

## 超声波细胞粉碎机在高通量测序片段化 DNA 中的应用<sup>①</sup>

李根亮, 卢舒雨, 许苡饶, 黄捷, 黄晓敏, 肖娟, 农嵩

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: ligenliang@163.com)

**摘要:** **目的** 探讨超声波细胞粉碎机在高通量测序中应用的最佳 DNA 片段化条件。**方法** DNA 样品在冰浴条件下采用不同的超声功率、单次间隙时间和超声时间、工作时间(单一样品超声破碎时间)、仪器连续工作时间, 通过琼脂糖凝胶电泳和 2100 生物分析仪分别检测基因组 DNA 片段化和羟甲基化免疫共沉淀效果。**结果** 超声功率 280 W、间隙时间/超声时间 5 s/5 s、总工作时间 18 min, 仪器连续工作时间不超过 90 min, 超声波处理时样品始终保持冰浴环境可获得高通量测序需要的、长度主要集中在 200~500 bp 之间的 DNA 片段。**结论** 在我们优化的实验条件下, 利用超声波细胞粉碎机可以得到重复性较好的基因组 DNA 片段, 可满足高通量测序文库构建中对 DNA 片段质量的要求。

**关键词:** 基因组 DNA; 高通量测序; 超声波细胞粉碎机; DNA 片段化; (羟) 甲基化免疫共沉淀

**中图分类号:** Q93-33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5817(2016)05-0466-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.05.003

## Application of ultrasonic cell disrupter in high-throughput sequencing DNA fragmentation

Li Genliang, Lu Shuyu, Xu Yijiao, Huang Jie, Huang Xiaomin, Xiao Juan, Nong Song

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

E-mail: ligenliang@163.com)

**Abstract:** **Objective** To investigate the optimal conditions of DNA fragmentation using a ultrasonic cell disrupter in high-throughput sequencing. **Methods** Under the conditions of ice bath, and of the diverse ultrasonic power, gap/ultrasonic duration, ultrasonic time, and continuous operating time of the instrument, the DNA was broken with the ultrasonic cell disrupter and then analyzed using agarose gel electrophoresis and the Agilent 2100 expert\_High Sensitivity DNA Assay to determine the effects of both DNA fragmentation and hydroxyl methylation immune coprecipitation. **Results** Under the conditions of ice bath and ultrasonic power of 280W, gap/ultrasonic duration of 5s/5s, ultrasonic time of 18 min, and continuous operating time of the instrument of 90min, we could harvest the genomic DNA fragment of 200~500 bp for the needs of high-throughput sequencing. **Conclusion** Using the ultrasonic cell disrupter under the optimized conditions, we can yield the repeatable DNA fragments which can be used to library construction for high-throughput sequencing.

**Key words:** genomic DNA; high-throughput sequencing; ultrasonic cell disrupter; DNA fragments; (hydroxyl) methylated DNA immunoprecipitation

随着技术的发展, 遗传信息及其表达调控的研究手段越来越多, 高通量测序技术是其中最有效的手段之一<sup>[1-5]</sup>。目前, 利用高通量测序手段研究生物遗传信息和基因表达调控信息已相当普及<sup>[3-7]</sup>。然而, 测序前需要先制备适当大小 DNA 片段的样本文库。因

此, 测序前需要对基因组 DNA 进行破碎, 使其片段长度满足测序要求<sup>[7-9]</sup>。RNA-seq 对测序片段的长度要求也和 DNA 高通量测序的一样<sup>[3-4]</sup>。目前三大主流测序平台的平均测序读长基本在 100~400 bp 范围内。其中 Illumina 测序平台更是主流中的主流, 其测

① **基金项目:** 国家自然科学基金(3120365); 广西自然科学基金(2015GXNSFAA139219 和 2016GXNSFAA380177); 右江民族医学院博士科研启动基金项目; 2013 年度广西高校科学技术研究项目(桂教科研[2013]7 号, 2013YB185); 广西自治区级大学生创新创业训练计划项目(桂教高教[2016]41 号, 201610599039 和 201610599051; 右医院字[2012]23 号, QJXCX201321 和 QJXCX201334); 右江民族医学院校级大学生创新创业训练计划项目(右医教字[2014]5 号, XJCXB201412; XJCXB201420 和 XJCXB201423)

