基于 Illumina MiSeq 和 IonS5 XL 测序对原料乳中微生物多样性的比较分析

苟 萌，胡 婕，张彤彤，剧 柠*

（宁夏大学 农学院，宁夏 银川 750021）

摘要：不同的高通量测序平台各有优劣，针对研究对象选择合适的测序平台，对微生物多样性研究具有重要意义。以原料乳中的细菌为研究对象，采用 Illumina MiSeq 和 IonS5 XL 两种测序平台对细菌的 V4—V5 区进行扩增测序，探讨两种不同的测序平台在原料乳微生物多样性应用中的适用性。结果显示：两个测序平台的原始测序数据经质控后均可满足实验需求；IonS5 XL 测序在不同分类水平上的注释物种数、alpha 多样性、稀释曲线和物种丰度等级曲线方面的结果优于 Illumina MiSeq 测序，显示出原料乳中较高的群落丰富度；Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序均检出相同的优势菌门与优势菌属；Venn 图和 PCA 分析显示，Illumina MiSeq 测序相较于 IonS5 XL 测序具有更好的生物学重复性，在测序稳定性方面具有优势。后期如能加大平行样本的统计，针对重复性进行改进，IonS5 XL 测序也将在乳品微生物多样性研究中具有很大的应用空间。

关键词：16S rRNA；原料乳；Illumina MiSeq 测序；IonS5 XL 测序

中图分类号：TS 201.1　**文章编号：**1673-1689(2021)04-0067-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.008

Comparative Analysis of Microbial Community in Raw Milk by Illumina MiSeq Sequencing and IonS5 XL Sequencing

GOU Meng，*HU Jie*，*ZHANG Tongtong*，*JU Ning**

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021,China)

Abstract: Different high-throughput sequencing platforms have their own advantages and disadvantages. An appropriate sequencing platform for the research object is of great significance to the study of microbial diversity. Taking the bacteria in raw milk as the research object, Illumina MiSeq and IonS5 XL sequencing platforms were used to amplify and sequence the V4-V5 region of bacteria, and the applicability of two different sequencing platforms in the microbial diversity of raw milk was discussed. The results showed that all of the original sequencing data from the two platforms could meet the experimental requirements after quality control. The results of IonS5 XL sequencing on the number of annotated species at different taxonomic levels, alpha diversity, rarefaction curve, and rank abundance curve were superior to those of Illumina MiSeq sequencing, indicating higher community abundance in raw milk. The same dominant phyla and dominant genera

收稿日期：2020-01-11

基金项目：国家自然科学基金地区科学基金项目(31760479)。

* **通信作者：**剧　柠(1979—)，女，博士，副教授，主要从事乳品微生物及分子生物学研究。E-mail:juning1122@163.com

were found in both Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing. The Venn plots and PCA analysis showed that Illumina MiSeq sequencing had better biological repeatability than IonS5 XL sequencing and had advantages in sequencing stability. If the statistics of parallel samples could be increased and the repeatability could be improved, IonS5 XL sequencing will have great application prospects in dairy microbial diversity research.

Keywords: 16S rRNA, raw milk, Illumina MiSeq sequencing, IonS5 XL sequencing

原料乳指的是未经加工处理的生鲜牛乳,在富含多种天然营养物质的同时,也为微生物生长提供了绝佳的环境[1]。原料乳中微生物种类繁多,导致乳及乳制品在存储及加工过程中的变化具有复杂性。细菌是导致原料乳品质变化的主要微生物[2]。因此,研究原料乳中的细菌种类及数量对乳及乳制品的品质控制尤为重要。早期的微生物纯培养法、传统核酸扩增等技术操作复杂、检测灵敏度低,已经无法满足对乳及乳制品中微生物的深入研究。高通量测序技术也叫第二代测序技术,具有时效高、精度高、通量高、成本低、操作简单等优点,目前已被广泛应用于肠道环境、土壤、食品等领域的微生物多样性研究。

近年来各类测序平台快速发展,研究表明,不同测序平台因测序质量与深度的不同,对相同样本亦可产生不同的微生物多样性结果[3-4]。Illumina MiSeq 测序与 IonS5 XL 测序是目前常用的高通量测序平台。Illumina MiSeq 测序能够使多个样品在不同区域内同步测序,其读长较短,结果准确性高,覆盖度深,已被广泛用于研究醋[5]、豆酱[6]和茶叶[7]等食品,也是目前研究原料乳[8-9]、巴氏杀菌乳[10]、发酵乳[11]以及干酪[12]中微生物群落结构的重要工具。IonS5 XL 测序平台的读长长于 Illumina MiSeq 平台,最长可达 600 bp。测序时间比 Illumina MiSeq 更短,且成本更低,多被应用于肠道菌群、发酵肉[13]、冰鲜鸡肉[14]的微生物菌相分析,在乳及乳制品微生物研究中的应用报道较少。基于 IonS5 XL 测序时效性高、成本低的优点,利用它对原料乳中微生物进行测序,探究其是否适用于乳及乳制品微生物多样性的研究,能够为获取更加准确全面的乳及乳制品微生物信息提供方法依据。

