华大智造 MGI

华大智造MGISP自动化系统搭配DNBSEQ平台赋能环境DNA检测

ATOPlex技术平台适配MGISP-960及DNBSEQ-E25 & DNBSEQ-G99在鱼类物种多样性检测中的应用

华大智造基于ATOPlex技术开发了环境DNA宏条形码测序组合产品。本研究通过对模拟鱼类群落样本和真实环境样本的双重验证发现：此组合产品可对自然环境水体中的鱼类生态群落进行准确物种鉴定和动态监测。

推荐应用: 鱼类生态学，环境DNA

推荐机型: DNBSEQ-E25RS, DNBSEQ-G99ARS(测序仪)
MGISP-NE32RS(自动化核酸提取系统)
MGISP-960RS，MGISP-100RS(自动化样本制备系统)

- **ATOPlex技术可全面赋能鱼类生态学研究**

  华大智造独有的ATOPlex多重PCR技术平台可满足不同环境DNA (eDNA)的检测需求。可检测环境中的微量DNA，检测灵敏度高，利于监测珍稀物种与早期入侵物种。

- **自动化系统可高度匹配核酸提取与建库全流程**

  MGISP自动化系列如MGISP-NE32、MGISP-960以及MGISP-100可准确、稳定、高效地完成核酸提取、文库构建全流程工作，并保证文库样本的均一性和准确性。

- **测序数据产出高效且质量高**

  DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率以及低标签跳跃等重要特性；DNBSEQ-E25小巧轻便，20h内即可完成PE150测序；DNBSEQ-G99满负荷PE150仅需12 h, PE300仅需30 h，数据产出高效且优质。

- **超快速的全流程方案**

  华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品涵盖核酸提取与文库构建试剂盒、自动化系统、DNBSEQ测序平台以及MetaSIS生信分析软件，从DNA提取到生信分析全流程最快仅需3天。相较传统形态学鉴定，具有不损伤生物机体且不受目标物种生命时期限制等优势，全方位赋能鱼类生态学研究。

背景介绍

环境DNA(eDNA)测序是一种快速兴起的研究生物多样性和监测生态系统变化的方法。当生物体与周围环境互动时，生物体上的DNA以血液、组织、黏液、细胞、鳞片等形式不断流入周围环境，形成eDNA[1]。每个生物都有一个与之相关的独特DNA序列或条形码，被称为宏条形码(Metabarcoding)。该DNA条形码介于保守基因组区域之间的高度可变区域，可以用于生物多样性评估[2]，常见条形码包括原核16S核糖体DNA(用于细菌和古菌)、真核18S核糖体DNA(用于各种真核生物，如植物、原生生物和真菌)、真核ITS核糖体DNA(用于真菌)、线粒体COI基因(用于各种真核生物，如动物和原生生物)和线粒体12S rDNA(用于鱼类)[3,4]。eDNA宏条形码技术可以利用Polymerase Chain Reaction (PCR) 扩增出这些特定的条形码区域，并进行大规模并行测序(Massively Parallel Sequencing, MPS)以获得生物多样性的全面视图[4]。

通过eDNA的分析，人们可以在不破坏生态系统的情况下获得目标物种的信息[5]。相比于传统形态学监测方法，如水下目视和捕捞法[6]，eDNA是一种非入侵式的检测方法，且对鉴定人员的专业要求低[7]。因此，eDNA 测序可说是一个既高效灵敏又相对简便的解决方案，使其成为水生生物监测最有前景的工具[8]。

近年来，随着鱼类物种入侵、更多稀有物种受到威胁[9]，全球淡水和海洋生态也面临着巨大挑战，使得eDNA适合作为鱼类生物学各个领域的非侵入性基因监测工具[6,10]。通过研究的不断推进，目前已经筛选出了一些物种识别率较高、对应引物扩增能力较强的优质片段，其中MiFish为来自鱼类线粒体12S rRNA基因的短片段，扩增长度约为170 bp[11]，可检测鱼类数目高达几百种。

因此，本研究利用MiFish(171bp)和12S(385bp)两种条形码来完成鱼类群落结构的快速准确分析。华大智造提供了在eDNA鱼类多样性检测方面的全套组合产品，涵盖自动化提取、自动化建库、测序到生信分析全流程。其中，MGISP-NE32全自动核酸提取纯化仪可采用磁棒吸附转移核酸提取纯化的方式完成核酸提取，搭配的MGISP-100以及MGISP-960自动化样本制备系统，拥有自动化流程设计以及标准化生产模式，可以有效防止污染，快速、稳定、高效地完成文库构建等实验操作。DNBSEQ-E25基因测序仪采用独有的自发光测序技术，无需外界激发光源，即可产生自发光信号，搭配的微流控测序载片集成了CMOS模块，可实现碱基序列的快速读取。由于其独特技术的展现，使得DNBSEQ-E25不仅能够在普通实验室环境下高效助力多领域研究，亦可适用于如机场、海关、野外科考等特殊移动场景，满足多层次、多领域、多场景的测序需求。DNBSEQ-G99作为目前全球中小通量测序仪中速度最快的机型之一,基于华大智造核心的DNBSEQ™测序技术，短时间内即可产出优质高效数据，亦可满足环境DNA (eDNA)领域研究需求。

华大智造为水生生态环境12S鱼类生物多样性监测提供了一套完整的端到端实验流程。该实验流程包括：1)使用MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒搭配MGISP-NE32进行DNA提取；2)使用ATOPlex文库制备试剂盒搭配MGISP-100或MGISP-960进行文库制备；3)在DNBSEQ-G99和DNBSEQ-E25平台上进行DNA测序；4)在宏条形码物种识别软件MetaSIS上进行生物信息学分析。

