

微生物组研究解决方案



1 微生物组测序研究策略

微生物存在于人体、植物、土壤、海洋等各种环境中,特定环境中所有微生物种类及其遗传信息和功能的集合被称为微生物组。当前微生物组学已被广泛应用医学研究、农业育种、食品加工、环境处理等领域。在医学研究领域,微生物组被称为“人体第二基因组”^[1]。特别是肠道菌群对宿主很多重要生理功能的维护和发挥起着非常重要的作用,与人体健康息息相关,已经成为近年来的研究热点^[2]。



微生物组学广泛应用于各研究领域

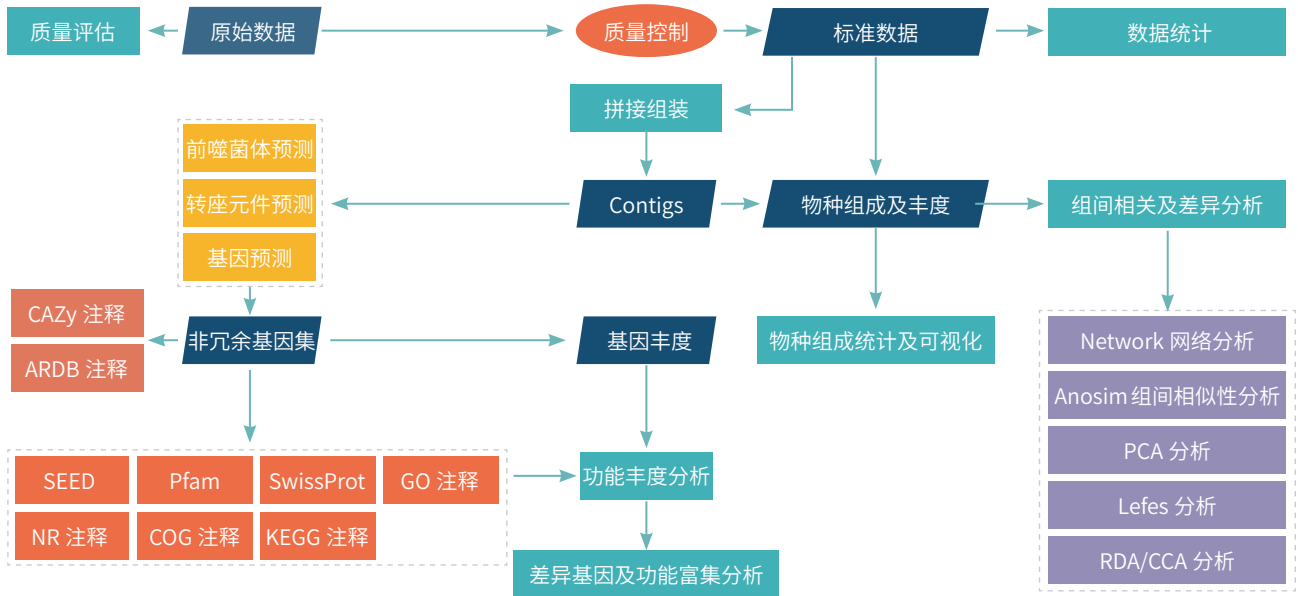
微生物组高通量测序技术的出现,使得我们无需分离培养单个微生物,即可对来自特定环境的微生物群落展开全局研究,宏基因组测序技术、16S rDNA 区段测序技术及 16S rDNA 全长测序技术可以一次性完成多个样本的平行测序,对微生物的物种组成、种群结构、进化关系、功能基因组、差异基因等进行分析。

宏基因组测序和 16S rDNA 测序各自特点

项目	宏基因组测序	16S rDNA 区段测序	16S rDNA 全长测序
检测区域	检测全基因组 DNA 序列	检测 16S 高变区域,通常为 V3+V4	检测 16S 区域全长
鉴定深度	种水平	属水平	种水平
研究目的	除能实现 16S rDNA 研究目的外,还可进行功能基因组分析、样品间基因差异、研究物种间代谢网络等	研究群落结构、丰度、多样性、进化关系以及群落差异等	研究群落结构、丰度、多样性进化关系以及群落差异等(分类和定量更准)
成本	高	低	较低

