



博淼生物

BIOMIAO BIOLOGICAL

-SINCE2009-

Your own Laboratory

您的专属实验室

微生物简化基因组技术

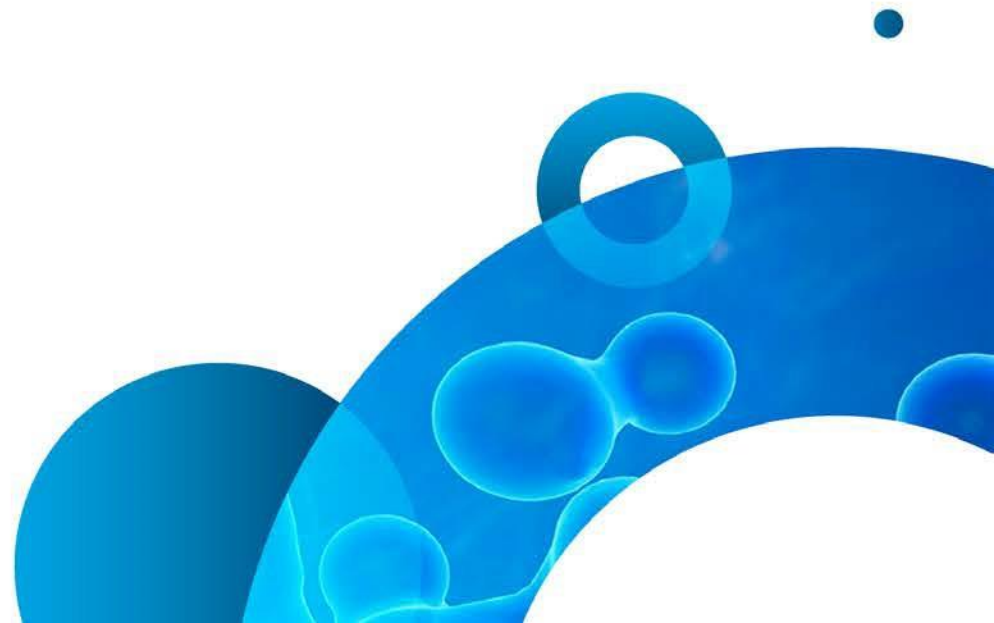
项目介绍

全国统一服务电话：400-6506-908

网址：www.biomiao.com

邮箱：marketing@biomiao.com

地址：北京市丰台区丰管路优橙创新中心3012-3015



人类微生物组

是指与人体互生、共生和致病的所有微生物及其遗传物质的总和

人体的另一器官

- ✓ 微生物数量是人体细胞数量的10倍;
- ✓ 微生物基因数量是人基因数量的100倍;
- ✓ 微生物普遍分布于人体的各个部位, 如皮肤、呼吸道、胃肠道、泌尿生殖系统等;
- ✓ 人肠道微生物: 常见1000多种
- ✓ 肠道细菌: 约 4×10^{13} 个



促进营
养吸收

增强免疫
功能

缓解肠道
炎症

改善肠易
激症状

防治肿瘤
疾病

调节血糖
血脂

Hooper LV et al., Science, 2001; Sender R, et al., Cell, 2016; Lynch S V, et al., New England Journal of Medicine, 2016.

微生物组-疑难样本

肿瘤组织、石蜡切片 (FFPE)、各种拭子 (皮肤/口腔/眼表等)
各种体液 (唾液、脑脊液、灌洗液、尿液等)、血液 (全血) 等等

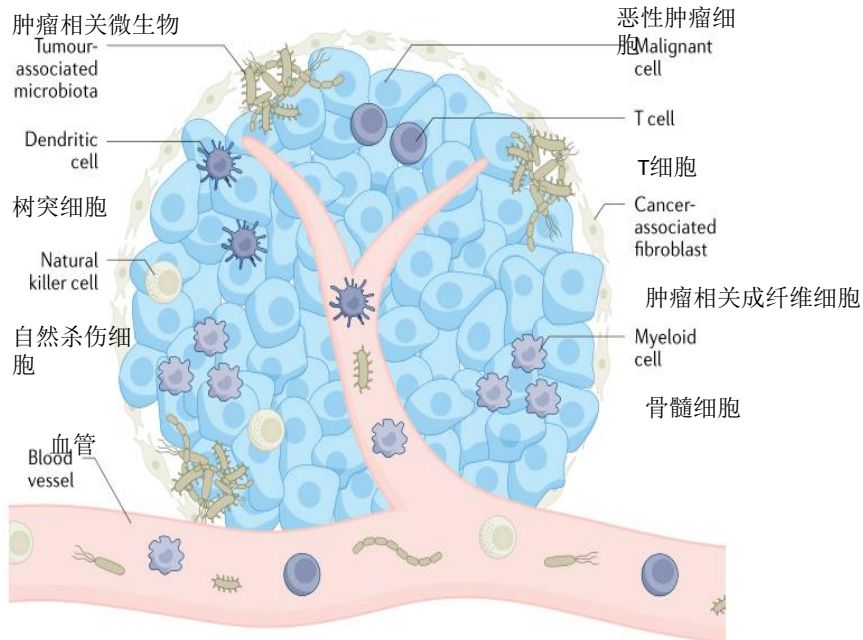
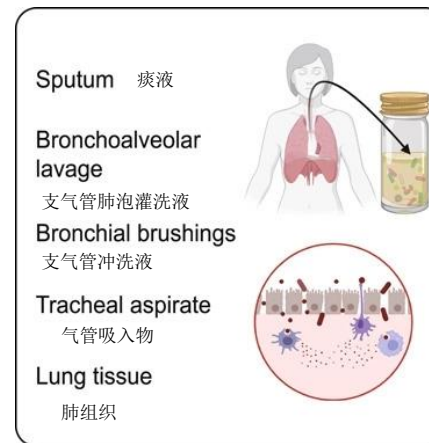
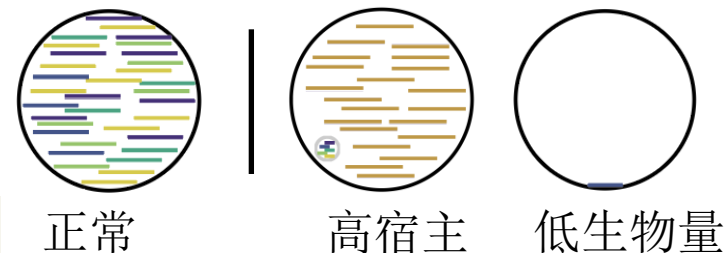
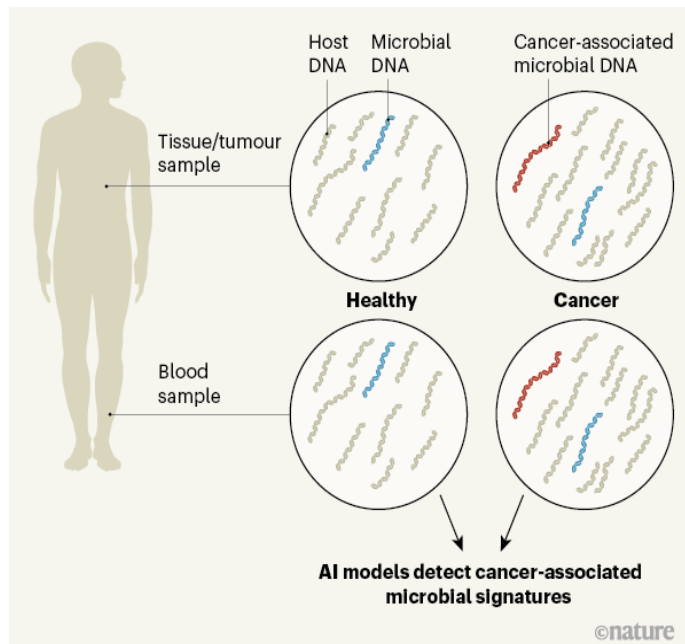


Fig. 1 | The tumour-associated microbiota. The schematic shows the key components of the tumour microenvironment, including a resident microbiota.

肿瘤微环境



2bRAD-M



Sampling

- Oral contamination
- Low microbial-to-host ratio
- Disease heterogeneity
- Microbiome-host interaction
- Microbiome manipulation
- Culturability

Challenges

iMeta

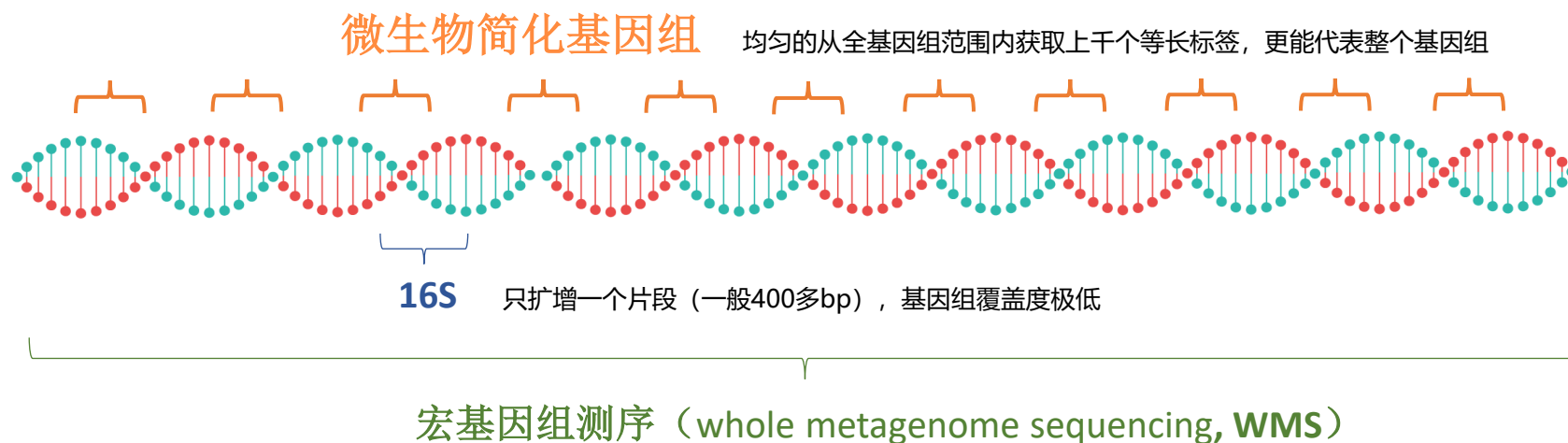
REVIEW ARTICLE | Open Access | © | i

The human lung microbiome—A hidden link between microbes and human health and diseases

Xinzhu Yi, Jingyuan Gao, Zhang Wang

First published: 16 June 2022 | <https://doi.org/10.1002/imt2.33>

微生物组学测序三大类技术



扩增子测序:

