



粪便样本不同保存方式对肠道菌群测序结果的影响

范馨月^{1,2}, 陈璐萍¹, 朱金滔¹, 律娜¹, 朱宝利^{1,2,3,4*}

- 1 中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101
- 2 中国科学院大学存济医学院, 北京 100049
- 3 病原微生物耐药与耐药基因组学北京市重点实验室, 北京 100101
- 4 西南医科大学基础医学院, 四川 泸州 646000

范馨月, 陈璐萍, 朱金滔, 律娜, 朱宝利. 粪便样本不同保存方式对肠道菌群测序结果的影响. 微生物学报, 2022, 62(2): 520–532.

Fan Xinyue, Chen Luping, Zhu Jintao, Lyu Na, Zhu Baoli. Effects of different preservation methods for fecal samples on the sequencing results of gut microbiota. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 520–532.

摘要: 【目的】本文探究了3种室温保存剂和-80 °C 冷冻保存对粪便样本中菌群结构的影响, 为大规模、标准化的采样提供参考。【方法】本研究采集了5名健康志愿者的新鲜粪便作为测试样本, 采用4种不同的保存方式保存: DETs 室温保存、GITC 室温保存、RNA later 室温保存和-80 °C 冷冻保存, 在保存0、1、3、7、14、28 d后, 采用高通量测序技术测定样本中微生物16S rRNA 基因 V3–V4 区序列, 通过比较不同保存剂、不同保存时间后的样本与新鲜样本的差异, 分析保存剂和保存时间对粪便样本菌群组成及丰度的影响。【结果】5组样本共得到489个操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs), 其中488个OTUs为5组所共有, 且样本alpha多样性无统计学差异。从属水平上看, 与fresh组(新鲜样本)相比, DETs组的拟杆菌属相对丰度显著升高, 且部分OTUs在保存超过3 d后发生明显变化; 其余保存方式无显著差异。综合分析微生物群落多样性和丰度, 结果表明, 在保存不同天数后, 4种保存方式的样本与fresh组的菌群结构均无显著差异, 其中-80 °C 保存的样本与fresh组样本菌群结构相似程度最高, 但不同志愿者与各自新鲜样本的相似程度变化较大, 且整体相似程度随着时间的推移与fresh组差异呈下降趋势; 而使用DTEs保存剂和GITC保存剂保存的样本, 志愿者个体间差异小, 保存效果稳定, 且随时间变化小。聚类分析结果表明, 无论使用哪种保存方式, 保存方式和时间带来的差异均小于志愿者个体间的差异。【结论】在满足低温冷冻保存条件时优先选择-80 °C 冷冻保存粪便样本, 无法满足立即冷

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1603803, 2018YFC2000505); 国家自然科学基金(81991534)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603803, 2018YFC2000505) and by the National Natural Science Foundation of China (81991534)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807362; E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

Received: 2 June 2021; Revised: 23 August 2021; Published online: 5 December 2021

冻保存的条件时, 可以选择添加保存剂室温保存, 且 GITC 保存剂优于其他保存剂。

关键词: 粪便样本; 室温保存; 肠道菌群; 保存剂; 高通量测序

Effects of different preservation methods for fecal samples on the sequencing results of gut microbiota

FAN Xinyue^{1,2}, CHEN Luping¹, ZHU Jintao¹, LYU Na¹, ZHU Baoli^{1,2,3,4*}

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Resistance and Pathogen Genomics, Beijing 100101, China

4 School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

Abstract: [Objective] In this study, we compared three room-temperature preservation methods with $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ preservation and investigated the effects of these methods on the sequencing results of microbiota in the fecal samples, thence providing guidelines for large-scale and standardized sampling.

[Methods] Fresh fecal samples from five healthy volunteers were collected and subjected to four different preservation methods: room-temperature preservation methods (DETs, GITC, and RNAlater) and storage at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ without stabilizers. High-throughput sequencing was deployed to sequence the V3–V4 region of the 16S rRNA genes in the samples being stored for 0, 1, 3, 7, 14 and 28 days. The effects of preservation stabilizers and time on the microbiota composition and species diversity were determined by comparison between different treatments. **[Results]** A total of 489 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from the five groups of samples (fresh samples, three room-temperature samples, and $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ preserved samples), among which 488 OTUs were shared by these five groups. No significant difference was observed in the alpha diversity of microbiota among preservation methods. The relative abundance of *Bacteroides* in the samples preserved with DETs was higher than that in fresh samples, and some other OTUs in the samples preserved with DETs changed considerably after 3-day storage. No significant difference in the relative abundance of microbial genera was observed among other groups apart from the DETs group. The microbiota diversity and abundance showed no significant difference between the samples preserved with the four methods and the fresh samples after the storage for different days. The samples stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ had the highest similarity to the fresh samples. However, the similarity of the samples from each volunteer varied, and such variation tended to increase with the prolonging of storage time. Nevertheless, DETs and GITC methods exhibited outstanding stability, especially after prolonged storage time. Cluster analysis revealed that the variation associated with preservation methods and time was neglectable. **[Conclusion]** Subject to the availability, storage at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ is considered the gold standard for fecal samples, and storage at room temperature with the addition of GITC shows comparable performance to low temperature preservation.

Keywords: fecal sample; room-temperature preservation; gut microbiota; stabilizer; high-throughput sequencing

近年来,随着高通量测序技术发展、美国国家微生物组计划(National Microbiome Initiative, NMI)以及人体微生物组计划(Human Microbiome Project, HMP)的开展和深入^[1],肠道微生物相关研究成为热点领域,肠道微生物与疾病的关系也越来越明确。许多研究表明,肠道菌群在消化道疾病、代谢性疾病、神经退行性疾病和癌症等疾病中发挥着重要作用,如炎症性肠病^[2-3]、结直肠癌^[4-5]、糖尿病^[6]、肥胖症^[7]、帕金森病^[8]和阿尔兹海默症^[9]等,患者的肠道菌群常出现多样性降低、稳态失调等现象^[10]。因此,对肠道菌群结构和功能进行检测,对疾病的早期诊断、治疗疗效的预估和用药的选择等具有重要意义^[11-12]。

