

OMNIGENE[®]•GUT能可靠地采集高质量粪便样品，用于肠道微生物组研究

Evgueni Doukhanine, Anne Bouevitch, Lindsay Pozza 和 Carlos Merino
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada
2014-09-19

OMNIGENE[®]•GUT是一种集成式系统，可轻松地自行采集和稳定粪便中的微生物DNA，用于分析肠道微生物组。在本文中，我们将说明OMNIGENE[®]•GUT能可靠地、重复地自行采集粪便样品。套件的设计确保样品量一致，而套件的稳定液和混合特性确保样品在采集点均质化和液化，以简化实验室的操作。从OMNIGENE[®]•GUT提取的DNA质量高且产量一致，足以用于多种高通量宏基因组分析。重要的是，OMNIGENE[®]•GUT稳定液的化学特性与商业处理方法兼容，保持中性组态，不会给下游应用带来任何偏倚。这些特性会简化实验室的工作流程、提高工作效率并降低成本。

前言

要进行任何肠道微生物群分析，都必须准确地捕获采集时存在的微生物组群的丰富度和相对丰度。目前文献中的方案提供了各种粪便样品的运输方法建议，包括环境温度、4°C或冷冻。每种方法都有可能将样品暴露于破坏微生物组稳定性的条件。考虑到人体粪便形式和微生物含量的多样性以及可能引入变异的各种分析前因素，迫切需要改进自行采集、运输和处理方法。OMNIGENE[®]•GUT旨在克服这些挑战，并具有独特功能，能够帮助宏基因组研究和生物标记物发现研究实现可扩展性和可重复性。

本文评估OMNIGENE[®]•GUT是否适用于家中自行采集粪便样品并由实验室处理以进行微生物组关联研究，重点是：a) 粪便样品量的一致性、b) DNA产量和浓度、c) 与常用DNA分离技术的兼容性，以及d) 下游应用中的性能。

材料和方法

样品采集

由未经培训的供者使用OMNIGENE[®]•GUT套件根据套件里的标准说明自行采集粪便样品。使用已称重的OMNIGENE[®]•GUT采集装置，6位供者各自从同一块粪便样品中采集三份样品（共18份）。采集后，将套件称重，从而确定采集的粪便样品量。

另外，按照人类微生物组计划标准程序¹，从同一块粪便样品中采集等分新鲜粪便样品，并在装有冷冻袋的聚苯乙烯泡沫塑料盒中运输。

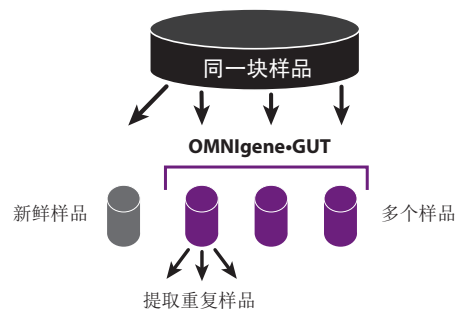


图1：每位供者的样品采集方案。6位供者各自从同一块样品的三个不同部位采集样本。从所有OMNIGENE[®]•GUT样品和新鲜样品中提取DNA。此外，对一份OMNIGENE[®]•GUT样品进行重复三次DNA提取。

DNA提取和样品储存

基线提取在采集后三小时内进行。对于基线分析，从OMNIGENE[®]•GUT样品中取出一份0.25mL等分样品，并使用PowerFecal[®]DNA分离试剂盒 (MO BIO Laboratories, Inc.) 提取DNA²。每份0.25mL样品含有约50mg粪便和200µL稳定液。从新鲜样品中提取等量的粪便（约50mg）。

DNA分析

使用Quant-iT[™] PicoGreen[®]试剂 (Life Technologies) 测定DNA浓度和产量。使用0.8%琼脂糖凝胶分离约50ng纯化DNA并用溴化乙锭染色来评估DNA完整性。使用Lambda Hind III梯度来确定纯化DNA的大小。