- 细菌、真菌、古菌等分别检测
- 分辨率低，属水平，很多注释不到种水平
- 假阳性率高

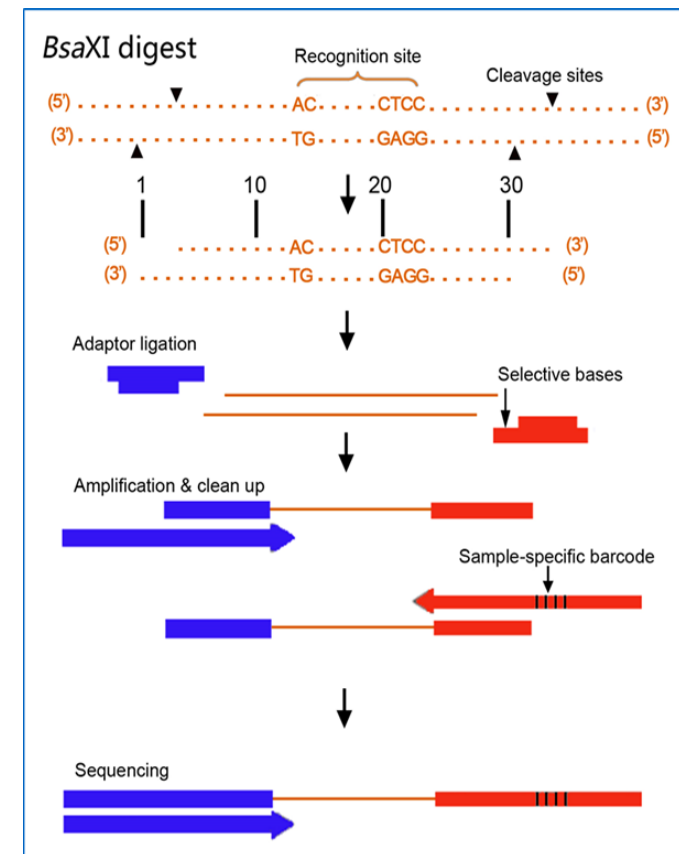
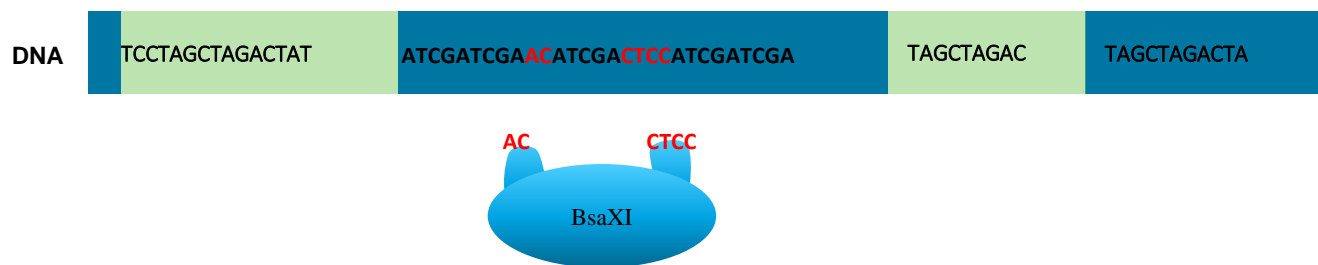
宏基因组测序:

- 高DNA质量要求;
- 高成本;
- 宿主污染问题

建库

- IIB型酶酶切基因组DNA;
- 标签分布均匀;
- 标签等长, 测序深度均一, 技术重复性高;
- 对DNA降解和浓度敏感性低;

Wang, et al, Nature Protocols, 2016



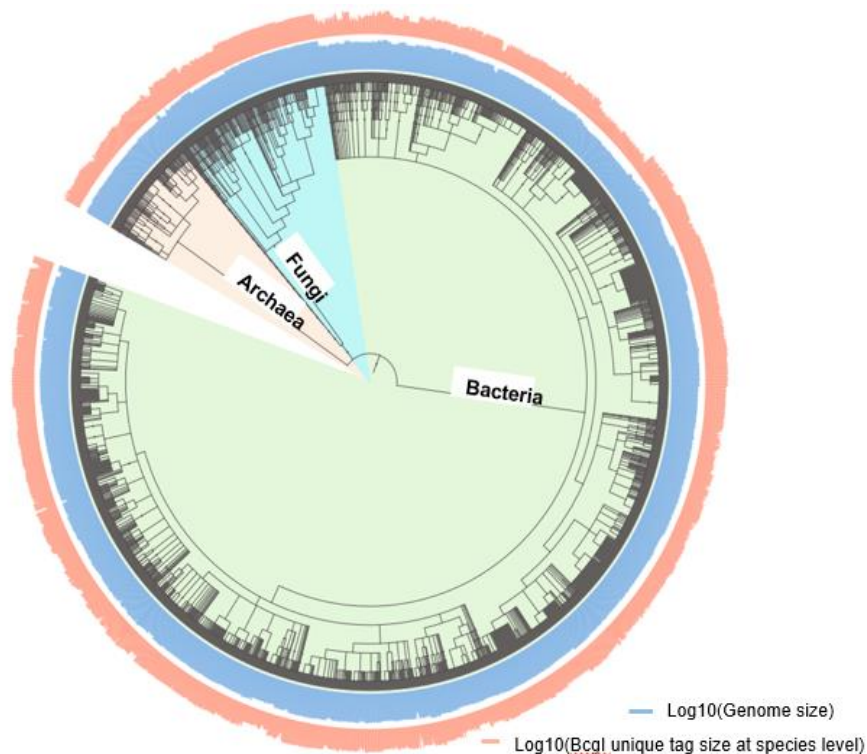
数据库

结果：构建40万+微生物基因组的特异性标签库

unique tag可用于微生物鉴定和分类的标志物

IIB enzyme	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
AlfI	89.12%	86.98%	82.84%	79.44%	72.94%	39.79%
AloI	86.81%	84.30%	79.41%	75.37%	68.75%	36.85%
BaeI	87.50%	85.35%	81.16%	77.76%	71.53%	39.19%
BcgI	88.85%	86.64%	82.54%	79.23%	72.71%	39.68%
BpII	87.14%	84.58%	80.57%	76.96%	70.17%	38.16%
BsaXI	87.39%	85.08%	80.62%	77.03%	70.61%	38.62%
BsIFI	86.17%	83.96%	79.65%	76.30%	69.95%	37.90%
Bsp24I	87.16%	84.88%	80.41%	76.85%	70.22%	38.10%
CjeI	87.58%	85.35%	80.99%	77.46%	70.89%	38.57%
CjePI	87.85%	85.56%	81.15%	77.51%	70.94%	38.29%
CspCI	88.88%	86.68%	82.95%	80.09%	74.09%	41.89%
FalI	86.77%	84.24%	79.21%	75.37%	68.45%	37.08%
HaeIV	87.43%	85.17%	80.89%	77.35%	70.93%	38.56%
Hin4I	86.98%	84.79%	80.52%	77.01%	70.64%	38.56%
PpiI	87.93%	85.24%	80.56%	76.55%	69.97%	37.33%
PsrI	84.96%	82.43%	77.53%	73.60%	66.78%	36.28%

