

• 微生物组测序与分析专题 •

吴崇明 博士，中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所副研究员。主要从事肠道微生物的检测、功能及药物互作研究。先后主持国家自然科学基金、中国博士后科学基金、中国医学科学院青年医学人才奖励项目等6项，发表科研论文77篇，其中SCI论文56篇。现为中国医学科学院创新工程团队骨干成员，担任国家自然科学基金评审专家，并担任 *Nanoscale*、*Nanomedicine*、*Phytomedicine*、*J Agr Food Chem*、*J Funct Foods* 等30余种SCI期刊的特约审稿人。



赵柏闻 北京量化健康科技有限公司 CEO。在基因组和微生物组的研究与开发领域深耕10余年。2010年担任“人类认知能力的基因组学分析”项目团队带头人；2013年被美国麻省理工学院 *MIT Technology Review* 杂志评为“2013年度杰出青年科技创新家”；入选《财富杂志(中文版)》的“2014年中国40位40岁以下的商界精英排行榜”；并被美国《时代》杂志评选为“下一代领导人”等。



DNA 提取过程中混入的实验室空气微生物 DNA 定量

陈天达¹，张婷婷¹，杨娅楠²，赵柏闻¹，吴崇明²

1 北京量化健康科技有限公司，北京 100070

2 中国医学科学院药用植物研究所，北京 100193

陈天达, 张婷婷, 杨娅楠, 等. DNA 提取过程中混入的实验室空气微生物 DNA 定量. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2541-2547.
Chen TD, Zhang TT, Yang YN, et al. Quantification of microbial DNA in laboratory environment during DNA extraction. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2541-2547.

摘要: 元基因组测序方法为微生物研究提供了有力的工具。但其中的DNA提取过程，会不可避免地混入实验室中的空气微生物。这些微生物DNA，是否会对一些极微量的元基因组检测（如皮肤样本等）结果造成影响，有多大影响，仍没有明确结论。本研究首先收集了实验室空气样品，用16S rRNA引物建立了基于qPCR的标准曲线，并检测了在开放环境下提取DNA过程中可掺杂的环境微生物DNA量。然后在开放环境下提取纯水DNA样品并进行元基因组分析，以确定掺杂环境微生物的种类。最后分别在生物安全柜和实验室开放环境下提取皮肤样本，并用鸟枪测序方法对样本的微生物组成进行分析，以评估掺杂环境微生物对元基因组检测结果的影响。结果

Received: August 19, 2020; Accepted: December 14, 2020

Corresponding authors: Chongming Wu. Tel: +86-10-57833235; E-mail: cmwu@implad.ac.cn
Bowen Zhao. E-mail: zhaobowen@quantibio.com

显示, 在实验室开放环境的 DNA 提取过程中, 环境微生物的 DNA 残留可达 28.9 pg, 可达某些极微量样本 DNA 总量的 30%。元基因组分析显示, 样品中掺杂的环境微生物主要是痤疮杆菌 *Cutibacterium acnes*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 等皮肤常见细菌。与洁净皮肤样本的信息相比, 开放环境下提取掺杂了数十种环境微生物, 并导致主要菌种的丰度大幅降低, 从而影响结果的真实性。因此, 微量样品的 DNA 提取应在洁净环境下执行。

关键词: 痕量 DNA 定量, 实验室环境, qPCR, 微生物组, 皮肤样本

Quantification of microbial DNA in laboratory environment during DNA extraction

Tianda Chen¹, Tingting Zhang¹, Yanan Yang², Bowen Zhao¹, and Chongming Wu²

¹ *Quantihealth Co. Ltd., Beijing 100070, China*

² *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China*

Abstract: Metagenomic sequencing provides a powerful tool for microbial research. However, traditional experimental DNA extraction process will inevitably mix with environmental microorganisms which float in the air. It is still unclear whether the mixed environmental microbial DNA will heavily affect the metagenomic results of samples with extremely low microbial content. In this study, we first collected environmental bacteria in the laboratory and quantified the mixed environmental microbial DNA content during DNA extraction based on a qPCR-based quantification assay. We then extracted DNA from pure water in order to determine the mixed microbial taxons during extraction under open environment. At last, we extracted total DNA from a skin sample in a Biosafety cabinet or under open laboratory environment, to assess the impact of the mixed environmental microorganisms on the metagenomic results. Our results showed that DNA extraction under open laboratory environment in Beijing region resulted in 28.9 pg contaminant, which may account for 30% of total DNA amount from skin samples. Metagenomic analysis revealed that the main incorporated environmental taxons were *Cutibacterium acnes* and *Escherichia coli*. Tens of environmental bacteria were foisted in the skin DNA samples, which largely decreased the relative abundance of dominant species and thus deteriorated the result accuracy. Therefore, analyzing microbial composition of samples with extremely low DNA content should better performed under aseptic environment.

