



## OMNIgene®•GUT可用于轻松地自行采集和稳定液体粪便样本， 以便用于微生物组分析。

Ashlee Brown, Denise Lynch, Anne Bouevitch, Evgueni Doukhanine

DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

2018年10月3日

OMNIgene®•GUT是一种一体化系统,可用于轻松地自行采集和稳定粪便中的微生物DNA,用于肠道微生物组分析。在本文件中,我们描述了OMNIgene®•GUT在有克罗恩病和慢性结肠炎症状(Bristol 6型和7型)的供者中采集和稳定肠道微生物组谱的可重复性能。

### 前言

精确复原微生物谱对研究肠道微生物组动态和宿主健康之间的关系至关重要。在过去,研究人员采用在4°C下运输或干冰包装等方法,在提取核酸之前保存粪便样本。随后,研究人员发现这些方法成本过高或无法准确捕获体内微生物组态,可导致分类学偏倚。此外,随着研究人员迅速转向从大型队列和/或存在生态失调的供者采集肠道微生物,采用一种易于使用、准确且经过验证的样本采集方法对于尽可能提高生成数据的价值和供者依从性至关重要。

与加拿大克罗恩病和结肠炎组织合作,本研究评估了供有克罗恩病和慢性结肠炎症状的供者在家里自行采集样本的OMNIgene®•GUT采集套件的兼容性和性能。评估指标包括:在不同时间点,供者依从性、DNA产量和质量以及样本保存情况。这些数据旨在将OMNIgene®•GUT的性能扩展到新用途中,目的是扩展肠道微生物组研究人员的工具箱,帮助他们成功完成独特的队列研究。

### 材料与amp;方法

#### 样本采集

OMNIgene®•GUT套件由加拿大克罗恩病和结肠炎组织招募且未经培训的供者用于自行采集粪便样本。每位供者从同一块粪便样本中采集两份样本,并使用不同的工具采集每份样本。工具和说明如下:标准OMNIgene®•GUT抹刀和DNA Genotek勺子配件(OM-AC2),专为患有生态失调的供者而设计。用OMNIgene®•GUT采集的样本以及来自同一供者的新鲜粪便样本块在采集当天交给采集协调员。根据人类微生物组项目标准程序<sup>1</sup>,使用冷链运输样本块。将采集后的套件称重并与采集前的套件的平均重量进行比较,以确定采集的粪便样本量。

将样本块在4°C下过夜储存,然后分配到三个OMNIgene®•GUT套件和两个不含稳定剂溶液的5mL试管中。

#### DNA提取和样本储存

在分配样本块后一小时内进行基线提取。提取时,使用改良的重复珠粒打浆方案(Yu和Morrison, 2004)<sup>2</sup>提取0.35mL等份的稳定化样本或60mg未稳定化处理/新鲜样本。简言之,改良的提取方案包括将裂解缓冲液减少至950µL,而且每个提取管中将0.5mm珠粒用替换为两个3mm珠粒和4个2mm珠粒。基线提取后,将OMNIgene®•GUT样本在室温(23±3°C)下保存60天,暴露于模拟运输条件(50°C, 3天)或进行3个冻融周期(每个周期包括-20°C,至少3小时;35°C,至少3小时),然后在-20°C下储存60天,之后再次进行3个冻融周期。将未稳定化处理的粪便等分试样在室温下储存14天,并将另一份等分试样在-80°C下储存60天。在每个时间点进行与基线方案相同的提取步骤。

#### DNA分析

使用Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA试剂(Invitrogen)测定DNA浓度和产量。通过在0.8%琼脂糖凝胶上运行大约70ng纯化DNA并用溴化乙锭染色来评估DNA完整性。UltraRanger 1kb DNA阶梯(Norgen)用于测定纯化DNA的大小。