微生物简化基因组标记在每个分类水平上的可用性



微生物简化基因组标签数与基因组大小成正比

➤ 种水平微生物

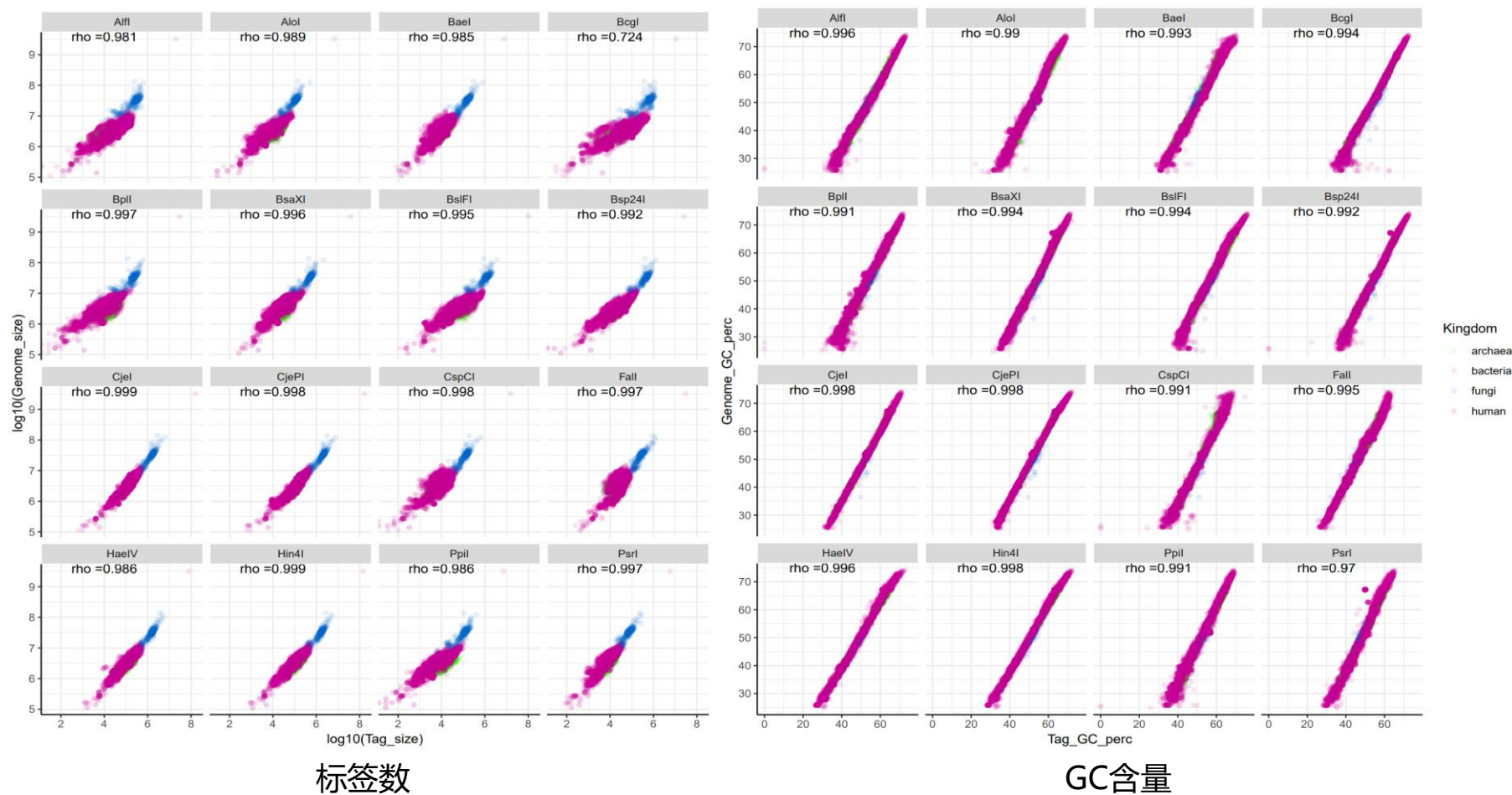
- 细菌：80789个
- 真菌：581个
- 古菌：4416个

➤ BcgI

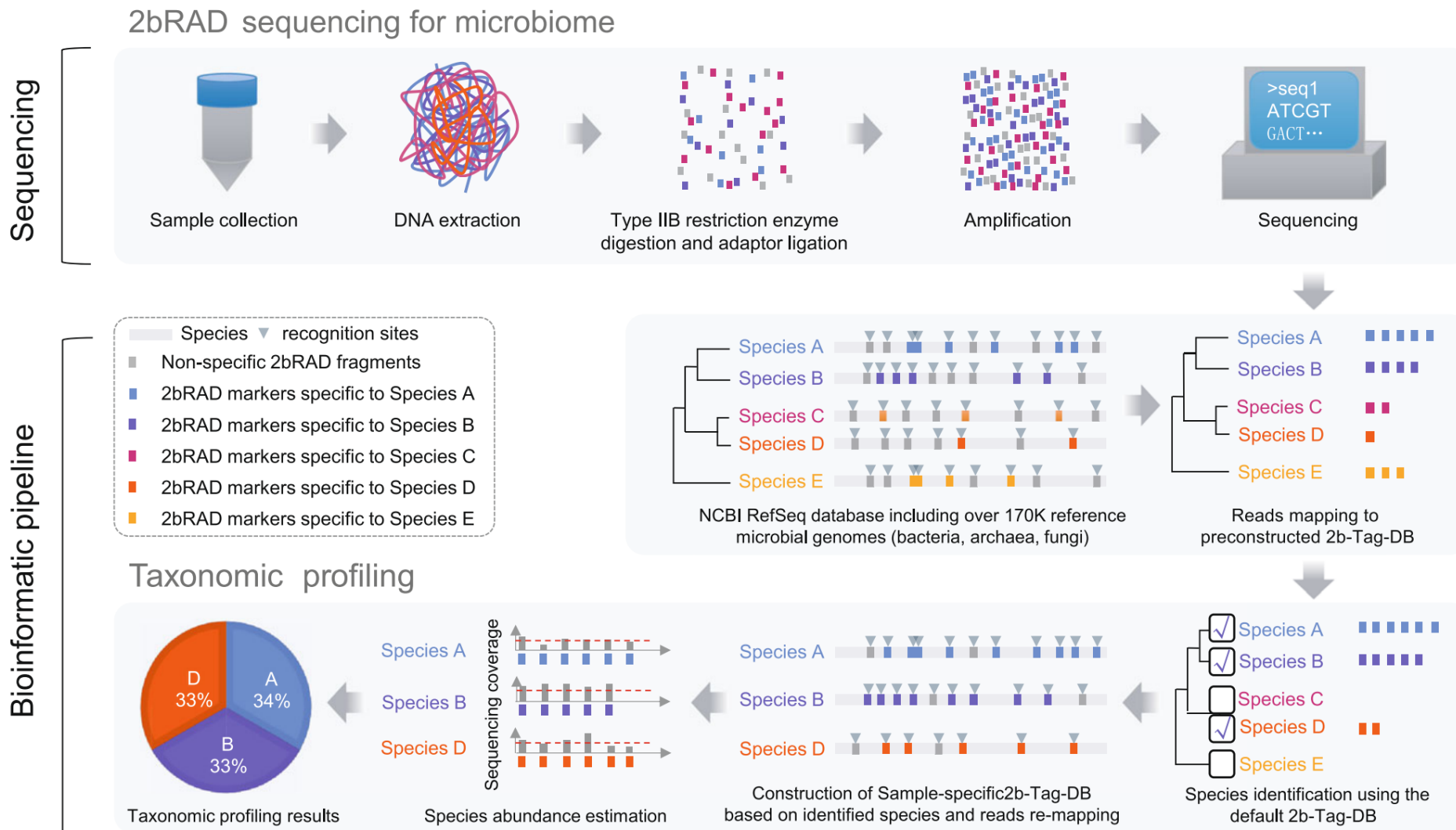
- 平均每个基因组有3,010个等长(32bp) 标签
- 平均每个基因组种水平的unique tag为39.7%

标签(tags)对整个基因组具有代表性

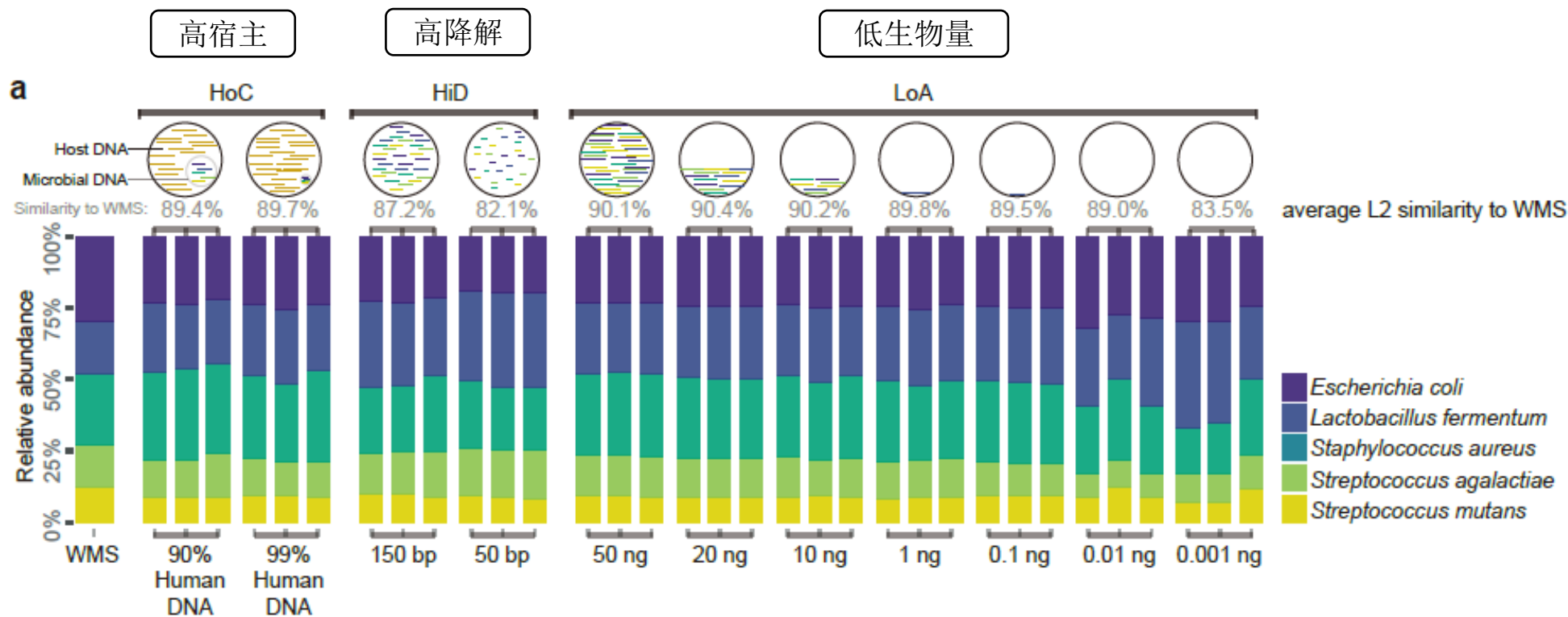
- 相关性分析表明，标签数和GC含量与整个基因组的相关性高度一致 ($r > 0.98$ 和 $r > 0.99$)



技术流程



技术特点

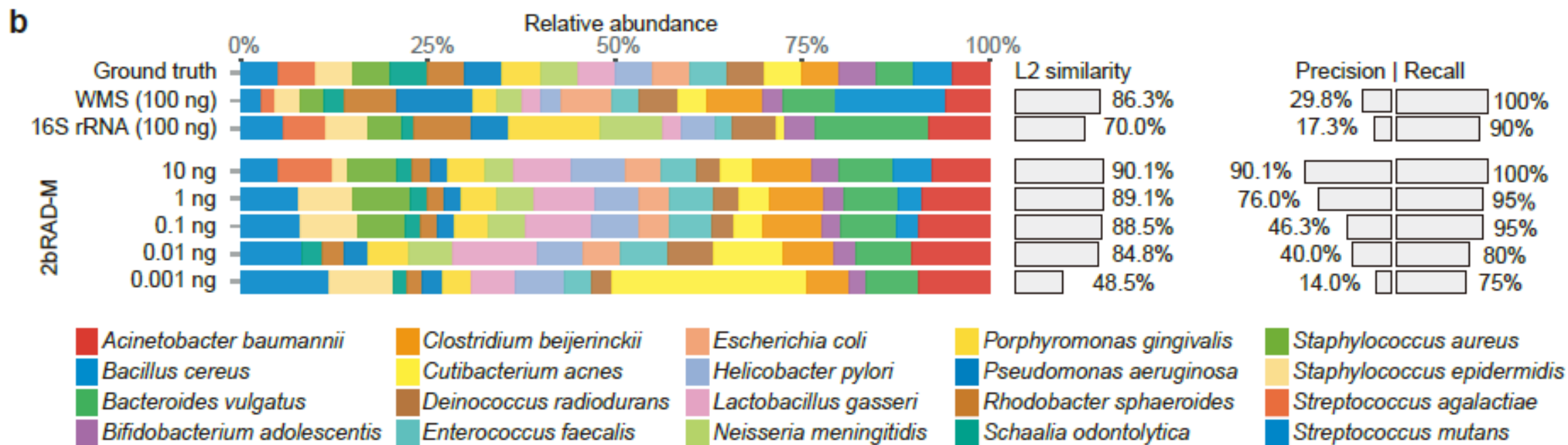


标准品1: Mock-CAS (5 种微生物)

- **技术重复性高:** 三个重复的平均L2相似性为 95.4% ;
- **灵敏度高:** 1pg 样品的L2相似性仍然可以达到83.5% ;
- **可应对三大挑战:** 高宿主污染样本、高降解、低生物量, 平均L2相似性分别为89.6 % , 84.6%和 88.9%。