作者以原料乳为研究对象,采用 16S rDNA 扩增子技术,利用 Illumina MiSeq 和 IonS5 XL 两种不同的测序平台对原料乳中微生物多样性进行分析,通过 OTU 聚类分析、alpha 多样性分析、物种注释和丰度分析,探讨两种测序平台结果一致性,比较两种测序平台之间的差异,分析各自的优缺点及适用性,为今后乳及乳制品微生物测序平台的选择、群落结构研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、设备及试剂

TGL-16M 高速台式冷冻离心机:湖南湘仪离心机仪器有限公司产品;C200 凝胶成像分析系统:北京百晶生物技术有限公司产品;核酸纯度测定仪:德国 TITERTEK BERTHOLD 公司产品。

DNeasy PowerFood Microbial Kit(100)试剂盒:德国 QIAGEN 公司产品;TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 试剂盒:美国 Illumina 公司产品;AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒:美国 AXYGEN 公司产品;GeneJET 凝胶回收试剂盒:Thermo Scientific 公司产品;Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒:Thermo Fisher 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 样品收集及预处理 严格遵循无菌操作,采集宁夏银川市某乳品企业乳罐中原料乳样品,经无菌容器密封后放入 4 ℃车载冰箱,2 小时内运回实验室,在 4 ℃冰箱中冷藏 72 h 后进行样品总细菌 DNA 的提取。

1.2.2 DNA 的提取 在 QIAGEN DNeasy PowerFood Microbial Kit (100) 试剂盒的改良基础上提取总 DNA,具体操作如下:先将 10 mL 均质原料乳样在 5 000 *g*、4 ℃下离心 10 min,去除多余上清液和脂肪,再加入 3 mL 无菌水,使用涡旋混匀器将无菌水和菌体沉淀混匀后,5 000 *g*、4 ℃下离心 5 min,去除多余的上清液和脂肪,加入 2 mL PBS 缓冲液,混匀后吸取 2 mL 菌液,按照 QIAGEN DNeasy PowerFood Microbial Kit(100)试剂盒操作说明进行

操作,并在第(4)步(转移重悬的细胞到 PowerBead Tube 上)之后进行 55 ℃、10 min 水浴,在第(19)步(在白色滤膜中加入 100 μL EB 溶液,13 000 *g* 离心 1 min)改为加入 80 μL EB 溶液。

将提取的 DNA 用 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳和核酸纯度测定仪进行浓度和纯度检测。DNA 样品混匀后平分 6 份,分别编号为 1—6,置于-20 ℃冰箱冻存,送样备用。

1.2.3 Illumina MiSeq 测序平台的检测 1—3 号核酸样本采用 Illumina MiSeq 平台进行测序。选择细菌的 16S rRNA 基因的 V4—V5 区作为目的扩增段,使用引物 515F(GTGCCAGCMGCCGCGGTAA)和引物 907R(CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)进行扩增。扩增体系为(25.0 μL):5× reaction buffer 5.0 μL,5× GC buffer 5.0 μL,dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL,正向引物(10 μmol/L) 1.0 μL,反向引物(10 μmol/L) 1.0 μL,DNA 模板 2.0 μL,ddH_2O 8.7 μL,Q5 高保真 DNA 聚合酶 0.3 μL。PCR 扩增程序为:98 ℃预变性 2 min;98 ℃变性 15 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,进行 25 次循环;最后 72 ℃延伸 5 min。使用 2.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,采用 AXYGEN 公司的凝胶回收试剂盒对目标片段进行切胶回收。将扩增回收产物进行荧光定量,使用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 试剂盒制备测序文库,2.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳进行文库最终的片段选择与纯化,在 Solex MiSeq 2500 测序平台上进行 300 bp 双端测序。

1.2.4 IonS5 XL 测序平台的检测 4—6 号核酸样本采用 IonS5 XL 平台进行测序。选择细菌的 16S rRNA 基因的 V4—V5 区作为目的扩增段,将 DNA 样本使用无菌水统一稀释至 1 ng/μL。用引物 515F(GTGCCAGCMGCCGCGGTAA)和引物 806R(CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) 进行扩增。扩增体系为(30.0 μL):Phusion Master Mix(2×) 15.0 μL,引物(2 μmol/L) 3.0 μL,DNA 模板 10.0 μL,H_2O 2.0 μL。PCR 扩增程序:98 ℃预变性 1 min;98 ℃变性 10 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。使用 2.0 g/dL 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,根据 PCR 产物浓度进行等量混样后采用 1×TAE 电泳缓冲液,2.0 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物,采用 Thermo Scientific 公司 GeneJET 凝胶回收试剂盒切胶回收产物。使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 试剂盒进行文库构建,经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 IonS5 XL 进行 400 bp 单端测序。

