

SZTT/SZGIA

深圳市团体标准

SZTT/SZGIA 1.3-2017

基于高通量测序的环境微生物检测 第3部分：人粪便微生物 16S rRNA 基因检测法

Detection of environmental microorganisms based on high-throughput sequencing

Part 3: Methodology of detecting human fecal microbiota using 16S rRNA gene sequencing

2017-05-27 发布

2017-05-28 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《基于高通量测序的环境微生物检测》分为四个部分：

- 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：人粪便微生物16S rRNA基因检测法
- 第4部分：临床样本病原微生物检测

本部分为SZTT/SZGIA 1的第3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：深圳华大基因股份有限公司、蓝色彩虹（深圳）科技有限公司、深圳华大基因科技服务有限公司、深圳华大基因科技有限公司、深圳市第二人民医院、深圳龙岗区妇幼保健院、深圳南山区妇幼保健院、深圳市谱元基因研究院、深圳弘睿康生物科技有限公司、华大精准营养（深圳）科技有限公司、深圳市微健康基因研究院。

本部分主要起草人：徐煜、唐美芳、钟宏彬、李陶莎、李倩一、杜佳婷、李岱怡、程奇、谢强、马倩倩、杨林峰、刘靓、刘文兰、魏凤香、张静、覃俊杰、胡鹏、朱立、刘晓璐、戴文魁。

本部分为首次发布。

基于高通量测序的环境微生物检测

第3部分：人粪便微生物16S rRNA基因检测法

1 范围

本部分规定了人粪便微生物16S rRNA 基因检测方法，包括样本的采集、保存，样本检测，扩增子制备，测序，数据分析的步骤以及各步骤质控标准。

本部分适用于利用16S rRNA基因测序方法进行人粪便微生物检测。微生物的检测范围仅限于细菌和古菌等原核微生物。

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 19495.3-2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 19495.4-2004 转基因产品检测 核酸定性 PCR 检测方法

GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测 核酸定量 PCR 检测方法

SN/T 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 1.1-2016 基于高通量测序的环境微生物检测 第1部分：基本规程

SZTT/SZGIA 1.2-2016 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

3 术语和定义

下列定义适用于本文件。

3.1

16S 核糖体RNA (16S ribosomal RNA)

核糖体RNA的一个亚基，其沉降系数为16S。

3.2

引物 (primer)

一小段单链DNA，用以作为DNA复制的起点。

3.3

扩增子 (amplicon)

扩增子为DNA或RNA扩增后形成的一段核苷酸序列。

3.4

可操作分类单元 (Operational Taxonomy Unit, OTU)

可操作分类单元 (OTU) 是指具有特定功能特征或特定基因组特征的物种的集合。OTU 可以指生物分类学意义上的种 (species), 也可以指其他物种分类单元 (如科, 属, 等)。

3.5

相对丰度 (relative abundance)

某OTU的相对丰度是指样品中该OTU在样品总微生物群落中的相对比例。

4 缩略语

bp—— 碱基对 (base pair)

DNA——脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

OUT——可操作分类单元 (operational taxonomy unit)

PCR——聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

RNA——核糖核酸 (ribonucleic acid)

rRNA——核糖体 RNA (ribosomal RNA)

5 检测方法

5.1 样品采集、保存与运输

样品采集、保存与运输及检测步骤请参照SZTT/SZGIA 1.2-2016 5.3。

5.2 实验室条件及所需仪器设备

实验室条件应达到SZTT/SZGIA 1.1-2016 5.5.1 要求。

本检测方法用到的设备包括: 核酸荧光定量设备, 凝胶电泳设备, 高通量DNA测序仪, 计算机等。

5.3 DNA 样品质量检测

粪便样品提取微生物总DNA后, 依据 GB/T 19495.3-2004和 GB/T 19495.5-2004 的规定检测DNA样品, 样品DNA质量应不少于50 ng, 浓度不小于6 ng/μL。并根据 SN/T 2497.21-2010 检测DNA样品的完整性, DNA应无降解或轻微降解。

5.4 扩增子制备

5.4.1 扩增区域选择

扩增区域应选择16S rRNA基因上一段连续的, 在不同物种间变异程度较高的区域。扩增区域应在样品可能包含的物种间具有较高的差异性, 且应包括至少一个高可变区。扩增区域的大小应与测序方法相匹配, 保证扩增子可以被全长测序。

5.4.2 区域扩增

扩增引物设计应用核酸序列保守区设计, 并满足GB/T 19495.4-2004 9.3.3要求。同时, 引物需对不同的微生物物种的扩增区域具有相同或相近的扩增效率。扩增子的片段大小应与扩增区域大小相符合, 呈现良好的单峰形态。

5.4.3 常用扩增区域引物序列

常用测序区域的及其扩增引物序列参见表1。

注：因物种不同，扩增区域的实际长度可能会较预期区域长度有数个至数十个碱基的偏差。

表 1 16S 区域扩增引物序列图

扩增区域	引物名称	引物序列	预期区域长度
全长	8F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	1484 bp
	1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	
V4	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	291 bp
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	
V3-V4	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	465 bp
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	
V4-V5	515F	GTGCCAGCMGCCGCGG	392 bp
	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGT	
V1-V3	8F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	510 bp
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	
V3	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	195 bp
	533R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	
V6	967F	CAACGCGAAGAACCTTACC	79 bp
	1046R	CGACAGCCATGCANCACT	

5.5 测序

测序应遵照DNA测序仪的操作规范进行，并对操作步骤和参数进行详细记录。测序策略应与扩增子大小相匹配，保证扩增子被全长测序。测序条件应进行合理控制，使数据质量达到测序平台要求，且错误率高于1%的碱基比例应低于20%。

5.6 生成有效数据

有效数据指高质量的扩增子序列信息。人源序列在生成有效数据的过程中应被去除。利用双端测序法进行测序的，两端的测序结果应进行合理拼接，形成完整的扩增子序列。在每

条有效数据中，错误率高于1%的碱基占序列长度比例应低于20%。每个样品的有效数据应不少于15000 条。

5.7 物种注释

应对所使用的注释方法和数据库进行描述，以满足可重复性要求。所选数据库应尽可能全面包含地样品中可能存在的物种的16S rRNA基因序列。常用的数据库包括greengenes、SILVA等。在不同的物种分类水平进行注释时，目标序列与数据库参考序列的相似性应达到表2要求。

表 2 序列相似性参数

分类水平	序列相似性
种	>99%
属	>97%
科	>95%
目	>90%
纲	>85%
门	>80%

5.8 物种相对丰度分析

应对所使用的相对丰度分析方法进行描述，以满足可重复性要求。相对丰度的计算结果应尽可能反映目标OTU在样本中的实际相对丰度。在不同物种分类水平进行相对丰度分析时，物种注释应达到5.7要求。

5.9 质量控制

实验方法的质量控制，可使用已知菌种配制的混合品，照以上步骤进行处理，并将所得结果与混合品的菌种组成和比例进行比较，以验证实验方法的可靠性。亦可将同一样品，分别照以上步骤和SZTT/SZGIA 1.2-2016 中的方法进行处理，交叉验证结果的可靠性。

各机构在描述结果时应对应方法的局限性予以说明。

注：当使用非全长扩增区域时，由于扩增子序列并不能全面代表物种的16S rRNA基因序列，由此可能引入物种注释和相对丰度分析结果的偏差。