粪便样本作为唯一能够在非侵入情况下获得的肠道微生物样本,在一定程度上代表肠道菌群的状态^[13-14]。目前针对人体肠道微生物的研究常以粪便样本作为研究对象,研究肠道菌群与健康 and 疾病的关系。若粪便样本收集后立即进行实验,所得的结果能最真实反映肠道微生物的状态。收集后的粪便样本若长时间暴露在室温下,由于氧气的存在以及适宜的温度,兼性厌氧细菌和严格厌氧细菌均会发生不同程度的改变^[15-18]。袁军等^[19]的研究结果表明,粪便样本室温放置 24 h 后,与新鲜样本的相似程度下降至约 80%,即使是冷冻储存在家用冰箱中,超过 3 d 微生物群落结构也会发生改变^[16]。目前最有效的保存方式仍然是样本采集后立即液氮冷冻或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存^[17,20-21]。但在实际样本收集过程中,粪便样本的采集多在普通家庭中进行,不具备液氮冷冻或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件,冷链运输也大幅增加了运输成本。另外,有研究证明了 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存的样本如果发生反复冻融也会导致 DNA 的降解^[16],从而改变肠道菌群结构,影响研究结果。

为解决实验样本采集、运输过程中存在的问题,White 等早在 1991 年就开始尝试对血液和组织样本中添加保存剂,以保证样本中的核酸在室温情况下不会降解^[22],而后保存剂被广泛应用于野外粪便采样^[23-24]。其中 DETs 保存剂能较好地保护肠道微生物 DNA^[25],且 Panasci 等的研究明确了不同性质的保存剂会对粪便样本产生不同的影响,并推荐使用 DETs 来保存植食动物的粪便,使用 95%酒精来保存杂食性动物的粪便,而不推荐使用裂解缓冲液(lysis buffer)对粪便进行保存^[26]。而后 Nishimoto 等的研究表明含有高浓度硫氰酸胍的裂解法 GITC 保存剂同样可以较好的保存粪便样本^[27-29]。随着微生物组计划的推进,肠道样本的采集、运输也成为研究的焦点,出现了一系列的商业保存剂产品,如 OMNIgene-GUT OM-200 (DNA Genotek)、MGIEasy (MGI)、FTA cards (Whatman) 和 RNAlater (Invitrogen)等。这些商业保存剂对粪便具有很好的保存效果,但由于商业产品成分的保密性质,无法对不同保存性质的保存剂进行比较分析^[17-18]。其中商业保存剂 RNAlater 对样品中的 RNA 具有很好的保存效果,使用该保存剂保存的样品能够达到转录水平的分析要求,更真实地反映肠道菌群的活动状态。

因此在本研究中,我们探究了含有高浓度渗透剂载体的 DETs 法^[22]、含有高浓度蛋白质变性剂的 GITC 法^[30-32]和专门用于保护样本 RNA 的商业保存剂 RNAlater 对粪便样本的室温保存效果。通过分析 16S rRNA 基因 V3-V4 区的高通量测序数据,进行物种注释及多样性分析,使用新鲜样本和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存作为对照,阐述不同性质的保存剂在室温下保存粪便样本的效果,分析样本随保存时间的增加菌群的变化情况,为大规模人群实验提供有效的粪便保存方法。

1 材料与amp;方法

1.1 粪便样本收集

收集 5 位健康志愿者的新鲜粪便, 粪便样本在 15 min 内送至实验室, 实验设计如图 1 所示。每位志愿者的粪便样本平均分成 5 份, fresh 组样本立即提取元基因组 DNA, 剩余 3 份样本按照 1:4 的比例加入到 3 种不同的保存剂中, 1 份样本不添加任何保存剂。4 种保存方式处理后的样本再平均分成 5 份, 将含有保存剂的粪便样本于室温下保存, 无保存剂的样本保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 分别在第 1、3、7、14、28 天后提取元基因组 DNA。3 种保存剂包括: (1) DETs 保存剂^[22], 其含有高浓度的二甲基亚砜, 具有破坏蛋白质结构的功能, 作为渗透剂载体来增

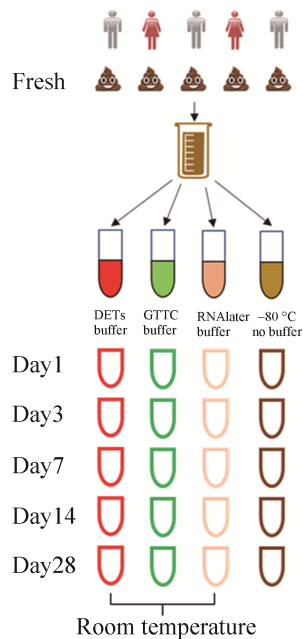


图 1 实验设计示意图

Figure 1 Diagram of experimental design. Total DNA from five healthy adults' fecal samples were extracted immediately after sampling. The rest of them were divided into 100 aliquots through four different preservation methods simultaneously and stored different length of time before DNA extraction.

加细胞对高浓度 EDTA 和钠离子的吸收, 螯合细胞内的二价金属阳离子, 从而抑制核酸酶的活性, 防止 DNA 降解; (2) GITC 保存剂^[30], 其含有高浓度的硫氰酸胍, 是一种常见的蛋白质变性剂, 可以裂解细胞并抑制 DNA 降解; (3) RNAlater Stabilization Solution (Invitrogen) 为商用 RNA 保存剂, 对样本中的 RNA 具有较好的保存效果。

1.2 粪便 DNA 的提取及 16S rRNA 基因的扩增测序

将不同时间节点的粪便样本取出, 采用 DNeasy Powersoil Pro Kit (QIAGEN) 按照标准操作程序提取元基因组 DNA, 随后使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行质量检测。随后使用 16S rRNA 基因 V3-V4 区通用引物[上游引物 5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3', 下游引物 5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3', 由生物工程(上海)股份有限公司合成]对 DNA 样本进行第 1 次扩增, 其反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 25 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。在第 2 次扩增时引入不同 barcode 序列, 用于后续拆分样本, 其反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 8 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。最后采用 Illumina 公司的 NovaSeq 6000 平台进行高通量基因测序。原始数据已全部上传至国家微生物科学数据中心, 生物项目编号为 NMDC10017792。

