

适用于第2代测序技术的宏基因组DNA提取方法

李昂^{1,2}, 崔迪^{1,2}, 王继华³, 张斯^{1,2}, 杨基先^{1,2}, 马放^{1,2}

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨; 2. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨; 3. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 150025 哈尔滨)

摘要: 为快速、高效、大量地获得城市污水处理厂活性污泥中的宏基因组DNA, 将3种不同的基因组DNA提取方式进行对比。结果显示, 采用液氮研磨+基因组提取试剂盒相结合的方法获得的宏基因组DNA信息量最大, 质量好, $D(260/280\text{ nm})$ 在1.69~1.72。在进行高通量测序前的样品制备过程中, 样品经过初步处理后宏基因组 $D(260/280\text{ nm})$ 达1.83, 满足文库构建要求。利用 Solexa Genome Analyzer System 测序结果显示, 两个样品正向测序结果良好, 可用于序列拼接的高质量数据条数占90.8%。

关键词: 宏基因组测序; 宏基因组DNA; 活性污泥; Solexa 测序

中图分类号: X703.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2012)06-0020-04

Extraction method of metagenomic DNA used for the next generation sequencing technology

LI Ang^{1,2}, CUI Di^{1,2}, WANG Ji-hua³, ZHANG Si^{1,2}, YANG Ji-xian^{1,2}, MA Fang^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
3. School of Life Science and Technology, Harbin Normal University, 150025 Harbin, China)

Abstract: Extraction of metagenomic DNA from environmental sample was the main restrictive factor for the metagenomic sequencing. Three different extraction methods were used and compared in this study. The results indicated that the metagenomic DNA obtained from the activated sludge by Liquid Nitrogen Grinding + DNA Extraction Kit was the best sample due to the largest information and best quality, and $D(260/280\text{ nm})$ was between 1.69~1.72. During the sample preparation for the next generation sequencing, $D(260/280\text{ nm})$ of the metagenomic DNA reached to 1.83 after purification, which met the requirement of library construction. After the sequencing by Solexa Genome Analyzer System, the results showed that the forward sequencing of these two samples was successful, and the high quality data was about 90.8%, which could be used for assemble.

Key words: metagenomic sequencing; metagenomic DNA; the activated sludge; Solexa sequencing

环境生物领域中各种组学技术(-omics Technologies)的发展及应用为揭示复杂体系微生物群落结构及功能的关系提供了强有力的工具。

收稿日期: 2011-06-10.

基金项目: 国家创新研究群体科学基金资助项目(51121062); 国家自然科学基金资助项目(51108120; 51178139; 51108145); 第46批中国博士后科学基金(20090460901); 第4批中国博士后科学基金特别资助(201104430); 水体污染控制与治理国家重大专项子课题(2012ZX07301001)。

作者简介: 李昂(1980—), 男, 博士, 博士后;
马放(1963—), 男, 教授, 博士生导师。

通信作者: 马放, mafang@hit.edu.cn;
王继华, wanghua333@sohu.com.

Handelsman 于1998年首次提出并定义了宏基因组(Metagenomics), 即环境样品中的细菌和真菌的基因组总和^[1]。宏基因组技术研究的初期阶段主要以获得环境样品中新的生物活性物质为目的^[2-3]。随着基因测序技术的进步, 第2代测序技术已经被引入环境宏基因组学的研究中^[4]。宏基因组测序技术是指直接从环境中提取所有物种的DNA进行全基因组测序, 该技术可以极大程度地揭示环境样品中微生物多样性、功能多样性及代谢多样性, 是评估环境样品中微生物组成结构最精确的方法之一。到目前为止, 已有超过210个不同环境的宏基因组样

品被测序,包括土壤、海洋及人类肠道等^[5-7].因此,宏基因组测序技术是解析城市污水处理厂活性污泥系统中微生物群落基因组微观变化的最有力手段和方法.

目前,环境样品中宏基因组DNA的提取成为制约宏基因组测序技术应用的主要瓶颈之一^[8-9].土壤、水体与海洋沉积物等自然环境中的宏基因组DNA提取方法已有较多报道,而活性污泥宏基因组DNA提取方法的研究较少^[3].本文通过对不同宏基因组DNA提取方法的比较,建立满足宏基因组测序要求的快速、高效、经济的活性污泥宏基因组DNA提取方法;评价活性污泥宏基因组DNA的不同提取方式对Solexa测序结果的影响.

