

## NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT DNA METAGENOME HỆ VI KHUẨN TRONG DẠ CỎ DÊ

Lê Ngọc Giang<sup>1</sup>, Lưu Hàn Ly<sup>2</sup>, Nguyễn Mai Phương<sup>1</sup>, Lê Tùng Lâm<sup>1</sup>, Đỗ Thị Huyền<sup>1</sup>, Phùng Thu Nguyệt<sup>1</sup>, Trương Nam Hải<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tnhai@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 10.6.2016

Ngày nhận đăng: 20.5.2017

### TÓM TẮT

Hệ vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn trong dạ cỏ của các động vật nhai lại là nguồn gen có giá trị được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Trong những năm gần đây, để khai thác hiệu quả nguồn gen, DNA đa hệ gen của vi khuẩn trong môi trường sinh thái thường được tách chiết và giải mã trực tiếp bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới dựa trên công nghệ Metagenomics. Tuy nhiên, để có được bộ dữ liệu DNA metagenome tốt cho khai thác gen thì chất lượng của DNA tách chiết cần phải đảm bảo tiêu chuẩn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả tách chiết DNA metagenome vi khuẩn trong dịch dạ cỏ dê bằng năm phương pháp RBB (sử dụng hạt thủy tinh), RBBC (sử dụng hạt thủy tinh và tinh sạch bằng cột Qiagen), PSP1, PSP2 (PSP®Spin Stool DNA Kit, protocol 1, 2, Đức) và QIA (QIAamp® DNA Stool Mini Kit, Đức). Kết quả, DNA metagenome tách từ năm phương pháp đều có chỉ số A260/280 đạt trên 1,8. Mặc dù phương pháp RBB cho nồng độ DNA cao hơn nhưng do không được tinh chế nên DNA từ mẫu này có chỉ số A260/230 thấp, chỉ đạt khoảng 1,4 và trong mẫu vẫn còn chất ức chế Taq polymerase. Mẫu tách từ RBB sau khi được tinh sạch lại bằng cột Qiagen có chỉ số A260/230 tăng lên đáng kể, đạt khoảng 2,0 và không còn chất ức chế Taq polymerase nhưng hàm lượng cũng như nồng độ DNA metagenome giảm 57% và đạt gần tương đương với DNA metagenome tách bằng QIA. Phương pháp sử dụng kit tách chiết PSP®Spin Stool DNA cho nồng độ DNA metagenome thu được cao nhất (từ 149,7 đến 195,5 ng/ $\mu$ l), chỉ số A260/280 đạt khoảng 1,9 và A260/230 đạt 1,8-1,9, không còn chất ức chế Taq polymerase và tiêu tốn ít thời gian. Vì vậy, đây là phương pháp thích hợp cho tách chiết DNA metagenome của vi khuẩn trong ruột dê. DNA thu được từ phương pháp này đủ chất lượng cho việc giải trình tự bằng thiết bị giải trình tự DNA thế hệ mới Illumina.

**Từ khóa:** Dạ cỏ dê, DNA metagenome, vi khuẩn, nồng độ, khả năng ức chế polymerase

### MỞ ĐẦU

Dê cũng như một số động vật nhai lại sử dụng nguồn thức ăn chủ yếu là cỏ, rơm rạ. Để tiêu hóa được nguồn thức ăn nghèo dinh dưỡng này, động vật nhai lại có hệ tiêu hóa phù hợp với dạ dày kép gồm bốn ngăn: dạ cỏ, dạ tổ ong, dạ lá sách và dạ múi khế. Dạ cỏ là dạ lớn nhất và là môi trường sinh sống của hệ vi sinh vật phong phú. Ước tính có khoảng  $10^{11}$  tế bào vi sinh vật trên một gram dịch dạ cỏ, bao gồm vi khuẩn, tảo (Kim *et al.*, 2011), nấm, động vật nguyên sinh (Fouts *et al.*, 2012) và virus (Berg Miller *et al.*, 2012) thuộc nhiều loài và chi khác nhau. Hệ vi sinh vật này tham gia vào chuyển hóa lignocellulose thành đường đơn, cung cấp năng lượng cho cơ thể.