为了评估验证华大智造MiFish和Ac12S两种条形码引物在鱼类多样性监测领域的可行性和真实效果，本研究使用了模拟鱼类群落和真实淡水样本进行评估，通过进行样本提取至生信分析全流程，实现鱼类物种鉴定及多样性的动态监测。

实验方法

样本采集与核酸提取

(1) 模拟鱼类群落样本制备

本研究使用的鱼肌肉组织由合作单位提供，使用MGIEasy基因组DNA提取试剂盒(磁珠法)从10-20 mg鱼肌肉组织中提取DNA，具体步骤可参考动物组织样本方案。提取的DNA使用荧光法(Qubit 荧光定量，ThermoFisher)进行定量，并根据260nm和280nm吸光比(A260/280)测定纯度(NanoDrop微量分光光度计仪器，ThermoFisher)。后使用表1中所示的引物对每种鱼的全长线粒体12S rDNA进行PCR扩增和定量。线粒体12S rDNA产物按指定比例混合，形成三种鱼类线粒体12S rDNA的模拟群落。模拟鱼类群落中的鱼种类(5种海水鱼类+5种淡水鱼类)和丰度如表2所示。

(2)真实环境样本DNA提取

环境水样均来自武汉东湖，每个样本的采样体积为0.6~5L，选用真空抽滤机（富集后的滤膜-20°C保存，也可加入DNA保存试剂延长滤膜保存时间）或eDNA专业采样设备（富集后的滤膜耗材自干燥常温保存）对水体进行采集或富集。所有滤膜样本均卷成滚筒状转移到5mL离心管中7天内完成DNA提取。

随后使用MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒提取滤膜上的DNA，按照该试剂盒针对水体DNA样本的流程进行操作。此方法为磁珠法提取，提取完成后测定产物的浓度与纯度，并通过电泳检测片段完整性。其中磁珠结合，纯化清洗，PB洗脱过程在MGISP-NE32上进行。本次测试还平行进行了全流程手工提取以评估自动化提取方案的可行性。

引物名称	序列 (5′ → 3′)	预期扩增子长度 (bp)
MiFishU-Forward	GTCGGTAAAWCTCGTGCCAGC	670-740
AcMDB-Reverse	GTACACTTACCATGTTACGACTT	

表 1. 用于扩增鱼类全长线粒体12S rDNA 的PCR 引物[12]

编号	目(Order)	科(Family)	种(Species)	生活环境	理论丰度-1	理论丰度-2	理论丰度-3
1	*Perciformes*	*Sparidae*	*Acanthopagrus schlegelii*	海洋	15.16%	3.79%	1.94%
7	*Cypriniformes*	*Cyprinidae*	*Carassius cuvieri*	淡水	2.61%	21.00%	17.19%
9	*Anabantiformes*	*Channidae*	*Channa maculata*	淡水	6.14%	14.73%	15.92%
6	*Cypriniformes*	*Xenocyprididae*	*Ctenopharyngodon idella*	淡水	10.03%	10.32%	13.03%
8	*Cypriniformes*	*Cyprinidae*	*Hypophthalmichthys nobilis*	淡水	4.67%	11.47%	9.88%
2	*Acanthuriformes*	*Sciaenidae*	*Larimichthys crocea*	海洋	16.04%	4.01%	2.01%
3	*Perciformes*	*Lateolabracidae*	*Lateolabrax maculatus*	海洋	16.88%	4.24%	6.13%
10	*Cichliformes*	*Cichlidae*	*Oreochromis niloticus*	淡水	4.54%	18.49%	15.98%
4	*Acanthuriformes*	*Sciaenidae*	*Sciaenops ocellatus*	海洋	11.90%	3.97%	5.95%
5	*Scorpaeniformes*	*Scorpaenidae*	*Sebastiscus marmoratus*	海洋	12.02%	7.99%	11.97%

表2. 用于构建模拟鱼类群落的10种鱼类和丰度列表

建库与测序

本研究中真实样本的文库投入量均为50ng(推荐投入量为50~100ng),模拟样本的文库投入量均为1ng，使用ATOPlex MiFish/Ac12S mtDNA建库试剂盒套装构建。文库构建包含两步PCR和两步纯化，其中第一步PCR使用ATOPlex MiFish或Ac12S mtDNA引物池扩增目的片段，循环数为30，具体流程可参考相关说明书。以上步骤在MGISP-960或MGISP-100上均有相应的脚本可以适配完成，由于本组合产品涉及了多种引物类型，不同引物PCR反应条件不同，手工进行PCR反应液的配制和PCR过程能极大地提高使用灵活度，因此本实验中MGISP-960仅参与PCR产物纯化过程，MGISP-100可适配MiFish建库全流程。此外，本次测试还平行进行了手工建库以评估自动化建库方案的可行性。文库制备完成后，测定建库产物的浓度与纯度，并用片段分析仪测定建库产物的片段大小。

随后将不同文库等质量混合，MiFish文库通过DNBSEQ一步法DNB制备试剂制备成DNA纳米球(DNA nanoballs, DNBs), Ac12S引物建库产物需使用MGIEasy 双barcode环化试剂盒环化成单链环状DNA (single-stranded DNA，ssDNA) 再进行常规DNB制备。上机测序前需将平衡文库试剂制备的DNB以一定的比例与样本DNB混合后再上机测序。上机DNBSEQ-E25时，样本文库与标准文库试剂(PCR产物)V4.0的质量比为2:1；上机DNBSEQ-G99时，样本文库与ATOPlex E450双标签平衡文库试剂的质量比为4:1。混合好的DNBs随后加载到DNBSEQ-E25(PE150)或DNBSEQ-G99(PE150/PE300)测序载片上进行测序。

