

· 微生物组测序与分析专题 ·

朱宝利 中国科学院微生物研究所研究员，中国科学院大学医学院岗位教授，博士生导师，国家973项目首席科学家，病原微生物耐药与耐药基因组学北京市重点实验室主任，中国生物工程学会微生物组学与技术专业委员会主任，《生物工程学报》编委。主要从事病原微生物基因组学、人体肠道微生物组学和免疫基因组学研究。研究成果包括确认细菌耐药谱与农用抗生素使用相关及MCR-1耐药基因在全球范围内的分布和传播状态等。



2020 微生物组测序与分析专题序言

段云峰，朱宝利

中国科学院微生物研究所，北京 100101

段云峰，朱宝利. 2020 微生物组测序与分析专题序言. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2511–2515.

Duan YF, Zhu BL. Preface for microbiome sequencing and analysis. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2511–2515.

摘要: 微生物是人体、动植物、土壤、沉积物、水体、空气等生境中最重要的生命体。对这些生境中微生物的分析已经成为一项基础的研究技术。微生物组测序与分析作为近年来快速发展的技术，已经在人类健康、环境污染治理、食品工业以及农牧业等领域得到了广泛应用。为了梳理和总结微生物组测序与分析技术的现状、发展状况和应用前景，本专题收录了 16 篇本领域的论文，分别从样本保存和处理、单菌基因组测序与分析、特殊生境中的微生物组特征分析、微生物组相关数据库和算法以及微生物组测序与分析专家共识等方面，详细介绍了微生物组测序与分析领域的发展态势，为推动我国微生物组测序与分析产业和科研的快速发展、促进微生物组相关产业的良性发展提供必要的参考。

关键词: 微生物，微生物组，基因测序，元基因组，16S rRNA，扩增子测序

Preface for microbiome sequencing and analysis

Yunfeng Duan, and Baoli Zhu

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Microbes are the most important commensal organisms in humans, animals and plants, and are the major inhabitants in soil, sediment, water, air and other habitats. The analysis of microbiome in these habitats has become a basic research technique. As a fast developing technology in recent years, microbiome sequencing and analysis have been widely used in human health, environmental pollution control, food industry, agriculture and animal husbandry and other fields. In order to

Received: December 17, 2020

Corresponding author: Baoli Zhu. Tel: +86-10-64807433; E-mail: baolizhu@im.ac.cn

sort out and summarize the current status, development and application prospects of microbiome sequencing and analysis technologies, this special issue has prepared a collection of 16 papers in this field, that comprise sample preservation and processing, single microbe genome sequencing and analysis, and microbiome feature analysis in special habitats, microbiome related databases and algorithms, and microbiome sequencing and analysis expert consensus. It also introduced in detail the development trend of the microbiome sequencing and analysis, in order to promote the rapid development of the microbiome sequencing and analysis industry and scientific research in China, and provide necessary reference for the healthy development of related industries.

Keywords: microbes, microbiome, gene sequencing, metagenome, 16S rRNA, amplicon sequencing

微生物组学 (Microbiomics) 是近年来发展十分迅速的学科。微生物组 (Microbiome) 是指一个特定生境中的全部微生物及其遗传信息,其研究的对象是微生物的群体,包含物种鉴定、功能基因鉴定等,通过对微生物基因测序与分析研究微生物多样性、种群结构、进化关系以及与环境之间的相互关系^[1-3]。

微生物组研究涉及领域非常广泛,其中包括人体、动物、植物、土壤、沉积物、水体、空气等可能存在微生物群体。在过去的十几年时间里,微生物组相关的科研和应用持续升温,逐渐成为生命科学、环境科学和医学等领域的焦点,也是全球多个国家争相支持的领域,并发起各自的国家级微生物组计划,进行积极的战略布局。美国分别于 2007 年和 2014 年启动了人类微生物计划 (Human Microbiome Project, HMP) 和人类微生物组整合计划 (Integrated Human Microbiome Project, iHMP)^[4-5]。2008 年,欧盟在 FP7 计划下启动了人类肠道元基因组 (MetaHIT) 计划^[6]。除此之外,各国也在积极进行本领域的标准化建设,2012 年,欧盟的 MetaGenoPolis (MGP) 项目重点关注粪便样本标准化管理,以及元基因组高通量测序、数据挖掘和元基因组功能性研究^[7]。2013 年,美国启动了微生物组质量控制计划 (The Microbiome Quality Control project, MBQC), 目的是推进人类微生物组研究的标准体系建设^[8]。目前中国在微生物组测序与分析的标准化研究工作相对比较滞后。

