

利用 GeoChip 分析环境微生物功能基因群落结构

Analysis of microbial functional gene community structure in environmental samples by GeoChip

郭雪*, 杨云锋

环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 环境学院, 清华大学, 北京

*通讯作者邮箱: guoxue0601@mail.tsinghua.edu.cn

摘要

GeoChip 是一种高通量基因芯片, 包含了编码参与多种地球化学循环(如, 碳循环、氮循环、硫代谢、磷利用、金属抗性、有机物降解等)的微生物相关功能基因的寡核苷酸探针。目前, 最新版的 GeoChip 5.0 共有 161,961 探针, 覆盖了 1,447 个基因家族的超过 365,000 个基因。与宏基因组测序技术相比, GeoChip 芯片技术虽然无法用于未知物种或功能基因的检测, 但它对已知功能基因的检测重现性更好, 灵敏度更高。因而, GeoChip 芯片技术被广泛地应用于土壤、海洋、森林、农田、湖泊、肠道等各种环境微生物群落分析之中, 揭示微生物群落的代谢途径和功能基因群落结构变化。本文详细介绍了 GeoChip 芯片实验过程中 DNA 荧光标记制备、芯片杂交与扫描和数据分析, 并列出了实验过程中的注意事项, 期望能够为开展 GeoChip 芯片分析环境微生物群落的读者提供一定参考。

关键词: GeoChip, 功能基因, 微生物群落, 芯片, 高通量

材料与试剂

1. 各种型号枪头
2. 离心管
3. DNA 样品 (或 cDNA)
4. 随机引物 Random primer (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ random hexamers; Life Technologies,)
5. dNTP (5 mM dAGC-TP, 2.5 mM dTTP; GE Healthcare)
6. CyDye (25 nM Cy-3 dUTP; GE Healthcare)
7. Klenow (imer; 40 U ml⁻¹; San Diego, CA)
8. Klenow buffer (San Diego, CA)

9. 双蒸水 H₂O
10. PCR 管
11. Qiagen QIAquick Kit 试剂盒
12. 2×HI-RPM hybridization buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)
13. 10×Acgh Blocking Agent (Thermo Fisher Scientific, USA)
14. Formamide (Thermo Fisher Scientific, USA)
15. Cot-1 DNA (Thermo Fisher Scientific, USA)
16. Universal standard (home-made common oligonucleotide reference standard)
17. GeoChip5.0 芯片 (180K 或者 60K)
18. Wash Buffer 1 (Agilent)
19. Wash Buffer 2 (Agilent)

仪器设备

1. 涡旋仪
2. 小离心机
3. PCR 仪
4. 离心机 (配备 1.5 ml 转头)
8. 恒温水浴锅
9. 金属浴恒温仪
10. 移液器
11. Nanodrop 核酸检测仪
12. 真空浓缩仪 (Speed Vac; ThermoSavant)
13. 恒温箱
14. 分子杂交炉 (Shel labs G2545A)
15. Agilent SureHyb 组件
16. 芯片扫描仪 NimbleGen MS200 Microarray Scanner (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA).
17. 磁力搅拌器

实验步骤

1. DNA 荧光标记

1.1 按照如下表 1 配置 DNA/随机引物混合体系（35 μL ），并分装于 PCR 反应管。

表 1. DNA/随机引物混合体系配置

组成组分	35 μL 体系
Random primer (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5.5 μL
DNA (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	10.0 μL
H ₂ O	19.5 μL

1.2 在制备 DNA 荧光标记时，一般需要 500-1000 ng DNA 样品，可以根据样品 DNA 浓度利用双蒸水（H₂O）将体系调整至 35 μL 。

1.3 利用振荡器充分混匀 DNA/随机引物混合体系，利用 PCR 仪 99.9 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min，立即置于冰上冷却。

1.4 按照如下表 2 配置荧光标记预混合液体系。

表 2. 荧光标记预混合液体系配置

组成组分	15 μL 体系
10 x Buffer	5 μL
dNTP mix	2.5 μL
Klenow (imer)	1 μL
CyDye* (25 nM)	0.5 μL
H ₂ O	6 μL

*荧光染料 CyDye 是光敏感性试剂，因而配置过程需要再暗室中完成。

1.5 将 15 μL 荧光标记预混合液加入到冷却的 DNA/随机引物混合液中混合均匀，利用 PCR 仪 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 6 hrs，95 $^{\circ}\text{C}$ 热激灭活酶反应 3 min，并立即 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却终止反应。

1.6 利用 Qiagen QIAquick Kit 试剂盒严格按照产品说明对荧光标记 DNA 样品进行纯化，用 100 μL H₂O 或者 EB 溶液洗脱回收 DNA 样品(卢慧 2013)。

