

用于微生物鉴定的“样品-结果报告”全流程解决方案：

Spectrum Compact CE System 测序与 SmartGene Analysis 联合使用

Promega Corporation 与 SmartGene 共同合作

Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711



台式定制化 CE 系统：

- 单碱基分辨率
- 集成触摸屏操作
- 6 色兼容 CE 分析
- 可进行 Sanger 测序和片段分析

引言

目前，通过对核糖体 RNA (rRNA) 基因的 DNA 测序并进行基因型分析被广泛认为是细菌和真菌分类和鉴定的金标准。利用 PCR 对具有系统发育信息的 DNA 区域（例如 16S/18S/ITS）进行扩增，对扩增产物进行测序，与精选的参考文库进行对比和解读，对给定的微生物分离物进行物种鉴定。

在许多应用中明确的物种级鉴别至关重要，包括人类病原体鉴定、食品安全检测，以及在制药领域中细胞生产和其他常规无菌测试和环境监测计划检测到外源性物质的生产设施。

基因型鉴定的工具和方法已经使用了数十年，但开发完整的内部解决方案可能是一项复杂而昂贵的工作。生成和分析 DNA 测序数据带来的挑战通常使得许多公司选择将该任务外包。然而，这会导致很多问题，例如获得结果的时间成本增加，每份样品成本增加，流程把控困难。

在这里，我们以细菌 16S 测序为例，描述了一个从样品到可操作结果的完整解决方案，用于快速准确地鉴定微生物培养物的物种级基因型。重要的是，大多数实验室都可在内部实施该解决方案，无需实验室基础设施的大量投入，也无需过多生物信息资源与专业知识。

工作流程概述

实验室内部的微生物基因型鉴定解决方案



图 1. 微生物鉴定实验室需要使用的产品组成

步骤	描述	时间
DNA 纯化	利用 Maxwell® Instrument 和 Maxwell® RSC Blood DNA Kit 从液体培养物或克隆样品中对细菌 DNA 进行纯化	预处理：30~60 分钟 仪器操作：40 分钟
PCR 扩增	使用 GoTaq® G2 Hot Start master mix 进行 PCR 扩增	100 分钟
PCR 纯化	使用 ReliaPrep™ DNA Clean-up 进行纯化	10 分钟
测序反应	使用 ProDye™ Sequencing System 进行测序反应	处理时间：5 分钟 热循环时间：120 分钟
测序反应纯化	乙醇沉淀、ReliaPrep™或其他替代方法	45~90 分钟
CE	Spectrum Compact CE System	处理时间：5 分钟 仪器操作：60 分钟
创建一致性序列 搜索参考数据库	将 .ab1 文件导入至 SmartGene Web App 中的靶标特异性的 Proofreader 工具中；检查、修剪、编辑并保存一致性的序列 在 SmartGene Web App 中的相关 Centroids 参考数据库（如有需要，可添加其他数据库）中检索保存的一致性序列	5~10 分钟 2~4 分钟；如果复杂的样品时间可能延长

材料和方法

DNA 纯化

使用 Maxwell® RSC 48 Instrument（目录号# AS8500）和 Maxwell® RSC Blood DNA Kit（目录号# AS1400），从液体细菌培养物和琼脂平板上生长的单菌落中纯化 DNA。Maxwell® RSC 48 Instrument 是一个用于自动化核酸纯化的紧凑型平台，可同时处理 48 个样品。使用预填充试剂条和预编程的方法，Maxwell® RSC 为提取 DNA 提供了一种可靠的方法。更多有关纯化方案的详情请参阅应用笔记^{1、2}及相关网站（promega.com）。