本研究中，MiFish文库均采用DNBSEQ-E25/DNBSEQ-G99(PE150)的测序策略，12S文库均采用DNBSEQ-G99 (PE300)的测序策略。

生信分析

本研究使用华大智造宏条形码物种识别软件(MetaSIS)进行生信分析, MetaSIS可以基于扩增子的宏基因组测序数据进行OTU分析、物种组成分析(包含物种分布堆叠图、Krona图等)、Alpha多样性(包含Shannon-Wiener曲线、等级丰度曲线等)、Beta多样性(包含组间距离分析、主成分分析等)。每个样本数据均精确截取至50000 reads进行分析。对于有内置生信模块的测序仪，如DNBSEQ-G99ARS，FastQ文件可以直接在其内部安装的MetaSIS软件中进行分析，对于无内置生信模块的测序仪如DNBSEQ-E25，可以搭配微生物快速识别平台(PFI，MetaSIS软件安装在其中)进行分析。分析流程如下：reads合并，Tags过滤，嵌合体去除，操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)聚类和过滤，生成特征序列OTU(本软件将相似度在100%的序列聚类为一个OTU)，随后使用QIIME2软件将OTU序列与鱼类12S rDNA数据库进行比对注释，进行物种组成分析、Alpha多样性分析、Beta多样性分析[13]。

仅供研究使用，不适用于临床诊断

结果

华大智造核酸提取试剂盒可高质量提取水环境DNA

为评估华大智造MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒对真实水环境DNA的提取质量，研究者们将从武汉东湖同一采样点采集的样本通过该试剂盒以及Competitor A试剂盒进行DNA提取。

结果表明利用该试剂盒提取样本的DNA产量达5720 ng(质检产量＞100 ng即为合格) (图1A)，A260/280接近1.8表明DNA的纯度良好(图1B)，电泳结果显示提取的DNA片段较为完整，无明显降解，片段大小符合预期(图1C)。

进一步的测序结果显示该试剂盒提取产物文库的测序质量亦较高，Q30高达97.31%；特征序列是用于后续ASV(OTU、feature)分析的序列，其数值是合并序列数与嵌合体序列数之差，该试剂盒提取产物文库的特征序列数比例高达78.65%; OTU数目 (OTU number) 为操作分类单元 (Operational taxonomic unit)聚类数，本研究将相似度在100%的序列聚类为一个OTU，该试剂盒提取产物文库的OTU数目为70；将OTU序列与注释数据库进行比对注释，获得其在不同分类水平上的物种识别结果，包括界、门、纲、目、科、属和种数目，发现该试剂盒提取产物测序得到的种数目为22。该试剂盒的上述测序和分析参数均略优于Competitor A提取试剂盒(图1D)。

以上结果表明MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒的提取质量高，且与Competitor A品牌试剂盒的提取质量不相上下。

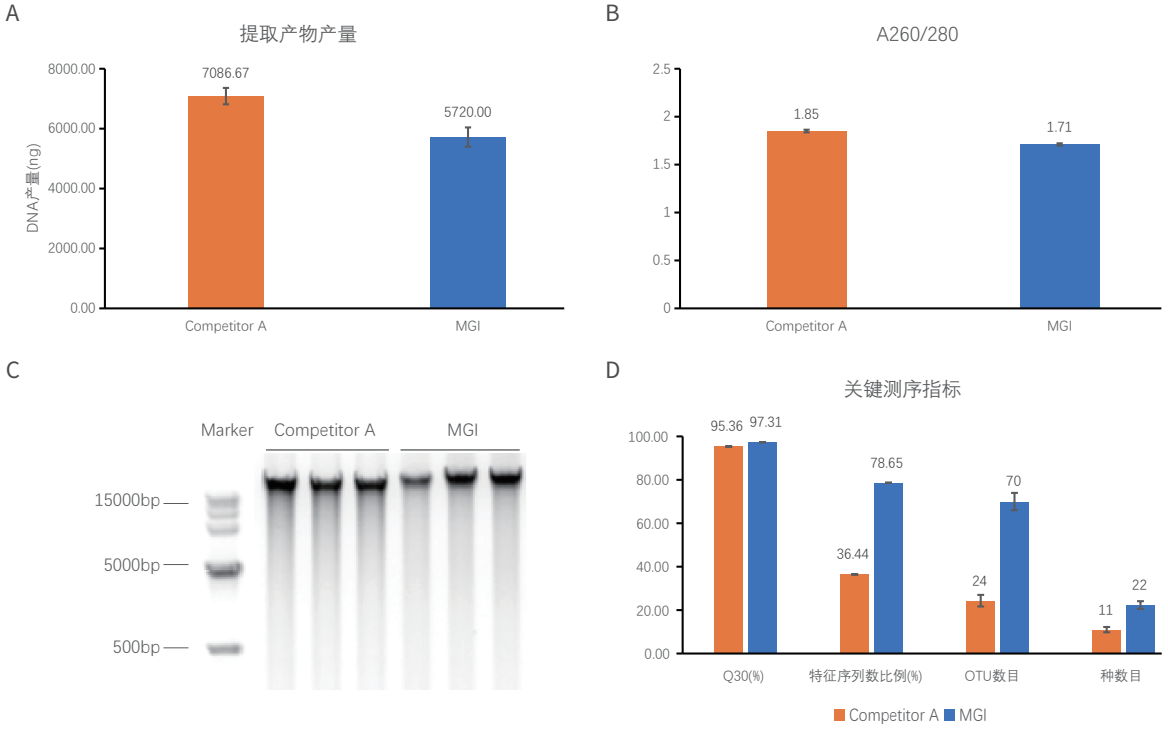

图1. MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒与Competitor A试剂盒的提取质量相当。(A-C)两款试剂盒提取的DNA的产量(A)，纯度(A260/280)(B)以及片段分布(C)；(D)提取产物建库后的测序结果；特征序列数比例(feature reads rate)=(合并reads数-嵌合体reads数)/截取reads数目。以上结果均为利用ATOPlex MiFish建库试剂盒套装进行手工建库，在DNBSEQ-G99测序仪上得到的测序结果。样本均采自武汉东湖同一采样点，每个试剂盒三个重复。

