

ICS 13. 020

CCS A 01

团 体 标 准

T/ACEF 0**—20**

湖库沉积物功能微生物多样性监测规程

Code of Procedures for monitoring functional microbial diversity in lake and
reservoir sediments

（征求意见稿）

2024-□□-□□发布

2024-□□-□□实施

中 华 环 保 联 合 会 发布

目 次

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 工作程序2

5 采样点布设2

6 样本采集3

7 转运与保存3

8 监测与分析3

9 监测报告10

附录 A （资料性）湖库沉积物采样器 10

附录 B （资料性）湖库沉积物采样信息登记表 10

附录 C （资料性）沉积物微生物形态学分析前处理方法 10

附录 D （资料性）沉积物 DNA 提取方法10

附录 E （资料性）微生物种群及功能注释对照数据库及其特点 11

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。

本文件为首次发布。

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。

本文件由西安建筑科技大学提出。

本文件由中华环保联合会归口。

本文件主编单位：

本文件参编单位：

本文件主要起草人：

湖库沉积物微生物多样性监测规程

1 范围

本文件规定了湖库沉积物微生物多样性监测的工作程序、采样点布设、样本采集、转运与保存、监测与分析 and 监测报告等。

本文件适用于湖泊和水库沉积物微生物多样性监测。

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 17378.7 海洋监测规范 第7部分：近海污染生态调查和生物监测

GB/T 32725 实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南

GB/T 34224 生物产品中功能性微生物检测

GB/T 34656 海洋沉积物间隙生物调查规范

GB/T 39792.2 生态环境损害鉴定评估技术指南 环境要素 第2部分：地表水和沉积物

GB/T 43628 空气中病原微生物宏基因组测序鉴定方法

HJ 442.4 近岸海域环境监测技术规范 第四部分 近岸海域沉积物监测

HJ 493 样品保存和管理技术规定

HJ 494 水质 采样技术指导

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

SN/T 3509 实验室样品管理指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 湖库沉积物 Lake-reservoir sediments

湖泊与水库中由地表水体携带并沉于水体底部，形成底泥状的黏土、泥沙、有机质及矿物的混合物。

3.2 深水沉积物采样器 Deep water sediment sampler

利用筒体自身重力下降至采样位后，通过提升开闭拉绳控制阀体上升，打开筒体阀口，湖库水底泥水界面处的水和泥进入采样器中，松开开闭拉绳，阀体因重力作用下沉，关闭阀口，完成采样过程的采样器。

3.3 微生物 Microorganism

微生物是一类生物的统称，包括细菌、病毒、真菌等在内，涵盖了有益跟有害的众多种类。

3.4 微生物多样性 Microbial diversity

微生物种群多样性，主要体现于微生物系统分类、物种数量、物种构成等。

3.5 代谢指纹技术 Metabolic fingerprinting techniques

基于不同底物诱导下的代谢响应模式，测算环境样本中微生物群落代谢功能多样性的一种方法，可应用 BIOLOG 板检测。BIOLOG 板上小孔中分别装有不同的碳源和四唑类显色物质，微生物群落可以利用不同种类的碳源进行代谢，以代谢过程产生的自由电子与四唑类显色物质发生颜色反应的吸光度差异为基础，表示微生物对碳源的利用程度。

4 工作程序

湖库沉积物微生物多样性工作程序宜包括采样点布设、样本采集、样品保存与转运、样品监测与分析，流程如图 1 所示。



图 1 湖库沉积物微生物多样性工作程序

5 采样点布设

5.1 采样区域宜通过文献调研和现场踏勘等方式，按研究区域概况、湖库基本信息确定。

5.2 采样区域内，采样点选择应符合下列规定：

- a) 湖泊和水库入口和出口，应采集大坝岸和中间位置；
- b) 采集样品应按周边环境确定，宜采集湖泊和水库距工厂和农业地区较近的岸边；
- c) 取样点可根据深度选择；

d) 以上点位确定后, 可在湖库示意图上稀疏的地方适当增加点位, 点位在湖库布点宜均匀。

6 样本采集

样本采样宜符合下列规定:

