|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 07.080 |
| CCS  | A 40 |

|  |
| --- |
|  3502 |

福建省厦门市地方标准

DB 3502/T XXXX—XXXX

人体肠道微生物16S rDNA
高通量测序方法

16S rDNA of human gut microbes
High-throughput sequencing method

2025 - XX - XX发布

2025 - XX - XX实施

厦门市市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc164956960)

[1 范围 1](#_Toc164956961)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc164956962)

[3 术语和定义 1](#_Toc164956963)

[4 缩略语 2](#_Toc164956964)

[5 检测条件 2](#_Toc164956965)

[6 样本采集、运输与保存 2](#_Toc164956966)

[7 样本的接收与处理 3](#_Toc164956967)

[8 检测步骤 3](#_Toc164956968)

[9 测序 4](#_Toc164956969)

[参考文献 6](#_Toc164956970)

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由厦门市科学技术局提出并归口。

本文件起草单位：厦门承葛生物科技有限公司、厦门市食品药品审评认证与不良反应监测中心、厦门承葛医学检验实验室有限公司、厦门市标准化研究院。

本文件主要起草人：何剑全、肖传兴、许艳稚、林爱强、梁银龙、张帮周、张金梅、陈鑫、吴水金、曹曼、陈瑀、甘煌灿。

人体肠道微生物16S rDNA检测
高通量测序方法

* 1. 范围

本文件规定了采用高通量测序方法进行人体肠道微生物16S rDNA检测的检测条件、检测试剂、检测仪器设备、样本采集、运输与保存、样本接受与处理。

本文件适用于运用16S rDNA高通量测序法进行人体肠道微生物中细菌的检测，亦可应用于其他动物肠道微生物中细菌的检测。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 39767—2021 人类生物样本管理规范

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 19495.4 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应（PCR）检测方法

GB/T 40974 核酸样本质量评价方法

GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

16S rDNA

细菌染色体上编码核糖体RNA亚基的一个基因，存在于所有细菌的基因组中。

高通量测序 high-throughput sequencing

能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术,通常一次测序反应能产生不低于100Mb碱基对的测序数据。

[来源:GB/T 30989—2014,3.19，有修改]

引物 primer

在DNA复制过程中，结合于模板链上并作为复制延伸的起始位点和/或终止位点的，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

[来源:GB/T 30989—2014,3.11]

扩增子 amplicon

DNA或RNA扩增后形成的一段核苷酸序列。

文库 library

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术等所得到的一个重建分子群,如基因组文库、互补DNA文库、噬菌体展示肽文库等。

[来源:GB/T 30989—2014,3.5]

可操作分类单元 operational taxonomy unit，OTU

具有特定功能特征或特定基因组特征的物种的集合。

1. 可以指生物分类学意义上的种，也可以指科、属等物种分类单元。

相对丰度 relative abundance

某一特定种类微生物在环境总微生物群落中所占的相对比例，通常以百分比表示。

1. 某OTU的相对丰度是样本中该OTU在样本总微生物群落中的相对比例。
	1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

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

RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）

rDNA：核糖体脱氧核糖核酸（ribosomal deoxyribonucleic acid）

* 1. 检测条件

实验室设施和设备要求应符合GB 19489中规定的二级生物安全防护水平。

实验室应根据不同工作内容划分独立区域，包括但不限于试剂储存和准备区、样本接收区、样本制备区、扩增区、文库构建区、测序区。区域间应设置明显标志，并做到防止污染，避免交叉污染。

实验室应具备的仪器设备包括但不限于：

1. 生物安全柜；
2. 核酸提取纯化设备；
3. 离心机；
4. PCR扩增仪；
5. 核酸荧光定量设备；
6. 毛细管电泳仪/凝胶电泳设备；
7. 高通量基因测序仪；
8. 计算机。

检测宜具备以下试剂盒及实验室用水。

1. 核酸提取试剂盒：用于粪便样本的核酸提取。试剂盒内至少包含：
	1. 裂解缓冲液；
	2. 结合与洗涤缓冲液；
	3. 洗脱缓冲液。
2. 扩增建库试剂盒：用于核酸样本的基因扩增及文库构建。试剂盒内至少包含：
	1. 扩增引物（含测序接头）；
	2. 高效扩增酶；
	3. 缓冲液。
3. 纯化试剂盒：用于核酸样本的纯化。试剂盒内至少包含：
	1. 洗涤缓冲液；
	2. 洗脱缓冲液。
4. 高通量基因测序试剂盒：用于对测序文库进行高通量基因测序。试剂盒内至少包含：
	1. 测序引物；
	2. 高效测序反应酶；
	3. 缓冲液。
5. 实验室用水：应符合GB/T 6682的规定且满足分子生物学的要求。
	1. 粪便样本采集、运输与保存
		1. 合规性要求

粪便样本的管理（采集、接收、储存、分发、包装、运输及废弃处置）应符合《中华人民共和国生物安全法》《人类遗传资源管理条例》《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》等生物样本相关法律法规要求。

粪便样本的采集应符合《个人信息保护法》的要求，加强保密管理，确保受试者信息安全。

* + 1. 粪便采集控制要求

排便完成后，应使用适宜的采样器在30min内完成样本采集，减少粪便暴露于空气中的时间。

粪便样本应至少多点采集，以降低采样误差。每个样本采集量至少1cm3大小。

* + 1. 粪便运输及保存控制要求

粪便样本的采集，若加了保护剂或稳定剂，可常温运输及保存。

粪便样本的采集，若未加保护剂或稳定剂，应确保运输及保存条件低于-20℃，且应避免反复冻融。

* 1. 粪便样本的接收与处理

粪便样本的接收与处理步骤如下：

1. 核对样本类型、数量、标签、唯一标识是否正确，样本容器是否正确、有无破损，样本保温状态（填充的保温物质是否仍有残留）；
2. 确认样本信息：受检者的身份信息，样本采集日期、时间及采集人；
3. 记录相关信息，保证样本的可追溯性。
	1. 样本检测
		1. DNA提取及质检

