

16s rRNA 高通量测序技术在人类医学中的应用进展

Application Progress of 16s rRNA High-Throughput Sequencing Technology on Human Medicine

杨溢 黄美 张琛 刘晓彤 王雅南 王雪梅 朱晓光

Yi Yang Mei Huang Chen Zhang Xiaotong Liu Yanan Wang Xuemei Wang Xiaoguang Zhu

康奥科技集团有限公司, 中国·天津 300011

Kang'ao Technology Group Co. Ltd., Tianjin, 300011, China

【摘要】 论文主要概述了 16s rRNA 高通量测序技术的特点、主要操作流程以及 Roche 454 GS Life Sciences 焦磷酸测序、Illumina/Solexa 聚合酶测序和 ABI Solid 连接酶测序 3 种测序技术的优势, 16s rRNA 高通量测序技术在口腔、肠道微生物种属鉴定的应用。

【Abstract】 This paper mainly summarizes the characteristics and main operation process of 16s rRNA high-throughput sequencing technology, the advantage of Roche 454 GS Life Sciences pyrophosphate sequencing, Illumina/Solexa sequencing polymerase and ABI Solid ligase sequencing, 16s rRNA high-throughput sequencing technologies applied in mouth, gut microbial species identification.

【关键词】 16s rRNA; 高通量测序; 微生物鉴定

【Keywords】 16s rRNA; high-throughput sequencing; microbial identification

【DOI】 <https://doi.org/10.26549/yzlcyxzz.v1i1.1189>

1 引言

16s rRNA 即 16s ribosomal RNA, 是原核核糖体 30S 小亚基的组成部分, 与 Shine-Dalgarno (SD) 序列结合。编码 16s rRNA 的基因称为 16s rRNA 基因。16s rRNA 是原核生物(细菌和古细菌)3 种 23s、16s 和 5s rRNA 的其中一种, 其大小约为 1500 个碱基。该基因区域既含有保守序列, 又含有可变序列, 在反映生物物种的亲缘关系的同时, 也揭示了生物物种的特征核算序列, 因此, 被用于鉴定原核生物的种属^[1]。

传统微生物研究方法主要是选择性培养或根据代谢特征、形态特征和抗原特征等进行鉴定和分类^[2]。这种方法局限于定量检测可培养的细菌, 因为有的细菌量很少, 培养不出来, 或现有的培养基和培养技术不适合微生物培养, 或有的细菌生长极为缓慢; 同时也不能鉴定未知的细菌, 这样就大大低估了正常菌群的数量和多样性^[3,4]。16s rRNA 序列分析技术是一种非培养分析技术, 能够快速鉴定出不能人工培养的微生物, 该方法的鉴定指标是以保守的 16s rRNA 序列为基准, 通过找到序列差异鉴定种属, 可以发现微生物新的种类。然而随着研究的不断深入, 16s rRNA 基因也逐渐表现出不可忽视的缺点, 即高保守性使其不能较好地地区分属内不同的物种, 在基因组内的多拷贝性也降低了确定其序列的准确性^[5]。正是由于

16s rRNA 基因的保守性, 许多研究对细菌的区分鉴别只能停留在“种”水平上, 无法进一步区分某些种系非常接近的菌种或同一菌种的不同菌株。而 16s~23s rRNA 基因间隔区 (ISR) 序列的进化速度是 16s rRNA 基因的 10 倍, 同一菌种不同菌株的基因间隔区是不同的, 可用于菌株的鉴别。同时研究者在原核生物的系统发育中使用其他不同的看家基因 (gyrB、secA1 等) 进行研究, 来弥补 16s rRNA 序列分析的不足。如 Gemma Carrasco^[6]应用 gyrB 来提高对 10 种诺卡菌属的鉴定。

2 16s rRNA 高通量测序技术简介

随着分子生物学的进一步发展, 许多学者和科学家们研究出各种新兴的菌种鉴定方法, 如克隆文库构建、变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、末端限制性片段长度多样性、实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 宏基因组学以及高通量测序技术。高通量测序技术是新一代的非培养分子生物学技术。

基于 16s rRNA 测序的高通量组学技术, 具有以下特点: ①每次能研究同一样本中多种微生物; ②可以对样本中微生物进行高灵敏度的精确定量; ③可以获得整个微生物群落的信息并进行分类学鉴定。其技术的主要操作流程包括: ①提取

样本中微生物总基因组;②选择合适的引物进行 PCR 扩增;③根据实际情况选择测序平台测序;④生物信息学分析,包括操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类、物种分类和多样性分析。