a) 采样前, 使用防水记录笔对无菌聚乙烯自封袋编号, 对冰箱提前预冷; 并检查采样仪器完整性; 将盛放采集样品的密封袋使用紫外灯杀毒灭菌;

b) 将准备好的材料器材搬运到船只上, 根据定位仪确定的经纬度信息在已确定的采样地点采样;

c) 采样的同时应对周围环境拍照; 使用米尺测量采样点处水深并记录, 选择抓斗式滤水采泥器、彼得逊抓斗式采泥器、分层箱式采泥器、重力柱状采泥器等湖库沉积物采样器采集沉积物, 采样器见附录 A, 将采集的沉积物放进已经标记好的无菌聚乙烯自封袋后封存;

d) 对采集点照片、采样点地点、样品编号、采样深度、采样日期、采样信息、采样数量和水体深度记录并保存, 采样信息登记表见附录 B。

7 转运与保存

7.1 微生物形态学及代谢活性分析样品转运及储存

7.1.1 分装后的沉积物样品, 应存放至温度 0℃ 的便携式冰箱或干冰转运。

7.1.2 沉积物样品应储存于-20℃ 的低温冰箱中。

7.2 微生物种群结构样品转运及储存

7.2.1 分装后的样品, 应存放至温度 0℃ 的便携式冰箱或干冰转运。

7.2.2 沉积物样品应储存于液氮或-80℃ 超低温冰箱中。

8 监测与分析

8.1 微生物形态学分析

8.1.1 分析项目

微生物形态特征宜包括细胞形状、大小、颜色、细胞壁结构等。宜使用高分辨率显微镜观察微生物细胞和胞内含物、鞭毛或胞外结构等结构细节。应观察不同染料标记的微生物探针在显微镜下的颜色, 保存不同微生物的染色图像及其叠加图, 描述沉积物样品中微生物的形态、结构和数量以及在样品中的相对位置。

8.1.2 分析流程

8.1.2.1 沉积物微生物形态学分析前处理方法可参照附录 C。

8.1.2.2 沉积物微生物形态学分析流程如图 2 所示。将制好的样品倒放在激光共聚焦显微镜

载物台上，根据标记探针引物的特性在电脑上设置相应参数，调节焦平面，在显微镜下清晰观察样品，依次设置激光通道、物镜放大倍数、激光强度、图像分辨率、增益和负背景，并将结果显示到电脑软件上成像。

8.1.2.3 观察目镜下微生物染色情况时，应包括染色区域、位置以及对应的染料，根据实验要求可观察一种或多种微生物分布情况，通过调节物镜倍数还可观察到微生物形态结构，输出图像。

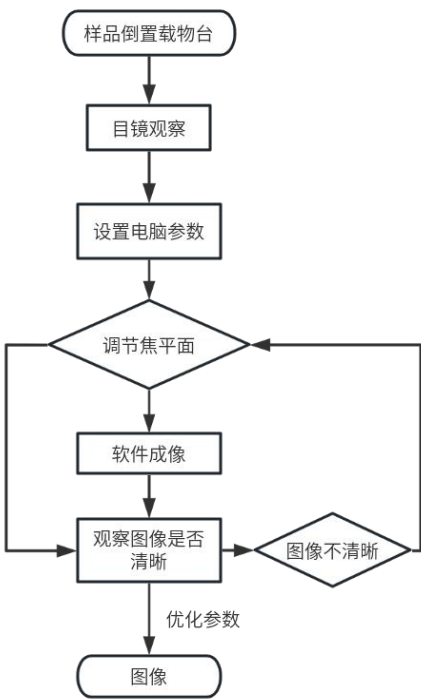


图 2 沉积物微生物形态学分析流程图

8.1.3 数据处理与分析

数据处理与分析时，应将显微镜观察获得的图像导入 AutoQuant 图像处理软件，选择 slice viewer 查看共聚焦仪器软件下的参数信息，设置不同通道参数，点击 apply，点击 3D 反卷积，设置参数，选择 Adaptive PSF，然后点击 all 进行校准，其他应按默认，开始反卷积，反卷积完成，查看图像，可进一步对每个通道图像调整，将优化的图像保存为 lsm 格式。