使用稳定可重复的方法提取粪便样本中微生物总DNA，宜采用核酸提取纯化试剂盒配合全自动核酸提取纯化仪进行样本中微生物总DNA提取。

按照GB/T 19495.3的方法检测DNA，每个样本DNA总质量应不少于100 ng，浓度不小于10 ng/μL，OD260/280范围为1.6～2.2。按照GB/T 40974的方法检测DNA样本的完整性，DNA应无降解或轻微降解。

* + 1. 16S rDNA扩增
			1. 扩增区域选择

应选择16S rDNA上一段连续的、在不同物种间变异程度较高的区域，且应包括至少一个高可变区。

长度应与测序方法相匹配，保证扩增子的全长都可以被测序到。

* + - 1. 扩增区域引物序列

扩增引物设计应用核酸序列保守区设计，并满足GB/T 19495.4的要求。

引物应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。

扩增子的片段长度应与扩增区域长度相符合，呈现良好的单峰形态。

常用16S rDNA的V4区域或V3～V4区域对人体肠道微生物16S rDNA进行检测。测序区域及其扩增引物序列参见表1。

1. 由于微生物的多样性，引物扩增区域在进行实际扩增时，碱基长度可能会有数个至数十个碱基的偏差。
2. 16S rDNA的各区域扩增引物序列及长度

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 |
| V1-V2 | 8F | AGAGTTTGATYMTGGCTCAG | 330 bp |
| 338R | TGCTGCCTCCCGTAGGAGT |
| V1-V3 | 8F | AGAGTTTGATYMTGGCTCAG | 525 bp |
| 533R | TTACCGCGGCTGCTGGCAC |
| V3 | 338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG | 195 bp |
| 533R | TTACCGCGGCTGCTGGCAC |
| V3-V4 | 338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG | 465 bp |
| 806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| V4 | 515F | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | 291 bp |
| 806R | GGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| V4-V5 | 515F | GTGCCAGCMGCCGCGG | 392 bp |
| 907R | CCGTCAATTCMTTTRAGT |
| V5-V6 | 784F | AGGATTAGATACCCTGGTA | 277 bp |
| 1061R | CRRCACGAGCTGACGAC |
| V6 | 967F | CAACGCGAAGAACCTTACC | 79 bp |
| 1046R | CGACAGCCATGCANCACCT |

* + 1. 文库构建与纯化

应根据不同的高通量基因测序仪选择不同的扩增建库试剂盒和纯化试剂盒。

扩增建库试剂盒应符合高通量基因测序仪所要求的测序接头及标签需求。

文库纯化后需匹配测序上机的核酸样本质量要求。

* + 1. 文库质检

应采用定量仪器（如酶标仪、分光光度计、荧光计）进行文库浓度和纯度检测。

文库样本质控并按照规定的使用量取样。混样后的文库集合可进行测序。

* + 1. 测序

测序应遵照高通量基因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。

测序策略应与文库大小相匹配，保证文库被全长测序。

测序条件应进行合理控制，使数据质量达到测序平台要求，错误率高于0.1％的碱基比例应低于15％。

* 1. 数据处理与分析
		1. 生成有效数据

人源序列在生成有效数据的过程中应被去除。

1. 有效数据指高质量的扩增子序列信息。

采用双端测序的，两端的测序序列应进行合理拼接，形成完整的扩增子序列。

在每条有效数据中，错误率高于0.1％的碱基占序列长度比例应低于15％。

每个样本的有效数据应不少于50000条。

* + 1. 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样本中可能存在的物种的16S rDNA序列。

1. 常用的数据库包括Greengenes、SILVA、EzBioCloud和NCBI等。

在基于不同的分析软件进行OTU聚类分析时，目标序列与数据库代表序列的相似性标准不低于97%。

1. 常用的分析软件包括usearch、qiime/qiime2、vsearch和mothur等。

基于不同的数据库，对每个样本的OTU进行物种分类学注释。

* + 1. 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。

若无特殊方法，有效的测序数据比对到对应的数据库上，可得到基因序列水平上的相对丰度分布情况。将注释到同一物种的基因序列相对丰度进行叠加，得到该物种的相对丰度结果。

* 1. 质量控制

实验方法的质量控制，应使用来自人源肠道且有资质的菌种配制成混合品或标准品，照上述步骤进行处理，并将测得结果与混合品或标准品的菌种组成和比例进行比较，以验证实验方法的可靠性和局限性。

当使用非全长扩增区域或多个测序单元拼接时，由于扩增序列并不能全面代表物种的16S rDNA全长序列，由此可能导致物种注释和相对丰度分析结果出现偏差，可配合采用其他检测分析方法进行校正。

参考文献

[1] GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程

[2] GB/T 35538-2018 高通量基因测序结果评价要求

[3] GB/T 40226-2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

[4] GB/T 41908-2022 人类粪便样本采集与处理

[5] 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).

[6] 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).

[7] Blekhman, R. et al. Common methods for fecal sample storage in field studies yield consistent signatures of individual identity in microbiome sequencing data. Sci. Rep. 1–5 (2016).