实时荧光定量PCR

为了评估与第三方DNA分离试剂盒的兼容性，使用PCR效率（通过Cq值测量）的变化来检测可能遗留的抑制剂。使用16S rRNA实时PCR扩增来自3位供者的OMNIGENE[®]•GUT稳定化样品和新鲜样

品中的粪便微生物DNA。PCR引物选自己知存在于各种微生物中的保守16S rRNA基因区域，而且该区域不存在于真核生物中。引物序列为BacrRNA173-F 5'ATTACCGCGGCTGCTGG 3'和BacrRNA173-R 5'CCTACGGGAGGCAGCAG 3'。从每个待测样品中取出20ng总DNA。使用2.5ng至80ng大肠杆菌DNA的2倍连续稀释生成标准曲线。所有实时PCR均在Corbett Life Sciences Rotor-Gene™上进行。使用默认定量分析和内置软件Rotor-Gene™6000 (版本1.7) 计算OMNIgene•GUT样品和未稳定化处理的样品的C_q值。使用 $\Delta\Delta C_q$ 方法量化扩增差异³。

16S rRNA测序

由Metanome微生物组发现服务部进行16S rRNA文库制备、测序和生物信息学分析，并由Resphera Biosciences提供附加分析。使用Illumina® MiSeq®进行V4高变区配对末端扩增子测序。使用长达500nt的扩增子，每份样品读取的碱基数平均达到25000个。使用QIIME和定制序列过滤测得的序列的质量。组织读取的配对末端序列并与Greengenes参考数据库比对，用UCLUST法分析，聚集度为96%。使数据标准化后，使用操作分类单元(OTU)丰度数据的Bray-Curtis距离测量两个样品之间的距离(将所有丰度的总和除以差异性的总和，得到成对归一化)。使用Mann-Whitney检验比较样品采集方法。

结果与讨论

OMNIgene•GUT确保采集的粪便样品量一致

按照材料和方法部分中所述的采集方法采集了18份样品后，测试了其OMNIgene•GUT的体积性质。采用标准OMNIgene•GUT用户采集方案采集的样品含有2mL稳定液，粪便量平均为613±144mg(平均值±标准偏差)，最少为400mg(图2)。因此，基于0.25mL样本量(使用PowerFecal DNA分离试剂盒提取DNA)，每份等分OMNIgene•GUT样品含有至少50mg粪便。

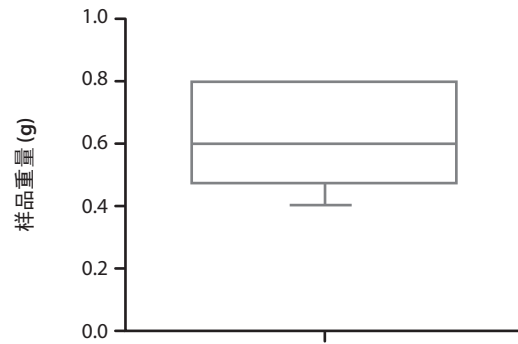


图2: 18份OMNIgene•GUT样品(6位供者各自采集3份样品)中包含的粪便样品量(g)。箱形图从底部到顶部代表最小值、第25百分位、中值、第75百分位。

用OMNIgene•GUT采集的粪便样品可提供可靠的DNA产量和浓度

OMNIgene•GUT采集的样品的总DNA产量为 $19.18 \pm 8.89 \mu\text{g}$ (平均值±标准偏差)，90%的样品总DNA产量 $\geq 7.6 \mu\text{g}$ 。从同一OMNIgene•GUT样品多次提取的等分样品的DNA产量具有高度可重复性(见图3中“组内变异性”)，表明OMNIgene•GUT能够完全均质化粪便样品并获得一致的等分样品。

