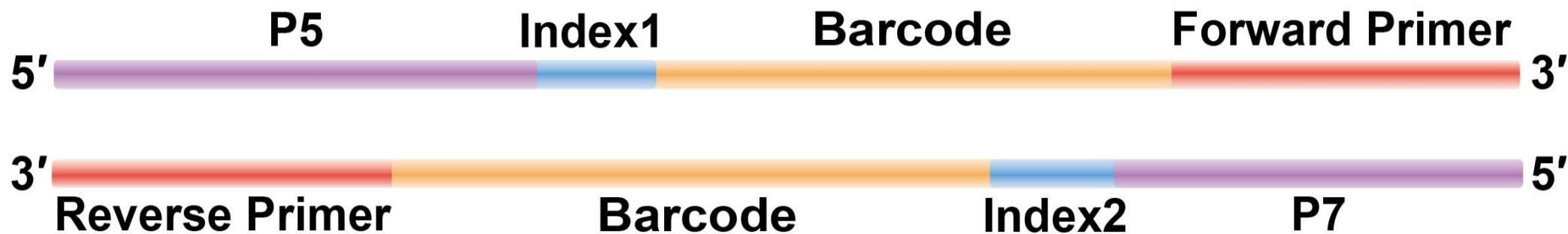
目标区域受限：非16S rDNA扩增子排机困难

核酸种类受限：不收RNA，反转录额外收费

计价未算分析：分析报告额外收费



## OSPALC引物结构



P5/P7: 与flow cell结合

可自由选择target primer

Barcode: 与测序引物结合

针对RNA样品, 可衔接cDNA使用

Index: 样品标签便于分样

针对低质量样品, 可尝试稀释模板DNA拯救

# OSPALC引物结构

P5/P7

Index区域

Barcode

可自行更改  
目标区域引物

Number	Forward primer (5'-3')
16SV4F1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGCACCTCTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCGAAGTATCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGTACTTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTCCATTGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAACGCTGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCAGGAGGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGCTGATATCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4F8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCCTTGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
Number	Reverse primer (5'-3')
16SV4R1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGCTCGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTATAGCCTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAATCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATAGACA GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCGTAGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATAGCGACGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATGAATCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R8	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCAGCGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R9	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAGGATGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACTAGTCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R11	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAACTGGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT
16SV4R12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAAGCCA GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT

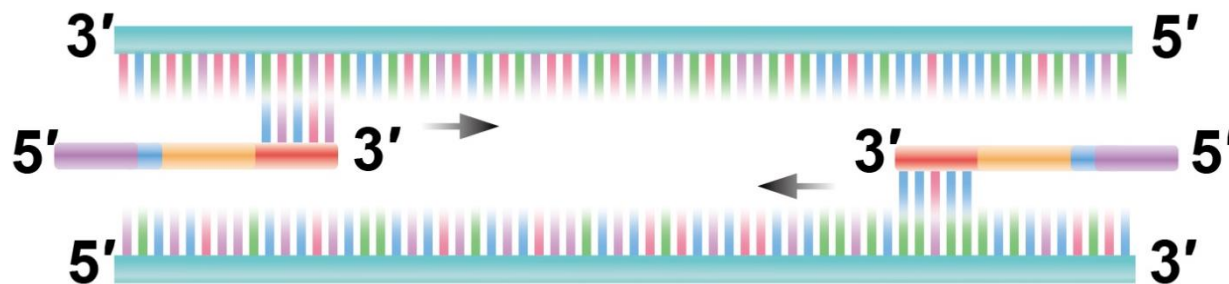
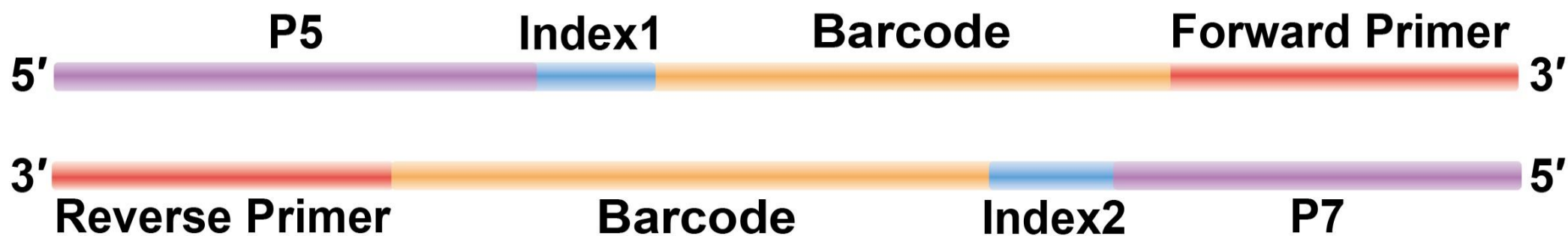
# OSPALC引物订购