2 宏基因组测序

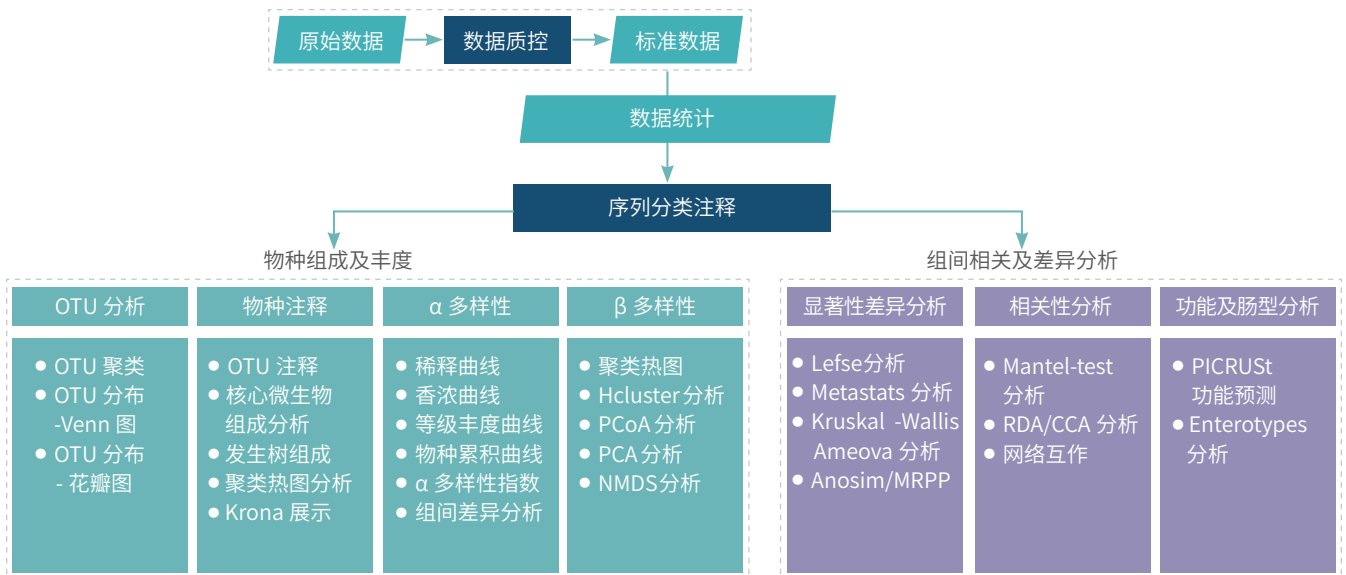
宏基因组是指某一特定环境中全部微生物的遗传物质总和。宏基因组测序可以测定特定环境中所有的微生物尤其是难于培养微生物的基因组，进行序列测定和功能基因挖掘，研究新的具有特定功能的基因。目前宏基因组数据的分析主要包括质量控制、基因组拼接组装、功能基因预测、基因功能注释和微生物群落组成等分析。



宏基因组测序分析流程

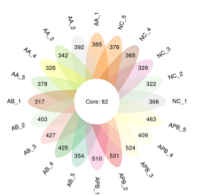
3 16S rDNA 区段及全长测序

细菌 16S rDNA 全长约 1540bp，包含 10 个保守区和 9 个高变区 (V1-V9)，其中保守区在细菌间差别不大，高变区具有高度特异性，因此可通过对 16S rDNA 全长区域或某些高变区域进行测序来分析细菌群落多样性，其中基于 16S rDNA 全长序列的分析能鉴定种水平，分类和定量也更准确。分析服务平台分为两大部分：基本分析和模块分析。其中模块分析可根据需求对要研究的样品分组，进行物种组成分析、alpha 多样性分析、beta 多样性分析和差异分析。

