

# 团 体 标 准

T/SZGIA 1.2-2018

---

## 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

2018-01-30 发布

2018-01-31 实施

---

深圳基因产学研资联盟 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

本标准规定了人粪便微生物宏基因组检测的术语和定义、规范性引用文件、术语和定义、微生物宏基因组、稳定剂、碱基识别质量、检测方法、结果判定和报告。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的实施是必不可少的。凡引用本文件中的规范性文件，仅适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.2-2004 水质 粪大肠菌群数的测定 滤膜法

GB/T 19495.3-2004 水质 粪大肠菌群数的测定 多管发酵法

GB/T 19495.5-2004 水质 粪大肠菌群数的测定 多管发酵法 PCR

GB 19489-2008 出口危险货物包装检验安全规范 性能检验

SNT 2497.21-2010 出口危险货物包装检验安全规范 性能检验 21 分钟凝固法

SZTT/SZGIA 1-2016 出口危险货物包装检验安全规范 性能检验 1 分钟凝固法

## 3 术语和定义

### 3.1

微生物宏基因组 microbial metagenome

从环境中提取的总DNA，分其基因组、转录组、功能基因组及代谢组。

### 3.2

稳定剂 stabilizer

保持样品稳定性的化学试剂。

### 3.3

碱基识别质量 quality of base calling

碱基识别的准确性，以值表示。识别与识别无关可公 (1) :

$$Q = -10 \times \lg P \dots \dots \dots (1)$$

中:

$Q$ ——识别;

$P$ ——识别错误的比例, 即单碱基识别错误的比例。

### 3.4

#### Q20

中，别值于20占例。

### 3.5

#### Q30

中，别值于30占例。  
：别值为30，准为99.9%以上。Q30≥85%，则中85%以上值于30。

### 3.6

#### 直接裂解法 direct lysis method

冲中，化DNA。

### 3.7

#### 间接提取法 indirect extraction method

先从中分出，取DNA。

## 4 缩略语

下列于件。

DNA——(deoxyribonucleic acid)

bp——(base pair)

## 5 主要试剂

别，准剂为分化剂。

### 5.1 DNA 取 剂

### 5.2

### 5.3 剂

### 5.4 剂

：分：化剂一，于二，为光，其低于优，于优，于分  
一，作，一、剂。化剂：关化，以及临、医  
剂。

## 6 主要设备和材料

### 6.1 仪

### 6.2 分光光

### 6.3 仪

6.4 凝 像

6.5 低 冰 : -20 -80

## 7 检测方法

### 7.1 检测对象

人 便 中 。

### 7.2 检测要求

及伦 。

### 7.3 样品采集、保存与运输

为 便 、保 与 ，使 便 中 不受 ，保  
准 可 ， 便 、保 与 参 准。  
便 则：使 净 便， 便 即刻 ， 免 中 便  
、 其他分 ( ) 。  
使 便 两 便 、保 与 准  
参 7.3.1 与 7.3.2。

#### 7.3.1 粪便杯采集法

##### 7.3.1.1 采集

使 净 便， 保 中 、 其他分 ( ) 。 便  
即刻使 一 便 取 勺 便 中 取 ， 便从 净 便 ， 刻  
。 个 便 中  $2\text{ cm}^3$  体 便 。