序片段的读长是 150 bp×2,其双端测序需要的样本 DNA 片段长度为 300 bp 左右。片段太长或太短,都不能经济有效地实现高通量测序过程。如片段太长,会在固定 DNA 到固体基质上时的效率低下且影响后续的测序效果、降低测序量。如果片段太短,则会导致测序读长偏短、增加测序成本和后续拼接的工作量。因此,测序前首先要获得高质量的核酸片段。通常,基因组 DNA 或 RNA 片段化的主要仪器是价格昂贵的超声波破碎仪,而大部分研究者的实验室并没有。因此,如何利用一般实验室现有条件实现 DNA 的片段化以满足高通量测序的需要成为亟待解决的问题。

本文主要关注的是普通超声波细胞粉碎机破碎 DNA 样本的应用与技巧,并通过琼脂糖凝胶电泳、2100 生物分析仪对超声片段化的 DNA 样本及其后甲基化免疫共沉淀(methylation immune coprecipitation,MeDIP)和羟甲基化免疫共沉淀(hydroxymethylation immune coprecipitation,hMeDIP)获得的样本进行质量分析,评价普通超声波细胞粉碎机在高通量测序中应用的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 肝癌组织和癌旁组织(取自实验室自己构建和饲养的肝癌模型小鼠),精巢组织(取自购买于江苏省赣榆河蟹养殖场的河蟹幼蟹)。DNA 组织样品保存液(GT21234,北京华越洋),美国 Parafilm 封口膜(PM-996),Tiangen 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304),Gelred(美国 BIOTIUM)。1.2 仪器 BILON92-IIID 型超声波细胞粉碎机(上海比朗仪器有限公司),凝胶成像系统 Chemidoc XRS(美国伯乐),Nanophotometer Pearl 微量核酸蛋白分析仪(德国 Implen),真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf),DYCP-31CN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一),安捷伦 2100 生物分析仪(Agilent 2100 expert\_High Sensitivity DNA Assay)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 取肝癌模型小鼠的肝癌组织和癌旁组织以及河蟹幼蟹精巢组织,保存于事先放入 DNA 组织样品保存液的离心管备用。样品要浸没在保存液中,离心管口用封口膜封口,大于 0.3 cm 厚度的样品保存前需要在冰上剪切成小于 0.3 cm 的薄片。提取 DNA 时,分别取小于 50 μg 的各组织,用基因组 DNA 提取试剂盒,按照试剂盒使用说明书的操作步骤提取基因组 DNA,用 Nanophotometer Pearl 微量核酸蛋白分析仪测定其浓度。

1.3.2 基因组 DNA 的超声波破碎 ①将各基因组 DNA 溶液分别加入 10ml 容量的离心管内,并加 ddH<sub>2</sub>O 稀释至溶液最终总体积为 4.5 ml。②取 100 ml 容量的烧杯,加入碎冰约达烧杯刻度的 90 ml 处,加适量水。在烧杯口放一个中部有孔的固定环,将盛

有稀释 DNA 溶液的离心管插入冰水中,并固定于固定环中部的孔内。③初步设置超声破碎条件。本实验中使用的是 BILON92-IIID 型超声波细胞粉碎机。超声破碎条件的初步设置见表 1。④进一步优化超声破碎条件。根据上一步的实验结果,对各种超声破碎条件做进一步的优化,见表 2。

表 1 初步设置的超声破碎条件

| 超声功率<br>(W) | 间隙时间/<br>超声时间(s) | 总工作时间<br>(min) | 样品温度 |
|-------------|------------------|----------------|------|
| 150         | 2/8              | 5              | 冰浴   |
| 300         | 5/5              | 15             |      |
| 450         | 7/3              | 30             |      |

表 2 进一步优化的超声破碎条件

| 超声功率<br>(W) | 间隙时间/<br>超声时间(s) | 总工作时间<br>(min) | 连续工作时间<br>(min) | 样品温度 |
|-------------|------------------|----------------|-----------------|------|
| 200         | 3/7              | 10             | 36              | 冰浴   |
| 240         | 4/6              | 14             | 54              |      |
| 280         | 5/5              | 18             | 90              |      |
| 320         | 6/4              | 22             | 126             |      |

