

臺大醫學院第一共研電子報

2016年10月第19期

本期目錄

- ◎ 醫學微生物體核心實驗室簡介
- ◎ 申請方式與服務流程
 - 服務流程圖
 - 核心實驗室網頁登入
 - 線上下單填寫範例
- ◎ 新添購儀器簡介：
 - 次世代定序平台(Illumina Miseq)
 - 自動化定序樣品文庫製備平台(Illumina NeoPrep Library Prep System)
- ◎ 16S metagenomics sequencing簡介：
 - 為何選擇16S rRNA GENE?
 - 2 steps PCR 16S library preparation

本期編輯：醫學微生物體核心實驗室 李慧瑛博士

醫學微生物體核心實驗室簡介

醫學微生物體核心實驗室

國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine



為協助台大院區學術研究發展，醫學院研究發展分處第一共同研究室，於2016年7月增設醫學微生物體核心實驗室(Medical Microbiota Center)，由李慧瑛博士與楊于萱小姐負責相關業務。服務與收費方式詳見醫學院研發分處/第一共研/醫學微生物體核心實驗室網頁：
<http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/microbe/index.asp>

實驗室位置：醫學院 基醫大樓 R1339 & R1343

服務項目：
Miseq Sequencing Service
Neoprep Library Preparation
Library Quality Control (Agilent 2100 Bioanalyzer)
Library Quantification (qPCR)
16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

聯絡方式： Email- hueiying@ntu.edu.tw
- yhyang76@ntu.edu.tw

分機 - 88200

申請方式與服務流程—流程圖

登入醫學微生物體核心實驗室網頁

<http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/microbe/index.asp>



於線上下單區填寫送件單(需上傳電泳圖與濃度資料)

<http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/microbe/service.asp>



檢體送至本核心(基醫大樓1339室)



核心人員確認檢體Quality，通過者續做實驗，不通過者通知送件單位，補送檢體重新確認Quality或是簽署續做同意書



安排上機，上機完成後通知領取結果

申請方式與服務流程—核心實驗室網頁登入

1.初次使用請先註冊一共同成員帳號，並email李慧瑛或楊于萱小姐，協助開通使用權限。

醫學微生物體核心實驗室
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共同研服務使用成員註冊

Google Custom Search

最新公告 本核心簡介 線上下單 收件標準 送件流程 收費標準 文件下載 致謝格式 Q&A及留言板

本核心認證成員登入
Members Login

帳號

密碼

登入 忘記密碼

醫學微生物體核心實驗室
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

如何成為本核心成員 [首頁：如何成為本核心成員](#)

新成員註冊,預約權限開通與網路預約流程等相關注意事項

- 欲進行網路預約及申請使用儀器者，請先點選右上方"第一共同研服務使用成員註冊"進行註冊,以取得第一共同研儀器與相關服務使用成員的資格。
- 完成註冊後,請 email 通知本核心實驗室管理人員 (yhyang76@ntu.edu.tw), 並註明：
 - 申請者姓名
 - 申請帳號
 - 系所/單位/分機號碼或連絡電話
 - 指導老師/醫師/負責人姓名
- 待本核心實驗室管理人員核准開通帳號並通知您後,即擁有該項線上下單的資格與權限。
- 請特別注意,欲使用本核心實驗室服務的人員,需先經本核心實驗室所屬之管理人員完成認證程序,管理人員才會開通線上預約的權限。

開始填寫送件單

國立台灣大學醫學院第一共同研究室醫學微生物體核心實驗室 (醫學院13樓1339 及1343 室)
Medical Microbiota Center of the First Core Laboratory, College of Medicine, National Taiwan University
管理人員: 楊于萱 小姐 TEL: 02-23123456 ext 88200 E-mail: yhyang76@ntu.edu.tw

2.有使用權限後，由此登入。

3.按此開始填寫送件單

申請方式與服務流程—線上下單填寫範例~1

以16S metagenomics library為例



醫學微生物體核心實驗室
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共研服務使用成員註冊

最新公告 | 本核心簡介 | **線上下單** | 收件標準 | 送件流程 | 收費標準 | 文件下載 | 致謝格式 | Q&A及留言板

本核心認證成員登入
Members Login

您好, 李慧瑛

我要登出

醫學微生物體核心實驗室
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

線上下單 **每個欄位皆為必填，請勿留白!** [首頁](#) > [線上下單](#)

