

华大智造基于DNBSEQ-E25测序平台的 16S rDNA测序应用赋能南海深海微生物 组研究

深海中的极端环境为生命科学、材料科学等领域提供了独特的研究条件，可以更好地理解地球生命起源和多样性¹。华大集团联合中国科学院深海科学与工程研究所、上海交通大学、香港科技大学等单位，赴南海冷泉区域进行深潜科考，并基于华大智造DNBSEQ-E25平台的16S rDNA测序技术完成了深海沉积物样本的微生物群落分析，检出了人类未培养过的细菌和古菌，为深入了解深海重要微生物类群的生物地球化学机制提供重要的参考。

推荐应用：海洋环境微生物组

推荐机型：DNBSEQ-E25RS

- 检测快速

ATOplex 16S V4 rDNA建库试剂套装搭配PE150测序和自研的MetaSIS分析软件，采样后当天即可出报告。

- 物种监测范围广

监测物种涵盖细菌、真菌、藻类、植物、浮游动物、底栖动物和鱼类，充分满足各种应用需求。

- 不惧海上颠簸

DNBSEQ-E25独有的抗颠簸设计，可在海上提供可靠精准的测序数据

- 一站式产品方案

此组合产品集成核酸提取、文库制备、测序和分析全流程产品，真正的一站式产品方案。

- 自动化程度高

搭配自动化核酸提取仪、自动化样本制备系统及分析软件，可实现自动化样本制备及数据分析，最大程度减少了人工介入。



背景介绍

环境DNA测序技术是通过对环境介质（水、土壤、沉积物等）中的生物DNA进行测序，实现对生物群落的定性和丰度分析，并利用生物个体、种群或群落对环境变化所产生的反应来评估环境状况，是评估生态环境状况和生物多样性的重要手段，也是环境科研领域的重要工具。高通量测序的灵敏度优势可以对环境中含量极低的DNA实现检测²。

深海指的是海平面1000米以下的区域，这是一个黑暗、寒冷和高压的环境，长期被认为不适合生物生存，被称为“生命的禁区”。然而，在某些区域，如冷泉区或热液喷口，富含硫化氢或甲烷的流体被排放到深水中，这些化学物质为共生微生物提供了能量来源。深海蕴藏着丰富的资源，包括矿产资源、生物资源等。随着陆地资源的日益枯竭，深海成为新的资源开发前沿。深海生态系统对地球环境也具有重要影响，了解和保护深海环境，对于维持全球生态平衡和应对气候变化具有重要意义³。

海马冷泉位于南海琼东南海域，是目前我国发现最大的深海冷泉生态系统之一，为研究我国南海深海生物多样性与演化等科学问题提供了重要场⁴。近日，华大集团联合多家科研单位，赴南海冷泉区域进行深潜科考，并基于华大智造DNBSEQ-E25平台的16S rRNA测序产品方案完1例深海底泥样本的微生物群落测序分析，检出了人类未培养过的细菌、古菌，如绿弯菌、酸杆菌、变形菌等，并进行了功能基因注释，为深入了解深海重要微生物类群的生物地球化学机制提供重要的参考。

