

УДК 57.083.1

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕТАГЕНОМНОЙ ДНК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА

*Е. В. ОХРЕМЧУК, А. Э. ОХРЕМЧУК, С. В. БУЙНИЦКАЯ,
А. В. СИДОРЕНКО, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ*

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
katerina_akhr@bio.bsu.by*

Выполнен сравнительный анализ 12 методов выделения метагеномной ДНК из биоматериала (кала). Показано, что протокол выделения ДНК влияет на чистоту и концентрацию нуклеиновых кислот, а также на соотношение таксонов, устанавливаемое с помощью высокопроизводительного массового секвенирования. Выбран метод выделения нуклеиновых кислот для последующих метагеномных исследований кишечной микробиоты человека, который позволяет получать препараты ДНК в высокой концентрации, не содержащие ингибиторов ферментативных реакций и включающие нуклеиновые кислоты из микроорганизмов с различным строением клеточной стенки.

Введение. Желудочно-кишечный тракт человека содержит огромное количество микроорганизмов, которые играют важную роль как в физиологии непосредственно пищеварительной системы, так и в поддержании иммунитета, обеспечении колонизационной резистентности к патогенам, обезвреживании токсических веществ [1, 2]. Однако лишь малый процент этих микроорганизмов может культивироваться в лабораторных условиях [3]. Развитие культурально-независимых методов, например секвенирования нового поколения (NGS), значительно расширило возможности исследования и описания микробных сообществ различных биотопов тела человека. Одним из таких подходов является выделение метагеномной ДНК из образцов кала с последующим массовым параллельным секвенированием переменных фрагментов гена 16S рРНК [4].

В настоящее время накоплено достаточно большое количество экспериментальных данных, посвященных метагеномному анализу микробиоты человека [3]. Однако всё еще не существует

единого метода выделения ДНК из биологического материала (кала) [5]. В большинстве работ выбор метода выделения нуклеиновых кислот не обосновывается и не валидируется. В то же время исследователями из разных стран продемонстрировано, что способ хранения и гомогенизации биоматериала, а также метод экстракции ДНК вносят значительный вклад в детектируемую с помощью NGS структуру микробиоты [5, 6]. Варьируя параметры, исследователь может получить различные результаты, работая даже с одним и тем же образцом биоматериала. Например, первый шаг при выделении ДНК – лизис бактериальных клеток – значительно влияет на выявляемое соотношение таксонов в силу различий в строении клеточных стенок бактерий и, соответственно, эффективности их деградации [7]. Длительная обработка образца лизирующими агентами может привести к снижению качества ДНК, недостаточная – лишь к частичному разрушению клеток бактерий, имеющих толстый слой пептидогликана, капсулы и др. Продемонстрировано также, что ДНК из клеток грамположительных микроорганизмов эффективнее экстрагируется после предварительной заморозки [8]. Выделение нуклеиновых кислот затрудняется еще и тем, что кал характеризуется крайне переменным составом, зависящим от питания и образа жизни человека, структуры кишечной микробиоты [9]. Образцы кала могут содержать различные ингибиторы ферментативных реакций (полисахариды, хлорофилл, желчные кислоты, мочевины, гликолипиды, гемоглобин, гепарин и др.), которые снижают эффективность или полностью ингибируют ПЦР на этапе амплификации генов 16S рРНК [9, 10]. Таким образом, неоптимальный протокол может привести к получению метагеномной ДНК, неприменимой для последующих молекулярно-генетических манипуляций.

Немаловажными критериями являются стоимость выделения ДНК и времязатратность данной процедуры, поскольку именно от них зависят финансовые расходы и производительность метагеномных исследований, особенно при необходимости анализа большого количества образцов биологического материала.

Цель исследования – анализ эффективности доступных на территории Республики Беларусь коммерческих наборов и описанных в литературе методов выделения метагеномной ДНК из образцов кала для изучения структуры кишечной микробиоты человека.

Материалы и методы. Образец кала забирали у здорового мужчины на основе информированного согласия. Сбор материала осуществляли в стерильный пластиковый контейнер, затем кал гомогенизировали путем перемешивания, распределяли по 200 мг в криопробирки и хранили при -80°C . Перед выделением нуклеиновых кислот образцы биоматериала размораживали при комнатной температуре, добавляли 100 мкл ТЕ-буфера на 0,3 г образца для получения полужидкой консистенции. Для выделения ДНК использовали по 200 мкл полученной суспензии.