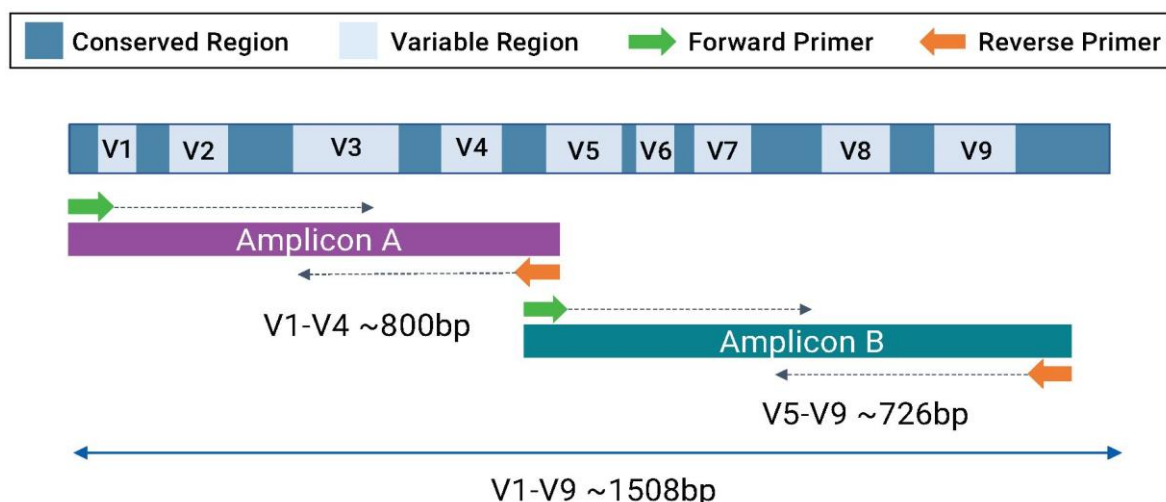
模板制备

该研究中所使用的引物设计方案需要每个样品进行 4 次测序反应，以覆盖 16S 全长基因，从而在使用 SmartGene Bacteria Web App 时实现最大化的物种鉴定能力。

该方案有效利用了 Spectrum Compact CE System 的 4 个毛细管的容量，每次进样都能电泳一个完整的样品。使用该方法，一次运行可处理多达 8 个样品，无需用户干预。

根据鉴定要求，通常可以对 16S 的部分区域（如前 500bp（V1-V3））或 16S 基因的其他可变区域进行测序。通过部分 16S 基因测序，可将每份样品测序的总次数从 4 次减少到 2 次（一次正向测序，一次反向测序），从而提高通量，降低了每份样品的运行成本。更多信息请参阅 CLSI MM18（第二版）³ 中详细的种属特异性表格。

通过扩增两个片段（A. V1~V4，长度约 791bp；B. V5~V9，长度约 726bp），制备全长 16S rRNA 基因模板（图 2, A）。使用 GoTaq® G2 Hot Start Master Mix（目录号# M7432）和用于 16S rRNA 基因的通用引物，进行扩增（图 2, B）。使用 ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System（目录号# A2892），对扩增反应进行纯化，使用 QuantiFluor™ ONE dsDNA System（目录号# E4871）和 Quantus™ Fluorometer（目录号# E6150）对纯化产物定量，并根据定量分析的结果将其稀释至 20ng/μl。PCR 样品设置和运行条件参见表 1。



引物组 A:

16S_A_FWD: 5'-cgccagggttttccagtcacgacAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

16S_A_REV: 5'-caggaaacagctatgacTACCAGGGTATCTAATCC-3'

引物组 B:

16S_B_FWD: 5'-cgccagggttttccagtcacgacGGATTAGATACCCTGGTA-3'

16S_B_REV: 5'-caggaaacagctatgacCGGTTACCTTGTACGACTT-3'

M13 加尾序列:

M13_F: 5'-cgccagggttttccagtcacgac-3'

M13_R: 5'-caggaaacagctatgac-3'

