人类肠道病毒粒子富集及纳米孔测序

Enrichment and Nanopore Sequencing of Human Gut Virus-like Particles

曹佳宝^{1,2,#}, 张雨青^{1,2,#}, 赵娜¹, 王军^{1,*}

¹病原微生物与免疫学重点实验室, 中国科学院微生物研究所, 北京; ²中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: junwang@im.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 曹佳宝, 张雨青, 赵娜, 王军. (2021). 人类肠道病毒粒子富集及纳米孔测序. *Bio-101* e2003610. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003610.

How to cite: Cao, J. B., Zhang, Y. Q., Zhao, N. and Wang, J. (2021). Enrichment and nanopore sequencing of human gut virus-like particles. *Bio-101* e2003610. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003610. (in Chinese)

摘要: 病毒作为微生物组的重要组成部分, 具有较高的多样性, 但是在环境中的含量较低, 直接测序得到的病毒序列极少, 限制了病毒组的研究。为了对人类粪便样本中肠道病毒粒子进行富集, 同时提取核酸并进行扩增和测序。本实验通过使用给定孔径范围的滤膜对病毒粒子进行初步过滤。然后, 根据病毒粒子的大小、密度和形状等物理特性, 使用超速离心机对其进行沉降富集。最终, 获得纯净的病毒粒子。该方法可有效提高病毒粒子的含量, 使病毒有效数据提升至 70% 左右 (包含未知序列), 为病毒组的下游分析奠定基础。此外, 运用该方法获得的病毒 cDNA 扩增产物除用于 Nanopore 测序, 还可用于 Illumina 测序。

关键词: 人类肠道病毒组, VLPs, 富集, 扩增

材料与试剂

1. 0.45 μ m PVDF 滤器 (Millex-HV)
2. 各种型号枪头
3. 1.5 ml、15 ml、50 ml 离心管
4. 超速离心管 (Beckman, catalog number: 355654)
5. TURBO DNase I (Invitrogen, catalog number: AM2238)

6. RNase A (QIAGEN)
7. 10 mM dNTP mix (Promega, catalog number: U1515)
8. M-MLV reverse transcriptase (Promega, catalog number: M1705)
9. Klenow fragment (Takara, catalog number: 2140A)
10. QIAamp MinElute virus spin kit (QIAGEN, catalog number: 57704)
11. DEPC 水 (Ambion, catalog number: AM9922)
12. KOD-Plus DNA polymerase (Toyobo, catalog number: KOD-201)
13. 琼脂糖 (Invitrogen, catalog number: 75510-019)
14. QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, catalog number: 28704)
15. Ligation sequencing kit (Oxford Nanopore, catalog number: SQK-LSK109)
16. Native barcoding kit (Oxford Nanopore, catalog number: EXP-NBD104)
17. NEBNext FFPE DNA repair mix (NEB, catalog number: M6630L)
18. Ultra II End-prep enzyme mix (NEB, catalog number: E7372AA)
19. Blunt/TA ligase master mix (NEB, catalog number: M0367L)
20. Quick T4 DNA ligase (NEB, catalog number: E6057AA)
21. 核酸染料 (Mei5bio, catalog number: MF079-plus-05)
22. 6x DNA loading buffer (Tiangen, catalog number: RT201-01)
23. Trans 15K DNA marker (全式金生物, catalog number: BM161-01)
24. Primer Rm (5'-GACCATCTAGCGACCTCCAC - NNNNNN-3')
25. Primer Rm (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3')
26. DNA beads (Beckman, catalog number: A63987)
27. Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen, catalog number: Q32854)
28. Ribonuclease inhibitor (Promega, catalog number: N2515)
29. PBS 缓冲液 (见溶液配方)
30. TBE 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 冷冻离心机 (Beckman Coulter, model: Allegra™ X-22R)
2. 高速冷冻离心机 (Thermo Heraeus FERSCO 17 Centrifuge)
3. 超速冷冻离心机 (Beckman Coulter, model: XP-100)
4. 掌上离心机

5. 高压蒸汽灭菌锅
6. PCR 仪
7. 凝胶成像系统
8. 电泳仪
9. 恒温水浴锅
10. 超净工作台
11. PromethION 测序仪
12. 制胶槽和梳子
13. 手术刀
14. 磁力架
15. 电子天平
16. Qubit™ 4 Fluorometer

实验步骤

一、病毒粒子 (VLPs) 富集 (图 1)

图 1. 病毒富集、核酸提取纯化及测序流程 (Cao 等, 2020)

1. 取 1~1.5 g 粪便于干净无菌的离心管，在 15 ml 无菌 PBS 中重悬并充分混匀。
2. 3,000 × g 4 °C 离心 10 min，取上清于新的无菌的离心管。
3. 重复离心一次。
4. 将上清液用无菌 0.45 μm PVDF 滤膜过滤至新的干净无菌的离心管。
5. 将滤液再次用无菌 0.45 μm PVDF 滤膜过滤。
6. 滤液转移至灭菌的超速离心管内，加无菌 PBS 至超过离心管体积 2/3 处，配平。
7. 180,000 × g 4 °C 离心 3 h。
8. 弃上清，将离心管倒置在干净吸水纸以流尽残液。
9. 加 150 μl 无菌 PBS 重悬沉淀并转移至新的无菌 1.5 ml 离心管。
10. 250 μl 无菌 PBS 重复冲洗超速离心管并转移至 1.5 ml 离心管。
11. 加入 8 U 的 TURBO DNase I、45 μl 10x TURBO DNase I buffer 和 20 U 的 RNase A 在 37 °C 下水浴处理 30 min。