送件單	
申請時間	2016/9/14 下午 03:04:01
單位	一共
姓名	李慧瑛
指導老師/計畫主持人	倪衍宏
實驗室分機號碼	88200
使用人email	hueiyng@ntu.edu.tw
備用聯絡人	李慧瑛 <input checked="" type="checkbox"/> 本人親自領取 請填寫聯絡人姓名，材料製備完成後，系統將會通知聯絡人
備用聯絡人Email	hueiyng@ntu.edu.tw 請填寫聯絡人email，材料製備完成後，系統將會通知聯絡人
備用聯絡電話	0921xxxxxx 請填寫聯絡電話
收據抬頭	台大醫學院
檢體來源*	
<input type="radio"/> Human <input checked="" type="radio"/> Mouse <input type="radio"/> 糞便 <input type="radio"/> 其他, <input type="text" value=""/>	
檢體種類*	
<input type="radio"/> 血球 <input type="radio"/> 血漿 <input type="radio"/> 冷凍組織 <input type="radio"/> 蠟塊組織與切片 <input type="radio"/> 培養細胞 <input checked="" type="radio"/> 其他; <input type="text" value="糞便"/>	

勾選本人親自領取，系統自動帶入使用者資料

申請方式與服務流程—線上下單填寫範例~2

以 16S metagenomics library 為例

16S V3-V4 PCR product 請選此處

檢體型態* (次世代定序反應樣品製備請附電泳圖以確認degrade程度)

gDNA mRNA smallRNA

PCR product (包含adapter與index序列, 可直接上機)

PCR product (不包含adapter與index序列, 需進行library prep)

其他; 請輸入

上傳電泳圖 選擇檔案 未選擇任何檔案

實驗需求*

16S Metagenomic Sequencing Library Preparation-Nextera XT DNA sample preparation

Library Quality Control - Bioanalyzer
晶片種類? DNA1000 High Sensitivity Others 請輸入

Library Quantification (qPCR) (KAPA Library Quantification Kits)

MiSeq次世代定序反應(請勾選細項) --上機

單向或雙向定序? single-end paired-end

每方向讀多少序列? 75bp 150bp 250bp 300bp

Index型態? Single (ex. AD001) Dual (ex. D701-D501) Others 請輸入

原始檢體濃度測定方式*

Nanodrop Qubit Pico Green Bioanalyzer

其他, 請輸入

上傳濃度 選擇檔案 未選擇任何檔案 濃度上傳範本

備註

【註1】收費標準及工作天數請參見「收費標準」與「送件流程」, 如有其它疑問請洽分機88200。
【註2】送件後管理員將檢查檢體, 待送件通過後, 才開始上機
【註3】若送件不通過, 可選擇「重送檢體」或「同意續做」
【註4】待管理員上機完成後, 會發送領貨通知,
MiSeq次世代定序反應, 請帶30G以上USB隨身碟親至本中心儲存上機後資料。
其他服務者請登入後下載檢查數據。