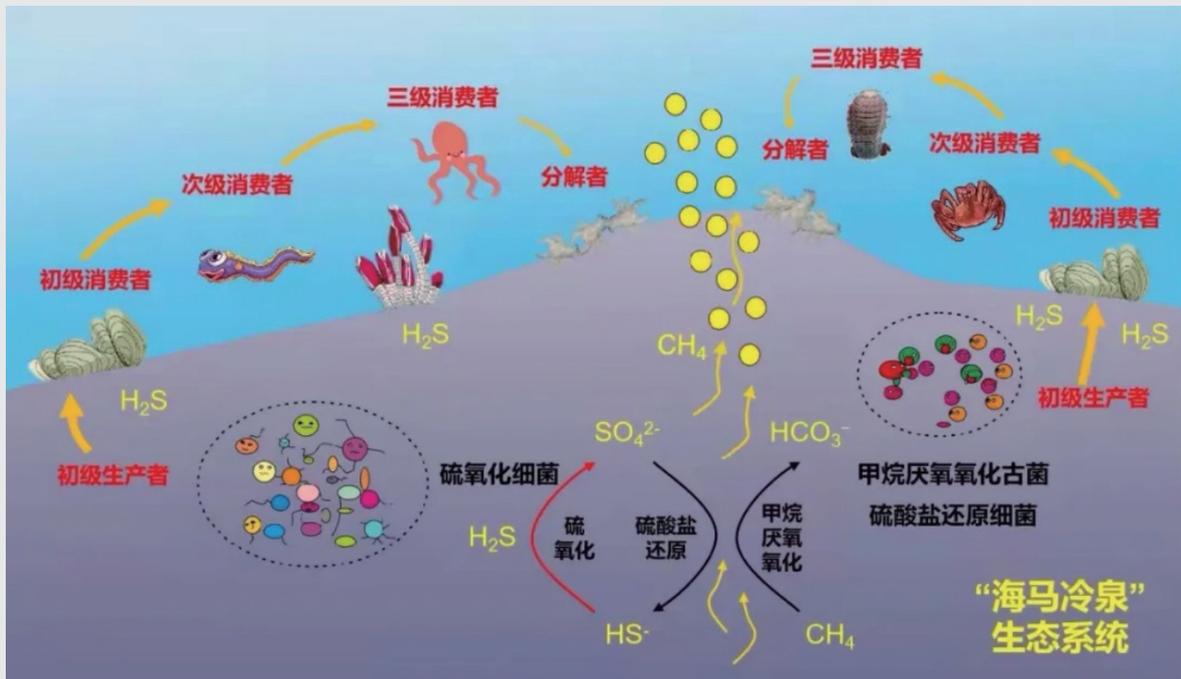


图1. “海马冷泉”生态系统⁴

研究概述

为研究深海冷泉的微生物群落在地球化学耦合反应过程能够产生哪些物质，从而构成生命起源最原始的元素。华大集团深海科研团队，搭乘载人潜水器“深海勇士”号⁵，在南海海马冷泉和甘泉海台等区域下潜至千米以下的海底采集沉积物样本，并基于ATOPlex 16SV4 rDNA建库试剂盒套装和DNBSEQ-E25RS测序平台完成了16S V4区域测序，测序数据经MetaSIS软件分析，检出了人类未培养过的细菌和古菌，如绿弯菌，酸杆菌，变形菌等，并进行了功能基因注释。为深入了解深海重要微生物类群的生物地球化学机制提供重要的参考。



图2. “华大科考团队搭乘“深海勇士”号潜水器在海马冷泉等区域进行作业



图3. 科考船上搭载的华大智造测序设备

研究方法

样本采集

通过“深海勇士”号载人潜水器在海底使用定制的 Pushcore 采集沉积物柱子，在实验室将沉积物柱固定到定制的沉积物分样器上，人工分装到无菌的容器中，于 -80°C 冰箱保存。

文库制备及测序

使用华大智造 MGIEasy 环境 DNA 提取试剂盒搭配 MGISP-NE32 自动化核酸提取纯化仪对沉积物样本进行核酸提取。使用 ATOPlex 16S V4 rDNA 建库试剂盒将提取所得的 DNA 样本和对照用的标准品制备成 PCR 文库，再进行环化和 DNB 制备，最后在 DNBSEQ-E25 平台上测序，测序读长为 PE150。值得关注的是，该流程在样本量较大的情况下，可搭配使用华大智造的自动化提取和建库平台，可极大的节约人力并提高效率。

样本编号	原始编号	来源
Sample-1	SPL240724174820-1	标准品
Sample-2	SPL240724174820-2	标准品
Sample-3	SPL240724174820-3	深海沉积物
Sample-4	SPL240724174820-4	深海沉积物

表1. 样本信息

生信分析

测序数据经拆分 Barcode 后用 MetaSIS 软件进行分析，软件首先会对 Raw Data 进行处理得到 Clean Reads, 再进行 OTU Cluster and Filter, 最后进行深度分析，分析内容包括 OTU 分析、物种组成分析、功能基因预测、Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析等。