图 2. 16S rRNA 基因可变区图例和用于全长覆盖的测序方法

(A) 扩增子 A 和 B 在正向和反向上进行测序，每个样品总共有四个反应。

(B) 引物序列如上所示，使用通用 M13 序列加尾。

表 1. PCR 反应设置

试剂	每次反应用量 (μl)
GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix	12.5
正向引物 (10μM)	0.5
反向引物 (10μM)	0.5
细菌 DNA 模板 (1~20ng/μl)	1
不含核酸酶的水	10.5
总计	25μl

步骤	循环数	温度、时间
GoTaq® Activation	1	95℃、2 分钟
变性	35	95℃、15 秒
退火		55℃、15 秒
扩增		72℃、60 秒
最后扩增	1	72℃、5 分钟

利用 ProDye Sanger Sequencing System 进行循环测序：

使用 ProDye™ Terminator Sequencing System (目录号# CR4302)，利用 M13 通用测序引物对 20ng 扩增子 A 和 B (图 2, A) 进行正向和反向扩增 (图 2, B)。

循环测序反应的样品设置和 PCR 运行条件参见表 2。

进行循环测序后，根据 ProDye™ Terminator Sequencing System 说明书 (TM672)，利用基于微孔板的乙醇沉淀方法，进行反应产物的纯化。另外，可在 1.5ml 微型离心管中进行乙醇沉淀纯化 ([PA716](#))，或者可执行其他纯化方法，例如使用 Wizard® MagneSil® Sequencing Reaction Clean-Up System (目录号# A1831) 进行纯化 ([PA747](#))，从而减少处理时间，或实现自动化。

表 2. 循环测序反应设置

试剂	每次反应用量 (μl)
ProDye™ 2.5X Master Mix	4
5X 反应缓冲液	2
正向或逆向 M13 引物 (10μM)	0.5
不含核酸酶的水	12.5
模板 DNA (20ng/μl)	1
总计	20μl

步骤	循环数	温度、时间
孵育	1	96℃、1 分钟
变性	25	96℃、10 秒
退火		50℃、5 秒
扩增		60℃、4 分钟
保持	1	4℃

利用 Spectrum Compact CE System 进行毛细管电泳和初步分析

将纯化的测序反应重悬于 Hi-Di™ 甲酰胺 (Applied Biosystems™, 目录号# 4311320) 中，并在 Spectrum Compact CE 系统 (Cat.# CE1304) 上进行毛细管电泳分析。

在 Spectrum Compact 中进行 Sanger 测序，样品可以在快速 (30 分钟) 或标准 (60 分钟) 模式下运行。在该应用中，标准测序运行模式可以获得几乎完整的双向覆盖，并且具有高质量值 (图 3)。完成一次 CE 进样循环后，一组四个测序反应的测序文件可立即在仪器上进行数据分析，如果通过网络连接，也可进行远程分析。利用远程访问功能，即使不在实验室也能实时进行鉴定分析。

Spectrum Compact CE System 可生成.ab1 格式的测序文件。可在 ProView™ Sequencing Software 中进行初步测序质量评估，查看电泳图和质量指标 (即 CRL、QV20+)。

