

部 (DNA Genotek) 对一部分样品进行测序。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 数据库比对, 用 UCLUST 法分析, 聚集度为 96%。标准化数据后, 使用操作分类单元 (OTU) 丰度数据的加权 UniFrac 和 Bray-Curtis 距离测量两个样品之间的距离 (采用多个样品在各分类水平上的丰度差异; 将检测到的所有 OTU 丰度的总和除以差异性的总和, 得到成对归一化)。在所有 Bray-Curtis 测量中, 将采集后不久提取的供者匹配的 T0 样品用作成对比较中的一个样品。通过测量每个 OTU 相对于 OTU 总数的比例, 然后乘以该比例的自然对数, 来分析每种稳定方法的香农指数 (SI)。对所有 OTU 产生的乘积求和, 得出每个样品的香农指数。使用 Mann-Whitney 检验比较样品采集方法。

结果

OMNIgene•GUT 稳定液在采集点保持了微生物组态的中性

微生物组研究要求生成的微生物组态代表供者体内存在的微生物群落。因此, 采集和稳定方法不得改变微生物组。

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)。比较新鲜样品和 OMNIgene•GUT 稳定化样品的 16S rRNA 微生物组态表明, 稳定液保持中性并且没有引入偏倚 (图 1)。

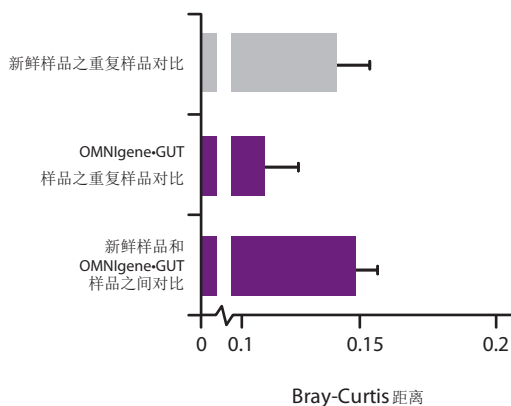


图 1: 新鲜样品和 OMNIgene•GUT 采集样品的重复样品和组间对比的 Bray-Curtis 不同距离。Mann-Whitney 检验显示在所有条件下差异都具有可比较性, 没有观察到统计学差异。

通过不同的统计学方法 (例如加权 UniFrac) 研究相对 OTU 丰度, 对微生物群落提供了有价值的描述, 但这些方法可能会减少低丰度微生物的贡献, 从而影响对微生物群落的理解。要正确研究微生物组态, 需要保存微生物群落的“丰富度”。丰富度定义为样品中存在的微生物物种或 OTU 的数量, 并且对环境条件 (包括温度、pH 值、氧浓度和化学组成) 的变化高度敏感。这些因素和其他因素可能会诱发细菌生长或凋亡, 从而改变样品中检测到的 OTU 数量³。

在采集不久后提取来自 6 位供者的新鲜样品和 OMNIgene•GUT 采集的样品。将 OMNIgene•GUT 样品中鉴定的微生物 OTU 与相应新鲜样品中存在的 OTU 进行比较。通过将 OTU 丰度数据转换成“存在”/“不存在”结果来计算代表多样性的香农指数 (SI)。对香农指数值进行 Mann-Whitney 检验, 显示 OMNIgene•GUT 样品和新鲜样品之间没有显著差异, 表明 OMNIgene•GUT 对样品的丰富度没有影响 (图 2)。

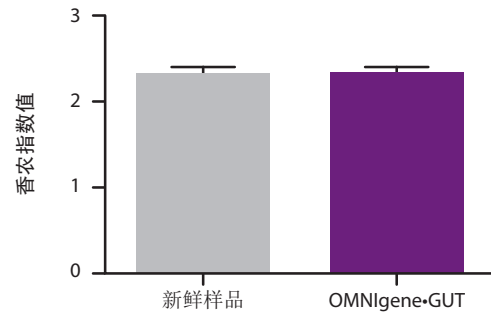


图 2: OMNIgene•GUT 保持样品丰富度。通过各 OUT 的“存在”/“不存在”结果并使用香农指数进行比较来评估丰富度。Mann-Whitney 检验显示, 新鲜样品和 OMNIgene•GUT 样品之间没有显著差异。

粪便样品采集中的变异性来源

Bray-Curtis 分析显示, 新鲜样品和 OMNIgene•GUT 样品的重复样品之间有系统差异。为了解这种不相似性的来源, 我们评估了粪便样品采集和处理过程中引入的变异性。采用从同一块样品中不同部分采集的 3 份新鲜样品和 3 份 OMNIgene•GUT 样品生成微生物组态来评估生物变异性。使用 OMNIgene•GUT 采集的样品评估技术变异性, 是因为该采集系统提供均质的液体样品, 从而减少处理过程中的实验误差。我们比较了来自同一试管的重复 DNA 提取谱 (提取变异性) 和来自同一 DNA 的重复文库制备谱 (测序变异性) (图 3)。在重组内生成 Bray-Curtis 不相似距离。