1.7 利用 Nanodrop 测定荧光染料 CyDye 标记效率，效率最低应>50 pmol (例如，纯化 DNA 被 100 μL EB 溶液洗脱回收并且 Nanodrop 测定为 0.8 pmol/ μL ; 100*0.8=80，因而荧光标记效率合格，可以用于芯片杂交)。

1.8 设置真空浓缩仪 (Speed Vac) 温度 45 °C, 运行时间 2 hrs, 真空等级 (Vacuum level) 5.1, 对荧光标记 DNA 样品进行彻底干燥。

2. GeoChip 芯片杂交

2.1 利用 27.5 µL 双蒸水重新溶解荧光标记 DNA 样品, 简短震荡并离心收集溶液于离心管底部。

2.2 目前最新版 GeoChip 5.0 有 180K 和 60K 两个版本(He 等, 2007; Tu 等, 2015; Shi 等, 2019), 按照如下表 3 配置杂交预混合液体系用于 180K 或 60K 版本 GeoChip 杂交分析。

表 3. 杂交预混合液体系配置

	180K	60K
2*HI-RPM Hybridization Buffer	63.5 µL	27.5 µL
10*Acgh Blocking Agent	12.7 µL	5.5 µL
Formamide	12.7 µL	5.5 µL
Cot-1 DNA	5.5 µL	2.4 µL
Universal standard	5 µL	2.2 µL
Total for each sample	99.4 µL	43.1 µL

2.3 将配置好的杂交预混合液加入到溶解的荧光标记 DNA 样品中, 弹动 15 s 并离心收集于离心管底部。

2.4 利用金属浴恒温仪 95 °C 温育 3 min 使得 DNA 变性, 并立即转移至 37 °C 恒温箱中温育 30 min。

2.5 37 °C 条件下 6000 × g 离心 1 min, 并立即放回 37 °C 恒温箱中。

2.6 检查分子杂交炉设置温度为 67 °C, 转速 20 rpm。

2.7 将一个垫圈玻片装入 Agilent SureHyb 组件底座上, 标签正面为 “Agilent” 向上。

2.8 吸取 112 µL (180K)或者 50 µL(60K)杂交混合液, 转移其中~110 µL (180K) 或~48 µL (60K)至垫圈玻片中心部位, 避免液体接触边缘垫圈和产生气泡。

2.9 将标签为 “Agilent” 的微阵列 GeoChip 玻片轻轻覆盖在垫圈玻片上, 数字条码面朝上, 避免 GeoChip 玻片于杂交混合液接触时产生气泡。

2.10 将 Agilent SureHyb 腔盖轻轻置于 GeoChip 玻片上, 并将夹具组件滑动到底座和腔件中间, 用手将夹具组件螺丝牢牢地拧紧, 固定底座和腔盖。

2.11 垂直旋转组装腔体，确保垫圈内杂交液体没有气泡或者气泡可以随液体平稳移动（如有必要，在桌面上轻击组件以移动固定的气泡）。

2.12 将 Agilent SureHyb 组件放置于分子杂交炉中杂交 22-24 hrs，保证旋转平衡。

2.13 将 200 mL Wash Buffer 2 在 43 °C 水浴锅中温育过夜。

2.14 按照如下三个步骤对芯片进行清洗：

步骤	清洗液	温度	磁力搅拌	时间	2.15 在清洗过程中尽量
拆解芯片	Wash Buffer 1	室温（~20 °C）			
清洗 1	Wash Buffer 1	室温（~20 °C）	200 rpm	5 min	
清洗 2	Wash Buffer 2	37 °C	140 rpm	1 min	

避免拆解后的 GeoChip 玻片暴露于空气中，避免玻片置于清洗液过程中形成气泡，同时保证只触摸 GeoChip 玻片的条形码部位或边缘。

3. GeoChip 芯片扫描和数据分析

3.1 将 GeoChip 芯片插入到芯片扫描仪（NimbleGen MS200 Microarray Scanner）的载玻片架中，保证标签为“Agilent”一面向上，条形码一端在外侧。

3.2 利用 Multi-TIFF 模式对芯片进行扫描，生成图片格式数据（图 1）。

3.3 利用 Agilent 芯片读取转化软件（Agilent Feature Extraction program, v11.5）将图片文件转化为文本数据文件，并将数据上传至 GeoChip 分析网站

（<http://ieg.ou.edu/microarray/>）对数据进行标准化 (Zhou 等, 2011; 谢建平 2011; Guo 等, 2020) 和后续统计分析。