Выделение ДНК осуществляли с помощью 11 коммерческих наборов (в соответствии с рекомендациями производителей) и методики, описанной в работе Кумар и соавт. [11]. Перечень используемых наборов и методов, а также их кодовые названия приведены в табл. 1 (для обозначения повторности к кодовому названию добавляли цифру 1 либо 2).

Таблица 1. Перечень коммерческих наборов и методов, использованных для выделения метагеномной ДНК из образцов кала

Кодовое название	Набор / метод	
MP	FastDNA SPIN Kit for Feces (116570200, MP Biomedicals)	
HM	Методика, предложенная Кумар и др.	
QI	QIAampFast DNA Stool Mini Kit (51604, QIAGEN)	
ZRFc	Fecal DNA Mini Prep (D6010, Zymo Research)	
DN	DNeasy Blood & Tissue Kit (69504, QIAGEN)	
ZR	Quick-DNA Fecal / Soil Microbe Kit (D6012, Zymo Research)	
IN	PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (A29790, Invitrogen)	
SA	GenElute™ Stool DNA Isolation Kit (DNB200, Sigma Aldrich)	
IP	innuPREP Stool DNA Kit (845-KS-7010050, Analytik Jena)	
OB	E. Z. N. A.® Stool DNA Kit (D4015-01, Omega Bio-tek)	
MNSt	NucleoSpin® DNA Stool (740472.50, Macherey-Nagel)	
MNSo*	B1	NucleoSpin® DNA Soil (740780.50, Macherey-Nagel)
	B1E	
	B2	
	B2E	

* В наборе имеется два вида буферов: SB1, SB2 (B1, B2 в кодировке), а также есть возможность использовать энхансер SX (E).

Концентрацию ДНК определяли тремя способами:

спектрофотометрически с помощью спектрофотометра NanoPhotometer® P 330 (Implen, Германия), при этом устанавливали отношения A260/A280 и A260/A230 для оценки чистоты нуклеиновых кислот;

флуориметрически с использованием флуориметра Quantus™ Fluorometer (Promega, США). В качестве красителя использовали QuantiFluor® dsDNA System (504nm_{Ex} / 531nm_{Em}) (E2670, Promega); денситометрически путем анализа электрофореграмм с программным обеспечением Image Lab (BioRad, США).

Рестрикционный анализ проводили с использованием рестриктаз PstI (ER0611, Thermo Fisher Scientific), HindIII (ER0505, Thermo Fisher Scientific). Рестрикционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 20 ч.

Для постановки ПЦР применяли универсальные праймеры 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') к последовательности гена 16S рНК бактерий [12].

Образцы ДНК, продукты ПЦР и рестрикции визуализировали путем электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле с бромистым этидием (0,05 мг/мл) или, в случае рестрикционного анализа, красителем ZUBR Green-1 (0010.2, «Праймтех»). Использовали маркер молекулярного веса GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311, Thermo Fisher Scientific). В случае образцов метагеномной ДНК в гель загружали по 100 нг ДНК, исходя из уточненных показаний флуориметра. В случае проб ZRFel и ZRFel2 вследствие низкой концентрации в гель загружали по 30 нг ДНК.

Подготовку библиотек для высокопроизводительного массового секвенирования проводили с использованием универсальных праймеров к V3-V4-участку гена 16S рНК, набора реагентов Nextera® XT DNA Library Preparation Kit (FC-131-1024, Illumina) и магнитных частиц AMPure XP (A63881, Beckman Coulter). Секвенирование осуществляли на платформе Illumina MiSeq, используя комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycle) (MS-102-2003, Illumina).

Удаление адаптеров, демультимплексирование прочтений проводили с помощью программного обеспечения bcl2fastq2 Conversion

Software v2.20 (Illumina, США). Количество несоответствий, допустимых для каждого индекса, равнялось одной нуклеотидной замене. Нормализовали прочтения по количеству с помощью инструмента seqtk: для анализа было отобрано по 40 000 парных прочтений на образец [13]. Нуклеотидные последовательности классифицировали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с помощью программы Kraken2 (v2.0.7-beta) [14]. В качестве базы данных последовательностей генов 16S рРНК использовали Silva SSU NR99 (release_126) [15]. Уточнение классификации проводили с помощью программы Bracken (v2.0.0) [16].