Keywords: trace DNA quantification, laboratory environment, qPCR, microbiome, skin sample

人体共生微生物与我们的健康密切相关。人体皮肤、母乳等微生物群在人类健康中发挥关键的作用。但由于采样方法的限制, 来自皮肤和母乳等样本中的微生物 DNA 总量很低, 一般只有 100 pg 左右。由于实验室环境如空气中存在一定量的环境微生物, 如果在 DNA 提取过程未加注意, 会不可避免地混入到实验样品中, 对实验样品, 特别是痕量 DNA 样品的检测结果造成影响^[1]。然而迄今为止, 环境 DNA 混杂对于样品检测结果的影响尚未见报道。

对空气混杂进来的 DNA 进行相对精确的定量是比较困难的。如此微量的 DNA 已经低于 NanoDrop 以及 Qubit 的检测下限^[2]。常规的食品

级无菌检测, 主要通过培养活菌进行检测。药品如疫苗中的 DNA 残留检测, 分别为杂交法及 qPCR 法^[3-4], 但两种方法都是已知 DNA 残留的宿主来源前提下进行 DNA 定量。而实验室空气微生物组成未知, 因此上述两种方法均无法使用。还有一些研究使用大肠杆菌 16S rRNA 进行定量^[5], 但是这种方法仅对单纯大肠杆菌 DNA 残留是准确的。不同微生物的基因组大小不同, 16S rRNA 基因拷贝数有差异^[6], 仅用大肠杆菌 16S rRNA 定量方法可能会产生比较大的误差。因此, 本课题利用空气净化器收集实验室中的空气微生物并以其 16S rRNA 的 qPCR 标准曲线进行 DNA 定量。

1 材料与方法

1.1 实验室空气微生物样本的采集及标准曲线绘制

为了绘制实验室环境微生物 DNA 量的标准曲线,我们通过空气净化器在洁净的实验室中采集空气微生物 DNA 达 30 d。此操作过程参考文献[7],并进行微调。

1.1.1 实验室空气微生物样本的采集

(1) 全新小米空气净化器,内外用 75%乙醇擦拭干净,并更换全新滤膜。净化器置于实验室中,调至净化模式,时长 30 d;(2) 关闭净化器,用 75%乙醇擦拭过的剪刀和镊子将净化器里面的滤纸剪出一小部分;(3) 滤纸的白色面朝里,绿色面朝外,撕开滤纸,使其中的灰色物质暴露出来。(4) 将滤纸剪开,分装在 8 个 50 mL 离心管中,向其中分别加入 50 mL PBS 溶液,使滤纸全部被溶液浸渍。(5) 用 VORTEX-5 振荡 2 min。(6) 用 0.2 μm 的水系滤膜减压过滤。然后将滤膜放置在通风橱中干燥,约 10 min。

1.1.2 DNA 提取

DNA 提取试剂盒采用 QIAGEN DNeasy PowerSoil Kit。具体操作如下:(1) 将滤膜用剪刀剪碎,收集到装有石榴石的 2 mL 离心管中,分别加入 60 μL C1 溶液,在 65 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴放置 15 min。(2) 转移至漩涡振荡器上振荡 10 min,随后 10 000 $\times g$ 离心 30 s,将其中的液体全部转移至新管中。(3) 加入 250 μL C2 溶液,振荡 5 s,冰浴 5 min。随后 10 000 $\times g$ 离心 60 s,转移上清。(4) 加入 200 μL C3 溶液,振荡 5 s(奶白色),冰浴 5 min。10 000 $\times g$ 离心 60 s,转移上清。(5) 取 750 μL 上清于新管中,加入 1 200 μL C4 溶液,振荡 5 s。(6) 取 675 μL 加入到带有硅胶柱的管子中,10 000 $\times g$ 离心 1 min,弃掉下面管子中的液体。重复此步骤,直至取完。(7) 加 500 μL C5 溶液,10 000 $\times g$ 离心 30 s。弃掉下面管子中的液体。再 10 000 $\times g$ 离心 30 s。(8) 将柱子转移至新管中,