- 跟WMS比较计算L2相似性
- 相似性越高, 说明与WMS结果越相似

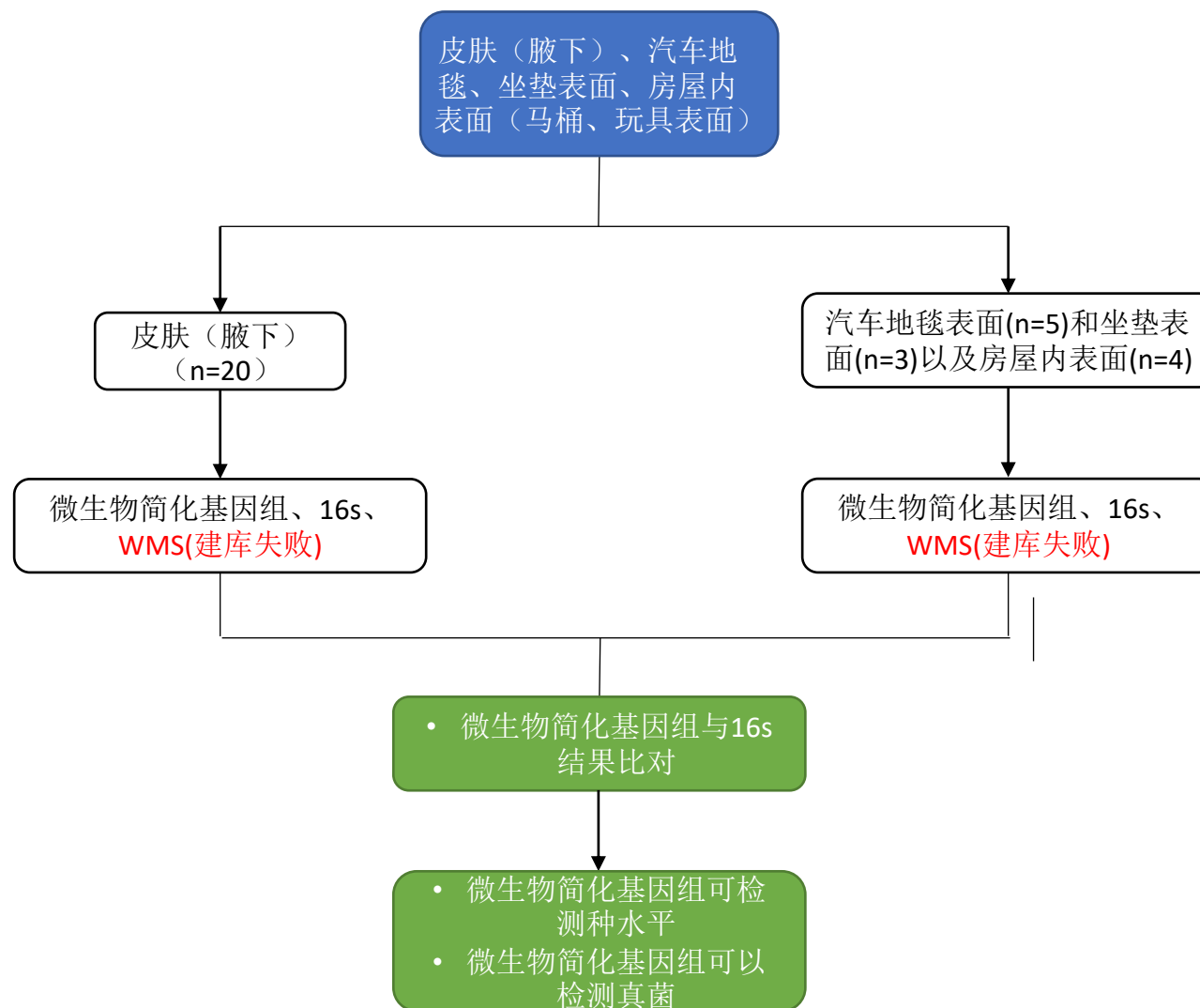
技术特点



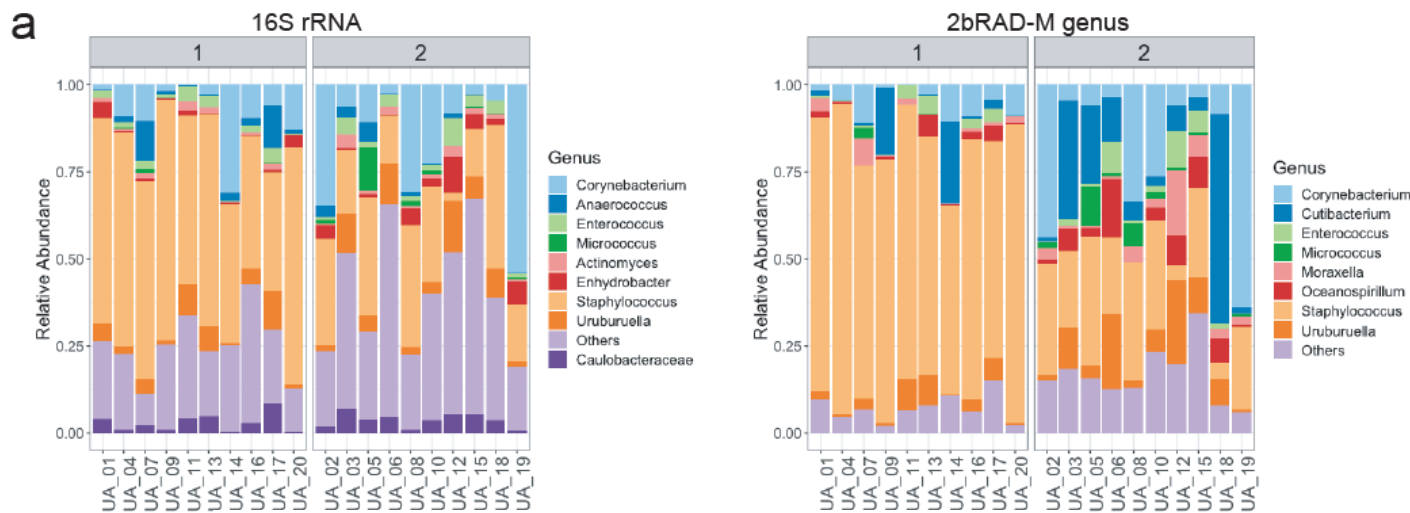
标准品2: ATCC MSA1002 (20 种微生物)



样本类型1：皮肤和环境拭子（低生物量样本）



皮肤样本结果

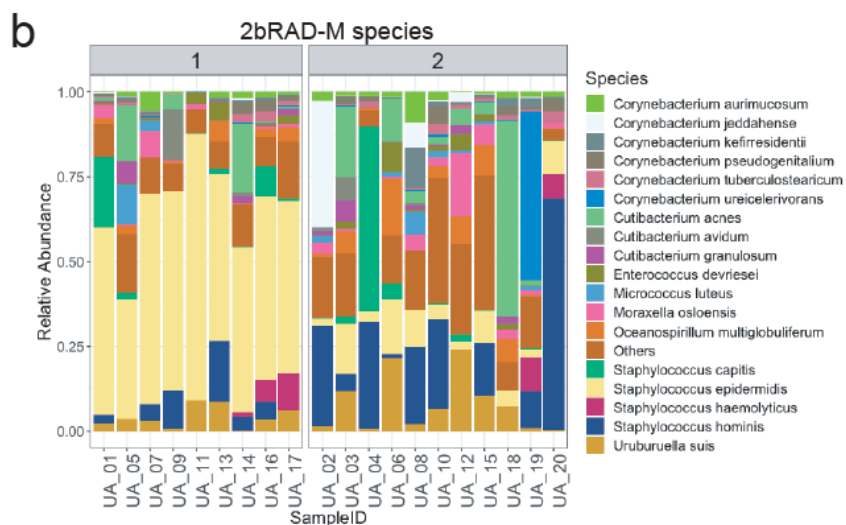


➤ WMS 失败

➤ 微生物简化基因组 vs 16S (属水平)

L2 相似性 81.1%

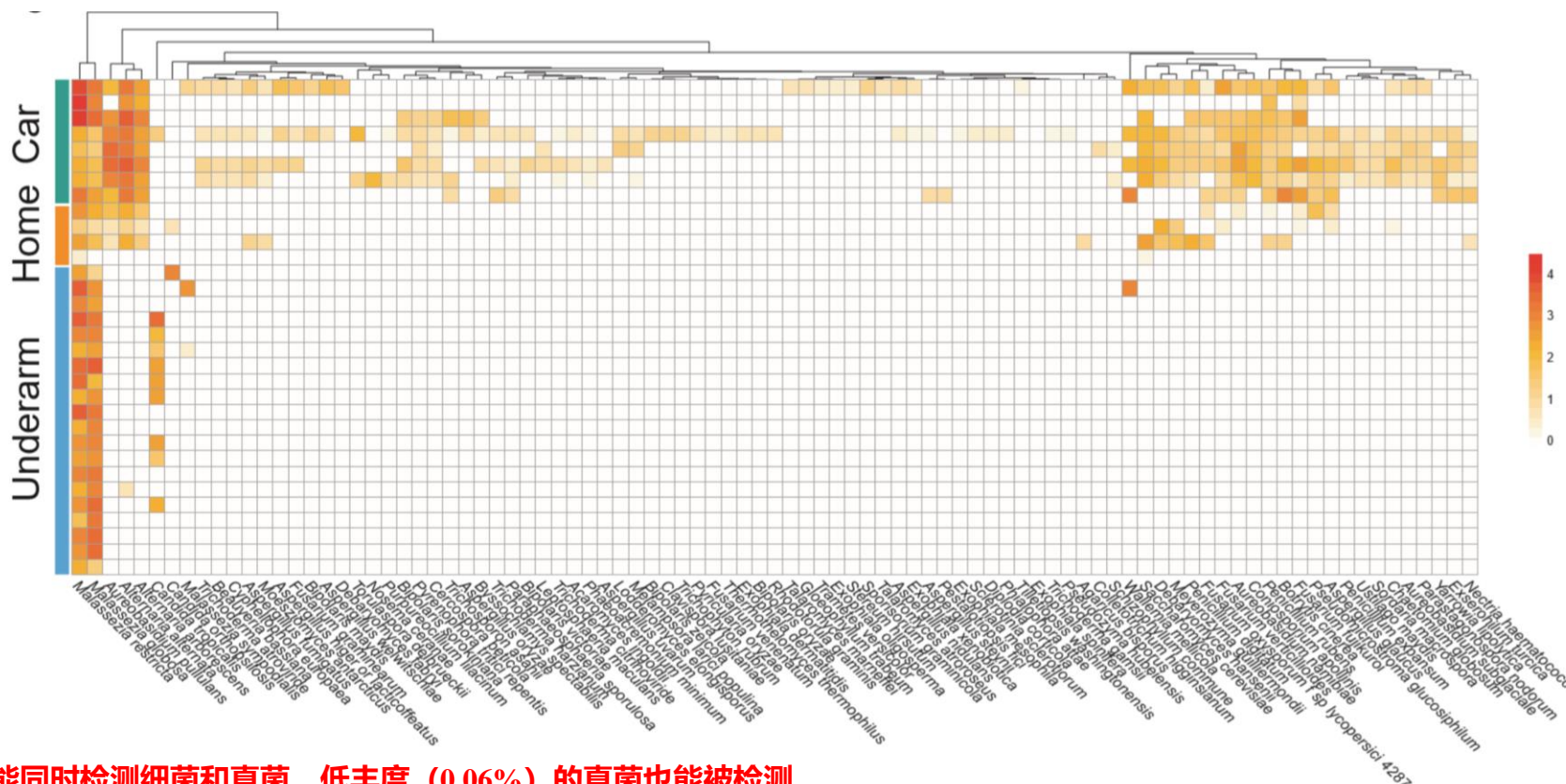
➤ 属水平: 葡萄球菌 (47.1% vs 44.43%) 和棒状杆菌 (10.38% vs 15.06%) 是优势微生物, 两个技术基本一致, 且与文献报道一致



