Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 695-701.

УДК 57.083.1
©Коллектив авторов

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА ПРИ МЕТАГЕНОМНОМ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА

Е.С. Кострюкова[1,2,3]*, И.Ю. Карпова[1,2], А.К. Ларин[1,2], А.С. Попенко[1], А.В. Тяхт[1], Е.Н. Ильина[1]

[1]Институт физико-химической медицины ФМБА,
119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; эл. почта: el-es@yandex.ru
[2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
[3]Московский физико-технический университет, Москва

Проведено сравнительное сопоставление семи различных способов выделения тотальной ДНК из образца кала, рекомендуемых в протоколах метагеномного анализа состава микробиоты кишечника человека. Исследована вариабельность относительного содержания в таких образцах ДНК человека, регистрируемого по результатам высокопроизводительного секвенирования с использованием генетического анализатора SOLiD 4. Показано, что масса взятого в обработку первичного материала и методика, реализуемая для выделения тотальной ДНК, не оказывают существенного влияния на конечную величину относительной доли ДНК человека, которая не превышает 1% для здоровой популяции. Продемонстрированная инвариантность этого показателя позволяет расценивать его повышение при метагеномном анализе как один из потенциальных маркеров воспалительных заболеваний кишечника.

Ключевые слова: метагеномный анализ, секвенирование фрагментных библиотек, выделение ДНК из кала.

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы накопилось большое количество публикаций, посвященных метагеномному анализу микробиоты кишечника человека [1-5]. Однако, в большинстве работ выбор протокола экстракции ДНК из кала и последующее приложение определённой технологии геномного секвенирования никак не обосновываются и не валидируются. Не исключено, что именно этот факт и является причиной противоречивых результатов, полученных независимыми группами [6]. Не вызывает сомнений, что каждый из ключевых этапов исследования – сбор и хранение биологических образцов, их последующая обработка для выделения ДНК и осуществления высокопроизодительного секвенирования, особенности считывания и анализа данных – потенциально влияет на конечные результаты метагеномного анализа (http://www.microbiome-standards.org/). Тем не менее, на настоящий момент не существует стандартизованного протокола, который позволил бы обеспечить сопоставимость результатов метагеномных исследований, полученных различными группами. В литературе имеется немало публикаций, оценивающих влияние тех или иных этапов процесса обработки образца кала на конечную характеристику микробиоты кишечника человека [7-10]. Однако, большая часть подобных работ основывается на анализе данных, полученных посредством видоспецифической количественной ПЦР, либо в процессе параллельного секвенирования библиотек фрагментов генов 16S рРНК бактерий. Оба эти протокола оценивают относительную концентрацию микробной ДНК. Влияние процедуры обработки образца кала на результаты метагеномного анализа, когда происходит считывание тотальных геномных данных без привязки к объекту (микробная флора, эукариоты, вирусы), до сегодняшнего дня

* - адресат для переписки

практически не исследовано вследствие высокой стоимости такого подхода. Однако, данная проблема требует внимательнейшего изучения и может, в частности, внести коррективы в сложившееся на сегодняшний день представление о структуре многообразия микробиоты кишечника человека [1].

Массив данных, накапливаемый при метагеномном анализе образца кала, несёт информацию о количественном составе микробиоты кишечника человека, включая бактерии и эукариотические симбионты (грибы, простейшие, гельминты). Кроме того, регистрируется присутствие ДНК пищевого происхождения и человека [11]. При этом источником ДНК человека служат слущённые клетки эпителия пищеварительной трубки. Относительное содержание ДНК человека, регистрируемое при анализе микробиоты кишечника посредством секвенирования фрагментных библиотек, может рассматриваться как потенциальный маркер воспаления и иных повреждений слизистой оболочки кишечника.

В данной работе мы проанализировали влияние процедуры выделения ДНК из образца кала на регистрируемое по результатам секвенирования фрагментных библиотек относительное содержание ДНК человека в метагеномном образце.