確認下單

16S V3-V4 1st PCR product , 約550bp , 請load 2% gel

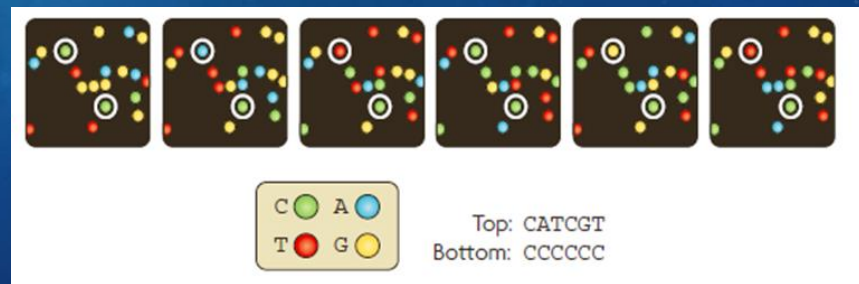
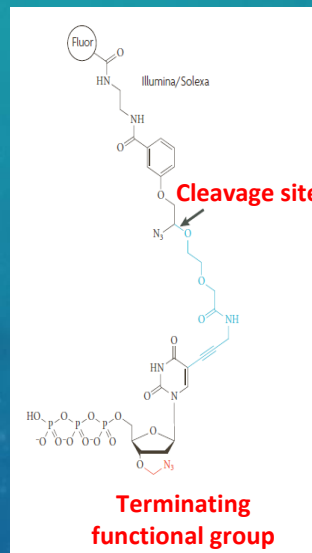
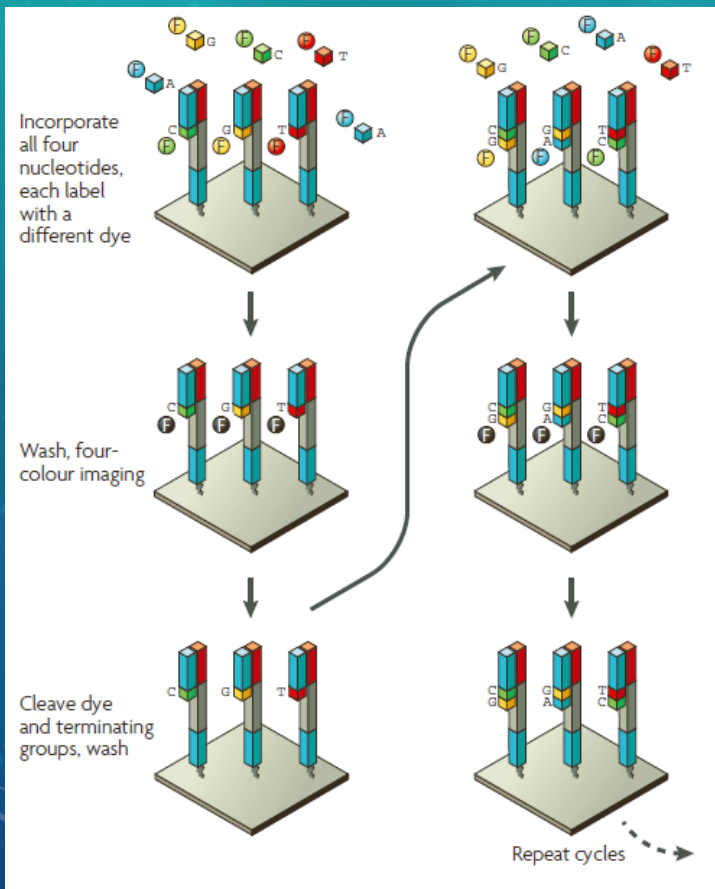
16S V3-V4 1st PCR product , 無須純化, 故濃度請填原始DNA濃度即可

完整的16S metagenomics exp. 包含 library preparation、library QC、Quantification和MiSeq run (paired-end 2*300bp=600 cycles kit)

填完後確認下單。收到送件單後, 本核心將以email通知送件。

次世代定序平台(Illumina Miseq)介紹

- ✓ MiSeq是Illumina首台，在單一機器上可進行DNA增幅(cluster generation)、定序(sequencing)以及數據分析(data analysis)的次世代定序平台。
- ✓ 利用Illumina現有CSMA(Clonal Single Molecule Array)與Reversible Terminator的技術，可在8~56小時內即可完成定序與初步分析。



次世代定序平台(Illumina Miseq)介紹

- ✓ MiSeq 目前提供v2和v3版本的上機試劑，依據使用者需求可彈性調整，定序長度與數據產量。其中v3試劑提供快速的cluster生成和更短的SBS週期時間及延長Pair-end讀長度至600bp (2x300bp)，單一次上機的定序數據產量為13~15Gb。
- ✓ Miseq可進行Multiplexed Amplicon Sequencing (TSCA, Nextera XT)、Target Region Re-sequencing、Small Genome Re-sequencing and de novo Sequencing、Small RNA Sequencing、Library QC、16S Metagenomic Studies等應用。