图4. 华大智造环境DNA宏条形码测序组合产品

研究结果

DNBSEQ-E25测序质量表现优异

虽然是在海上进行测序，但是从表2和图5可以看到，不管是标准样品还是深海沉积物样本，DNBSEQ-E25平台都产出了质量优异的测序数据，Q30>96%，数据产量>29 M reads，完全满

足下游深度分析的需求，说明DNBSEQ-E25测序平台完全不受海上颠簸的影响，依然能够稳定且高质量地完成测序。

质控指标	数值
TotalReads(M)	29.43
ESR%	88.25
Q30%	96.89
SplitRate%	93.72
CycleNumber	320

表2. 测序数据质控信息

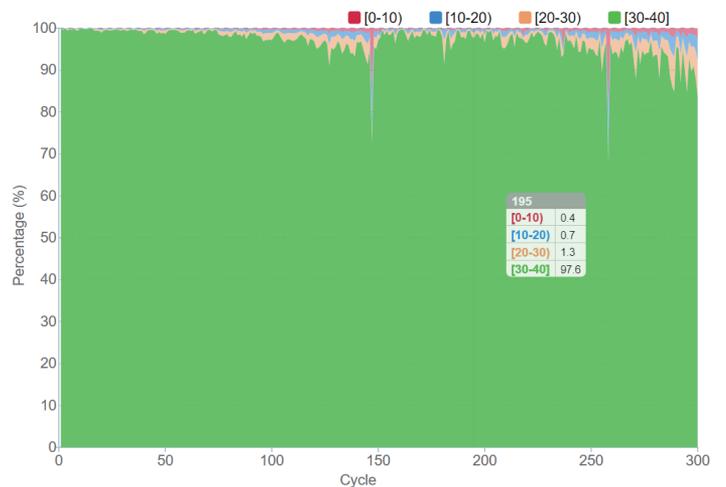


图5. 碱基测序质量分布图

样本OTU分析

OTU是在系统发生学或群体遗传学研究中，为了便于分析，给某一个分类单元设置的统一标志⁶。MetaSIS软件将相似度在100%的序列聚类为一个OTU。在得到OTU后，使用QIIME 2模块将OTU序列与注释数据库进行比对注释，获得其在不同分类水平上的物种识别结果。通过对 OTU 的物种识别统计，得到了在不同分类水平上（由界、门、纲、目、科、属、种组成）各个样品的生物群落组成数量，如表3所示。

物种组成分析

在不考虑丰度的前提下，基于所有样品的物种识别结果，用GraphlAn模块生成物种组成可视化图形，如图6所示。该图可以直观地对样品各分类水平物种组成进行总体可视化展示，帮助用户发现优势生物类群。从内到外，每一圈表示一个层级，依次为门、纲、目、科、属、种水平。不同的门用不同的颜色标出，最外圈文字显示丰度排名前20的末端分级水平的上一级的名称，并使用更深颜色标出该分级水平分支。