加入 50 μL C6,10 000 $\times g$ 离心 30 s。

1.1.3 DNA 定量

使用 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen),按使用说明书操作。

1.2 实验室开放环境下纯水样品 DNA 的提取

1.2.1 DNA 提取

为了检验常规样品 DNA 提取过程中,实验室环境 DNA 的混杂对样品检测的影响,我们使用无菌水作为空白样品,使用重鼎生物的微量 DNA 提取试剂盒 (XJ-Micro) 在开放的实验室环境下进行常规的 DNA 提取操作。具体流程如下:(1) 取 200 μL 无菌水作为空白样本。(2) 向管中加入 Proteinase K 15 μL ,混匀。56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。(3) 向管中加入 600 μL 溶液 GH 及 600 μL 无水乙醇,充分混匀。12 000 $\times g$ 离心 2 min。(4) 将上清液转入套有收集管的微量离心柱中。8 000 $\times g$ 离心 2 min。取出离心柱后弃去收集管中废液,将离心柱放回收集管中。(每次加 700 μL ,共 6 次)。(5) 向离心柱中加入 200 μL 溶液 W1,8 000 $\times g$ 离心 1 min。(6) 向离心柱中加入 200 μL 溶液 W2,8 000 $\times g$ 离心 1 min。弃废液,将离心柱放回。(7) 重复步骤 (6) 一次。12 000 $\times g$ 离心 2 min。(8) 将离心柱取出后放入新的 1.5 mL 离心管中。向柱中央加入 5 μL 无菌去离子水,室温放置 3 min,12 000 $\times g$ 离心 1 min。再向柱中央加入 5 μL 无菌去离子水,室温放置 2 min,12 000 $\times g$ 离心 1 min,DNA 溶液被收集在离心管中。

1.2.2 DNA 定量

我们使用细菌通用 16S rRNA 引物,通过 Realtime PCR 方法对空白样品中的细菌 DNA 含量进行定量。所用引物序列如下:515F 正向引物为 5'-GTGYCAGCMGCCGCG GTAA-3';806R 反向引物为 5'-GGACTACNVGGGTWT CTAAT-3'。

Realtime PCR 使用 KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2 \times) Kit,按照试剂盒的使用说明书,在 Bio-Rad CFX96 仪器上运行。

1.3 皮肤样品 DNA 的提取

1.3.1 皮肤样本的采集

将灭菌拭子在无菌生理盐水中浸湿,在实验目标区域擦拭约 30 s (在不产生不适感的前提下尽量用力);取样后,将棉拭子头伸入无菌取样管(含有无菌水)中,折断拭子头与杆部的连接,弃掉拭子杆。在 VORTEX-5 上振荡 1 min 后,移除拭子头,并高速离心 10 min,去掉上清。

1.3.2 DNA 提取

分别在生物安全柜和实验室开放环境下使用 DNeasy PowerSoil pro 试剂盒 (QIAGEN) 对皮肤 DNA 进行提取。

1.3.3 鸟枪法元基因组测序

使用 KAPA HyperPlus 试剂盒 (KAPA Biosystems) 对 DNA 进行文库构建。构建的文库的插入大小约为 350 bp, 然后进行高通量测序。在 Illumina NovaSeq 6000 平台 (Illumina) 上进行测序, 每个样本的测序深度为 3 Gb。原始的下机数据, 使用 KneadData 进行质量控制和宿主基因的去除 (v0.7.2, 宿主基因为 *H. sapiens*, ucschg19, 默认参数)。质控后的 clean reads, 使用 PathoScope 2.0 (默认参数), 与 NCBI 的 nt 数据库进行比对, 得到物种注释结果。

2 结果与分析

2.1 实验室环境微生物 DNA 的掺杂量

为了检测在实验室开放环境下提取 DNA 导致的环境细菌 DNA 掺杂量, 我们首先用空气净化器采集实验室空气微生物样本, 并用细菌 16S rRNA 引物建立了基于 qPCR 的 DNA 含量标准曲线 (图 1)。

