

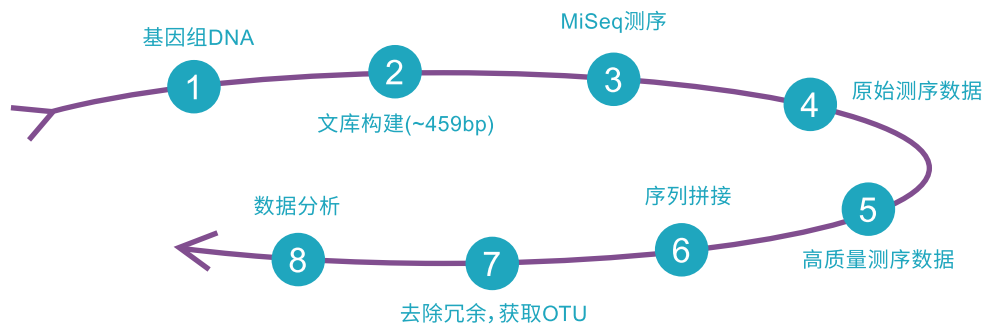
# 16S rDNA 测序解决方案

16S rDNA测序即16S测序,利用高通量测序技术检测特定环境下的微生物(主要是细菌),结合生物信息学分析,提供环境样本物种分类、物种丰度、种群结构、系统进化等诸多信息。16S rDNA是细菌基因组中编码核糖体16S rRNA分子对应的DNA序列,由9个高变区(V)组成,中间穿插着保守区。对于不同环境样品的DNA,扩增其中16S rDNA中V3-V4区片段,可以区分鉴定绝大多数细菌,是最常用的细菌分类标准。

## 锐博技术特色

- 超低建库起始量,无偏差覆盖低丰度物种
- 拼接效果好,准确高效鉴定物种
- 自主研发分析方法,轻松实现样品菌群组成、组间差异和系统进化分析

## 项目流程



## 数据分析

### 标准信息分析

- |               |                  |
|---------------|------------------|
| 数据质量评估及QC     | Beta多样性分析        |
| 序列拼接          | 系统进化树分析          |
| 去除嵌合体及短序列分析   | Rank Abundance分析 |
| OTU统计分析及注释    | 样品主坐标分析(PCoA)    |
| 物种丰度统计及群落组成分析 | 样品主成分分析(PCA)     |
| Alpha多样性分析    |                  |

### 高级信息分析

- 样品非加权配对平均法聚类分析(UPGMA)
- 组间显著性差异分析
- RDA/CCA分析
- 非度量多维尺度分析(NMDS)

## 生物信息软件分析

分析内容	分析软件
数据质控	Trimmomatic
Tags拼接	Flash, mothur
OTU生成及共聚焦分析	Qiime, uclust, 内部程序 (R)
去除chimera	chimeraslayer
物种注释及丰度统计	Qiime, pynast, biom-format, RDP

分析内容	分析软件
系统进化分析	Qiime, pynast, Fasttree
Alpha多样性	Qiime, 内部程序 (R)
Beta多样性	Qiime, Unifrac, 内部程序 (R)
PCA	Qiime, 内部程序 (R)
RDA/CCA分析	内部程序 (R)

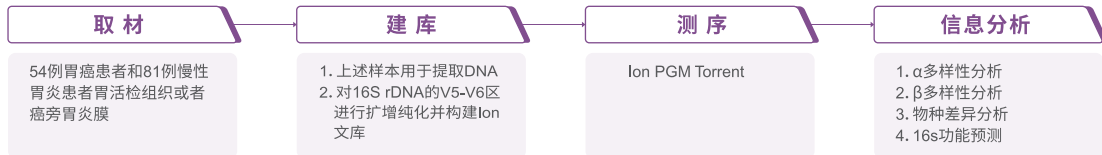
推荐测序模式: MiSeq, PE250 >0.05M clean data

【案例一】胃部菌群群落分析揭示癌症相关的菌群失调

【研究背景】

胃癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一，幽门螺旋杆菌是引起胃癌的主要原因。但幽门螺杆菌根除实验发现成功消除该菌也并不能完全防止胃癌的发展，表明有其他因素促进胃粘膜炎症和胃癌的发展。感染慢性幽门螺旋杆菌会使体内酸分泌的减少，导致胃部菌群生长异常和高水平的胃亚硝酸盐和N-亚硝胺，并进一步促进恶性肿瘤形成。然而胃部微生物群体与慢性胃炎和胃癌之间的关系仍有待确定。