Vì vậy, đây là nguồn gen tiềm năng cho việc khai khác gen mã hóa enzyme phân giải lignocellulose.

Metagenomics (nghiên cứu đa hệ gen) là phương pháp nghiên cứu (phân tích) đa hệ gen (Metagenome) của tất cả các vi sinh vật thu nhận trực tiếp từ mẫu môi trường tự nhiên (Handelsman, 2004, Streit, Schmitz, 2004, Hogan *et al.*, 1988). Từ đó, rất nhiều thư viện DNA metagenome của vi sinh vật trong các môi trường sống đã được xây dựng nhằm khai thác gen cũng như nghiên cứu sự đa dạng vi sinh vật, ví dụ môi trường nước biển (Schloss, Handelsman, 2003, Breitbart *et al.*, 2002, Venter *et al.*, 2004), môi trường đất (Xu *et al.*, 2014)... Để có được kết quả phân tích dữ liệu DNA metagenome đáng tin cậy, thì trước hết DNA metagenome được

tách chiết phải đảm bảo về chất lượng và nồng độ. Yêu cầu đối với mẫu DNA metagenome dùng cho giải trình tự bằng hệ thống giải trình tự mới là A260/280 phải đạt trên 1,8 và A260/230 trên 1,5, tức là mẫu phải sạch protein cũng như các chất thứ cấp khác, đặc biệt là acid formic. Nhìn trên điện di đồ, DNA metagenome phải đảm bảo tính toàn vẹn, không bị phân cắt, và nồng độ phải đạt trên 50 ng/ $\mu$ l. Đồng thời, mẫu DNA metagenome không còn chất ức chế enzyme tổng hợp chuỗi ví dụ như enzyme polymerase. Do vậy, đối với mỗi hệ sinh thái mini, việc khảo sát các phương pháp tách chiết DNA đa hệ gen của vi sinh vật là rất cần thiết. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm kiểm tra ảnh hưởng của phương pháp tách chiết tới chất lượng DNA phân lập từ các nguồn khác nhau (Krsek, Wellington, 1999, Cuív *et al.*, 2011, McOrist *et al.*, 2002), trong đó có dạ cỏ (Chen *et al.*, 2015, Henderson *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành so sánh hiệu quả của các phương pháp tách chiết DNA metagenome từ dạ cỏ dê thu thập tại Ninh Bình, Ba Vì, Thanh Hóa để tiến tới giải trình tự DNA đa hệ gen phục vụ cho việc khai thác các gen mã hóa protein, enzyme có đặc tính quý, có giá trị sử dụng trong công nghiệp, nông nghiệp, y, dược.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Thu thập, xử lý và bảo quản mẫu dịch dạ cỏ dê

Dê trưởng thành (6 tháng đến 2 năm tuổi) được lựa chọn ngẫu nhiên từ các đàn dê chăn thả tự nhiên của các trại chăn nuôi ở các tỉnh Thanh Hóa, Ninh Bình và huyện Ba Vì (Hà Nội). Dạ cỏ được lấy trực tiếp tại trại nuôi, được bảo quản lạnh để đưa về phòng thí nghiệm tiến hành các bước thu DNA metagenome vi sinh vật. Toàn bộ dịch trong dạ cỏ được thu và lọc qua vải bốn lớp để loại xác thức ăn. Dịch lọc sau đó được ly tâm phân đoạn nhiều lần để loại bỏ tạp chất. Cuối cùng, dịch chứa vi sinh vật được hòa với glycerol 25% trong đệm PBS pH 7,0 và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

### Các phương pháp tách chiết DNA metagenome

Các phương pháp tách chiết DNA metagenome sử dụng trong nghiên cứu này được tham khảo từ một số nghiên cứu trên thế giới. Chúng tôi lựa chọn ra năm phương pháp được liệt kê trong Bảng 1. Các phương pháp được tiến hành dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc tác giả. Mỗi phương pháp được thực hiện với mỗi 200  $\mu$ l mẫu dịch dạ cỏ dê và lặp lại ít nhất ba lần.