1 实验

1.1 样品采集

活性污泥样品分别于2009年秋季(10月)和冬季(12月)采集自哈尔滨某城市污水厂生化处理系统,记为样品1和样品2.取一定量的污泥样品经10 kr/min离心5 min,离心后弃上清液,沉淀立即保存于-80℃冰箱中,48 h内提取活性污泥宏基因组DNA.

1.2 基因组提取

目前活性污泥基因组DNA的提取主要有试剂盒提取法及酚-氯仿法.试剂盒提取法操作简单,毒性小,提取的DNA样品纯度高,但菌体破碎不完全,产率低;酚-氯仿法菌体破碎完全,收率高,但杂质去除效果不佳.因此,本研究还将采用液氮研磨与试剂盒相结合的方法提取活性污泥的宏基因组DNA,以期提高菌体的破碎程度及基因组DNA样品的纯度.

将保存于-80℃冰箱中的活性污泥样品沉淀用磷酸缓冲溶液(pH7.0)洗涤2~3次,弃上清,所得沉淀采用不同方式进行基因组DNA提取.

1.2.1 试剂盒提取活性污泥宏基因组DNA

采用上海华舜公司生产的细菌基因组提取试剂盒.步骤如下:

1) 向一定量的活性污泥沉淀中加入40 μL DB溶液、160 μL Lysozyme及8 μL RNaseA,彻底悬浮.37℃恒温水浴30~60 min,期间来回颠倒离心管数次.

2) 水浴完毕,加入200 μL DLT液和25 μL Proteinase K,迅速温和地来回颠倒离心管使之彻底混匀.置65℃恒温水浴30 min,期间来回颠倒

离心管数次.水浴后离心(9 kr/min),将上清移入一个干净的离心管,加入200 μL无水乙醇,混匀后全部移入吸附柱中,离心后(12 kr/min),将吸附柱移入一个干净的收集管.

3) 将500 μL W1液静置离心后,倒掉收集管内液体,吸附柱放回收集管中,重复此步2~3次,将吸附柱移入一个1.5 mL的离心管中,在吸附膜中央加入100 μL T1液,65℃静置5 min,离心(9 kr/min)将收集管低温(-20℃)保存.

1.2.2 酚-氯仿方法提取活性污泥宏基因组DNA

1) 称取1 g经-80℃保存的活性污泥样品于10 mL灭菌离心管中,加入5 mL缓冲液(TENP)震荡悬浮.

2) 加入100 μL溶菌酶母液至终质量浓度为1 g/L,37℃水浴1 h.

3) 加入500 μL 10% SDS至终质量分数为1%,50 μL Proteinase K母液,至终质量浓度为200 mg/L,55℃水浴1 h.

4) 将混合液分装至1.5 mL离心管,加入等体积的PCI,充分混匀,4℃低温离心(12 kr/min, 10 min).取上清液,重复抽提一次.

5) 获得的上清液加入等体积的CI抽提一次.

6) 获得的上清液加入0.6倍体积的异丙醇,-20℃沉降40 min,4℃低温离心(12 kr/min, 20 min),弃上清.

7) 加入1 mL 70%乙醇清洗沉淀物,4℃低温离心(12 kr/min, 10 min),弃上清.

8) 自然风干沉淀物,加入20 μL无菌超纯水回溶,电泳检测,-20℃保存待用.

1.2.3 物理破碎与试剂盒相结合提取活性污泥宏基因组DNA

活性污泥样品经液氮研磨后,采用试剂盒进行宏基因组DNA的提取,提取步骤如1.2.1所述.

1.3 宏基因组DNA浓度、纯度及产量的测定及电泳检测

测定所提取的活性污泥宏基因组DNA的浓度和纯度采用紫外吸收光谱法^[10],以Marker DL 2,000作为标准,取2 μL所得的宏基因组DNA样品进行琼脂糖凝胶电泳.

1.4 SOLEXA测序样品制备

步骤如下:

1) 细菌基因组样品体积于TE buffer/ddH₂O补齐至300 μL,Covaris仪器超声打碎片段设置4个梯度程序,3%琼脂糖凝胶检测.

Covaris程序(1):10% duty cycle,10 Indensity,500 cycle,10 s,共25 cycles.

Covaris 程序 (2):15% duty cycle,15 Indensity,500 cycle,15 s,共 25 cycles.

Covaris 程序 (3):20% duty cycle,20 Indensity,500 cycle,20 s,共 25 cycles.

Covaris 程序 (4):25% duty cycle,25 Indensity,500 cycle,25 s,共 25 cycles.