【方法流程】



【研究结果】

(1) 慢性胃炎和胃癌患者的胃部菌群的差异性

通过分析α多样性，发现胃癌患者与慢性胃炎患者相比微生物多样性显著降低。ANOSIM相似性分析发现胃癌患者的微生物组成与慢性胃炎患者有显著性差异。

(2) 慢性胃炎和胃癌患者对菌群中幽门螺杆菌的影响

胃癌患者中放线菌和厚壁菌门表达丰度增高，拟杆菌门和梭杆菌门表达丰度显著降低；且变形菌门中的幽门螺杆菌属与非幽门螺杆菌变形杆菌呈现出明显的负相关。此外，螺杆菌和非螺杆菌变形杆菌的表达丰度可以用来区分胃癌和慢性胃炎患者。

(3) 胃癌相关的特定菌群

分析发现胃癌和慢性胃炎中有显著差异的菌群。胃癌

中的柠檬酸杆菌属、红球菌属、乳酸杆菌属和叶杆菌属显著富集，而缺乏幽门螺杆菌属和奈瑟氏菌属。胃癌患者胃菌群具有更高的菌群失调指数 (MDI)；且MDI与α多样性呈负相关，与β多样性呈正相关。表明胃癌胃部菌群具有高度的生态失调，与其细菌多样性降低一致。此外，MDI可以用来区分慢性胃炎和胃癌。

(4) 胃部菌群主要为亚硝化细菌

研究发现所有胃癌微生物菌群的硝酸还原酶功能增强，其可促进硝酸盐还原成亚硝酸盐；且亚硝酸盐还原酶可促进亚硝酸盐还原成一氧化氮。微生物群落功能特征分析与癌症中存在亚硝化微生物群体相一致。

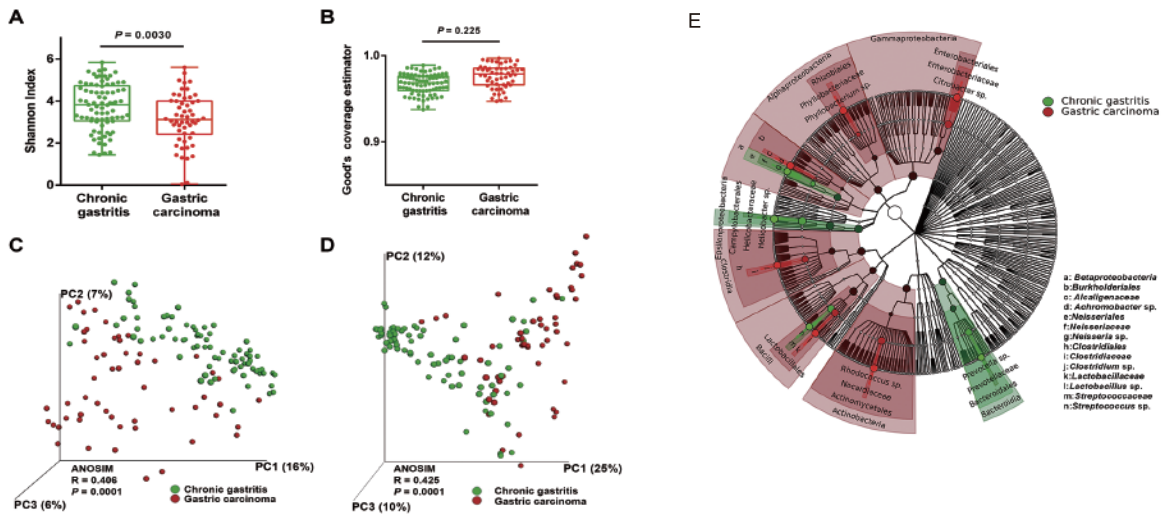


图1. ABCD. 慢性胃炎和胃癌的胃微生物群落差异  
E. 慢性胃炎和胃癌相关的胃微生物群落

【参考文献】

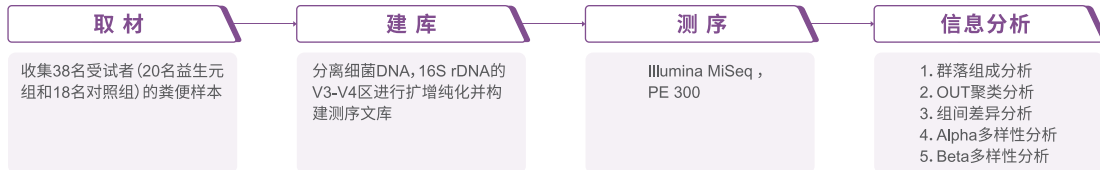
Ferreira R M, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota[J]. *Gut*, 2017: gutjnl-2017-314205. IF: 16.658