微生物组学的快速发展离不开新一代高通量

基因测序技术。由于环境中的微生物难以培养,并且具有高度的复杂性,高通量基因测序是目前应用较为广泛的研究技术;随着微生物组学的蓬勃发展以及相关成果的产业化,更突显出对微生物组测序和分析的全流程的规范、统一和标准化的需求。

由于微生物组测序与数据分析缺乏统一的规范与指南,并且国内和国际的相关标准还存在差异,导致标准不一、质控不严、定量不高、结果差异大、结果很难重现、数据统一分析等困难^[9-11]。为了解决技术本身对行业发展造成的困扰,让各界专家、广大科研人员、企业技术人员、医生和医疗健康、生态与环保等行业从业者能够获得最新、全面、权威的技术与工具指导,解答从业者对微生物组测序和数据分析相关新技术的认识、选择和使用等方面存在的疑虑,在借鉴国内外相关指南、标准、规范和发表的权威文献的基础上,由中国生物工程学会和中国科学院微生物研究所牵头编制了“微生物组测序与分析专家共识”。内容涉及微生物样本采集、核酸的提取和质控、保存及建库、基因测序技术与应用管理、生物信息分析、数据质控、分析流程、报告解读、数据存储和安全等各流程,以及参考品、质控品等的选择及测试评估等多个环节。

在此背景下,《生物工程学报》推出了“微生物组测序与分析”专题,不仅集中发布“微生物组测序与分析专家共识”的内容,而且还收录了与之相关本领域内多项研究动态和科研进展。本专题共收录了 16 篇文章,以微生物组测序与分析相关内

容为主线,从样本保存与基因组提取、单菌基因组测序、微生物组测序、扩增子测序、数据库建设、数据分析技术、量化研究等多个方面,展示了微生物组测序与分析领域的研究进展和发展趋势。

在进行微生物组研究过程中,有多种因素会影响到数据质量,特别是样本存储和运输的条件、基因组的提取、核酸的存储等对数据产生的变异大于存储时间和测序方法的变异^[12]。影响微生物 DNA 稳定性的因素可能会导致肠道微生物组成发生重大变化,从而影响研究结果。因此,对粪便样品处理和储存方法研究对于微生物组研究至关重要。在进行标准化和大规模微生物样本采样时,会存在样本数量多、地域分布广、现场采样条件多样、工作量大、运输条件差等多种问题,如果不加注意就会对研究结果产生重大影响。在本专题中,中国科学院微生物研究所朱宝利课题组对比了不同保存液,在不同保存时间后对肠道菌群组成的影响。这项研究为进行大规模微生物样本采集、保存提供了参考,也为标准化的微生物组项目提供了可参考的数据。除此之外,还系统阐明了在微生物组 DNA 的提取过程中混入实验室中的微生物污染可能性,以及对一些极微量元基因组检测,如皮肤、口腔样本等造成的影响。来自中国医学科学院药用植物研究所吴崇明团队与北京量化健康科技有限公司联合研究发现,在生物安全柜和实验室开放环境下分别提取纯水和人皮肤样本后的环境微生物 DNA 定量分析存在明显差异,在实验室开放环境进行 DNA 提取会导致环境微生物 DNA 在结果中的残留,通过元基因组测序方法分析后发现在环境微生物污染导致的 DNA 残留可达 28.9 pg,能够占到极微量样本 DNA 总量的 30%,并且鉴定出样品中掺杂的主要环境微生物种类。

运用高通量基因测序研究人类肠道微生物是普遍的研究方法,目前大多研究使用 16S rRNA 基因进行扩增和分析来研究细菌,但是,对古菌的研究较少。来自昆明理工大学生命科学与技术

学院的李晓然团队选择了一对可以同时扩增细菌和古菌 16S rRNA 基因的引物,通过比较人为干扰肠道微生物前后的群落变化,评估了该引物对分析人类肠道细菌和古菌群落变化的情况,并且证明了优化的引物在检测细菌和古菌方面具有一定优势;来自江南大学生物工程学院的许正宏研究团队,采用类似的引物进行微生物 16S rRNA 扩增子测序分析了浓香型白酒发酵过程酒醅与窖泥中古菌的生物量、群落组成与演替规律,并通过共现性网络分析了古菌与细菌的潜在互作关系。