8.2 微生物代谢活性分析

8.2.1 分析项目

微生物代谢活性测定宜采用代谢指纹技术。

8.2.2 测定流程

8.2.2.1 前处理

前处理时，应取湿重为 1 g 新鲜沉积物用 9 mL 无菌 0.05 M 磷酸缓冲液稀释，经暗培养振荡培养 30 min 后，在超净工作台对暗培养液进行梯度稀释，随后将稀释后沉积物样本转移至灭菌水槽中，通过移液枪转接到微生态板。

8.2.2.2 代谢指纹技术测定流程

代谢指纹技术测定流程如图 3 所示。应使用电子移液枪将悬浮液接种至 BIOLOG 板后，在暗培养箱培养 240 h。间隔 12 或 24 h，应用 BIOLOG 系统的微平板读数器，测定 BIOLOG 板在 590 nm 及 720 nm 波长下的光密度值（optical density，OD 值），完成数据的采集、存储与导出。

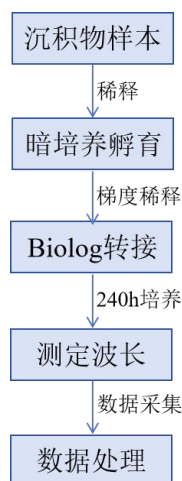


图 3 代谢指纹技术测定流程

8.2.3 数据处理与分析

数据处理与分析时，应计算 BIOLOG 每孔平均颜色变化率用于评估微生物碳源代谢活性，并计算香农（Shannon）指数和辛普森（Simpson）指数评估微生物群落功能丰富度及评估微生物群落功能优势度指数。宜采用下列公式计算：

a) 平均吸光度（AWCD）可表征微生物群落对碳源利用的总能力，宜采用下式计算：

$$AWCD = \frac{\sum (A_i - A_{A1})}{95}$$

式中：

A_i —第 i 孔的相对吸光度；

A_{A1} —A1 孔的相对吸光度。

b) Shannon 指数 H' 用于评估微生物群落功能的丰富度，宜采用下式计算：

$$H' = -\sum P_i \cdot \ln(P_i)$$

式中：

P_i —第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

c) Simpson 指数 D 用于评估微生物群落功能优势度指数，宜采用下式计算：

$$D = 1 - \sum \frac{A_i (A_i - 1)}{N(N-1)}$$

式中：

A_i —第 i 孔的相对吸光度；

N —相对吸光值总和。

8.3 微生物功能与种群结构分析

8.3.1 分析项目

8.3.1.1 高通量测序

高通量测序时，应识别沉积物中微生物群落组成，评估微生物种群丰富度和均匀度。

8.3.1.1 宏基因测序

宏基因测序时，应解析沉积物中微生物群落丰度和群落组成，鉴定沉积物中微生物基因组成及功能、相关代谢通路。

8.3.2 测定流程

8.3.2.1 DNA 提取

沉积物样品宜开展 DNA 提取。DNA 提取方法可参照附录 D。

8.3.2.2 高通量测序

高通量测序流程如图 4 所示。并按下列步骤执行：

a) 荧光定量。选择所需功能基因条带对提取 DNA 进行荧光定量 qPCR 分析。每个样本重复 3 次。将 PCR 产物用荧光定量系统检测定量，之后按每个样本测序量要求，进行相应比例混合。

b) Illumina 文库构建。通过 PCR 将 Illumina 接头序列添加至目标区域外端，使用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物；Tris-HCl 缓冲液洗脱，2%琼脂糖电泳检测；氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。

c) Illumina 测序。以 DNA 片段为模版、碱基序列为引物合成目标待测 DNA 片段，使芯片上 DNA 片段的另一端随机与附近的另外一个引物互补形成“桥”。PCR 扩增产生 DNA 簇并线性化为单链，加入 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应聚合的核苷酸种类。重复操作，统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段序列。

d) 物种注释与评估。Illumina 测序得到的 PE reads 根据 overlap 关系拼接，同时对序列质量进行质控和过滤，区分样本后进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析。选出与 OTU 代表序列相似性在 99%以上的序列，生成 OTU 表格。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 99%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析，并分别在分类学水平统计样本的群落物种组成。



