OMNIgene®·GUT

为获取准确可靠的肠道微生物组样本结果，评估DNA提取方法

OMNIgene®•GUT最佳提取方法指南

B. LeFrançois 和 L. Cunningham
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada 2019年1月10日

前言

对于涉及来自粪便等复杂环境的微生物群落分析，技术方面的差异（如采集程序、储存条件和样本提取）会极大地影响数据的准确性。与样本稳定缓冲液结合使用，可避免采集后样本中微生物谱出现变化。必须选择能够获得足量和高质量微生物核酸的提取方法，才能对这些复杂群落进行有意义和可靠的分析。

目前缺乏用于从任何类型的粪便样本有效回收DNA的标准化或优化提取方法，多年来开发的大多数方法依赖于微生物细胞的机械和/或酶促裂解来释放DNA。提取方法的裂解步骤在DNA回收效率中起关键作用，特别是对于具有挑战性的样本基质（存在纤维或未消化的颗粒）或低生物量样本（如婴儿或存在生态失调的供者）。最近对提取方案的比较表明，机械裂解（即珠粒打浆）对于从难以裂解的革兰氏阳性细菌中有效地释放DNA至关重要，并与样本多样性正相关。[1]

DNA Genotek的OMNIgene•GUT采集和稳定套件采用可靠的方法，可以在采集时轻松准确地捕获粪便样本中存在的微生物群落。[2]在本应用说明中，我们测试并比较了四种常用的基于珠粒打浆的DNA提取方法对使用OMNIgene•GUT套件采集的粪便样本的提取性能。

方法

根据IRB指南用OMNIgene•GUT采集了八名成人供者的粪便样本，然后用 **QIAamp® PowerFecal® DNA**试剂盒（**QIAGEN®**）、**QIAamp PowerFecal Pro DNA**试剂盒（**QIAGEN**）、**RBB+C**方法[3]或 **ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep**试剂盒（**Zymo Research**）从250µL等分试样中提取了DNA。用OMNIgene•GUT采集样本后72小时内提取了DNA。对这四种方法比较了DNA产量、裂解效力以及回收DNA的质量和完整性。

对于PowerFecal（QIAamp PowerFecal DNA 试剂盒）和PowerFecal Pro（QIAamp PowerFecal Pro DNA 试剂盒）提取物，使用2mL试管涡旋适配器（QIAGEN）进行珠粒打浆10分钟。对于RBB + C提取物，用Bead Ruptor Elite（OMNI International）以5.5m/s进行珠粒打浆3分钟，我们发现这些条件是最佳裂解条件，同时能够保持良好的DNA完整性。对于ZymoBIOMICS（ZymoBIOMICS DNA Miniprep 试剂盒）提取物，也用Zymo Research技术支持部门推荐的条件用Bead Ruptor Elite进行了珠粒打浆（5个周期，每个周期包括以6.5 m/s珠粒打浆1分钟，然后在冰上孵育5分钟）。

结果

我们的提取数据表明，PowerFecal Pro从多位供者采集的样本中提取的平均DNA产量最高，其次是ZymoBIOMICS、RBB + C和PowerFecal（图1）。有趣的是，RBB + C显示供者之间的变异性最小，而ZymoBIOMICS的性能似乎高度依赖于具体供者。

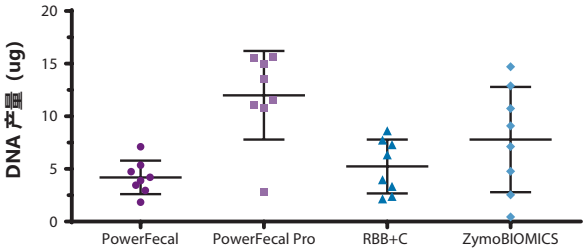

***图1：**使用PowerFecal、PowerFecal Pro、RBB + C或ZymoBIOMICS从8位不同供者各一份250µL OMNI基因•GUT等分试样（代表约50mg粪便物质）中提取的DNA总量。根据制造商的说明进行DNA提取。使用PicoGreen测定法定量洗脱的DNA。*

为了评估各种提取方法的裂解效率，我们使用实时PCR量化了10ng总DNA中两种难以裂解的革兰氏阳性细菌（长双歧杆菌和普拉氏梭杆菌）和革兰氏阴性细菌（拟杆菌属）的相对水平。

MK-AN-00037 (ZH - Chinese) Issue 1/2019-05
©2019年DNA Genotek Inc.。
DNA Genotek Inc.是OraSure Technologies，Inc.的一家子公司。保留一切权利。

