

• 微生物组测序与分析专题 •

**朱宝利** 中国科学院微生物研究所研究员，中国科学院大学医学院岗位教授，博士生导师，国家973项目首席科学家，病原微生物耐药与耐药基因组学北京市重点实验室主任，《生物工程学报》编委。主要从事病原微生物基因组学、人体肠道微生物组学和免疫基因组学研究。研究成果包括确认细菌耐药谱与农用抗生素使用相关及MCR-1耐药基因在全球范围内的分布和传播状态等。



## 不同保存液和保存期限下肠道微生物组的变化

段云峰<sup>1</sup>，律娜<sup>1</sup>，蔡峰<sup>1</sup>，朱宝利<sup>1,2</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室，北京 100101

2 中国科学院大学，北京 100049

段云峰，律娜，蔡峰，等. 不同保存液和保存期限下肠道微生物组的变化. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2525–2540.

Duan YF, Lü N, Cai F, et al. Variations of gut microbiome composition under different preservation solutions and periods. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2525–2540.

**摘要:** 肠道菌群与人体健康的关系密切，通过检测肠道菌群可以获得有关健康的信息。新鲜粪便不易获得，很难做到快速低温冷冻，在进行标准化和大规模人群采样时，可用于常温条件下采集和保存样本的保存液可以弥补采集样本数量多、地域分布广、现场采样条件多样、工作量大、运输条件差等条件不足。本研究招募了5名健康志愿者，采集他们的粪便样本后，通过对比不同市售微生物样本采集常温保存液对新鲜粪便样本的影响，评估了各类保存液的保存效果。在室温下把粪便放置于5种保存液，在第0、1、3、7、15、30天提取元基因组DNA，进行16S rRNA V3–V4区高通量测序，来分析不同保存液，在不同时间段对肠道菌群组成的影响。结果显示，不同保存液对肠道菌群的影响存在差异，与对照组相比，不同保存液对样本中的OUT数量影响不大；保存液A、B和C在菌群构成上更接近对照组，保存液D会明显改变肠道菌群组成，使放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)增加；随着时间延长，各类保存液都有降低菌群多样性趋势，保存液E降低菌群多样性更明显；第30天时，5种保存液都会改变肠道菌群构成；肠道菌群组成存在个体差异，是影响各样本相似性的主要因素，来自不同志愿者的粪便样本，无论何种保存液和保存时间，彼此之间更接近。不同保存液对革兰氏阳性杆菌、革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性菌的含量存在不同影响，保存液C、E会降低双歧杆菌(*Bifidobacterium*)丰度，而保存液D则相对升高；除保存液E相对降低乳酸杆菌(*Lactobacillus*)丰度之外，保存液A、B、C、D与对照都相当。各类保存液对链球菌(*Streptococcus*)的影响，除保存液D差异较大之外，保存液C与对照组最接近；保存液D

Received: July 31, 2020; Accepted: November 4, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC2000500).

Corresponding author: Baoli Zhu. Tel: +86-10-64807433; E-mail: baolizhu@im.ac.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFC200500) 资助。

比对照组降低瘤胃球菌科 UCG 003 (*Ruminococcaceae* UCG 003), 其他各类保存液与对照组差异不大; 不同保存液都比对照组增加大肠-志贺氏杆菌 (*Escherichia-Shigella*) 丰度, 保存液 A、B 会增加克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) 丰度, 而保存液 C、D 和 E 与对照组相当。整体来看, 保存液 C 在稳定肠道菌群的组成上表现较好。文中通过对比国内外常用保存液在不同时间点对肠道菌群的影响, 为进行大规模微生物样本采集、保存提供了参考, 也为标准化的微生物组项目提供了可参考的数据。后续的研究可在此基础上选择针对性的保存液和保存时间。

**关键词:** 粪便, 肠道菌群, 微生物组, 保存液, 样本保存

## Variations of gut microbiome composition under different preservation solutions and periods

Yunfeng Duan<sup>1</sup>, Na Lü<sup>1</sup>, Feng Cai<sup>1</sup>, and Baoli Zhu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Gut microbiota is closely related to human health, and its composition can give us health information. The large-scale population sampling is required on gut microbiome research; however, fresh feces samples are not easy to obtain, and rapid low-temperature freezing is difficult to achieve. With the development of technology, preservation solutions are widely used for sample collection, storage, and transport under normal temperature conditions. Preservation solutions can be used in large scale sample collection, wide geographical distribution, diverse on-site sampling conditions, heavy workload, and poor transportation conditions. In this study, five healthy volunteers were recruited. After collecting their fresh stool samples, effect of 5 different commercial preservation solutions was evaluated at room temperature. Samples in different preservation solutions after placing fresh stool samples at the 0, 1, 3, 7, 15, and 30 days were collected. All samples were tested by 16S rRNA V3–V4 high-throughput sequencing to analyze the influence of microbiome composition in different preservation solutions. The results show that different preservation solutions had distinct effects on the gut microbiome composition. Compared with the control, different preservation solutions had little effect on the amount of OUTs; preservation solutions A, B and C were closer to the control in the composition of the gut microbiota, but preservation solution D significantly changed the composition by increasing Actinobacteria and Firmicutes abundance. With the time, all solutions tended to reduce the diversity of the microbiota. Preservation solution E significantly reduced the diversity of the flora; on the 30th day, all five solutions changed the composition; the individual differences in the composition of the gut microbiome were the main factors affecting the similarity of each sample, and were derived from different stools donors. The same samples, no matter which storage solution and storage time, were directly closer to each other. Different storage solutions had different effects on the content of Gram-positive bacilli, Gram-positive cocci and Gram-negative bacteria. Storage solutions C and E reduced the abundance of *Bifidobacterium*, whereas storage solution D increased; except that preservation solution E relatively reduced the abundance of *Lactobacillus*, but the preservation solution A, B, C, and D were all closer to the control. Except for the greater difference in preservation solution D, preservation solution C was the closest to the control group on *Streptococcus*; preservation solution D reduced *Ruminococcaceae* UCG 003 than the control group. However, other preservation solutions were not much different from the control group; different preservation solutions increased the abundance of *Escherichia-Shigella* than the control group, and preservation solutions A and B increased the abundance of *Klebsiella*, but preservation solution C, D, and E were closer to the control group. Overall, preservation solution C performed better in stabilizing the composition of the gut microbiota. This study provides reference for standardized microbiome projects. Subsequent research can choose a targeted preservation solution and preservation time based on this study.

**Keywords:** stool, gut microbiota, microbiome, preservation solution, sample storage

肠道微生物对维持人体健康是必不可少,保持肠道微生物的平衡对促进健康和维持体内稳态至关重要。肠道菌群失调造成菌群组成或功能异常,可以导致多种疾病发生。肠道菌群的改变与多种急性和慢性疾病的发病机制有关,如糖尿病<sup>[1]</sup>、肥胖<sup>[2]</sup>、代谢综合征<sup>[3]</sup>、炎症性肠病<sup>[4]</sup>、癌症<sup>[5]</sup>、哮喘<sup>[6]</sup>、自闭症<sup>[7]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[8]</sup>、帕金森病<sup>[9]</sup>、焦虑和抑郁<sup>[10]</sup>等。通过检测肠道菌群组成和功能,对疾病的早期检测和治疗具有重要意义。

正常的肠道菌群主要包括厚壁菌门和拟杆菌门,在不同个体之间高度可变,并且不同研究之间经常出现数据不一致。在研究过程中,有多种因素可能导致数据变化和不一致,尤其是样本存储和运输条件及元基因组提取过程,并且存储条件引起的变异大于存储时间和测序方法的变异<sup>[11]</sup>。此外,对肠道菌群的研究需要大规模人群,需要采集不同健康状态下个体的粪便样本,提取元基因组 DNA 后进行高通量基因组测序,比较肠道菌群构成。影响微生物 DNA 稳定性的因素可能会导致肠道微生物组成发生重大变化,从而影响研究结果。因此,对粪便样品处理和储存方法研究对于微生物组研究至关重要。