随后我们在实验室开放环境下进行纯水样本的 DNA 提取, 并根据标准曲线计算提取过程中掺杂的环境微生物 DNA 量。实验结果显示, 在实验室开放环境中提取的纯水样品中, 空气微生物 DNA 的残留量为 28.9 pg。

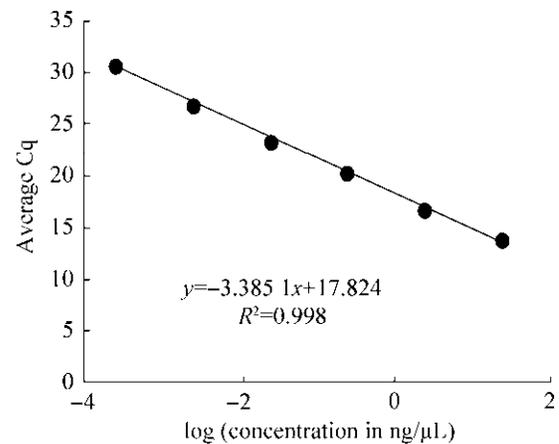


图 1 实验室环境微生物 DNA 标准曲线

Fig. 1 Standard curve for laboratory environmental microbial DNA.

2.2 开放环境 DNA 提取掺杂的微生物种类

进一步在实验室开放环境下对纯水进行 DNA 提取和元基因组分析, 以确定掺杂的主要环境微生物种类。结果显示, 有 22 种环境细菌掺杂到了无菌的纯水样品中, 其中丰度最高的是痤疮杆菌 *Cutibacterium acnes* (77.060%)、大肠杆菌 *Escherichia coli* (8.073%)、表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* (4.329%)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (2.324%) 和头状葡萄球菌 *Staphylococcus capitis* (1.597%) (表 1)。这些掺杂菌都是空气和皮肤上常见的细菌。

2.3 开放环境 DNA 提取对真实皮肤样品测定结果的影响

我们进一步分别在生物安全柜和实验室开放环境下对同一份皮肤样本进行 DNA 提取, 考察环境微生物掺杂对所得分析结果的影响。与洁净环境 (生物安全柜) 下提取的皮肤样品相比, 在开放环境下提取的皮肤样品中出现了 83 种新的菌种, 其中 7 种掺杂细菌发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum*、洋葱伯克氏菌 *Burkholderia contaminans*、未分类的根瘤菌 unclassified *Rhizobium*、干酪乳杆菌族 *Lactobacillus caseigroup*、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、产色葡萄球

表 1 开放环境 DNA 提取掺杂的微生物种类
Table 1 The incorporated bacteria during DNA extraction under open environment

Species	Relative abundance (%)
<i>Cutibacterium acnes</i>	77.060
<i>Escherichia coli</i>	8.073
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4.329
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.324
<i>Staphylococcus capitis</i>	1.597
<i>Burkholderia contaminans</i>	0.927
Unclassified <i>Gordonia</i>	0.514
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0.412
<i>Olsenella uli</i>	0.354
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.336
<i>Pseudopropionibacterium propionicum</i>	0.287
<i>Kocuria rhizophila</i>	0.270
Unclassified <i>Streptococcus</i>	0.267
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.229
<i>Brevundimonas</i> sp. DS20	0.193
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	0.167
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0.142
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	0.130
<i>Kocuria palustris</i>	0.129
<i>Altererythrobacter atlanticus</i>	0.119
Unclassified <i>Curtobacterium</i>	0.090
<i>Micrococcus luteus</i>	0.086

菌 *Staphylococcus chromogenes* 和未分类的棒状杆菌 unclassified *Corynebacterium* 的相对丰度超过了 0.5%，而 *Lactobacillus fermentum* 和 *Burkholderia contaminans* 的掺杂量达到了 1.5% 左右 (图 2)。由于环境细菌的掺杂，导致皮肤样本中原本的优势菌种，如 *Cutibacterium acnes* 和 *Escherichia coli* 的相对丰度分别降低了 11.35% 和 3.11%，而 *Staphylococcus epidermidis* 的相对丰度升高了 2.45% (图 2)。