## 【案例二】益生元可减少超重或肥胖儿童的体脂和改变肠道微生物群

### 【研究背景】

可以利用益生元或其他药剂来控制肠道菌群，以预防或治疗肥胖症。然而，对于益生元在超重/肥胖或降低体重的儿童中特异性修饰肠道菌群的能力知之甚少。本研究进行了一项随机对照试验，以研究益生元对身体成分、炎症标志物、粪便样品中胆汁酸以及超重或肥胖儿童肠道菌群组成的影响。

### 【方法流程】



### 【研究结果】

#### (1) 益生元改善人体测量和身体组成

与对照相比，益生元的摄入减缓了体重z-score增加。OI (oligofructose-enriched inulin) 处理组的总体脂肪百分比显著低于对照组。两组的瘦体重都有显著提高。区域身体脂肪评估显示，益生元组内躯干脂肪百分比显著降低且组间差异显著。此外，益生元组中的男性脂肪百分比趋于降低。

#### (2) 益生元引起全身性炎症的边缘改变

益生元组和对照组的血清炎症分布及血清Creactive蛋白变化均没有显著差异。组间分析显示OI显著降低白细胞介素(IL)-6水平，而对对照则增加IL-6水平。随着OI摄入量的增加，LPS有减少的趋势(1.9×)；而对对照中，LPS则增加(1.4×)。

#### (3) 粪便胆汁酸

初级粪便胆汁酸(FBAs)、胆酸(CA)和鹅去氧胆酸(CDCA)在OI和对照组之间有显著差异。对照组中初级FBAs显著增加，处理组内/次的次级FBAs没有显著变化。随着时间的推移，对照组中CDCA占总FBAs(CDCA%)的百分比显著增加，而组间差异在对照组和OI组之间的比例较高。

#### (4) 肠道微生物变化的特征

定量PCR显示与对照相比，OI组中双歧杆菌属物种明显增加。16S rDNA测序结果显示，在使用OI的组中，双歧杆菌属的种类显著增加，普通拟杆菌属的种类减少。粪便样品中，在16周的研究期间，对照组中的初级胆汁酸水平增加，而OI组中的胆汁酸水平没有增加。

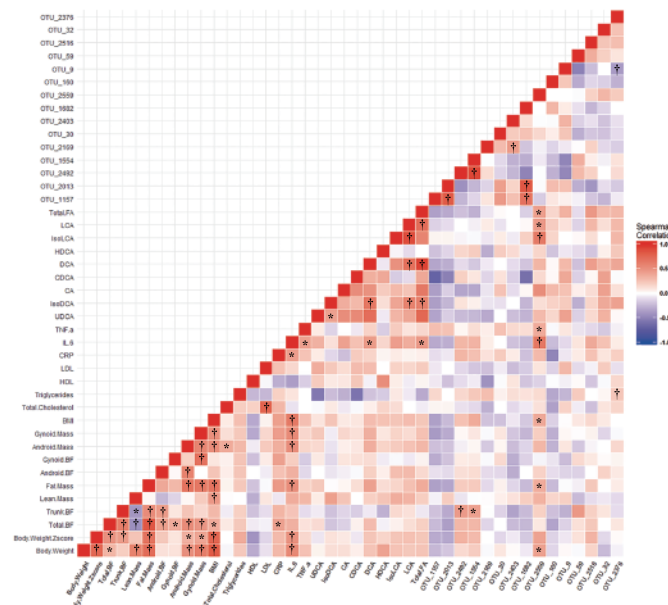


图2. 生物学与肠道微生物结果之间的Spearman等级相关性热图

### 【参考文献】

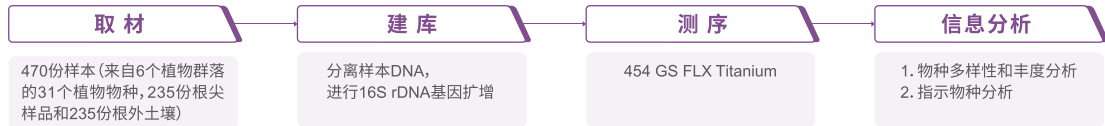
Nicolucci AC, Hume MP, Martínez I, *et al.* Prebiotics Reduce Body Fat and Alter Intestinal Microbiota in Children Who Are Overweight or With Obesity[J]. *Gastroenterology*, 2017. IF: 18.392