粪便是研究肠道菌群构成最常用样本,样本最佳保存方式是 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻<sup>[12]</sup>。粪便样本的收集,尤其是非住院患者,通常采取居家取样的方式,但是几乎所有家庭都不具备快速低温冷冻条件,在保存和运输过程中就会导致菌群比例变化<sup>[13-14]</sup>。即使将这些样品包装在冰袋中或采取其他保护措施,长时间的运输也可能使样品解冻,导致菌群组成发生改变<sup>[15]</sup>。有研究对室温下粪便样品的稳定性进行了分析,结果显示 24 h 内粪便样品成分还算稳定,在室温下保存 3 d 后,不同细菌门水平的相对比例也没有明显变化<sup>[16-17]</sup>。短期内的常温保存还可以接受,但是在进行标准化和大规模人群采样时,由于采集样本数量多、地域分布广、

现场采样条件多样、工作量大、运输条件差等因素限制,对新鲜样本的采集、保存、运输等存在诸多不便,3 d 时间很难满足实际需求。

将粪便样本保存在专用溶液中,可以保持长达 7 d 的稳定性,这就为常温运输和保存提供了便利。在粪便样本采集条件限制下,使用保存液是一种较为理想的解决方案。针对此类问题,本研究选取了 5 种市售微生物样本采集常温保存液,检测其对新鲜粪便样本的影响,在室温下把粪便放置于不同保存液和不放保存液条件下,放置不同时间后通过 16S rRNA 基因高通量测序方法,分析其中的微生物组成,比较不同保存液相比新鲜样本对肠道菌群组成的影响,目的是确定适合大规模、多地域研究的粪便保存方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和 DNA 提取

从健康人群中招募 5 位志愿者,每人提供一份新鲜粪便样品。S1 为 25 岁男性,S2 为 28 岁男性,S3 为 24 岁男性,S4 为 26 岁女性,S5 为 30 岁女性。

采样时使用一次性无菌粪便取样袋(MEDISHARK, GF18B-SL80),用无菌取样勺取粪便中段内部,在粪便多位点挖取样本,每人取 15 g 左右粪便后加入 10 mL PBS 缓冲液中,涡旋后充分混匀。每份样本再分别取 2.5 mL 混匀的样本于 5 mL 不同品牌的商品化常温液体保存液中(A: Hcode, 深圳泓睿康; B: SGENE, 深圳赛因生物; C: MEDISHARK (GL18V1-2), 北京麦迪时刻; D: PSP<sup>®</sup> Spin Stool DNA Kit, 德国 Stratec; E: OMNIgene•GUT, 加拿大 DNA Genotek) 并充分混匀。混合均匀后将上述混有保存液的样本,分别取 1.3 mL 保存到 2.0 mL 冻存管中(各 5 管),上述样品室温保存,取一份不加保存液的样本作为新鲜对照,其余样本分别于第 1、3、7、15、30 天提取基因组 DNA,剩余样本转存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰

箱保存,因保存液 E 数量不足,仅采集了第 3、7、30 天的样本,所有样本收集结束后统一提取 DNA。

粪便总基因 DNA 提取,所有样品使用改进的 Bead-beater 法,通过采用特定粒径的研磨物(玻璃或氧化锆颗粒,粒径 1 mm)与破碎仪(QIAGEN 涡旋振荡仪和适配器(Cat.No 13000-v1-24 的组合) 3 200 r/min 研磨 10 min 后再配合使用 QIAampPowerFecal DNA Kit 试剂盒(QIAGEN, 德国)提取粪便样品总基因组 DNA。操作步骤按照试剂盒说明书进行,获得的 DNA 溶液保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

## 1.2 PCR 扩增和扩增子测序

以提取的样品 DNA 为模板进行 PCR 扩增,采用二次扩增法,引物使用细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 通用引物 343F (341F: 5'-CCTACGGGNGB CASCAG-3'; 805R: 5'-GACTACNVGGGTATCTA ATCC-3'),第二次扩增用来引入不同 index 序列。第一次扩增,设定反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 25 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。第二次扩增反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 8 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

扩增所用引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。主要试剂、设备及厂家: KAPA HiFi GC 缓冲液 (5 $\times$ )、KAPA dNTP Mix、KAPA HiFiHotStart DNA Polymerase (KAPA Biosystems, 美国); 无水乙醇、 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (北京化工厂, 中国); Tris-base (NoVoN, 中国)、硼酸 (沪试, 中国)、琼脂糖 (Life Technologies, 美国); 6 $\times$ DNA 上样缓冲液、100 bp Ladder marker、 $\lambda$  DNA/Hind III marker (TIANGEN, 德国); Midori Green Advance DNA Stain (Midori Green, 德国); AMPure XP (Beckman, 德国)。最后采用 Illumina 公司的 HiSeq 2500 进行高通量基因测序 (PE250)。

## 1.3 测序结果统计分析

测序后将序列分配到其所属样品中,并去掉

引物序列,获得有效序列文件。对有效文件进行处理,除去测序质量低的序列。分析数据只保留高质量 (Q 值  $\geq 25$ ) 碱基比例大于等于 90% 的 reads。采用 QIIME 软件中的 usearch8.0 软件进行嵌合体序列的检测及过滤<sup>[18]</sup>,按照 97% 的序列相似性进行 OTUs (Operational taxonomic units) 聚类,采用 Silva (<https://www.arb-silva.de/>) 数据库获得样品的分类信息<sup>[19]</sup>。对每个样品的 OTUs 进行物种分类学 (Taxonomy) 注释。分类至门、纲、目、科、属、种各分类水平各自含有的微生物类群数。

Alpha 多样性指数和系统发育分析使用 Mothur (Version 1.39.5)<sup>[20]</sup>完成多样性指数的分析,计算样品的 Shannon 指数,并根据所得多样性指数数据绘制箱线图。

Beta 多样性分析采用 R 语言工具分析,主坐标分析 (Principal coordinate analysis, PCoA) 和 NMDS (Non-metric multidimensional scaling) 非度量多维尺度分析采用 vegan 软件包进行分析和作图。热图、层次聚类 (Hierarchical clustering) 分析采用 Bray-Curtis Index 算法,ward 方法绘制聚类树。

差异显著性用 Kruskal-Wallis 秩和检验比较,结果以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 OTU 丰度和多样性指数差异

经过对原始序列的测序质量和序列长度进行质量控制后,共获得 120 个粪便样品,测序后获得 5 529 120 条有效序列,每个样本最少序列数 46 076,共获得 594 个 OTU。具体每个样本的 OUT 数量见图 1。从图中可以看出,各样本的 OUT 数量比较接近,差异不明显。

Alpha 多样性分析显示,保存液中的粪便样品在室温下保存不同时间后 16S rRNA V3-V4 区的 Shannon 多样性指数存在一定差异 (图 2)。测试的 5 种保存液,都存在随时间延长细菌  $\alpha$  多

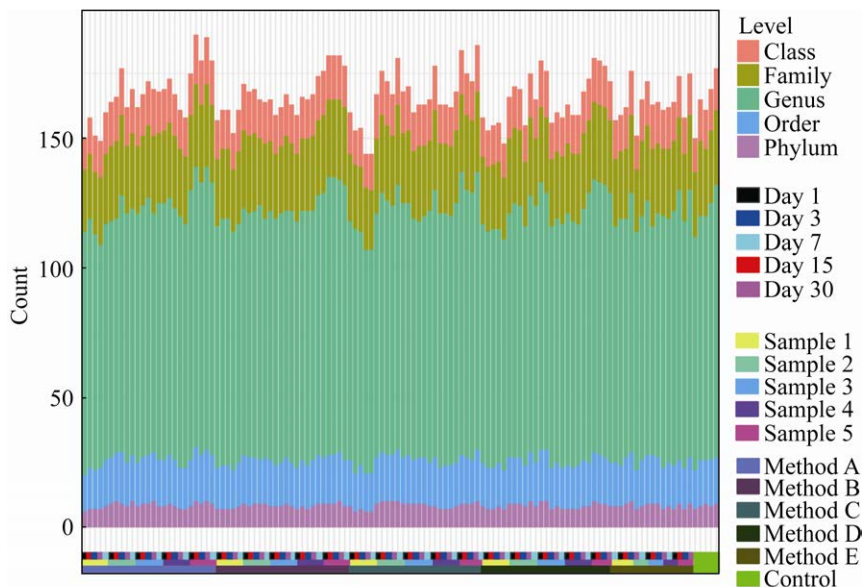


图 1 各样本在不同分类级别的 OUT 数量分布

Fig. 1 OUT number distribution of each sample at different taxonomy levels.