MiSeq Reagent Kit v2

Read Length	Total Time*	Output
1 × 36 bp	~4 hours	540–610 Mb
2 × 25 bp	~5.5 hours	750–850 Mb
2 × 150 bp	~24 hours	4.5–5.1 Gb
2 × 250 bp	~39 hours	7.5–8.5 Gb

Reads Passing Filter†

Single Reads	12–15 M
Paired-End Reads	24–30 M

Quality Scores††

- > 90% bases higher than Q30 at 1 × 36 bp
- > 90% bases higher than Q30 at 2 × 25 bp
- > 80% bases higher than Q30 at 2 × 150 bp
- > 75% bases higher than Q30 at 2 × 250 bp

MiSeq Reagent Kit v3

Read Length	Total Time*	Output
2 × 75 bp	~21 hours	3.3–3.8 Gb
2 × 300 bp	~56 hours	13.2–15 Gb

Reads Passing Filter†

Single Reads	22–25 M
Paired-End Reads	44–50 M

Quality Scores††

- > 85% bases higher than Q30 at 2 × 75 bp
- > 70% bases higher than Q30 at 2 × 300 bp

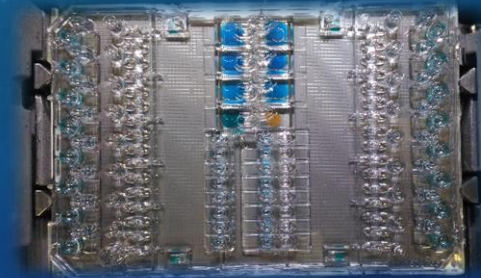
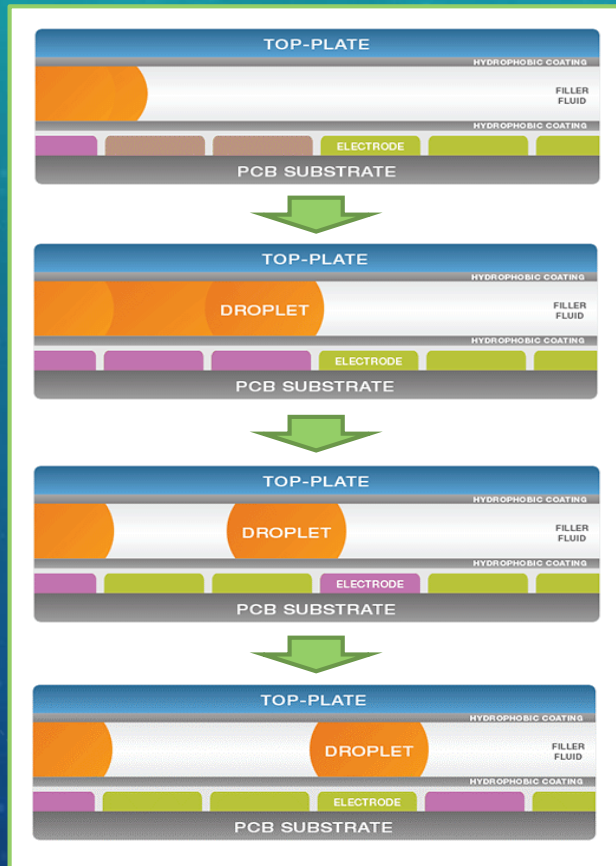
自動化定序樣品文庫製備平台 (Illumina Neoprep Library Prep System)介紹



✓ 利用電流轉換技術來改變液滴形狀，不需使用幫浦或流體管路，即可進行微流體的移動，分配，及混合。

(動畫請參考https://youtu.be/F_Hks6OnSKM)