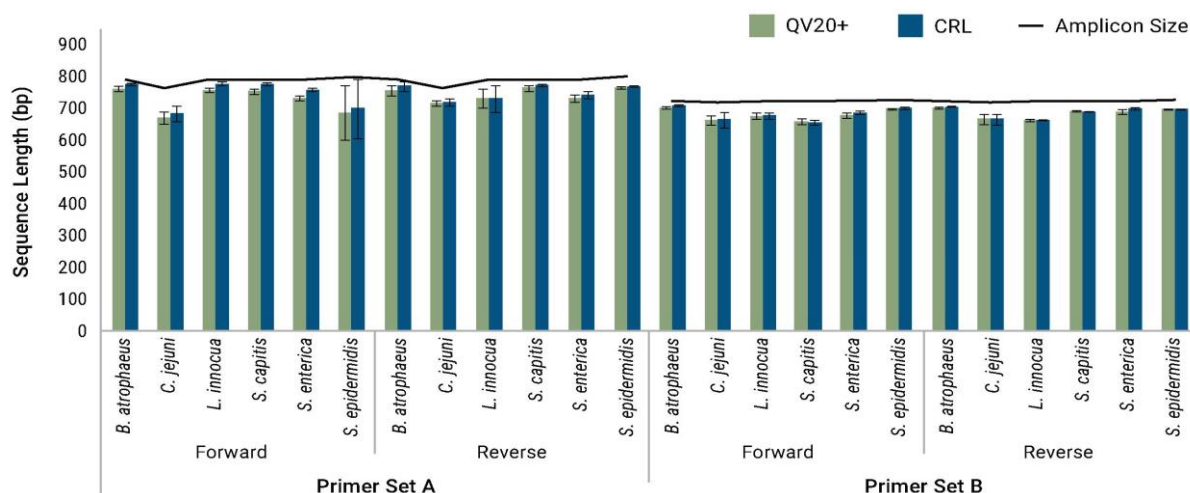


图 3. 测序反应的质量指标。CRL（连续读取长度）是在 21 个碱基的滑动窗口内，平均质量值大于或等于 20 的最长不间断碱基序列。QV20+ 代表整个序列中质量值大于或等于 20 的碱基总数。平均值±标准偏差（n=3）。

SmartGene® Web Application 的数据分析和报告生成

首先应使用 SmartGene® Bacteria Web App 中的目标特异性 16S 校对工具，从扩增子 A 和 B 的两条链（正反向测序结果）生成一个连续的一致序列，从而尽可能完整地重构 16S rRNA 基因序列。

SmartGene® Bacteria Web App 帮助常规微生物实验室实现细菌的精确鉴定，高效得出可靠结果。SmartGene 专用参考序列数据库包含 16000 多种细菌种属，并经常更新，以捕捉新菌株和分类变化。

1. 访问 SmartGene URL 安全链接，并使用用户名和密码登录（图 4）。
2. 点击链接“Add record...”，输入样品编号和元数据。
3. 打开校对器，从 Spectrum Compact 上传当前样本的四个.ab1 文件。SmartGene App 可动态选择适合未知细菌的参考序列，为用户提供初步比对，生成一致的序列，以便用户进行简单的查看（美国专利 8275557）（图 5）。
4. 在校对工具中使用内置的工具来高效地审查比对结果；如果需要的话，修剪和纠正碱基判读错误，并搜索/删除引物序列。电泳图中的双峰可能反映了 16S 基因的操纵子间变异性，应予以保留。
5. 将样品记录中的 16S 一致序列，以及比对结果和 Spectrum Compact 的原始.ab1 文件保存至 SmartGene App 中。所有 SmartGene 的应用程序都内置有审查和日志记录，以记录用户的每次操作，确保分析的可追溯性。
6. 在 SmartGene 专有的精选参考数据库中搜索一致序列，该数据库为 SmartGene 应用程序提供了强大的支持，可帮助进行可靠的物种鉴定（图 6）。

SmartGene 的专有 16S Centroids 参考数据库（欧洲专利 2215578）包含了基于当前分类学的每个有效种属的最具代表性的序列。16S Centroids 参考数据库的优点包括：

1. 快速准确的 BLAST 结果；
2. 易于区分物种；
3. 细菌鉴定结果可靠；
4. 数据条目更新及时，反映了所有相关种属和种类学变化

截至 2023 年 6 月，16S Centroids 参考数据库涵盖了超过 16000 个不同细菌种属的参考序列，这些参考序列均

已经过验证。

如果样本序列与 16S Centroids 序列不能确定匹配，用户可以在 SmartGene 的 16S Eubacteria 参考数据库中搜索匹配度更高的物种变体，该数据库包含超过 1,000,000 个经过特征筛选的条目。