MGISP自动化系统可对环境样本进行高质量的核酸提取与建库

华大智造可为环境样本的核酸提取和建库提供自动化解决方案，本研究分别使用手工和自动化方案(MGISP-NE32和MGISP-960)对真实水环境DNA进行提取和建库。

由于在去除RNA后只吸取了一半的产物上机MGISP-NE32，此处未比较手工和自动化提取方案的产量。自动化方案所提取DNA的A260/280为1.63(图2A)，其DNA产物提取质量较高，条带大小和完整性亦符合预期(图2B)。样本DNA通过自动化提取与手工提取质量相当。在50ng的建库DNA投入量下，自动化建库的文库产量为969ng(图2C)，文库片段大小为329bp，与预期(300~400bp)相符，且没有引物二聚体等非特异峰，得到的文库质量较高且与手工建库方案相当(图2D)。(NE32，960)为利用MGISP-NE32进行提取，利用MGISP-960进行建库的样本组，其他名称以此类推。文库在测序后发现，(NE32，960)的Q30值为96.79%，特征序列数比例为69.35%，OTU number为54，检测到的种数目(Species)为18，均与(手工，960)相当(图2E)。(手工，960)的测序结果Q30%为96.64%，特征序列数比例为72.45%，OTU数目为51，检测的物种数(Species)有17种，均与(手工, 手工)的测序结果相当。

上述结果综合表明华大智造自动化系统可对环境样本进行高质量的核酸提取与建库，且其质量与手工方案相当。

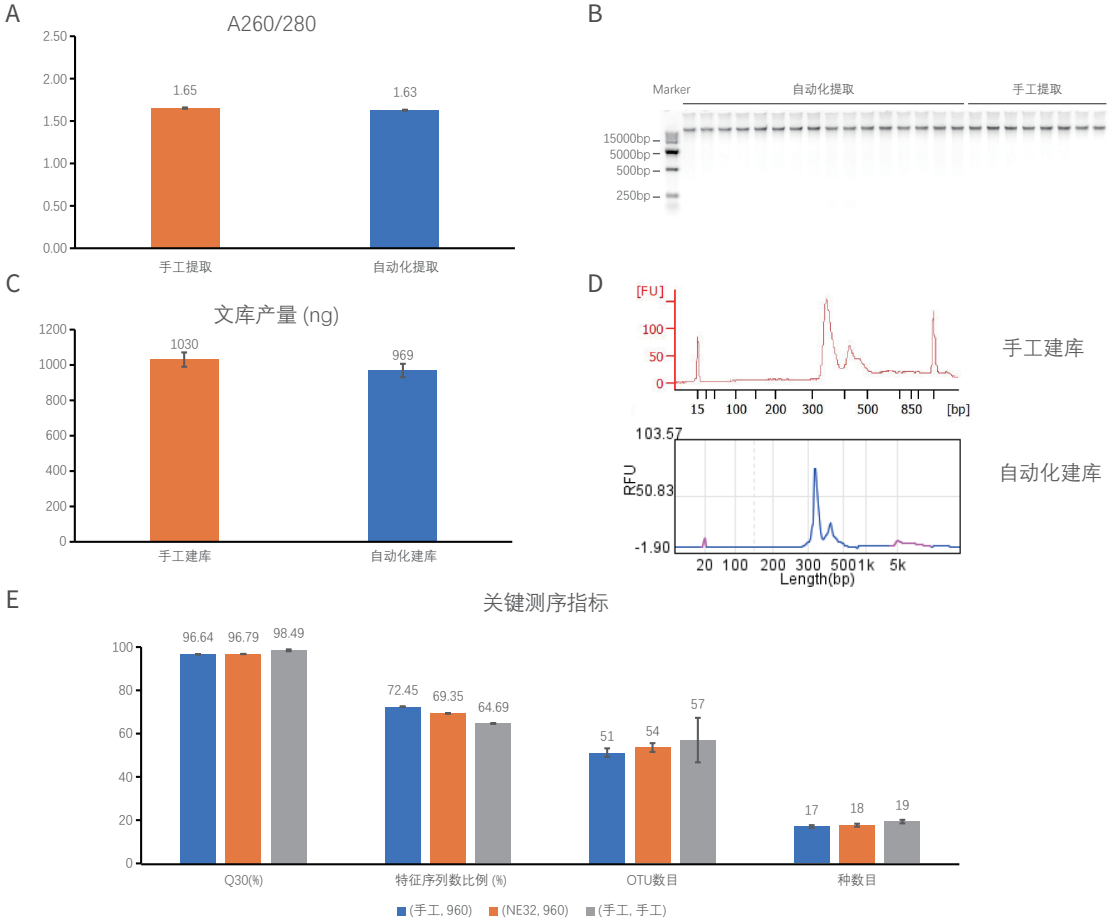

图2. 华大智造提取和建库自动化方案和手工方案质量相当。(A-B)手工和自动化提取方案的DNA纯度(A260/280)(A)以及片段分布(B)；(C-D)手工和自动化建库方案的文库产量(C)以及片段分布结果(D)；(E)自动化建库提取、建库方案与手工方案的测序结果。以上结果均为真实样本，使用MiFish panel建库，在DNBSEQ-G99上的测序结果。