1.3.3 基因组 DNA 破碎效果的分析 首先浓缩样品。将以上超声波破碎后的 DNA 样品溶液用真空离心浓缩仪浓缩成原体积,用微量核酸蛋白分析仪测定其浓度。然后电泳分析。取以上各种条件下破碎的 DNA 浓缩样品约 0.2 μg,用质量浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。制胶时在冷却到约 65 ℃的凝胶溶液中加入 Gelred 用于染色。电泳时间约 35 min,电压为 8 V/cm。电泳结果用凝胶成像系统 Chemidoc XRS 进行拍照、观察和分析。

1.3.4 (h)MeDIP 样品的制备和分析 在优化后的超声波功率、间隔时间/超声时间,以及总超声时间条件下,使用超声波细胞粉碎机对各基因组 DNA 进行超声波粉碎。用 DNA 甲基化免疫共沉淀试剂盒捕获各基因组甲基化 DNA 片段。所有操作步骤按照免疫共沉淀试剂盒使用说明书的操作流程进行。然后将(h)MeDIP 捕获的羟甲基化和甲基化 DNA 片段,用安捷伦 2100 生物分析仪进行检测。

2 结果

2.1 优化的超声波破碎条件 超声波破碎 DNA 实验的初步结果表明,功率 300 W、间隙时间/超声时间 5 s/5 s、总工作时间 15 min 效果最好,DNA 片段长度的峰值在 300 bp 左右、波峰跨度在 90~1 000 bp。进一步优化超声条件的实验结果表明,超声功率在 240~320 W、间隙时间/超声时间 4 s/6 s~5 s/5 s、总工作时间 12~20 min 都可以基本满足片段长度要求。但超声功率 280 W、间隙时间/超声时间 5 s/5 s、总工作时间 18 min 效果最好(见图 1、图 2 和图 3)。

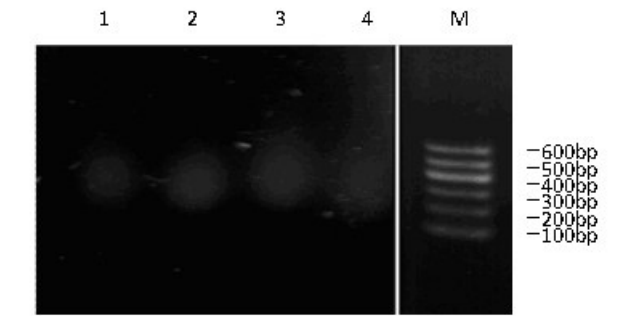


图 1 总超声时间 18 min、间隙时间/超声时间 5 s/5 s 时超声波功率对 DNA 破碎效果的影响  
注:1 为 320 W;2 为 280 W;3 为 240 W;4 为 200 W;M 为 Marker

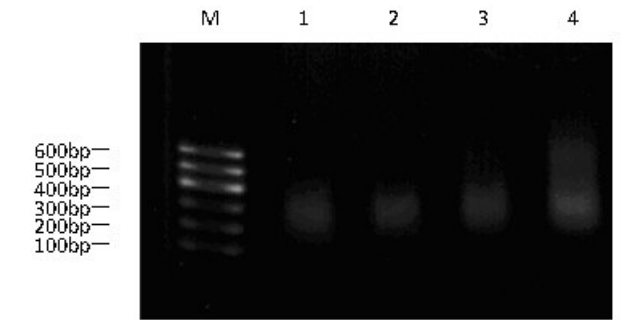


图 2 总超声时间 18 min、超声波功率 280 W 时间隙时间/超声时间对 DNA 破碎效果的影响  
注:M:Marker; 1 为 3 s/7 s;2 为 4 s/6 s;3 为 5 s/5 s;4 为 6 s/4 s

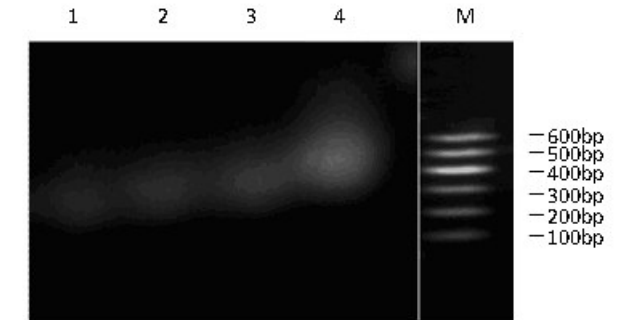


图 3 总超声时间 18 min、间隙时间/超声时间 5 s/5 s、超声波功率 280 W 时总工作时间对 DNA 破碎效果的影响  
注:1 为 22 min;2 为 18 min;3 为 14 min;4 为 10 min;M 为 Marker