Информацию о таксономическом составе каждого из образцов приводили в факторную таблицу формата BIOM с помощью скрипта kraken-biom [17]. Конвертирование таблицы в другие форматы проводили с помощью скрипта biom-format [18]. Для вычисления статистических параметров и построения диаграмм использовали среду вычислений RStudio [19]. При проведении кластерного анализа в RStudio устанавливали евклидово расстояние и объединяли кластеры методом минимальной дисперсии Уорда с предварительным возведением значений дисперсии в квадрат (ward.D2).

Результаты и обсуждение. Для выбора эффективного протокола выделения метагеномной ДНК из образцов кала нами был выполнен сравнительный анализ 12 различных методов. При этом оценивали следующие характеристики:

времязатратность – время, необходимое на выделение ДНК из одного образца биологического материала;

воспроизводимость результатов – сравнимость показателей чистоты и концентрации ДНК, количества выявляемых бактериальных таксонов в нескольких повторностях выделения нуклеиновых кислот;

стоимость процедуры выделения ДНК в пересчете на один образец;

удобство работы с набором либо методикой – соответствие процесса выделения ДНК ожиданиям, основанным на инструкции, прилагаемой к набору;

необходимость дополнительного оборудования и реагентов;

возможность выявлять группы микроорганизмов, отличные по строению клеточной стенки.

С использованием анализируемых протоколов проведено выделение метагеномной ДНК из одного гомогенизированного образца биологического материала. Показано, что полученные образцы нуклеиновых кислот различаются концентрацией и спектральными характеристиками (табл. 2, рис. 1). Максимальное количество нуклеиновых кислот содержалось в образцах MP, OB1, MNSoB1, минимальное – в ZR1 и ZRFe1. Наиболее очищенными от белков и других примесей оказались образцы OB1, MNSt1, MNSoB1E1.

Для установления пригодности полученных образцов ДНК для последующего использования в метагеномных исследованиях

Т а б л и ц а 2. Основные характеристики образцов метагеномной ДНК, выделенных из биоматериала

Кодовое название образца	Метод измерения концентрации ДНК, нг/мкл		Спектральные характеристики	
	спектрофотометрия	флуориметрия	A260/A280	A260/A230
QI1	118	140	1,735	–
ZR1	30	10	1,667	0,060
ZRFe1	57	18,6	1,520	0,152
SA1	109	137	1,810	0,450
IN1	74	280	1,762	1,104
IP1	461	390	1,972	0,933
OB1	142	530	1,841	2,038
MNSt1	136	393	1,845	2,093
MP	260	852	1,898	0,162
MNSoB1	138	420	1,828	1,296
MNSoB1E1	124	380	1,816	1,764
MNSoB2	89	151	1,816	1,047
MNSoB2E	54	130	1,800	0,663
DN	173	188	1,850	1,272
HM	165	140	1,564	1,269

П р и м е ч а н и е. Серым цветом выделены значения, которые были уточнены путем анализа электрофореграмм. Отношение A260/A280, равное 1,8, свидетельствует о «чистой» ДНК, равное 2,0 – «чистой» РНК. Значение отношения ниже 1,8 указывает на присутствие примесей в растворе (белок, фенол, др.). Отношение 260/230 для «чистой» нуклеиновой кислоты равно 2,0–2,2. Если данный показатель ниже, это свидетельствует о присутствии в растворе таких примесей, как ЭДТА, углеводы и др.