#NAME?	引物合成订购表					
订购日期:	北京总部: bj-synth@tsingke.com.cn 4006					
结帐方式:	成都合成部: cd-synth@tsingke.com.cn 4006683730转2					
客户姓名:	杭州合成部: hz-synth@tsingke.com.cn 4006683730转2					
负责人姓名:	南京合成部: nj-synth@tsingke.com.cn 4006683730转2					
客户单位:	上海合成部: sh-synth@tsingke.com.cn 4006683730转2					
发票抬头:	广州合成部: gz-synth@tsingke.com.cn 4006683730转2					
客户地址:	西安合成部: xa-synth@tsingke.com.cn 029-84182920					
联系电话:	青岛合成部: qd-synth@tsingke.com.cn 0532-66008100					
客户Email:	武汉合成部: wh-synth@tsingke.com.cn 027-88161699/1399					
碱基总数:	长沙合成部: cs-synth@tsingke.com.cn 0731-89785521/6621					
	昆明合成部: km-synth@tsingke.com.cn 0871-65011065/909					
	哈尔滨合成部: hrb-synth@tsingke.com.cn 0451-86819884					
ID	引物名称	引物序列 (5' to 3')	碱基数	纯化方法	OD/管	分装管数
1	1634F1_CATTAGTT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCATTAGTTTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	87	PAGE	4	4
2	1634F2_ATTGAGCG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATTGAGCGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	87	PAGE	4	4
3	1634F3_AACGGTAA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACGGTAATCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	87	PAGE	4	4
4	1634F4_GCCAATAG	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCCAATAGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	87	PAGE	4	4
5	1634F5_GAGTCGGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAGTCGGATCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	87	PAGE	4	4
6	1634F6_CGTTATCT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTTATCTTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	87	PAGE	4	4