1.2.5 测序数据优化处理与分析 获得原始数据(raw data)后使用 FLASH 软件和 Trimmomatic 软件对其分别进行拼接和质控,设置 50 bp 的窗口,去除平均长度小于 20 bp 的序列后端的序列,再去除质控后长度小于 50 bp 及含 N 碱基的序列;将 Overlap 长度小于 10 bp 及错配比率大于 0.2 的序列去除,根据序列首尾两端的 Barcode 和引物区分样品并调整序列方向,Barcode 允许的错配数为 0,最大引物错配数为 2,去除存在模糊碱基的序列,最终得到优化序列。

利用 Uparse 7.1(http://www.drive5.com/uparse/)在 97%相似度下进行 OTU 聚类,对于优化序列,去除单序列,并在聚类过程中去除嵌合体;参考 Silva 数据库(http://www.arb-silva.de),采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,以获取每个 OTU 对应的物种分类信息,置信度阈值为 0.7。利用 Mothur 1.30.2(https://www.mothur.org/wiki/Download_mothur)进行 alpha 多样性分析,并利用 R 语言制作稀释曲线、丰度等级曲线、Venn 图、群落柱形图以及主成分分析(PCA)图。通过 OTU 的物种注释信息并结合 OTU 丰度表对门和属两个生物学水平上的物种丰度结果进行物种多样性和测序重复性比较。

2 结果与讨论

2.1 测序数据预处理及质控结果比较

测序得到的最初的序列即为原始序列,其中存在一定比例的干扰数据,对原始数据进行质控,得到有效序列后进行 OTU 聚类和物种分类分析。由两个测序平台测序数据及质控结果比较(见表 1)可知,Illumina MiSeq 测序得到的原始序列数低于 IonS5 XL 测序,但经过相同的质控参数优化处理后,Illumina MiSeq 测序平台的有效序列在原始序列中所占比例为 89.61%,高于 IonS5 XL 测序的 76.13%的结果,说明 IonS5 XL 测序得到的原始序列数据量虽然大,但低质量序列数目较多。而由两个测序平台所得出的平均读长可以看出,IonS5 XL 测序的序列平均读长为 410 bp,高于 Illumina MiSeq 测序得出的平均读长 372 bp。因此,虽然 IonS5 XL

表 1 Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序结果统计比较

Table 1 Statistical comparison between Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

测序平台	原始序列数	有效序列数	有效序列占原始序列比例	平均长度/ bp
Illumina MiSeq	146 322	131 124	89.61%	372
IonS5 XL	250 779	190 935	76.13%	410

测序平台识别出较多的原始序列数,但可能是由于这些原始序列并非全部为高质量序列,经质控处理后低质量序列最终被剔除。

2.2 OTU 分类地位鉴定结果比较

从门、纲、目、科、属各分类学水平下注释物种数来看 (见表 2),IonS5 XL 平台注释出的物种数目均多于 Illumina MiSeq 平台,分别是 Illumina MiSeq 的 1.6 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.6 倍、1.9 倍,总 OTU 数为 Illumina MiSeq 测序的 2.5 倍。可见 IonS5 XL 测序能够得到更多的物种信息。

表 2 Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序在各分类水平上注释物种数比较

Table 2 Comparison of the annotated species numbers at each taxonomic level between Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

测序平台	总 OTU	门	纲	目	科	属
Illumina MiSeq	148	8	13	30	57	91
IonS5 XL	380	13	20	49	91	178