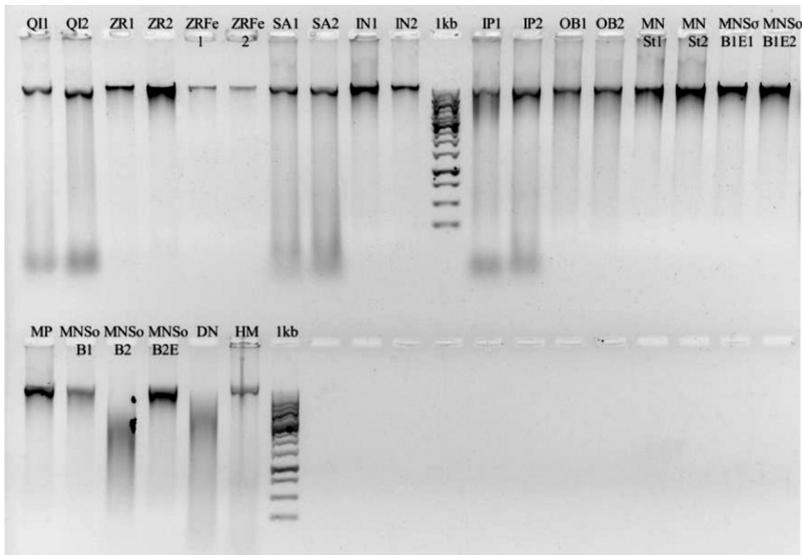


Рис. 1. Электрофореграмма образцов метагеномной ДНК, выделенных с помощью различных наборов

были проведены ПЦР- и рестрикционный анализы. Вышеуказанные методы позволяют выявить присутствие в образцах ингибиторов ферментативных реакций.

Как видно из рис. 2, реакция рестрикции протекала в смесях со всеми исследуемыми образцами метагеномной ДНК.

При ПЦР-анализе из-за наличия в образцах метагеномной ДНК ингибиторов ферментативных реакций ампликоны гена 16S рРНК не детектировались для образцов ZR1, MNSoB2E, DN (рис. 3).

В случае образца DN отсутствие продуктов ПЦР может быть связано с частичной деградацией молекул ДНК в исходном образце. При выделении набором DN молекулы ДНК фрагментированы в большей степени, чем в случае остальных образцов (рис. 1), что может затруднять или делать невозможным протекание ПЦР. Частичная деградация молекул ДНК может быть вызвана избыточной обработкой образца на этапе лизиса бактериальных клеток. В остальных случаях причину ингибирования либо низкой эффективности ПЦР достоверно указать невозможно (рис. 3).

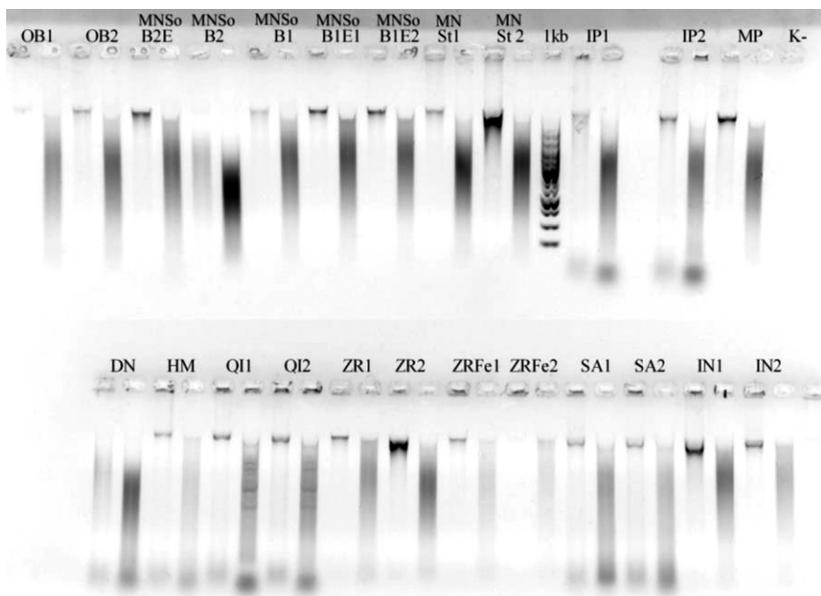


Рис. 2. Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа образцов метагеномной ДНК. Каждому образцу соответствуют две дорожки на агарозном геле: в 1-ю загружали исходный образец ДНК, во 2-ю – рестрикционную смесь