##### 7.3.1.2 保存与运输

便 便 ， 即 于 冰 -80 保 。 不 即刻 上 保 ， 可  
于4 4 以下 ( 冰 ) ， 30分 内 冰 -80 保 。  
冰 件下 。

#### 7.3.2 含稳定液自采样套装采集法

##### 7.3.2.1 采集

使 净 便， 保 中 、 其他分 ( ) 。 便  
即刻 作 取中 便， 便 剂 保 中，  
使 全 便 ， 。

##### 7.3.2.2 保存与运输

保 ， 保 作 可于 保 ， 免 光 。  
不 作 保 。 出 作  
便保 -80 冻 ， 冰 件下 。

## 7.4 检测步骤

### 7.4.1 实验室条件

1) 于人 便

GB 19489-2008 GB/T

19495.2-2004。

2) GB/T 6682。

3) 不作内划分区，剂储准区，制区，区，各区免交叉。

#### 7.4.2 样品接收与处理

1) 号，信，不严重，其他分（），则。准关信（可参A），保可。

2) 使可取便中DNA。取取取，使DNA取剂便DNA取。

#### 7.4.3 DNA 样品判定标准

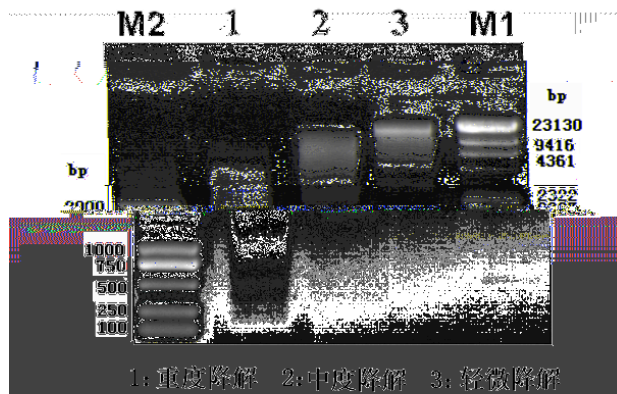
便取DNA，依 GB/T 19495.3-2004 GB/T 19495.5-2004 DNA，1判准区分其。

表1 DNA 样品质量判断标准

				判
DNA	$m \geq 2.0 \mu\text{g}$	$c \geq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$		A
	$1.0 \mu\text{g} \leq m < 2.0 \mu\text{g}$			B
	$m < 1.0 \mu\text{g}$	$c \leq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$	中	C

- 1) m— (total mass) 写，DNA；
- 2) c— (concentration) 写，DNA；
- 3) A  $m \geq 2.0 \mu\text{g}$ ,  $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , 三个件，；
- 4) B  $1.0 \mu\text{g} \leq m < 2.0 \mu\text{g}$ ,  $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , 三个件，；
- 5) C  $m < 1.0 \mu\text{g}$ ,  $c \leq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , 中三个件其中之一以上，不全。

DNA 光仪 DNA，SNT 2497.21-2010 DNA，判准下1。



#### 1 DNA

- 1) 中主，严，1。
- 2) 中可 14000bp 右主，，2。
- 3) 中可 20000bp 右主，，3。

#### 7.4.4 文库构建与高通量测序

使用试剂，台参 SZTT/SZGIA 1-2016。

1 判 准， 2 DNA 。

表2 建库测序选择标准

DNA 别	
A	
B	
C	不全，取 DNA

#### 7.4.5 数据处理

到原，制，去人列，人列，再信分。

#### 7.4.6 数据分析

分 SZTT/SZGIA 1-2016。

#### 7.4.7 数据质控要求

##### 7.4.7.1 质量要求

，个DNA可值下：  
1)  $Q20 \geq 90\%$ ，90%以上值于20；  
2)  $Q30 \geq 80\%$ ，80%以上值于30。  
：仅于不300bp列。

##### 7.4.7.2 数量要求

为保信分准，个可人列（即单列，双列），于 $1 \times 10^7$ 。

#### 7.4.8 结果与报告

以上，中及各分丰。

##### 7.4.8.1 检测报告应包括下列信息：

1) ， ， ， ， ；

各 出 准 全 ； 准 各 丰 值 动 于  
于 值  $\pm 20\%$ ， 判 “优 ”； 动 于 值  $\pm 20\%$ ， 于 值  $\pm 50\%$ ，  
判 “ ”； 动 于 于 值  $\pm 50\%$ ， 判 “ ”。

#### 7.4.8.3 局限性描述

各 作 以及可 任何 ，也 准 为 可供



附 录 A  
(资料性附录)  
样品信息单

信	公司: _____ 单号: _____ : _____ 件人: _____ 件人 : _____ : <input type="checkbox"/> 冰 <input type="checkbox"/> 冰 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 其他: _____		
	人*		人
	人 *		人单位
	传 *	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ( 传 : _____ ) <input type="checkbox"/>	
	* *	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> P2 ( 全 ) : 便 传 、 , P2 中 关 ; 便 传 传 , P2 中 关 。	
	取 *		
	信	信	写 准
	*		1. 一化以区分其他 ; 2. 可 及 ; 不 包 “_”、“-”、“#”、“%”、“/”, “&” “*” 号。 3. 人体 关 不 包 任何可 别个体 份 信 。
	*		包 : DNA、 冻 便、 剂
	*		, - - “yyyy-mm-dd” , 可 到 份 份。例 : 2017-01-23, 2017-01 2017。
	*		信 包 份信 。 例 : 中 东 。

:

- 1) 便 及 关 。
- 2) 信 准参 准 (Genomic standards consortium, <http://gensc.org/>) 关 准。
- 3) “\*” 为 。