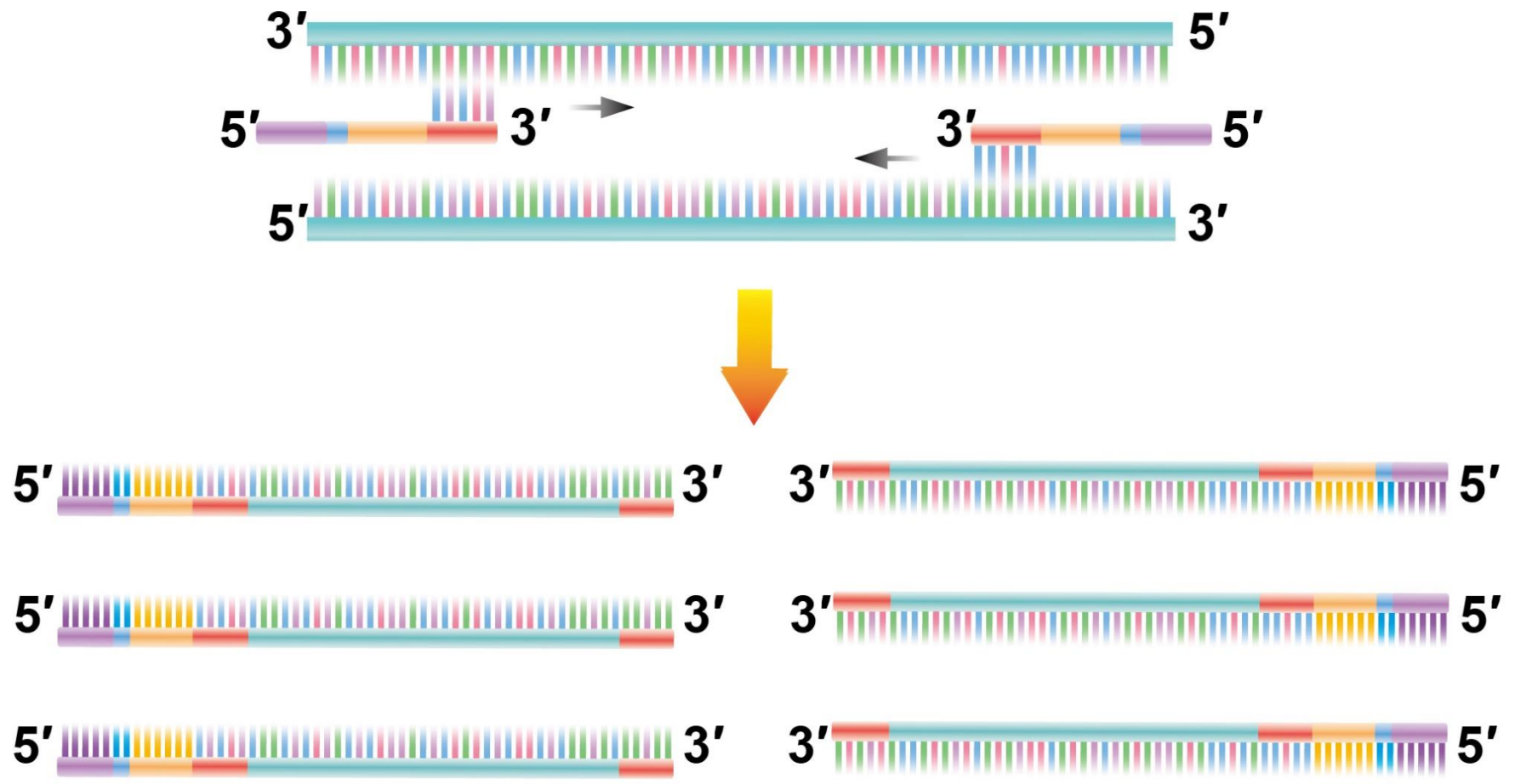
为方便建库  
引物名称需要清楚标记



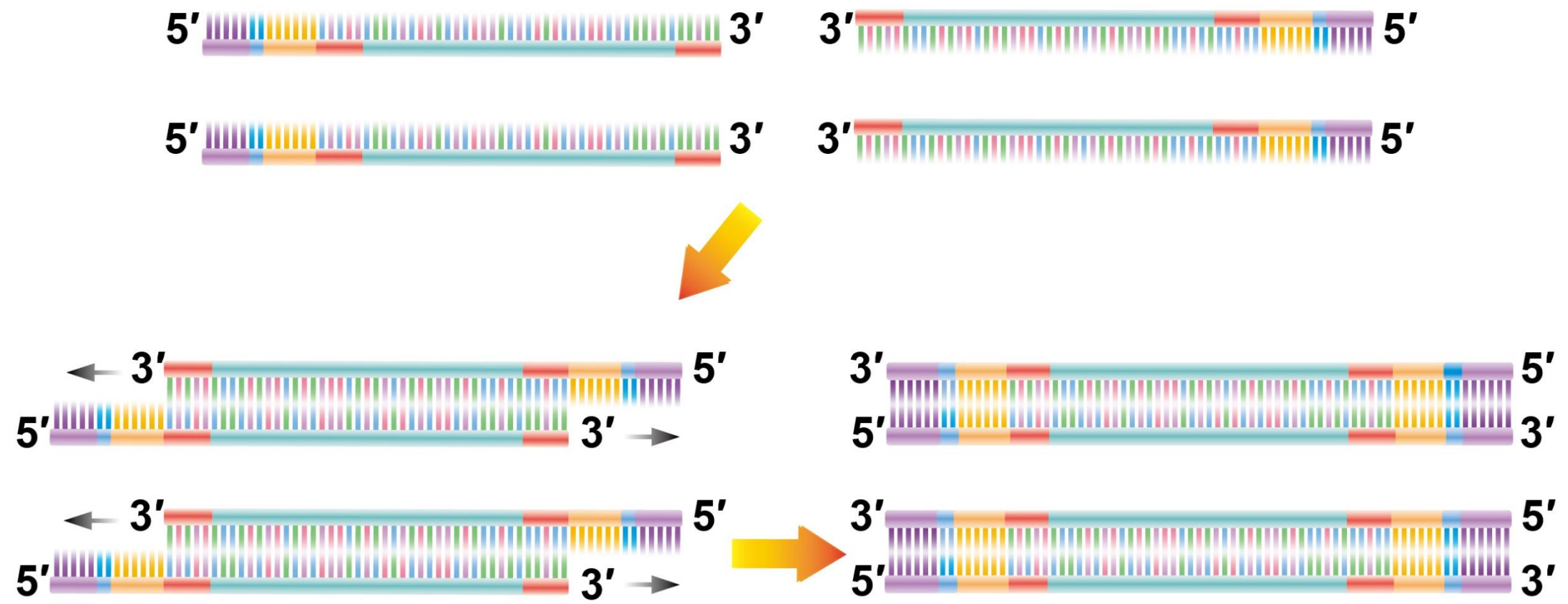
## OSPALC引物结构



# OSPALC引物结构

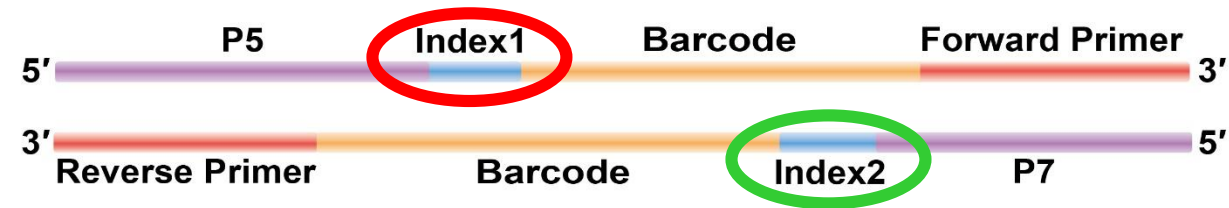
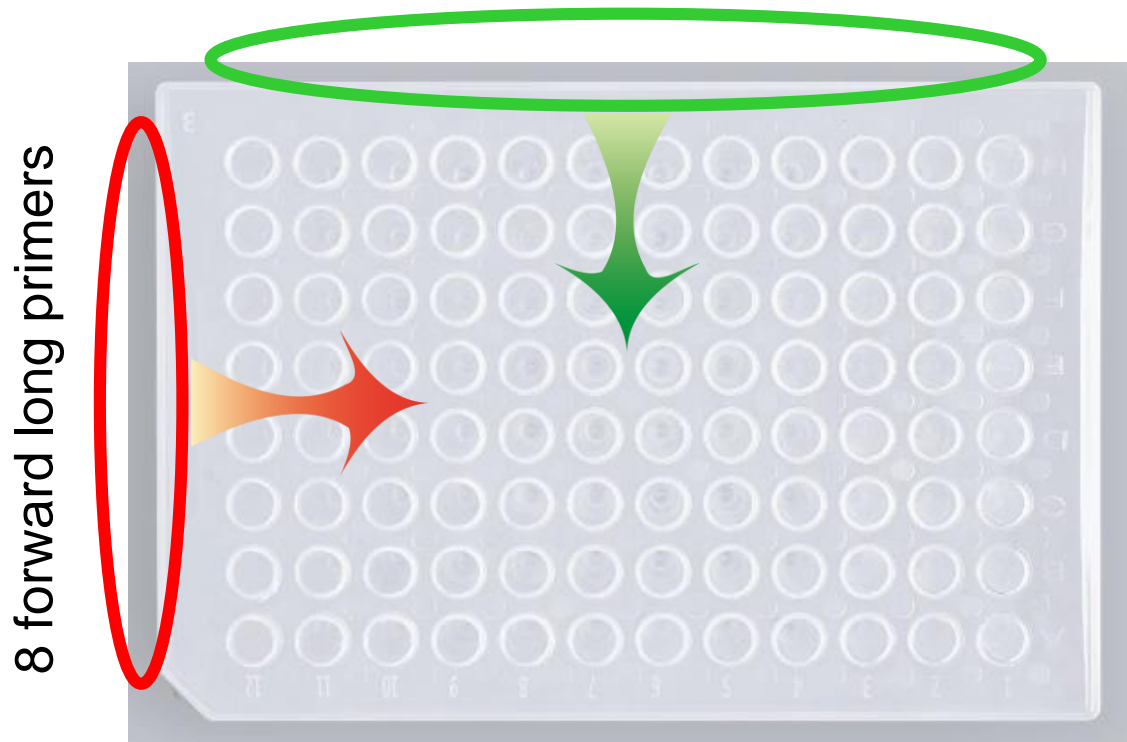


# OSPALC引物结构



# OSPALC一步扩增子文库构建

12 reverse long primers