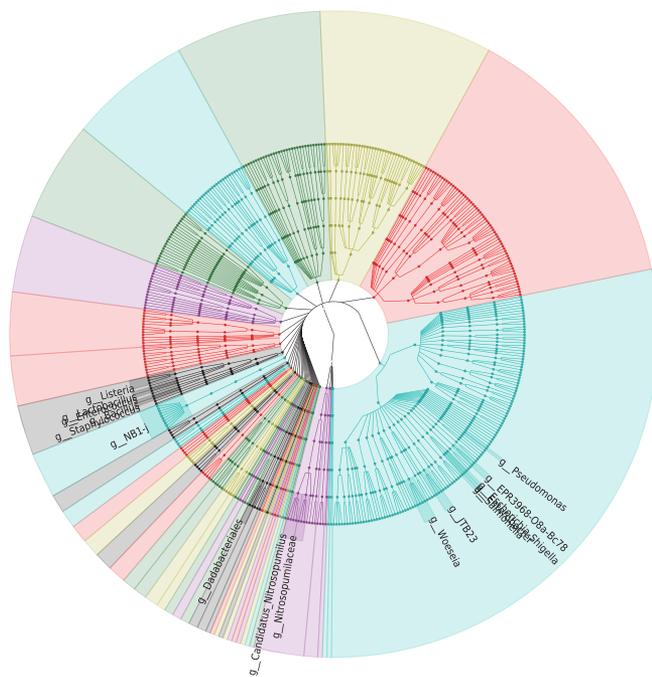


图6. 物种组成图

样本编号	OTU 类型数	OTU 序列数	可识别的 OTU类型数	可识别的 OTU序列数	界	门	纲	目	科	属	种
Sample-1	11	41065	10	41030	1	2	2	5	7	9	9
Sample-2	13	40996	11	40956	1	2	2	5	7	9	11
Sample-3	843	32742	840	32709	2	36	86	159	182	190	54
Sample-4	840	31041	837	30980	2	40	88	158	177	189	52

表3. OTU统计表

表4展示了各样品在不同分类水平（门、纲、目、科、属、种）上的物种相对丰度，限于篇幅，本文只展示了排名前十的Species，可以看出，检出了人类未培养过的细菌和古菌，如绿弯菌，酸杆菌，变形菌等。

选取每个样品在种分类水平上丰度排名前18的物种识别结果，生成堆叠柱状图，可以直观地展示

样品中不同分类水平上的生物群落组成情况，更好地理解样品之间的差异和相似性。如图7所示，横坐标为样品，纵坐标为注释物种的相对丰度。每一个柱形图代表一个样品，并以颜色区分各分类单元，柱子越长，该分类单元在对应样品中的相对丰度越高。

分级	拉丁名	Sample-1	Sample-2	Sample-3	Sample-4
Species	uncultured_bacterium	15.3449%	15.6973%	57.8373%	56.6946%
Species	Lactobacillus_fermentum	22.9442%	21.9089%	0.0000%	0.0000%
Species	Bacillus_subtilis	13.8557%	13.0481%	0.0000%	0.0000%
Species	Klebsiella_sp.	11.7865%	13.7098%	0.0000%	0.0000%
Species	Escherichia_coli	12.0741%	12.4060%	0.0000%	0.0000%
Species	uncultured_archaeon	0.0000%	0.0000%	13.0820%	14.3544%
Species	Listeria_monocytogenes	8.6717%	8.4823%	0.0000%	0.0000%
Species	Pseudomonas_aeruginosa	7.4994%	7.2029%	0.0000%	0.0000%
Species	Enterococcus_faecalis	6.3295%	5.8331%	0.0000%	0.0000%

表4. 物种相对丰度统计表

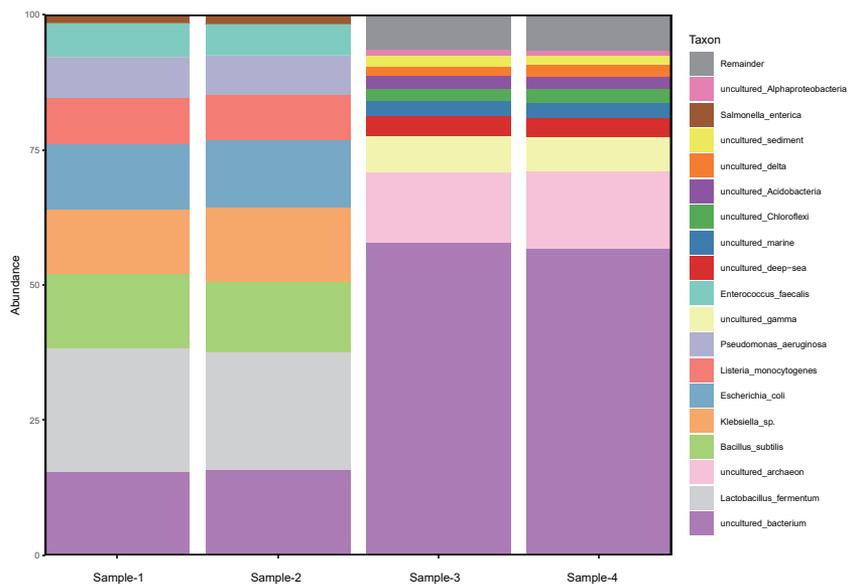


图7. 物种分布堆叠图

仅供研究使用，不适用于临床诊断

选取每个样品在种类水平上丰度排名前50的物种识别结果，生成热图，直观地展示样品中不同分类水平上的生物群落组成情况，更好地理解样品之间的差异和相似性，如图8所示。横坐标为样品，纵坐标为注释物种名称，颜色反应样品中该注释物种的丰度信息。可以直观地将数值大小用颜色深浅表示出来，通过颜色梯度及相似程度来