连续工作时间方面,经过 90 min 的超声粉碎,仪器的工作效果没有明显的变化,但当工作持续时间超过 2 h 时,超声破碎效果略有下降。因此,我们接下来的仪器持续工作时间都控制在 90 min 以内,即最多连续处理 5 个样品。

不同样品之间,河蟹精巢、小鼠肝癌及癌旁组织基因组 DNA 破碎效果没有差异。

2.2 (h)MeDIP 的结果 (h)MeDIP 捕获的羟甲基化和甲基化 DNA 片段,经 2100 生物分析仪检测的结果表明,其波峰跨度都主要集中在 200~500 bp,平均都为 260~360 bp 之间,峰值都在 300 bp 附近(见图 4 和图 5)。所有免疫共沉淀捕获的 DNA 片段都符合高通量测序的样品长度要求。也就是说,在优化的条件下,利用超声波细胞粉碎机处理得到的基因组 DNA 片段可以满足(h)MeDIP 对 DNA 样品处理的要求。

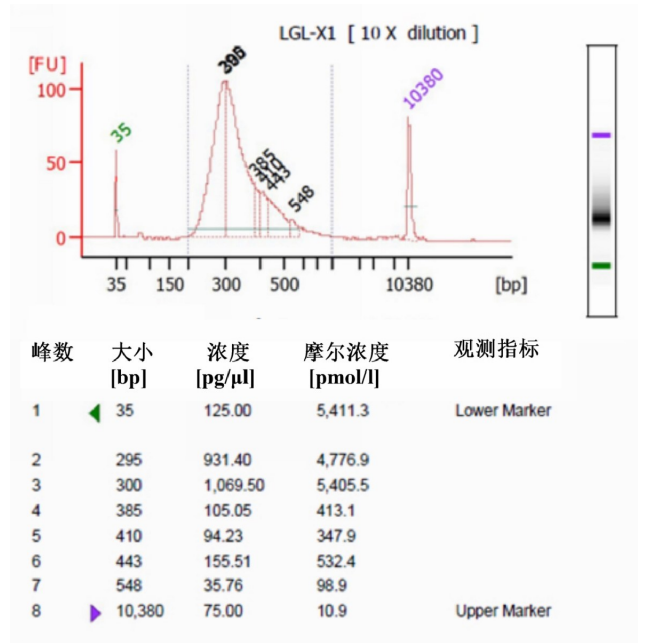


图 4 hMeDIP 捕获的羟甲基化 DNA 片段

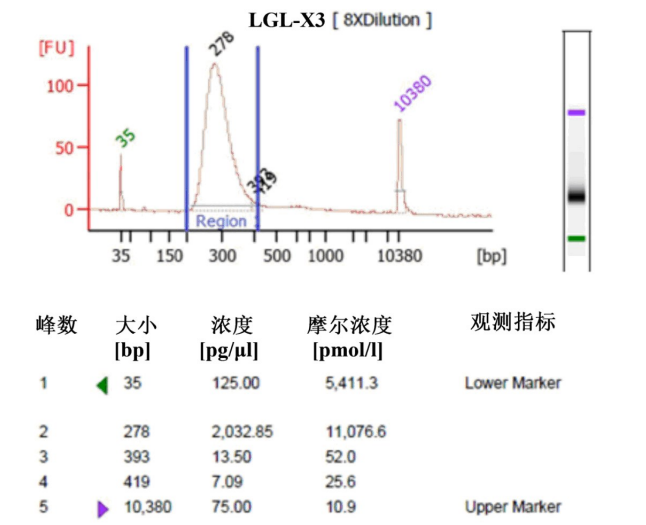


图 5 MeDIP 捕获的甲基化 DNA 片段

3 讨论

超声波破碎组织、细胞、DNA 或其他物质时,主要

是将电能转换为声能,后者使水(或其他液体)形成密集的小气泡,随着气泡震动和其猛烈的聚爆而产生机械切割力,使被作用物破碎,DNA 等则被片段化<sup>[9-11]</sup>。超声波细胞粉碎机是各类生命科学和医学实验室的常规仪器。本研究中使用的是国产的 BILON92-IIID 型超声波细胞粉碎机,虽然其变幅杆直径有 2 mm、3 mm、6 mm、8 mm、10 mm、12 mm 和 15 mm 7 种,但我们用的仪器的变幅杆直径是固定的 6mm。由于其直径相对较大,因此要求被处理的体积较大。为了满足这一条件,我们将微克级 DNA 样本用 ddH<sub>2</sub>O 稀释成满足仪器要求的足够量体积,在处理完成后再用普通的浓缩仪在 4℃ 低温甚至室温下用大约 20 min 的时间将其浓缩成原体积大小。为了减少浓缩时间,可以将 4 ml 的 DNA 样品溶液分装到多个离心管中进行浓缩。实验结果表明,低浓度溶液的 DNA 能被超声波细胞粉碎机很好地切割成预期长度的 DNA;超声破碎前后,DNA 溶液的浓度没有发生任何变化;而且室温和低温下短时间浓缩得到的 DNA 片段没有明显的质量差异。

在实验操作中,需要注意几个小问题:①在使用超声波细胞粉碎机处理 DNA 样品时,需要注意适时功率。因为在仪器工作的前 3 min 内,其功率会有一定的波动,因此需要及时手动校正使其功率在设定的范围内。②超声处理过程中样品冰浴的问题。在我们的实验中,每一个样品的处理时间是 18 min,在一个样品处理完成后,小烧杯内的冰块并没有完全融化,因此样品处理的整个过程都是在冰浴环境下进行的。但即使如此,在下一个样品处理前也需要重新换上新的冰块以确保接下来的样品处理的冰浴条件。③在离心管的选择上,我们用的是 10 ml 容量的圆底透明离心管,变幅杆垂直悬于离心管中央,其游离端与管底相距约 10 mm,杆身与管四周内壁保持基本相等的距离。

综上所述,本文涉及的实验主要是 DNA (h)Me-DIP 和 DNA 样本文库制备前基因组 DNA 样本片段化的问题。实验结果表明,利用超声波细胞粉碎机片段化基因组 DNA 在 200~500 bp 之间的优化条件是超声功率 280 W、间隙时间/超声时间 5 s/5 s、总工作