图 4 高通量测序流程

8.3.2.3 宏基因组测序

宏基因组测序流程如图 5 所示。并按下列步骤执行：

a) 基因组 DNA 提取与片段化。完成基因组 DNA 抽提后，利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。将基因组 DNA 片段化为 350 bp。

b) 构建 PE 文库。连接“Y”字形接头；使用磁珠筛选去除接头自连片段；利用 PCR 扩增进行文库模板富集；氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。

c) 桥式 PCR。DNA 片段的一端与引物碱基互补，固定在芯片上；另一端随机与附近的另外一个引物互补，固定形成“桥”；PCR 扩增，产生 DNA 簇；DNA 扩增子线性化成为单链。

d) Illumina 测序。加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，每次循环只合成一个碱基；用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应聚合上去的核苷酸种类；重复操作，统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段的序列。

e) 物种与功能注释。数据分析从下机原始序列开始，对原始序列进行拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理。然后使用优化序列进行拼接组装和基因预测，对得到的基因进行 NR，eggNOG，KEGG 等物种和功能注释以及分类。对数据库选择可参照附录 E。使用 DIAMOND 软件 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/>) 将非冗余基因集与 NR 数据库 BLASTP 比对，并通过 NR 数据库对应的分类学信息数据库获得物种注释，然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种丰度，并在域 (Domain)、界 (Kingdom)、门 (Phylum)、纲 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、种 (Species) 分类学水平上统计物种在样品中的丰度，构建相应分类学水平上的丰度谱 (abundance profile)。使用 DIAMOND 软件 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/diamond/>) 将非冗余基因集序列与 COG 数据库进行 BLASTP 比对，获得基因对应的直系同源蛋白簇 (COG, Clusters of orthologous groups of proteins)，然后使用 COG 对应的基因丰度总和计算该 COG 的丰度。



图 5 宏基因组测序流程

8.3.3 数据处理与分析

对统计得到的物种群落组成，宜采用乔伊（Chao1）、基于丰度的覆盖估计值（ACE）、香农（Shannon）和辛普森（Simpson）指数反映沉积物微生物种群多样性和丰富度。宜按下列公式计算：

a) Chao1 指数分析宜按下式计算：

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1-1)}{2(n_2+1)}$$

式中：

S_{chao1} —估计的物种数；

S_{obs} —实际观察到的物种数；

n_1 —只含有一条序列的物种数；

n_2 —只含有两条序列的物种数。

b) ACE 指数宜用来估计群落中物种数目的指数，宜按下列公式计算：

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_i}{C_{ACE}} R_{ACE}^2 \quad r_{ACE} < 0.08$$

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_i}{C_{ACE}} r_{ACE}^2 \quad r_{ACE} \geq 0.08$$

其中，

$$N_{rare} = \sum_{i=1}^{abund} i n_i$$

$$C_{ACE} = 1 - \frac{n_1}{N_{rare}}$$

$$R_{ACE}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{abund} i(i-1)n_i}{C_{ACE} N_{rare} (N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

$$r_{ACE}^2 = \max \left[r_{ACE}^2 \left\{ 1 + \frac{N_{rare} (1 - C_{ACE}) \sum_{i=1}^{abund} i(i-1)n_i}{N_{rare} (N_{rare} - C_{ACE})} \right\}, 0 \right]$$

式中：

n_i —含有 i 条序列的物种数；

S_{rare} —含有或少于 $abund$ 条序列的物种数；

S_{abund} —多于 $abund$ 条序列的物种数；

$abund$ —优势物种的序列数阈值，默认 10。

c) Shannon 指数宜用来估算样本中微生物多样性指数之一，与群落多样性成正比，宜按下式计算：

$$H_{Shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中：

S_{obs} —实际观察到的物种数；

n_i —第 i 个物种数所含的序列数；

N —所有的序列数。

d) Simpson 指数宜用来估算样本中微生物多样性的指数，与群落多样性成反比，宜按下式计算：

$$D_{Simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

式中：

S_{obs} —实际观察到的物种数；

n_i —第 i 个物种所包含的序列数；

N —所有的序列数。

9 监测报告

完成检测与分析项目后，宜按表 1 填写监测报告。

表 1 监测报告

采样点 名称	采样点 深度/m	微生物代谢活性分析			微生物功能与种群结构分析						
		平均吸光度 <i>AWCD</i>	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	优势物种 1	优势物种 2	优势物种 3
采样点 1											
采样点 2											
采样点 3											