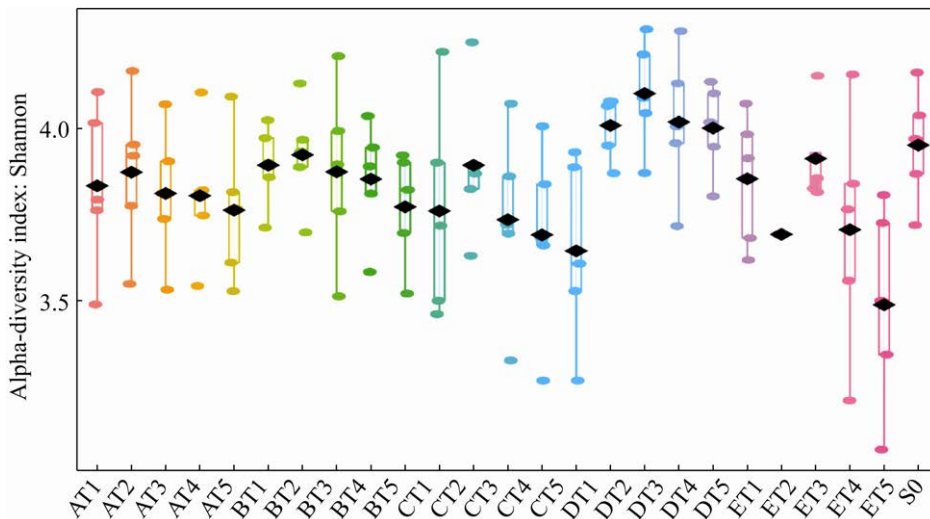


图 2 不同保存液在不同时间点 Shannon 多样性指数分布

Fig. 2 Shannon diversity index distribution of different preservation solutions at different time points. T1–T5 represent the storage time of 1, 3, 7, 15, and 30 days respectively, and S0 represents the control. A–D represents 5 kinds of preservation solutions. The prism in the figure represents the median.

样性指数下降趋势。在各时间点，除保存液 E 之外，其他保存液显示的  $\alpha$  多样性波动不明显。与对照 (S0) 相比，除保存液 D 外，其他保存液的菌群多样性大幅降低，其中，保存液 E 降低幅度最大。

由于每个人的肠道菌群构成不同，在  $\alpha$  多样性指数方面也会表现出差异。对每个人的多样性指数分析形成了每个样本的不同保存液在不同时间点 Shannon 多样性指数分布图 (图 3)。结果发现，不同个体的肠道菌群多样性存在差异，其中

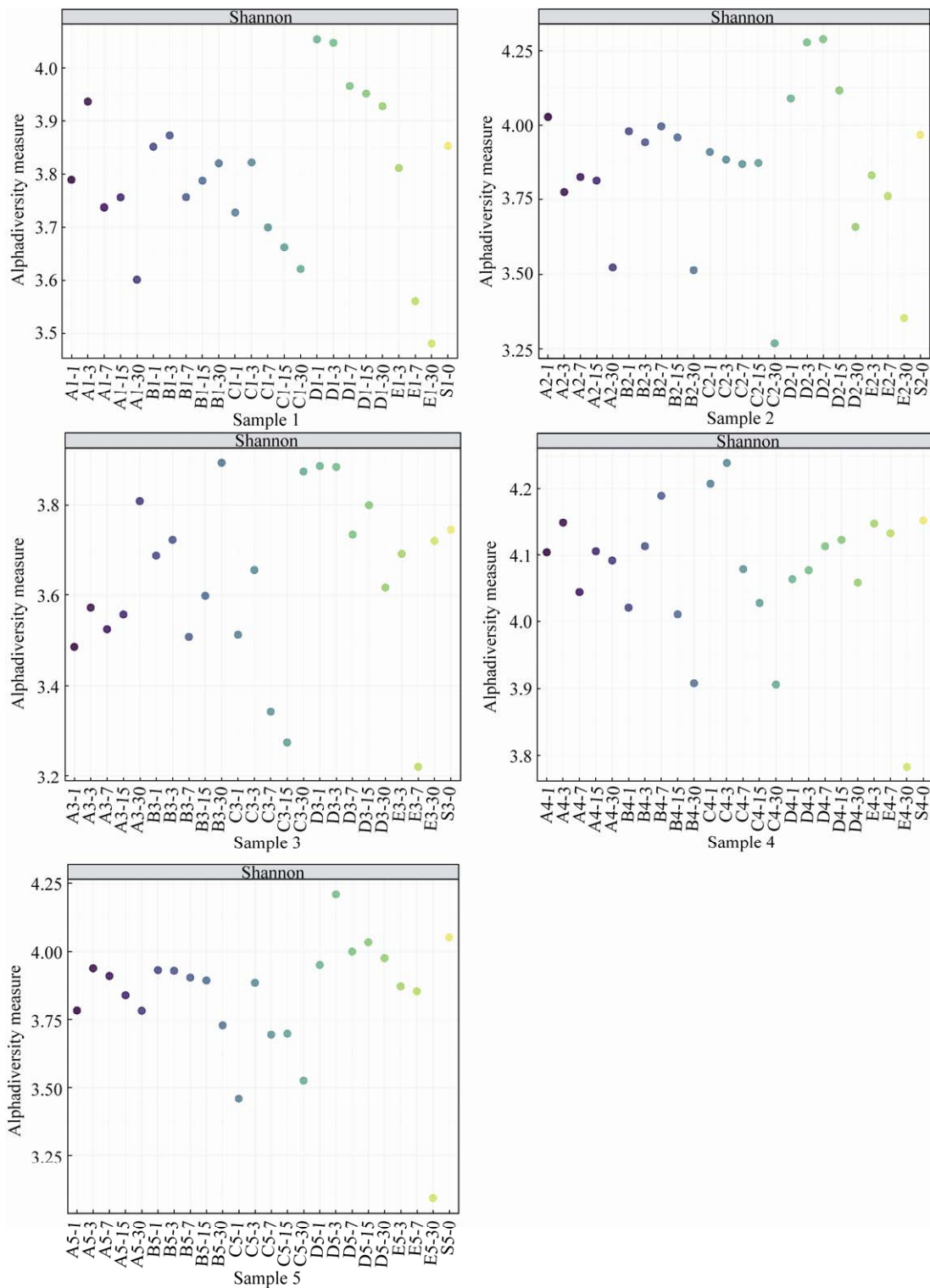


图 3 每个样本在不同保存液在不同时间点 Shannon 多样性指数分布

Fig. 3 The Shannon diversity index distribution of each sample in different preservation solutions at different time points. A–E represent different preservation solutions; S represents control; the sample number is represented by numbers 1-5, and numbers 1, 3, 7, 15 and 30 represent the number of days of storage.