1.3 数据分析和统计学方法

测序结束后, 拆分样本并去除引物, 根据 PE reads 之间的 overlap 使用 Flash 软件^[33]进行拼接。利用 Trimmomatic 软件^[34]对低质量序列进行过滤, 采用 QIIME 软件^[35]中的 usearch8.0 软件进行嵌合体序列的检测及过滤。根据 97% 的序列相似性水平, 利用 QIIME 软件^[35]中的 Uclust 方法对

有效数据进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类分析, 然后基于 Silva (Release128 <https://www.arb-silva.de/documentation/release-128/>) 参考数据库, 对每个样本的 OTUs 进行物种分类学注释。利用 QIIME 软件^[35]完成样本内多样性指数分析, 并基于 Weighted Unifrac 距离、Bray-Curtis 距离进行组间相似性分析。使用 Wilcoxon 秩和检验对组间差异进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 样本分组和 OTUs 分布情况

本研究共纳入 105 例样本, 经测序并对结果进行质量控制后共得到 6 829 240 条序列, 平均每个样本 65 040 条序列。其中采样后立即进行 DNA 提取的样本为 fresh 组, 剩余样本按保存方式的差异分为 4 组: DTEs 组、GITC 组、RNAlater 组和-80 组。5 组样本共得到 489 个 OTUs, 其中 488 个 OTUs 为 5 组所共有。不同保存方式下样本的 OTUs 数量随时间变化信息如表 1 所示, 与 fresh 组相比, 不同保存方式下样本的 OTUs 的数量基本不变。

表 1 不同保存方式和时间下样本的 OTU 信息

Table 1 OTU information of samples in different preservation methods over time

Day	Groups				
	Fresh	DETs	GITC	RNAlater	-80
Day0	489	-	-	-	-
Day1	-	489	487	488	487
Day3	-	488	486	488	487
Day7	-	487	488	486	486
Day14	-	485	486	486	485
Day28	-	486	486	486	485

-: There were no samples under such condition.

2.2 物种多样性与丰富度分析

物种 alpha 多样性通常反映每个样本内部微生物群落的丰富度和均匀度。如稀释曲线(图 2A)所示, 随着测序量的增加, 样本的 OTU 数量达到饱和, 说明实验采用的测序数据量足够, 测序结果可以真实反映样本的菌群分布情况。图 2B 表明, 与 fresh 组相比, 4 种不同保存方式的菌群的 Shannon 多样性指数均无显著差异。-80 °C 保存的样本 alpha 多样性略高于其他保存剂保存的样本, 统计学分析结果显示为不显著。

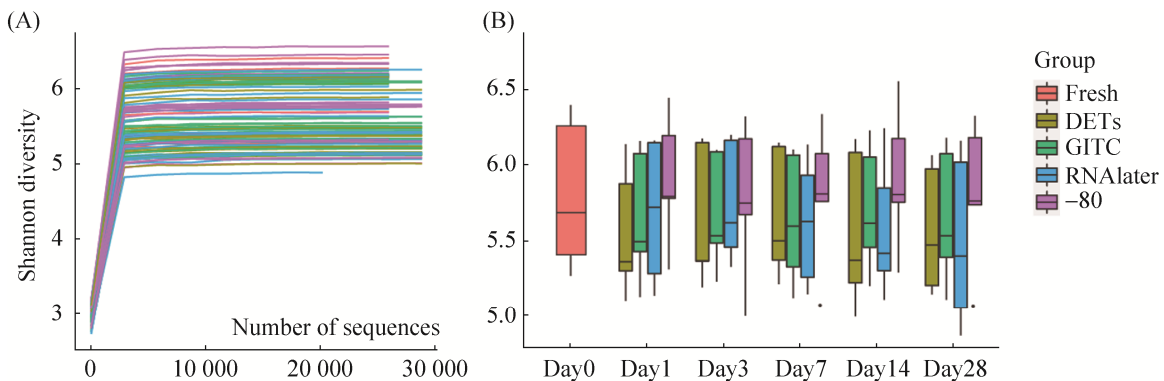


图 2 样本稀释曲线和细菌 alpha 多样性分析

Figure 2 Rarefaction curves and alpha diversity index of bacteria community in different preservation methods. A: rarefaction curves of each sample shows whether sequencing depth is enough; B: Shannon diversity index values by preservation methods over time. Statistical analysis shows that there is no significant difference between fresh group and other groups ($P>0.05$, Wilcoxon test).

2.3 样本微生物群落结构

样本微生物群落在门水平的相对丰度如图 3A 所示, 主要集中在 4 个门, 包括拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*)。其中, 拟杆菌门占比最多, 其平均相对丰度在 fresh 组、DETs 组、GITC 组、RNAlater 组和 -80 组分别为 53.80%、43.5%、47.8%、49.99%、55.20%; 厚壁菌门次之, 其平均相对丰度分别为 34.36%、45.80%、41.38%、37.25%、31.27%。

选取属分类水平上优势(相对丰度排名前 15)微生物, 生成物种相对丰度分布图, 展示不同保存方式下微生物群落的分布随保存时间的变化。如图 3B 所示, 样本中的微生物主要由拟杆菌属 (*Bacteroides*)、粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 及罗氏菌属 (*Roseburia*) 等优势菌组成。其中, 拟杆菌属占比最多, 在 fresh 组、DETs 组、GITC 组、RNAlater 组和 -80 组中平均相对丰度分别为 32.23%、41.89%、38.70%、34.90%、28.60%。图 3B 显