МЕТОДИКА

Образец кала забирали у здоровой женщины 28 лет на основе информированного согласия. Забор материала осуществляли в индивидуальный пластиковый контейнер, после чего использовали для немедленного выделения ДНК, либо подвергали заморозке и хранили при -20°C.

Выделение ДНК из кала осуществляли с использованием семи методов, ранее описанных в публикациях, посвященных метагеномному анализу микробиоты кишечника [2, 4, 9, 12-16]. Подробное описание методов приведено в Приложениях. Полученные образцы ДНК использовали для приготовления фрагментных библиотек (таблица).

Конечную концентрацию тотальной ДНК в растворе определяли с помощью флуориметра Qubit® (“Invitrogen”, США) с использованием наборов Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit и Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit (“Invitrogen”), согласно рекомендациям производителя.

Подготовку фрагментных библиотек и их секвенирование с использованием генетического анализатора SOLiD 4 (“Life Technology”, США) осуществляли согласно рекомендациям производителя с использованием наборов SOLiD TM Fragment Library Construction Kit, SOLiD TM Fragment Library Barcoding Module 1 – 16, SOLiD TM EZ Bead TM E80 System Consumables, SOLiD™ ToP Sequencing Kit, MM50/5. Геномные данные депонированы в Sequence Read Archive (NCBI), код проекта PRJNA243613.

Предварительная обработка геномных данных включала в себя отбрасывание низкокачественных прочтений, коррекцию с помощью программы SAET и обрезание по качеству, как описано ранее [15].

Таблица. Номера библиотек фрагментов тотальной ДНК, экстрагированной разными методами из навесок единого образца кала.

	Свежий образец кала	**Замороженный образец кала**
Метод 1	M1_1, M1_2, M1_3, M1_4 (независимые навески по 100 мг) M1_5, M1_6, M1_7, M1_8 (суммарная навеска 500 мг)	F1_1, F1_2, F1_3, F1_4 (независимые навески по 100 мг) F1_5, F1_6, F1_7, F1_8 (суммарная навеска 500 мг)
Метод 2	M2	
Метод 3	M3	
Метод 4	M4	
Метод 5	M5	
Метод 6	M6	
Метод 7	M7_1, M7_2 (супернатант, полученный при формировании клеточного осадка после одной и двух предварительных промывок) M7_3, M7_4 (клеточный осадок, сформированный после одной и двух предварительных промывок)	F7_1, F7_2 (супернатант, полученный при формировании клеточного осадка после одной и двух предварительных промывок) F7_3, F7_4 (клеточный осадок, сформированный после одной и двух предварительных промывок)

Долю ДНК человека в образце оценивали путём картирования предобработанных прочтений на геном человека (версия hg19) с помощью пакета Bowtie [17]. Прочтения, не откартировавшиеся на геном человека, были использованы для дальнейшего количественного профилирования таксономического состава микробиоты. Его вычисляли в результате картирования прочтений на неизбыточный референсный каталог из 354 репрезентативных геномов микроорганизмов, встречающихся в кишечнике человека, с использованием программного пакета Bowtie [17]. В качестве источников для составления каталога геномов использовали базу проекта Human Microbiome Project (http://www.hmpdacc.org), NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), IMG/M (http://img.jgi.doe.gov/m), а также другие общедоступные источники [1, 2]. Относительную представленность генома в образце рассчитывали путем деления общей длины прочтений, картировавшихся на геном, на длину генома, с последующей нормировкой на общую длину прочтений, откартировавшихся на все геномы для данного образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метагеномный анализ микробиоты кишечника человека в формате секвенирования библиотек фрагментов ДНК представляет собой сложный многоступенчатый процесс (рис. 1). Обычно образец тотальной ДНК, выделенной из кала, расщепляется в заданном диапазоне длин на короткие фрагменты, которые в дальнейшем используют для приготовления библиотек и считывания нуклеотидной последовательности на секвенаторах второго поколения, согласно стандартным протоколам. Последующая таксономическая и метаболическая реконструкция сообщества выполняется на основании результатов картирования полученных индивидуальных прочтений на наборы референсных каталогов генов и геномов. Соответственно, идентификация того или иного организма в составе метагеномного образца возможна, если его геном входит в состав референсного каталога и доля покрытой части генома превышает заданный пороговый уровень.