#### 16S测序

16S rRNA文库制备、测序和生物信息学在DNA Genotek内部GenoFIND™服务部进行。在Illumina® MiSeq®平台上用PE-300 V3试剂盒进行V3-V4高变区配对末端扩增子测序。将配对末端测序序列合并,筛选长度,并使用专有DNA Genotek脚本过滤质量。使用NINJA-OPS算法(版本1.5.1)将过滤后的序列与GreenGenes参考数据库比对(97%同源性)。取决于具体研究,将样本稀疏至每个样本20,000或25,000个碱基对序列。删除在任何样本中每个样本计数不存在超过10个的操作分类单位(OTU),并尽可能在物种级别(L7)折叠所有剩余的OTU,否则会分配最高的可用分类分辨率。使用QIIME(版本1.9.1)在折叠的OTU表上计算

Shannon alpha多样性和Bray-Curtis相异度。LEfSe (线性判别分析效果大小)用于确定是否有任何生物体在两个时间点之间存在差分丰度(Segata等, 2011)。<sup>3</sup>

## 结果

供者填写调查, 以评估套件的易用性并确定自己的Bristol粪便类型。加拿大克罗恩病和结肠炎组织协助招募了供者, 目标是招募活跃性炎症性肠病 (IBD) 患者。正如预期的那样, 并非所有供者在采集当天都排出Bristol 6型或7型粪便, 65%的供者自我报告Bristol 6型或7型(图1)。结果和讨论将主要侧重于这些供者的样本。

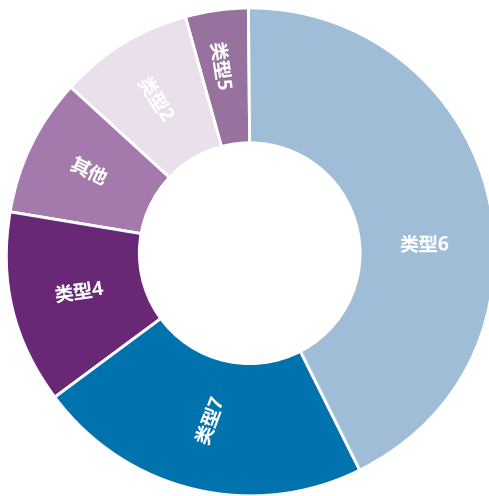


图1. 供者报告的Bristol粪便类型的分布。65%的供者自我报告Bristol 6型或7型。“其他”包括在调查中自我报告多种类型的供者。

要求供者用抹刀或取样勺填满OMNIgene•GUT套件中的容积腔。所有Bristol 7型供者都优选取样勺, 并采集了580±120mg(平均值±标准偏差), 最少430mg。Bristol 6型及以下供者通常优选抹刀, 并采集了560±160mg(平均值±标准偏差), 最少330mg。因此, 基于0.35 mL提取量, OMNIgene•GUT样本每次提取时至少含有50 mg粪便(图2)。两种取样工具均成功用于在OMNIgene•GUT套件中采集所需的粪便量。

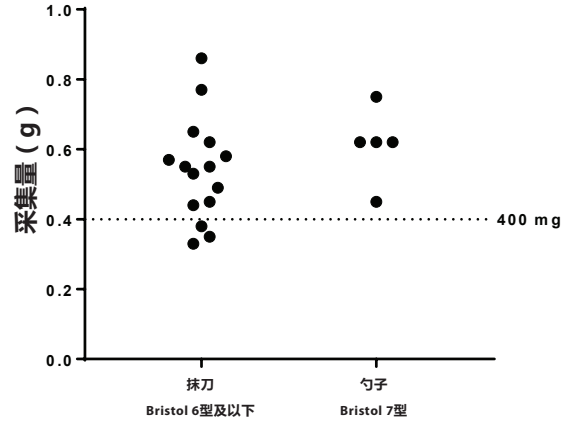


图2. 使用每个供者首选工具 (Bristol 6型及以下: 抹刀, Bristol 7型: 勺子) 采集到OMNIgene•GUT中的粪便样本量。对于这两组供者, 优选工具都采集了足够的样本, 每350μL提取量中含有至少50mg粪便。