虽然微生物 16S rRNA 扩增子测序技术被广泛应用于肠道微生物菌群结构和多样性研究,但是,其对样本中物种鉴定的分辨率一般只能到属水平,在实验过程中多种因素还可能对结果产生影响,仍有升级的空间。为解决以上问题,来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所生物信息室和疾病预防控制中心国家重点实验室的张雯研究团队采用随机标签和内参法相结合的方法,开发了一套定量 16S rRNA 扩增子测序方法,将常规的 16S rRNA 编码基因测序结果中的相对丰度转化为绝对定量的拷贝数,有效提高了肠道菌群结构检测的精准性,降低了实验操作对结果的影响,也提高了测序与其他分子生物学方法间的可比性。

在单菌基因组研究方面,高通量基因组测序技术可以对单菌基因组进行较为全面的解析,对了解特殊微生物的基因功能,以及利用基因工程方法对相关基因和代谢途径改造方面都有很好的应用。在工业应用方面,单菌基因组序列的分析可以用于提高特定代谢产物的产量和合成效率,已经成为工业菌种选育的一种重要方式。通过对微生物基因组的测序,可以从分子水平上了解其遗传变异规律、重要代谢途径和调控机制,为基因工程菌的构建提供理论依据。来自上海医药工业研究院的胡海峰团队对去甲基霉素的高产菌株金色链霉菌 *Streptomyces aureofaciens* DM-1 的基因组进行了解析,获得了有效的线性基因组序列,在其基因组中鉴定出 6 431 个基因以及 28 个

次级代谢生物合成基因簇, 为去甲基霉素高产菌株育种提供了研究基础。来自北京化工大学生命科学与技术学院李正军团队对一种海生杆菌属的菌种特征进行基因组分析, 并从碳源利用、聚羟基脂肪酸酯代谢和芳香族化合物降解三个方面对基因组测序数据进行了分析。研究发现, 海生杆菌属具有完整的糖酵解途径和三羧酸循环, 缺乏木糖利用基因。通过基因组测序数据分析加深了对海生杆菌属代谢特征的认识, 提示该菌属在聚羟基脂肪酸酯合成和海洋芳香族污染物治理方面有一定的应用前景。

特定生境中的微生物组与其生存环境之间有着密切联系。目前的研究已经证明, 人体微生物、动物微生物、环境微生物对其天然宿主或生存环境的健康至关重要。肠道菌群不但在动物的能量代谢和抵抗病原体方面起着重要的作用, 还在生长、发育、免疫、繁殖等多个方面发挥重要的功能^[13-15]。

内蒙古民族大学动物科技学院牛化欣团队分析了耳萝卜螺和三旋卷丽螺肠道菌群的多样性, 结果发现这两种螺的肠道菌群结构差异显著。功能预测分析表明, 两种螺肠道菌群功能组成相似, 氨基酸代谢、碳水化合物代谢及膜转运丰度较大。在环境微生物组领域也有类似的研究, 河北省科学院生物研究所黄媛媛团队以枯草芽孢杆菌为试验菌剂, 分析不同施用方式对设施甜瓜土壤微生物多样性及生长的影响, 采用 Illumina Miseq 测序技术测定土壤未培养微生物多样性进行了分析, 结果发现枯草芽孢杆菌具有增加土壤可培养微生物数量、提高土壤微生物多样性、促长增产的作用。来自哈尔滨师范大学生命科学与技术学院崔继哲和卢倩研究团队使用睾丸酮丛毛单胞菌联合羊草检测了修复多环芳烃污染土壤过程中土壤根际微生物的变化, 通过高通量测序技术测定羊草根际土壤细菌群落及多样性后发现, 睾丸酮丛毛单胞菌使羊草根际细菌丰富度、多样性发生改变, 并且提高了羊草根际污染物的降解潜力, 为微生物联合植物修复土壤污染物提供新的微生

物选择。在其他环境微生物组研究方面, 来自中国地质大学(武汉)环境学院的马丽媛团队研究了不同冶金底物对微生物组的影响, 高通量微生物基因组测序和分子生态网络分析技术, 他们发现富硫少铁的能源底物可以使冶金微生物群落更稳定。

微生物组学研究的飞速发展除了需要基因组测序技术之外, 还离不开数据库建设和数据处理算法的开发。随着基因组测序成本的下降, 在未来, 对数据的存储、分析和挖掘等方面的需求和应用会越来越多。在本专题中, 来自中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室的王军团队探讨了病毒组及其在生态位中的潜在作用。他们对病毒组的分离富集方法和数据分析进行了整理与总结, 并列举出部分采用病毒组分离富集方法进行的重要研究, 旨在为相关人员提供参考, 进一步促进病毒组研究领域的发展。此外, 来自天津医科大学免疫学系王荃团队对目前耐药领域的基因数据库进行收集整理, 从数据库类型、数据特征、耐药基因预测模型以及可分析序列的类型等方面对这些数据库进行论述和介绍。对抗金属离子和抗杀菌剂的基因数据库也有所涉及。这篇文章将为如何选择及使用耐药基因数据库提供参考和帮助。