2.3 Alpha 多样性结果比较

2.3.1 多样性指数结果比较 微生物群落 alpha 多样性可由多种指数反映。不同的指数对于衡量群落多样性的侧重点各不相同,常用的度量指数主要包括侧重于体现群落丰富度的 Chao1 指数和 ace 指数, 兼顾群落均匀度的 Shannon 指数和 Simpson 指数,以及反映群落覆盖度的 Coverage 指数。一般而言,Chao1 或 ace 指数越大, 表明群落的丰富度越高;Shannon 值越大,说明群落多样性越高;Simpson 指数值越大,说明群落多样性越低。通常 Shannon 指数对群落的丰富度以及稀有 OTU 更敏感,而 Simpson 指数对均匀度和群落中的优势 OTU 更敏感。Coverage 是指各样本文库的覆盖率, 其数值越高,则样本中序列被测出的概率越高。该指数反映本次测序结果是否代表了样本中微生物的真实情况[5]。Alpha 多样性指数表(见表 3)显示,两个测序平台所得出的 Coverage 值均高于 99.00%, 说明样品文库覆盖率足够大,两个测序平台的结果足够反应样本的真实情况; 就 Chao1 指数和 ace 指数而言,IonS5 XL 平台检测到的结果分别为 Illumina MiSeq 平台检测到的 2.2 倍和 2.09 倍,且差异性显著($P<0.05$), 表明 IonS5 XL 测序检测到的物种丰富度要高于 Illumina MiSeq 测序;IonS5 XL 测序的 Shannon 指数是 Illumina MiSeq 测序的 1.32 倍,Illumina MiSeq 测序样本的 Simpson 指数是 IonS5 XL 测序的 1.58 倍,这说明本实验中 IonS5 XL 测序所得到的微生物结构可能会更加丰富。

表 3 Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序的 alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity index of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

测序平台及 P 值	Chao1 指数	ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage 指数/%
Illumina MiSeq	128.74±14.33	137.18±13.34	2.20±0.87	0.18±0.01	99.95±0.01
IonS5 XL	282.98±52.18	313.90±19.69	2.90±0.64	0.12±0.06	99.87±0.03
P 值	0.008	0	0.212 9	0.119	0.009

2.3.2 稀释曲线结果比较 稀释曲线可直接反映当前测序数据量的合理性,并间接反映样本物种的丰富程度,当曲线趋向平坦时,说明测序数据量渐进合理,增加数据量只会产生少量新的物种。两测序平台的稀释曲线见图 1, 横坐标代表随机抽取的测序数据量, 纵坐标代表观测到的物种数量。对 Illumina MiSeq 和 IonS5 XL 测序所得序列进行抽样分析,随着测序深度的增加,曲线逐渐变得平坦,表明原料乳样品中绝大部分微生物已经被检测出,此测序水平可以表示出样品微生物的多样性,两个平

台的测序量均可满足实验要求。

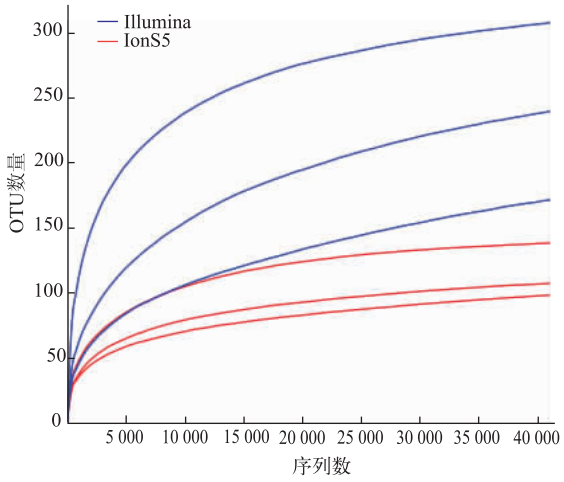


图 1 Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction Curve of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

2.4 丰度等级曲线结果比较

丰度等级曲线的横坐标代表某分类学水平下的 OTU 数目排序等级,纵坐标表示该分类水平下物种数目的相对百分含量,样本曲线延伸终点的横坐标位置为该样本的物种数量,若曲线下降平缓则表明样本的物种多样性越高,而曲线下降快速陡峭则表明样本中的优势菌群所占比例很高,物种多样性较低。随着物种等级的增加,两个测序平台得出的相对丰度均降低并逐渐趋于平缓(见图 2),表明此测序水平下,二者均已检测出原料乳中绝大部分微生物。而 Illumina MiSeq 测序得到的丰度等级曲线下降比较陡峭,IonS5 XL 测序得到的曲线下降较为平缓,说明 IonS5 XL 测序比 Illumina MiSeq 测序所得的物种数量多。

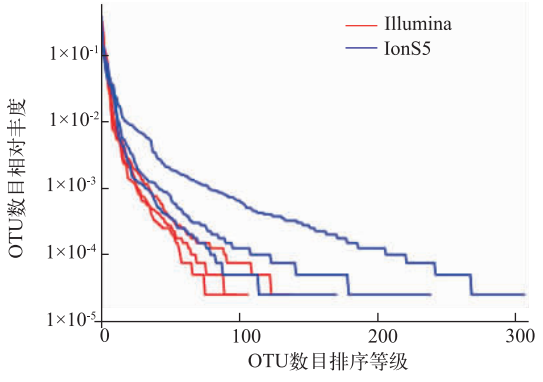
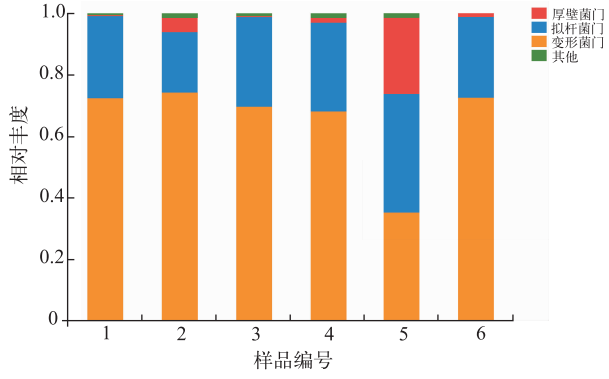


