



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111455021 A

(43)申请公布日 2020.07.28

(21)申请号 201910047978.6

(22)申请日 2019.01.18

(71)申请人 广州微远基因科技有限公司

地址 510130 广东省广州市高新技术产业
开发区科丰路31号自编三栋华南新材
料创新园G10栋303号

(72)发明人 许腾 曾伟奇 秦璐 王小锐
李永军 杨敏玲 苏杭

(74)专利代理机构 广州新诺专利商标事务所有
限公司 44100

代理人 李海恬

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6806(2018.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

去除宏基因组中宿主DNA的方法及试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种去除宏基因组中宿主DNA的方法及试剂盒,属于微生物基因检测技术领域。该方法包括以下步骤:DNA片段化:将宿主基因组DNA进行片段化处理,得到宿主DNA片段;氨基化:对上述宿主DNA片段进行氨基化处理;偶联磁珠:将上述经氨基化处理的宿主DNA片段与磁珠偶联,得捕获磁珠;杂交捕获:将待测样本采用上述方法进行DNA片段化,加入上述制备得到的捕获磁珠,进行杂交反应,磁力吸附磁珠,转移上清液,即得去除宿主DNA的待测宏基因组样本。上述方法通过将片段化的宿主DNA氨基化后,偶联到磁珠上,再通过磁珠与宏基因组样本核酸杂交的方式,把宏基因组样本核酸中的宿主源DNA分离开,从而使宏基因组样本核酸中病原微生物核酸的占比大大提高。

1. 一种去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,包括以下步骤:
DNA片段化:将宿主基因组DNA进行片段化处理,得到宿主DNA片段;
氨基化:对上述宿主DNA片段进行氨基化处理;
偶联磁珠:将上述经氨基化处理的宿主DNA片段与磁珠偶联,得捕获磁珠;
杂交捕获:将待测样本采用上述方法进行DNA片段化,加入上述制备得到的捕获磁珠,进行杂交反应,磁力吸附磁珠,转移上清液,即得去除宿主DNA的待测宏基因组样本。
2. 根据权利要求1所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述宿主的物种为人。
3. 根据权利要求1所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述DNA片段化步骤中,所述宿主DNA片段的大小为150-300bp。
4. 根据权利要求3所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述宿主基因组DNA片段化步骤中,采用超声破碎进行片段化处理,所述超声破碎的参数为:峰值功率为30-70W,脉冲占空系数为15.0-25.0,循环数为150-250,时间为200-400s;所述超声破碎的次数为1-3次。
5. 根据权利要求1所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述氨基化步骤中,将所述宿主DNA片段与Premix Taq™试剂反应。
6. 根据权利要求5所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,将所述宿主DNA片段与Premix Taq™试剂按照体积比为1:0.8-1.2混匀,70-74℃反应5-20min。
7. 根据权利要求1所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述偶联磁珠步骤中,依次包括以下步骤:磁珠活化、磁珠偶联和双链变性;
所述磁珠活化步骤中,取羧基磁珠,加入一水合2-(N-吗啉代)乙烷磺酸洗涤,磁力吸附后去除上清,再加入乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸和N-羟基丁二酰亚胺,震荡活化,即得;
所述磁珠偶联步骤中,往活化后的磁珠加入经氨基化处理的宿主DNA片段,偶联反应,磁力吸附磁珠,去除上清液,重悬后封闭,即得;
所述双链变性步骤中,取上述偶联后的磁珠,加热使偶联于磁珠上的DNA双链变性,随后立即冷却,磁力吸附磁珠,去除上清液,洗涤,重悬,即得所述捕获磁珠。
8. 根据权利要求7所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述磁珠偶联步骤中,以阻断试剂溶液重悬保存偶联后磁珠,备用;
所述双链变性步骤中,以阻断试剂溶液洗涤、重悬偶联后磁珠;
所述阻断试剂溶液含有:30-70mM的氯化钾,10-30mM的Tris-HCl,5-25mM的硫酸镁,50-200μg/ml的BSA。
9. 根据权利要求1所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述杂交捕获步骤中,所述杂交反应的条件为:95℃加热3-5min,40-70℃加热1-3min。
10. 根据权利要求1所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法,其特征在于,所述杂交捕获步骤中,所述杂交反应中,还按照50-50μl阻断剂溶液/0.1-1mg捕获磁珠的量加入阻断试剂溶液,进行杂交反应;
所述阻断试剂溶液含有:30-70mM的氯化钾,10-30mM的Tris-HCl,5-25mM的硫酸镁,50-200μg/ml的BSA。

