



中华人民共和国国家标准

GB/T 30744—2014

GB/T 30744—2014

深海微生物样品前处理技术规范

The technology specification for the pre-treatment of deep-sea microorganism samples

中华人民共和国
国家标准
深海微生物样品前处理技术规范
GB/T 30744—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 2.5 字数 66 千字
2014年8月第一版 2014年8月第一次印刷

*

书号: 155066·1-49750 定价 36.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 30744-2014

2014-06-09 发布

2014-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	1
4 试剂和材料	2
5 仪器与设备	5
6 一般规定	6
7 样品现场处理	6
8 深海微生物菌种分离	8
9 深海微生物基因组 DNA 提取	10
10 深海微生物宏基因组 DNA 提取	12
11 深海生物样品及微生物资源保存	13
附录 A (资料性附录) 深海微生物样品前处理记录表格式	22
附录 B (资料性附录) 耐压菌株分离	28
附录 C (资料性附录) 微生物菌种分子鉴定	29
附录 D (资料性附录) 宏基因组 Cosmid 文库构建	32
表 A.1 深海样品采样记录表	22
表 A.2 深海微生物分离鉴定记录表	22
表 A.3 深海微生物基因组 DNA 提取记录表	23
表 A.4 深海样品宏基因组 DNA 提取记录表	23
表 A.5 深海样品保藏记录表	24
表 A.6 深海细菌保藏记录表	24
表 A.7 深海放线菌保藏记录表	25
表 A.8 深海真菌保藏记录表	26
表 A.9 深海样品宏基因组 DNA 文库记录表	27
表 C.1 16S rRNA 基因通用引物的适用范围	29

EPI 100-T1(D.4)进行转染,37 ℃水浴 20 min。

D.12.2 立即将已经转染了噬菌体的 *E.coli* EPI 100-T1 涂布到含 Amp 的 LB 固体培养基平板上,37 ℃培养至菌落长出后将培养基平板于 4 ℃保藏。

D.12.3 向 100 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中加入 23 mL 甘油溶液,分装至 96 孔板中,将培养基平板上的克隆从平板上随机挑取到无菌 96 孔板中,并适当标记,于 37℃ 培养至菌长出后将 96 孔板直接保藏于-80 ℃中。

吸取 200 μL~500 μL 新配制的含 Amp 的 LB 液体培养基加入平板,用涂布棒将菌株全部刮下,所得的混合菌液为放大的环境样品 Cosmid DNA 文库。按每管 100 μL 分装于小离心管中,于-80 ℃保存。

f) *E.coli* EPI 100-T1。

D.8 连接

D.8.1 在小离心管中加入 2 μL 10 \times Fast-link 连接缓冲液, 1 μL 10 mM 的 ATP 溶液, 1 μL pWEB::TNC 载体, 2 μg 制备好的 DNA 片段和 1 μL Fast-link DNA 连接酶, 用无菌双蒸水补足体积至 20 μL , 混匀后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h 进行连接。

D.8.2 连接完成后将产物转移至 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 10 min, 立刻进行体外包装。如无法立刻进行包装, 可将连接混合物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏, 但保藏期限不应超过 7 d。

D.9 体外包装

D.9.1 取出保藏于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的包装蛋白 (50 μL /管), 在冰上融化后立刻取出 25 μL 分装至另一新离心管中, 将两管分装后的包装蛋白置于冰上, 在其中一管包装蛋白 (25 μL) 中加入 10 μL 已连接好的 Cosmid DNA 连接产物 (D.2), 混匀包装混合物, 1 000 r/min 离心 2 min 收集所有混合物。

D.9.2 将反应物于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 90 min, 加入另一半已融化的在冰上保藏的 25 μL 包装蛋白, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温浴 90 min。

D.9.3 反应结束后, 加入 500 μL 噬菌体稀释液, 混匀, 加入 25 μL 氯仿, 混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏。

D.10 感受态细胞制备

D.10.1 将 *E.coli* EPI 100-T1 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 接种到新配制的 LB 固体培养基上进行划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌落生成, 挑取单克隆, 接种到添加了 12.3 mg MgSO_4 的 5 mL 新配制 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 振荡培养 12 h。

D.10.2 按体积分数为 1% 的比例将 D.10.1 中的培养液接种入新配制的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 振荡培养至 600 nm 处的 OD 值为 0.8~1.0。

D.11 文库评估

D.11.1 取 10 μL 保藏于噬菌体稀释液中已包装好的 Cosmid 质粒 (D.3), 用噬菌体稀释液进行 1 倍~10 倍梯度稀释, 取 10 μL 未经稀释和 1 倍~10 倍梯度稀释的已包装好的 Cosmid 质粒, 分别加入 100 μL 预先制备好的包装宿主菌 *E.coli* EPI 100-T1 (D.4), 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。

D.11.2 立即将已转染了噬菌体的 *E.coli* EPI 100-T1 涂布到含 Amp 的 LB 固体培养基平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。

D.11.3 分别计算各个培养基平板上的克隆数, 按式 (D.1) 计算噬菌体包装蛋白包装效价。

D.11.4 根据式 (D.1) 计算结果, 按式 (D.2) 计算 Cosmid DNA 文库中全部克隆的数目。

D.11.5 随机挑取 20 个克隆, 接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 振荡培养过夜后提取质粒。

D.11.6 根据 pWEB::TNC Cosmid 载体上的酶切位点, 选择 *Bam*H I 对质粒进行完全酶切, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 以 $\lambda\text{DNA}/\text{EcoR}$ I + *Hind* III 为分子量标准, 检测所构建文库的多样性。

D.12 文库保藏

D.12.1 根据式 (D.1) 计算的结果, 选择合适的稀释梯度, 分批次对预先制备好的包装宿主菌 *E.coli*

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家海洋局提出。

本标准由全国海洋标准化技术委员会 (SAC/TC 283) 归口。

本标准起草单位: 国家海洋局第三海洋研究所。

本标准主要起草人: 曾润颖、邵宗泽、叶德赞、陈新华、林荣澄、孙凤芹、徐丽美、盖英宝。