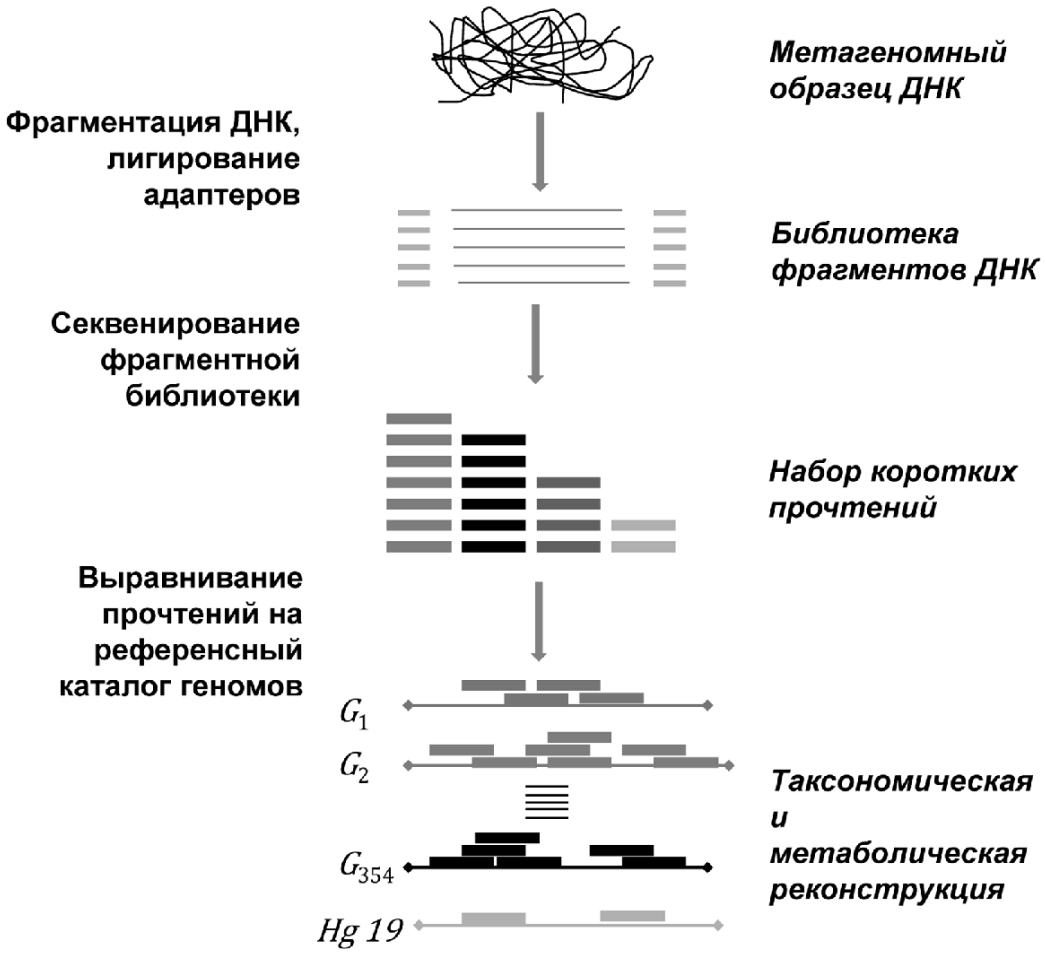

Рисунок 1. Метагеномный анализ посредством секвенирования библиотек фрагментов ДНК.