11. 权利要求1-10任一项所述的去除宏基因组中宿主DNA的方法在制备检测宏基因组的试剂盒中的应用。

12. 一种检测宏基因组的试剂盒,其特征在于,包括权利要求1-10任一项所述的捕获磁珠。

13. 根据权利要求12所述的检测宏基因组的试剂盒,其特征在于,还包括阻断试剂,所述阻断试剂包括:摩尔比为4-6:1.5-2.5:0.7-1.3的氯化钾:Tris-HCl:硫酸镁,以及工作浓度为100 μ g/ml的BSA。

去除宏基因组中宿主DNA的方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物基因检测技术领域,特别是涉及一种去除宏基因组中宿主DNA的方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 宏基因组也称病原微生物环境基因组或病原微生物元基因组,是指特定组织或样本中全部微生物遗传物质的总和,它包含了目前体外可培养的和不能培养的微生物的基因组。目前,在现有技术条件下,仅有0.1%~1%的微生物是可培养的,这已成为病原微生物准确诊断的一个限制性因素。

[0003] 而宏基因组测序技术是通过提取某一组织或样本中的所有微生物基因组、构建基因组文库及对文库进行测序和筛选,寻找和发现病原的一种方法。它克服了多数病原体不能培养的弊端,能够准确、高效地获得全部病原体遗传物质信息,直接检测出造成人类感染性疾病的病原体微生物,对疑难感染性疾病的诊断具有重要参考价值。

[0004] 近年来,利用宏基因组测序技术在疑难感染性疾病诊断方面的应用越来越广泛。尤其是人呼吸道及胃肠道感染性疾病的诊断。但在呼吸道和胃肠道宏基因组中,含有大量的人源基因组DNA。相对于宿主的基因组含量,病原体基因组含量一般比较少,往往导致在高通量测序结果中掺入大量宿主DNA的干扰数据,增加后续信息分析的处理难度,影响分析结果。这同时意味着,同样的测序深度下,测得的序列中大部分是无用的人源DNA序列(即宿主DNA序列),增加成本,造成浪费。因此,在呼吸道和胃肠道宏基因组测序中,为达到病原体基因组足够的序列覆盖度,使用一种前处理办法,在保证尽可能少微生物遗传物质的损失的情况下,消除宿主基因组的影响是很有意义的。

[0005] 目前,已公开的消除宿主DNA的方法主要有以下几种,但都存在一些不足:1) 基于宿主细胞与微生物细胞大小差异对宿主细胞进行清除,然而样本中存在大量的胞外DNA,而这些胞外DNA仅通过细胞大小分离是无法做到的。2) 短时间低速离心去除大部分人源细胞后用DNase来处理样本以减少宿主DNA含量,然而此种办法无法检测很重要的游离核酸,并且酶处理方法昂贵、敏感,且要求样本必需是新鲜的,而且难以大规模进行。3) 采用蛋白酶和表面活性剂联合的温柔型消化法,将宿主基因组释放于溶液中,获得保留完整细胞壁结构的微生物,实现去宿主化微生物核酸提取。此种办法同样无法检测很重要的游离核酸,并且该法成本较高、蛋白酶消耗大、时间较长。4) 基于渗透裂解及叠氮碘化丙锭处理的化学方法去除宿主污染,此方法与利用DNase去除宿主DNA的方法相似,所有基于酶解的方法都无法获得游离核酸信息,并且同样需要较长时间,目前并未被广泛应用。5) 利用探针杂交磁珠捕获方式降低宏基因组DNA样品中宿主DNA的影响,此方法依赖于探针的预先设计,不能检测到未知的微生物核酸信息。