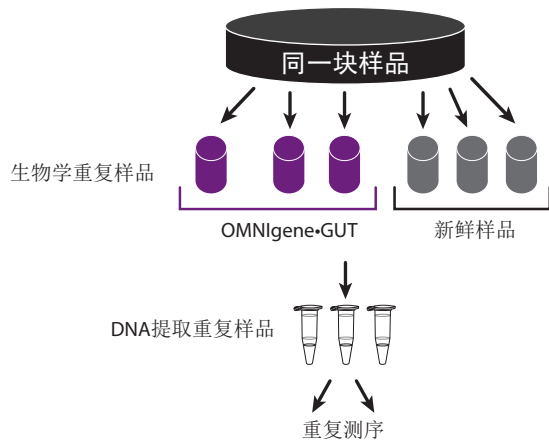


图3: 每位供者的样品采集方案。6位供者各自从同一块样品的三个不同部位采集样本。此外，对1份OMNIgene-GUT样品(紫色)进行重复3次DNA提取，并将提取的1份DNA等分成三份，进行16S rRNA测序。

在新鲜样品和OMNIgene-GUT采集的样品的生物学重复样品中观察到类似的变异性 (Bray-Curtis距离分别为 0.14 ± 0.01 和 0.11 ± 0.01) (图4)。我们的分析表明，技术和生物学变异性将一定的不相似引入16S rRNA微生物组态 (Bray-Curtis距离生物学变异性为0.11，提取变异性为0.09，测序变异性为0.08)。我们认为，观察到的不相似的来源可以用技术或生物学变异性来解释，而OMNIgene-GUT不会引入任何偏倚。

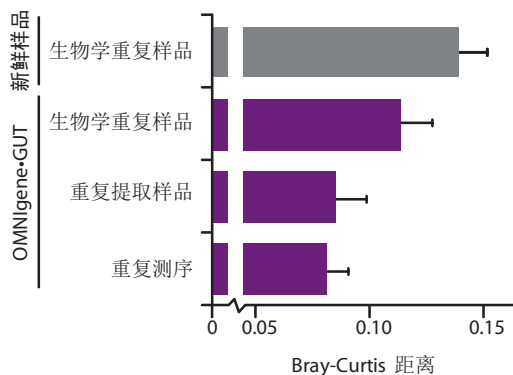


图4: OMNIgene-GUT样品呈现高度可重复性微生物组态。Bray-Curtis距离的Mann-Whitney检验显示三份重复样品的差异具有可比性。

OMNIgene-GUT保持微生物组态长达60天

除了保持微生物组态中性外，MWAS还需要随时间准确保存微生物群落结构。我们评估了OMNIgene-GUT在23°C长达60天的储存条件下并暴露于模拟运输条件下稳定样品的能力 (见下一节)。

在基线 (T0) 并再次在室温 (23°C) 下储存14和60天后提取OMNIgene-GUT稳定化样品。在基线 (T0, 新鲜样品) 和室温 (23°C) 下储存14天后或在-80°C下储存14天后提取未稳定化处理的配对样品 (图5)。使用Bray-Curtis距离评估基线和储存后样品的相似性。Mann-Whitney分析显示，在23°C下储存60天的OMNIgene-GUT样品和在-80°C下储存14天的未稳定化处理的样品的Bray-Curtis距离没有显著差异。而在23°C下储存60天的OMNIgene-GUT样品或在-80°C下储存14天的未稳定化处理的样品和在23°C下储存14天的未稳定化处理的样品的Bray-Curtis距离有显著差异。

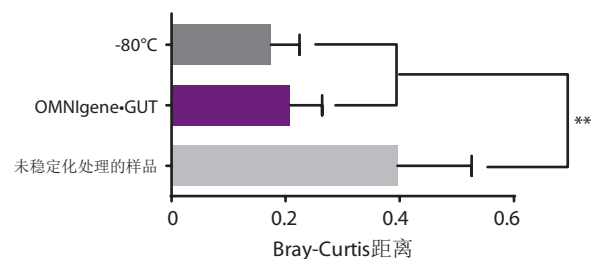


图5: 未稳定化处理的样品 (23°C下14天)、OMNIgene-GUT样品 (23°C下60天) 和-80°C下储存的样品 (-80°C下14天) 与新鲜样品之间的Bray-Curtis距离不同。使用Mann-Whitney分析评估差异的显著性 (** $P \leq 0.001$)。

为了了解重复样品之间的可重复性，使用新鲜样品 (T0)、未稳定化处理的样品 (23°C下14天 [T14]) 和OMNIgene-GUT稳定化样品 (T0, 23°C下14天 [T14]) 的生物学重复样品进行加权UniFrac的聚类分析 (图6)。新鲜生物学重复样品和T0和T14 OMNIgene-GUT生物学重复样品紧密聚集 (96%相似性)。未稳定化处理的生物学重复样品聚集在一起，与新鲜生物学重复样品高度分离 (约63%相似性)。因此，适当的稳定化处理对随时间推移的微生物集群有很大的影响。