**Bảng 1.** Các phương pháp tách chiết DNA được sử dụng trong nghiên cứu.

Phương pháp	Tên viết tắt	Ghi chú	Tài liệu tham khảo / Hãng sản xuất
Repeated bead beating plus column	RBBC		(Yu, Morrison, 2004)
Repeated bead beating	RBB	Thực hiện tương tự phương pháp RBBC nhưng không có bước sử dụng cột tinh sạch	
PSP®Spin Stool DNA Kit, protocol 1	PSP1	Theo hướng dẫn protocol 1 của nhà sản xuất	Invitex GmbH, Berlin, Đức
PSP®Spin Stool DNA Kit, protocol 2	PSP2	Theo hướng dẫn protocol 2 của nhà sản xuất	Invitex GmbH, Berlin, Đức
QIAamp® DNA Stool Mini Kit	QIA	Theo hướng dẫn protocol 1 của nhà sản xuất	QIAGEN, Hilden, Đức

### Kiểm tra chất lượng và tính toàn vẹn của DNA metagenome

Nồng độ DNA metagenome tách chiết được từ mỗi phương pháp được kiểm tra bằng máy quang phổ Nanodrop (Implen GmbH, Đức). Độ tinh sạch của DNA được xác định bởi giá trị A260/280 và A260/230. Từng mẫu DNA được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% với DNA chuẩn 1 kb (Fermentas).

### Nhân bội bằng PCR với cặp mồi 16S rDNA vi khuẩn

DNA metagenome của vi khuẩn trong dạ cỏ sau quá trình tách chiết bằng các phương pháp khác nhau được tiến hành khuếch đại gen 16S rDNA bằng cặp mồi 27F (5'-GAGTTTGATCTGGCTCAG-3') và 1527R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Rainey *et al.*, 1996) để đánh giá sự tồn tại của chất ức chế polymerase có trong mẫu. PCR được thực

hiện trên máy Mastercycler® gradient (Eppendorf, Netheler – Hinz GmbH, Hamburg, Đức) với chu trình phản ứng gồm 30 chu kỳ (pha biến tính 94°C, 1 phút; pha gắn mỗi 58°C, 1 phút và pha kéo dài 72°C, 1 phút 30 giây). Sản phẩm PCR sau đó được kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

### Phân tích thống kê

Dữ liệu thu được được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 5. Giá trị thu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại thí nghiệm.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tách chiết DNA metagenome và đánh giá chất lượng của mẫu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 5 phương pháp tách chiết khác nhau để phân lập DNA metagenome từ dịch dạ cỏ dê. Trong đó, phương pháp PSP1, PSP2 và QIA hoàn toàn sử dụng các kit tách DNA thương mại. Phương pháp RBBC dựa trên mô tả của Yu và Morrison (2004) là phương pháp kết hợp phá tế bào bằng hạt thủy tinh trong đệm EDTA chứa muối và SDS và tinh sạch bằng cột QIAgen kit. Ngoài ra, chúng tôi tiến hành song song phương pháp RBB dựa trên phương pháp RBBC nhưng không tiến hành tinh sạch qua cột để so sánh.

Hàm lượng DNA cũng như các chỉ số A260/280 và A260/230 thu được khi sử dụng các phương pháp tách chiết khác nhau được kiểm tra bằng máy Nanodrop (Bảng 2). Nồng độ DNA thu được cao hơn