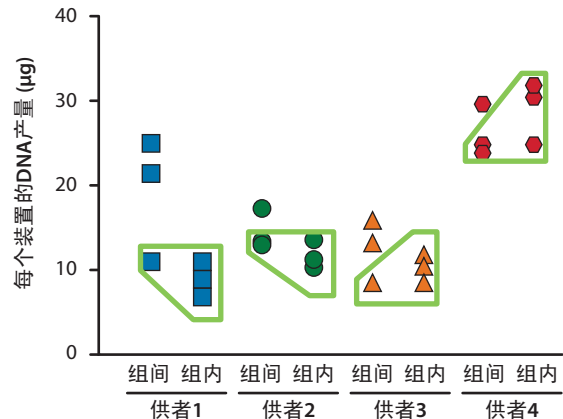


图3: OMNIgene•GUT样品的总DNA产量(μg)。该图表示组间变异性(同一块样品的三个部位)和组内变异性(同一OMNIgene•GUT样品的三份等分样品，如绿框所示)。

来自OMNIgene-GUT的DNA产量足以用于下游测序应用。

每份0.25 mL等分样品 (约50mg粪便) 的DNA产量平均为 $2.40 \pm 1.11 \mu\text{g}$ (平均值 \pm 标准偏差)。鉴于16S rRNA文库制备通常需要每次测定至少5ng纯化DNA, 并且宏基因组测序需要每个文库制备测定至少100ng DNA, 单份OMNIgene-GUT样品就能够提供足够的DNA用于至少3500次16S测序分析和190次宏基因组测序分析 (表1)。

	16S rRNA 测序	宏基因组 测序	无PCR的 测序
样品量要求 (每份样品)	约5ng	约100ng	1-2 μg
单份等分 OMNIgene-GUT样品可进行的分析次数 [†]	>475	>20	2
单份OMNIgene-GUT样品可进行的分析总次数 [†]	>3500	>190	9

表1: 每份OMNIgene-GUT样品可进行的测序分析次数。

[†]基于平均总DNA产量。

从OMNIgene-GUT采集的样品中能够稳定地提取高分子量DNA

由于PCR的竞争性质, 微生物组样品中DNA降解可引入偏倚, 因为较小的DNA片段可能优先扩增。因此, 尽量减少粪便样品中DNA降解对确保准确的微生物组态结果至关重要。如琼脂糖凝胶电泳评估所显示, 从OMNIgene-GUT样品中提取的DNA的分子量大于10kb (图4), 从而减少了基于PCR的下游应用中潜在的偏倚来源。

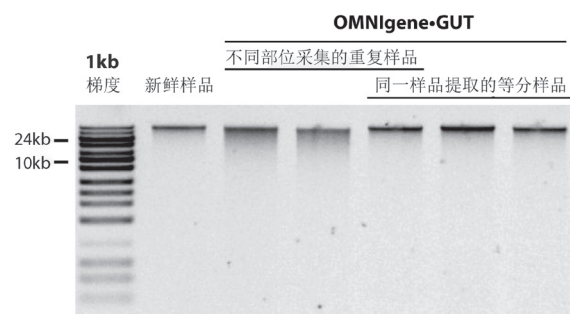


图4: 琼脂糖凝胶电泳分离一位代表性供者采集的新鲜样品和OMNIgene-GUT粪便样品。不同部位采集的重复样品是指从一位供者的一份粪便样品中多次采集而成的样品。同一样品提取的等分样品是指单份重复样品的等分样品。

从OMNIgene-GUT稳定化样品中提取的DNA表明其适用于下游应用且性能优良。

粪便样品中含有数种PCR抑制剂, 包括腐植酸、多酚、多糖和血红素等。商业采集套件包括有效的去除抑制剂的系统, 确保在下游应用中性能不受影响。

评估了OMNIgene-GUT采集的样品与PowerFecal DNA分离试剂盒的兼容性。三位供者各自从同一块粪便样品中采集了一份新鲜样品和一份OMNIgene-GUT样品。从每份等分样品中提取DNA。通过等量DNA的16S rRNA实时PCR确定DNA性能。从对照样品或OMNIgene-GUT样品中提取的DNA之间没有观察到Cq值有显著差异, 表明OMNIgene-GUT稳定方法不影响抑制剂的去除, 也不影响实时PCR的性能 (图5)。