PowerFecal提取的样本中革兰氏阳性细菌的裂解是次优的(图2), 证据是长双歧杆菌和普拉氏梭杆菌的Ct值明显更高。较高的Ct值与样本中较低水平的细菌DNA相关, 表明测定菌种的裂解是次优的。相反, PowerFecal Pro、RBB + C和ZymoBIOMICS提取样本的Ct值均较低, 表明裂解更有效。正如预期的那样, 易于裂解的革兰氏阴性菌属拟杆菌属的水平在各种提取方法之间类似。

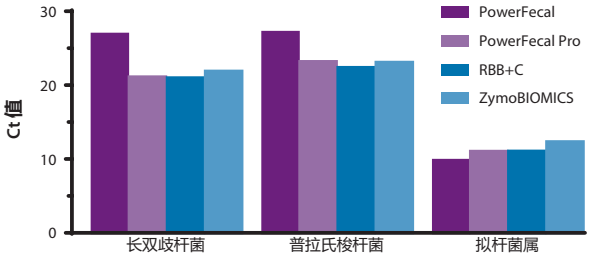

图2：*使用PowerFecal、PowerFecal Pro、RBB + C或ZymoBIOMICS提取的粪便DNA样本中革兰氏阳性或阴性细菌的相对水平。使用特异性引物对和10ng总DNA作为模板，通过实时PCR测定了长双歧杆菌（革兰氏阳性）、普拉氏梭杆菌（革兰氏阳性）和拟杆菌属（革兰氏阴性）的水平。此处提供的数据来自一名代表性供者。*

为了评估提取的DNA的质量和完整性, 我们检查了样本中是否存在PCR抑制剂并测定了DIN值(DNA完整性数)。粪便携带污染物(如腐殖酸和多酚)可干扰用于新一代测序平台的PCR和DNA文库制备, 进而影响样本的下游处理和分析。用市售试剂盒提取的所有DNA样本都不含抑制剂, 但我们能够在10-20%的RBB + C提取样本中检测到抑制剂(数据未显示)。此外, 我们的结果表明, PowerFecal、PowerFecal Pro和RBB + C均产生高质量、高分子量的DNA, 平均片段大小> 10kbp, DIN值高于7。(图3和表1)。相比之下, ZymoBIOMICS提取方法产生了被明显剪切的DNA, 平均片段大小为3-4kbp, 平均DIN值低于5。

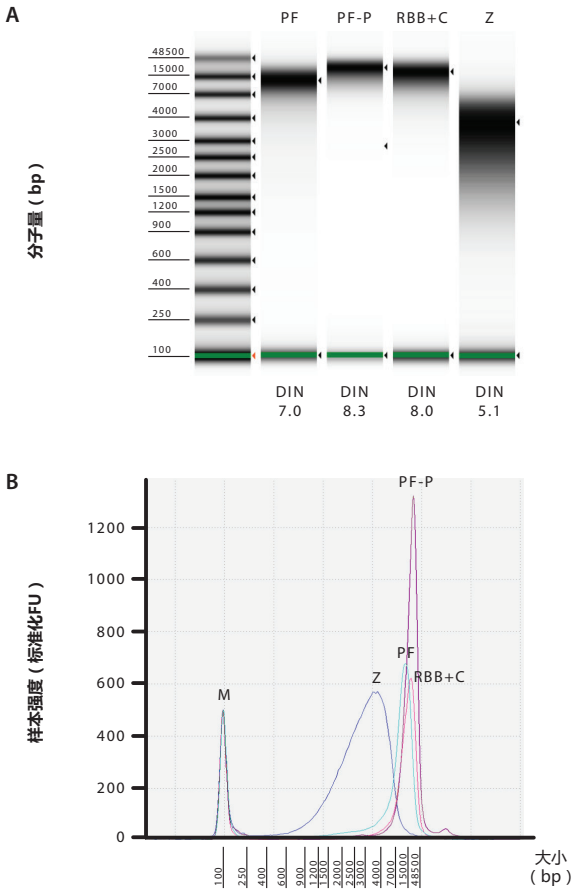

图3：*使用PowerFecal（PF）、PowerFecal Pro（PF-P）、RBB+C或ZymoBIOMICS（Z）从OMNIgene•GUT样本中提取的DNA样本的完整性和平均大小（M =对照标记物）。在基因组DNA ScreenTape（Agilent）上运行提取的DNA 样本，从而确定DNA完整性（A）和平均片段大小（B）。此处提供的数据来自一名代表性供者。*