[0006] 即依赖于人的细胞和微生物的差异来去除人源宿主DNA,效率低,灵敏度低,且可能存在漏检情况;宏基因组测序由于大量的人源宿主DNA不去除或去除不充分导致测序成本高,后续分析难度增加。

发明内容

[0007] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种去除宏基因组中宿主DNA的方法,该方法可将宏基因组样本核酸中的宿主DNA分离,从而使宏基因组样本核酸中病原微生物核酸的占比大大提高。

[0008] 一种去除宏基因组中宿主DNA的方法,包括以下步骤:

[0009] DNA片段化:将宿主基因组DNA进行片段化处理,得到宿主DNA片段;

[0010] 氨基化:对上述宿主DNA片段进行氨基化处理;

[0011] 偶联磁珠:将上述经氨基化处理的宿主DNA片段与磁珠偶联,得捕获磁珠;

[0012] 杂交捕获:将待测样本采用上述方法进行DNA片段化,加入上述制备得到的捕获磁珠,进行杂交反应,磁力吸附磁珠,转移上清液,即得去除宿主DNA的待测宏基因组样本。

[0013] 上述去除宏基因组中宿主DNA的方法,基于宿主和微生物遗传物质差异最大之处——遗传编码信息的差异,通过将片段化的宿主DNA氨基化后,偶联到磁珠上,再通过磁珠与宏基因组样本核酸杂交的方式,把宏基因组样本核酸中的宿主源DNA分离开,从而使宏基因组样本核酸中病原微生物核酸的占比大大提高。因此,可以在同样的测序深度下,提高测序的灵敏度,降低建库和测序的成本以及后期数据分析的难度。

[0014] 本发明在考虑如何制备人源序列探针时,曾思考通过人工合成序列的方式实施,但是,人的基因组DNA长度达到3G,序列复杂程度极高,而目前商业化通过探针合成进行的捕获技术,捕获区域极限是两三百兆左右(如罗氏Nimblegen),远低于人类全基因组长度,并且探针设计和成本昂贵。几乎不可能用人工合成序列的方法来匹配大部分人基因组DNA的序列。因此,本发明人基于“序列特异性区分人源和微生物源”的核心思路,放弃了人工合成序列的实施策略,转而从培养的人类细胞系中提取人的遗传物质,通过一系列后续操作,使其成为探针,特异性地从样本混合DNA中匹配到人源序列,从而实现人源/微生物源DNA的分选。

[0015] 在其中一个实施例中,所述宿主的物种为人。上述方法可用于临床样本检测的去除宏基因组中人源宿主DNA,即以人类基因组DNA进行片段化后偶联于磁珠上,从而可捕获宏基因组中人源宿主DNA。

[0016] 在其中一个实施例中,所述DNA片段化步骤中,所述宿主DNA片段的大小为150-300bp。将宿主DNA片段控制在上述大小范围,该区间的DNA片段与测序过程中,mNGS所使用的片段大小接近,利于偶联探针杂交捕获样本DNA。

[0017] 在其中一个实施例中,所述宿主基因组DNA片段化步骤中,采用超声破碎进行片段化处理,所述超声破碎的参数为:峰值功率为30-70W,脉冲占空系数(Duty Factor)为15.0-25.0,循环数为150-250,时间为200-400s;所述超声破碎的次数为1-3次。采用上述破碎参数,能够使片段化的DNA探针大小适中,具有方便与磁珠偶联,并利于杂交捕获宿主DNA的优点。

[0018] 在其中一个实施例中,所述氨基化步骤中,将所述宿主DNA片段与Premix Taq™试剂反应。

[0019] 通过体外培养细胞系获取人源DNA实施分选,这一策略在应用上存在一定的技术难度。例如,如何在特异性的匹配到样本中的人源DNA后,成功分离出来,就需要对用作探针的人基因组DNA进行预处理,从而达到这一目的。预处理有很多方法,但几乎都离不开DNA的