华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品对鱼类物种鉴定准确

为探究此组合产品对鱼类多样性检测的准确性，研究者们检测了三类模拟鱼类群落样本的鱼类实测丰度，并与理论丰度进行比对。其中(手工, MiFish, 960)-1/2/3/4为10种鱼类同一混合比例的4个重复，(手工, 12S，960)-1/2与(手工, 12S，960) -3/4为两种不同混合比例的样本。(手工,MiFish,960)代表手工提取，利用MiFish panel以及MGISP-960进行建库的样本，其他样本含义依次类推。

结果发现无论是(手工, MiFish, 960)还是(手工,12S，960)样本，预期物种全部检出(图3A, B)。并且实测丰度与理论丰度具有非常高的一致性，三类样本的皮尔逊相关系数(PCC)分别为0.904，0.871，0.838 (图3 C, D, E)，均接近1。

说明在鱼类多样性检测研究中，无论是使用MiFish panel搭配DNBSEQ-E25，还是Ac12S panel搭配DNBSEQ-G99均能获得较为准确的鱼类物种检测结果。

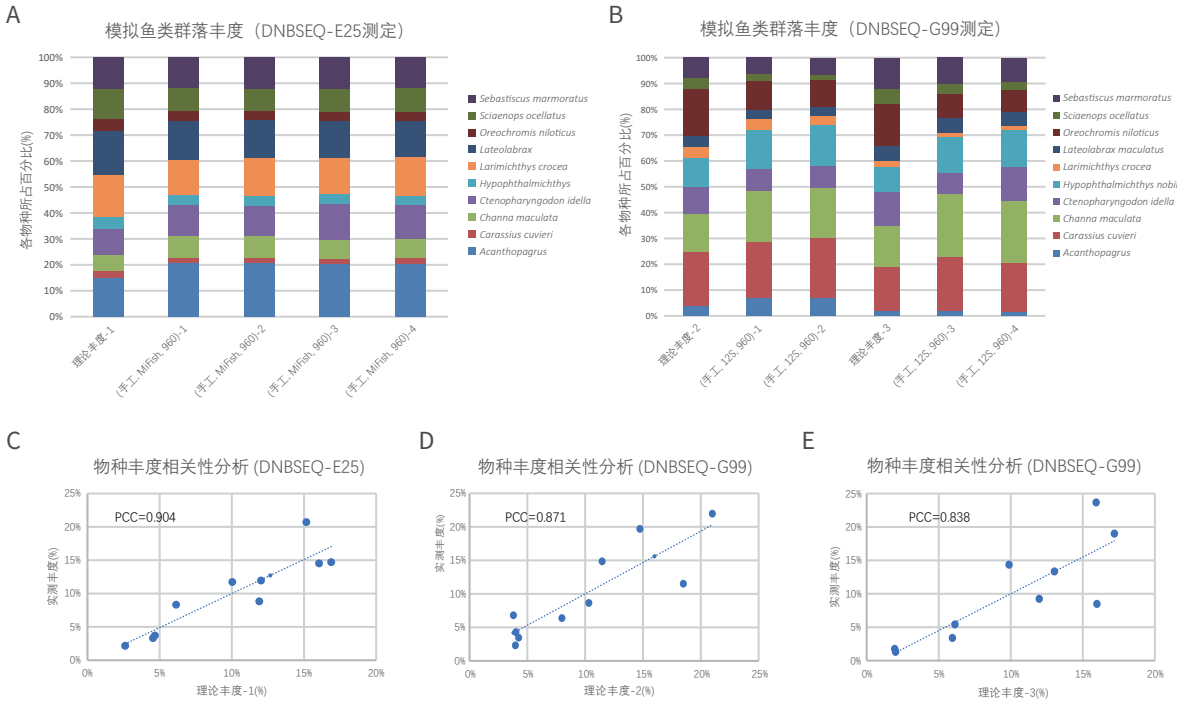

图3. 模拟鱼类群落样本的实测丰度与理论丰度基本一致。(A-B) 三种不同比例的模拟鱼类群落样本实测丰度；(C,D,E)三种不同比例模拟鱼类群落样本的丰度相关性分析。以上MiFish文库均在DNBSEQ-E25上测序。

华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品可对鱼类多样性进行动态监测

目前已有较多研究将eDNA技术应用于长江流域鱼类多样性分析。本研究基于华大智造环境DNA宏条形码测序组合方案，对武汉东湖鱼类进行多样性监测。其中样本D3~D8代表武汉东湖6个不同位点(图4A)。对种分类水平上丰度排名前18的物种进行统计发现，同一个采样位点的不同重复所检测出的物种种类一致，物种丰度相似，D5，D6，D7样本中的鳙鱼(Hypophthalmichthys nobilis)鱼类比例相对较高(图4B)。Krona图形详细展示了D3样本在不同的分类级别下鱼类物种的相对比例(图4C)。Shannon-Wiener曲线显示在截取30000 reads进行分析时，所有样本的曲线趋于平坦，说明本研究截取50000 reads足以检测出样本中绝大部分的生物物种(图4D)。等级丰度曲线反应出D3位点的物种丰度和均匀度较高，D7及D8的物种丰度及均匀度相对较低(图4E)。组间距离分析图显