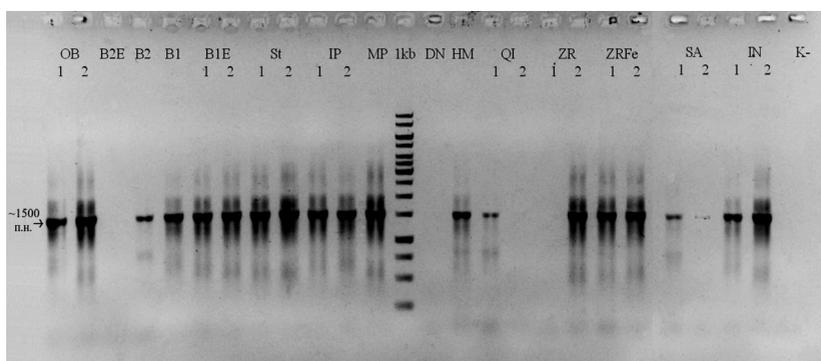


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента гена 16S рРНК из образцов метагеномной ДНК

Таким образом, образцы ДНК, полученные методами MNSoB2E, DN, нежелательно использовать для проведения дальнейших исследований. Хотя рестрикция данных образцов ДНК прошла успешно, в ходе ПЦР не наблюдалось накопления целевых продуктов. Также неоднозначные данные получены для набора ZR: ПЦР с высокой эффективностью протекала в случае использования матрицы ZR2, но не ZR1. Низкая эффективность либо невозможность протекания реакции с матрицей ZR1 может быть вызвана низким качеством очистки образца от ингибирующих веществ, входящих в состав кала, либо от компонентов набора для выделения ДНК ($A260/A280 = 1,667$, $A260/A230 = 0,06$).

Результаты анализа используемых протоколов выделения ДНК по таким параметрам, как времязатратность, стоимость (на один образец), удобство работы, необходимость дополнительного оборудования и реагентов, приведены в табл. 3. Меньше всего време-

Т а б л и ц а 3. Сравнительная характеристика наборов для выделения ДНК

Кодовое название набора	Времязатратность (1 образец), мин	Необходимость в дополнительных реагентах / оборудовании	Удобство работы	Стоимость (1 образец), у. е.
MP	70	пробирки, специальное оборудование	–	14,2
HM	120	пробирки, растворы	–	–
QI	30	пробирки	+	19,2
ZRFe	35	пробирки	–	11,6
DN	40	пробирки	+	19,5
ZR	45	пробирки	–	11,8
IN	50	пробирки	+	7,4
SA	45	пробирки	+	9,7
IP	50	пробирки	+	4,8
OB	70	пробирки, РНКза А	+	5,7
MNS _t	35	пробирки	+	7,0
MNS _o	B1	пробирки	+	6,8
	B1E			
	B2			
	B2E			

П р и м е ч а н и е. Обозначения: «+» – удобно, при выделении ДНК не возникало трудностей; «–» – неудобно.

ни требовалось для экстракции нуклеиновых кислот с помощью наборов QI, ZRFe, MNSt, MNSo, наиболее времязатратным оказался метод, описанный в литературе (НМ).

При этом работа с наборами QI, MNSt, MNSo не требовала дополнительных реагентов и не вызывала затруднений. В то же время при использовании наборов ZRFe и ZR возникали определенные неудобства, связанные с сильной разбавленностью ДНК после элюирования (поскольку предусмотрено применение сорбента) и низкой фильтрующей способностью колонок для очистки от примесей. Что касается стоимости анализа, то наиболее дешевым оказалось выделение нуклеиновых кислот с помощью наборов IP, OB, MNSo. Однако в набор OB не включена РНКаза А, что вызывает необходимость дополнительных затрат.

На основании полученных результатов из дальнейших исследований были исключены наборы MP и DN, а также метод НМ. Выделение метагеномной ДНК с помощью набора MP требовало достаточно больших, в сравнении с другими протоколами, временных затрат, а также наличия специального оборудования (дезинтегратор клеток) и пробирок различных объемов, что снижало удобство работы. Кроме того, данный набор отличался относительно высокой стоимостью. Основным недостатком набора DN являлось получение сильно фрагментированных нуклеиновых кислот (рис. 1), что затрудняло их последующий анализ, а также дороговизна выделения ДНК. Метод НМ являлся наиболее времязатратным из всех использованных в данной работе и не обеспечивал получения высокоочищенного образца нуклеиновых кислот.

Из четырех возможных вариантов применения набора MNSo (MNSoB1, MNSoB2, MNSoB2E, MNSoB1E), характеризующегося невысокой стоимостью, быстротой выделения ДНК, удобством в работе, для дальнейших исследований был выбран протокол MNSoB1E, позволяющий получить образцы с более высокой концентрацией и чистотой нуклеиновых кислот.