样本 2 和 5 的多样性更高, 样本 3 的多样性最少。保存液 D 在不同样本中, 与对照相比表现出升高多样性的趋势。在样本 2 中, 保存液 B 和 C 表现较为理想, 在样本 5 中, 保存液 B 和 D 表现较为理想。

## 2.2 样品间的聚类分析

通过层次聚类 (Hierarchical clustering) 分析比较不同保存液在不同时间点各样品 OTU 的群落结构相似度, 利用树形图描述和对比了 120 个样品间的相似性和差异性 (图 4), 从图中可以看出, 来自同一人的大部分样本可以聚在一起, 说明个体差异性大于不同保存液引起的差异。然而, 在样本 3 和样本 2 中存在互换, 这两个人样本采用

不同保存液后存在交叉, 并且这种交叉只发生在第 30 天的样本, 涉及的保存液有 A、B、C 和 D。此外, 不同保存液之间有一定的差异性, 其中, 在样本 2 中, 保存液 B、C 和 D 保存的样本能够聚类在一起, 其中保存液 D 在各样本中都有聚类。

根据 beta 多样性距离矩阵进行的分析显示, 不同保存方法, 在不同时间点的分布与样本来源联系最密切, 有 5 个人的不同样本分别聚在一起 (图 5)。在不同保存方法中, 保存液 D 和 E 与各样本的距离较远, 特别是样本 2 和样本 3, 经过保存液 D 保存的样本在多个时间点上都明显偏离了其对照样本。

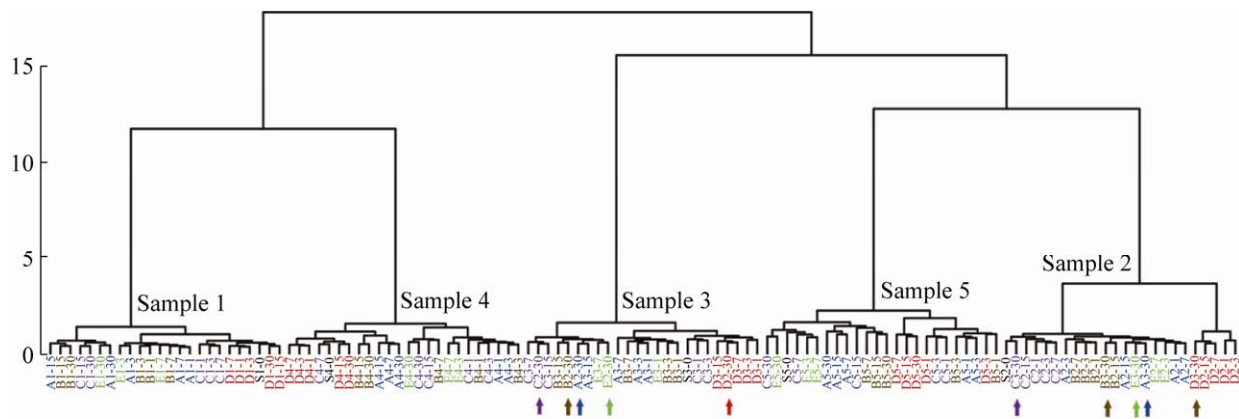


图 4 不同样本群落结构相似度树形图

Fig. 4 Tree diagram of similarity of community structure in different samples. The tree diagram was constructed by Bray-Curtis Index and ward method.

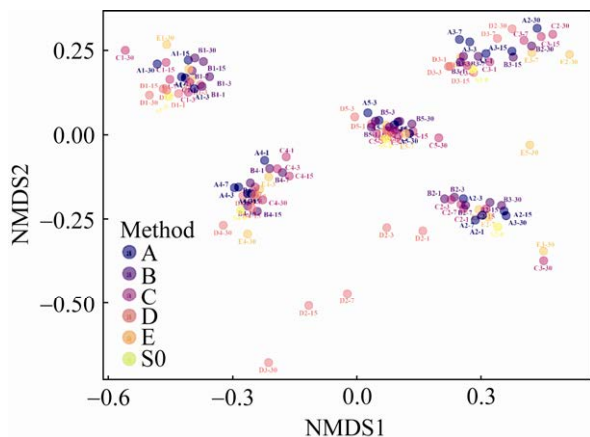


图 5 Beta 多样性距离矩阵 NMDS 分析结果

Fig. 5 NMDS analysis result of beta diversity distance matrix.

具体到每一个人的样本, 与对照相比, 保存液 A、C、D 更接近对照 (图 6)。比如在样本 4 中, 与对照最接近的是保存液 C 第 7 天的样本、保存液 A 第 7 天的样本和保存液 D 第 7 天的样本。

## 2.3 样品的微生物群落构成

为了分析不同保存液在不同时间对粪便样品微生物群落构成的影响, 通过对高通量测序结果进行分析, 物种注释之后的比对分析结果显示, 在门水平, 与对照 (S0) 相比, 保存液 D 使放线菌门 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 增加, 而其他几种保存液都使厚壁菌门减少, 而拟杆菌门 (Bacteroidetes) 比例相对增加 (图 7A)。

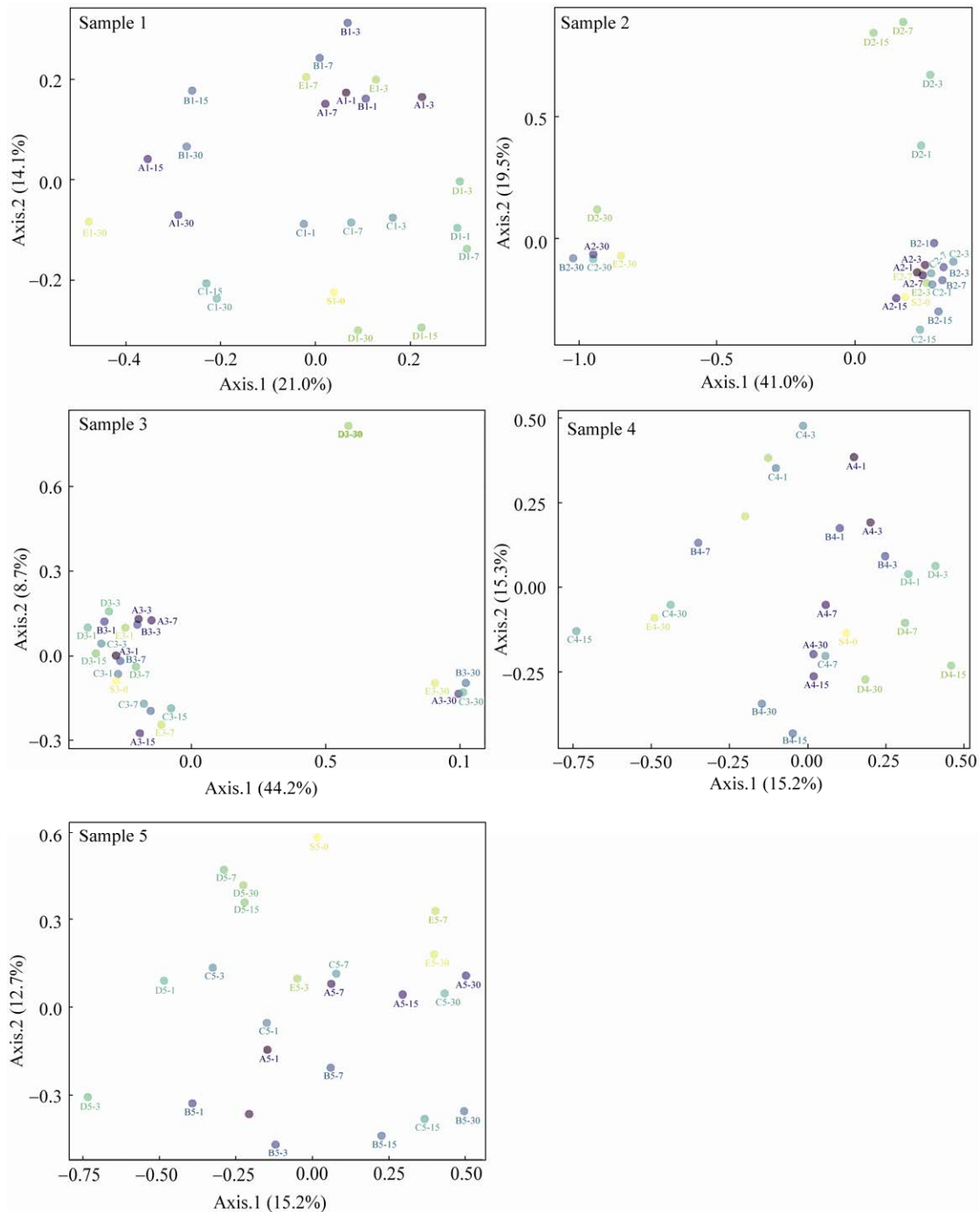


图 6 Beta 多样性 PCoA 分析结果

Fig. 6 PCoA analysis results of beta diversity.