➤ 种水平: 深入分析葡萄球菌属, **表皮葡萄球菌** 的相对丰度较高(4.63倍, $p=4.3E-04$), 而其他葡萄球菌在簇间没有显著变化。

➤ 微生物简化基因组可以提供种水平结果, 而16S 不能。

真菌结果

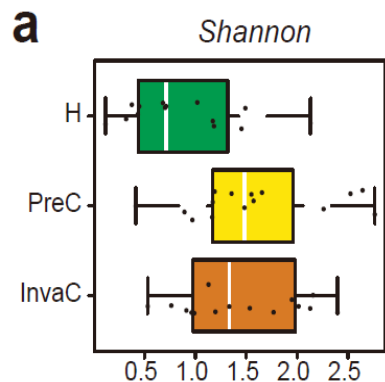


微生物简化基因组能同时检测细菌和真菌，低丰度 (0.06%) 的真菌也能被检测。

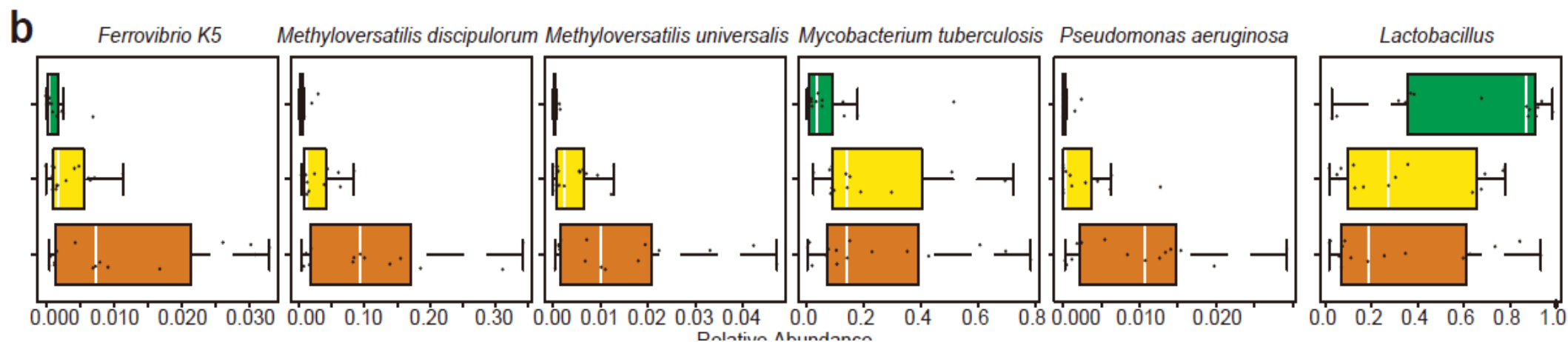
- 腋下(0.83%)和室内环境样品中真菌(0.06%)的相对丰度相较于细菌(99.16%)来说是极低的。汽车坐垫表面的真菌含量最高(2.33%);
- 微生物简化基因组揭示不同地点真菌组成差别很大:
 - *Alassezia restricta* *Malassezia globosa*, 在腋下和大部分室内环境样本中最丰富 (是已知的人类皮肤表面共生菌) 。
 - 相反, *Alternaria alteranta*主要在室内环境中发现, 但在腋下不存在, 这与现有的报道一致。



样本类型2: FFPE(高降解样本)



- 45 个宫颈癌石蜡切片 (4 μ m厚, 3cm²) : 健康对照 (H)、侵袭前 (PreC; 良性)、浸润性患者 (InvaC; 恶性), 各15例
- 健康组(H)的alpha多样性显著低于PreC和InvaC



- PreC和InvaC的富集菌和 H不同, 而乳酸菌属(*L. paracasei*, *L. vaccinostrercus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*)在H中富集 (与之前报道一致)

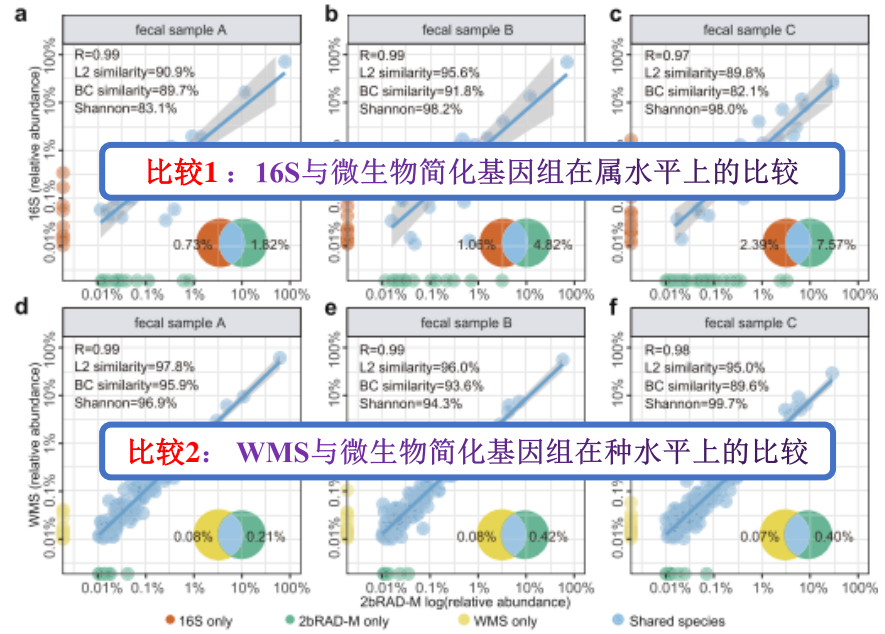
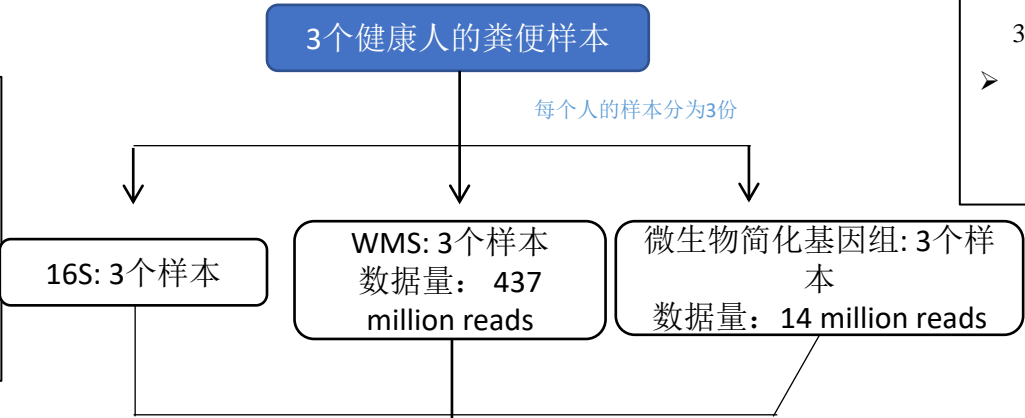
样本类型3：粪便（高生物量样本）

微生物简化基因组所需要的测序数据量远低于WMS

- 20-40M reads/样本, WMS可以识别170-182个物种
- 3-4Mreads /样本, 微生物简化基因组可以识别173-188个物种
- 总之, 微生物简化基因组每样本大约需要3M reads, 可以在种水平上产生一致、准确和稳定的alpha多样性估计和分类分析。

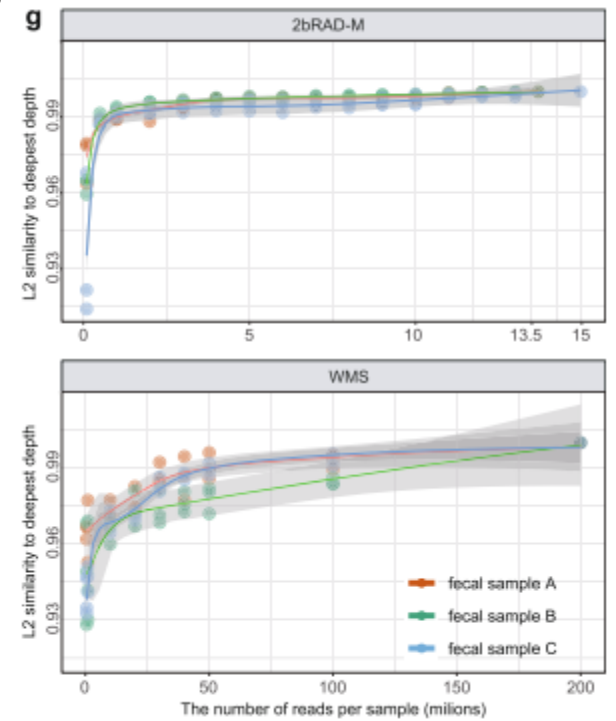
WMS和16S检出的微生物95%以上会被微生物简化基因组检出

- 比较1: 微生物简化基因组vs 16S (genus level):**
 - 属水平, 16S 鉴定到的**95.27%** 可以被微生物简化基因组鉴定到
- 比较2: 微生物简化基因组vs WMS (species level):**
 - WMS 的**3.35%** 不能被微生物简化基因组鉴定到