反映多个样品在各分类水平上物种分布的相似性和差异性。

为了更直观展示所有样品在不同分类水平（门、纲、目、科、属、种）的物种识别信息，软件生成Krona图。如图9所示，圆圈从内到外依次代表不同的分类级别，扇形的大小代表不同识别结果的相对比例。

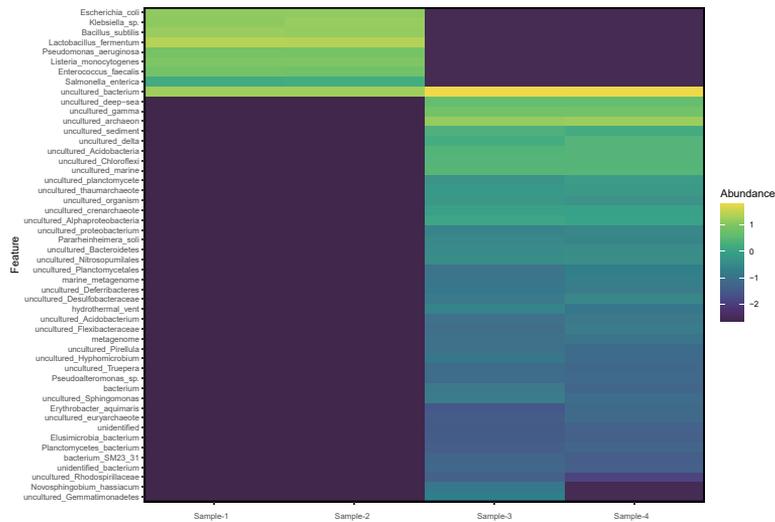


图8. 物种分布热度图

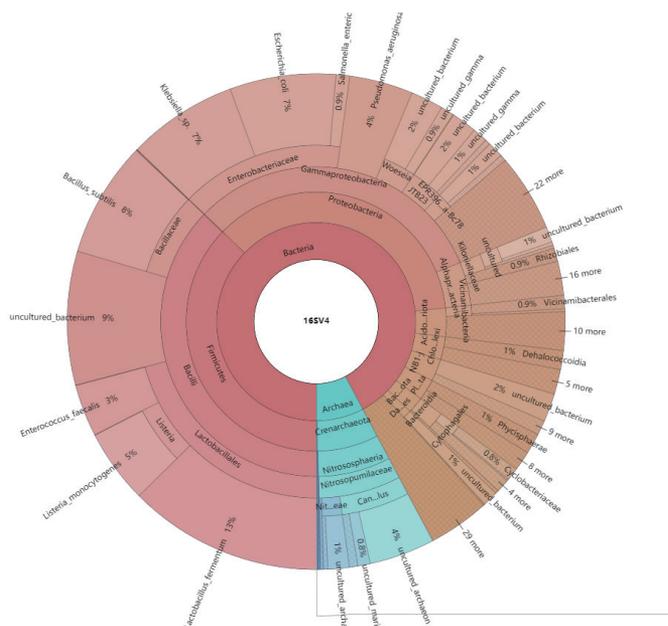


图9. 物种分布Krona图

功能基因预测

研究团队还对样本中的功能基因进行了注释，采用了COG功能基因注释，通常用于对新的基因组序列进行注释，通过比对新的基因序列与COG数据库中的蛋白质序列，可以确定新的基因序列可能的功能和结构⁷。通过比对注释，挖掘到了一些