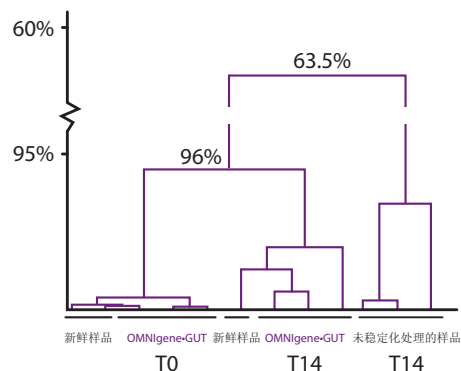


图6: 代表性供者的微生物组加权UniFrac相似性百分比的树状图。对每种条件评估提取的3份生物学重复样品。与新鲜样品对比，低相似性百分比表明随时间推移微生物组态出现变化。

OMNIgene•GUT有效地在运输过程中保存了微生物组态

从采集点到样品处理实验室的运输过程中，样品通常会在不理想的条件下暴露。为了模拟标准运输条件，将未稳定化处理的样品和OMNIgene•GUT稳定化样品暴露于50°C达3天、37°C达3天，或多次冻融周期。OMNIgene•GUT稳定化样品保存了高分子量DNA带，而未稳定化处理的样品显示出不同程度的降解，特别是当暴露于50°C或冻融周期时(图7)。

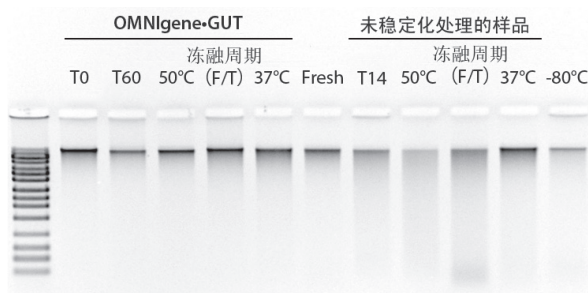


图7: OMNIgene•GUT样品在模拟运输条件下的DNA完整性。来自代表性供者的OMNIgene•GUT样品储存在23°C下60天(T60)、50°C下3天(50°C)、37°C下3天(37°C)，或暴露于6次冻融周期(F/T)。-将来自同一供者的、未经稳定化处理的样品储存在23°C下14天(T14)、50°C下1天(50°C)、37°C下3天(37°C)。或-80°C下14天(-80°C)。

16S rRNA分析证实，OMNIgene•GUT样品即使在极端温度下也能保持微生物群落结构。Mann-Whitney检验比较了暴露于常见运输温度的OMNIgene•GUT样品和储存在-80°C下的配对样品的Bray-Curtis距离，结果显示没有显著差异。相反，储存在37°C下或经受冻融周期的未稳定化处理的样品与储存在-80°C下的样品相比有显著差异(图8)。

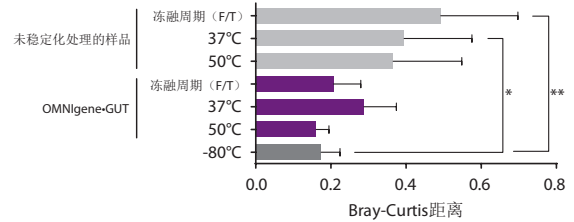


图8: 暴露于模拟运输条件的OMNIgene•GUT样品的Bray-Curtis距离不相似性(如图7所示)。Mann-Whitney检验显示，在不同温度下储存的OMNIgene•GUT样品与储存在-80°C下的未稳定化处理的样品之间没有显著差异。储存在37°C下或经受冻融周期(F/T)的未稳定化处理的样品和配对-80°C样品之间观察到显著差异(* $P \leq 0.05$ 和** $P \leq 0.01$)。

结论

在宏基因组学的背景下，稳定是一个多维属性，包括：

- 中性(捕捉无偏倚组态的能力)
- 可重复性(可从中提取高度一致的等分样品的均质样品材料)，以及
- 随时间测量的DNA完整性(分子量)。

基于严格控制的实验和严格的分析，OMNIgene•GUT是第一种也是唯一一种经验证在室温下有效稳定人体粪便中肠道微生物群长达60天的装置，而且还能在实际运输和处理条件以及冻融周期期间稳定肠道微生物群。这对于高成本效益的MWAS扩展以及确保有效的生物标志物发现和研究应用至关重要。

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 The Open Microbiology Journal, 3, 40-46 (2009).

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理区域提供。
*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。
对于所有DNA Genotek方案、白皮书和应用说明，详见我们网站www.dnagenotek.com的“支持”部分。