đáng kể khi tách chiết bằng kit PSP, lần lượt là 149,7 và 195,5 ng/μl cho protocol 1 và 2 và phương pháp RBB là 143,5 ng/μl. Tuy nhiên, đối với DNA tách chiết bằng phương pháp RBB sau đó sử dụng cột tinh sạch QIAgen (RBB+C) nồng độ DNA metagenome đã bị giảm đi hơn hai lần. Yu và Morrison (2004) đã phát triển phương pháp tách chiết RBBC và ứng dụng trên đối tượng là dịch dạ cỏ bò (Yu, Morrison, 2004). Kết quả nghiên cứu của hai tác giả cho thấy phương pháp này có khả năng tách chiết được lượng lớn DNA vi sinh vật vượt trội khi so sánh với hai kit thương mại là QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) và FastDNA® SPIN Kit (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA). Tương tự, kết quả so sánh hiệu quả tách chiết của 15 phương pháp do Henderson và đồng tác giả (2013) thực hiện trên bò và cừu cũng cho thấy nồng độ DNA vi sinh vật dạ cỏ tách chiết bằng phương pháp RBBC cao hơn các phương pháp sử dụng kit (Henderson *et al.*, 2013). Nguyên nhân có thể do trong quá trình xử lý mẫu, chúng tôi đã thực hiện nhiều bước ly tâm phân đoạn nhằm mục đích thu được chủ yếu mẫu vi khuẩn nên lượng DNA thu được không cao như các nghiên cứu này. Như vậy, có lẽ phương pháp xử lý mẫu và đối tượng đã có ảnh hưởng tới nồng độ DNA vi sinh vật tách chiết bằng RBBC. Mặc dù vậy, những nghiên cứu này cũng cho thấy tính ổn định của các kit thương mại khi sử dụng trên các đối tượng khác nhau. Nồng độ DNA tách chiết trực tiếp theo kit QIAgen luôn thấp hơn so với các phương pháp còn lại trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các nghiên cứu đã nêu trên và một số nghiên cứu khác (Chen *et al.*, 2015).

**Bảng 2.** Nồng độ và độ tinh sạch của DNA metagenome sử dụng các phương pháp tách chiết khác nhau.

Phương pháp	Nồng độ DNA metagenome (ng/μl)	A260/280	A260/230
RBBC	61,70 ± 28,84	1,930 ± 0,111	2,097 ± 0,387
RBB	143,5 ± 20,51	1,878 ± 0,011	1,462 ± 0,008
PSP1	149,7 ± 29,94	1,921 ± 0,031	1,832 ± 0,394
PSP2	195,5 ± 98,29	1,893 ± 0,001	1,902 ± 0,020
QIA	55,93 ± 42,34	1,887 ± 0,096	1,797 ± 0,677

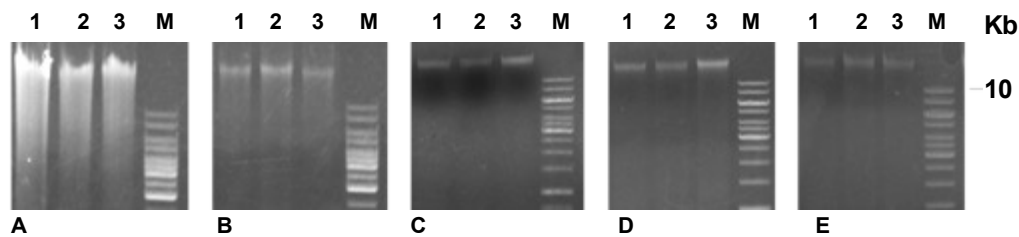
Dịch dạ cỏ của dê cũng như các động vật ăn cỏ khác chứa nhiều tạp chất có nguồn gốc từ thực vật như tannin, saponin, mimosine và nitrate-nitrite (Kamra, 2005). Trong đó, tannin và một số hợp chất chứa nhóm phenol tự do có khả năng ảnh hưởng đến hiệu quả sử dụng DNA tách chiết cho các mục đích sinh học phân tử như PCR, cắt giới hạn và giải trình

tự do ức chế hoạt động của enzyme polymerase và endonuclease (Porebski *et al.*, 1997, Kontanis, Reed, 2006). Do đó, ngoài hàm lượng DNA, chất lượng của DNA tách chiết còn xác định dựa trên các chỉ số A260/230 (xác định sự có mặt của carbohydrate, hợp chất chứa nhóm phenol) và A260/280 (cho protein). DNA được cho là “sạch” nếu chỉ số A260/280 trên