高频的已知的和未知的功能基因簇，如S基因簇，R基因簇和与转录、核糖体结构和合成相关的J基因簇，如图10所示，为后续深海微生物的基因功能研究提供重要参考。

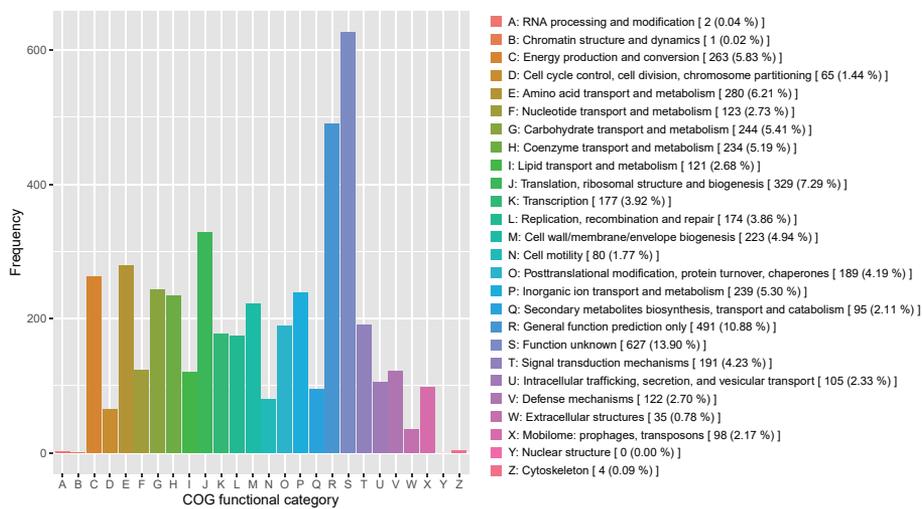


图10. 功能基因预测图

总结

华大智造基于DNBSEQ-E25平台的16S V4测序产品方案，检测速度快，能在出海采样的当天完成数据分析。不惧海上颠簸，测序数据质量优异稳定。功能强大的软件，挖掘出了有价值的菌种和功能基因。总而言之，华大智造的微生物测序产品，为本次南海深海科考提供了可靠且高效的工具支撑。



DNBSEQ-E25RS基因测序仪



MGISP-100自动化样本制备系统

参考文献

1. Acinas, S. G. *et al.*, Deep ocean metagenomes provide insight into the metabolic architecture of bathypelagic microbial communities. *COMMUN BIOL* 4 604 (2021).
2. Ashish Sahu, N. K. C. P., Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. *J NAT CONSERV* (2023).
3. Michael A. Rex, R. J. E., Deep-sea Biodiversity: *Pattern and Scale*. (2010).
4. 梁永志 & 冯强强, 海洋日专题“海马冷泉”: 深蓝世界的生命交响曲. http://www.gmgs.cgs.gov.cn/hykp/hyzs/202406/t20240617_764071.html (2024).
5. 佚名, “深海勇士”号4500米载人潜水器正式交付 落户中科院. https://www.cas.cn/jh/201801/t20180119_4632981.shtml (2017).
6. Llado, F. S., Vetrovsky, T. & Baldrian, P., The concept of operational taxonomic units revisited: genomes of bacteria that are regarded as closely related are often highly dissimilar. *FOLIA MICROBIOL* 64 19 (2019).
7. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V., The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *NUCLEIC ACIDS RES* 28 33 (2000).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪DNBSEQ-E25RS	900-000490-00
	基因测序仪 DNBSEQ-G99ARS	900-000608-00
	全自动核酸提取纯化仪MGISP-NE32RS	950-000019-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 高通量自动化样本制备系统	900-000108-00
提取试剂	MGIEasy 环境DNA提取试剂盒 (96 Preps)	940-002484-00
	MGIEasy 环境DNA提取试剂盒 (384 Preps)	940-002486-00
建库试剂	ATOPlex 16S V4 rDNA建库试剂盒套装 (576 RXN)	940-002559-00
	ATOPlex 16S V4 rDNA建库试剂盒套装 (96 RXN)	940-002560-00
	标准文库试剂 (PCR 产物) V4.0	1000027585
测序试剂	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂盒(FCL PE150)	940-000567-00
	DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装(G99 SM FCL PE150)	940-000410-00
数据分析	宏条形码物种识别软件MetaSIS	970-000417-00
	微生物快速识别平台	900-000392-00

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2024年12月版

撰稿：卢佳

责任编辑：王其伟

审稿：江遥