## 使用OMNIgene•GUT从生态失调供者采集的样本提供一致的DNA产量和质量, 足以用于下游测序应用。

采集到OMNIgene•GUT套件中的Bristol 6型和7型样本的DNA总量为31.43±25.67μg(平均值±标准偏差), 其中90%的样本>4.05μg。多次提取同一OMNIgene•GUT样本时, 不同时间点DNA的产量是可重复的(见图3“样本内变异性”), 表明OMNIgene•GUT能够完全均质化样本并提供一致的样本等分试样。

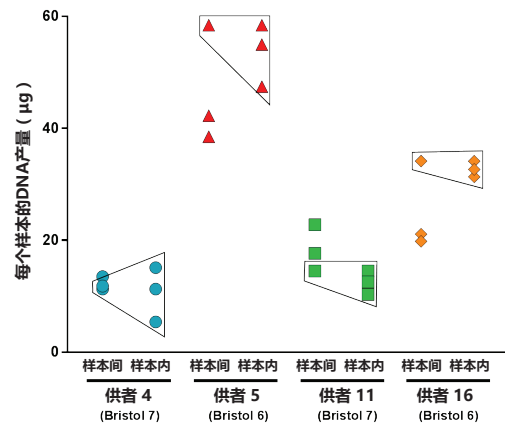


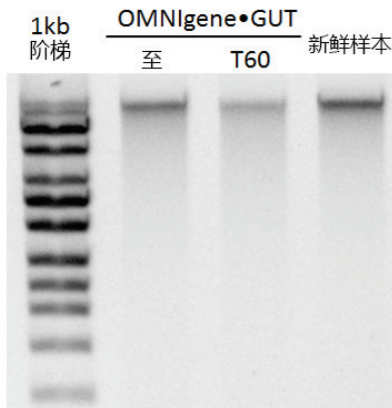
图3. 使用OMNIgene•GUT采集的代表性Bristol 6型和7型样本的DNA总量。该图显示来自同一块粪便的OMNIgene•GUT样本的样本间变异性以及来自同一OMNIgene•GUT样本的提取等分试样的样本内变异性 (如方框所示)。

每0.35mL OMNIgene•GUT提取等分试样的平均DNA产量为4.49± 3.67μg(平均值±标准偏差)。考虑到目前对测序分析的最小DNA输入要求,生态失调供者采集的单份OMNIgene•GUT样本足以以为这些分析提供足够的DNA(表1)。

	16S rRNA测序	宏基因组测序	无PCR测序
分析输入要求(每个样本)	约50ng	约100ng	1-2μg
每个OMNIgene•GUT提取等分试样可进行的检测次数 <sup>†</sup>	> 800	> 40	4
每个OMNIgene•GUT样本可进行的检测次数 <sup>†</sup>	> 6000	> 300	31

**表1.** 每个OMNIgene•GUT 样本的测序分析次数。<sup>†</sup>基于平均DNA产量和每个样本7个提取等分试样的假设。

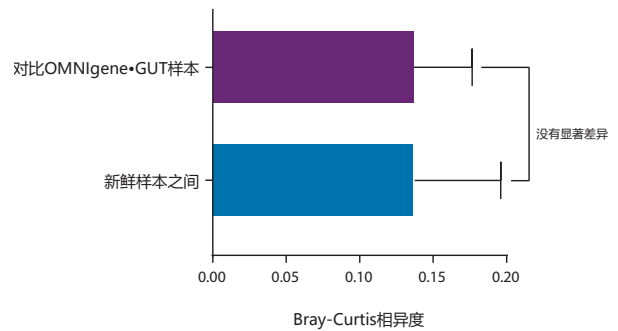
从OMNIgene•GUT样本提取的DNA分子量大于10 kb, 从而减少了基于PCR的下游应用中可能优先扩增较小DNA片段的潜在偏倚(图4)。