2) 末端补平体系. 50 μL 二链 cDNA,25 μL water,10 μL 10x phosphorylation,4 μL 10 mmol/L d NTP mix,5 μL T4 DNA polymerase,1 μL DNA polymerase,5 μL T4 polynucleotide Kinase,水补齐至 100 μL ,PCR 扩增后洗脱.

3) 向补平的二链 c DNA 3' 端加碱基 A. 32 μL 洗脱产物,5 μL NE Buffer,10 μL d ATP Solution,3 μL Klenow Fragment,水补齐至 50 μL ,PCR 扩增后洗脱.

4) 加接头. 1 g 洗脱产物,25 μL Quick Ligation Reaction Buffer,1 μL PE adapter Oligo Mix,5 μL T4 DNA Ligase,水补齐至 50 μL ,纯化洗脱.

5) PCR 富集 c DNA 模板.

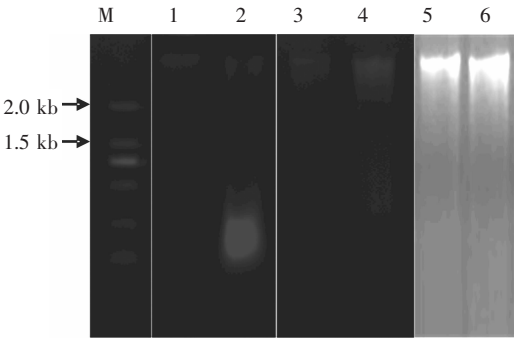
6) 胶回收 PCR 产物,2100 检测.

7) 测序.

2 结果分析

2.1 不同提取方法获得基因组 DNA 的效果评价

不同方法提取活性污泥样品的宏基因组 DNA 如图 1 所示,标号 1~6 分别代表两个样品的 3 组平行样本,3 组宏基因组 DNA 获得的纯度如表 1 所示.



(a) 试剂盒法 (b) 酚-氯仿法 (c) 物理破碎+试剂盒法
M—DL2000; 1, 3, 5—秋季样品; 2, 4, 6—冬季样品.

图 1 获得的宏基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

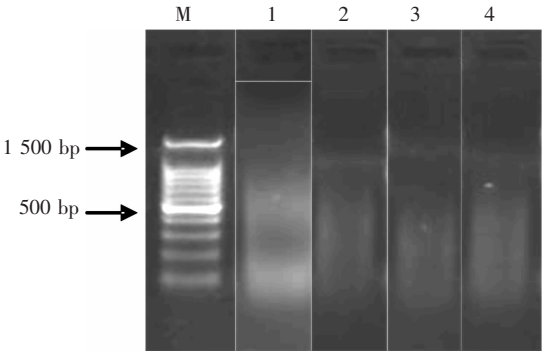
表 1 宏基因组 DNA 的纯度

指标	$D(260/280\text{ nm})$	$D(260/230\text{ nm})$
1	1.62	0.84
2	1.65	0.87
3	1.66	0.90
4	1.67	0.92
5	1.72	1.08
6	1.73	1.16

由图 1 和表 1 可知,采用物理破碎与试剂盒相结合的方法提取活性污泥样品中的宏基因组 DNA 效果最好,含量及纯度最高.说明经液氮研磨使活性污泥样品的 DNA 充分释放,再经过试剂盒中的吸附柱有效去除蛋白质等杂质,有利于得到高纯度及含量较高的宏基因组 DNA.单纯用试剂盒提取宏基因组 DNA 的效果不好,产率不高.一是由于采用该方法污泥样品中的 DNA 不能完全释放,使得产量减少;二是经过吸附柱处理时出现样品过载现象,有部分蛋白质、腐植酸等杂质存在,干扰 DNA 的产率和纯度.采用苯酚-氯仿方法提取宏基因组 DNA 的效果较好,但操作过程耗时费力,且酚及氯仿等药品存在毒性,对人体危害较大.

2.2 Solexa 测序分析

宏基因组 DNA 样品经 Covaris 不同频率打断后的电泳检测结果如图 2 所示,有效条带位点应介于 300~500 bp,只有 1 道频段 (10 Indensity) 打断条带结果最佳,2、3、4 道频段打断条带在 300~500 bp 极弱,丰度较差.因此,在 10 Indensity 条件下打断宏基因组片段适宜于进行后续高通量测序.



1—Covaris 程序 (1); 2—Covaris 程序 (2); 3—Covaris 程序 (3);
4—Covaris 程序 (4).