1,8 và A260/230 trên 2,0 (có thể chấp nhận từ 1,5 đến 1,8). Tất cả các phương pháp tách chiết DNA metagenome được sử dụng cho nghiên cứu này đều cho kết quả chỉ số A260/280 trên 1,8. DNA tách chiết cũng đạt tiêu chuẩn về hàm lượng carbohydrate và hợp chất phenol trong mẫu, chỉ có phương pháp RBB cho kết quả A260/230 thấp (1,462). Điều này cho thấy, các phương pháp đều có khả năng loại bỏ protein trong quá trình tách chiết nhưng chỉ phương pháp có sử dụng cột tinh sạch mới có thể loại bỏ đáng kể các hợp chất không mong muốn khác trong mẫu DNA tách chiết từ dạ cỏ dê. Như vậy, DNA tách chiết từ các phương pháp RBBC, sử dụng kit thương mại PSP hoặc QIAgen đều đạt tiêu chuẩn độ tinh sạch ở cả hai chỉ số A260/280 và A260/230.

DNA metagenome sau mỗi lần tách chiết bằng các phương pháp được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 1). Kết quả điện di cho thấy

các thí nghiệm đều thu được các băng có kích thước lớn hơn 10 kb. Riêng DNA tách chiết bằng phương pháp RBB tuy có nồng độ cao nhưng khi điện di kiểm tra cho thấy các vệt DNA kéo dài. Có thể trong quá trình tách chiết, hạt thủy tinh không chỉ phá màng tế bào vi DNA metagenome sau mỗi lần tách chiết bằng các phương pháp được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 1). Kết quả điện di cho thấy các thí nghiệm đều thu được các băng có kích thước lớn hơn 10 kb. Riêng DNA tách chiết bằng phương pháp RBB tuy có nồng độ cao nhưng khi điện di kiểm tra cho thấy các vệt DNA kéo dài. Có thể trong quá trình tách chiết, hạt thủy tinh không chỉ phá màng tế bào vi khuẩn mà còn ảnh hưởng đến DNA giải phóng ra. Sau khi thực hiện đầy đủ quy trình tách chiết RBBC, các vệt DNA không còn nhiều do màng của cột tinh sạch chỉ giữ lại chủ yếu DNA kích thước lớn.



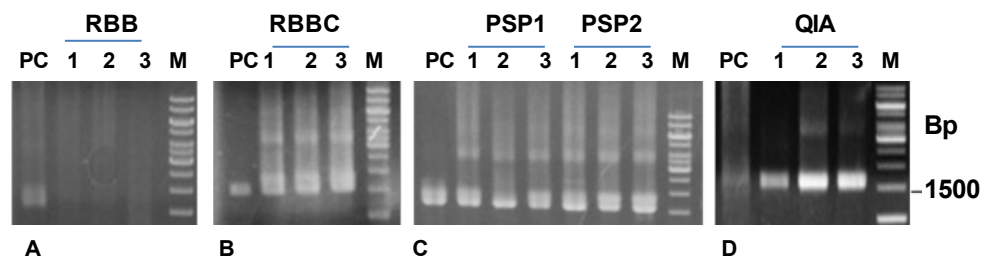
**Hình 1.** So sánh DNA metagenome thu được từ các phương pháp tách chiết khác nhau: (A) RBB, (B) RBBC, (C) PSP1, (D) PSP2 và (E) QIA. 1-3: Ba lần lặp lại thí nghiệm. M: DNA chuẩn 1 Kb (Fermentas)