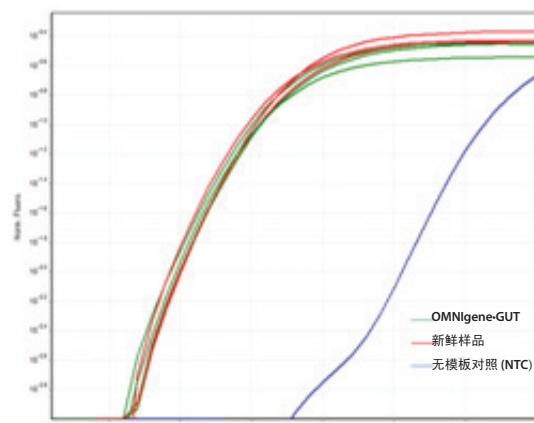


图5: 使用3位供者采集的OMNIgene-GUT样品或新鲜样品通过实时16S rRNA PCR提取的粪便DNA ($\Delta\Delta Cq = 0.54$)。

NTC: 无模板对照。

OMNIgene-GUT稳定液保持了中性微生物组态并且未引入偏倚

使用化学稳定缓冲液可能会通过加速某些微生物的生长, 同时允许其他某些微生物凋亡, 从而改变样品的微生物组成。在理想条件下, 稳定液应该是中性的 (即不应导致微生物组出现任何偏倚)。为了测试中性, 通过16S rRNA测序比较了新鲜样品和OMNIgene-GUT采集的样品。通过16S rRNA测序得到的微生物组态的Bray-Curtis分析表明OMNIgene-GUT不会将任何偏倚引入微生物组态。

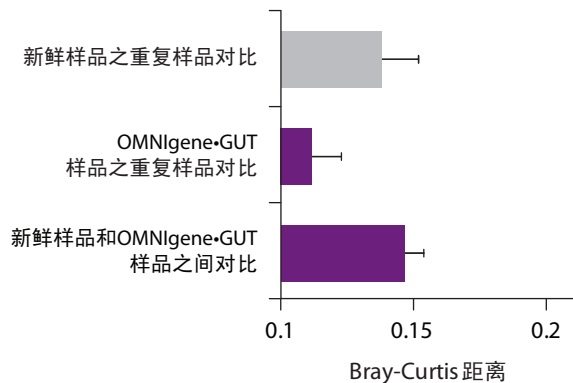


图6: 供者匹配的新鲜样品和OMNIgene-GUT采集的粪便样品的重复样品和组间对比的不相似性。Bray-Curtis分析显示新鲜样品和OMNIgene-GUT样品之间的不相似性没有统计学差异。

结论

OMNIgene•GUT提供了一种采集含有足够材料的样品的方法，以便进行全微生物组关联研究，以建立文库并共享用于重复分析。OMNIgene•GUT稳定液与市售提取流程兼容，而且DNA质量适用于下游应用，包括qPCR和测序。此外，OMNIgene•GUT能够保持DNA完整性，从而尽可能减少常用微生物组态应用中的偏倚。OMNIgene•GUT的独特功能使研究参与者自己进行重复、可靠的采集，从而推动人群全微生物组关联研究。

参考文献

- 1 Manual of Procedures - Human Microbiome Project (2010).
- 2 OMNIgene•GUT gut microbial DNA purification using MoBio PowerFecal DNA Isolation Kit. DNA Genotek. PD-PR-00434.
- 3 Pfaffl, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29(9): E45 (2001).

OMNIgene•GUT (OM-200) 不在美国销售。

OMNIgene•GUT (OMR-200) 仅用于研究，不得用于诊断程序。

某些DNA Genotek产品可能并不在所有地区提供。

*OMNIgene是DNA Genotek Inc.的注册商标。此处包含的其他所有品牌和名称均为其各自所有者的财产。

所有DNA Genotek方案、白皮书和应用说明均在我们网站www.dnagenotek.com的“支持”部分提供。