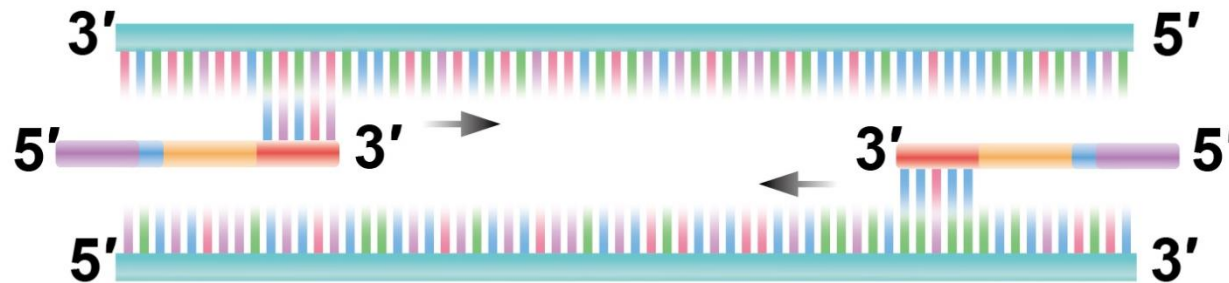
- Row master-mix in 8-strip PCR tubes A
- Column master-mix in 12-strip PCR tubes B

8×12双端indices  
8+12共20条引物，可区分96个样品

# OSPALC反应体系

## Components of the reaction system for each sample:

Vazyme 2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)	5.0μl
Forward primer	0.2μl
Reverse primer	0.2μl
Sterilized ultrapure water	2.6μl
DNA	2.0μl (1ng/μl)
<b>Total volume</b>	<b>10.0μl</b>



## OSPALC文库质检与合并



OMEGA E.Z.N.A. Gel Extraction Kit  
(Cat. No.: D2500-02)



VAHTS DNA Clean Beads  
(Cat. No.: N411-01)