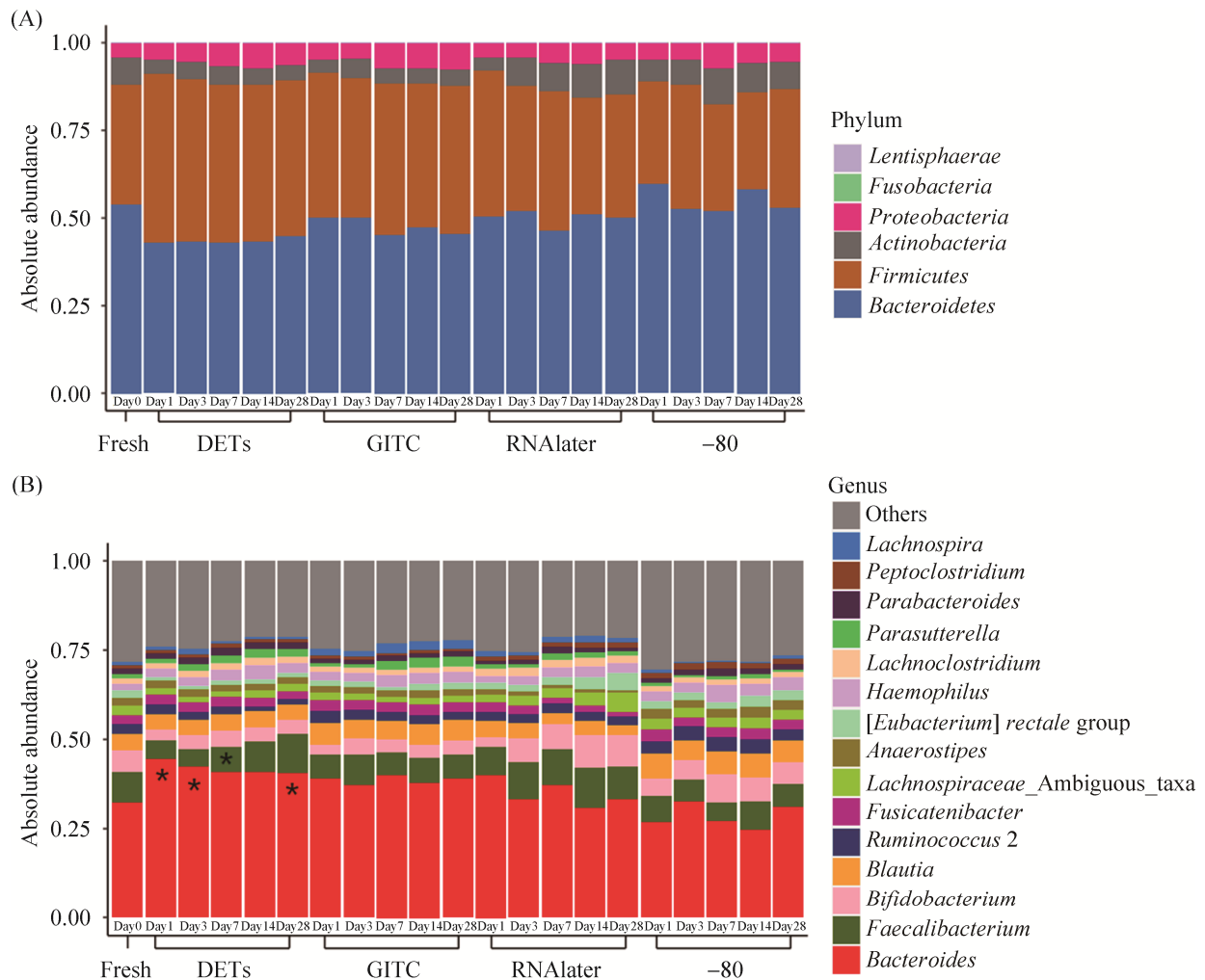


图 3 样本微生物群落在门(A)和属(B)分类水平的分布

Figure 3 Relative abundances of phylum (A) or genus (B) taxa of bacteria in each group over time. Each column represents the microbial community from a group in mean relative abundance. The asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$, Wilcoxon test) between treated samples and fresh samples.

示, 使用 DTEs 保存剂保存 1 d、3 d 和 28 d 后, 所有志愿者样本中拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度都高于新鲜样本, 保存 7 d 后, 所有志愿者样本中粪杆菌属(*Faecalibacterium*)的相对丰度都显著降低, 而其余 OTUs 均无显著变化。

不同保存方式和时间使样本微生物组成及丰度发生改变, 但绝大部分的 OTUs 与 fresh 组无显著差异, 后续的组间相似性分析也证实了这一现象。比较不同的保存时间, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组中少数微生物随保存时间的变化稍有波动, 但整体优势微生物群落组成与新鲜样本最为相似, 而 GITC 组的微生物群落组成随时间变化最为稳定。

2.4 各组样本中微生物群落在属分类水平的变化

在不同保存方式下, 与 fresh 组相比, 样

本间共有 OTUs 的相对丰度随保存时间的倍数变化结果如图 4 所示。无论哪种保存方式, 样本中的某些 OTUs 的相对丰度都会发生改变, 并且这种变化程度会随着保存时间的推移而改变。使用 DETs 和 GITC 保存剂会降低 *Bifidobacterium* 和 [*Eubacterium*] *ventriosum* group 等 OTUs 的相对丰度, 升高 *Clostridium sensu stricto* 1 等 OTUs 的相对丰度。DETs 保存剂室温保存超过 3 d 时, 部分 OTUs 出现了明显的改变。GITC 保存剂室温保存超过 7 d 时, 部分 OTUs 出现了明显的改变。RNAlater 室温保存的变化幅度最大, 且其随时间变化逐渐下降的 OTUs 多属于厚壁菌门。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存的样本 OTUs 相对丰度随时间变化最为稳定。