体外修饰,这一过程目前最为成熟的应用步骤是在人工合成DNA的时候进行,而针对天然提纯的DNA进行修饰则比较困难。特别是本发明人希望通过DNA片段的末端氨基化修饰来完成与羧基磁珠缩合反应后的固相化过程难度非常大。最终,通过反复的实验探索和筛选,本发明人创新地利用脱氧核糖核酸碱基在非匹配状态下自带的伯氨基(-NH₂)来替代额外的氨基修饰,通过Taq酶在双链DNA末端添加A尾的特性,给天然提纯的人基因组DNA探针加上dATP,使人基因组DNA的末端带上伯氨基(-NH₂),从而完成氨基化的过程。

[0020] 在其中一个实施例中,所述氨基化步骤中,将所述宿主DNA片段与Premix Taq™试剂按照体积比为1:0.8-1.2混匀,70-74℃反应5-20min。以上述条件进行氨基化,具有片段化后的DNA氨基化比例最高的优点。上述氨基化过程中,dATP的伯氨基不同于人工合成DNA时添加的额外氨基修饰,其化学反应活性更低,常规的缩合流程并不能有效地将这种修饰的DNA连接到羧基化的磁珠上,本发明人在缩合剂种类、浓度、反应时间与温度上进行了梯度测试,才发现最佳的反应条件。

[0021] 在其中一个实施例中,所述偶联磁珠步骤中,依次包括以下步骤:磁珠活化、磁珠偶联和双链变性;

[0022] 所述磁珠活化步骤中,取羧基磁珠,加入一水合2-(N-吗啉代)乙烷磺酸洗涤,磁力吸附后去除上清,再加入乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸和N-羟基丁二酰亚胺,震荡活化,即得;

[0023] 所述磁珠偶联步骤中,往活化后的磁珠加入经氨基化处理的宿主DNA片段,偶联反应,磁力吸附磁珠,去除上清液,重悬后封闭,即得;

[0024] 所述双链变性步骤中,取上述偶联后的磁珠,加热使偶联于磁珠上的DNA双链变性,随后立即冷却,磁力吸附磁珠,去除上清液,洗涤,重悬,即得所述捕获磁珠。

[0025] 在其中一个实施例中,所述磁珠偶联步骤中,以阻断试剂溶液重悬保存偶联后磁珠,备用;

[0026] 所述双链变性步骤中,以阻断试剂溶液洗涤、重悬偶联后磁珠;

[0027] 所述阻断试剂溶液含有:30-70mM的氯化钾,10-30mM的Tris-HCl,5-25mM的硫酸镁,50-200μg/ml的BSA。

[0028] 通过上述阻断试剂的使用,阻断了样本DNA与磁珠间的非特异性结合,由此获得了更高的捕获效率、更高的文库多样性、以及更均一的覆盖度,尤其适合微量以及低丰度突变的样本文库的构建,有利于实现技术流程上的节约。

[0029] 在其中一个实施例中,所述杂交捕获步骤中,所述杂交反应的条件为:95℃加热3-5min,50℃加热1-3min。

[0030] 在其中一个实施例中,所述杂交捕获步骤中,所述杂交反应中,还按照50-50μl阻断剂溶液/0.1-1mg捕获磁珠的量加入阻断试剂溶液,进行杂交反应;

[0031] 所述阻断试剂溶液含有:30-70mM的氯化钾,10-30mM的Tris-HCl,5-25mM的硫酸镁,50-200μg/ml的BSA。

[0032] 通过上述阻断试剂的使用,阻断了样本DNA与磁珠间的非特异性结合,由此获得了更高的捕获效率、更高的文库多样性、以及更均一的覆盖度,尤其适合微量以及低丰度突变的样本文库的构建,有利于实现技术流程上的节约。并且,为了在同一个反应体系中进行,还筛选了杂交反应中的投入量,对杂交捕获中的阻断试剂进行了优化。

[0033] 本发明还公开了上述的去除宏基因组中宿主DNA的方法在制备检测宏基因组的试剂盒中的应用。

[0034] 本发明还公开了一种检测宏基因组的试剂盒,包括上述的捕获磁珠。

[0035] 在其中一个实施例中,该试剂盒还包括阻断试剂,所述阻断试剂包括:摩尔比为4-6:1.5-2.5:0.7-1.3的氯化钾:Tris-HCl:硫酸镁,以及工作浓度为100 μ g/ml的BSA,优选摩尔比为5:2:1。