Описанные выше результаты позволяют судить об эффективности экстракции нуклеиновых кислот лишь по их целостности, концентрации, а также химической чистоте образца. Для того чтобы выявить, в какой степени в полученных метагеномных

ДНК представлены нуклеиновые кислоты отдельных таксонов микроорганизмов, был проведен дальнейший анализ образцов IN, IP, MNSoB1E, MNSt, OB, QI, SA, ZR, ZRFe с помощью высокопроизводительного массового секвенирования V3–V4-регионов генов 16S рРНК.

Сходство между образцами было проанализировано с помощью кластерного анализа нормализованной таблицы операционных таксономических единиц – условных единиц, которые, в зависимости от установленного критерия сходства между нуклеотидными последовательностями, могут быть соотнесены с таксономическими рангами вида, рода, семейства и др. (рис. 4).

Образцы условно можно разделить на три группы. К первой относились образцы IP, SA, QI, которые группировались по повторностям, что говорит о хорошей воспроизводимости результатов при использовании соответствующих наборов для выделения метагеномной ДНК. Хорошая воспроизводимость, исходя из кластерного анализа, также характерна для набора MNSo. Образцы ZR и ZRFe образовали отдельный кластер, что свидетельствует

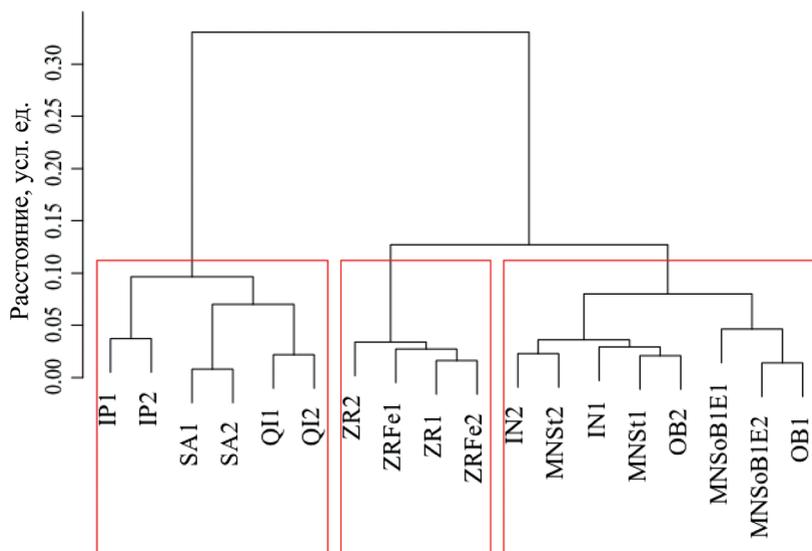


Рис. 4. Иерархическая кластеризация образцов методом минимальной дисперсии Уорда с предварительным возведением значений дисперсии в квадрат

о сходстве методик выделения ДНК в двух наборах одного производителя.

Воспроизводимость результатов также проанализировали путем сравнения общего количества ОТЕ и общих ОТЕ на уровне семейства, содержащихся в повторностях (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. **Количество ОТЕ в образцах метагеномной ДНК на уровне семейства**

Образец	Общее количество ОТЕ	Количество ОТЕ, присутствующих в обоих образцах	% общих ОТЕ относительно всех вариантов ОТЕ, детектируемых в обоих образцах
IN1	192	174	64
IN2	238		
IP1	239	189	73
IP2	209		
MNSoB1E1	232	189	74
MNSoB1E2	213		
MNSt1	198	175	62
MNSt2	247		
OB1	217	180	70
OB2	210		
QI1	189	161	64
QI2	194		
SA1	195	166	65
SA2	203		
ZR1	190	172	66
ZR2	227		
ZRFe1	232	173	63
ZRFe2	198		

Общее количество ОТЕ среди образцов находилось в пределах от 189 (QI1) до 247 (MNSt2). Наименьшая разница в количестве ОТЕ выявлена для методов QI и OB (5 и 7 ОТЕ соответственно), наибольшая – для метода MNSt (49 ОТЕ).

