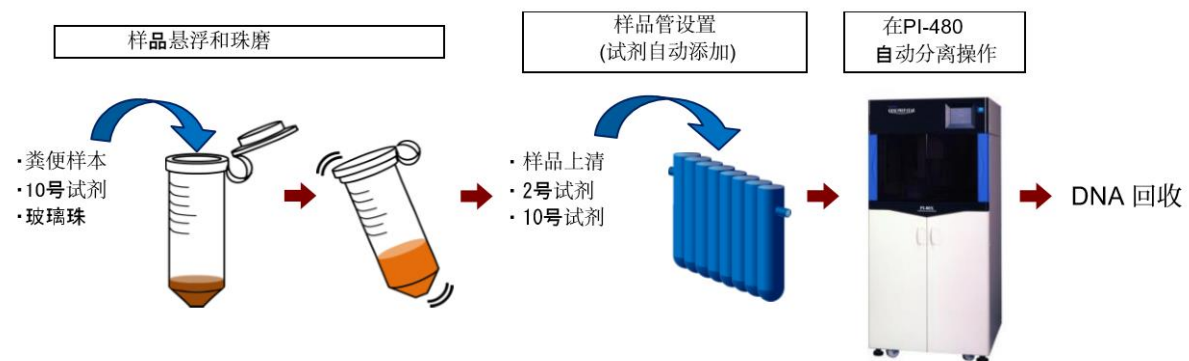


## Kurabo PI-480 在肠道微生物群落研究中的应用

肠道不仅是人体消化吸收的重要场所，同时也是最大的免疫器官，在维持正常免疫防御功能中发挥着极其重要的作用。人体肠道为微生物提供了良好的栖息环境，成人肠道内的微生物数量高达  $10^{14}$  个；质量达到 1.2kg，接近人体肝脏的质量；其包含的基因数目约是人体自身的 150 倍，具有人体自身不具备的代谢功能。

作为人体最庞大、最复杂的微生态系统，肠道微生物本身及其代谢产物不仅能调节人体健康，更在膳食和宿主之间起到了重要的桥梁作用。正如诺贝尔奖获得者 Joshua Lederberg 曾指出的，人体与人体共生微生物构成了超级生物体 (superorganism)。

如何快速从肠道中提取到微生物群落宏基因组，Kurabo 的全自动核酸提取系统可以提供强有力的帮助。



### 【实验概况】

样本类型：粪便

样本量：40mg/200  $\mu$ l (保存缓冲液中悬浮)

样本数：48 个样品/次

分离系统：DNA 自动提取设备：PI-480，组织 DNA 分离提取方案

试剂：组织 DNA 试剂盒 (NR-201)

耗材：样品管 (PT-8000)、DNA 回收管 (NT-8000)

天美(中国)科学仪器有限公司  
北京市朝阳区天畅园7号楼(100107)

t 010-64010651

f 010-64060202

e techcomp@techcomp.cn

w www.techcomp.cn

分离纯化原理：

样品溶解：珠磨粉碎以及蛋白酶 K 消化；

纯化：酚类试剂使蛋白质变性；

DNA 收集：酒精（乙醇）将 DNA 沉淀

### 【操作】

( 1 ) 200  $\mu$ l 粪便悬浮液中添加直径 0.1mm 的玻璃珠 0.5g , 以及 10 号试剂 ( NR-10025 ) 300  $\mu$ l。

( 2 ) 粉碎机粉碎 ( 4800 rpm , 50 秒 ) 。

( 3 ) 离心 ( 12000 rpm , 5 分钟 ) 。

( 4 ) 样品上清 ( 大约 200 $\mu$ l ) 转移到 8 连管中 ( PT-8000 ) 。

( 5 ) 加入 2 号试剂 ( NR-2025+0.4 mg/ml 蛋白酶 K ) 150  $\mu$ l , 10 号试剂 ( NR-10025 ) 150  $\mu$ l。