示D3和D8这2个点位的样本在鱼类物种构成上具有一定的相似性，而其他点位的样本之间物种构成差异性较大(图4F)。

主成分分析结果可以看出D3和D8的样本距离较近(图4G)，说明这2个位点的鱼类物种构成有一定的相似性，与上述组间距离分析的结论一致。

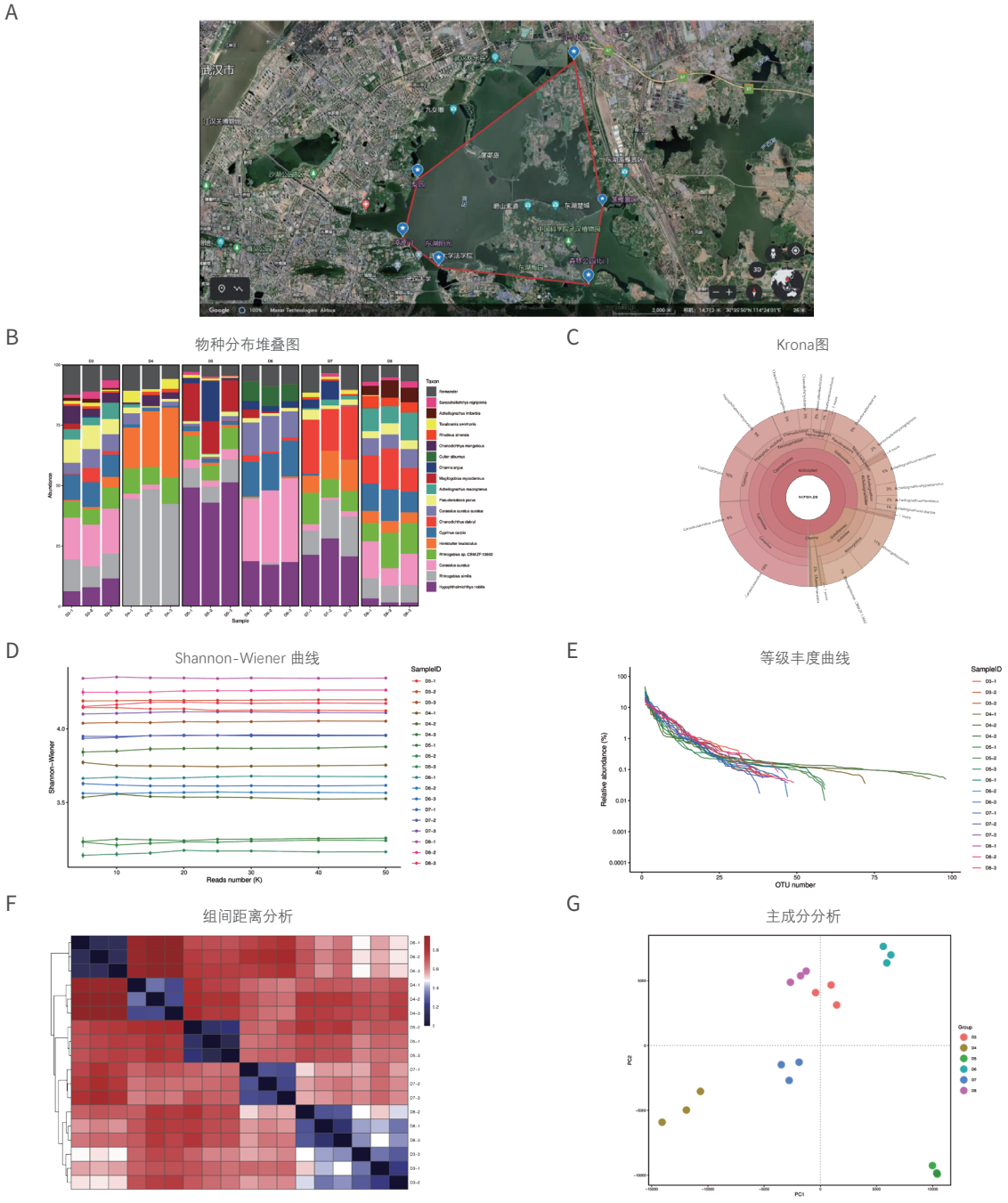

图4. 武汉东湖真实样本的MetaSIS报告结果。(A)D3~D8为武汉东湖的6个不同采样位点，每个位点重复采样3次。(B)种分类水平上丰度排名前18的物种构成的物种丰度堆叠图。(C)样本D3的Krona图。圆圈从内到外依次代表不同的分类级别(门、纲、目、科、属、种)下物种的相对比例。(D)Shannon-Wiener曲线。横坐标代表不同的测序数据量，纵坐标为生物多样性指数，在截取30000 reads进行分析时，所有样本的曲线趋于平坦。(E)所有样本的等级丰度曲线。横坐标代表排名后OTU的数量，纵坐标代表每个OTU的相对丰度。物种的丰度越高，曲线在横轴上的范围越大；曲线越平缓，物种分布越均匀。(F)各个样本的组间距离分析。横纵坐标均为样品，可以通过颜色梯度及相似程度可以反映多个样品间的相似性和差异性。(G)主成分分析。每一个点代表一个样本，相同颜色的点来自同一个分组，两点之间距离越近表明两者差异越小。

表3为华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品检测出的东湖鱼类，共鉴定出鱼类59种，隶属9目17科38属(表3)，并且发现食蚊鱼（*Gambusia affinis*）为入侵物种[14]。