Оценить количество ДНК человека, исходно присутствующей в метагеномном образце, возможно посредством картирования полученных в результате секвенирования прочтений на один из известных референсных человеческих геномов. Для того чтобы определить вариабельность этого показателя для образцов ДНК, выделенной из кала здоровых людей, мы проанализировали массив данных, полученных ранее при метагеномном анализе микробиоты кишечника у 96 жителей Российской Федерации [15]. Для 92 образцов среднее значение доли прочтений, картировавшихся на геном человека hg19, составило 0,22±0,24%, и только для четырёх образцов мы наблюдали повышение данного показателя, вплоть до 44% [15]. Повышенная представленность ДНК человека (более 10%) отмечена нами также в метагеномных образцах, полученных от пациентов с различными патологическими состояниями кишечника (данные не приводятся). Поскольку при многих воспалительных заболеваниях кишечника значительно усиливаются процессы некроза и апоптоза энтероцитов [18], мы предположили, что значительное повышение доли геномной ДНК человека при метагеномном анализе может рассматриваться как один из потенциальных маркеров воспаления.

В представленной работе, проведя серию экспериментов с образцом кала, единожды полученным от одного пациента, мы оценили возможность влияния различных методов выделения ДНК на регистрируемую долю ДНК человека в тестируемом метагеномном образце и воспроизводимость полученных результатов.

В первой серии экспериментов мы исследовали, влияет ли количество взятого в анализ кала на регистрируемое в последствии относительное содержание геномной ДНК человека. В различных работах по метагеномному анализу микробиоты кишечника человека исследуют навески от десятков миллиграммов до нескольких граммов [4, 14, 19, 20]. В настоящей работе мы отобрали пять навесок по 100 мг и выделяли ДНК из каждой независимо, согласно методу 1, ранее используемому в нашей практике [15]. Параллельно пять навесок по 100 мг были помещены в одну пробирку и ресупендированы в 1000 мкл лизирующего буфера тщательным перемешиванием. После чего по 200 мкл суспензии были помещены в пробирки с кремниево-циркониевыми бусинами, дальнейшие стадии выделения ДНК были проведены независимо. По четыре образца из каждой группы были протестированы геномным секвенированием (библиотеки M1_1-8 в таблице). В четырёх независимо отобранных навесках среднее содержание геномной ДНК составило 0,69±0,15%, что достоверно не отличалось от аналогичного показателя для четырех образцов, выделенных из исходно общей навески – 0,51±0,15% (рис. 2)

Аналогичный эксперимент был провёден для образца кала после его хранения при -20°C в течение пяти дней (библиотеки F1_1-8 в таблице). При такой постановке эксперимента для четырёх независимо отобранных навесок среднее содержание геномной ДНК составило 0,43±0,07%, а для выделенных из исходно общей навески – 0,67±0,05%.

Таким образом, было показано, что регистрируемая доля геномной ДНК человека в метагеномном образце, выделенном из кала, практически не меняется для технических повторов вне зависимости от исходного количества биологического материала и от стадии предварительной заморозки, и не превышает 1% (рис. 2).

Во второй серии экспериментов мы оценили влияние разных методов выделения тотальной ДНК на относительное содержание геномной ДНК человека по результатам секвенирования фрагментных библиотек. В дополнение к методу 1, нами были использованы ещё пять вариантов экстракции ДНК, применяемых в известных работах по метагеномному анализу микробиоты кишечника. В целом, все эти методы направлены на максимально полное разрушение клеточной стенки бактерий, при этом вопрос сохранности ДНК человека ранее не рассматривался. Метод 2 базируется на использовании набора для выделения ДНК из кала Stool Mini Kit (“Qiagen”) с некоторыми модификациями протокола для более полного лизиса бактериальных клеток, как описано ранее [9]. Метод 3, адаптированный из публикаций консорциума Metahit [2], предусматривает дополнительную обработку выделенной ДНК поливинилпирролидоном для удаления из раствора потенциальных ингибиторов полимеразной цепной реакции. Метод 4, предлагаемый в работе Turnbaugh et al. [4], основывается на механической гомогенизации образца в присутствии фенола. Метод 5 реализует модифицированный протокол Kurokawa et al. [14] выделения ДНК с лизисом бактериальных клеток лизоцимом. Метод 6, описанный Apajalahti et al. [12], предполагает предварительное удаление из образца части механических примесей и потенциальных ингибиторов ферментативных реакций в результате последовательных промывок.