目前,高通量测序主要包括 Roche 454 GS Life Sciences 焦磷酸测序、Illumina Solexa 聚合酶测序和 ABI Solid 连接酶测序 3 种测序技术^[7,8]。而在 16s rRNA 测序方面, Roche 454 GS Life Sciences 焦磷酸测序(特别是 Roche 454 FLX 技术)、Illumina Solexa 聚合酶测序(特别是 Illumina 公司的 Hiseq 和 Miseq 技术)应用最广泛。许多研究者如 LUO C 等^[9]对这两种测序技术的优势和不足进行了比较。454 FLX 技术测序长度较长,可以达到 400~500bp,如 16s rRNA 片段的 V4~V5 区或 V3~V5 区,但是每个样品的数据大约为 1~2 万个序列。测序片段越长,物种鉴定的准确度越高,就越能真实地反映样品中微生物物种的组成。Hiseq 技术测序长度只有 100bp,但是每个样品可获 10~100 倍 454 FLX 技术测序的序列数。Miseq 技术测序,单端测序长度可达 250bp,每个样品可测定 4~6 万个序列,测序时间短,价格较低。通常 Hiseq 和 Miseq 技术应用双端测序,每个样品最后可获得 40~100M 条序列,足以后续分析样品中的生物信息。生物信息学分析是高通量测序研究样本中微生物生态学的重点和难点,不仅仅需要专业的人员进行精准的专业操作,还更需要通过一系列工具和资源将海量数据翻译成具体群落的多样性信息,其主要内容包括数据预处理、测序错误校正、OUT 聚类、物种分类、a 多样性分析和 B 多样性分析。

3 16s rRNA 高通量测序技术应用于口腔微生物鉴定

人类口腔是一个复杂的生态环境,其中寄居着病毒、细菌和真菌等微生物,而细菌就多达 1000 种^[10],他们形成复杂而稳定的微生物群落结构,与宿主形成一种微妙的关系。然而这种稳定的微生物群落一旦丧失,就会导致少数致病物种的过度增长,进而影响宿主的整体或局部的改变,即发生病变。几种口腔传染性疾病中最常见的是龋齿和牙周炎。而牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、具核梭杆菌、变异链球菌等细菌与龋齿、牙周炎的发生均有着紧密的联系^[11]。因此,正确了解口腔微生物群落结构是研究致病菌致病机理的基础,也是预防疾病的发生与发展的重要手段之一。Al-hebshi 等^[12]严格筛选 12 名健康

年轻人并获得口腔唾液,选取细菌 16s V1~V3 高变区应用 454 焦磷酸 FLX 测序平台测序,最终共鉴定 557 个种水平的分类单元,122 个属,13 个门;核心菌群包括 55 个种水平的分类单元,30 个属,7 个门,即厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、Saccharibacteria 菌门和 SR1 菌门。KC Anukam 等^[13]利用 Illumina MiSeq 测序平台对 8、28、58 岁三个不同年龄段女性的口腔样本的 DNA 进行测序,辛普森指数分别为 7.42、6.95 和 7.74,共检测出 85 个种、70 个属、12 个门,而 8 岁样本中流感嗜血杆菌所占比例最高,28 岁样本中副流感嗜血杆菌所占比例最高,58 岁样本中嗜热链球菌所占比例最高。

4 16s rRNA 高通量测序技术应用于肠道微生物鉴定

人类肠道菌群与人体肠道功能、免疫功能和营养代谢密切相关。健康的肠道菌群不仅涉及参与从膳食成分中提取能量、维生素合成、免疫系统组成原则等,还能防止胃肠道病原体的定植^[14~17]。但是在现实生活中,在机体免疫力的改变、广谱抗菌药物的使用、微生态制剂等因素的作用下,肠道中正常菌群的构成和丰度发生变化,最终导致疾病的发生。Almonacid 等^[18]选取了 897 个健康个体的粪便样本,选用 28 个与临床相关的肠道细菌 16s rRNA 靶点序列,应用 Illumina Nextseq500 测序平台分析粪便样本微生物的构成和丰度,最后建立一种与临床相关的肠道健康微生物群落参考范围,为临床上相关疾病的诊断与治理提供一种有效的途径。Alcon-Gine 等^[19]优化了极低体重儿肠道微生物群落 16s rRNA 基因序列分析法,结果表明,选取 16s rRNA 可变区域的(V1+V2+V3)和(V6+V7+V8)序列比(V4+V5)序列在鉴定肠道微生物的种属方面更具有代表性。

同时,许多研究者通过对比分析患者肠道微生物群落与健康人群之间的差异来研究与疾病发生相关的微生物菌种。Xingming Deng 等^[20]应用 Illumina Hiseq2500 测序平台对 69 个粪便样本中微生物 16s rRNA 测序分析,这 69 个样本分别来自于健康个体、结直肠癌(CRC)患者和手术或化疗过的 CRC 患者,结果表明,在 CRC 患者的抗癌治疗中,某些细菌群的存在或缺失可能起着关键作用,因此,观察 CRC 患者菌群中物种特异性变异可能会导致现有外科或化疗方案的发展和优化。姜洋等^[21]也采用高通量测序技术检测溃疡性结肠炎(UC)