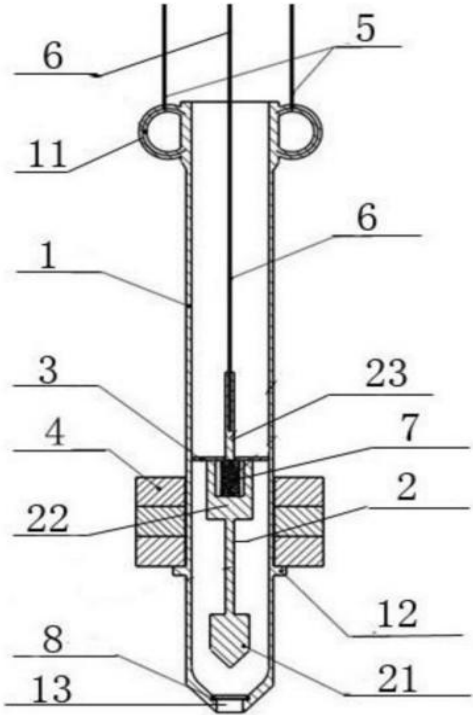
附录 A
(资料性)
湖库沉积物采样器

采样器	采集沉积物深度	特点	操作方法	示意图
彼得森抓斗式采泥器	0~5 cm	优点：操作简便； 缺点：不能滤去采集到的多余的水分；只能采集表层的沉积物；对沉积物有扰动。	1、野外工作时，首先把取样抓斗和绳子拉好； 2、将取样抓斗打开，再打开的同时，将挂钩扣上，取样抓斗就不会紧闭； 3、通过绳子慢慢大奖采样器放入水中，当到河底时，轻松一下绳子、抓泥斗脱钩； 4、用力拉起取样抓斗，抓斗自动关闭，在关闭的同时会将河底污泥采入取样抓斗中；然后上提得到沉积物样品。	
抓斗滤水式式采泥器	0~5 cm	优点：可去除采集沉积物是过多的水分；操作简便； 缺点：只能采集到表层的沉积物；对沉积物有扰动。	1、将直径 10-12 mm 的提升用缆绳系在脱钩器一端的卸扣上，用脱钩器上的钩勾住连杆交接件顶部扣件，提起绳子，此时采泥器展开； 2、将采泥器展开放入水中，让其自然下沉，等沉到水底，抖动绳子，让挂钩松开勾住的钢丝绳； 3、双手往上提采样绳子，此时采泥器开口闭合，将采泥器提出水面放入备用的盆中，提起两侧的拉杆张开采泥器，倒出泥样，用自封袋收集泥样。	

湖库沉积物采样器（续）

分层箱式采泥器	0~2 cm	优点：对沉积物原样扰动小；采样量少； 缺点：操作较为繁琐，只能采取表层沉积物。	1、将绳子系在挂钩的另一端孔，然后将挂钩勾住两边的钢丝绳，用双手提起采泥器，此时采泥器展开； 2、将采泥器展开放入水中，让其自然下沉，等沉到水底，抖动下绳子，让挂钩松开勾住的钢丝绳； 3、双手提采样绳子，此时采泥器活页将关闭，将采泥器提出水面，提起两侧的钢丝绳，把泥样倒出来，收集泥样。	
重力柱状采泥器	可采取任意深度采集器	优点：可采集多层沉积物，操作简便； 缺点：对沉积物的扰动比较大。	1、当取样器进入水中时，透明树脂玻璃管顶端的塑料阀门打开，确保水自由流过取样器管； 2、柱状采泥器可通过用手推或者自身重力插入采样底部； 3、当采到所需的样品时，将取样器从沉积物中取出，在上升过程中，取样器顶端的阀门会由于水压的作用而关闭。向上移动产生一个真空作用，使得样品保留在管中而不会损失； 4、当取样器从水中取出后，通过一个活塞将样品取出进行分析； 5、使用完毕，请清洗后装入仪器箱和便携包。	