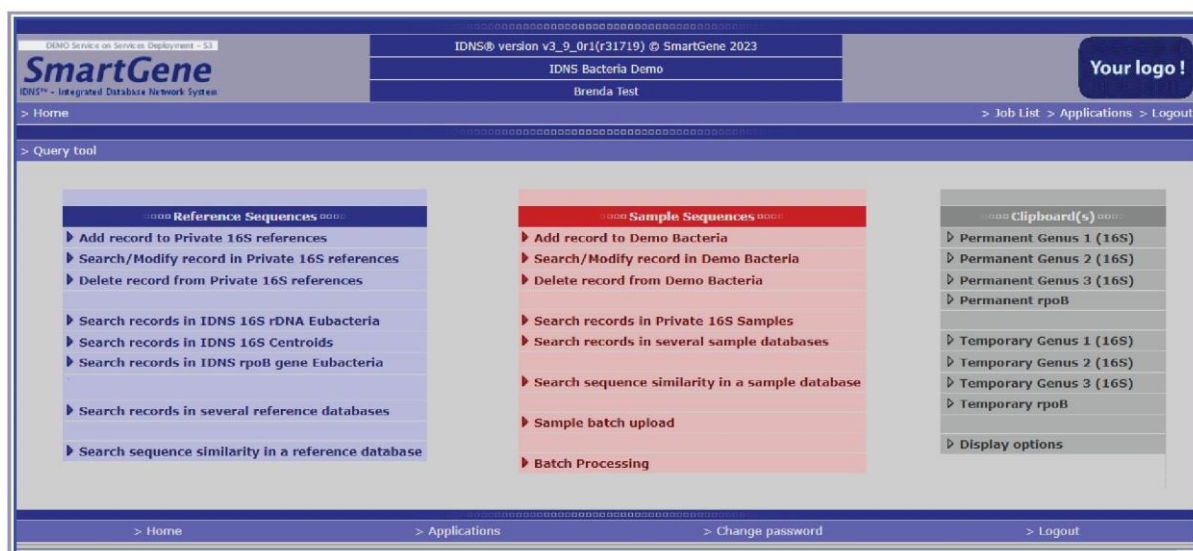


图 4. SmartGene Bacteria 模块主页

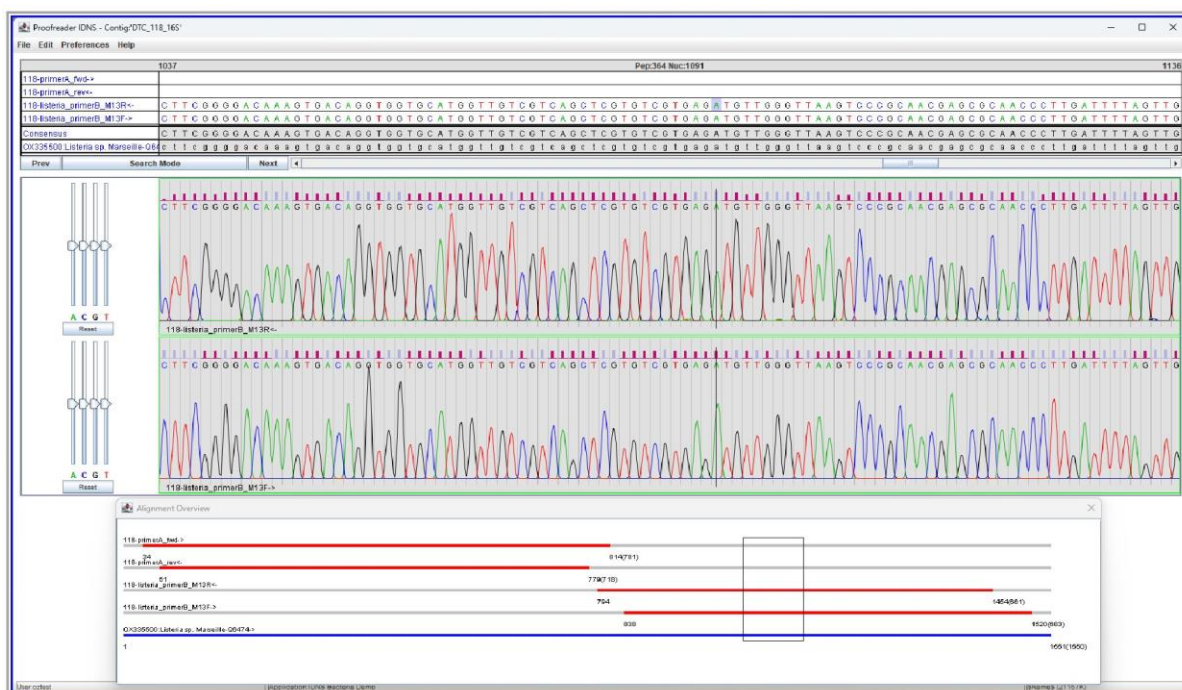


图 5. 校对中初步比对和一致序列示意图



图 6. 使用 SmartGene 16S Centroids 参考数据库进行 BLAST 搜索的最佳匹配案例

结果

为了证明上述工作流程的可行性，我们分析了六种具有不同分类和相关性的微生物的 DNA（表 3）。利用 SmartGene 16S Centroids 参考数据库,结合扩增子 A 和 B 正向和反向测序读取的一致性结果,对 Spectrum Compact CE System 生成的测序结果进行分析。所有样本都被鉴定为正确的物种，鉴定准确率大于 99.8%（表 4）。

表 3. 16S rRNA 基因测序用于基因型鉴定的样本组中使用的细菌种类

种属	革兰氏染色	门类	相关性
深褐芽孢杆菌	革兰氏阳性	芽孢杆菌门	灭菌或消毒的生物指示剂
空肠弯曲杆菌	革兰氏阴性	弯曲菌门	食品污染物