3 讨论

空气中漂浮的灰尘微粒上附着有大量的环境微生物，在 DNA 提取过程会不可避免地混入到所得的样品 DNA 中。虽然对于微生物 DNA 含量异常丰富的样品，例如粪便样品，环境微生物掺入所造成的影响可以忽略不计，但是对于微生物 DNA 含量本就非常微小的样品，如皮肤样品和母乳样品等，在 DNA 提取过程中如果不注意防护，那么混入的环境微生物 DNA 有可能大大影响检测结果的准确性。然而，这些掺入的环境微生物 DNA 会对这些微量样品的元基因组检测结果造成多大的影响，目前尚没有明确的结论。

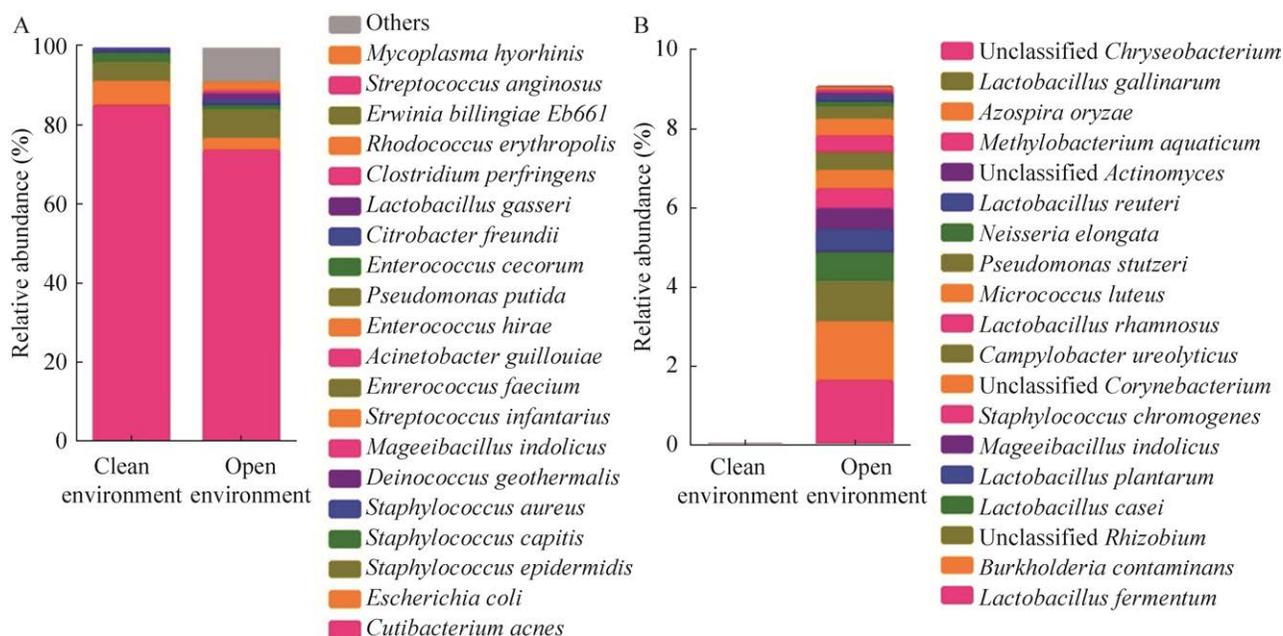


图 2 开放环境 DNA 提取对皮肤样本微生物组检测结果的影响

Fig. 2 Impact of DNA extraction under open environment on the microbial analysis results of skin sample. (A) The microbial composition obtained under the two conditions. (B) The incorporated bacteria by DNA extraction under open environment.

我们的结果显示, DNA 提取过程中实验室环境微生物的掺入有可能对微量样品的元基因组检测结果造成严重的影响。首先, 在开放环境下提取 DNA 可能导致大约 30 pg 的 DNA 掺杂。对于粪便、唾液等样本(样本 DNA 提取量可达 1 μg), 空气微生物的比例小于万分之一, 因此对于这类样本中万分之一以上丰度的微生物不会产生很大影响。但在某些样本类型, 如皮肤样本等, 样本 DNA 总量可能小于 1 ng, 母乳样本中的微生物 DNA 总量可能更低。而且这类样本中, 人源 DNA 比例可高达 90% 以上, 微生物 DNA 总量约为 100 pg 以下^[8]。实验空气微生物在 DNA 提取过程中的残留量可达到其总量的 30% 以上, 对这类样本的元基因组检测可能会产生较大影响。