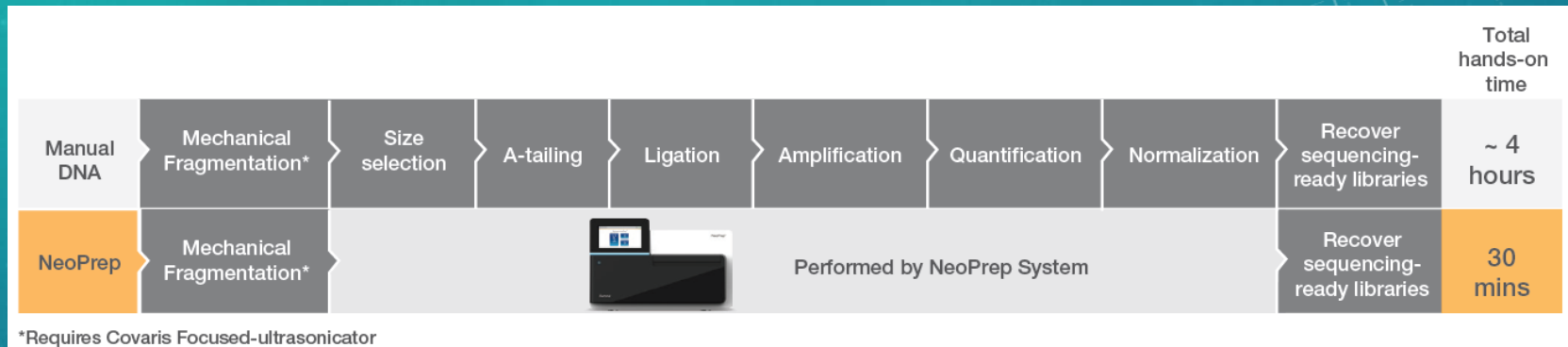
✓ 可同時製備16 個定序文庫。同時支援核酸定量，PCR，片段大小選擇，及多重文庫的標準化 (normalization)，並可在一個流程中一次完成。



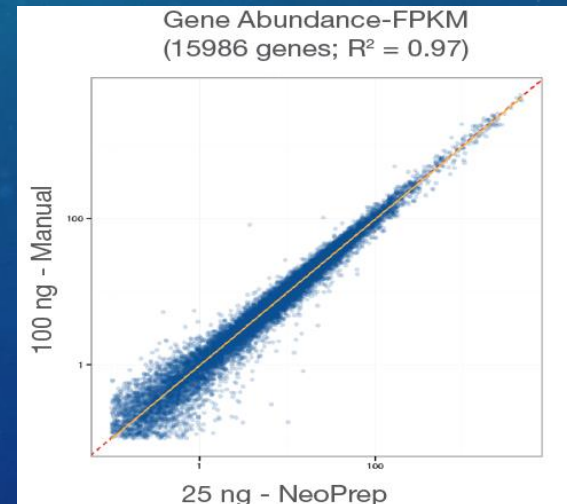
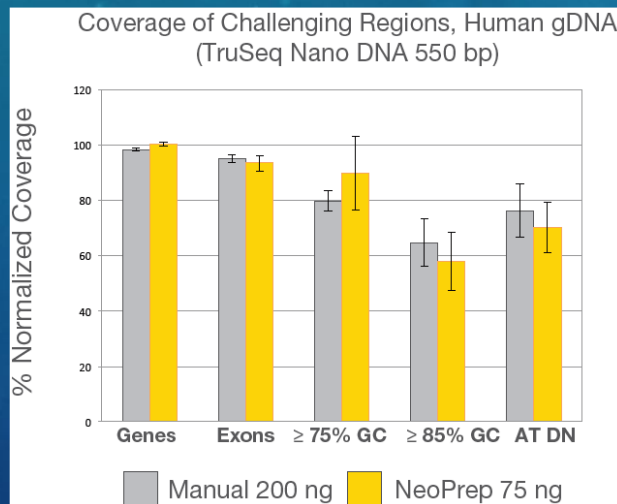
自動化定序樣品文庫製備平台 (Illumina Neoprep Library Prep System) 介紹



✓ 只須30分鐘的手動操作流程，大幅減少實驗步驟，有效減少人為疏失。



✓ 廣泛應用於包括DNA及RNA之文庫製備，且樣品進樣量降低，使用TruSeq Nano DNA試劑建構人類基因定序文庫只需25~75ng gDNA，TruSeq Stranded mRNA 只需25 ng total RNA。