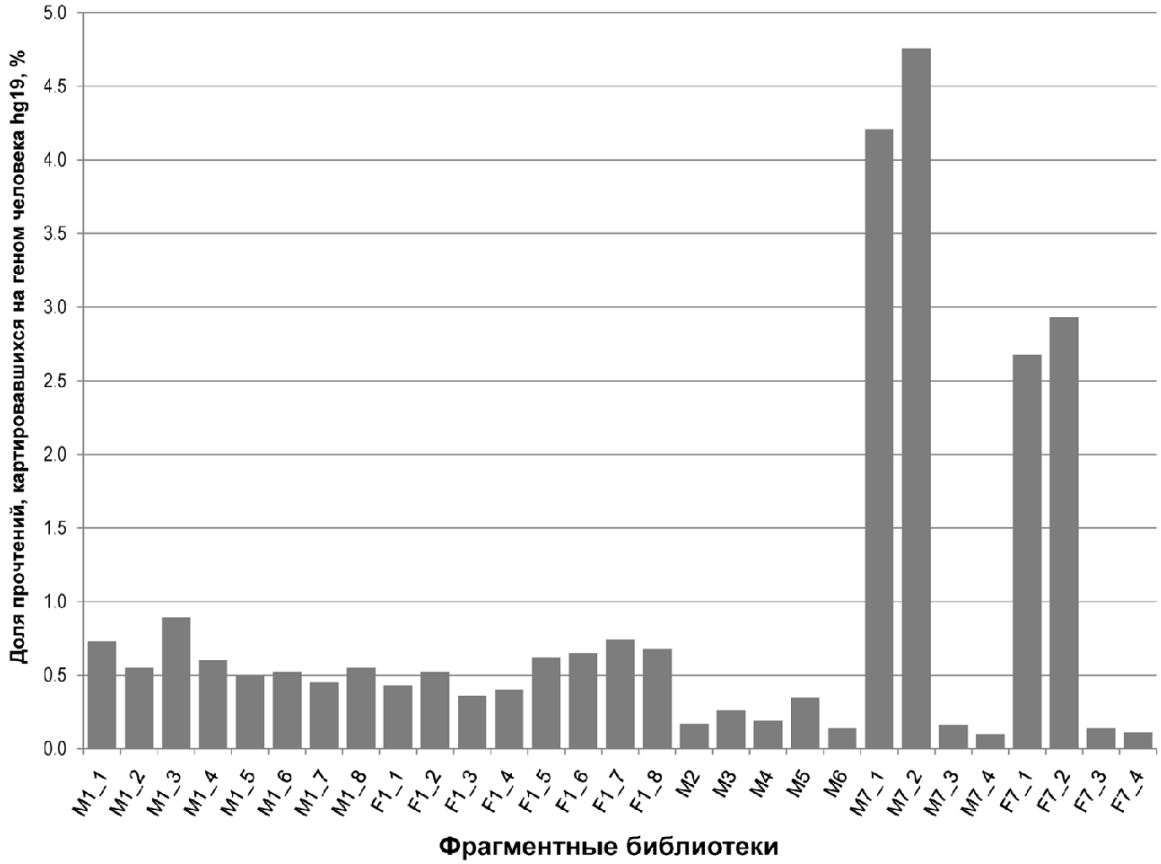

Рисунок 2. Относительное содержание геномной ДНК человека в анализируемом образце кала по результатам секвенирования фрагментных библиотек тотальной ДНК, полученной по разным протоколам экстракции. Наименования библиотек приведены в соответствии с таблицей.