图 2 Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序的丰度等级曲线图

Fig. 2 Rank abundance of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

2.5 细菌的物种分类注释结果比较

2.5.1 门水平上的物种相对丰度 在门水平上,Illumina MiSeq 平台检测到了 8 个细菌门,IonS5 XL 平台检测到 13 个细菌门(见表 2),说明原料乳的微生物多样性组成丰富,并且 IonS5 XL 测序覆盖的细菌菌群比 Illumina MiSeq 测序更加广泛。进一步分析比较门分类水平下 Illumina MiSeq 与 IonS5 XL 测序的物种相对丰度可知(见图3),两个平台检测到原料乳中的优势菌门组成差别不大,且优势菌门均为变形菌门(Proteobacteria),这与前人报道一致[1,8,11]。Illumina MiSeq 测序与 IonS5 XL 测序所检出的变形菌门平均相对丰度分别为 72.4% 和 58.8%,但差异性并不显著(P>0.05)。拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)也是原料乳中常见的菌门[15-17],且两测序平台相对丰度的差异性也并不显著(P>0.05)。Mareike 等[18]采用传统的选择性培养法对冷藏 72 h 原料乳中的微生物进行研究,所分离鉴定出的菌株归属于拟杆菌门、厚壁菌门与变形菌门,与作者所选用的两个测序平台的优势菌门结果一致,说明两个测序平台在分析乳中微生物方面结果准确可靠。



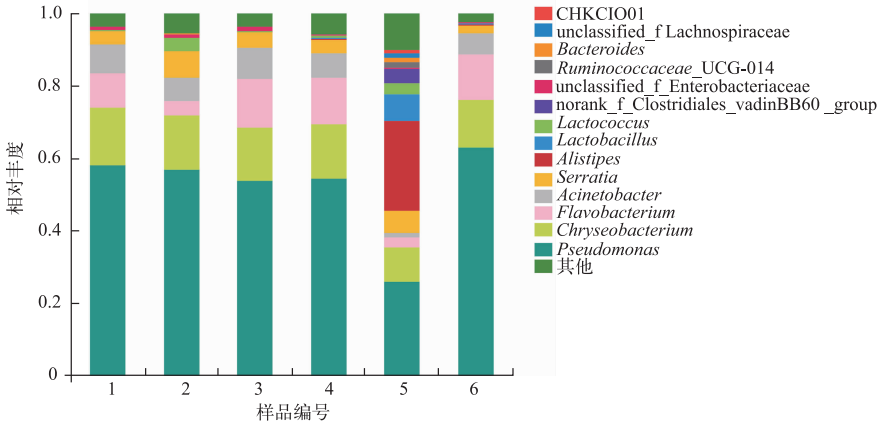
1、2、3 为 Illumina MiSeq 测序平台结果;4、5、6 为 IonS5 XL 测序平台结果。

图 3 门分类水平下 Illumina MiSeq 与 IonS5 XL 测序的物种相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of predominant bacteria in phylum classification level of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

2.5.2 属水平上的物种相对丰度及差异 Illumina MiSeq 测序检测到 123 个细菌属,IonS5 XL 测序检测到 178 个细菌属(见表 2)。对两个测序平台属水平上的物种丰度进行进一步研究分析(见图 4),

Illumina MiSeq 与 IonS5 XL 平台所检测到原料乳中的优势菌属均为假单胞杆菌属(*Pseudomonas*),在已检测出的细菌属中平均占比分别为 56.6% 和 48.1%,见图 5,差异性不显著(P>0.05)。两测序平台也都在原料乳中检出了金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*),以及少量沙雷氏菌属(*Serratia*)和另支菌属(*Alistipes*),相对丰度的差异均不显著(P>0.05)。先前的研究显示,尽管环境、泌乳期、冷藏温度等因素会造成原料乳中微生物存在差异,但其中主要菌属结构相同。李玲等[8]利用高通量测序技术对原料乳冷藏过程中微生物多样性进行研究,结果显示,冷藏 72 h 后原料乳中的优势菌属为假单胞杆菌属,相对丰度高达 51.0%;Nuwan[19]利用 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 技术对原料乳中嗜冷微生物进行分离鉴定,得到的 604 株分离菌株有 19.9%属于假单胞杆菌属;于国萍等[20]研究原料乳时,不动杆菌属的相对丰度也位于前列。Mareike[18]利用选择性培养法获得了乳中的黄杆菌属菌种。因此,在原料乳优势菌属的检测上,两个平台的结果均可满足准确性的要求。