( 6 ) 将样品管和 DNA 收集管添加到 PI-480 中 , 使用 PI-480 标准的动物组织 DNA 提取方案开始分离操作。

( 7 ) 分离后 , DNA 溶液转移至保存管 , 12000 rpm , 5 分钟 , 4 $^{\circ}$ C 离心浓缩。

( 8 ) 上清冷冻保存 ( -86 $^{\circ}$ C ) 或分析

### 【PI-480】自动分离与操作

第一步 , 蛋白质变性与杂质去除

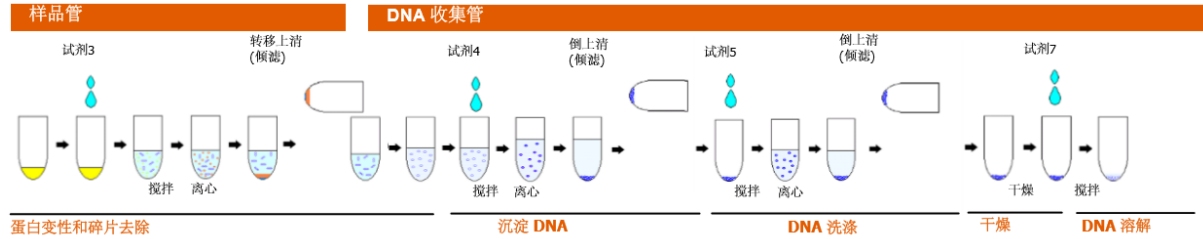
第二步 , DNA 沉淀

第三步 , DNA 纯化

第四步 , 干燥

第五步 , DNA 溶解试剂将 DNA 溶解 , 体积为 100  $\mu$ l

## 【组织 DNA 提取方案流程】



## 【分析方法】

产量和纯度：用分光光度计测定每个 DNA 溶液在 260 nm 处的吸收率。

DNA 产量由  $A_{260} \times 50 \times \text{稀释比例} \times \text{最终溶解量}$  算出。

DNA 纯度由  $A_{260}/A_{280}$  的比值得到。

电泳：各 5  $\mu\text{l}$  的 DNA 溶液在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳实验。

PCR：16S 遗传子 V3-V4 区扩增。

Forward; 5' -  
TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGCGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3'

Reverse; 5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC  
AGGACTACHVGGGTATCTAATCC - 3'

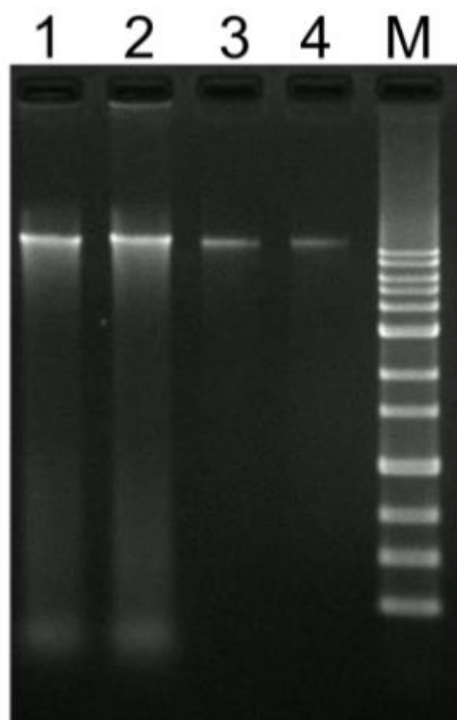
16S rDNA 宏基因组分析：由 illumina 的 Miseq 进行测序，随后进行数据分析 ( Basespace )。

【结果】

产量和纯度

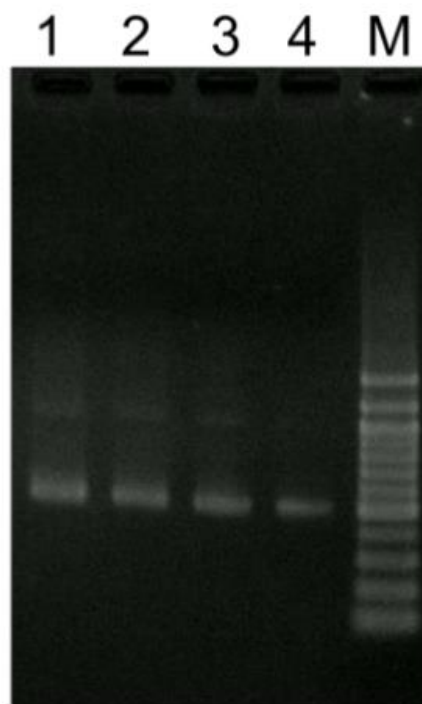
设备	No.	A260/A280	DNA 浓度 ( ng/ $\mu$ l )
Kurabo PI-480	1	1.84	50.6
	2	1.82	52.0
A 公司 粪便 DNA 提取试剂盒	3	1.58	10.0
	4	1.93	9.9