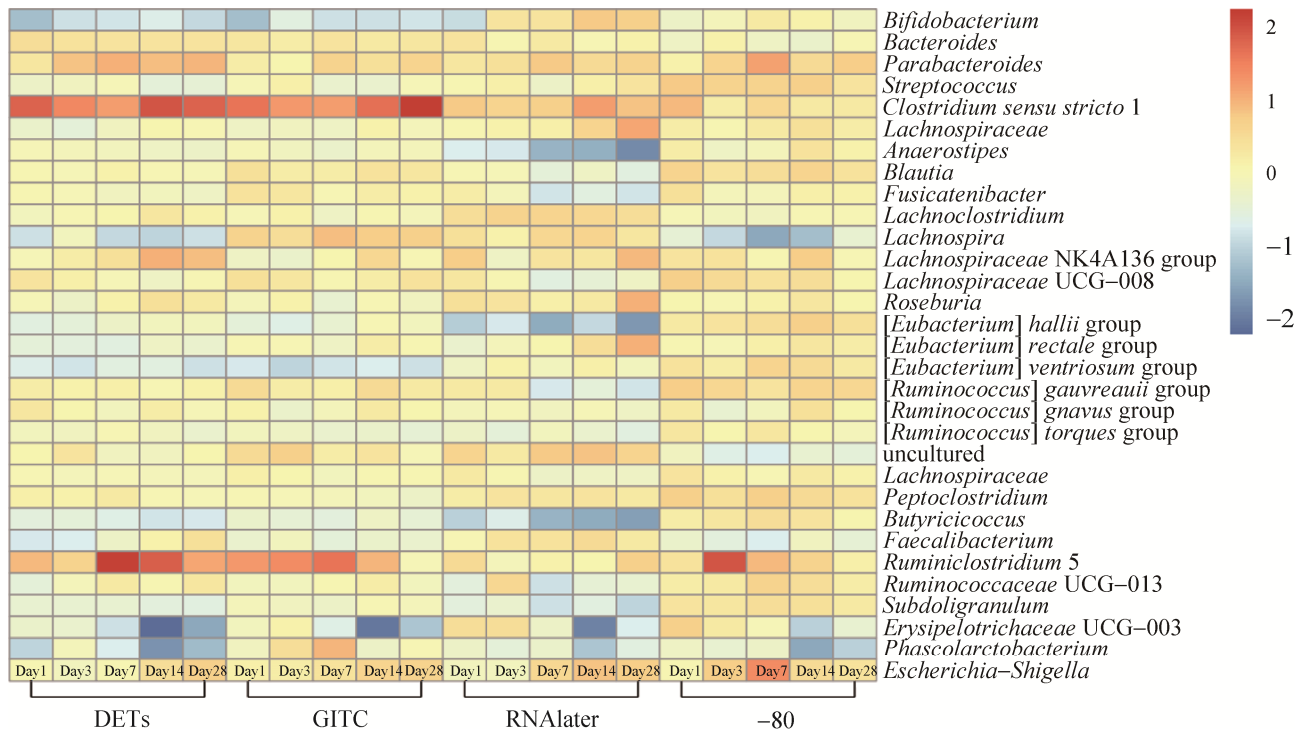


图 4 各组样本中微生物在属分类水平的倍数变化热图

Figure 4 Distribution of fold changes of bacterial genus taxa compared with fresh group. Heat map shows the log₂ fold changes of the common OTUs that either increase (showed in red) or decrease (shown in blue) compared with fresh samples.

2.5 样本群落微生物随时间的变化

采用 Weighted Unifrac 计算每个志愿者样本在不同保存方式及时间后与 fresh 组中的距离, 来表示样本间的相似程度, 距离越小表示样本间细菌组成越相似^[36]。如图 5A 所示, 不同保存时间, 4 种保存方式样本与 fresh 组的相似程度均无显著差异。先前的研究表明, 不同技术重复的平均 Weighted Unifrac 距离约为 0.1^[17], 而本研究中所有样本的平均距离为 0.07 ± 0.06 (灰色水平线), 与技术重复之间的平均距离相似, 说明不同保存方式和时间对样本微生物群落的改变与技术重复带来的差异相似。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的样本与 fresh 组样本的距离中位数有小于其他保存方式的趋势, 说明 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的样本与新鲜样本更为相似, 但不同志愿者的样本与其新鲜样本之间的相似程度相差较大, 并且随着时间的推移, 相似程度呈下降趋势。而 DTEs 保存剂和 GITC 保存剂对于不同的志愿者

的样本, 具有较小的差异, 且保存效果随时间变化比较稳定。图 5B 展示了不同保存方式和时间下的样本与 fresh 组的 alpha 多样性差异, 水平线表示平均差异值, 为 $\pm 0.21 \pm 0.14$ (灰色水平线), 与先前研究中技术重复的平均绝对差异值 0.4 相似, 也再次证明了样本受到不同保存方式和时间的影响较小, 与技术重复带来的差异相似。

2.6 样本间聚类分析

通过非加权配对平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)对不同保存方式及不同保存时长的各样本进行聚类分析, 来比较样本间微生物群落结构的相似性。如图 6 所示, 来自相同志愿者的样本显示为相同的颜色, 5 名志愿者的肠道菌群组成本身存在差异, 且不同保存方式同一志愿者的样本以及 fresh 组内对应的样本都聚集在一起。说明不同保存方式带来的差异均小于志愿者个体间的差异。

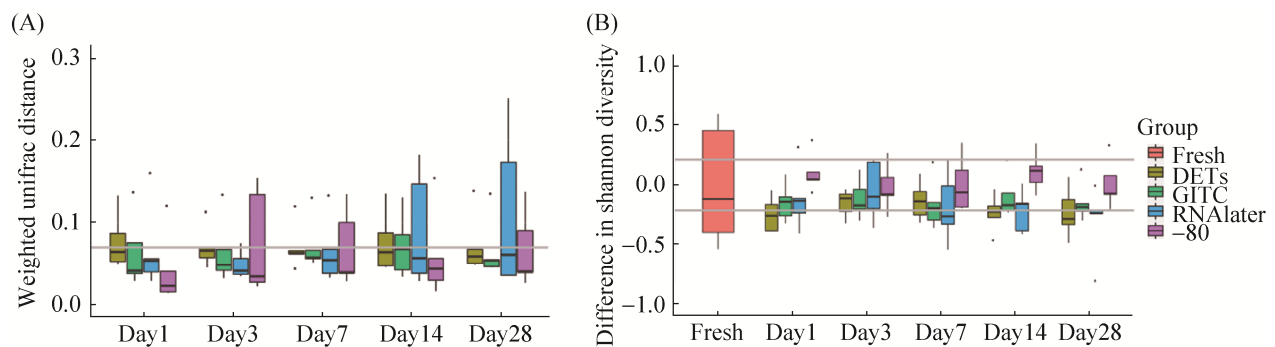


图 5 不同保存方式和时间对同一粪便样本群落结构的影响

Figure 5 Microbe community changes by treatment over time. A: box plots show Weighted Unifrac distances between treated samples and fresh samples taken on the day of sampling with no stabilizer. Horizontal line (showed in gray) shows the average distance between volunteers. There is no significant difference between each group ($P > 0.05$, Wilcoxon test). B: difference in Shannon diversity between treated samples and fresh samples. Horizontal lines (showed in gray) show the average absolute difference in positive and negative directions.