在属的分类水平，保存液 D 与对照组的差异较大，A、B、C 三种保存液与对照组在菌群构成上更接近 (图 7B)。

在属水平，通过热图分析和层次聚类

(Hierarchical clustering) 分析可以看出，来源不同的 5 个人，肠道菌群的构成本身存在差异 (图 8)。从聚类结果上看，在样本 1、2、5 中，保存液 C 与对照最接近。在样本 4 中最接近的是保存液 B



和 C, 在样本 3 中最接近的是保存液 E 和 C。保存液 D 在不同个体中都是聚类在一起, 与对照样本 S 距离较远。

在门水平上, 通过对常见的 6 个门的细菌进行对比, 结果显示, 使用不同保存液后, 保存液 D 会明显导致拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*) 降低, 而导致厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*) 增加, 而其他几种保存液引起的这几种菌的变化跟对照

组相差不大 (图 9)。

在属水平, 通过对常见的 6 种属水平的细菌进行对比, 结果显示, 革兰氏阳性杆菌, 也是常见的有益菌, 双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 和乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 受保存液影响会出现变动。对双歧杆菌来说, 相比对照组, 保存液 A、B 与之相当, 保存液 C、E 相对降低, 而保存液 D 则相对升高其丰度。对乳酸杆菌来说, 除保存液 E 相对降低丰度之外, 保存液 A、B、C、D 与对照都相当。

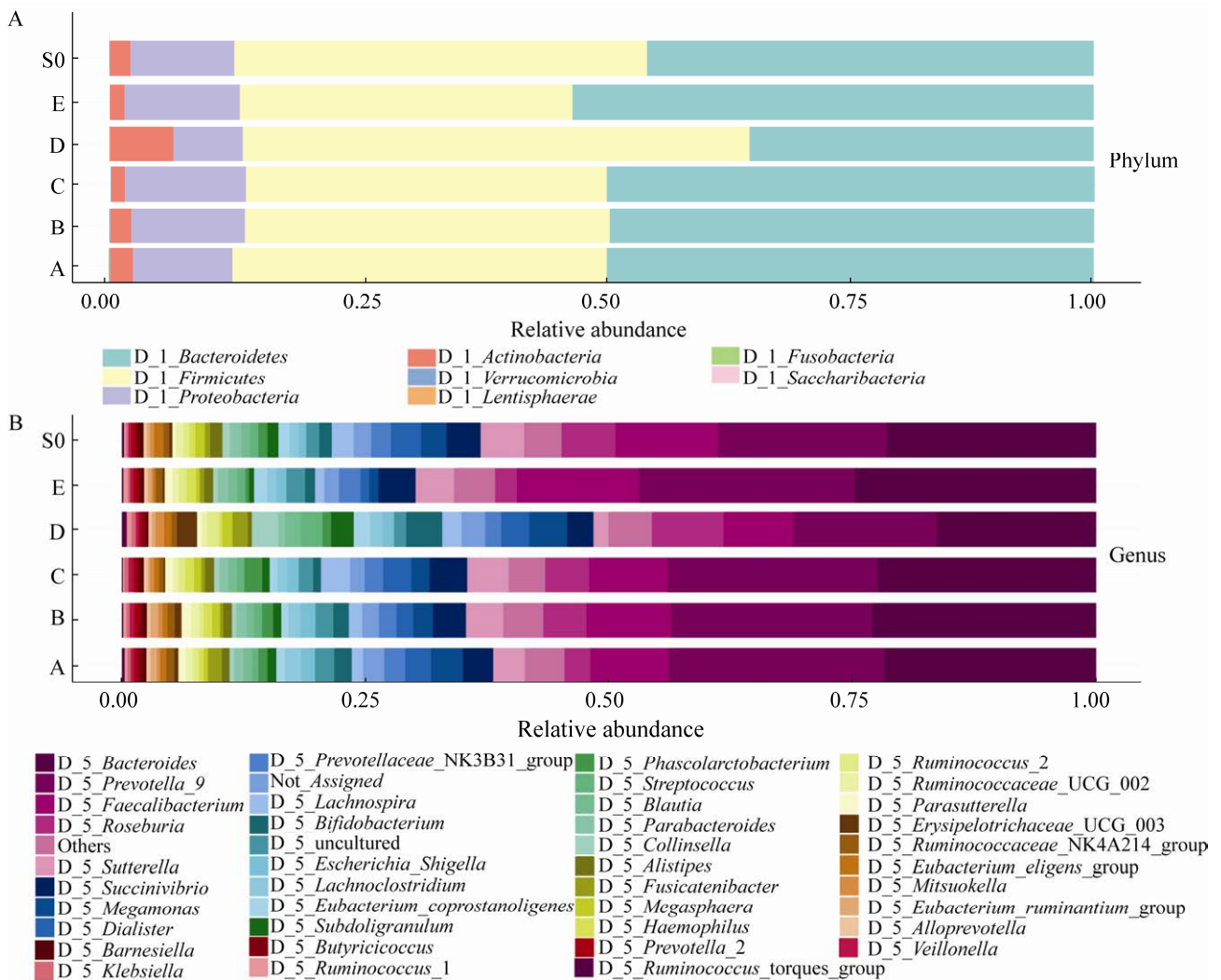


图 7 各样品中微生物在门和属分类水平的分布

Fig. 7 The distribution of microbiota in the phylum and genus classification levels in each sample. (A) Distribution of bacteria at the phylum level. (B) Distribution of bacteria at the genus level.

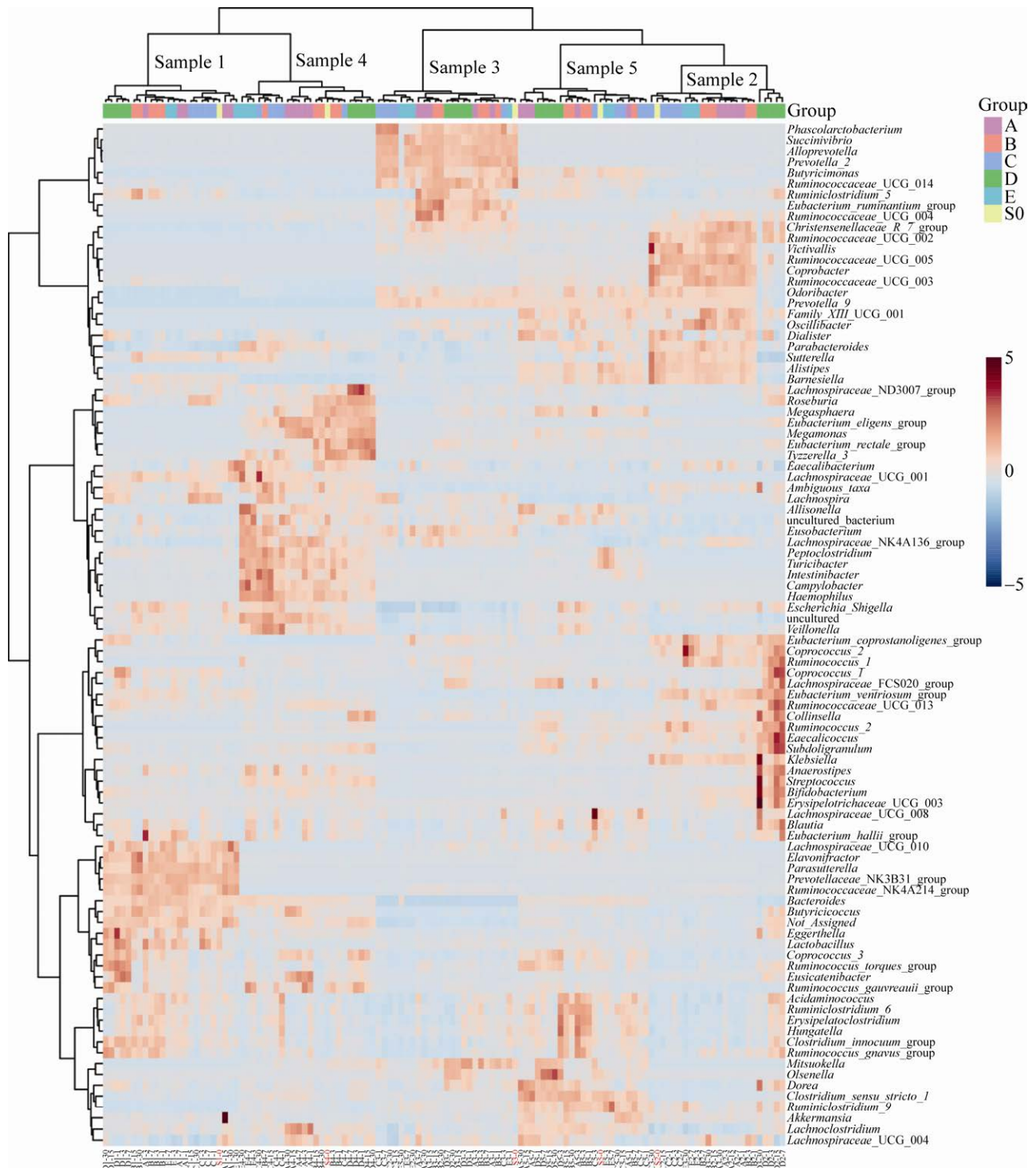


图 8 不同样本的肠道菌群在属水平的细菌构成热图

Fig. 8 Heat map of gut microbiome composition of different samples at the genus level.

