

SZTT/SZGIA

深圳市团体标准

SZTT/SZGIA 2-2016

基于高通量测序的环境微生物检测 第2部分：人粪便微生物宏基因组检测方法

Detection of environmental microorganisms based on high-throughput sequencing
Part 2: Methodology of detecting human fecal microbiota using metagenomic
sequencing

2017-1-20 发布

2017-1-21 实施

深圳基因产学研资联盟 发布

前 言

本部分编写格式遵循了 GB/T 1.1-2009 给出的规则编写。

SZTT/SZGIA 1-2016 《基于高通量测序的环境微生物检测》分为三个部分：

——第1部分：基本规程

——第2部分：人粪便微生物宏基因组检测方法

——第3部分：人肠道微生物16s检测

本部分为SZTT/SZGIA 1-2016 的第2部分。

本部分由深圳基因产学研资联盟提出并归口。

本部分负责起草单位：深圳华大基因研究院、蓝色彩虹（深圳）科技有限公司、深圳华大基因科技有限公司、南方医科大学、深圳龙岗区妇幼保健院、深圳市谱元基因研究院、深圳弘睿康生物科技有限公司、深圳市微健康基因研究院、华大精准营养（深圳）科技有限公司、深圳市恒创基因科技有限公司、上海凡迪生物科技有限公司。

本部分主要起草人：陈冰、李俊桦、蒋慧、罗佳波、谭晓梅、范钦、罗兰、魏凤香、刘靓、李陶莎、谢强、杜佳婷、李倩一、李岱怡、覃俊杰、胡鹏、马振华、戴文魁、李骏、陈蕾。

本部分为首次发布。

基于高通量测序的环境微生物检测 第2部分：人粪便微生物宏基因组检测方法

1 范围

本部分为《基于高通量测序的环境微生物检测》第2部分，规定了采用高通量测序技术进行人粪便微生物宏基因组检测的方法，包括样品的采集、保存，实验室工作程序，样品处理程序及质量控制、测序数据质量控制。

本部分适用于利用宏基因组学方法进行人粪便微生物检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 19495.2-2004 转基因产品检测实验室技术要求

GB/T 19495.3-2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR检测方法

SNT 2497.21-2010 进出口危险化学品安全试验方法 第21部分：琼脂糖凝胶电泳试验

SZTT/SZGIA 1-2016 基于高通量测序的环境微生物检测 第1部分：基本规程

3 术语和定义

3.1

宏基因组 metagenome

又称元基因组，是指特定环境中全部微小生物遗传物质的总和。

3.2

微生物宏基因组 microbial metagenome

微生物宏基因组是以特定环境中整个微生物群落作为研究对象，无需分离培养，直接提取环境样本中全部微生物的DNA，分析其遗传组成、物种分类、系统进化、基因功能及代谢网络等。

3.3

Q20

测序数据中，质量值大于20的碱基占所有碱基的比例。

注：其中Q指每个碱基对应的质量值，使用GB/T 30989-2014高通量基因测序技术规程 公式进行计算。

3.4

Q30

测序数据中，质量值大于30的碱基占有所有碱基的比例。

注：碱基测序的质量值为30时，表示该碱基的准确率为99.9%。Q30 ≥ 85%，则表示测序数据中85%以上的碱基质量值大于30。

3.5

直接裂解法 direct lysis method

将样品直接悬浮在裂解缓冲液中处理，继而抽提纯化DNA。

3.6

间接提取法 indirect extraction method

先用物理方法将微生物细胞从环境中分离出来，然后采用较温和的方法提取DNA。

4 缩略语

下列缩略语适合于本文件。

DNA——脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。

bp——碱基对(base pair)

5 检测方法

5.1 检测对象

人粪便样品中的微生物。

5.2 检测要求

样品采集应符合国家法律法规及伦理规范。

5.3 样品采集、保存与运输

采样方法应保证样品中微生物群落的准确性。应即刻采样，减少粪便样品暴露于空气中的时间，应不超过10分钟。本部分包括使用粪便杯采集和含稳定液的自采样套装采集两种方法。

5.3.1 粪便杯采集法

5.3.1.1 采集

使用洁净的器皿收集粪便样品，确认器皿中无尿液等其他污染（如图1所示）。排便后即刻使用一次性粪便杯配套取样勺对粪便样品中部取样，将粪便从洁净器皿转移至粪便杯，立刻旋紧盖子（如图2所示）。每个粪便杯中转移至少2 cm³体积大小的粪便样品。