无害李斯特氏菌	革兰氏阳性	芽孢杆菌门	灭菌或消毒的生物指示剂
头葡萄球菌	革兰氏阳性	芽孢杆菌门	洁净室污染物
肠道沙门氏菌	革兰氏阴性	假单胞菌	食品污染物
表皮葡萄球菌	革兰氏阳性	芽孢杆菌门	洁净室污染物

表 4. 六种细菌样品 SmartGene 16S 序列比对结果和种属鉴定总结

微生物（样品输入）	一致序列长度 (nt)	SmartGene 16S Centroids 参考数据库中的最佳匹配	不匹配的数量	鉴定率	匹配长度
深褐芽孢杆菌	1469	深褐芽孢杆菌	0	100%	1468
		死谷芽孢杆菌	7		
		中村芽孢杆菌	7		
空肠弯曲杆菌	1475	空肠弯曲杆菌	3	99.80%	1475
		大肠弯曲杆菌	5		
		亚南极弯曲杆菌	13		
无害李斯特氏菌	1482	无害李斯特氏菌	0	100%	1482

		单核增生李斯特氏菌	4		
头葡萄球菌	1504	头葡萄球菌	1	99.93%	1504
		山羊葡萄球菌	5		
肠道沙门氏菌	1504	肠道沙门氏菌	2	99.87%	1504
		考恩氏小浴氏菌	21		
表皮葡萄球菌	1500	表皮葡萄球菌	0	100%	1497
		解糖葡萄球菌	7		