湖库沉积物采样器（续）

沉积物采集器	可采取任意深度采集器	优点：可根据需求采集不同深度的沉积物，对沉积物的扰动比较小； 缺点：操作较为繁琐。	1、依据需求将一定数量的配重 4 安装于采样器筒体 1 上的配重座 12 上； 2、依次放入采样器阀体 2、弹簧 7 和限位件 3、本实施例中限位件 3 优选为弹簧片，并将弹簧片和采样器筒体 1 紧固连接，比如通过侧向螺钉连接弹簧片和筒体 1； 3、将升降拉绳 5 与耳状环 11 连接，将开闭拉绳 6 与采样器阀体 2 的导向杆 23 连接； 4、拉紧开闭拉绳 6，将采样器放入水中，并缓缓下降至采样器不再继续下降，在采样器重力作用下，湖库水底泥水界面处的水和泥进入采样器中，完成采样过程； 5、松开开闭拉绳 6，向上提升降拉绳 5，采样器阀体 2 在自身重力和弹簧 7 的作用下闭合阀口 13，通过升降拉绳 5 将采样器缓缓提出水面，完成采样过程。	
--------	------------	---	---	--

附录 B
(资料性)
湖库沉积物采样信息登记表

采样湖库名称:				采样日期:		采样当日天气及气温:					
采样点名称	采样经度	采样纬度	采样点深度	采样点	采样指标 1	采样指标 2	采样指标 3	采样指标 4	采样指标 5	采样指标 6	采样指标 7

附录 C

(资料性)

沉积物微生物形态学分析前处理方法

1. 将载玻片置于盐酸乙醇溶液中浸泡清洗 30 min, 取出在空气中晾干;
2. 将晾干后的载玻片放入 0.01% 的多聚赖氨酸溶液中浸泡 5 min, 取出后放入 60℃ 的烘箱烘干或者室温过夜晾干, 这一步会使载玻片表面带有正电荷的赖氨酸涂层;
3. 定量吸取 1 mL 饱和含氧水孵育 15 天之后的表层 2 cm 新鲜的湖库沉积物, 加入 3 mL 质量分数为 4% 多聚甲醛溶液, 轻轻混匀后置于 4℃ 冰箱固定 3 h 以上或者过夜;
4. 多聚甲醛固定之后将样本在 6000 r/min 的条件下离心 2 min, 移去上清液;
5. 加入 3 mL 磷酸盐缓冲溶液(1xPBS)重悬沉积物, 在 6000 g 的条件下离心 2 min, 移去上清液, 此步重复操作 3 次以尽量洗去多余的多聚甲醛溶液;
6. 加入 1 mL 无水乙醇/1xPBS(v/v=1:1)混合溶液重悬沉积物, 随后放入 -20℃ 冰箱保存备用;
7. 取 3 μ L 固定后沉积物样品涂在预处理后的载玻片上并展开, 在 46℃ 烘箱烘干使得样本粘附在载玻片上;
8. 随后将附着有样本的载玻片依次浸入 50%、80%、96% 的乙醇溶液, 每个梯度浸没 3 min, 最后于空气中自然晾干;
9. 将探针用无菌水配置成浓度为 10 μ mol/L 并分装, FISH 杂交前取分装好的探针溶液与 FISH 杂交缓冲液按体积比 1:9 混合, 使得探针的终浓度为 1 μ mol/L, 用锡箔纸包好放入 46℃ 水浴锅中预热数分钟;
10. 将预热后的探针完全覆盖载玻片上的样本, 并将载玻片迅速转移到杂交管, 在 46℃ 下杂交 2-3 小时 (黑暗潮湿中进行);
11. 提前将 FISH 洗脱缓冲液预热到 48℃;
12. 待 FISH 杂交完成后, 将载玻片快速放入 48℃ 预热后的洗脱缓冲液中, 放入 48℃ 黑暗恒温烘箱中洗脱 30 min。最后在暗处用 4℃ 超纯水洗掉载玻片上多余盐分, 并自然风干;
13. 将上一步风干后的载玻片用 DAPI 覆盖样本, 在 4℃ 暗处染色 15 min, 染色结束后用 4℃ 超纯水洗掉多余的 DAPI, 暗室自然风干;
14. 待样本自然风干后, 用适量封片剂覆盖样本并盖上盖玻片。最后使用激光共聚焦显微镜成像观察。