[0036] 上述工作浓度指试剂使用时的浓度,在试剂盒中为了便于保存和运输,也可配置更高浓度的试剂浓度,仅需在使用时稀释即可。

[0037] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0038] 本发明的一种去除宏基因组中宿主DNA的方法,通过dATP自带的伯氨基和Taq酶加A尾的活性来引入氨基修饰,用这一方法替代了传统DNA偶联磁珠中的氨基引入方式,并通过大量实验测试并确定了反应条件,实现了核心思路(从天然提纯DNA制备探针)-应用策略(以脱氧核糖核酸碱基在非匹配状态下自带的伯氨基替代额外的氨基修饰)-技术实施(缩合反应调整)这三个层级的全面更新,最终创立了DNA去宿主的新方法。

[0039] 该方法基于宿主和微生物遗传物质差异最大之处——遗传编码信息的差异,通过将片段化的宿主DNA氨基化后,偶联到磁珠上,再通过磁珠与宏基因组样本核酸杂交的方式,把宏基因组样本核酸中的宿主源DNA分离开,从而使宏基因组样本核酸中病原微生物核酸的占比大大提高。因此,可以在同样的测序深度下,提高测序的灵敏度,降低建库和测序的成本以及后期数据分析的难度。

[0040] 本发明的一种检测宏基因组的试剂盒,包含上述偶联了片段化的宿主DNA的磁珠,可通过磁珠与宏基因组样本核酸杂交的方式,把宏基因组样本核酸中的宿主源DNA分离开,通过去宿主处理,减少了人源遗传物质的干扰,可以提高目标病原微生物检测的灵敏度。并且在宏基因组测序文库构建前进行去宿主DNA处理,可以大大降低宏基因组测序的成本和后续数据处理的难度,提高检测效率。同时,在保证同等测序深度的情况下,可以极大降低测序成本。

具体实施方式

[0041] 为了便于理解本发明,下面将参照实施例对本发明进行更全面的描述。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0042] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0043] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。下列实施例中未注明来源的实验材料,均为市售购得。

[0044] 实施例1

[0045] 一种去除宏基因组中宿主DNA的方法,包括以下步骤:

[0046] 1、DNA片段化。

[0047] 取人类基因组DNA(购自北京百奥莱博科技有限公司),使用Covaris M220非接触式超声波破碎仪进行DNA片段化处理。

[0048] 在超声波破碎仪的配套反应管中加入体积为50-100 μ L的DNA样本(约10 μ g),超声波片段化参数如下:

[0049] 表1.超声波片段化参数

[0050]

参数	设定值
Peak Power (峰值功率)	50W
Duty Factor (脉冲占空系数)	20.0
Cycles/Burst (循环数)	200
Time (时间)	300s

[0051] 重复上述步骤一次,获得150-300bp大小的人类基因组DNA片段。

[0052] 2、氨基化。

[0053] 2.1、对片段化的人类DNA片段进行氨基化处理。

[0054] 取步骤1中破碎得到的人类基因组DNA片段与Premix Taq™(LA Taq™Version 2.0)(购自TAKARA,货号:RR900A)按照体积比进行1:1混匀(即50 μ g人类基因组DNA片段:50-100 μ L Premix Taq™试剂),72℃反应5-20分钟。

[0055] 2.2、对氨基化处理后的产物进行纯化。

[0056] 使用PCR产物纯化试剂盒(购自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:B518141),根据说明书操作。

[0057] 3、偶联磁珠。

[0058] 3.1、磁珠活化。

[0059] A.取25-50 μ l粒径为30-150 μ m的羧基磁珠(购自苏州海狸,货号:70103-5)于干净的离心管中,磁力架吸附后去除上清液;

[0060] B.加200 μ l 0.1M MEST洗涤磁珠两次,磁力架吸附后去除上清;

[0061] 此处MEST为0.1M MES (pH5.0),0.05wt%Tween20)的水溶液,其中MES为2-(N-吗啉代)乙烷磺酸一水(MES monohydrate),购自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号145224-94-8;Tween20,购自Beyotime,货号ST825。