微生物简化基因组与WMS、16s的技术对比

微生物简化基因组和WMS最佳测序数据量确定



微生物简化基因组分析内容

2bRAD-M分析

1、测序数据质控

2、酶片段提取及质控

3、碱基及质量值分布

4、物种注释与定量

5、群落结构分布

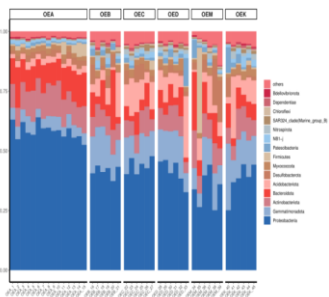
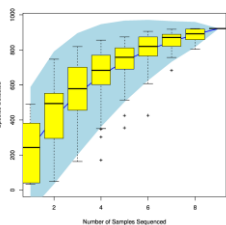
6、alpha 多样性分析

7、beta 多样性分析

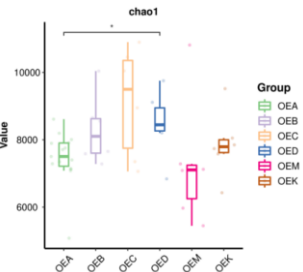
8、微生物多元变量统计分析

9、关联与模型预测分析

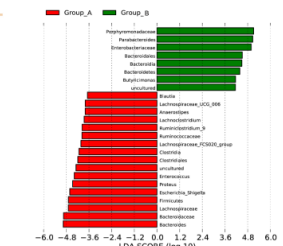
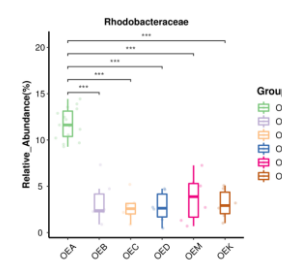
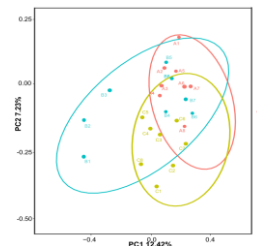
10、功能注释分析



群落结构柱状图
群落结构Heatmap图
群落结构 Krona 分析



alpha 多样性指数统计
alpha 多样性指数箱线图
Specaccum 物种累积曲线
Rank Abundance 分析

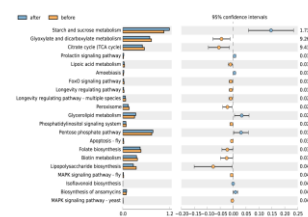


beta 多样性指数
PCA 分析
PCoA 分析
NMDS 分析
样本层次聚类分析

Kruskal Wallis 差异统计
ANOVA 差异统计
LEfSe 分析
PERMANOVA/Adonis 分析
ANOSIM 分析

Indicator 分析
随机森林分析

KEGG 功能预测
COG 功能预测



微生物简化基因组与其他技术对比

技术	分辨率	微生物种类	扩增区域对基因组的覆盖度	扩增偏好性	痕量样本处理能力	降解样本处理能力	宿主污染样本处理能力
16S	属水平	细菌	最低	高	中	中	中
5R 16S	种水平	细菌	很低	高	中	中	中
三代全长16S	种水平	细菌	低	中	低	低	中
宏基因组	种水平	细菌、真菌、古菌、病毒	最高	低	低	低	低
微生物简化基因组	种水平	细菌、真菌、古菌	中等	低	高	高	高



各类疑难样本

各种组织样本内生菌（肿瘤、其他）

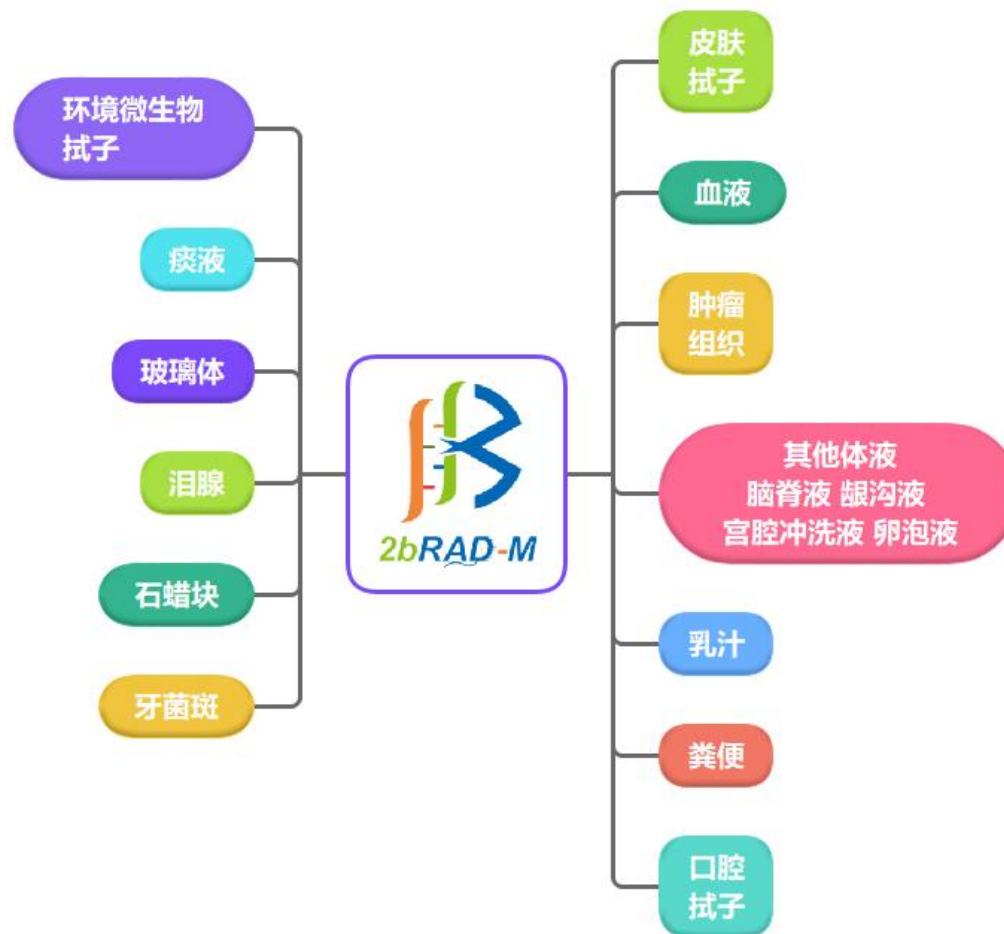
石蜡切片/块

各种拭子（皮肤/口腔/眼表等）

各种体液（唾液、脑脊液、灌洗液、尿液等）

血液（全血）

等等...



微生物简化基因组专用P2标准实验室

按照P2标准建设

严格的功能分区

完善的实验操作管理

配套生信环节的去污染分析流程

确保获得更加真实、客观的结果



案例一：幼儿园首次种水平微生物组检测

ORIGINAL RESEARCH article

Front. Microbiol., 28 March 2022 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871017>



Species-Resolved Metagenomics of Kindergarten Microbiomes Reveal Microbial Admixture Within Sites and Potential Microbial Hazards

TzeHau Lam¹, Dillon Chew¹, Helen Zhao¹, Pengfei Zhu², Lili Zhang², Yajie Dai², Jiquan Liu^{1*} and Jian Xu^{2,3*}

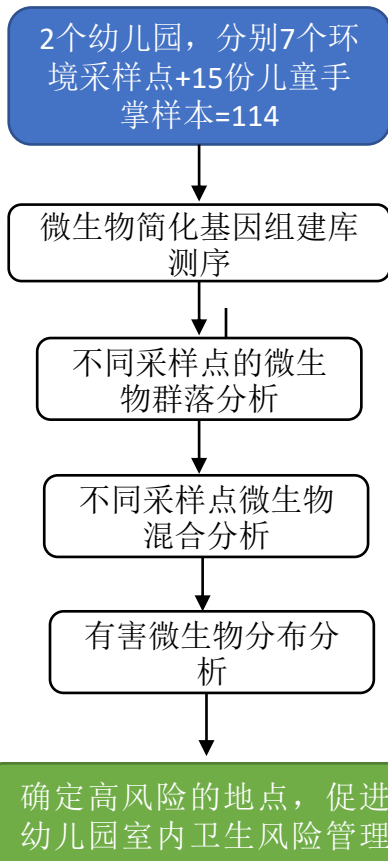
发表期刊：frontiers in Microbiology

发表时间：2022年3月

样本：游戏室灰尘、厕所地板、游戏室地板、书包、玩具表面、图画书、彩色铅笔、手掌

取样：

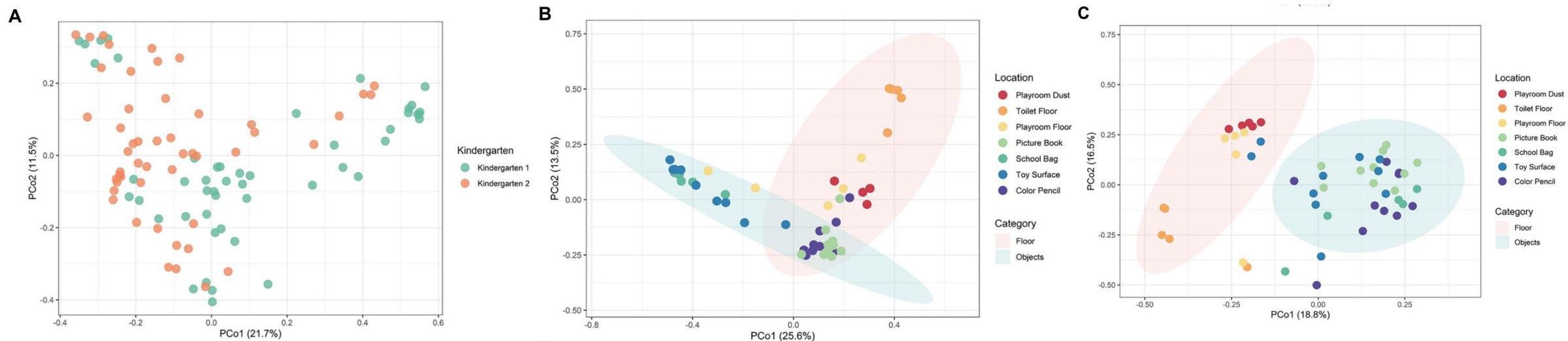
- 地板，无菌拭子无菌去离子水湿润，8cm×8cm区域横向和纵向涂抹20次。
- 彩色铅笔和玩具表面，擦拭拭子以覆盖整个表面。
- 儿童，洗手前用拭子擦拭双手的整个手掌。
- 室地板灰尘，沿游戏室地板边缘进行2分钟的吸尘器灰尘收集