1、2、3 为 Illumina MiSeq 测序平台结果;4、5、6 为 IonS5 XL 测序平台结果。

图 4　属分类水平下 Illumina MiSeq 与 IonS5 XL 测序的物种相对丰度

Fig. 4　Relative abundance of predominant bacteria in genus classification level of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

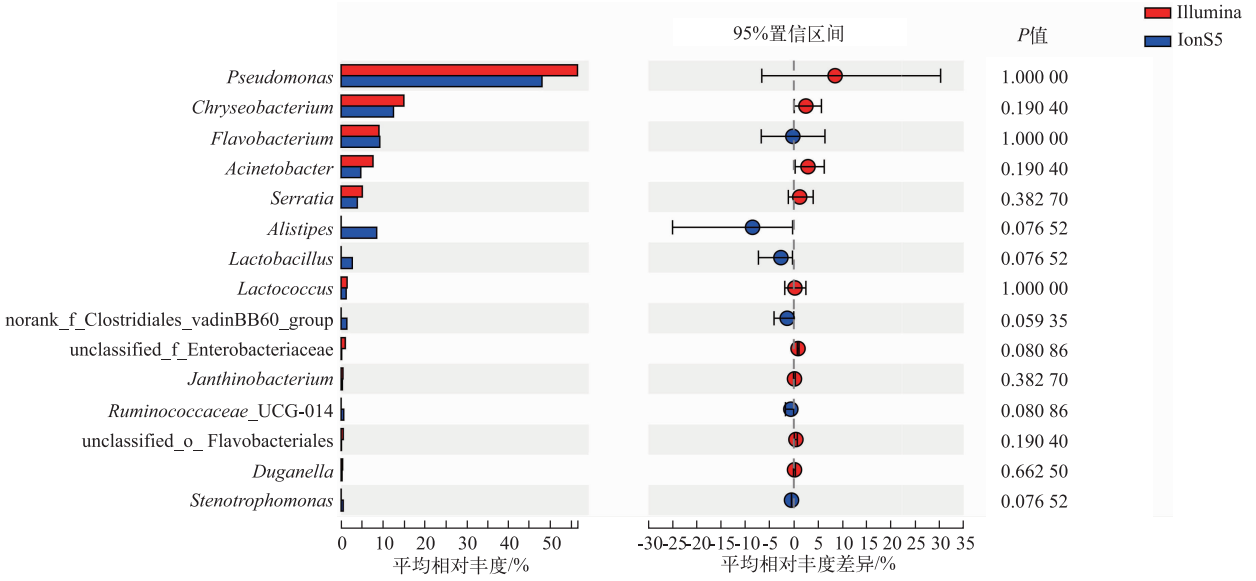
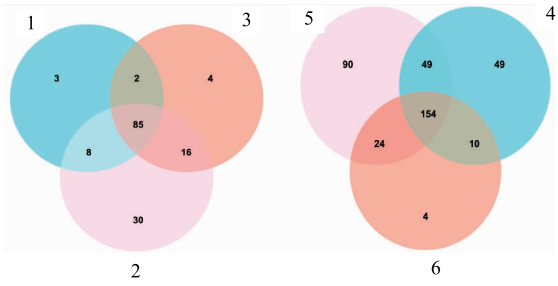


图 5　Illumina MiSeq 测序与 IonS5 XL 测序属水平多物种差异检验柱形图

Fig. 5　Wilcoxon rank-sum test bar plot on Genus level of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

2.6 测序平台稳定性比较

分别对两个测序平台的平行样本中共有和独有的 OTU 进行 Venn 图绘制(见图 6),Illumina MiSeq 测序检测到平行样本中共有的 OTU 个数为 85,占所有 OTU 的 57.4%;IonS5 XL 测序检测到原料乳中共有的 OTU 个数为 154,占所有 OTU 的 40.5%。Illumina MiSeq 测序得到的各平行样本的独有 OTU 数目差距较小,而 IonS5 XL 测序的各平行样本的独有 OTU 数目差距较大。可初步认为针对原料乳菌群多样性的研究,Illumina MiSeq 平台的重复性优于 IonS5 XL 平台。此外,从稀释曲线(见图 1)以及 DNA 样品丰度等级曲线(见图 2)来看,Illumina MiSeq 平台测得的 3 个平行样本的物种数量以及丰度等级的重合度均高于 IonS5 XL 平台。