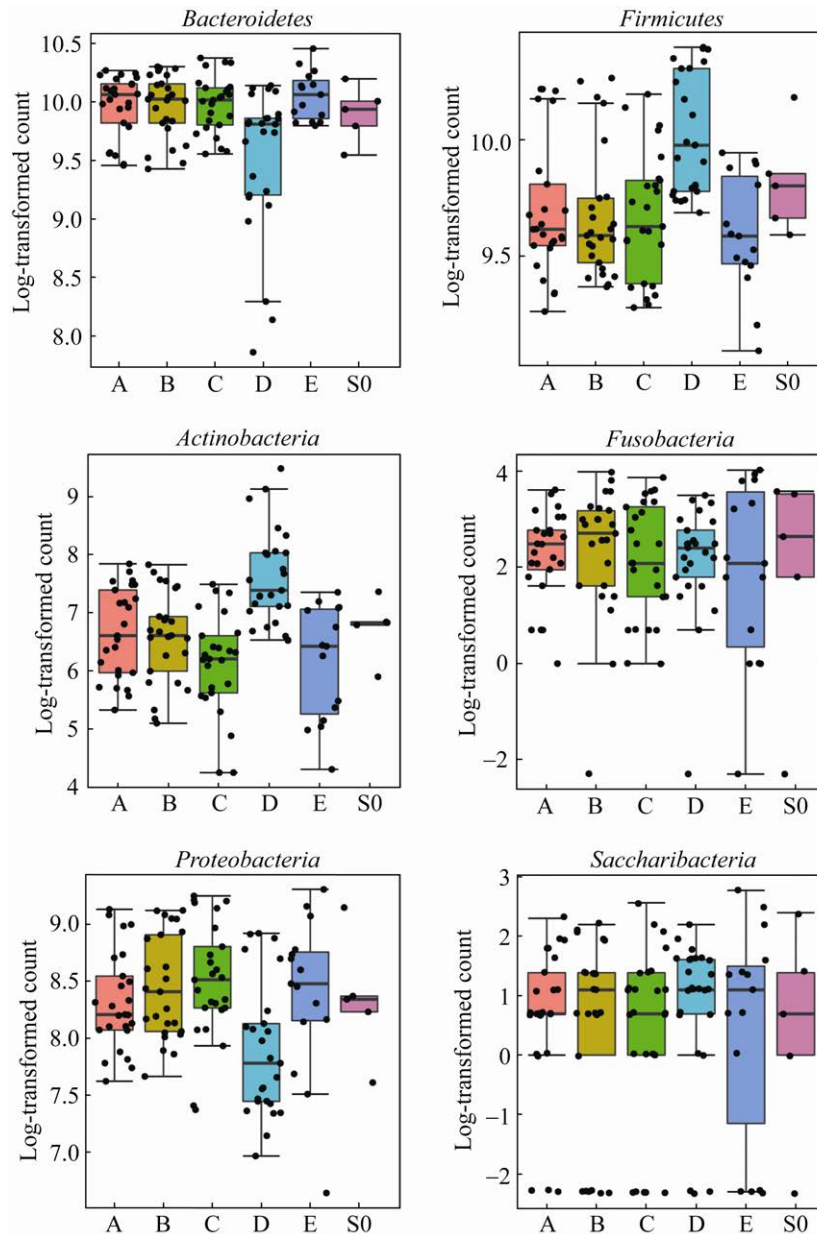


图9 门水平不同细菌在不同保存液中的丰度变化

Fig. 9 Changes in the abundance of different bacteria at different phylum levels in different preservation solutions.

除革兰氏阳性杆菌外，对革兰氏阳性球菌的分析结果表明，各类保存液对链球菌 (*Streptococcus*) 的影响，除保存液 D 差异较大之外，保存液 C 与对照组最接近；而各类保存液对瘤胃球菌科 UCG 003 (*Ruminococcaceae* UCG 003) 的影响则不同，保存液 D 比对照组降低，其他各

类保存液与对照组差异不大。

对于革兰氏阴性菌，大肠-志贺氏杆菌 (*Escherichia-Shigella*) 的表现则是不同保存液都比对照组增加了丰度，而克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) 的表现则是保存液 A、B 会增加其丰度，保存液 C、D 和 E 与对照组相当。

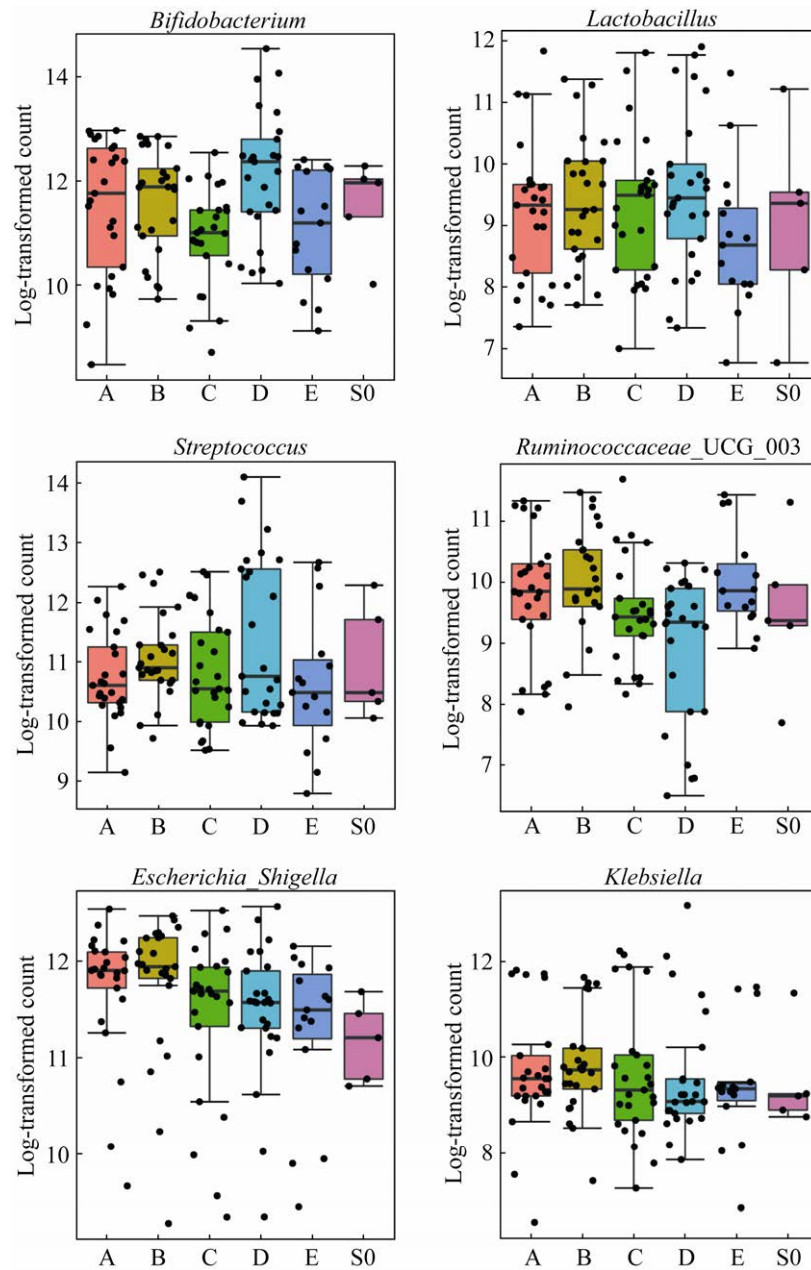


图 10 属水平不同细菌在不同保存液中的丰度变化

Fig. 10 Changes in the abundance of bacteria at different genus levels in different preservation solutions.