## OSPALC文库质检与合并



OMEGA E.Z.N.A. Gel Extraction Kit  
(Cat. No.: D2500-02)



VAHTS DNA Clean Beads  
(Cat. No.: N411-01)



96孔板磁力架  
(可自行3D打印或联系我们实验室)  
Li et al. 2019 MLST—宏基因组/转录组自建库

## OSPALC文库合并&送测

根据Qubit测量的浓度合库至新PCR或EP管中

合并文库中每个子文库的含量应当相等

每个子文库的平均体积应约为 $1\mu\text{l}$

将约 $20\mu\text{l}$ 的合并文库邮寄给测序商进行PE250测序

每个样本应当有100,000个reads (50,000 forward reads和50,000 reverse reads; 测序公司有时将 reads = tags) 的测序量





## OSPALC一步扩增子文库构建

构建模拟群落：ME、MG

OSPALC与外送建库测序结果比较

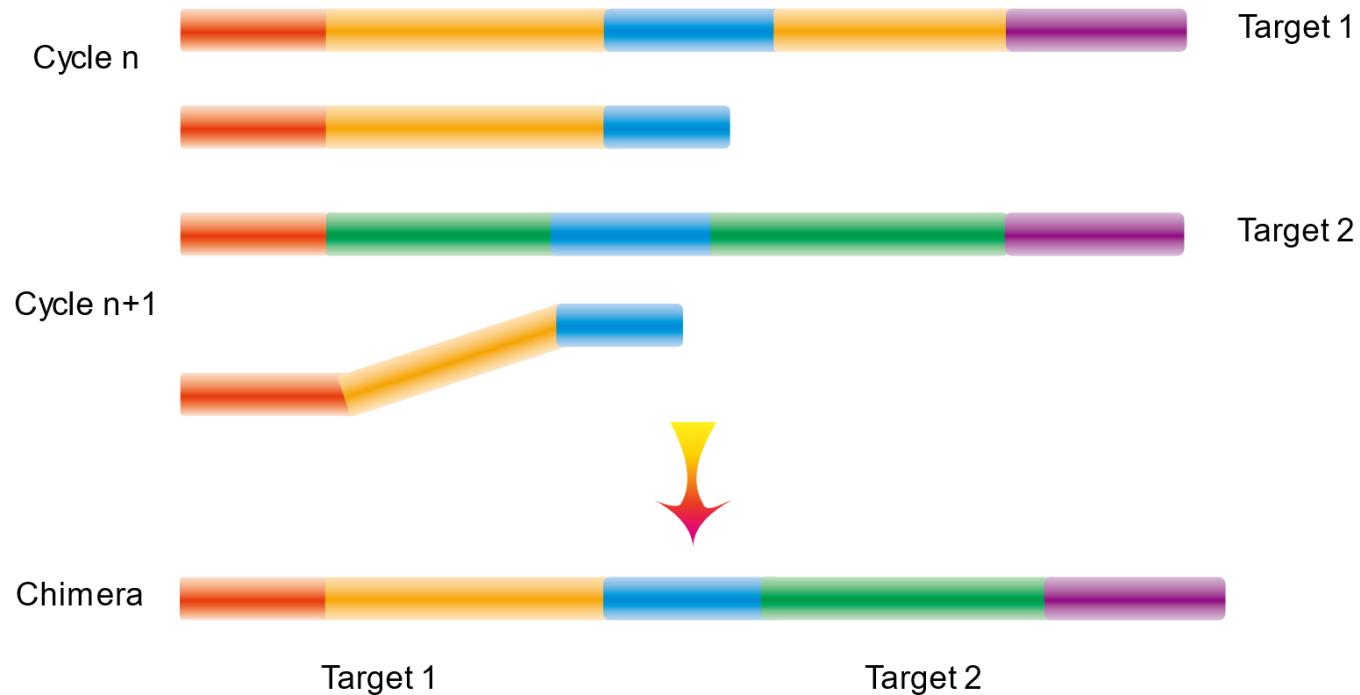