На уровне семейства показатель общих ОТЕ, относительно суммы всех вариантов ОТЕ, детектируемых в повторностях, варьировал от 62 до 74 %. Наибольшее количество общих ОТЕ наблюдалось при выделении ДНК методом MNSoB1E – 74 %. Близкие

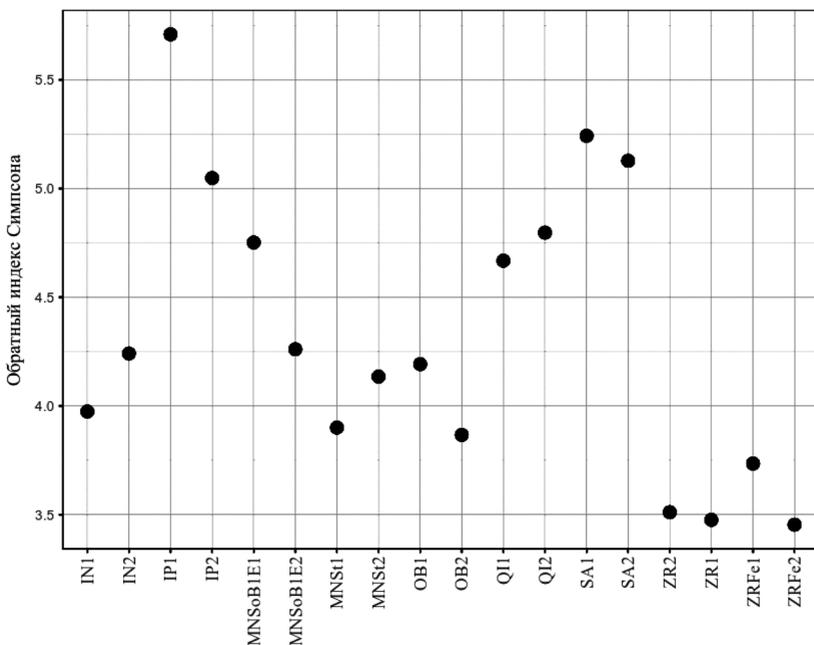


Рис. 5. График, отражающий значения обратного индекса Симпсона

значения получены для методов IP, OB и QI, которые были отнесены в одну группу при кластеризации.

С целью установить, насколько эффективно происходило выделение ДНК из разных групп микроорганизмов, проанализировали показатель доминирования – обратный индекс Симпсона (рис. 5) [20]. Данный показатель тем меньше, чем более выражено доминирование одного или нескольких таксонов в исследуемом образце.

В случае наборов ZR, ZRFe ДНК из ряда таксонов выделяется с большей эффективностью, чем для других, что приводит к снижению обратного индекса Симпсона. При использовании наборов SA, QI, IP, MNSoB1E1 данный показатель принимает значения выше 4,25, что позволяет предположить, что при использовании вышеуказанных наборов ДНК экстрагируется с примерно равной эффективностью из микроорганизмов с различным строением клеточной стенки.

Для выбора метода выделения ДНК в последующих метагеномных исследованиях оценили наборы по каждому анализируемому параметру по шкале от 1 до 10 баллов, где 10 – наивысший балл, 1 – низший (табл. 6).

Т а б л и ц а 6. Сравнение методов выделения ДНК по совокупности исследованных показателей

Показатель	Кодовое название метода								
	QI	ZRFc	ZR	IN	SA	IP	OB	MNSI	MNSoBIE
Времязатратность	10	9	6	5	6	5	1	9	9
Необходимость в дополнительном оборудовании или реагентах	10	10	10	10	10	10	1	10	10
Удобство работы	10	7	7	10	10	10	10	10	10
Стоимость выделения ДНК из одного образца	1	6	6	9	8	10	10	10	10
Воспроизводимость результатов (по общим ОТЕ)	1	1	4	1	2	9	7	1	10
Концентрация ДНК	2	1	1	7	3	7	10	10	10
ИТОГО	34	34	34	42	39	51	39	50	59

За 10 баллов принимали наилучшее значение исследуемого признака, а за 1 – наихудшее значение. Для проведения дальнейших работ по изучению структуры микробиоты кишечника человека выбран метод MNSoBIE, который характеризуется наибольшей воспроизводимостью результатов внутри повторностей, позволяет получить высокоочищенные препараты нуклеиновых кислот в высокой концентрации. Кроме того, данный подход отличает низкая стоимость процедуры выделения ДНК и удобство использования.