### **Đánh giá khả năng tồn tại chất ức chế polymerase trong mẫu DNA metagenome**

Để khẳng định chắc chắn DNA thu được có thể sử dụng để giải trình tự phục vụ mục đích khai thác dữ liệu DNA metagenome, chúng tôi tiến hành thực hiện khuếch đại gen mã cho 16S rRNA vi khuẩn bằng PCR với cặp mồi 1527R-27F đối với DNA thu được từ các phương pháp tách chiết sau khi đưa về cùng nồng độ. PCR là phương pháp phổ biến, dễ dàng được sử dụng trong các nghiên cứu để kiểm tra chất lượng DNA có đạt chuẩn cho các ứng dụng phân tử về sau hay không (Tang *et al.*, 2008, Scupham *et al.*, 2007) cũng như phản ứng kéo dài chuỗi được sử dụng trong công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới. PCR mẫu DNA tách chiết cho kết quả dương tính tức là mẫu hầu như không chứa các chất có khả năng ức chế enzyme DNA polymerase hoặc enzyme cắt. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel

agarose tương ứng với dự đoán. Các mẫu tách có hai chỉ số A260/280 và A260/230 đạt tiêu chuẩn, chúng tôi đều quan sát thấy có băng sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1500 bp. Riêng mẫu tách chiết bằng phương pháp RBB sau phản ứng không thu được băng sản phẩm nào. Điều này phản ánh đúng kết quả đo chỉ số A260/230, chúng tôi trong mẫu còn chứa nhiều tạp chất ảnh hưởng tới hiệu quả của PCR.

Tóm lại, các phương pháp đều mang lại hiệu quả tách chiết nhất định. Trong đó, các phương pháp RBBC, PSP1, PSP2 và QIA cho kết quả thu được DNA đạt tiêu chuẩn về độ tinh sạch, có thể sử dụng cho các thí nghiệm về sau như PCR, cắt giới hạn hoặc giải trình tự. Xét về hiệu quả tách chiết, thực hiện phương pháp RBBC cần từ 20 đến 30 phút trong khi sử dụng kit tinh sạch thương mại tốn ít thời gian hơn nhưng hàm lượng DNA thu được tương đương hoặc cao hơn.



**Hình 1.** Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã cho 16S rDNA của các mẫu DNA thu được từ các phương pháp tách chiết khác nhau: (A) RBB, (B) RBBC, (C) PSP và (E) QIA. PC: Đối chứng dương (mẫu DNA tổng số của vi khuẩn *Staphylococcus*). 1-3: Ba lần lặp lại thí nghiệm. M: DNA chuẩn 1 Kb (Fermentas)

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thử nghiệm 5 phương pháp khác nhau là RBB, RBBC, PSP1, PSP2 và QIA để tách chiết DNA metagenome của vi khuẩn dạ cỏ dê. Kết quả cho thấy, tách chiết bằng kit PSP cho sản phẩm DNA có chất lượng đảm bảo cho giải trình tự DNA metagenome bằng hệ thống HiSeq 2000 (Illumina) với chỉ số A260/280 là 1,893; A260/230 là 1,902 và nồng độ cao nhất đạt 195,5 ng/ $\mu$ l.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ về kinh phí của đề tài Độc lập cấp nhà nước mã số ĐTĐLCN.15/14: “Nghiên cứu metagenome của một số hệ sinh thái mini tiềm năng nhằm khai thác các gen mới mã hóa hệ enzyme chuyển hóa hiệu quả lignocellulose” và sử dụng trang thiết bị của phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, viện Công nghệ sinh học, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Berg MME, Yeoman CJ, Chia N, Tringe SG, Angly FE, Edwards RA, Flint HJ, Lamed R, Bayer EA, White BA (2012) Phage–bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environ Microbiol* 14: 207-227.

Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F (2002) Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14250-14255.

Chen YB, Lan DL, Tang C, Yang XN, Li J (2015) Effect of DNA extraction methods on the apparent structure of Yak rumen microbial communities as revealed by 16S rDNA sequencing. *Polish J Microbiol* 64: 29-36.

Cuiv PÓ, De Cárcer DA, Jones M, Klaassens ES, Worthley DL, Whitehall VL, Kang S, Mcsweeney CS, Leggett BA, Morrison M (2011) The effects from DNA extraction methods on the evaluation of microbial diversity

associated with human colonic tissue. *Microb Ecol* 61: 353-362.