图1 采样器皿示意图



图2 采样过程示意图



5.3.1.2 保存与运输

粪便杯采集粪便样品后，应立即置于干冰或 -80°C 保存。若不能即刻转移，可暂存于 4°C 或 4°C 以下环境（如冰盒），30分钟内转移至干冰或 -80°C 保存。干冰条件下运输。

5.3.2 自采样套装采集法

5.3.2.1 采集

使用洁净的器皿收集粪便，按照自采样套装操作要求取中段粪便，将采集的粪便样品迅速转移至含有稳定剂的保存管中，浸没粪便样品，盖紧管盖。取样品的过程要避免与尿液混合。

5.3.2.2 保存与运输

采样后，可于 15°C – 30°C 常温保存和运输，避免阳光直射。

5.4 检测步骤

5.4.1 实验室条件

- 用于人粪便微生物宏基因组检测的实验室设施和环境应符合 GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求和 GB/T 19495.2-2004 转基因产品检测实验室技术要求的规定。
- 实验室用水应符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法的规定。
- 实验室应按照不同工作内容划分独立区域，并有明显标志。如试剂储备和准备区，样品制备区，扩增区等，各区域间应避免交叉污染。实验室洁净等级应达到 30 万级。

5.4.2 样品接收与处理

- 核对样品编号，记录样品信息，检查样品状态，应无密封不严导致泄漏或者污染等情况，否则该样品废弃，重新采样。准确记录相关信息（可参考附录 A 所示），保证样品的可追溯性。
- 使用稳定高度可重复的方法提取粪便中微生物总 DNA。可用直接裂解法和间接提取法。
- 宜使用相关试剂盒进行提取。

5.4.3 DNA 样品判定标准

- a) 粪便样品提取微生物总 DNA 后，依据 GB/T 19495.3-2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法和 GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法的规定检测 DNA 样品，并按表 1 所示的判定标准来区分其质量。

- b) 常用荧光定量仪检测 DNA 样品浓度，根据 SNT 2497.21-2010 进出口危险化学品安全试验方法第 21 部分：琼脂糖凝胶电泳试的规定执行使用琼脂糖凝胶电泳法 检测 DNA 样品的完整性，DNA 样品完整性判断的标准如下图 3 所示。

表1 DNA 样品质量判断标准

样品类型	检测结果			判定结论
基因组DNA	$m \geq 2.0 \mu\text{g}$	$c \geq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$	无降解	A类
	$1.0 \mu\text{g} \leq m < 2.0 \mu\text{g}$		或轻微降解	B类
	$m < 1.0 \mu\text{g}$	$c \leq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$	中度降解 或重度降解	C类

注：m—总量(total mass)的缩写，此处指DNA总量；

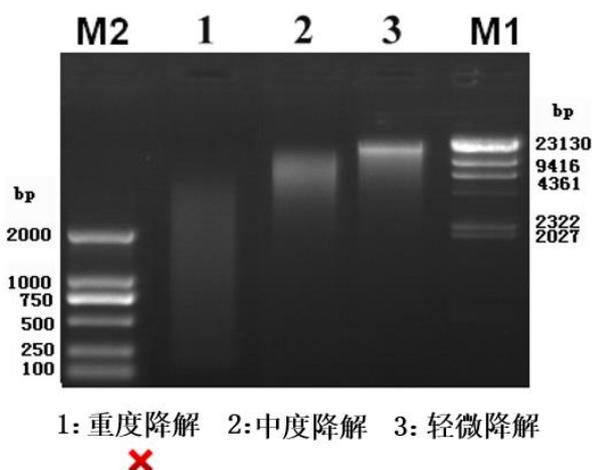
c—浓度(concentration)的缩写，此处指DNA浓度；

A类样品需同时满足 $m \geq 2.0 \mu\text{g}$ ， $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，无降解或轻微降解三个条件，合格；

B类样品需同时满足 $1.0 \mu\text{g} \leq m < 2.0 \mu\text{g}$ ， $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，无降解或轻度降解三个条件，合格；

满足 $m < 1.0 \mu\text{g}$ ， $c \leq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，中度降解或重度降解三个条件其中之一或以上，该样品判为C类，不完全合格。

图 3 基因组 DNA 样品降解程度示意图



注1：重度降解：电泳图中对应样品的泳道无明显主带，拖尾严重，如泳道1所示。

注2：中度降解：电泳图中对应样品的泳道可见14000bp左右主带，略有拖尾，如泳道2所示。

注3：轻微降解：电泳图中对应样品的泳道可见20000bp左右主带，略有拖尾，如泳道3所示。

5.4.4 文库构建与高通量测序

构建文库，进行高通量平台测序过程参见GB/T 30989-2014高通量基因测序技术规程。

根据表1的判断标准，建议如表2所示选择合适的DNA样品。

表2 建库测序选择标准

DNA样品类别	建议
A类	满足建库测序要求
B类	满足建库测序要求
C类	不完全满足建库测序要求，可以尝试风险建库，但不保证测序质量。 建议重新采样，重新提取样品DNA