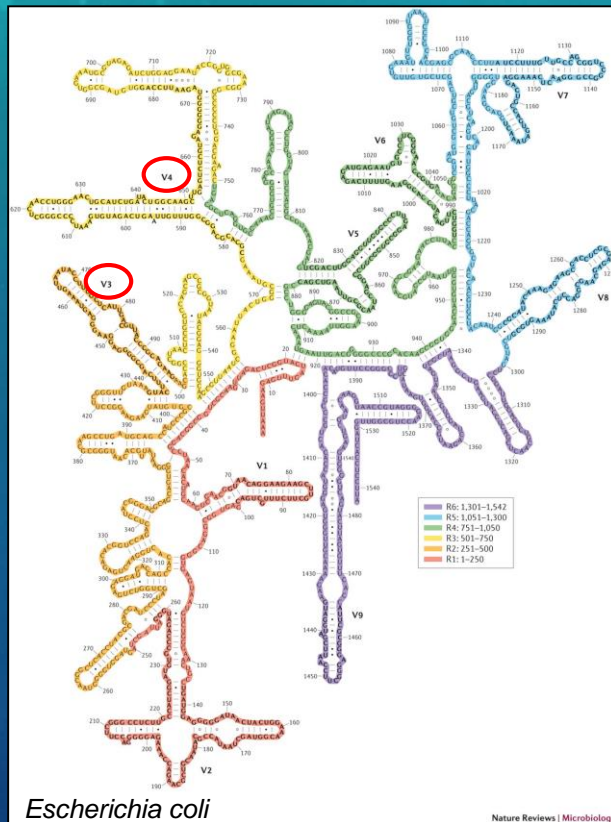


16S Metagenomics sequencing簡介

- ✦ 早期的微生物學研究，分類微生物，主要是依靠培養條件，加上染色等生理或生化特徵來辨別，但絕大部份的微生物是無法被實驗室培養的，因此大大的侷限了這種分類法的適用性。
- ✦ 1980年代，開始發展出無需培養的研究方法。檢體不經培養，直接將DNA萃取出來，針對某些目標基因(ex. 16S rRNA gene)進行PCR放大，再利用電泳(SSCP、DGGE等)或cloning & sequencing的方式，達到鑑定微生物種類的目的。雖然這些方法，其中，又以cloning後直接定序，可得到較精確的資訊，但隨著檢體不同，並不知道要定序多少個clone，才能覆蓋到檢體中大部分的微生物，有時甚至得定序超過上千個clone，是很耗時耗力的研究方法。
- ✦ 隨著次世代定序的發展，微生物的鑑定，得到突飛猛進的發展。目標基因放大後，直接利用次世代定序讀序，不但省去cloning的時間，同時可得到數以萬計甚至上百萬條定序結果。這些既精確又大量的定序，使得複雜度高的檢體微生物組成，得以被研究。

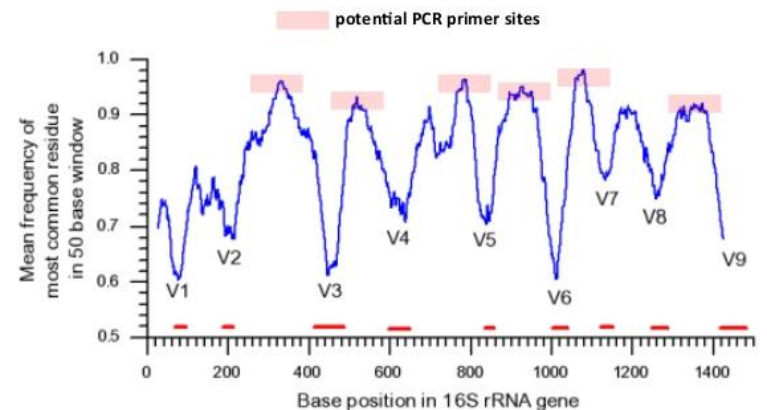
16S Metagenomics sequencing—為何選擇16S rRNA gene?