B  
( )  
准

B.1 标准样品的选择

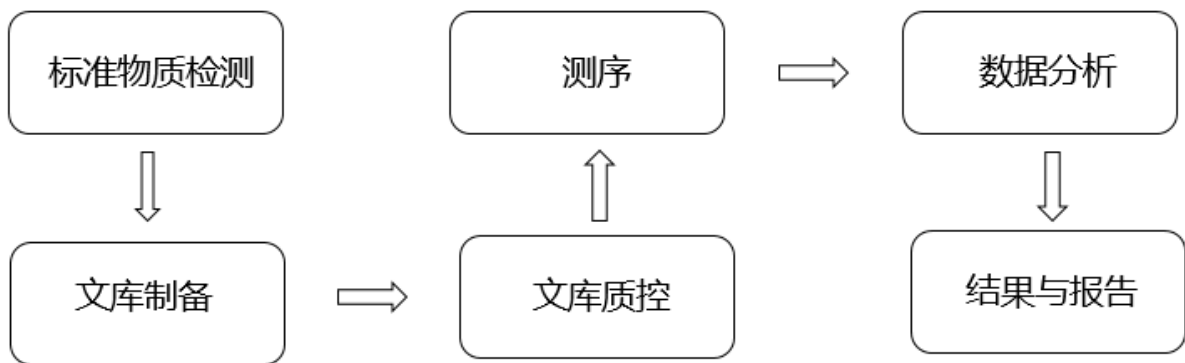
准、可且参列信DNA。准中使  
准为取DNA、例DNA，包但不  
于 B.1。

B.1 准

中	丁	号	兰	GC%
伊乳	<i>Lac bac</i>	JCM 1112		38.9
	<i>D a ca a</i>	JCM 11232		41.4
	<i>R b a a</i>	DSM 16841		41.9
	<i>R b a</i>	DSM16839		48.5
	<i>E c c a c</i>	MG 1655		50.8
单	<i>A a</i>	JCM 8355		59.7
	<i>C a a ac</i>	JCM 10188		60.5

B.2 标准物质宏基因组检测技术路线

B.1 准 作



：分使下

- 1) 低列：全准 90%以上且 于 于 30bp 列作为 列予以保 ；
- 2) 去人列：件 soap2(version 2.21) bowtie2(version 2.2.9) 列与人 参 列 Hg19 ， 与人 列 ≥90%以上 列作为人 列去 ， soap2(version 2.21) 件关 参 ： -M=4 -l=30 -v=7 -r=1 -c=0.9； bowtie2(version 2.2.9) 件使 --very-sensitive ， 其余参 使 ， 列仅 出一 优匹 ；
- 3) 件 soap2(version 2.21) bowtie2(version 2.2.9) 去人 列 人 列与 准 7个 参 列 ， soap2(version 2.21)关 参 ： -M=4, -l=30, -v=5, -r=1, -c=0.95； bowtie2(version 2.2.9) 件参 使 ， 列仅 出一 优匹 ；
- 4) 丰 ： 到单个 列 占 上 准 中任一 列 例。

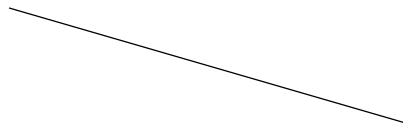
( C )  
准

信						
台						
列 (M)						
列 (G)						
Q20						
Q30						
分						

- 1: 去主 列 到参 上 例;  
2: 去主 列 区 例。

准

与



: A- 丰 ; δ- 丰 与 丰 偏 , 公 为 ( 丰 - 丰 ) / 丰 。

1. Handelsman, J., Rondon, J. B., Ceballos, G. R., Rojas, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown microbial products. *Chemical Biology*, 6(12), R245–R249 (1998).
2. Lauber, C. L., Zhou, N., et al. Field conditions on the assessment of microbial community structure. *FEMS Microbiology Reviews*, 86(1), 80–86 (2012).
3. Bergström, C., Ho, G. T. & Lees, C. A. High-throughput sequencing: Commentary. *International Journal of Microbiology*, 2012, 1–12 (2012).
4. Tang, W. H. W., Grice, S. E., et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7427), 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), 1–7 (2012).
6. Hale, V. L. et al. Effects of field conditions on fecal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 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. *Journal of Parasitology*, 146, 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. *Scientific Data*, 5, 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. *Scientific Reports*, 6, 1–5 (2016).
10. Methé, B. et al. A framework for human microbiome research. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 215–221 (2012).