©2019年DNA Genotek Inc.。DNA Genotek Inc.是OraSure Technologies，Inc.的一家子公司。保留一切权利。

	PowerFecal	PowerFecal Pro	RBB + C	ZymoBIOMICS
DNA产量	低至中等	中等至高	低至中等	中等至高
裂解效率	对革兰氏阳性细菌有限	良好	良好	良好
平均片段大小 平均DIN	19.2 kbp ± 11.5 7.1 ± 1.0	19.3 kbp ± 2.3 7.8 ± 0.6	18.6 kbp ± 1.4 7.9 ± 0.3	3.2 kbp ± 0.6 4.8 ± 0.5
存在PCR/文库制备抑制剂	不存在	不存在	可在10-20%的样本中检测到	不存在

***表1：**使用各种DNA提取试剂盒从 OMNIgene•GUT粪便样本（8例）中提取的DNA的产量、裂解效率和DNA质量，以及是否存在PCR抑制剂的概要：QIAamp PowerFecal DNA 试剂盒、QIAamp PowerFecal Pro DNA试剂盒、RBB + C方案或ZymoBIOMICS DNA Miniprep试剂盒。*

值得注意的是，对于新鲜粪便样本，各提取试剂盒的性能在各个方面都与OMNIgene•GUT采集的样本相似（数据未显示），这表明DNA Genotek的稳定化学试剂对本应用说明中测试的DNA提取试剂盒的整体性能没有影响。

结论

选择可靠的粪便DNA提取方案对任何微生物组分析都至关重要。对粪便样本中高度多样化的微生物物种进行有效和一致的裂解，这是确保提取的DNA以最小偏倚准确地捕获样本中代表性细菌群落的关键考虑因素。如PowerFecal试剂盒所显示，次优裂解可显著影响测定的革兰氏阳性菌种（如普拉氏梭杆菌和长双歧杆菌）的相对丰度。有趣的是，一些研究报道，在OMNIgene•GUT采集的样本中存在普拉氏梭杆菌偏倚[4,5]。多个证据表明，这些结果来自采集和稳定样本后次优的DNA提取，而不是样本分类组成的实际变化。

分离的高分子量DNA是利用全套现有新一代测序技术的必要条件。长程测序应用（例如全长16S或基于纳米孔的测序）有赖于回收相对完整和高质量的DNA。我们的数据表明，PowerFecal Pro和RBB + C提取方法在保持DNA完整性的同时提供了良好的裂解效率，而ZymoBIOMICS裂解是以DNA完整性为代价实现的。在初步测试Zymo Research 的Quick-DNA™粪便/土壤微生物试剂盒中也观察到了这一结果。

总之，在评估的提取方法中，我们认为PowerFecal Pro是性能最佳的粪便DNA提取试剂盒，能够提供（i）来自多种供者的高DNA产量、（ii）有效裂解革兰氏阳性细菌，以及（iii）回收不含抑制剂的高分子量DNA。此外，我们的初步数据还表明，PowerFecal Pro对于低生物量样本（如婴儿和存在生态失调的供者）具有良好的性能，使这种提取方法成为各种肠道微生物组研究的良好选择。我们极力建议使用OMNIgene•GUT采集和稳定套件有效而准确地捕获供者的代表性体内微生物谱，同时不会引入偏倚或丢失DNA完整性。要提取OMNIgene•GUT样本，我们建议使用PowerFecal Pro提取试剂盒，以尽量减少任何潜在的提取偏倚。这种组合方法将最准确、最全面提供样本采集时存在的代表性微生物群落。

©2019年DNA Genotek Inc.。DNA Genotek Inc.是OraSure Technologies，Inc.的一家子公司。保留一切权利。

参考文献：

1 Costea PI et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*. Nov;35(11):1069-1076 (2017).
2 OMNIgene•GUT enables reliable collection of high quality fecal samples for gut microbiome studies. DNA Genotek. PD-WP-00040. (2016).
3 Yu Z and Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* May;36(5):808-12. (2004).
4 Song EJ, Lee ES and Nam YD. Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *J Microbiol*. Oct;56(10):693-705. (2018).
5 Choo JM, Leong L and Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep*. 2015 Nov 17;5:16350. (2015)

技术支持部门办公时间：周一至周五（东部时间9:00至17:00时）：

- 免费电话（北美）：1.866.813.6354，选项6
- 其他所有国家：+1.613.723.5757，选项6
- 电子邮件：support@dnagenotek.com

OMNIgene•GUT（OM-200）尚未在美国上市。
OMNIgene•GUT（OMR-200）仅供研究使用，不用于诊断程序。
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。

对于所有DNA Genotek方案、白皮书和应用说明，详见www.dnagenotek.com的支持版块。

MK-AN-00037 (ZH - Chinese) Issue 1/2019-05

©2019 年DNA Genotek Inc.。
DNA Genotek Inc.是OraSure Technologies，Inc.的一家子公司。保留一切权利。