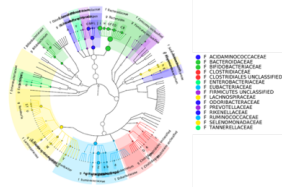


16S rDNA 区段及全长测序分析流程

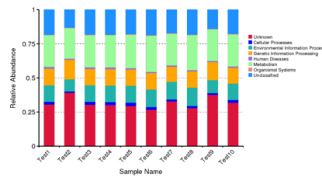
4 数据分析结果展示（部分）



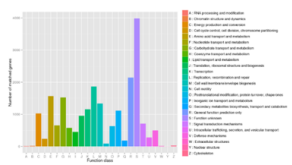
OUT 分布花瓣图



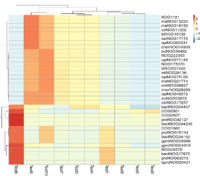
物种组成树状图



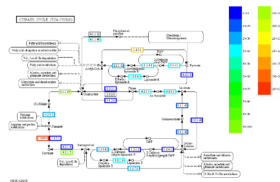
物种 / 功能丰度分布示意图



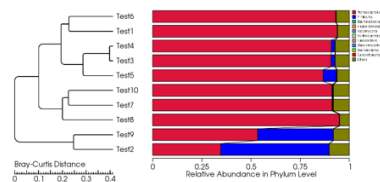
功能基因数目统计示意图



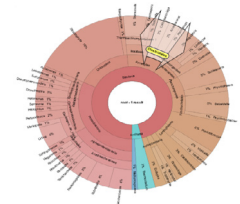
物种 / 功能聚类热图示例



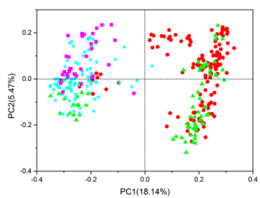
代谢通路示意图



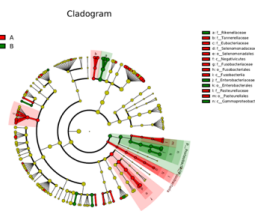
基于物种的样品聚类树



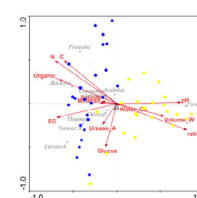
Krona 物种组成展示



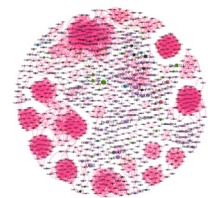
PCA/PCoA 示意图



LEfSe 分析进化分歧图



属水平 RDA 分析



Network 图

5 博奥晶典微生物组测序优势

产品覆盖全

可开展宏基因组测序、16S rDNA 区段测序、16S rDNA 全长测序，另外还可开展转录组、蛋白组和代谢组学研究，便于整体实验设计和数据整合，可进行多组学关联分析

平台优势

博奥拥有 Illumina Novaseq 测序平台，能够更好保证测序数据质量和产品性价比

质量保证

2019 年，博奥晶典满分通过国家卫生健康委临床检验中心举办的全国室内质量评价预研活动，能够提供高质量实验结果数据



6 微生物组测序应用案例

6.1 Nature Medicine (IF=30.641)：移植粪便菌群延长早衰小鼠的健康和寿命^[3]

使用技术

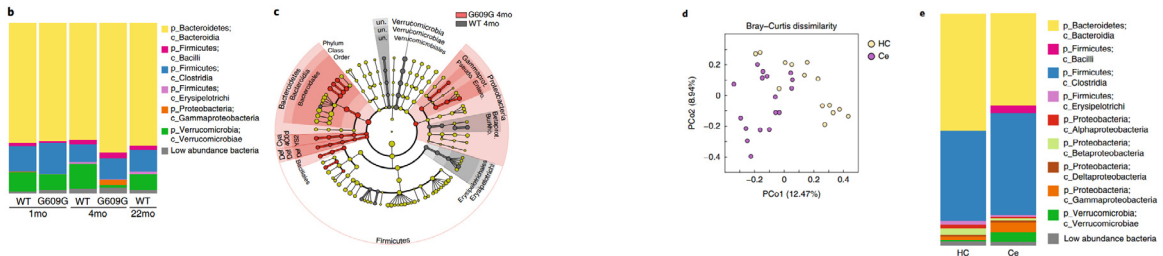
16S rDNA 区段测序 (V3-V4)，Illumina MiSeq 平台

研究样本

2 种小鼠早衰模型，5 个早衰家系，17 位长寿者，14 个健康成年人

主要结论

- 两种不同的早衰小鼠模型都有肠道生态失调的特征，与人类早衰症患者的肠道菌群生态失调结果类似
- 移植健康小鼠的肠道菌群给早衰症小鼠，改善了早衰症小鼠的健康状况和寿命，并且单独移植 *Verrucomicrobia* 菌也可以改善早衰症小鼠寿命
- 肠道菌群的治疗性干预可能延长健康寿命甚至是提高寿命年限