## 【案例三】16S测序发现年代序列热带土壤植物的核心根部微生物

### 【研究背景】

对植物根部微生物的非培养调查表明，土壤类型通常比宿主类型对微生物群落有更强的影响。本文的研究选择了位于昆士兰大桑迪国家公园几个年代序列土壤，研究了代表不同森林演替阶段的多个群落，包括多种植物门类：石松、蕨类、裸子植物、被子植物。

### 【方法流程】



### 【研究结果】

#### (1) 年代序列土壤化学性质差异

所研究的年代序列土壤的酸碱度介于4.1-4.6, 而化学元素的差别较大。较新的土壤有更高含量的金属元素, 雨林土壤有更高的碳、氮、钙、磷、硫元素, 雨林区的微生物多样性也是最高的。

#### (2) $\alpha$ 多样性

对于根外土壤,  $\alpha$ 多样性的指标表明雨林土壤的微生物多样性最高, 而物种的丰度(观测丰度和估计丰度chao1)在所有样本基本相同。分析根尖5cm范围内的微生物组成, 发现根部的物种丰度和多样性均低于根外土壤。

#### (3) 核心根部微生物

STAMP和mixOmics分析获得的核心物种OTU分别有369、302、30个。基于相对丰度分析, 核心OTU占了根部微生物群落的33.2%。其中一些是已知研究较多的植物相关属, 如 *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, 另外一些是尚未命名的物种 *WPS-2*, *Ellin329*, *FW68*。通过对多个国家的研究数据交叉比对, 发现 *Streptomyces*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Rubrivivax* 在多个研究中都有存在, 说明这些可能是全球性的重要根部相关微生物。

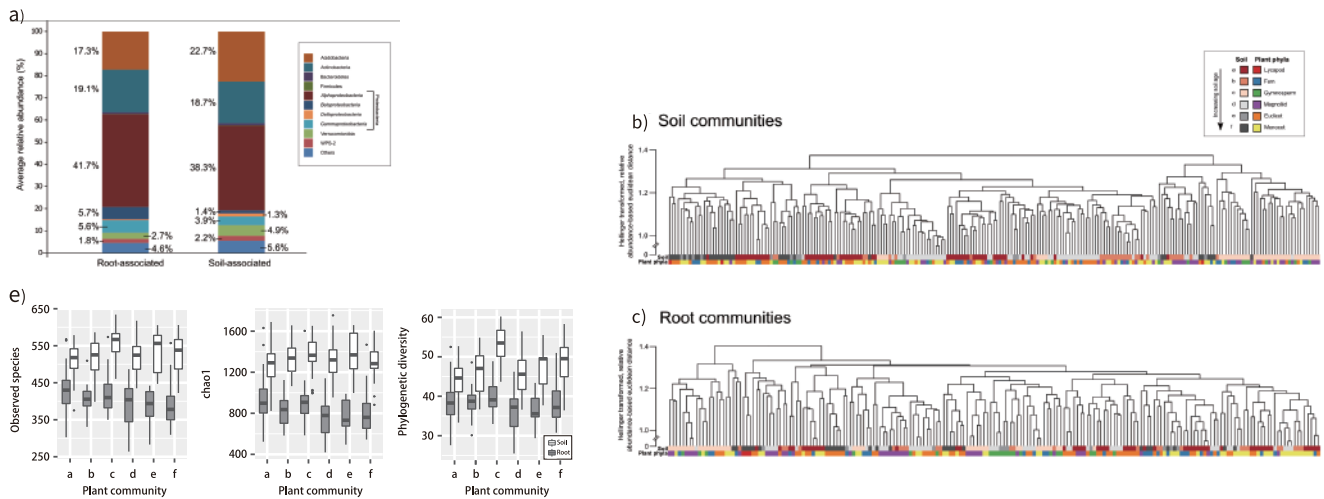


图3.a. 根部和根外土壤群落OTUs的相对丰度分布  
bce. 根部和根外土壤微生物群落的Alpha多样性指标

### 【参考文献】

Yeoh Y K, Dennis P G, Paungfoo-Lonhienne C, *et al.* Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence[J]. *Nature communications*, 2017, 8(1): 215. IF: 12.124