通过微生物组测序与分析技术, 理论上是可以识别出各种生境中的特定微生物的, 尤其是在病原微生物识别方面。然而, 对于此类应用仍存在一些技术难题, 如标准的取样和测序方法、检测流程和质控等。病原元基因组高通量测序技术理论上能够检测几乎所有病原体基因组核酸, 且适用于几乎所有类型的临床样本, 尤其适用于病原不明的疑难感染性疾病的诊断。该技术正逐渐成为实验室常规检测方法的重要补充和不可替代的项目。来自中国食品药品检定研究所王佑春、许四宏团队介绍了病原元基因组高通量测序技术的原理及优势, 以及检测流程和关键质量控制环节, 同时, 他们还探讨了关于该技术的质量评价方法和标准。另外, 来自中国科学院深圳先进技

术研究院的戴磊团队探讨了采用微生物基因组测序与分析技术对复杂微生物群落进行菌株水平的构成分析和功能分析的综述。文中介绍了基于元基因组数据的菌株分析的主流算法,以及菌株分析在基础科研、临床应用等方面的应用价值以及在微生物组研究中的潜在应用和未来的发展方向。

微生物组学与技术不仅是一门新兴学科,还是一门交叉学科,其相关领域包含的内容非常多。这样一个内容庞杂、发展迅速的学科需要多方面的专家、学者和技术人员共同参与才能发展长远。本专题的出版希望能够促进微生物组学与技术在我国持续快速发展,能够为相关从业者提供必要的理论和技术支持,为微生物组测序与分析技术在更多领域的应用提供信息,为本行业的发展提供新的思路,从而吸引更多资源共同推动微生物组学与技术领域的发展,进而能够为疾病的预防和治疗、土壤、水体和空气污染的防治、动植物和农牧业的稳定发展提供必要的支持。由于篇幅和水平的限制,在本专题的内容上难免有疏漏,如有遗漏、不足和不准确之处,希望各位同行和广大读者批评指正。

REFERENCES

- [1] Gilbert JA, Jansson JK, Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biol*, 2014, 12(1): 69.
- [2] Consortium HMP. A framework for human microbiome research. *Nature*, 2012, 486(7402): 215.
- [3] Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 2020, 8(1): 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- [4] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human microbiome project. *Nature*, 2007, 449(7164): 804–810.
- [5] The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The integrative human microbiome project. *Nature*, 2019, 569(7758): 641–648.
- [6] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin JJ, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 2013, 500(7464): 541–546.
- [7] The International Human Microbiome Standards (IHMS) [EB/OL]. (2020-12-17). <http://mgps.eu/standard-operating-procedure/>.
- [8] Sinha R, Abnet CC, White O, et al. The microbiome quality control project: baseline study design and future directions. *Genome Biol*, 2015, 16: 276.
- [9] Sheng FH, Zhou HW. Methods, challenges and opportunities for big data analyses of microbiome. *J South Med Univ*, 2015, 35(7): 931–934 (in Chinese). 盛华芳, 周宏伟. 微生物组学大数据分析方法, 挑战与机遇. *南方医科大学学报*, 2015, 35(7): 931–934.
- [10] Zhu YG, Shen RF, He JZ, et al. China soil microbiome initiative: progress and perspective. *Bull Chin Acad Sci*, 2017, 32(6): 554–565 (in Chinese). 朱永官, 沈仁芳, 贺纪正, 等. 中国土壤微生物组: 进展与展望. *中国科学院院刊*, 2017, 32(6): 554–565.
- [11] Liu SJ, Shi WY, Zhao GP. China microbiome initiative: opportunity and challenges. *Bull Chin Acad Sci*, 2017, 32(3): 241–250 (in Chinese). 刘双江, 施文元, 赵国屏. 中国微生物组计划: 机遇与挑战. *中国科学院院刊*, 2017, 32(3): 241–250.
- [12] Costea I, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(11): 1069–1076.
- [13] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(4): 227–238.
- [14] Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*, 2011, 12(1): 5–9.
- [15] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189–200.

(本文责编 郝丽芳)