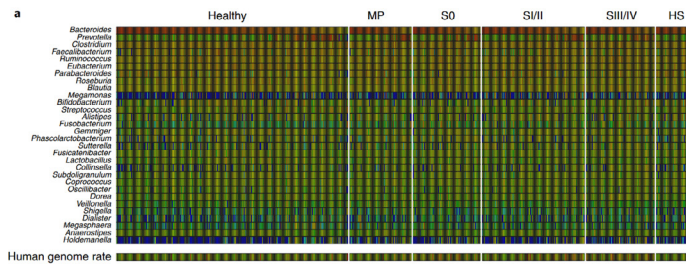


4月龄早衰小鼠的肠道菌群图谱与野生型显著不同

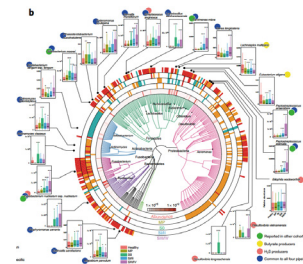
百岁老人与健康对照相比肠道菌群结构存在差异

6.2 Nature Medicine (IF=30.641) : 结肠直肠癌肠道微生物群特征研究^[4]

使用技术	宏基因组测序, Illumina HiSeq2500 平台
研究样本	616 份粪便样本, 包括健康对照 251 份、多发息肉样腺瘤伴低级增生异常 67 份、黏膜内癌 73 份、I/II 期 CRC 111 份、III/IV 期 CRC 74 份、检查正常但有结直肠癌手术史 40 份
主要结论	<p>a. 揭示了结肠直肠癌不同阶段肠道微生物组的具体变化</p> <p>b. 发现特定肠道微生物的增加可能与结肠直肠癌相关恶性肿瘤密切相关, 如黏膜内癌和息肉样腺瘤</p> <p>c. 特定的宏基因组和代谢组学标志物可以帮助区分结肠直肠癌病例和健康样本</p> <p>d. 大队列组学数据进一步表明, 微生物组和代谢组的变化发生于结直肠癌发展的早期阶段, 或具有重要的病因和诊断意义</p>



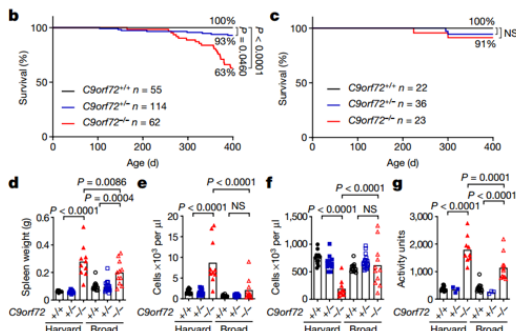
粪便样本中宏基因组特征



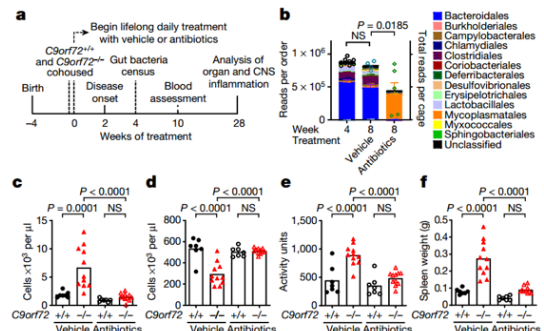
CRC 不同阶段特异性分类和代谢组学特征

6.3 Nature (IF=43.07) : C9orf72 通过抑制肠道菌群引起的全身性神经炎症^[5]

使用技术	16S rDNA 区段测序 (V3-V4), Illumina 平台
研究样本	<i>C9orf72</i> 缺陷的模型小鼠 (模拟额颞叶痴呆的神经退行性疾病) 及正常小鼠, 分别在哈佛大学生物研究设施 (H 组) 和麻省理工的新设施 (B 组) 中饲养
主要结论	<p>a. <i>C9orf72</i> 缺陷小鼠在不同环境 (H 和 B) 饲养时, H 组寿命更短, 免疫反应增强</p> <p>b. H 组 <i>C9orf72</i> 缺陷小鼠的菌群多样性较低, 部分微生物的丰度也不同, 其粪便的免疫刺激性更强</p> <p>c. 抗生素能预防和抑制 H 组 <i>C9orf72</i> 缺陷小鼠的炎症和自身免疫表型, 移植 B 组 <i>C9orf72</i> 缺陷小鼠粪菌也能达到类似效果</p> <p>d. 肠道菌群可调节外周免疫细胞对脊髓的浸润和小神经胶质活化, 从而影响 <i>C9orf72</i> 缺陷小鼠的神经炎症</p>