Заключение. По результатам сравнительного анализа 11 коммерческих наборов и одного описанного в литературе метода для выделения ДНК из образцов биологического материала (кала) с целью метагеномных исследований микробиоты кишечника выбран набор MNSoBIE – NucleoSpin® DNA Soil (Macherey-Nagel) в варианте с буфером SB1 и энхансером SX. Данный метод позволяет получить высокоочищенные препараты нуклеиновых кислот в высокой концентрации; обеспечивает эффективную экстракцию ДНК

из клеток бактерий с различным строением клеточной стенки; характеризуется хорошей воспроизводимостью по выявлению различных таксонов внутри повторностей; отличается невысокой стоимостью процедуры выделения ДНК и удобством использования.

Литература

1. Evolution of mammals and their gut microbes / R. E. Ley [et al.] // *Sci.* – 2008. – Vol. 320, № 5883. – P. 1647–1651.
2. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota / H. Chung [et al.] // *Cell.* – 2012. – Vol. 149, № 7. – P. 1578–1593.
3. The human microbiome project / P. J. Turnbaugh [et al.] // *Nature.* – 2007. – Vol. 449, № 7164. – P. 804–810.
4. Maccaferri, S. Metagenomics: key to human gut microbiota / S. Maccaferri, E. Biagi, P. Brigidi // *Dig Dis.* – 2011. – Vol. 29, № 6. – P. 525–530.
5. Greathouse, K. L. DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization / K. L. Greathouse, R. Sinha, E. Vogtmann // *Gen. Biol.* – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 212.
6. Sampling, metadata and DNA extraction – important steps in metagenomic studies / A. Felczykowska [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2015. – Vol. 62, № 1. – P. 151–160.
7. Guo, F. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing / F. Guo, T. Zhang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97, № 10. – P. 4607–4616.
8. Bahl, M. I. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis / M. I. Bahl, A. Bergström, T. R. Licht // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 329, № 2. – P. 193–197.
9. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants / S. Oikarinen [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2009. – Vol. 44, № 3. – P. 211–214.
10. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model / L. Monteiro [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35, № 4. – P. 995–998.
11. An Improved Methodology to Overcome Key Issues in Human Fecal Metagenomic DNA Extraction / J. Kumar [et al.] // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2016. – Vol. 14, № 6. – P. 371–378.
12. Baker, G. C. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers / G. C. Baker, J. J. Smith, D. A. Cowan // *J. Microbiol. Methods.* – 2003. – Vol. 55, № 3. – P. 541–555.
13. Li, H. lh3/seqtk [Electronic resource] / H. Li. – Mode of access: <https://github.com/lh3/seqtk>. – Date of access: 01.03.2020.
14. Wood, D. E. Improved metagenomic analysis with Kraken 2 / D. E. Wood, J. Lu, B. Langmead // *Gen. Biol.* – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 257.

15. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools / C. Quast [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41, № D1. – P. D590–D596.

16. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data / J. Lu [et al.] // *PeerJ Comput. Sci.* – 2017. – Vol. 3 – P. E104.

17. Dabdoub, S. *smdabdoub/kraken-biom* [Electronic resource] / S. Dabdoub. – Mode of access: <https://github.com/smdabdoub/kraken-biom>. – Date of access: 21.01.2020.

18. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome / D. McDonald [et al.] // *GigaSci.* – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 7.

19. R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

20. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities / B.-R. Kim [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 27, № 12. – P. 2089–2093.

COMPARATIVE EXAMINATION OF METAGENOMIC DNA EXTRACTION METHODS FOR ANALYSIS OF GUT MICROBIOTA

*E. V. AKHREMCHUK, A. E. AKHREMCHUK, S. V. BUINITSKAYA,
A. V. SIDARENKA, L. N. VALENTOVICH*

*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
katerina_akhr@bio.bsu.by*

Comparative analysis of 12 metagenomic DNA extraction methods from biological material (feces) was performed. It was shown that the method of DNA extraction influences purity and concentration of DNA, as well as the ratio of taxonomic groups. The technique selected for isolation of nucleic acids to be further used in metagenomic studies of human gut microbiota provided highly concentrated DNA samples lacking inhibitors of enzymatic reactions and containing nucleic acids from microorganisms with different cell wall structure.

Поступила в редакцию 03.06.2020