第一个幼儿园种水平的微生物组调查，揭示手部微生物重要性



结果1：不同采样点的群落组成

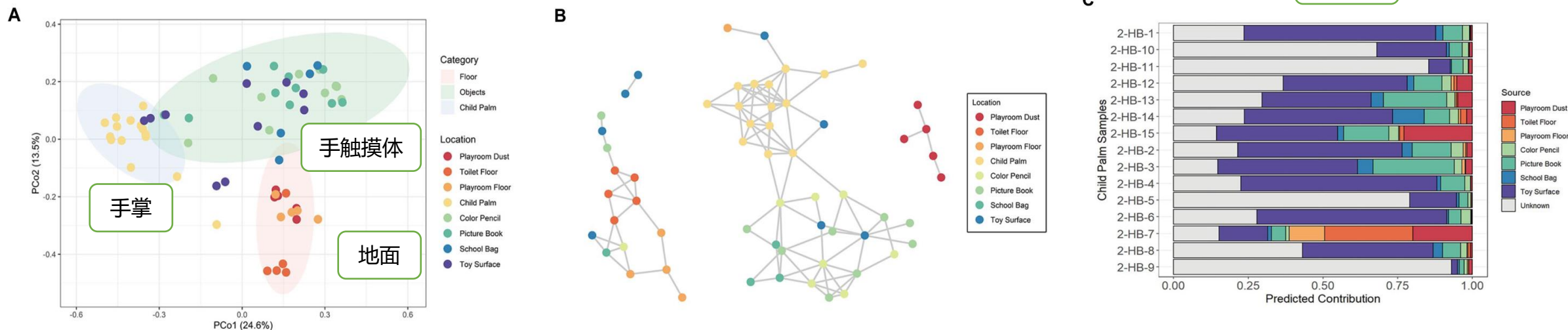


PCoA对幼儿园种水平上的微生物组成的可视化分析

微生物的群落组成依据幼儿园及表面类型进行区分

- ✓ (A) 两所幼儿园的PCoA结果显示：**两所幼儿园**的微生物种类组成存在显著差异(PERMANOVA; $R^2 = 0.059$, $p < 0.001$)。
- ✓ (B) 和 (C) 发现来自于**地面** (游戏室灰尘、游戏室地板、厕所地板) 的微生物种类组成和来自**手触摸物体** (绘本、书包、玩具表面、彩色铅笔) 的微生物种类组成存在显著差异 (1号幼儿园: PERMANOVA; $R^2 = 0.467$, $p < 0.001$, 2号幼儿园: PERMANOVA; $R^2 = 0.366$, $p < 0.001$) 。

结果2：不同采样点的群落交流

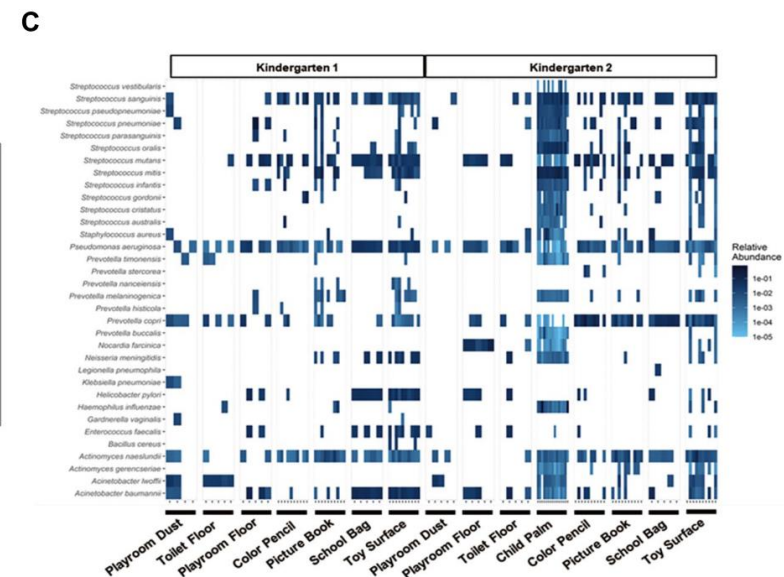
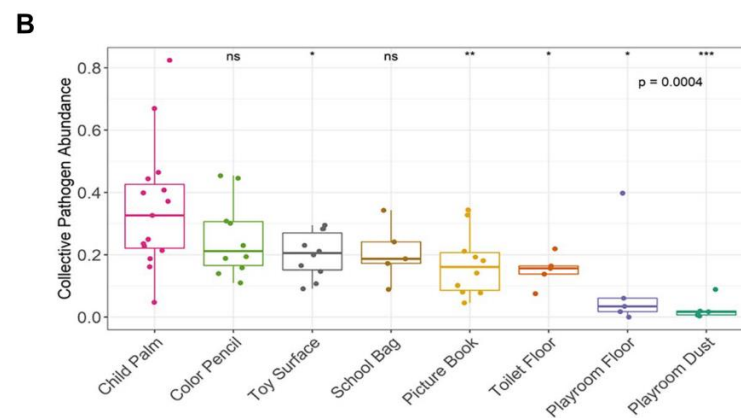
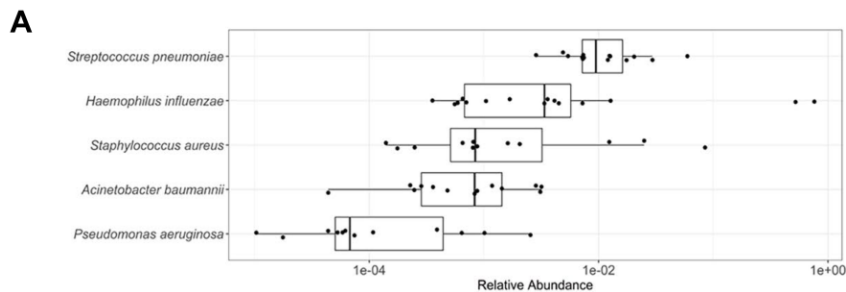


七个采地点与儿童手掌样本之间的微生物相关性

在不同的采样点中发现了大量的微生物混合，可能是由于儿童的手接触造成的

- ✓ (A) PCoA显示微生物种类组成存在显著差异 (PERMANOVA; $R^2 = 0.410$, $p < 0.001$)。地面（游戏室灰尘、游戏室地板、厕所地板）、手触摸物体（绘本、书包、玩具表面、彩色铅笔）和儿童手掌形成三个不同的簇。
- ✓ (B) 样本相关性网络，确定了三个主要的簇，即厕所地板/游戏室地板簇、儿童手掌/物体簇，游戏室灰尘簇，儿童手掌样本与玩具表面和彩色铅笔样本关联最大，表明幼儿园内部的交叉传播途径可能是通过儿童的手来介导的。
- ✓ (C) 估算各个来源的微生物群落在儿童手掌微生物群的丰都。发现，玩具是手掌微生物的主要来源，其次是绘本。说明玩具表面和绘本是最常见的接触热点，最有可能成为儿童手掌交叉传播的潜在媒介。

结果3：有害菌的分布统计



幼儿园表面存在的潜在有害微生物

在所有采样点均发现了潜在人类健康问题和潜在抗生素耐药性的细菌，但主要是在儿童的手上而不是在环境中富集

- ✓ (A) 5种病原菌在儿童手掌中检出率情况，相对丰度大多很低。且不同病原菌的相对丰度差异很大。
- ✓ (B) 8个点进行病原微生物丰度分析发现，儿童手掌样本携带的病原种类最多，而地板样本携带的病原种类最少。
- ✓ (C) 34种潜在病原菌在8个点的丰度热图分析。发现：手掌的潜在病原菌的累积相对丰度最高。表明儿童的手可能比地表面含有更多的潜在致病菌，强调了手部卫生重要性。

案例二：微生物简化基因组解析单侧肾结石患者的肾盂尿微生物组

8.440 > J Transl Med. 2022 Sep 24;20(1):431. doi: 10.1186/s12967-022-03639-6.

The renal pelvis urobiome in the unilateral kidney stone patients revealed by 2bRAD-M

Sen-Yuan Hong¹, Yuan-Yuan Yang¹, Jin-Zhou Xu¹, Qi-Dong Xia¹, Shao-Gang Wang², Yang Xun³