Fouts DE, Szpakowski S, Purushe J, Torralba M, Waterman RC, Macneil MD, Alexander LJ, Nelson KE (2012) Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS ONE* 7: e48289.

Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 669-685.

Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH (2013) Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS ONE* 8: e74787.

Hogan M, Schulz M, Slaytor M, Czolij R, O'brien R (1988) Components of termite and protozoal cellulases from the lower termite, *Coptotermes lacteus* froggatt. *Insect Biochem* 18: 45-51.

Kamra D (2005) Rumen microbial ecosystem. *Curr Sci* 89: 124-135.

Kim M, Morrison M, Yu Z (2011) Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol Ecol* 76: 49-63.

Kontanis EJ, Reed FA (2006) Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci* 51: 795-804.

Krsek M, Wellington E (1999) Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Meth* 39: 1-16.

Mcorist AL, Jackson M, Bird AR (2002) A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Meth* 50: 131-139.

Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Reporter* 15: 8-15.

- Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 46: 1088-1092.
- Schloss PD, Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 14: 303-310.
- Scupham A, Jones J, Wesley I (2007) Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *J Appl Microbiol* 102: 401-409.
- Streit WR, Schmitz RA (2004) Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* 7: 492-498.
- Tang JN, Zeng ZG, Wang HN, Yang T, Zhang PJ, Li YL, Zhang AY, Fan WQ, Zhang Y, Yang X (2008) An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *J Microbiol Meth* 75: 432-436.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Sci* 304: 66-74.
- Xu Z, Hansen MA, Hansen LH, Jacquioid S, Sorensen SJ (2014) Bioinformatic approaches reveal metagenomic characterization of soil microbial community. *PLoS ONE* 9: e93445.
- Yu Z, Morrison M (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36: 808-813.

## INVESTIGATION OF METHODS FOR EXTRACTION OF BACTERIAL DNA METAGENOME FROM GOAT RUMEN

Le Ngọc Giang<sup>1</sup>, Luu Han Ly<sup>2</sup>, Nguyen Mai Phuong<sup>1</sup>, Le Tung Lam<sup>1</sup>, Do Thi Huyen<sup>1</sup>, Phung Thu Nguyet<sup>1</sup>, Truong Nam Hai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Hanoi University of Science, Vietnam National University*

### SUMMARY

Microorganisms, particularly bacteria, in the ruminant's rumen are valuable genetic resources that many scientists interested in. In recent years, the application of next-generation sequencing technologies allows direct decoding an extracted DNA metagenome in each ecological community without culture, increasing the efficiency of exploiting interested genes. Notably, the quantity and quality of extracted DNA play an important role in getting a reliable metagenome database. In this study, DNA metagenome from goat rumen fluid was extracted by five different methods RBB (repeated bead beating plus column), RBBC (repeated bead beating), PSP1, PSP2 (PSP®Spin Stool DNA Kit, protocol 1, 2, Germany) và QIA (QIAamp® DNA Stool Mini Kit, Germany). The results showed that DNA metagenome obtained by all methods had A260/280 greater than 1.8. DNA extracted by the RBB method had high DNA concentration but low A260/230 values (less than 1.4) and still contained Taq polymerase inhibitor. After purifying by QIA column, A260/230 values of RBB-extracted DNA significantly increased up to 2.0 and Taq polymerase inhibitor in samples were removed. However, the concentrations decreased by 57% that nearly equivalent to concentration of DNA metagenome obtained by QIA. The method using PSP®Spin Stool DNA kit produced the highest DNA concentrations (from 149.7 to 195.5 ng/μl) with A260/280 ratios of 1.9 and A260/230 ratios of 1.8 to 1.9. Moreover, this method was able to remove polymerase inhibitor and be performed on short time. Therefore, the PSP®Spin Stool DNA kit is a suitable method for DNA metagenome extraction of bacteria from goat rumen. DNA obtained by this method fulfilled all criteria about quality and concentration for sequencing by next-generation sequencing Illumina.

**Keywords:** *bacteria, concentration, DNA metagenome, goat rumen, polymerase inhibitor*