1、2、3 为 Illumina MiSeq 测序平台结果;4、5、6 为 IonS5 XL 测序平台结果。

图 6 Illumina MiSeq 测序和 IonS5 XL 测序基于 OTU 的 Venn 分析比较

Fig. 6 Venn analysis comparison based on OTU between Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

主成分分析(PCA)是通过分析不同样本群落组成,反映样本间的差异和距离。样本物种组成越相似,反映在 PCA 图中的距离越近[21]。图 7 可以看到 Illumina MiSeq 测序的 3 个样本点距离较近,其中两个样本点有重叠现象,说明平行样本之间差异较小。而 IonS5 XL 测序的 3 个样本点距离较远,分布离散,群落结构差异较大。再次证明了本实验中,Illumina MiSeq 平台的检测结果具有更高的稳定性与生物学重复性。

通过门水平和属水平上细菌相对丰度的分析,可以看出随着分类水平的降低,两个平台所检出的物种丰富度差异增大,在属水平上,IonS5 XL 测序

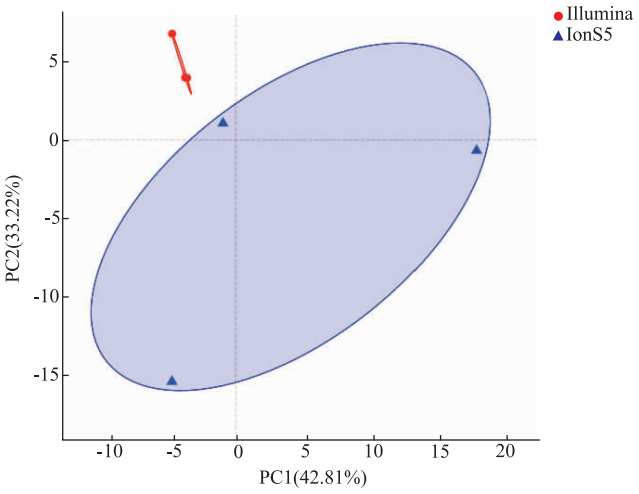


图 7 Illumina MiSeq 与 IonS5 XL 测序对样本属水平的 PCA 分析

Fig. 7 PCA analysis on genus level of Illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing

检测得到的菌属种类要多于 Illumina MiSeq 测序。然而两个测序平台所检出的优势菌属相同,对两个平台所得到的各优势菌属的相对丰度进行差异分析,发现两者之间并不存在显著性差异。Anna 等[22]采用 Illumina MiSeq 与 IonS5 用于草药茶的微生物组成分析,最终两个平台在定性和定量上都产生了一致的结果。本研究中,可初步认为两个平台对原料乳中优势菌群的检测结果具有一致性,且对优势菌群的检测均具有准确性。

本实验中两个平台的优势群落组成差异虽然不显著,但依然可以看出优势菌群在 Illumina MiSeq 测序结果中的占比与 IonS5 XL 测序结果相比较高,IonS5 XL 测序所检出的菌属尤其稀有菌属多于 Illumina MiSeq 测序。何世耀等[3]的研究表明测序深度会影响微生物群落的丰富度。测序深度较低时,环境中的群落大多由高丰度微生物组成,从而掩盖了低丰度微生物信息,低估了环境微生物的多样性。

此实验中,IonS5 XL 测序结果表现出来的稳定性和重复性不高,平行样本间离散程度较大,这可能与数据量不足有关,尚需大量的实验数据继续验证。另外,前人的研究中发现,测序的错误率会随着读长增加而提升,需要在质控环节严格控制,降低错误干扰[3]。即也可能是因为 IonS5 XL 较长的读长引起的测序错误,进而影响了平行样本间结果稳定

性。这也是后续比较测序平台时可供参考的方向。

一个好的测序平台应当具备测序时间短、生物学重复性良好、稳定性高等特点,并且能展示出全面准确的物种多样性信息。Illumina MiSeq 测序是最常见的二代双端测序平台之一,测序时间大约为28~56 h,是常被用于乳品微生物研究领域的测序平台之一[23]。IonS5 XL 测序是 Thermo 公司近年来推出的较新的二代单端测序平台,能够在较短的时间(约 2~11 h)内完成测序,且测序费用低于 Illumina Miseq 平台,常被用于临床试验及真菌多样性的检测[24],尚未见应用于乳品研究领域的报道。作者比较了两测序平台在原料乳微生物多样性中的应用,结果显示二者均能检出相同的优势菌相,且相对丰度差异性不显著,测序结果具有一致性。从物种丰富度来看,IonS5 XL 测序可检出乳中更多的低丰度微生物,获得更全面的生物信息。但在各平台 3 个平行样本的检测结果中发现,IonS5 XL 测序的重现性不如 Illumina MiSeq 测序。后期需加大样本量进一步分析。相信经过针对性改进后,IonS5 XL 测序将在乳品微生物研究领域拥有更大的应用空间。