二、病毒核酸提取

处理后的病毒粒子取 140~200 μl 使用 QIAamp MinElute virus spin kit 试剂盒提取核酸，剩余病毒粒子-80 °C 储存。

三、反转录为 cDNA

取 13 μl 核酸按照如下体系进行反转录，剩余核酸-80 °C 储存。

第一链：

RNA	13 μl
Rrm primer	1 μl

65 °C 5 min，冰浴 2 min；

5x MLV buffer	4 μl
10 mM dNTP mix	1 μl
RNA inhibitor	0.5 μl
M-MLV	1 μl

25 °C 10 min； 37 °C 60 min； 95 °C 10 min； 4 °C

第二链:

Rrm primer	0.5 μ l
10mM dNTP mix	1 μ l
10x buffer	2.5 μ l
Klenow fragment	2 μ l
25 °C 10 min; 37 °C 60 min; 75 °C 10 min; 4 °C	

四、PCR 扩增

取反转录产物按照如下体系和程序进行 PCR 扩增，一般为 25 μ l 体系 (为获得足够质量的扩增产物，可增大到 200 μ l 体系):

体系为:

Rm primer	1 μ l
2mM dNTP mix	1.25 μ l
10x buffer	2.5 μ l
Mg ²⁺	1 μ l
KOD 酶	0.5 μ l
反转录产物	1 μ l
ddH ₂ O	17.75 μ l

扩增程序为:

Step1: 95 °C	5 min	预变性
Step2: 95 °C	30 s	变性
Step3: 54 °C	1 min	退火
Step4: 72 °C	30 s	延伸
Step5: Go to Step 2-4	34 个循环	
Step6: 72 °C	10 min	充分延伸
Step7: 4 °C	∞	反应终止，低温保存

PCR 体系配好后轻微涡旋混匀，分装到八连管中，稍离心，放入 PCR 仪中，运行程序。

五、琼脂糖凝胶电泳和胶回收 (图 2)

图 2. 病毒核酸扩增后的琼脂糖凝胶电泳

1. 用 1x TBE 配制 2%浓度琼脂糖胶 (200 ml TBE 加 4 g 琼脂糖)，微波炉加热煮沸至琼脂糖完全溶解，自来水冷却至约 60~70 °C (体感可承受)，加入 20 μ l 核酸染料，摇匀后倒入放有制胶托板的制胶槽中，插入梳子 (300 μ l)，冷却凝固 20 min。
2. 将 200 μ l PCR 反应液加入 100 μ l 3x Loading buffer 混匀后全部加入到制好的琼脂糖胶孔中，加入 Marker，200 V 电泳 10 min。
3. 取出琼脂糖胶放入凝胶成像系统中拍照，检查扩增产物目标条带。目的条带回收纯化：参照 Marker 条带分子量大小，用手术刀在紫外发光仪上切取大于 500 bp 的条带胶块，参照 QIAquick gel extraction kit 说明书回收纯化目的基因片段，并用 Qubit 4.0 检测胶回收产物浓度。

六、文库制备及测序

回收后的核酸按照 ONT PromethION DNA 建库说明书进行基因文库制备和上机测序。

图 3. 主要病毒组成及相对丰度 (Cao 等, 2020)

注意事项

1. 病毒粒子富集过程中应保证在无菌环境中进行。
2. PBS 缓冲液重悬粪便时应充分悬浮，将粪便与食物残渣等冲洗干净，可多次冲洗至上清液色浅澄清后进行下一步离心，也应当注意控制溶液体积。
3. 在超速离心过程中离心管中液体应超过离心管容积的 2/3，转速不宜过高，可适当延长离心时间以使病毒粒子沉淀更充分 (Thurber 等, 2009)。
4. 病毒核酸在反转录扩增中应避免反复用枪头吹吸，可以选择轻轻拍打的方式混匀。扩增过程为了保证核酸产量，可以扩增 50 μ l 体系四组共 200 μ l 总体系 (Froussard, 1993)。
5. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳呈现为弥散条带，为了降低回收胶的重量，选择高浓度琼脂糖凝胶和大电压进行电泳，Marker 中 500 bp 条带充分跑开时即可切胶回收，丢弃小于 500 bp 的条带，其余条带全部切下回收。回收时裂胶液体积过大，需反复多次添加至同一吸附柱离心。

溶液配方

1. TBE 缓冲液

先配制 10x TBE 缓冲液。称取 108 g Tris、7.44 g Na₂EDTA·2H₂O、55 g 硼酸，加去离子水 800 ml 充分溶解，再定容至 1 L，121 °C，20 min 灭菌后室温保存，使用时用去离子水稀释 10 倍。

2. PBS 缓冲液 (pH 7.2~7.4):

称取 KH₂PO₄ 0.24 g、Na₂HPO₄ 1.44 g、NaCl 8 g、KCl 0.2 g，加去离子水约 800 ml 充分搅拌溶解，然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4，最后定容到 1 L。

致谢

该项工作得到中国国家重点研究发展计划 (批准号 2018YFC2000500)，中国科学院战略重点研究计划 (批准号 XDB29020000) 和国家自然科学基金 (批准号 31771481 和 91857101) 的支持。

参考文献

1. Cao, J., Zhang, Y., Dai, M., Xu, J., Chen, L., Zhang, F., Zhao, N. and Wang, J. (2020). [Profiling of human gut virome with oxford nanopore technology](#). *Medicine in Microecology* 4: 100012.
2. Froussard, P. (1993). [rPCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequences](#). *PCR Methods Appl* 2(3): 185-190.
3. Thurber, R. V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L. and Rohwer, F. (2009). [Laboratory procedures to generate viral metagenomes](#). *Nat Protoc* 4(4): 470-483.