Affiliations + expand

PMID: 36153619 DOI: 10.1186/s12967-022-03639-6

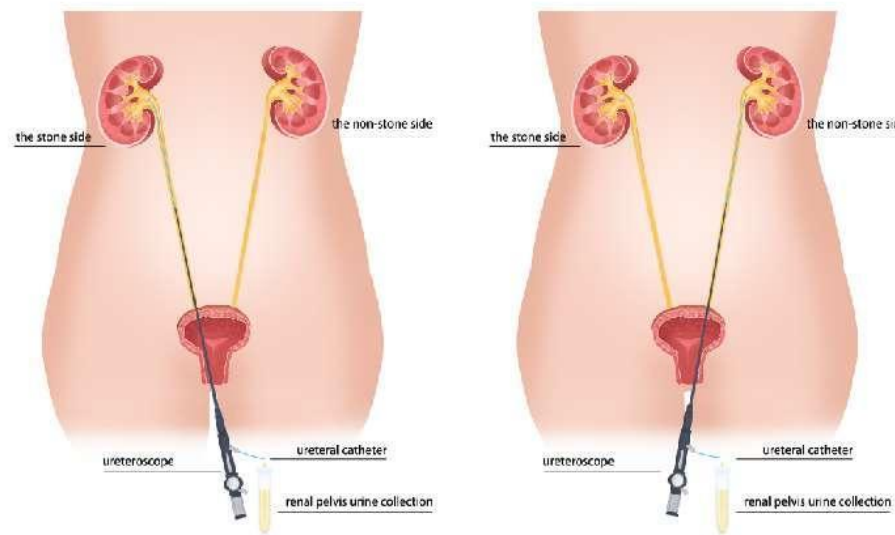
发表期刊： Journal of Translational Medicine

发表时间： 2022年9月

病例数： 30

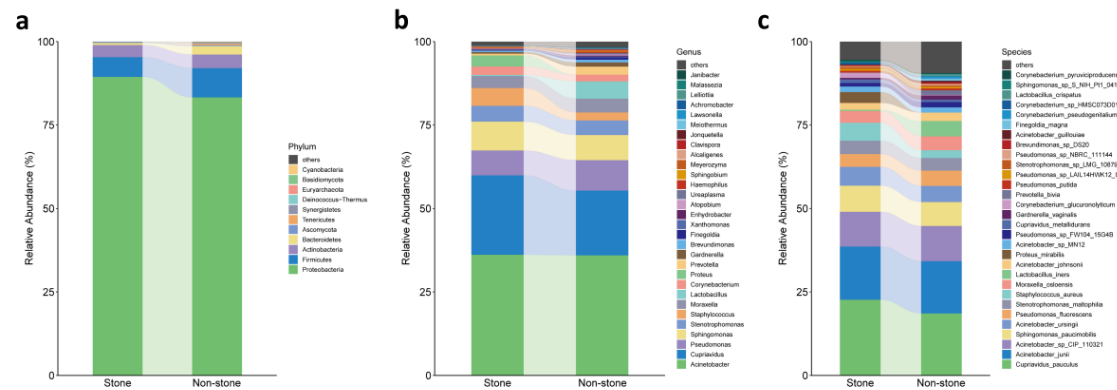
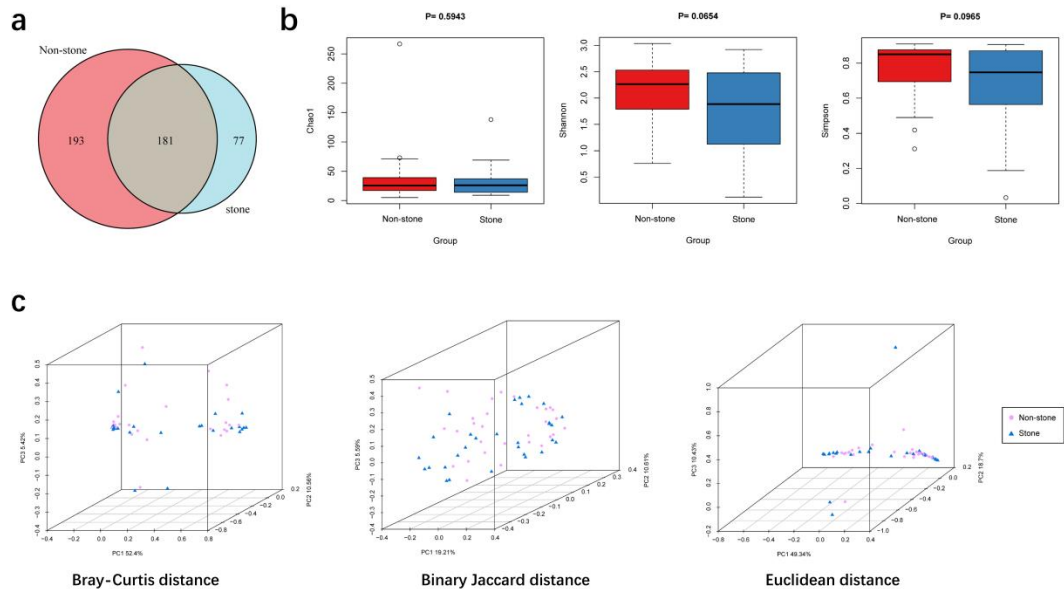
取样：

- 将输尿管镜插入肾盂结石中，将输尿管导管放入肾盂内收集肾盂尿液
- 收集5ml尿液，尿液样本在收集后1小时内存放在-80℃下。整个过程在无菌条件下进行。



肾盂尿收集示意图

结果1：肾盂尿微生物组的多样性

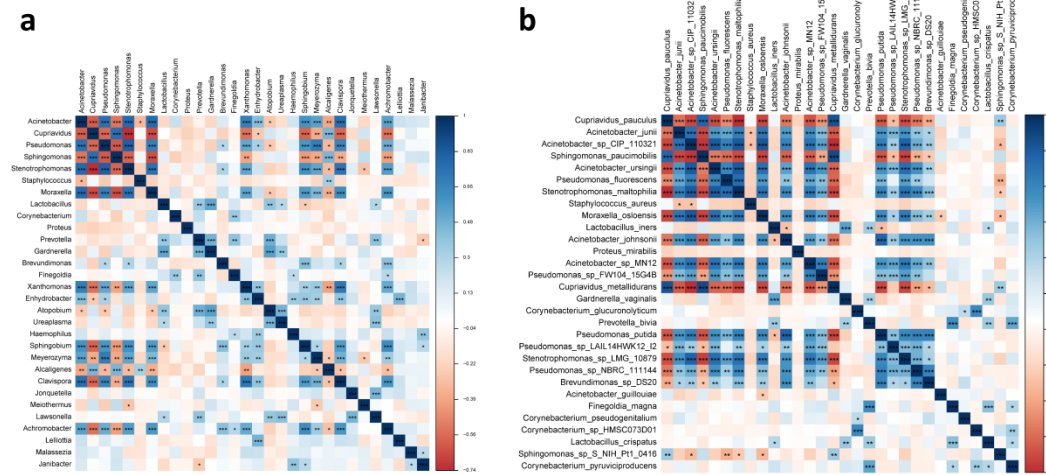
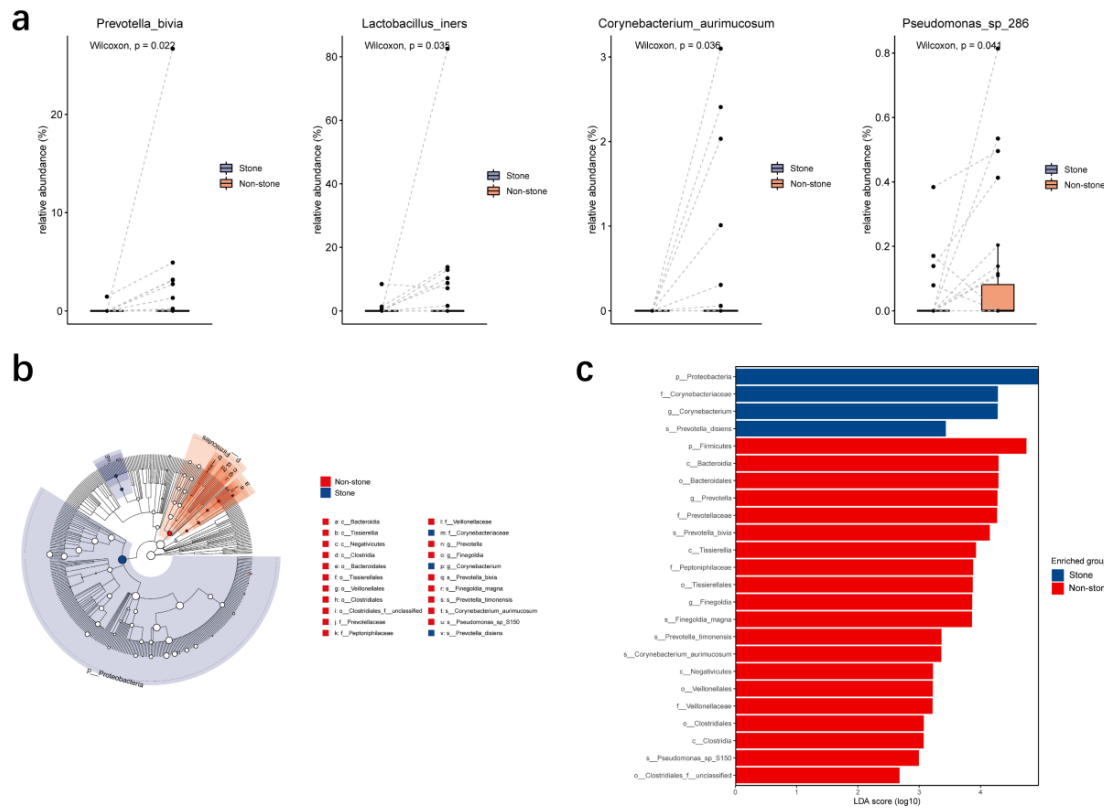


肾盂泌尿系统微生物多样性及结构差异。

两组细菌丰度及分布情况。细菌门(a)、最丰富的前30个属(b)和种(c)的相对丰度在barplot中表示

结石侧与非结石侧微生物群落组成相似

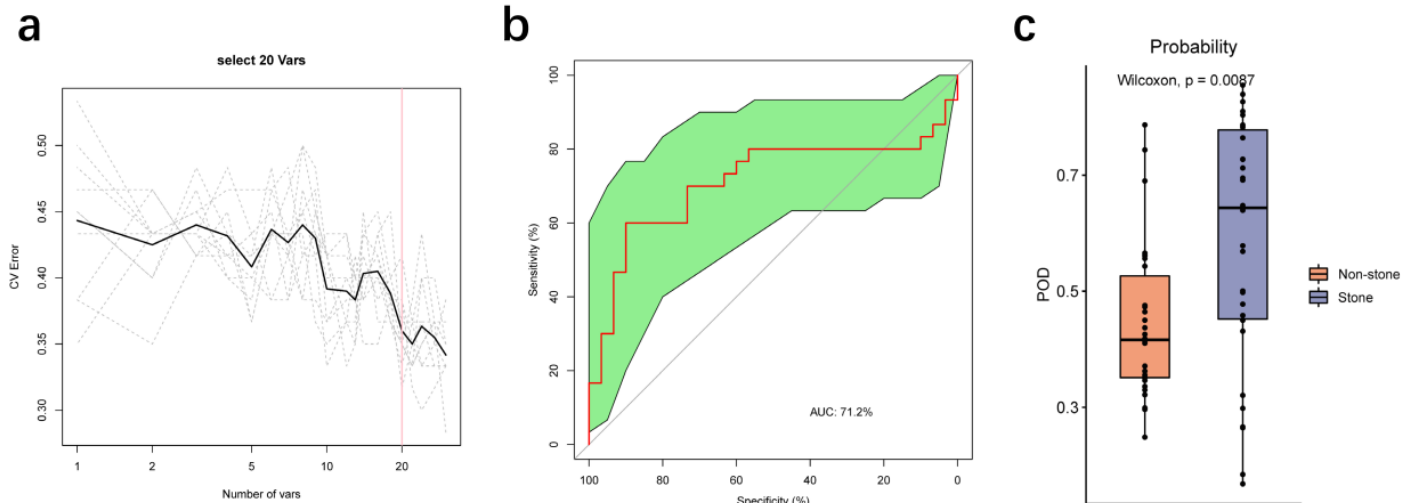
结果2: 结石与非结石侧的差异细菌类群



- 棒状杆菌属在结石侧增多，普氏菌属和乳酸菌属在结石侧降低。
- 种水平上，非结石侧的普雷沃氏菌、乳杆菌、金棒状杆菌和 *Pseudomonas sp_286* 更为富集。

丰度最高的不动杆菌属与几种条件病原体（寡养单胞菌、假单胞菌）正相关，与贪铜菌属和鞘脂单胞菌属呈现负相关。

结果3：种水平的标记物对结石状态进行分类



20个物种作为区分结石侧和非结石侧的最佳标记组合。



感谢各位的聆听

Your own Laboratory

——您的专属实验室