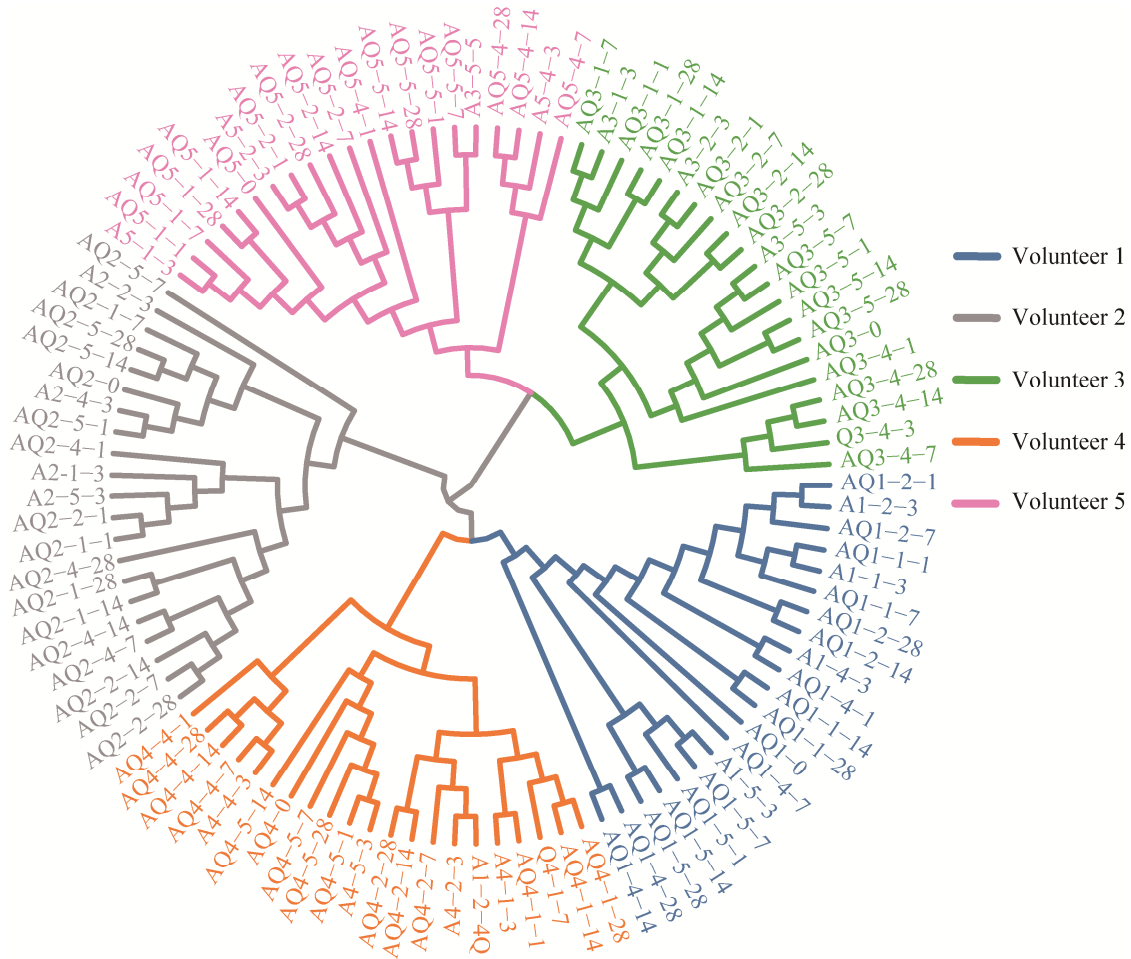


图 6 UPGMA 聚类分析

Figure 6 UPGMA clustering of the microbiota profiles calculated by Bray-Curtis distance. Each lane represents a sample and samples from same volunteers are showed in same colors.

3 讨论与结论

在肠道菌群的研究中，受限于样本采集的条件及可能长期采集的实际需求，采集的粪便样本在进行实验前通常需要保存一段时间。目前已有研究表明，粪便样本在室温下保存超过 15 min 或在家用无霜食品冷冻箱中保存超过 3 d，细菌组成就会发生明显变化^[16]。因此，-80 °C 低温冷冻保存是目前公认效果最佳的保存方式，以粪便样本为研究对象的大规模研究，有条件的情况下在样本采集后，暂时储存在家

用冰箱中，短时间内转移至实验室的-80 °C 冰箱中保存^[4,6,37]。但一般的家庭、临时的采样地点或采集环境样本及野生动物的粪便样本等，都很难满足低温保存的要求，难以满足目前肠道菌群研究中越来越多的大规模的采样需求。

在不影响菌群结构的基础上，选择合适的粪便样本室温保存方法至关重要。有效的保存试剂可以在室温条件下短期保存粪便样本，保持微生物结构，从而解决大规模采样过程中样本难以及时冷冻保存的问题，对大规模的肠道微生物调查或研究具有重要意义。目前为止，