与外送建库样品结果基本一致

不同反应条件OSPALC群落结构略有波动



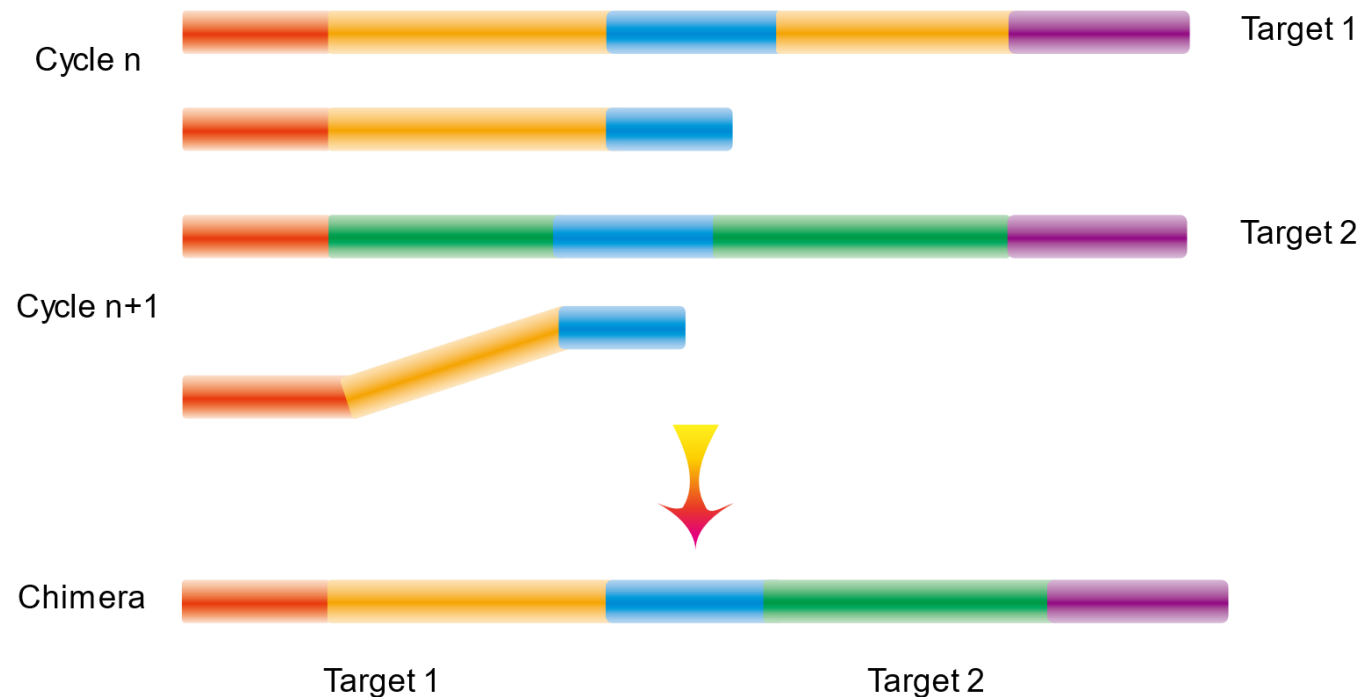
## 嵌合体 (chimera) 过滤

嵌合体序列由来自两条或者多条模板链的序列组成，在16S rDNA扩增子中，嵌合体比例甚至可达到20%。扩增子建库流程对嵌合体比例的影响非常大。



## 嵌合体 (chimera) 过滤

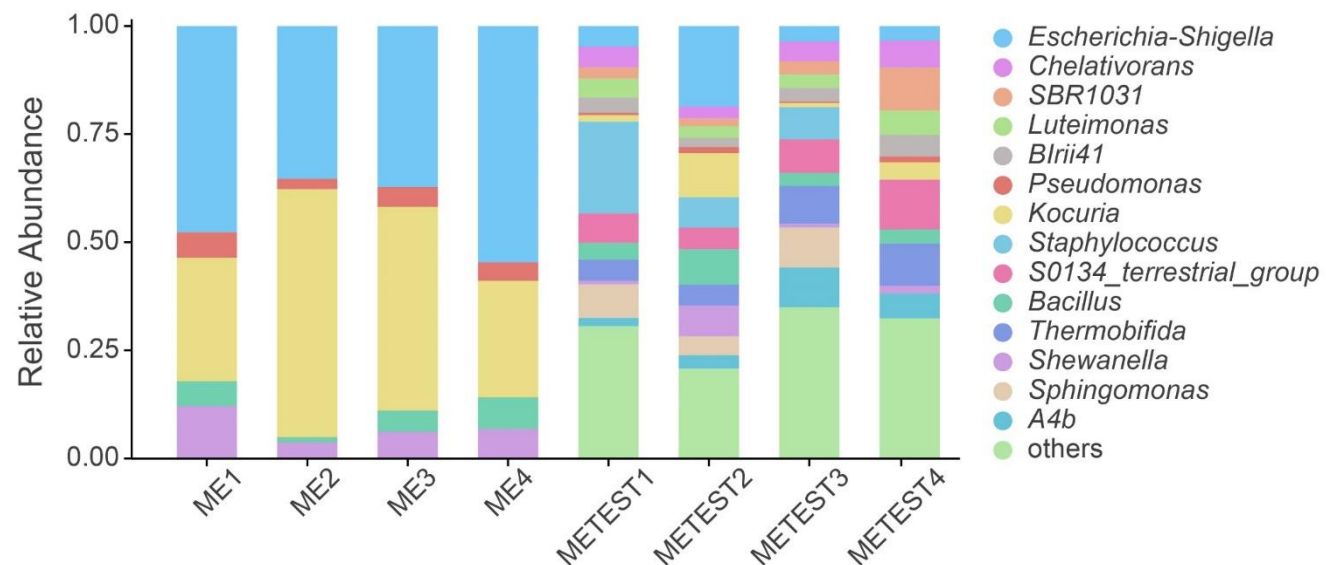
嵌合体序列由来自两条或者多条模板链的序列组成，在16S rDNA扩增子中，嵌合体比例甚至可达到20%。扩增子建库流程对嵌合体比例的影响非常大。



OSPALC 嵌合体占比: 2.88% ✓

外送对照 嵌合体占比: 7.95%

# OSPALC一步扩增子文库构建



一步操作

更少污染

价格极便宜

送测样品中务必增加已知对照

## OSPALC成本计算 (不含人工或设备折损)

20条长引物 (~90bp) : ¥ 2880 —— 可供约200次96孔板建库

每条引物约144元 (90bp)

单个样品的引物费用: ¥ 0.15

4管共480 $\mu$ l



PCR试剂: ¥ 1350 —— 可供1000次反应

单个样品的试剂费用: ¥ 1.35



¥ 1350: 5ml

Illumina PE250 sequencing: ¥ 200/M reads

Vazyme 2 $\times$  Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)  
(Cat. No.: P520-02)

单个样品测序费用: ¥ 10.00



## OSPALC成本计算（不含人工或设备折损）

20条引物： ¥ 2880 —— 可供约200次96孔板建库

单样品引物： ¥ 0.15

试剂： ¥ 1350 ——可供1000次反应

单样品试剂： ¥ 1.35

Illumina PE250 sequencing: ¥ 200/M reads

单个样品测序费用： ¥ 10.00

单样品总费用： 约 ¥ 20

96样品总费用： 约 ¥ 1920

公司96样品总费用： 约 ¥ 19200

96样品总费用节省： 约 ¥ 17280



海洋生物多样性与进化研究所



进化基因组学实验室