1. 16S rRNA 基因存在於所有的細菌和古細菌(bacteria and archaea)之中。
2. 16S rRNA基因大小約1.5kb，相對小的基因size，使sequencing所需的成本不會太高。
3. 同時，16S rRNA基因具有9個可變區(variable regions)，包含獨特於個別細菌的特定序列，而保守區(conserved regions)則是所有的細菌高度相同的，可用做設計PCR primers，使得16S rRNA 基因很適合用來分類和鑑定細菌。



Nat Rev Microbiol. 2014 Sep;12(9):635-45

Variable Regions of the 16S rRNA:



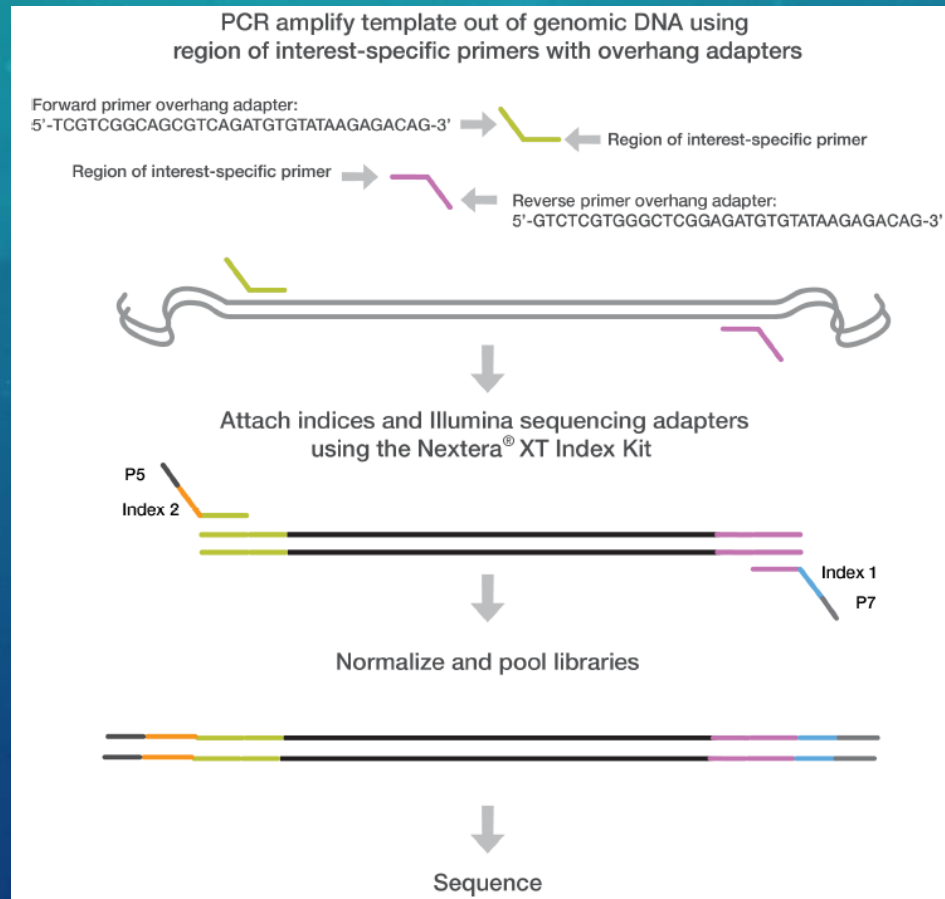
<http://image.slidesharecdn.com/molecularmethods-bioaerosols-peccia-140324090829-phpapp01/95/dnabased-methods-for-bioaerosol-analysis-18-638.jpg?cb=1395652387>

0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500 bp
V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9							
CONSERVED REGIONS: unspecific applications															
VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications															

<http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>

16S Metagenomics sequencing—2 steps PCR workflow

1. 目前本核心實驗室提供的16S metagenomics定序服務，採用的是 Illumina官方網站上提供的2 steps PCR workflow。第一次的primer包含部分的adapter及16S rRNA 基因 primer (V3~V4 regions)，第二次的primer則包括完整的adapter及index序列。
2. 這種workflow的好處是，第一階段的PCR使用universal primer，可使用在所有的檢體上，primer也不會太長而影響PCR效率。若想要更換除了V3~V4以外的region，也只需重訂這對primer即可。Index為dual index的設計，目前總共有384種組合，方便pooling檢體。



References

1. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46.
2. Miseq Introduction <http://www.illumina.com/systems/miseq.html>
3. Neoprep Introduction <http://www.illumina.com/systems/neoprep-library-system.html>
4. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J.* 2015;56(2):228-40.
5. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Sep;12(9):635-45.
6. Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation
http://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html