Каждый препарат тотальной ДНК был проанализирован секвенированием фрагментных библиотек (номера M2 - M6 в таблице). Для серии образцов кала, обработанных по протоколам 2 - 6, регистрируемое относительное содержание геномной ДНК составило 0,14±0,08%, что также не превышало 1% от общего числа картируемых прочтений (рис. 2).

Среди многочисленных публикаций по метагеномному анализу микробиоты кишечника наше внимание привлекла серия работ, в которых исследуемый образец кала подвергали различным вариантам предварительного фракционирования с целью получения обогащённого препарата бактериальных клеток [13, 16]. Авторы предлагали на первых этапах обработки материала удалять из образца кала как грубые примеси, так и все растворимые соединения, включая свободную ДНК, с возможностью в дальнейшем работать только с фракцией цельных клеток, преимущественно бактериальных. Соответственно, в третьей серии экспериментов мы проанализировали, как скажется такой подход на величину относительного содержания геномной ДНК человека по результатам секвенирования фрагментных библиотек. Свежий образец кала был подвергнут серии отмывок согласно методу 7, описанному у Jin-Long Yang et al. и Martin Iain Bahl et al. [13, 16]. Аналогичная процедура была выполнена для образца кала после его хранения при -20°C в течение пяти дней. Подвергнутые секвенированию фрагментные библиотеки были приготовлены из тотальной ДНК, изолированной из клеточных фракций (номера M7_3, 4 и F7_3, 4) и из супернатанта (номера M7_1, 2 и F7_1, 2), полученных при обработке свежего и замороженного образцов кала (таблица).

В клеточных фракциях, полученных при обработке свежего и замороженного образцов кала, относительное содержание геномной ДНК человека составило 0,13±0,04 и 0,13±0,02, соответственно. В свою очередь в супернатанте, полученном при формировании клеточных осадков, регистрируемый процент ДНК человека был существенно выше,

чем в клеточной фракции, как для свежего, так и для предварительно замороженного образца (рис. 2). Наблюдаемый феномен может объясняться присутствием в кале человеческой ДНК в свободном состоянии в результате разрушения энтероцитов в процессе естественного обновления слизистой оболочки эпителия.

Стоит отметить, что протокол, реализуемый нами как метод 7, изначально предполагает отбрасывание супернатанта с последующим анализом исключительно клеточной фракции. Таким образом, регистрируемым повышенным процентным содержание ДНК человека в образцах M7_1, 2 и F7_1, 2 применительно к методу в целом можно пренебречь. В остальном можно сделать заключение, что по результатам метагеномного анализа посредством секвенирования фрагментных библиотек предварительное фракционирование образца кала последовательным центрифугированием в изотонических буферах сохраняет в клеточных осадках ДНК (клетки) человека в количествах, пропорциональных этому показателю для цельного образца кала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные в представленном исследовании экспериментальные данные демонстрируют, что доля геномной ДНК человека, регистрируемая в образце кала на основании метагеномного анализа, практически не зависит от применяемого протокола экстракции тотальной ДНК. Значение данного показателя колеблется в пределах 1%, что в целом соответствует значениям, полученным для популяции здоровых жителей Российской Федерации. Соответственно, значительное возрастание этого показателя может иметь клиническую и диагностическую ценность как потенциальный маркер патологических изменений в слизистой оболочке кишечника и требует дальнейшего изучения на выборках пациентов с различными патологиями желудочно-кишечного тракта.

Данное исследование осуществлялось за счёт средств государственного контракта №RFMEFI60414X0119 при финансовой поддержке государства в лице Минобрнаки России, с использованием оборудования Междисциплинарного ЦКП Казанского Федерального (Приволжского) Университета.