#### 2.4 不同保存液的微生物群落相关性分析

根据不同保存液在不同时间点肠道菌群构成相关性分析显示, 在第 1、7、15 和 30 天时间点 5 种保存液中, 保存液 A 和 B 在第 1 和 7 天时相关性强; 在第 7、15 天时, 保存液 A 还和 E 的相

关性强; 与对照组相关性最强的是保存液 C, 在 4 个时间点, 两者都表现出较强的相关性 (图 11)。

随着室温放置时间的延长, 各类保存液中的菌群结构相似性呈现明显变低的趋势, 在第 30 天时尤为明显。以样本 1 为例, 菌群结构相关性的

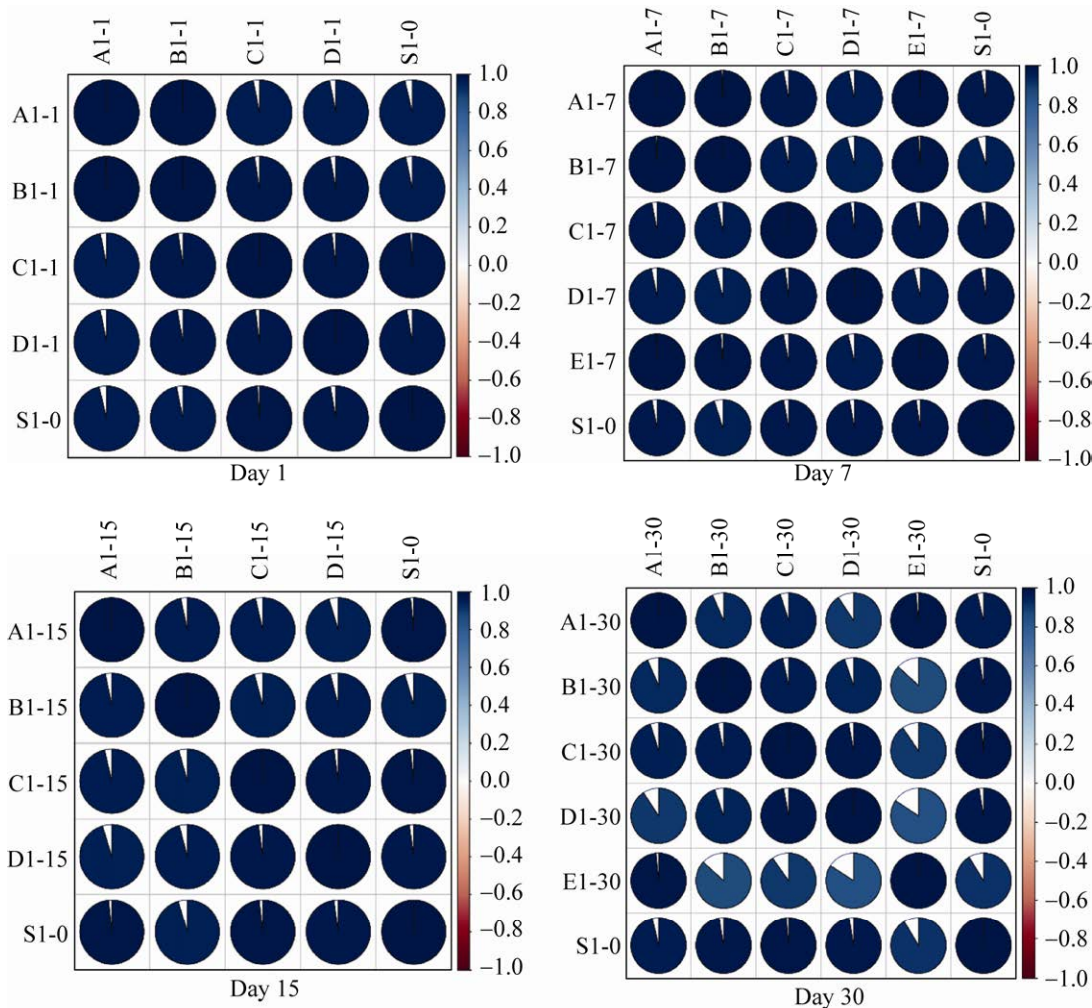


图 11 不同保存条件下的肠道菌群在不同保存液中的相关性图

Fig. 11 The gut microbiome correlation under different storage conditions in different storage solutions.

趋势是随样品在室温下放置时间延长, 与对照样品菌群结构的相似度逐渐降低 (图 12)。与对照样本相关性最强的分别是保存液 C 在第 1、3、15、30 天的样本。

### 3 讨论

高通量基因测序技术是常用的检测多种复杂微生物群落, 如土壤、空气、水体、发酵物、人体及动植物胃肠道系统等的菌群组成及遗传多样性的常用技术。该方法具有无需培养、简单、快捷、可重复性、高通量的特征, 可以检测和分析大量样品中的微生物群, 因此, 在比较不同生态

环境中的微生物群落的组成差异和动态监测方面具有显著优势。

肠道微生物相关研究已经发现了大量跟人类健康息息相关的微生物。通过分析微生物的构成可以反映人体的健康状态。由于个体之间的肠道菌群构成较为多样, 同时, 样本采集之后很难做到及时送检, 这就给微生物的活动提供了条件, 容易导致菌群组成发生改变。通过抑制微生物的繁殖, 保护基因组 DNA 不被降解的技术可以解决样本采集和保存问题。为此, 市面上已经出现了多种粪便样本保存液, 可以在常温下保存样本, 方便运输和后续检测。

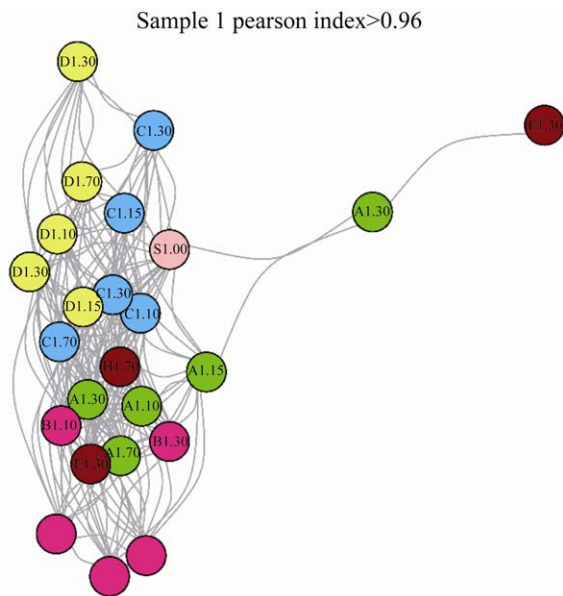


图 12 样本 1 在不同保存条件下的肠道菌群在不同保存液中的相关性网路图

Fig. 12 The correlation network diagram of the gut microbiome of sample 1 in different storage solutions under different storage conditions.