图 2 Covaris 不同频率超声打断宏基因组 DNA 样品的
琼脂糖凝胶电泳检测

如图 3(a) 所示,将获得的高质量活性污泥样品的宏基因组 DNA 样品采用 1 道频段条件进行超声打断,经琼脂糖凝胶电泳检测,样品 DNA 打断后呈弥散状态,Marker 为 100 bp 标记,200~700 bp 皆有条带,质量好. Solexa 测序样品制备步骤如下:末端补平,向补平的二链 c DNA 3' 端加碱基 A,加接头至最后 PCR 胶回收结果检测,如图 3(b) 所示,片段大小在 450~550 bp,质量好. $D(260/280\text{ nm})$ 为 1.83,总质量为 248.9 ng,产量为 13.1 mg/L.

宏基因组 DNA 样品经过测序拼接后的序列分析结果如表 2 所示,总数据量 1 655.777 Mb,原始序列条数可达 27 398 928 条,其中高质量的系

列条数为 24 891 111 条, 占总序列条数的 90.8%. 原始序列经过拼接后 ≥ 500 bp 的 contig 数目为 23 719 条. 该结果说明采用液氮研磨 + 基因组提取试剂盒相结合的方法提取的宏基因组 DNA 完全满足宏基因组测序的要求.

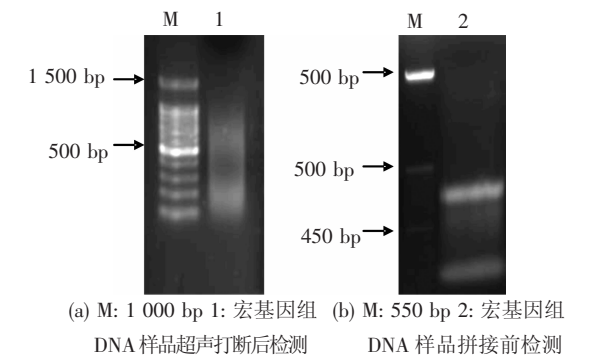


图3 测序用宏基因组DNA样品超声打断后
琼脂糖凝胶电泳检测图

表2 宏基因组DNA高通量测序结果

项目	测序模式	原始序列 条数	≥ 500 bp contig 数目	高质量 序列条数
样品1	2 × 80	27 398 928	23 719	24 891 111

3 结 论

1) 3 种不同宏基因组 DNA 提取方法的对比结果表明,液氮研磨 + 试剂盒法提取的活性污泥样品宏基因组 DNA 效果最好,产率高,质量好,且快速简便. 单纯用试剂盒方法进行提取细菌基因组效果最差,获得产物含有较多蛋白质、腐植酸等杂质,干扰 Solexa 测序.

2) Solexa 样品制备阶段,宏基因组 DNA 样品最佳超声打断条件为 10% duty cycle,10 Indensity,500 cycle,10 s,共 25 cycles.

3) Solexa 测序冬季样品的 $D(260/280\text{ nm})$ 可达 1.83, $D(260/230\text{ nm})$ 达 0.25, 产量为 13.1 mg/L. 基因组样品正向测序结果较好,总数据量 1 655.777 Mb, 可用高质量序列数据为 24 891 111 条.

参考文献:

[1] HANDELSMAN J, RONDON M R, BRADY S F, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chem Biol, 1998, 5: 245 – 249.

[2] MORGAN J L, DARLING A E, EISEN J A. Metagenomic sequencing of an in vitro-simulated microbial community [J]. PLoS One, 2010, 5 (4): e10209.

[3] 曲媛媛, 魏利. 微生物非培养技术原理与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.

[4] SIMON C, DANIEL R. Metagenomic analysis: past and future trends [J]. Applied and Environmental, Microbiology, 2011, 77: 1153 – 1161.

[5] TYSON G W, CHAPMAN J, HUGENHOLTZ P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. Nature, 2004, 428: 37 – 43.

[6] VENTER J C, REMINGTON K, HEIDELBERG J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea [J]. Science, 2004, 304: 66 – 74.

[7] QIN J J, LI R Q, RAES J, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464: 59 – 65.

[8] LAZAREVIC V, WHITESON K, HUSE S, *et al.* Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high – throughput sequencing [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79: 266 – 271.

[9] TYSON G W, CHAPMAN J, HUGENHOLTZ P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. Nature, 2004: 1 – 7.

[10] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞得曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 831 – 833.

(编辑 刘 彤)