电泳图



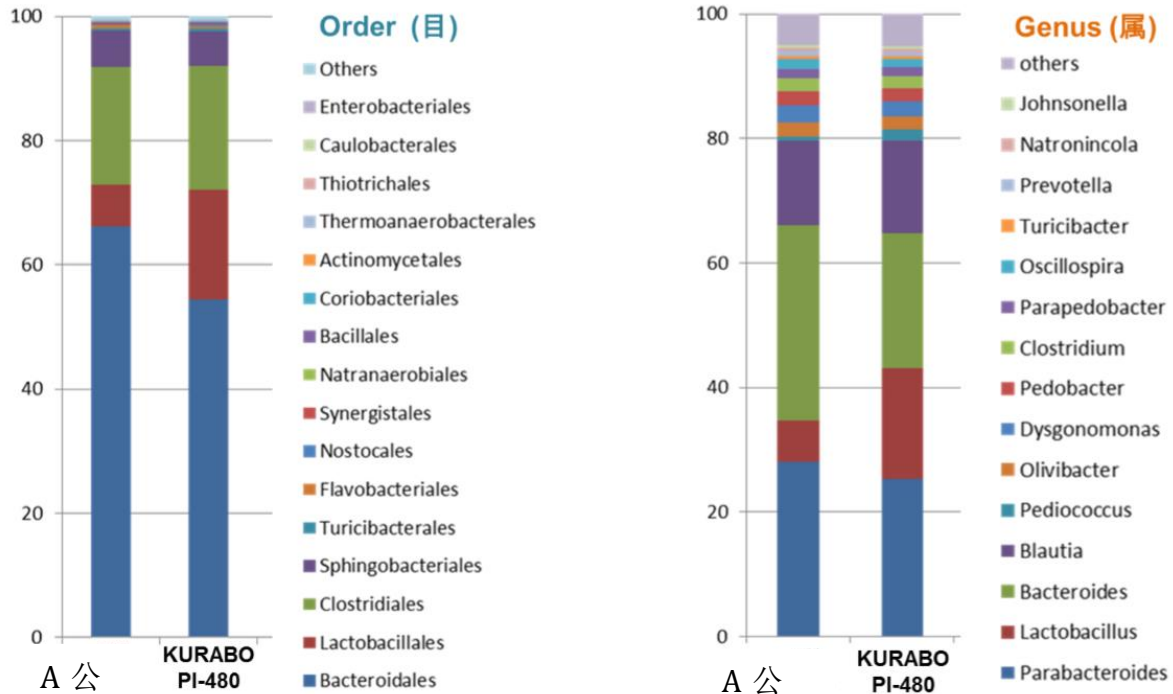
M: 1 kb DNA Ladder One

PCR 图



M: 100 bp DNA Ladder One

### 16S rDNA 宏基因组分析



### 多样性指标分析

	Shannon 多样性指标	菌种数
Kurabo PI-480	2.130	266
A 公司试剂盒	1.973	214

#### 【结论】

通过分光光度分析和电泳的结果可知，PI-480 可以从粪便样品中分离出宏基因组。此外，分离得到的 DNA 可用于 PCR 和 rDNA 宏基因组分析。与其他专门用于粪便 DNA 提取的试剂盒（A 公司）相比，PI-480 分离的 DNA 是高产的，而 Shannon 物种多样性是微生物群落多样性的一个指标，是许多种细菌的鉴别结果。使用 PI-480 提取的宏基因组多样性情况更好。

具体请详询天美（中国）科学仪器有限公司。