我们利用纯水样品进一步分析了在实验室开放环境下进行 DNA 提取所掺杂的主要环境微生物种类。虽然所在实验室在肉眼检测下非常干净整洁, 但是在 DNA 提取过程中依然有大量微生物掺杂进来。我们在纯水样品中检测到了 22 种环境细菌, 其中含量最丰富的是空气和皮肤上常见的细菌。由于皮肤菌群主要来自于同空气等接触得到的细菌, 并且在人活动过程中皮肤上的微生物也会扩散到环境空气中, 因此, 我们的实验结果非常容易理解。但是这也可能为皮肤样本的菌群分析结果造成更加隐蔽的影响, 导致所得元基因组数据不可靠。

为了深入了解 DNA 提取过程中环境微生物 DNA 的掺杂对皮肤菌群分析结果的影响, 我们使用了同一个皮肤样品并分别在无菌的生物安全柜和表面上看似洁净的实验台上进行 DNA 提取。元基因组测序结果显示, 由于环境细菌的掺杂, 导致皮肤样本中优势菌种的相对丰度发生了明显的改变, 最多降低了 11.35%, 从而导致所得细菌组成结果的准确性大大降低。更重要的, 在开放环境下提取的皮肤样品中掺杂了

83 种环境细菌, 其中 7 种掺杂细菌的丰度超过了 0.5%。而该皮肤样品中真实含有的细菌种类只有 34 种。换言之, 在开放环境下进行 DNA 提取会使所检测到的细菌种类增加 49 种, 提高将近 1.5 倍 (144%)。这个结果会大大增加皮肤微生物组数据的多样性指数, 从而得到完全错误的整体皮肤菌群分析结果。

因此, 当对极低量样本进行 DNA 提取时, 为了进一步提高其准确性, 需要注意空气微生物的影响。可以提高实验室的洁净度级别, 或尽量在超净台中处理样本^[9]。同时, 也需要注意 DNA 提取及建库过程中使用的试剂和耗材的 DNA 残留问题^[10]。

REFERENCES

- [1] Cheema AS, Stinson LF, Lai CT, et al. DNA extraction method influences human milk bacterial profiles. *J Appl Microbiol*, 2020, doi: 10.1111/jam.14780.
- [2] Yang P, Zhang Y, Li W, et al. Development of a method for determination of residual exogenous DNA in recombinant human enterovirus 71 virus-like particle vaccine. *Chin J Biol*, 2020, 33(3): 308–311, 315 (in Chinese).
杨萍, 张艳, 李微, 等. 重组人肠道病毒 71 型病毒样颗粒疫苗外源 DNA 残留量检测方法的建立. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(3): 308–311, 315.
- [3] Cafiero C, Re A, Stigliano E, et al. Optimization of DNA extraction from dental remains. *Electrophoresis*, 2019, 40(14): 1820–1823.
- [4] Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clin Chim Acta*, 2018, 479: 14–19.
- [5] Peng Y, Yang XM. Comparison of testing methods

- for residual DNA in biotech drugs. *Int J Biol*, 2016, 39(2): 73–76 (in Chinese).
- 彭燕, 杨晓明. 生物技术药物中残留 DNA 检测方法的比较. *国际生物制品学杂志*, 2016, 39(2): 73–76.
- [6] Lang-Yona N, Mazar Y, Pardo M, et al. Air-sampled filter analysis for endotoxins and DNA content. *J Vis Exp*, 2016, (109): 53444.
- [7] Kobayashi A, Sano D, Taniuchi A, et al. Use of a genetically-engineered *Escherichia coli* strain as a sample process control for quantification of the host-specific bacterial genetic markers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(20): 9165–9173.
- [8] Bjerre RD, Hugerth LW, Boulund F, et al. Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. *Sci Rep*, 2019, 9: 17287.
- [9] Hung JC, Anderson MM. Mayo Clinic approaches to meet United States Pharmacopeia <797> requirements for facility design and environmental controls of nuclear pharmacy. *J Nucl Med*, 2009, 50(1): 156–164.
- [10] Lee C, Lee S, Shin SG, et al. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(2): 371–376.

(本文责编 郝丽芳)