[0062] C.加100 μ l 10mg/mL EDC和100 μ l 10mg/mL NHS,混匀后室温震荡活化30min。

[0063] 此处EDC为乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride),购自自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号25952-53-8,溶剂为上述MEST;NHS为N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide),购自自生工生物工程(上海)股份有限公司,货号6066-82-6,溶剂为上述步骤B中的MEST。

[0064] 3.2、磁珠偶联。

[0065] A.活化后的磁珠置于磁力架上,吸附磁珠去除上清,加入20 μ g-100 μ g步骤2中纯化后的人类基因组DNA,室温震荡偶联1-2h;

[0066] B.磁力架吸附磁珠后去除上清,加200 μ l PBST重悬,室温封闭1-2h;

[0067] 此处PBST为0.01M PBS (pH7.2-7.4),1wt%BSA的水溶液。其中PBS购自北京索莱宝

科技有限公司,货号P1010-2L;BSA购自北京索莱宝科技有限公司。

[0068] C.磁力架吸附磁珠后去除上清,加200 μ l PBS洗涤3次;

[0069] D.用50 μ l Vicz溶液将磁珠重悬。

[0070] Vicz溶液为含有50mM氯化钾,20mM Tris-HCl,10mM硫酸镁,100 μ g/ml BSA的阻断试剂溶液。

[0071] 3.3、双链变性。

[0072] 取上述步骤3.2中偶联好的磁珠10-30 μ l于1.5ml的离心管中,95 $^{\circ}$ C加热3-5分钟,取出后立刻置于冰上,冷却后置于磁力架上吸附磁珠去除上清。加入100-300 μ l Vicz溶液清洗磁珠,置于磁力架上吸附磁珠去除上清,重复洗涤一次。用10-30 μ l Vicz溶液将磁珠重悬。

[0073] 4、杂交捕获。

[0074] 4.1临床样本(包括但不限于血液、痰液、脑脊液、肺泡灌洗液)宏基因组DNA提取,使用天根生化科技(北京)有限公司的TIANamp Micro DNA Kit (DP316)。

[0075] 4.2临床样本宏基因组片段化处理,条件与步骤1中的破碎条件一致。

[0076] 4.3取步骤3.3中变性好的磁珠10 μ l,加入上述步骤片段化后的临床样本宏基因组10 μ l,试剂盒中的Vicz溶液30 μ l,混匀,于95 $^{\circ}$ C加热3-5min,50 $^{\circ}$ C加热1-3min反应,置于磁力架上吸附磁珠,并转移上清于新的离心管中。

[0077] 5、上述步骤4中所得到的上清即为去除人源宿主后的临床样本宏基因组,可用于高通量测序文库(NGS)的文库构建。

[0078] 实施例2

[0079] 一种检测宏基因组的试剂盒,用于去除临床样本宏基因组中人源宿主DNA,试剂盒包含有实施例1制备得到的捕获磁珠的悬浮液和阻断试剂Vicz溶液。

[0080] 其中捕获磁珠偶联有片段化的人源DNA序列;Vicz溶液成分为:50mM的氯化钾,20mM Tris-HCl,10mM硫酸镁,100 μ g/ml BSA。

[0081] 实施例3

[0082] 本实施例采用实施例1中的方法对模拟混合样品进行检测。

[0083] 1、模拟混合样品。

[0084] 模拟混合样品包含人基因组DNA,大肠杆菌(E.coli)DNA,金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)DNA,百日咳杆菌(Bordetella pertussis)DNA。

[0085] 模拟混合样品的总DNA浓度为100ng/ μ l,其中人基因组DNA占98.5%,大肠杆菌DNA占0.5%,金黄色葡萄球菌DNA占0.5%,百日咳杆菌DNA占0.5%。

[0086] 2、检测。

[0087] 以上DNA均为参照实施例1中步骤1分别进行DNA片段化处理的DNA片段。

[0088] 取3个干净的1.5ml离心管,分别标记为1、2、3号管。往3个管中分别加入10 μ l模拟混合样品。

[0089] 1号管样品直接使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,然后使用Illumina NextSeq CN500平台对以上构建后的文库进行测序。

[0090] 2号管样品使用本发明实施例2的试剂盒按照实施例1中步骤4.3进行操作。上述得到去人源宿主后的样品,使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,然后使用Illumina