Дополнительные материалы и приложения свободно доступны в электронной версии статьи на сайте журнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J. et al.* (2011) Nature, **473**, 174-180.
2. *Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F. et al.* (2010) Nature, **464**, 59-65.
3. *Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y. et al.* (2012) Nature, **490**, 55-60.
4. *Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J. et al.* (2009) Nature, **457**, 480-484.
5. *Yatsunenko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G. et al.* (2012) Nature, **486**, 222-227.
6. *Angelakis E., Armougom F., Million M., Raoult D.* (2012) Future Microbiol., **7**, 91-109.
7. *Donatin E., Drancourt M.* (2012) BMC Res. Notes, **5**, 702.
8. *Gomez-Alvarez V., Teal T.K., Schmidt T.M.* (2009) ISME J., **3**, 1314-1317.
9. *Smith B., Li N., Andersen A.S., Slotved H.C., Krogfelt K.A.* (2011) Open Microbiol. J., **5**, 14-17.
10. *Yuan S., Cohen D.B., Ravel J., Abdo Z., Forney L.J.* (2012) PLoS One, **7**, e33865.
11. *Wesolowska-Andersen A., Bahl M.I., Carvalho V., Kristiansen K., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Licht T.R.* (2014) Microbiome, **2**, 19.
12. *Apajalahti J.H., Sarkilahti L.K., Maki B.R., Heikkinen J.P., Nurminen P.H., Holben W.E.* (1998) Appl. Environ. Microbiol., **64**, 4084-4088.
13. *Bahl M.I., Bergstrom A., Licht T.R.* (2012) FEMS Microbiol. Lett., **329**, 193-197.
14. *Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H. et al.* (2007) DNA Res., **14**, 169-181.
15. *Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S., Belenikin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K., Karpova I.Y., Selezneva O.V. et al.* (2013) Nat. Commun., **4**, 2469.
16. *Yang J.L., Wang M.S., Cheng A.C., Pan K.C., Li C.F., Deng S.X.* (2008) World J. Gastroenterol., **14**, 2872-2876.
17. *Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L.* (2009) Genome Biol., **10**, R25.
18. *Vereecke L., Beyaert R., van Loo G.* (2011) Trends Mol. Med., **17,** 584-593.
19. *Nechvatal J.M., Ram J.L., Basson M.D., Namprachan P., Niec S.R., Badsha K.Z., Matherly L.H., Majumdar A.P., Kato I.* (2008) J. Microbiol. Methods, **72**, 124-132.
20. *Zhang B.W., Li M., Ma L.C., Wei F.W.* (2006) Biochem. Genet., **44**, 503-512.

Поступила: 18. 10. 2014.

VARIABILITY IN THE RELATIVE QUANTITY OF HUMAN DNA RESULTED FROM METAGENOMIC ANALYSIS OF GUT MICROBIOTA

E.S. Kostryukova[1,2,3], I.Y. Karpova[1,2], A.K. Larin[1,2], A.C. Popenko[1], A.V. Tyaht[1], E.N. Ilina[1]

[1]SRI of Physical-Chemical Medicine Federal Medical & Biological Agency,
1a, Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; e-mail: el-es@yandex.ru.
[2]Kazan Federal University, Kazan, Russia
[3]Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

We conducted the comparative study of seven different methods of total DNA extraction from human feces. All these methods are recommended in protocols for metagenomic analysis of human gut microbiota. We studied the relative quantity of human DNA calculated from shotgun sequencing on a SOLiD 4 genetic analyzer of metagenomic samples. It was shown that either initial amount of feces or a method applied for total DNA extraction do not affect on final relative human DNA abundance, which is less than 1% in healthy people. Invariance of this parameter allows to consider increased abundance of human DNA in metagenomic samples as a potential marker of inflammatory bowel diseases.

Key words: metagenomic analysis, shotgun sequencing, DNA extraction from feces.