*灰色表示 Centroid 序列数据库中第二匹配的种属

讨论

为了证明与其他方法相比，全长 16S rRNA 基因测序的实用性，我们选择将空肠弯曲杆菌作为样品，这种细菌的种属鉴定具有挑战性。虽然空肠弯曲杆菌与其他弯曲菌有足够的不同，但空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌的 16S 序列几乎完全相同。基于 16S 基因的前 500 个核苷酸（V1~V3 区域）以及 V4 区域，无法区分空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌，因为它们在这些区域的序列相同，并且在 750 位及之后的位置上仍然相同。仅在 980~1000bp 位置上，发现有两个核苷酸有差异（A vs T；T vs A）。尽管仅有这两个差异，我们依然成功地鉴定了空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌，这说明了使用上述工作流程以及测序方法进行高质量全长 rRNA 基因测序的重要性。

结论

在本白皮书中，我们以细菌 16S 测序为例，展示了从样品到可操作结果的完整解决方案的实施情况，用于快速准确地鉴定微生物培养物的物种级基因型。Promega 提供的样品提取到测序的解决方案，以及 SmartGene 提供的具有针对性的便捷分析应用程序，为细菌基于序列的鉴定提供了一种可行的替代方案，省去了外包服务。

每个样品使用 2 个扩增子（4 个测序反应）的方法可生成大于 1500 个高质量碱基，用于后续 16S 基因片段拼接和下游分析，同时可使仪器设备和人力资源得到高效利用。一旦分离出微生物培养物，这里描述整个工作流程可在一个班次内完成。

SmartGene® Web App 可指导用户完成从.ab1 文件到最终报告生成的全过程，无需配备本地硬件、特定软件和生物信息专业人员。完全可搜索的序列存档便于用户与之前的案例进行简要比对，随着时间的推移，追踪目标微生物，同时避免了建立和维护生物信息学团队以及内部管理软件和数据库的成本和复杂性。

Want to explore our in-house solution? Email us at genomics@promega.com

For more information about Spectrum Compact, visit promega.com/SampleToAction

订购信息

产品	目录号
Spectrum Compact CE System	CE1304
ProDye™ Terminator Sequencing System	CR4324 、 CR4302 、 CR4310
ProView™ Sequencing Software	可在 promega.com 上免费下载
SmartGene® Bacteria web App	欲获取有关 SmartGene 细菌许可条款，请发送电子邮件至 genomics@promega.com
Maxwell® RSC 48 Instrument	AS8500
Maxwell® RSC Blood DNA Kit	AS1400
GoTaq® G2 Hot Start Master Mix	M7432
ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System	A2892
Quantus™ Fluorometer	E6150
QuantiFluor™ ONE dsDNA System	E4871
Wizard® MagneSil® Sequencing Reaction Clean-Up System	A1831

参考文献

1. Automated Purification of DNA from Bacterial Culture. Application Note. [PA743](#).
2. Automated Purification of DNA from a Single Bacterial Colony. Application Note. [PA744](#).
3. CLSI MM18 Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by Targeted DNA Sequencing, 2nd Edition.
4. Ethanol Precipitation in 1.5ml Microcentrifuge Tubes for Purification of ProDye™ Terminator Sequencing Reactions. [PA716](#).
5. Wizard® MagneSil® Sequencing Reaction Clean-Up System for Purification of ProDye™ Terminator Sequencing Reactions. [PA747](#).

For Research Use only.

GoTaq, Maxwell and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation. ProDye, ProView, ReliaPrep, Quantus and QuantiFluor are trademarks of Promega Corporation.

SmartGene and IDNS are registered trademarks of SmartGene AG. SmartGene® Bacteria is Copyright SmartGene AG and protected by international patents, including EP 2,215,578; US 8,275,557.



in collaboration with

SmartGene



PROMEGA CORPORATION • 2800 WOODS HOLLOW ROAD • MADISON, WI 53711-5399
USA • TELEPHONE 608-274-4330

[www.promega.com](#) • ©2023 PROMEGA CORPORATION • ALL RIGHTS RESERVED •
PRICES AND SPECIFICATIONS SUBJECT TO CHANGE WITHOUT PRIOR NOTICE •
PRINTED IN USA 06/23 • MSDD-736 • PART #WP129