NextSeq CN500平台对以上构建后的文库进行测序。

[0091] 3号管样品首先使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,再使用Thermo Fisher的Ion AmpliSeq Pan-Bacterial Community Panel按照说明书进行杂交捕获,然后使用Illumina NextSeq CN500平台对以上杂交捕获后的文库进行测序。

[0092] 1、2、3号样品同时上机测序,并采取同样的测序深度,得到结果如下:

[0093] 表2上述1、2、3号管样品测序结果

[0094]

	1 号管		2 号管		3 号管	
Target	reads 数	比例(%)	reads 数	比例(%)	reads 数	比例(%)
人	106478	98.92	94533	88.92	103588	95.25
大肠杆菌	423	0.39	4784	4.50	2652	2.44
金黄色葡萄球菌	358	0.33	3472	3.27	2514	2.31
百日咳杆菌	383	0.36	3529	3.32	0	0
Total	107642		106318		108754	

[0095] 注:reads指高通量测序平台产生的小片段的序列数据,即可视为测序深度的体现。

[0096] 从上表可以看出,同样测序深度下,经过本发明方法处理的2号管得到的宏基因组DNA测序结果中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和百日咳杆菌的比例均比未处理前提高约10倍,与3号管的处理方法相比,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的比例也有明显优势,并且3号管处理方法没有检测到百日咳杆菌。说明本方案去除样本宏基因组中人源DNA后明显提高了待检病原微生物的检测灵敏度且不会有漏检情况。

[0097] 同时,这意味着在保证待测病原微生物检出的情况下,本方案发明的方法和试剂盒可以采取较低的测序深度,即可降低测序的成本提高测序效率,且极大地降低了后续测序数据的分析难度。

[0098] 实施例4

[0099] 本实施例采用实施例1中的方法对临床样品进行检测。

[0100] 1、临床样品。

[0101] 选用肺泡灌洗液样本30例,包含临床确认的肺炎克雷伯菌感染10例,腺病毒感染10例,和非感染性肺炎10例。

[0102] 2、检测。

[0103] 以上样本均为参照实施例1中步骤4.1进行宏基因组DNA提取,再将DNA参照实施例1中步骤1分别进行DNA片段化处理。

[0104] 对同一样本分别取2个干净的1.5ml离心管,分别标记为1、2、3、4号管。往4个管中分别加入10 μ l样品,分以下四种处理方式进行处理:

[0105] 第1种处理方式中,直接使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,然后使用Illumina NextSeq CN500平台对以上构建后的文库进行测序。

[0106] 第2种处理方式中,使用本发明实施例2的试剂盒按照实施例1中步骤4.3进行操作。上述得到去人源宿主后的样品,使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,然后使用Illumina NextSeq CN500平台对以上构建后的文库进行测序。

[0107] 第3种处理方式中,使用MolYsis Basic去宿主试剂盒,按照说明书进行去宿主实验,使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,然后使用Illumina NextSeq CN500平台对以上构建后的文库进行测序。

[0108] 第4种处理方式中,首先使用罗氏的BacCapSeq试剂盒进行杂交捕获,使用罗氏的KAPA HyperPlus Kit文库构建,然后使用Illumina NextSeq CN500平台对以上构建后的文库进行测序。

[0109] 1、2、3、4号样品同时上机测序,并采取同样的测序深度,得到结果如下:

[0110] 表3临床样品测序结果

[0111]

	处理方式 1		处理方式 2		处理方式 3		处理方式 4	
	检出 (例)	准确率	检出 (例)	准确率	检出 (例)	准确率	检出 (例)	准确率

[0112]

肺炎克雷伯菌 (10 例)	5	60%	10	100%	6	60%	10	100%
腺病毒 (10 例)	3	30%	8	80%	5	50%	0	0%
非感染性 (10 例)	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
总计	18	60%	28	93%	21	70%	20	67%

[0113] 从上表可以看出,同样测序深度下,经过本发明方法处理得到的宏基因组DNA测序结果中病原微生物的检出比例比未处理前或其他富集方法有明显的提高。

[0114] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0115] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。