5.4.5 数据分析

分析过程参见SZTT/SZGIA 1-2016基于高通量测序的环境微生物检测 第1部分：基本规程。

5.4.6 数据质控要求

5.4.6.1 质量要求

测序完成后，每个DNA样品对应的有效可用数据质量值应符合如下要求：

——Q20≥90%，该样品测序结果 90%以上的碱基质量值大于 20；

——Q30≥80%，该样品测序结果 80%以上的碱基质量值大于 30。

注：以上要求适用于读长不超过 300bp的短序列，超过350bp的应选择合适的质控要求。

5.4.6.2 数量要求

为了完成后续物种注释，功能分析等数据分析步骤，要求每个样品测序短序列数目（即单端测序的序列条数，或双端测序序列对数），至少大于 1×10^7 条。

附 录 A
(资料性附录)
样品信息单

运输信息	运输公司: _____ 快递单号: _____ 城市: _____ 联系人: _____ 联系电话: _____ 联系邮箱: _____ 运输状态: <input type="checkbox"/> 干冰 <input type="checkbox"/> 冰袋 <input type="checkbox"/> 常温 <input type="checkbox"/> 其他: _____			
客户姓名*		客户联系电话		
客户单位*				
样品信息*	样品类型: <input type="checkbox"/> 组织 <input type="checkbox"/> 细胞 <input type="checkbox"/> 菌体 <input type="checkbox"/> 全血(收集淋巴细胞) <input type="checkbox"/> 血清 <input type="checkbox"/> 其他: _____			
	样品状态: <input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 速冻组织 <input type="checkbox"/> RNAlater 保存 <input type="checkbox"/> 已裂解 <input type="checkbox"/> 其他: _____			
	采样前状态: <input type="checkbox"/> 正常生长(培养) <input type="checkbox"/> 经过特殊处理: _____ (如盐胁迫 高温 低温 辐射 药物) <input type="checkbox"/> 其他: _____			
物种 (中文+拉丁名)				
种类 (微生物填写)	原核: <input type="checkbox"/> 细菌; <input type="checkbox"/> 放线菌; <input type="checkbox"/> 螺旋体; <input type="checkbox"/> 支原体; <input type="checkbox"/> 立克次氏体; <input type="checkbox"/> 衣原体 真核: <input type="checkbox"/> 真菌; <input type="checkbox"/> 藻类; <input type="checkbox"/> 原生动物 非细胞类: <input type="checkbox"/> 病毒; <input type="checkbox"/> 亚病毒			
有无传染性、致病性*	<input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 有 (致病传染性说明: _____)			
实验室环境要求*	<input type="checkbox"/> 普通实验室 <input type="checkbox"/> P2 实验室 (生物安全柜)			
详细提取方案*				
样品名称	样品管数	样品总量	采集时间	备注

注: 样品的采集及运输需遵守国家相关规定 (例如: 《病原微生物实验室生物安全管理条例》), 需在样品保存管或保存袋上做好清晰标记。

参 考 文 献

- [1] Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, R245–R249 (1998).
- [2] Lauber, C. L., Zhou, N., Gordon, J. I. & Knight, R. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and humann-associated samples. *FEMS Microbiol. Rev.* **307**, 80–86 (2010).
- [3] Balzola, F., Bernstein, C., Ho, G. T. & Lees, C. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Inflamm. Bowel Dis. Monit.* **11**, 28 (2010).
- [4] Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
- [5] Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., Klaenhammer, T. R. & Ringel, Y. Characterization of the Fecal Microbiota Using High-Throughput Sequencing Reveals a Stable Microbial Community during Storage. *PLoS One* **7**, 1–7 (2012).
- [6] Hale, V. L. *et al.* Effects of field conditions on fecal microbiota. *J. Microbiol. Methods* **130**, 180–188 (2016).
- [7] Karatza, E., Vertzoni, M., Muenster, U. & Reppas, C. The Impact of Handling and Storage of Human Fecal Material on Bacterial Activity. *J. Pharm. Sci.* **105**, 3458–3461 (2016).
- [8] Song, S. J., Amir, A., Metcalf, J. L. & Amato, K. R. Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies. *mSystems*. **1**, 1–12 (2016).
- [9] Blekhman, R. *et al.* Common methods for fecal sample storage in field studies yield consistent signatures of individual identity in microbiome sequencing data. *bioRxiv* 1–5 (2016). doi:10.1101/038844