目(Order)	科(Family)	属(Genus)	种(Species)
攀鲈目 *Anabantiformes*	鳢科 *Channidae*	鳢属 *Channa*	乌鳢 *Channa argus*
			斑鳢 *Channa maculata*
太阳鱼目 *Centrarchiformes*	鳜科 *Sinipercidae*	鳜属 *Siniperca*	翘嘴鳜 *Siniperca chuatsi*
鲱形目 *Clupeiformes*	鳀科 *Engraulidae*	鲚属 *Coilia*	刀鲚 *Coilia nasus*
鲤形目 *Cypriniformes*	鱊亚科 *Acheilognathidae*	鱊属 *Acheilognathus*	短须鱊 *Acheilognathus barbatulus*
			寡鳞鱊 *Acheilognathus hypselonotus*
			缺须鱊 *Acheilognathus imberbis*
			大鳍鱊 *Acheilognathus macropterus*
			斜方鱊 *Acheilognathus rhombeus*
		鳑鲏属 *Rhodeus*	高体鳑鲏 *Rhodeus ocellatus*
			中华鳑鲏 *Rhodeus sinensis*
	鳅科 *Cobitidae*	泥鳅属 *Misgurnus*	北方泥鳅 *Misgurnus bipartitus*
		副泥鳅属 *Paramisgurnus*	大鳞副泥鳅 *Paramisgurnus dabryanus*
	鲤科 *Cyprinidae*	鲫属 *Carassius*	鲫 *Carassius auratus*
			鲫 *Carassius auratus auratus*
			黑鲫 *Carassius carassius*
		鲤属 *Cyprinus*	尖鳍鲤 *Cyprinus acutidorsalis*
			华南鲤 *Cyprinus carpio*
	鲤形目 *Cyprinoidei*	二倍体 *diploid*	二倍体鲂×团头鲂 *diploid Xenocypris davidi x Megalobrama amblycephala*
	鮈亚科 *Gobionidae*	棒花鱼属 *Abbottina*	棒花鱼 *Abbottina rivularis*
		鳈属 *Hemibarbus*	唇鳈 *Hemibarbus labeo*
			花鳈 *Hemibarbus maculatus*
		小鳔鮈属 *Microphysogobio*	小鳔鮈属sp. ZF-11935种 *Microphysogobio sp. ZF-11935*
		似刺鳊鮈属 *Paracanthobrama*	似刺鳊鮈 *Paracanthobrama guichenoti*
		麦穗鱼属 *Pseudorasbora*	麦穗鱼 *Pseudorasbora parva*
		鳡属 *Sarcocheilichthys*	东北黑鳍鳡 *Sarcocheilichthys nigripinnis*
			华鳡 *Sarcocheilichthys sinensis*
			黑鳍鳡 *Sarcocheilichthys soldatovi*

目(Order)	科(Family)	属(Genus)	种(Species)
鲤形目 *Cypriniformes*	鮈亚科 *Gobionidae*	鲤科蛇鮈属 *Saurogobio*	蛇鮈 *Saurogobio dabryi*
			滑唇蛇鮈 *Saurogobio lissilabris*
		银鮈属 *Squalidus*	银鮈 *Squalidus argentatus*
	鲌亚科 *Xenocyprididae*	红鳍鲌属 *Chanodichthys*	达氏鲌 *Chanodichthys dabryi*
			蒙古红鲌 *Chanodichthys mongolicus*
		草鱼属 *Ctenopharyngodon*	草鱼 *Ctenopharyngodon idella*
		鲌属 *Culter*	翘嘴鲌 *Culter alburnus*
			扁体原鲌 *Culter compressocorpus*
		鲤科鳌属 *Hemiculter*	白条鱼 *Hemiculter leucisculus*
		鲢属 *Hypophthalmichthys*	鲢鱼 *Hypophthalmichthys molitrix*
			鳙鱼 *Hypophthalmichthys nobilis*
		鲂属 *Megalobrama*	团头鲂 *Megalobrama amblycephala*
			三角鲂 *Megalobrama terminalis*
		青鱼属 *Mylopharyngodon*	青鱼 *Mylopharyngodon piceus*
		鳊属 *Parabramis*	壮体长春鳊 *Parabramis pekinensis strenosomus*
		斜颌鲴属 *Plagiognathops*	细鳞斜颌鲴 *Plagiognathops microlepis*
		似鳊属 *Toxabramis*	似鳊 *Toxabramis swinhonis*
鳉形目 *Cyprinodontiformes*	胎鳉科 *Poeciliidae*	食蚊鱼属 *Gambusia*	食蚊鱼 *Gambusia affinis*
虾虎鱼目 *Gobiiformes*	鰕虎鱼科 *Gobiidae*	鲻鰕虎鱼属 *Mugilogobius*	粘皮鲻鰕虎鱼 *Mugilogobius myxodermus*
		吻鰕虎鱼属 *Rhinogobius*	波氏吻鰕虎鱼 *Rhinogobius cliffordpopei*
			河川吻鰕虎鱼 *Rhinogobius fluviatilis*
			名古屋吻虾虎鱼 *Rhinogobius nagoyae*
			真吻鰕虎鱼 *Rhinogobius similis*
			吻鰕虎鱼属sp. CBM:ZF:13662种 *hinogobius sp. CBM:ZF:13662*
	沙塘鳢科 *Odontobutidae*	小黄黝鱼属 *Micropercops*	小黄黝鱼 *Micropercops swinhonis*
		沙塘鳢属 *Odontobutis*	中华沙塘鳢 *Odontobutis sinensis*
骨舌鱼总目 *Osteoglossiformes*	驼背鱼科 *Notopteridae*	铠甲弓背鱼属 *Chitala*	铠甲弓背鱼 *Chitala ornata*
鲇形目 *Siluriformes*	鲿科 *Bagridae*	疯鲿属 *Tachysurus*	黄颡鱼 *Tachysurus fulvidraco*
	鲶科 *Pimelodidae*	雷氏鲶属 *Rhamdia*	巴西雷氏鲇 *Rhamdia cf. jequitinhonha NS 3056B*
	鲇科 *Siluridae*	鲶属 *Silurus*	鲶鱼 *Silurus asotus*
合鳃目 *Synbranchiformes*	刺鳅科 *Mastacembelidae*	刺鳅科 *Macrognathus*	棘鳅 *Macrognathus aculeatus*