附录 D

(资料性)

沉积物 DNA 提取方法

自备仪器和材料：水浴锅、小型高速离心机（最大离心力不小于 $12,000 \times g$ ）、1.5 mL 离心管、75%乙醇、无水乙醇、RNase A (10 mg/mL)、氯仿等。

1. 称取 100~300 mg 的土壤，加入 400 μ L 65°C 预热的 Buffer SCL，震荡混匀，置于 65°C 水浴 5 min。

注：每次使用前请检查 Buffer SCL 是否出现沉淀，如有沉淀，于 65°C 溶解后使用。提前将水浴锅调至 65°C 备用。

震荡混匀时一定要将管底的土壤震荡起来。样品较多时可适当延长水浴时间。

如需得到无 RNA 的 DNA，可在水浴后加入 20 μ L 的 RNase A (10 mg/mL)，室温放置 2~5 min。

2. 12,000 rpm 室温离心 3 min。吸取上清至一个干净的 1.5 mL 的离心管中。

3. 加入等体积 Buffer SP，颠倒混匀，冰浴 10 min。

4. 12,000 rpm 室温离心 3 min。吸取上清至一个干净的 1.5 mL 的离心管中。

5. 加入 200 μ L 氯仿，充分混匀，12,000 rpm 离心 5 min。吸取上层水相至一个干净的 1.5 mL 的离心管中。

6. 加入 2 倍体积无水乙醇，颠倒 5~8 次使之充分混匀，室温放置 2~3 min。室温 10000 rpm 离心 5 min，弃上清。

7. 加入 1 mL 75%乙醇，颠倒漂洗 1~3 min，10,000 rpm 离心 2 min，弃上清。

8. 重复步骤 7 一次。

9. 开盖室温倒置 5~10 min 至残留的乙醇完全挥发。

10. 得到的 DNA 用 50~100 μ L TE Buffer (TE Buffer 为 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解。提取的 DNA 可立即进行下一步实验或 -80°C 保存。

附录 E

(资料性)

微生物种群及功能注释对照数据库及其特点

数据库名称	数据库特点
NR (Non-Redundant Protein Database)	NR 数据库是一个非冗余蛋白质的氨基酸序列数据库，由 NCBI 创建并维护，其特点在于内容比较全面，同时注释结果中会包含有物种信息，可作物种分类用。
COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins)	COG 数据库是 NCBI 开发的用于同源蛋白注释的数据库，是将细菌、藻类和真核生物的 21 个完整基因组的编码蛋白，根据系统进化关系分类构建而成。通过鉴定蛋白与数据库的比对，可以很好的预测蛋白质的功能。
eggNOG (Evolutionary Genealogy of Genes: Non-supervised Orthologous Groups Database)	eggNOG 数据库是 NCBI 的 COG 数据库的扩展，它收集了更全面的物种和更大量的蛋白序列数据。同样进行了同源基因聚类分析和对每个同源基因类的描述和功能分类。
CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes Database)	CAZy 数据库是关于能够合成或者分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类的一个数据库资源，其基于蛋白质结构域中的氨基酸序列相似性，将碳水化合物活性酶类归入不同蛋白质家族。CAZy 数据库中包含了碳水化合物酶类的物种来源、酶功能 EC 分类、基因序列、蛋白质序列及其结构等信息。
KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	KEGG 数据库是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库。KEGG 数据库能够把从完整测序的基因组中得到的基因目录与更高级别的细胞、物种和生态系统水平的系统功能关联起来。
CARD (The Comprehensive Antibiotic Research Database)	CARD 数据库是抗性基因数据库，能够关联抗生素模块及其目标、抗性机制、基因变异等信息。