**图4.** 来自一位代表性Bristol 7型供者的OMNIgene•GUT和未稳定化处理的粪便样本的琼脂糖凝胶电泳。在基线和在室温下储存60天后提取并稳定样本, 还在基线时提取了来自匹配供者的对照新鲜样本。

### 在OMNIgene•GUT中维持了生态失调供者的微生物组谱中性。

微生物组研究的重要一点是采集的样本能够代表供者体内的微生物群落。在-80°C下储存仍然是保存微生物群的标准, 但在许多情况下并不可行或成本高昂, 特别是在家里采集样本时。使用化学稳定缓冲剂, 可无需额外费用, 也没有冷链保存的不便, 但需要证明中性, 即微生物谱不会因DNA降解或特定微生物的生长而改变。通过比较OMNIgene•GUT基线与新鲜样本提取建立了中性, 然后对基线新鲜样本的重复提取之间的相异度进行了统计学检测(图5)。没有发现统计学意义, 证实OMNIgene•GUT内稳定化处理未引入超过通过生物取样通常会观察到的微生物组谱变化。

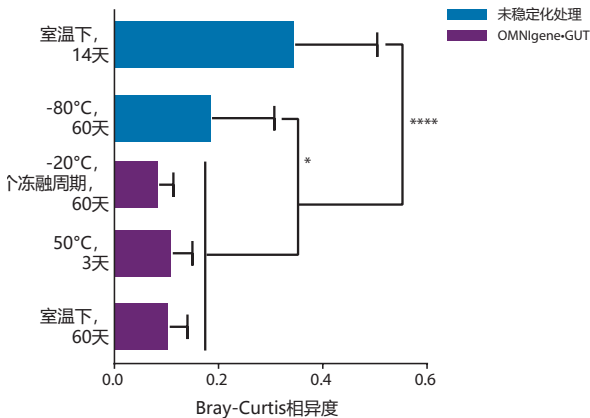


**图5.** OMNIgene•GUT基线与新鲜样本之间的Bray-Curtis相异度(以紫色标记)以及新鲜等分试样之间的基线变异性(以蓝色标记); 两组相异度值之间未发现统计学差异。新鲜等分试样的Bray-Curtis相异度结果(以蓝色标记)来自OMNIgene•GUT验证研究<sup>4</sup>, 该研究中包括了来自28位供者的三份等分试样。

### 生态失调供者的肠道微生物组谱在OMNIgene•GUT中保存长达60天。

OMNIgene•GUT样本在室温下保存60天, 并暴露于模拟运输条件: 在50°C下储存3天以及冻融周期, 冻融周期期间在-20°C下储存60天。此外, 将未稳定化处理的对照样本等分试样在室温下储存14天, 然后在-80°C下储存60天。使用Bray-Curtis相异度分析评估基线和储存后样本的微生物组谱变化(图6)。正如预期的那样, 在室温下储存14天后, 未稳定化处理的样本显示Bray-Curtis相异度自基线大幅增加。Mann-Whitney分析显示, 无论是在-80°C下还是在室温下储存, OMNIgene•GUT样本和未稳定化处理的样本之间都存在显著差异。这表明与未稳定化处理的样本相比, 在-80°C下储存时, 生态失调供者使用OMNIgene•GUT采集的粪便样本随时间的推移微生物组谱的变化要明显少得多。





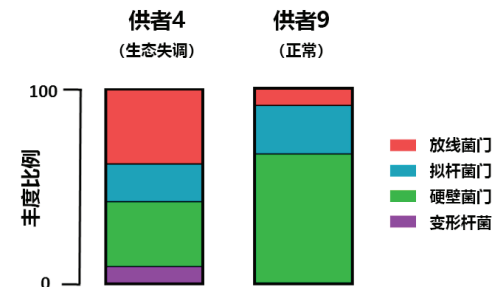
**图6.** 生态失调供者使用OMNIgene-GUT采集并暴露于储存和模拟运输条件的粪便样本的Bray-Curtis相异度。通过比较基线样本和与其配对的储存样本的微生物谱来得出相异度。与配对OMNIgene-GUT (以紫色标记) 稳定样本相比, 在室温或-80°C下储存的未稳定化处理 (以蓝色标记) 的样本的微生物组谱变化观察到显著差异 ( $P$ 值分别为 $*P \leq 0.05$ 和 $****P \leq 0.0005$ )。