和正常人群的肠道菌群分布,分析与 UC 形成和发展密切相关的菌属种类和丰度,以便利于 UC 的研究和相关药物的开发。

5 结语

随着分子生物学技术的快速发展,16s rRNA 高通量测序技术也在不断进步。同时,越来越多的研究者将此技术应用于不同领域,尤其是在医学领域。更多的医学研究者希望将更先进更快捷的方法应用于疾病诊断及疾病预防中。16s rRNA 高通量测序技术近年来发展迅速,其主要应用于各种生态环境中微生物菌种的鉴定以及菌种的多样性。然而其只能在属种水平上区分微生物,局限于属种水平以下的分级鉴定。因此,16s rRNA 高通量测序技术需要结合其他分子生物学技术,准确地鉴定微生物的种类,为人类健康的精准治疗与预防提供有力依据。

参考文献

- [1] Delong E.F., G.S. Wickham.N.R. Pace. Phylogenetic Stains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Cells[J].*Science*,1989,243(4896):1360-1363.
- [2] Woese C.R., O. Kandler.M.L. Wheelis. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1990,87(12):4576-4579.
- [3] 姜静,杨圣辉,王松灵.16SrRNA 基因及 16S-23SrRNA 基因间隔区在口腔微生物鉴定中的应用[J].*北京口腔医学*,2006,14(4):297-299.
- [4] 黄菁华.16s rRNA 基因检测技术在肠道微生态研究中的应用[J].*猪业科学*,2006,23(8):49-51.
- [5] 牟丽丽,涂云华,明春艳,等.几类主要病原需氧放线菌菌属的 SecA1 基因分析研究[J].*中国人兽共患病学报*,2016,32(4):349-355.
- [6] Carrasco G., S. Valdezate, N. Garrido, et al. gyrB Analysis as a Tool for Identifying Nocardia Species and Exploring Their Phylogeny[J]. *Journal of Clinical Microbiology*,2015,53(3):997-1001.
- [7] Lindahl B.D., R.H. Nilsson, L. Tedersoo, et al. Fungal Community Analysis by High-Throughput Sequencing of Amplified Markers a user's Guide[J].*New Phytologist*,2013,199(1):288-299.
- [8] 岳桂东,高强,罗龙海,等.高通量测序技术在动植物研究领域中的应用[J].*中国科学:生命科学*,2012(2):107-124.
- [9] Luo C., D. Tsementzi, N. Kyrpides, et al. Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample[J].*Plos One*,2012,7(2):30087.
- [10] Huse S.M., Y. Ye, Y. Zhou, et al. A Core Human Microbiome as Viewed through 16s rRNA Sequence Clusters [J].*Plos One*,2012,7(6):34242.
- [11] Ouhara K., H. Komatsuzawa, S. Yamada, et al. Susceptibilities of Periodontopathogenic and Cariogenic Bacteria to Antibacterial Peptides, β -defensins and LL37, Produced by Human Epithelial Cells [J].*J Antimicrob Chemother*,2005,55(6):888-896.
- [12] Noor A.H.N., A. Ahmed, A. Ahmed, et al. Species-Level Core Oral Bacteriome Identified by 16s rRNA Pyrosequencing in a Healthy Young Arab Population [J].*Journal of Oral Microbiology*,2016(8): 31444.
- [13] KC Anukam N.A. A Comparative Study of the Oral Microbiome Compositions of Healthy Postmenopausal, Premenopausal, and Prepubertal Nigerian Females, Using 16s rRNA Metagenomics Methods[J].*Nigerian Journal of Clinical Practice*,2017,20(10):1250-1258.
- [14] Sonnenburg J.L..F. B?ckhed.Diet Microbiota Interactions as Modulators of Human Metabolism[J].*Nature*,2016,535(7610):56-64.
- [15] Round J.L..S.K. Mazmanian. The Gut Microbiota Shapes Intestinal Immune Responses During Health and Disease [J].*Nature Reviews Immunology*,2009(9):313.
- [16] Leblanc J.G., C. Milani, G.S. de Giori, et al. Bacteria as Vitamin Suppliers to their Host: a Gut Microbiota Perspective [J].*Current Opinion in Biotechnology*,2013,24(2):160-168.
- [17] Stecher B..W.D. Hardt. Mechanisms Controlling Pathogen Colonization of the Gut[J]. *Current Opinion in Microbiology*,2011,14(1): 82-91.
- [18] Almonacid D.E., L. Kraal, F.J. Ossandon, et al. 16s rRNA Gene Sequencing and Healthy Reference Ranges for 28 Clinically Relevant Microbial Taxa from the Human Gut Microbiome [J].*Plos One*, 2017,12(5):176555.
- [19] Alcon-Giner C., S. Caim, S. Mitra, et al. Optimisation of 16s rRNA Gut Microbiota Profiling of Extremely Low Birth Weight Infants[J]. *Bmc Genomics*,2017,18(1):841.
- [20] Deng X., Z. Li, G. Li, et al. Comparison of Microbiota in Patients Treated by Surgery or Chemotherapy by 16s rRNA Sequencing Reveals Potential Biomarkers for Colorectal Cancer Therapy[J].*Frontiers in Microbiology*,2018(9):145.
- [21] 姜洋,赵秋枫,王实,等.基于 16S rRNA 序列分析肠道菌群失调与溃疡性结肠炎的相关性[J].*世界华人消化杂志*,2017,25(36):3191-3202.