表3. 检测到的东湖鱼类群落组成

仅供研究使用，不适用于临床诊断

总结

本研究表明华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品可有效应用于鱼类动态监测，该方案利用MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒以及MGISP-NE32对鱼类脱落的环境DNA(eDNA)进行提取、ATOPlex MiFish建库试剂盒或ATOPlex Ac12S mtDNA建库试剂盒搭配MGISP-960进行建库，利用DNBSEQ-E25或DNBSEQ-G99测序，MetaSIS软件进行数据分析。相关的实测数据表明，MGIEasy粪便基因组DNA(meta)提取试剂盒与Competitor A试剂盒的提取结果不相上下，自动化提取/建库方案与手工提取/建库方案相当。此组合产品得到的数据质量较高，鱼类物种鉴定结果准确。

DNBSEQ-E25是一款小巧轻便的基因测序仪，仪器占桌面利仅0.1m^2，运行速度快，对实验室环境要求低，安装、维护简便，单张载片的通量为25M reads，20 h内即可完成PE150测序。DNBSEQ-G99其单张载片的通量为80M reads，最多可同时运行两张载片，满负荷PE150仅需12 h, PE300仅需30 h。两款测序仪均可内置计算模块，测序生信一体化，将测序效率提升到极致。

华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品可实现从样本处理到分析报告全流程覆盖，为生态环境监测与环境科学研究提供强有力的工具支撑。通过对环境样本中的生物群落结构进行快速、准确分析，可对多个地点进行持续的生物多样性监测，进而了解生物多样性丧失或外来物种入侵，健全生态系统保护策略的制定，促进物种资源的可持续利用。

致谢

此应用简报中的部分实验由湖北省生态环境监测中心站、中国科学院水生生物研究所与华大智造研发团队联合完成，十分感谢以上单位为本文提供的材料、支持和宝贵的意见。

参考文献

1. Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring[J]. *Trends in ecology & evolution*, 2014, 29(6): 358-367.
2. Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series* B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
3. Creer S, Deiner K, Frey S, et al. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, 7(9): 1008- 1018.
4. Ruppert K M, Kline R J, Rahman M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA[J]. *Global*
5. *Ecology and Conservation*, 2019, 17: e00547.
Stewart K A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2019, 28(5): 983-1001.
6. Jerde C L, Chadderton W L, Mahon A R, et al. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(4): 522-526.
7. Wilcox T M, McKelvey K S, Young M K, et al. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity[J]. *PloS one*, 2013, 8(3): e59520.
8. Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. *PloS one*, 2012, 7(4): e35868.
9. Takahara T, Minamoto T, Doi H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds[J]. *PloS one*, 2013, 8(2): e56584.
10. Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples[J]. 2012.
11. Miya M, Gotoh R O, Sado T. MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples[J]. *Fisheries Science*, 2020, 86(6): 939- 970.
12. Zhang S, Zhao J, Yao M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, 11(12): 1609-1625.
13. May2023 reference datasets for Mitohelper: https://zenodo.org/record/7925541.
14. Li Y, Tang M, Lu S, et al. A Comparative Evaluation of eDNA Metabarcoding Primers in Fish Community Monitoring in the East Lake[J]. *Water*, 2024, 16(5): 631.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	DNBSEQ-G99ARS基因测序仪	900-000608-00
	DNBSEQ-E25RS基因测序仪	900-000490-00
	全自动核酸提取纯化仪MGISP-NE32RS	950-000019-00
	MGISP-960RS 高通量自动化样本制备系统-订制化配置 9	900-000108-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
软件	宏条形码物种识别软件 (MetaSIS)	970-000417-00
	微生物快速识别平台 (PFI)	900-000392-00*
	微生物快速识别与组装溯源平台	900-000398-00*
提取试剂	MGIEasy基因组DNA提取试剂盒	1000010524
	MGIEasy粪便基因组DNA (meta) 提取试剂盒	940-000122-00
	MGIEasy组织研磨珠	940-000136-00
建库试剂	ATOPlex MiFish建库试剂盒套装 (ATOPlex MiFish引物池+ATOPlex DNA 双标签建库试剂盒套装)	Group010-000021-00**
	ATOPlex Ac12S mtDNA建库试剂盒套装 (ATOPlex Ac12S mtDNA引物池+ATOPlex DNA 双标签建库试剂盒套装)	Group010-000019-00**
DNB制备试剂	MGIEasy 双barcode环化试剂盒	1000020570
	DNBSEQ一步法DNB制备试剂盒 (OS-DB)	1000026466
平衡文库	ATOPlex E450双标签平衡文库试剂	940-000637-00
	标准文库试剂 (PCR 产物)V4.0	1000027585
测序试剂	DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL PE150)	940-000410-00
	DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL PE300)	940-000415-00
	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150)	940-000567-00***
清洗试剂	DNBSEQ-G99RS清洗试剂盒 (G99 SM FCL)	940-000624-00

*可任意选购一种

**更多ATOPlex定制化产品可前往华大智造官网查阅：https://www.mgitech.cn/products/atoplex/

***DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) 涵盖DNBSEQ一步法DNB制备试剂，无需额外订购

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

4000-688-114

www.mgi-tech.com

MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114

仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2024年4月版

撰稿：张含菲，刘淼

责任编辑：王其伟

审稿：江遥