此外, 对在室温下储存了14天的未稳定化处理的样本进行了LEfSe分析与基线比较, 发现了13个从科级到种级的显著分类差异。而OMNIgene-GUT粪便样本在室温下储存60天或暴露于模拟运输条件后, 未发现显著差异。作为对照, 对在采集后立即在80°C下储存了60天(直至提取)的粪便样本进行LEfSe分析, 未发现显著差异。这些证据表明, OMNIgene-GUT套件可有效稳定生态失调供者采集的粪便中的微生物组信号, 从而允许扩展储存条件而无需冷链。

### 与炎症性肠炎相关的微生物富集和消耗可在生态失调供者的肠道微生物组谱中观察到。

我们在该队列中共观察到17个结肠克罗恩病(CD)的微生物标记物, 与对照供者相比, 其中53%的标记物符合文献报道的富集和消耗趋势(Walters, Xu和Knight, 2014)<sup>5</sup>。例如, 与对照相比, 狄氏副拟杆菌在

生态失调供者中消耗量高14倍。我们还观察到共23个回肠克罗恩病(ICD)的微生物标记物, 其中65%的标记物符合文献报道的趋势(Walters, Xu和Knight, 2014)<sup>5</sup>。例如, 在我们的生态失调队列中, 我们观察到两异韦荣球菌富集(约35倍)。这些有关结肠和回肠克罗恩病的结果是初步的, 其余不符合文献报道趋势的数据可能与特定队列或研究规模有关。有关炎症性肠病相关微生物的文献报道的广泛分类学变化包括硬壁菌门和拟杆菌门消耗以及变形杆菌和放线菌门富集(Sartor和Mazmanian, 2012)<sup>6</sup>, 在我们的队列中也观察到类似的趋势(图7)。



**图7.** 代表性供者的门级丰度图表, 显示先前文献报道的炎症性肠病相关微生物的消耗和富集趋势。

## 结论

OMNIgene-GUT套件提供了有效采集和稳定生态失调供者的微生物组谱的方法。这些粪便样本为软便或液体状, 这在炎症性肠病、克罗恩病或慢性结肠炎患者中很常见。勺子配件的直观设计与OMNIgene-GUT相结合, 让供者更容易在家里采集样本。在OMNIgene-GUT中采集的样本可以有效回收DNA, 其产量和质量足以满足多种下游应用。此外, 这些样本保持其微生物谱中性而没有任何引入偏倚。因此, 可以准确地确定供者体内的生态失调情况。在室温和各种运输条件下, 微生物谱可保持可达60天, 便于建立样本库并重复分析。

## 参考文献

- Manual of Procedures – Human Microbiome Project (2010).
- Yu, Z. and Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, 36(5): 808–812.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S. and Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <http://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- PD-WP-00040: OMNIgene-GUT enables reliable collection of high quality fecal samples for gut microbiome studies (2014).
- Walters, W.A., Xu, Z. and Knight, R. (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters*, 588. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.039>
- Sartor, R.B. and Mazmanian, S.K. (2012). Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol. Suppl.*, 1: 15-21. <http://doi.org/10.1038/ajgsup.2012.4>

OMNIgene-GUT (OM-200) 尚未在美国上市。

OMNIgene-GUT (OMR-200) 仅供研究使用, 不得用于诊断程序。

某些DNA Genotek产品可能并非在所有地区都提供。

\*OMNIgene是DNA Genotek Inc.的注册商标, GenoFIND™是DNA Genotek Inc.的商标。此处包含的所有其他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网站www.dnagenotek.com的支持部分提供。