为了建立方便可靠的粪便保存方法，以确保肠道微生物组研究的准确性，需要比较不同保存液在不同时间点对样本中菌群结构的影响。本文采用 16S rRNA 扩增子高通量测序技术对市售的 5 种保存液进行对比，评测这些保存液在最长 30 d 的时间里对粪便样本中的微生物组成，菌群多样性以及具有代表性的细菌丰度的影响。

结果显示，不同保存液在 30 d 内确实会对菌群组成产生影响，有些保存液引起的偏差较大。一项研究系统地评估了 6 种粪便样品储存条件，包含 3 种非商业性储存方案： $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  含 70% 乙醇、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  含 70% 乙醇和 3 种商业保存液。结果发现，不同的保存液对样本产生的变化存在差异<sup>[11]</sup>。所以，非常有必要评估不同保存液的保存效果。

如果能及时提取 DNA，即使短期室温存储，对微生物组和代谢组谱的影响极小，短期粪便样品存储可以在 52 h 之内处理<sup>[21]</sup>。在不能及时提取

DNA 的条件下，将样本冷冻在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下，可以在长达 6 个月的时间里确保粪便微生物群落没有显著变化<sup>[22]</sup>，甚至婴儿粪便样品的在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下放置 2 年，微生物群落也几乎没有显著变化，除了细菌 OTU 数量有所减少，某些特定 OTU 的丰度发生了变化<sup>[23]</sup>。

对样本中微生物多样性的分析显示，随时间延长，各类保存液都存在  $\alpha$  多样性指数下降的趋势。这一趋势与  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保存一致，可能随时间延长细菌 DNA 降解所致<sup>[22]</sup>。从层次聚类结果图中可以看出，经过大多数保存液保存后，只在第 30 天时样本之间在聚类上存在交叉，说明 30 d 已经会引起肠道菌群组成的明显改变。以往的研究已经证实，在室温下保存 2 周后，样品中观察到了微生物群落的显著变化<sup>[16,22]</sup>。本研究结果将时间延长到 30 d 后，也观察到了类似现象，因此，两周内的保存时间对肠道菌群的组成影响是可以接受的。

在保持物种多样性方面，保存液 D 在不同样本中，与对照相比表现出升高多样性的趋势。这可能是由于保存液中的成分不能快速杀死其中的微生物，导致部分微生物出现了增殖，低丰度微生物的增加可能导致了整体物种多样性指数的增加。在保持物种构成方面，保存液 D 会使放线菌门和厚壁菌门增加，并且在属水平，也表现出与对照组菌群构成差异较大。这些差异与不良的保存条件导致的菌群组成改变一致。有研究发现不加保护剂，常温下肠杆菌科，特别是肠杆菌属的 OTU 的相对丰度会随着时间延长而增加，表明这类细菌并没有死亡，而是继续繁殖。

与保存液 D 不同，保存液 A、B、C 的菌群构成与对照组在门和属水平上都更接近。此外，在不同样本中，热图分析显示，保存液 C 与对照最接近。在样本 3 中，最接近的是保存液 E 和保存液 C。而保存液 D 在不同的个体中都是聚类在一起，与对照样本 S 距离较远。这就说明保存液

D 在保持菌群组成稳定方面表现不佳。

具体到某类微生物,对革兰氏阳性杆菌双歧杆菌和乳酸杆菌来说,相比对照组,保存液 A、B、C 与对照组丰度相当,而保存液 E 会相对降低,保存液 D 则相对升高。有研究也观察到了类似现象,不良保存条件会导致乳酸杆菌丰度增加。对革兰氏阳性球菌的分析显示,保存液 D 会降低该类菌的丰度,保存液 C 与对照组最接近。对于革兰氏阴性菌,不同保存液都会升高该类菌的比例,而对于克雷伯氏菌则是保存液 A、B 会导致该菌增加,保存液 C、D 和 E 与对照组相当。

从菌群整体构成来看,在第 1 天时,保存液 C 就与对照组表现出最强的相关性。此外,在 4 个时间点,与对照组相关性最强的也是保存液 C,在第 30 天时,仍是保存液 C 表现最强。在不同时间点,相关性较低的是保存液 B 和 E。

按时间来看,保存液 A 和 C 在 15 d 内都表现较好,可以满足样本运输要求。15 d 内甚至一周时间内快递可以运输样本至全国。在中国,快递服务时间一般在 3 d 左右,保存液对肠道菌群的稳定性能够维持 3 d 以上理论上都是可以用的。只要样品在收集之日迅速采用合适的保存液并用最快的邮寄方式寄出,并注意避免周末,就可以很方便地将样品送至实验室,并不会明显降低检测质量。但是,在快递服务不可靠的环境中,应该优先考虑使用保护作用更持久的保存液进行样品递送,以确保样本质量。

在本研究中,不同个体的肠道菌群结构差异明显,在  $\alpha$  和  $\beta$  多样性方面,都可以看出所选取的 5 个人的菌群组成有所不同。饮食、身体状况和生活方式等差异会导致菌群结构改变,导致个体菌群组成的差异<sup>[24]</sup>。但是,通过热图分析可以看出同一个体的优势菌群在不同保存时间内,其相对比例较稳定,占优势的菌群基本没有变化,说明同一个体的肠道菌群即使用不同保存液,在不同时间也具有稳定性。

在室温下保藏后,不同保存液对样本的菌群结构变化影响不同,变化的剧烈程度也不同。粪便样品在保存过程中某些细菌种类的损失很可能是由于代谢和氧气条件的改变而造成的<sup>[21]</sup>。有氧条件,渗透压以及乳酸和短链脂肪酸比例都进一步提高,对粪便中的某些细菌产生致命影响,而一些耐受性较好的菌会部分增殖。保存液可以使粪便样品在保存 30 d 后与对照样品菌群结构相似度基本在 90% 以上。可见粪便样本保存液确实能起到稳定样品菌群结构的作用。

采用保存液可以对粪便样品中的肠道菌群进行不超过 30 d 的常温保存,在室温条件下 15 d 内可以有效保持肠道菌群结构及多样性,维持主要菌群的相对比例,这样可以降低肠道菌群保存条件,减低采集、运输和保存成本,可以实现居家采样、大范围采样、跨地域样品运输等特殊条件下对粪便菌群的有效保存。

## REFERENCES

- [1] Graessler J, Qin Y, Zhong H, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J*, 2013, 13(6): 514–522.
- [2] Turnbaugh J, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [3] Perry RJ, Peng L, Barry NA, et al. Acetate mediates a microbiome-brain- $\beta$ -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*, 2016, 534(7606): 213–217.
- [4] Dickson I. Gut microbiota: Diagnosing IBD with the gut microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(4): 195.
- [5] Nakatsu G, Li XC, Zhou HK, et al. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun*, 2015, 6: 8727.
- [6] Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease

- influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun*, 2015, 6: 7320.
- [7] Kang DW, Ilhan ZE, Isern NG, et al. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*, 2018, 49: 121–131.
- [8] Vogt NM, Kerby RL, Dill-Mcfarland KA, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2017, 7: 13537.
- [9] Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord*, 2017, 32(5): 739–749.
- [10] Chen Z, Li J, Gui SW, et al. Comparative metaproteomics analysis shows altered fecal microbiota signatures in patients with major depressive disorder. *Neuroreport*, 2018, 29(5): 417–425.
- [11] Ma JL, Sheng LL, Hong Y, et al. Variations of gut microbiome profile under different storage conditions and preservation periods: a multi-dimensional evaluation. *Front Microbiol*, 2020, 11: 972.
- [12] Shaw AG, Sim K, Powell E, et al. Latitude in sample handling and storage for infant faecal microbiota studies: the elephant in the room? *Microbiome*, 2016, 4: 40.
- [13] Voigt AY, Costea PI, Kultima JR, et al. Temporal and technical variability of human gut metagenomes. *Genome Biol*, 2015, 16: 73.
- [14] Lauber CL, Zhou N, Gordon JI, et al. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 307(1): 80–86.
- [15] Gorzelak MA, Gill SK, Tasnim N, et al. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0134802.
- [16] Cardona S, Eck A, Cassellas M, et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*, 2012, 12: 158.
- [17] Dominianni C, Wu J, Hayes RB, et al. Comparison of methods for fecal microbiome biospecimen collection. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 103.
- [18] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [19] Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(21): 7188–7196.
- [20] Schloss D, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [21] Liang YL, Dong TY, Chen MJ, et al. Systematic analysis of impact of sampling regions and storage methods on fecal gut microbiome and metabolome profiles. *mSphere*, 2020, 5(1): e00763–19.
- [22] Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, et al. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e46953.
- [23] Bai GY, Gajer P, Nandy M, et al. Comparison of storage conditions for human vaginal microbiome studies. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e36934.
- [24] de Paepe K, Kerckhof FM, Verspreet J, et al. Inter-individual differences determine the outcome of wheat bran colonization by the human gut microbiome. *Environ Microbiol*, 2017, 19(8): 3251–3267.

(本文责编 陈宏宇)