时间 18 min,仪器连续工作时间不超过 90 min,超声波处理时样品始终保持冰浴环境。以上优化的条件下可获得比较理想的片段,重复性好,技术和设备要求低、操作简单。

#### 参考文献:

- [1] 李进,熊滨,黄冰,等. 血栓调节蛋白单核苷酸多态性与脓毒症的相关性研究[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(2):127-131.
- [2] 黄海庭,林栩. miRNA 与肾小球疾病研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2015,37(4):638-639,642.
- [3] Tan L, Xiong L, Xu W, et al. Genome-wide comparison of DNA hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells and neural progenitor cells by a new comparative hMeDIP-seq method[J]. Nucleic Acids Res,2013,41(7):e84.
- [4] Santos CA, Blanck DV, de Freitas PD. RNA-seq as a powerful tool for penaeid shrimp genetic progress[J]. Front Genet,2014,5:298.
- [5] Klein HU, Schäfer M. Integrative Analysis of Histone ChIP-seq and RNA-seq Data[J]. Curr Protoc Hum Genet,2016,90:20.3.1-20.3.16.
- [6] Shimbo T, Takaku M, Wade PA. High-quality ChIP-seq analysis of MBD3 in human breast cancer cells[J]. Genom Data,2016,7:173-174.
- [7] Sheaffer KL, Schug J. ChIP-Seq: Library Preparation and Sequencing[J]. Methods Mol Biol,2016,1402:101-117.
- [8] 李敏俐,关善辉,陆祖宏. 染色质免疫沉淀试验中基因组 DNA 超声破碎条件优化策略[J]. 生物技术通报,2010(5):121-125,140.
- [9] 刘莉扬,张博. 超声波破碎仪在高通量测序中的应用[J]. 实验技术与管理,2012,29(7):49-53.
- [10] 万晶晶,张汝嘉,邢德峰,等. 超声波破碎法提取活性污泥 DNA 及其 DGGE 分析[J]. 哈尔滨工业大学学报,2008,40(4):559-562.
- [11] 王志纯. 超声波温育处理提取水稻种子 DNA 方法探讨[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2015,44(5):449-455.

收稿日期:2016-08-13;修回日期:2016-09-30