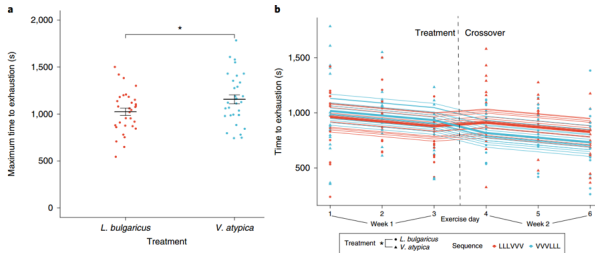
不同饲养环境下小鼠生存期、炎症和自身免疫指标差异



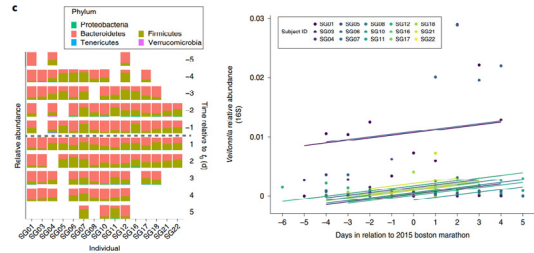
小鼠肠道菌群的终生抑制可防止炎症和自身免疫

6.4 Nature Medicine (IF=30.641) : 肠道微生物组与优秀运动员的表现相关 [6]

使用技术	16S rDNA 区段测序 (V4) , Illumina MiSeq 平台; 宏基因组测序, Illumina HiSeq2500 平台
研究样本	运动员 15 例和不运动对照 10 例, 比赛前一周到比赛结束后一周, 连续取 209 份样品, 采用 16S rDNA 区段测序; 验证采用运动员 87 例, 宏基因组测序
主要结论	a. 马拉松运动员在运动后韦永氏球菌属 (<i>Veillonella</i>) 相关菌群丰度明显增加 b. 将 <i>Veillonella</i> 菌株移植到小鼠体内后, 小鼠的跑步时间明显增加 c. 机制研究表明, <i>Veillonella</i> 通过将运动诱导的乳酸代谢转化为丙酸提高运动表现



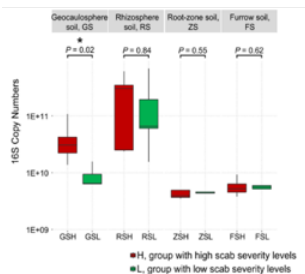
灌胃改善小鼠跑步机的运动时间



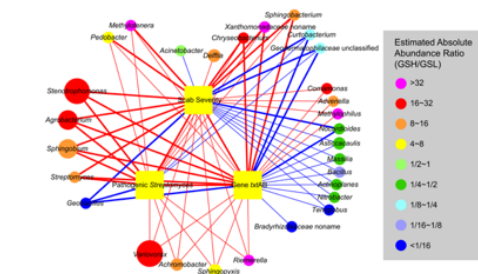
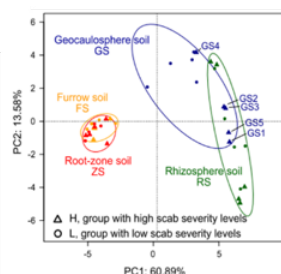
肠道 *Veillonella* 菌丰度与马拉松运动显著相关

6.5 Microbiome (IF=10.465) : 马铃薯疮痂病发生与微生物群落组成有关 [7]

使用技术	16S rDNA 区段测序 (V3-V4) , Illumina MiSeq 平台; 宏基因组测序, Illumina HiSeq2500 平台
研究样本	病情严重组 5 株, 病情轻微组 5 株, 每株采集薯表土、根际土、根区土、垄沟土 4 个区域的土壤样本。
主要结论	a. 16S 测序发现病情轻微组薯表土病原菌和细菌丰度较低、细菌多样性较高、菌群共存网络较复杂 b. 相关性分析揭示贪食菌、寡养单胞菌和农杆菌等与疮痂病显著正相关, 地芽孢杆菌、短杆菌和地嗜皮菌与疮痂病显著负相关 c. 宏基因组测序发现一些抗生素合成相关代谢途径显著富集在发病轻薯表土中



不同土壤样本中微生物菌群差异分析



细菌绝对丰度与病害严重程度等因素之间的网络互作

参考文献

- [1] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans[J]. *Cell*, 2016, 164(3): 337-340.
- [2] Goldszmid R S, Trinchieri G. The price of immunity[J]. *Nature immunology*, 2012, 13(10): 932.
- [3] Barcena C, Valdés-Mas R, Mayoral P, et al. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice[J]. *Nature medicine*, 2019, 25: 1234-1242.
- [4] Yachida S, Mizutani S, Shiroma H, et al. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer[J]. *Nature medicine*, 2019, 25: 968-976.
- [5] Burberry A, Wells M F, Limone F, et al. *C9orf72* suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria[J]. *Nature*, 2020, 1-6.
- [6] Scheiman J, Lubert J M, Chavkin T A, et al. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism[J]. *Nature Medicine*. 2019, 25(7): 1104 - 1109.
- [7] Shi W, Li M, Wei G, et al. The occurrence of potato common scab correlates with the community composition and function of the geocaulosphere soil microbiome[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1), 1-18.

奥晶典控股成员



京博奥晶典生物技术有限公司

北京市经济技术开发区科创六街生物医药园 C 座 邮编: 101111 电话: 010-69002900 传真: 010-69002988 客服: 400-9968-999
//www.capitalbiotech.com