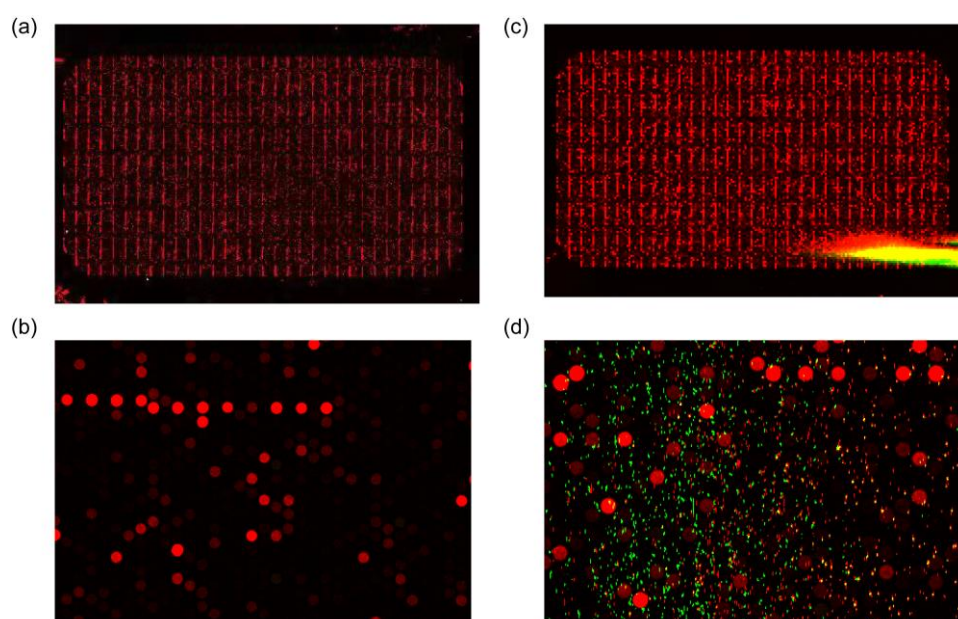


图 1. GeoChip 芯片扫描生成结果示意图。正常清洗后 GeoChip 芯片扫描整体 (a) 和局部 (b) 放大效果示意图；毛絮污染后 GeoChip 芯片扫描整体 (c) 和局部 (d) 放大效果示意图

注意事项

1. DNA 样品的质量对于荧光标记、芯片杂交和最终的数据质量影响很大，因此，尽可能得到高质量的 DNA 样品是 GeoChip 芯片分析最关键的第一步。
2. 实验过程中用到的荧光染料对光比较敏感，在有条件的情况下尽可能做到避光或者所有实验过程都在暗室中进行。
3. 实验过程涉及药品试剂较多，芯片杂交对温度等环境条件比较敏感，为避免批次效应尽量将所有样品在一批或者短时间内处理完成。
4. 空气中悬浮颗粒和细小毛絮沾染在清洗后的 GeoChip 芯片上对后续芯片扫描影响较大（图 1），因而应尽量保证实验环境的清洁。

致谢

本项目由国家自然科学基金项目(编号：41907209)和中国博士后科学基金项目(编号：2018M641327、2019T120101) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41907209), the China Postdoctoral Science Foundation (2018M641327 and 2019T120101)]支持。

参考文献

1. Guo, X., Gao, Q., Yuan, M., Wang, G., Zhou, X., Feng, J., Shi, Z., Hale, L., Wu, L., Zhou, A., Tian, R., Liu, F., Wu, B., Chen, L., Jung, C. G., Niu, S., Li, D., Xu, X., Jiang, L., Escalas, A., Wu, L., He, Z., Van Nostrand, J. D., Ning, D., Liu, X., Yang, Y., Schuur, E. A. G., Konstantinidis, K. T., Cole, J. R., Penton, C. R., Luo, Y., Tiedje, J. M. and Zhou, J. (2020). Gene-informed decomposition model predicts lower soil carbon loss due to persistent microbial adaptation to warming. *Nature Communications* 11(1): 4897
2. He, Z., Gentry, T. J., Schadt, C. W., Wu, L., Liebich, J., Chong, S. C., Huang, Z., Wu, W., Gu, B. and Jardine, P. (2007). GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *Isme Journal* 1(1): 67-77
3. Shi, Z., Yin, H., Nostrand, J. D. V., Voordeckers, J. W. and Zhou, J. (2019). Functional Gene Array-Based Ultrasensitive and Quantitative Detection of Microbial Populations in Complex Communities.
4. Tu, Q., Yu, H., He, Z., Deng, Y., Wu, L., Van Nostrand, J. D., Zhou, A., Voordeckers, J., Lee, Y. J. and Qin, Y. (2015). GeoChip 4: a functional gene-array-based high-throughput environmental technology for microbial community analysis. *Molecular Ecology Resources* 14(5): 914-928
5. Zhou, J. Z., Xue, K., Xie, J. P., Deng, Y. and Luo, Y. Q. (2011). Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming. *Nature Climate Change* 2(2): 106-110
6. 卢慧 (2013). 三江源典型高寒草甸不同海拔梯度土壤微生物研究, 青海师范大学.
7. 谢建平 (2011). 功能基因芯片 (GeoChip) 在两种典型环境微生物群落分析中应用的研究, 中南大学.