已经有多项研究工作对粪便样本的保存方法进行了比较和探究。2011年, Panasci 等对比了 DETs 方法和裂解缓冲液方法对粪便的保存效果, 他们推荐使用 DETs 来保存植食动物的粪便, 使用 95%酒精来保存杂食性动物的粪便, 而不推荐使用裂解缓冲液对粪便进行保存^[26]。而后 2016年, Nishimoto 等的研究表明裂解法也同样可以较好地保存粪便样本^[27]。Nishimoto 等使用裂解法保存剂为含有高浓度硫氰酸胍的 GITC 保存剂, 而 Panasci 等使用的裂解缓冲液主要使用的是 20%的 SDS 对细胞进行裂解^[38]。我们推测可能由于不同的裂解试剂导致样本保存上的差异, 而硫氰酸胍更适用于粪便样本的保存。但是 Nishimoto 等没有比较裂解法与 DETs 对保存粪便样本的效果, 因此本研究比较了这两种不同性质的保存剂, 如图 4 所示, DETs 和 GITC 保存剂虽然使 *Clostridium sensu stricto* 1 和 *Ruminiclostridium* 5 的丰度随着时间的变化增加, 但是在保存 14 d 内, GITC 保存剂的变化幅度小于 DETs 保存剂。图 5 展示了不同保存剂在不同保存时间点与新鲜样品的差异, 我们发现在多样性无明显差异(图 5B)的情况下, GITC 保存剂保存的样本与 fresh 组样本的距离小于 DETs 保存剂与 fresh 组样本的距离(图 5A)。综上说明 GITC 保存剂对粪便样本的保存效果优于 DETs。

商用的 RNeasy 试剂常用于细胞和组织样本的保存, 使得保存的样本可以提取到完整的 RNA, 同时也有报道称 RNeasy 对粪便中的 DNA 也具有较好的保存效果^[17,39]。本研究的结果如前所示, 表明 RNeasy 对粪便样本中的 DNA 同样有很好的保存效果(图 5), 但是 RNeasy 保存试剂目的是保护细胞中的 RNA, 因此我们也对 RNeasy 保存粪便样本 RNA 的能力进行了验证, 结果表明 RNeasy 不仅可以获得元基

基因组 DNA, 同时也可以获得较完整的 RNA 样本。同时我们也对 GITC 和 DETs 保存剂保存的粪便样本提取了 RNA, GITC 保存的样本 RNA 降解严重, 但是 DETs 对粪便样本中的 RNA 也具有较好的保存效果(未公开数据)。因此若实验设计中需同时保存粪便样本中的 DNA 和 RNA, 可以考虑选择 DETs 保存剂或 RNeasy 保存剂, 但 DETs 与 RNeasy 对 RNA 保存效果的差异比较有待进一步研究。

不同保存方式与保存时间和新鲜样本菌群的差异分析表明, 不同的保存方式与 28 d 内不同保存时间的样本菌群结构与新鲜样本菌群结构没有显著差异(图 2、3、5), 志愿者个体间的差异明显高于不同保存条件带来的差异(图 6)。说明无论什么类型的保存方式, 对粪便样本中的 DNA 都具有很好的保护效果, 但不同的保存方式下样本菌群的变化存在差异。例如使用 DETs 和 GITC 保存的样本双歧杆菌属的相对丰度有下降趋势, 而梭菌属和瘤胃梭菌属随着保存时间的增加, 相对丰度增加, RNeasy 保存的粪便样本中的某些细菌会随着保存时间增加而减少(图 4)。被视为最优保存方式的 -80°C 冷冻保存, 不同保存时间的样本与新鲜样本的菌群差异中位数均小于其他保存方式(图 5A), OTUs 的改变程度较小(图 4), 但不同志愿者与各自新鲜样本的相似程度变化较大(图 5A)。以上结果说明, 不同的保存试剂虽然对粪便样本都有良好的保存效果, 但是各种保存试剂或保存方式对粪便样本中微生物影响有一定差异, 导致不同保存试剂及保存方式下样本菌群的变化方向不同。因此建议大规模、多中心样本采集时, 尽量保证保存剂或保存方式的一致性。

综上所述, 粪便样本保存剂可以在室温下对粪便样本进行保存。虽然 GITC 保存剂和 DETs 保存剂的本质不同(裂解和渗透), 但是都

可以很好地保存粪便样本中的基因组 DNA, 且随时间变化相对稳定。因此在进行大规模取样时, 若不能满足低温冷冻保存条件时可以优先选择 GITC 保存剂室温保存粪便样本, 并在 28 d 内尽快转移到实验室的低温冰箱中或进行实验。RNAlater 和 DETs 保存剂都可以保护粪便菌群的 RNA, 对于保存效果的差异还需要进一步的验证。

参考文献

- [1] The integrative hmp (ihmp) research network consortium. The integrative human microbiome project. *Nature*, 2019, 569(7758): 641–648.
- [2] Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ, Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, 2012, 13(9): R79.
- [3] Yilmaz B, Juillerat P, Oyas O, Ramon C, Bravo FD, Franc Y, Fournier N, Michetti P, Mueller C, Geuking M, Pittet VEH, Maillard MH, Rogler G, Swiss IBDCI, Wiest R, Stelling J, Macpherson AJ. Microbial network disturbances in relapsing refractory crohn's disease. *Nature Medicine*, 2019, 25(2): 323–336.
- [4] Yu J, Feng Q, Wong SH, Zhang D, Liang QY, Qin Y, Tang L, Zhao H, Stenvang J, Li Y, Wang X, Xu X, Chen N, Wu WK, Al-Aama J, Nielsen HJ, Kiilerich P, Jensen BA, Yau TO, Lan Z, Jia H, Li J, Xiao L, Lam TY, Ng SC, Cheng AS, Wong VW, Chan FK, Xu X, Yang H, Madsen L, Datz C, Tilg H, Wang J, Brunner N, Kristiansen K, Arumugam M, Sung JJ, Wang J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*, 2017, 66(1): 70–78.
- [5] Wirbel J, Pyl PT, Kartal E, Zych K, Kashani A, Milanese A, Fleck JS, Voigt AY, Palleja A, Ponnudurai R, Sunagawa S, Coelho LP, Schrotz-King P, Vogtmann E, Habermann N, Nimeus E, Thomas AM, Manghi P, Gandini S, Serrano D, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Shibata T, Yachida S, Yamada T, Waldron L, Naccarati A, Segata N, Sinha R, Ulrich CM, Brenner H, Arumugam M, Bork P, Zeller G. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature Medicine*, 2019, 25(4): 679–689.
- [6] Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012, 490(7418): 55–60.
- [7] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jorgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clement K, Dore J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T, Meta HITc, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 2013, 500(7464): 541–546.
- [8] Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD, Peddada SD, Factor SA, Molho E, Zabetian CP, Knight R, Payami H. Parkinson's disease and parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement Disorders*, 2017, 32(5): 739–749.
- [9] Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, Carlsson CM, Asthana S, Zetterberg H, Blennow K, Bendlin BB, Rey FE. Gut microbiome alterations in alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13537.
- [10] Zeng MY, Inohara N, Nunez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*, 2017, 10(1): 18–26.
- [11] Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, Dulai PS, Caussy C, Bettencourt R, Highlander SK, Jones MB, Sirlin CB, Schnabl B, Brinkac L, Schork N, Chen CH, Brenner DA, Biggs W, Yooseph S, Venter JC, Nelson KE. Gut microbiome-based metagenomic signature for non-invasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metabolism*, 2017, 25(5): 1054–1062 e1055.

- [12] Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*, 2019, 570(7762): 462–467.
- [13] Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 2006, 312(5778): 1355–1359.
- [14] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, 308(5728): 1635–1638.
- [15] Guo Y, Li SH, Kuang YS, He JR, Lu JH, Luo BJ, Jiang FJ, Liu YZ, Papisian CJ, Xia HM, Deng HW, Qiu X. Effect of short-term room temperature storage on the microbial community in infant fecal samples. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26648.
- [16] Gorzelak MA, Gill SK, Tasnim N, Ahmadi-Vand Z, Jay M, Gibson DL. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0134802.
- [17] Song SJ, Amir A, Metcalf JL, Amato KR, Xu ZZ, Humphrey G, Knight R. Preservation methods differ in fecal microbiome stability affecting suitability for field studies. *mSystems*, 2016, 1(3): e00021.
- [18] Han M, Hao L, Lin Y, Li F, Wang J, Yang H, Xiao L, Kristiansen K, Jia H, Li J. A novel affordable reagent for room temperature storage and transport of fecal samples for metagenomic analyses. *Microbiome*, 2018, 6(1): 43.
- [19] 袁军, 李旻, 申剑, 赵立平, 庞小燕. 两种粪便保存方法对肠道菌群结构研究的影响. *中国微生物学杂志*, 2009, (3): 223–225.
Yuan J, Li M, Shen J, Zhao LP, Pang XY. Comparison of two methods of stool sample preservation used in gut microbiota analysis. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, (3): 223–225. (in Chinese)
- [20] Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'Sullivan O, Ross RP, O'Callaghan G, Plant BJ, Stanton C. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using miseq sequencing and culture-based investigations. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119355.
- [21] Vogtmann E, Chen J, Amir A, Shi J, Abnet CC, Nelson H, Knight R, Chia N, Sinha R. Comparison of collection methods for fecal samples in microbiome studies. *American Journal of Epidemiology*, 2017, 185(2): 115–123.
- [22] White BN, Boag PT, Seutin G. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 1991, 69(1): 82–90.
- [23] Frantzen MA, Silk JB, Ferguson JW, Wayne RK, Kohn MH. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 1998, 7(10): 1423–1428.
- [24] Blekhan R, Tang K, Archie EA, Barreiro LB, Johnson ZP, Wilson ME, Kohn J, Yuan ML, Gesquiere L, Grieneisen LE, Tung J. Common methods for fecal sample storage in field studies yield consistent signatures of individual identity in microbiome sequencing data. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31519.
- [25] 蔡重阳, 张于光, 李迪强, 任佐华, 刘学端. DETs 缓冲液对肠道微生物 DNA 的保存效果. *现代生物医学进展*, 2009, 9(13): 2484–2486.
Cai CY, Zhang YG, Li DQ, Yen ZH, Liu XD. Effectiveness of DETs buffer for intestinal microbes DNA preservation. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(13): 2484–2486. (in Chinese)
- [26] Panasci M, Ballard WB, Breck S, Rodriguez D, Densmore LD, Wester DB, Baker RJ. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *The Journal of Wildlife Management*, 2011, 75(7): 1616–1624.
- [27] Nishimoto Y, Mizutani S, Nakajima T, Hosoda F, Watanabe H, Saito Y, Shibata T, Yachida S, Yamada T. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy. *Gut*, 2016, 65(9): 1574–1575.
- [28] Hosomi K, Ohno H, Murakami H, Natsume-Kitatani Y, Tanisawa K, Hirata S, Suzuki H, Nagatake T, Nishino T, Mizuguchi K, Miyachi M, Kunisawa J. Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16s rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4339.
- [29] Yang L, Hou K, Zhang B, Ouyang C, Lin A, Xu S, Ke D, Fang L, Chen Q, Wu J, Yan C, Lian Y, Jiang T, He J, Wang H, Fu Y, Xiao C, Chen Z. Preservation of the fecal samples at ambient temperature for microbiota analysis with a cost-effective and reliable stabilizer effcugut. *Science of the Total Environment*, 2020, 741: 140423.

- [30] Fukuda K, Fujita Y. Determination of the discriminant score of intestinal microbiota as a biomarker of disease activity in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 49.
- [31] Shiozaki A, Yoneda S, Yoneda N, Yonezawa R, Matsubayashi T, Seo G, Saito S. Intestinal microbiota is different in women with preterm birth: results from terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e111374.
- [32] Hisada T, Endoh K, Kuriki K. Inter- and intra-individual variations in seasonal and daily stabilities of the human gut microbiota in Japanese. *Arch Microbiol*, 2015, 197(7): 919–934.
- [33] Magoc T, Salzberg SL. Flash: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [34] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [35] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [36] Lozupone C, Knight R. Unifrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8228–8235.
- [37] Jalanka J, Salonen A, Salojarvi J, Ritari J, Immonen O, Marciani L, Gowland P, Hoad C, Garsed K, Lam C, Palva A, Spiller RC, de Vos WM. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut*, 2015, 64(10): 1562–1568.
- [38] Longmire JL, Maltbie M, Baker RJ. Use of “lysis buffer” in DNA isolation and its implication for museum collections. 1997.
- [39] Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, Namprachan P, Niec SR, Badsha KZ, Matherly LH, Majumdar AP, Kato I. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 72(2): 124–132.

(本文责编 李磊)