3 结 语

作者利用 Illumina MiSeq 与 IonS5 XL 两种高通量测序对原料乳中的微生物多样性进行研究。IonS5 XL 与 Illumina MiSeq 两种测序所得到的原始数据经过相同的预处理及质控后,结果均可满足实验需求。IonS5 XL 高通量测序相较于 Illumina MiSeq 能够获得更多的 OTU,鉴定出更多的微生物群落,且对低丰度菌群较为敏感。而 Illumina MiSeq 测序的广泛度不够,忽略了某些稀有物种,低估了样本的微生物多样性。在优势菌相上,两测序平台获得的信息相同,差异性并不显著,说明 IonS5 XL 测序同样适用于乳品微生物检测。值得注意的是,无论是平行样本之间稀释曲线、丰度等级曲线以及物种丰度的结果,都显示 Illumina MiSeq 测序结果的重现性优于 IonS5 XL 测序。因此,Illumina MiSeq 测序目前依然能够为原料乳微生物多样性的研究提供稳定且较为全面准确的测序信息,而IonS5 XL 测序在针对稳定性进行改进后,能够替代 Illumina MiSeq 测序,更为全面、快捷地研究乳品微生物多样性。

参考文献:

[1] KIM I,HUR Y,KIM E,et al. Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea[J]. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**,2017,30(11):1643-1650.

[2] WOUTERS J T M,AYAD E H E,HUGENHOLTZ J,et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products [J]. **International Dairy Journal**,2002,12(2):91-109.

[3] 何世耀,胡万金,肖玲,等. 对不同公司 16S rRNA 基因 MiSeq 测序数据的一致性分析[J]. 微生物学通报,2018,45(12):2648-2661.

[4] RAJU C S,LAGSTROM S,ELLONEN P,et al. Reproducibility and repeatability of six high-throughput 16S rDNA sequencing protocols for microbiota profiling[J]. **Journal of Microbiological Methods**,2018,147:76-86.

[5] AI M,QIU X,HUANG J,et al. Characterizing the microbial diversity and major metabolites of Sichuan bran vinegar augmented by *Monascus purpureus*[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2018,292:83-90.

[6] 赵馨馨,崔梦君,董蕴,等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析巴东地区豆瓣酱中微生物多样性[J]. 现代食品科技,2019,35(9):297-303.

[7] RUI Y,WAN P,CHEN G,et al. Analysis of bacterial and fungal communities by Illumina MiSeq platforms and characterization of *Aspergillus cristatus* in Fuzhuan brick tea[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2019,110:168-174.

[8] LI L,RENYE J A,FENG L,et al. Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing[J]. **Journal of Dairy Science**,2016,99(9):7016-7024.

[9] 姚宇秀,陈媛,郭佩佩,等. Illumina MiSeq 高通量测序技术研究原料乳及环境中细菌多样性和致病菌的分布情况[J]. 中国食品学报,2019,19(1):249-254.

[10] 丁瑞雪,耿丽娟,张铁华,等. 基于下一代测序技术分析巴氏杀菌乳中残留细菌在贮藏期间的动态变化[J]. 食品科学,2019,40(14):77-83.

[11] 张敏,张艳,黄丽丽,等. 基于 16S rDNA 高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性[J]. 食品科学,2017,38(20):27-33.
[12] DALMASSO A,DEL RIO M D S,CIVERA T,et al. Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing[J]. **LWT–Food Science and Technology**,2016,69:490-496.
[13] 米瑞芳,陈曦,熊苏玥,等. 传统自然发酵酸肉中细菌群落多样性与风味品质分析[J]. 食品科学,2019,40(2):85-92.
[14] 茹志莹,唐婷婷,姚瑶,等. 高通量测序方法分析冰鲜鸡肉保鲜期间微生物菌相变化研究[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(11):3319-3328.
[15] DOYLE C J,GLEESON D,OTOOLE P W,et al. High-throughput metataxonomic characterization of the raw milk microbiota identifies changes reflecting lactation stage and storage conditions[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2017,255:1-6.
[16] 曾学琴,柳陈坚,杨雪,等. 高通量测序法检测奶牛乳房炎关联微生物群落结构及多样性[J]. 浙江农业学报,2019,31(9):1437-1445.
[17] DOYLE C J,GLEESON D,OTOOLE P W,et al. Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2017,83(2):e02694.
[18] WEBER M,GEISSERT J,KRUSE M,et al. Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide[J]. **Journal of Dairy Science**,2014,97(11):6761-6776.
[19] VITHANAGE N R,DISSANAYAKE M,BOLGE G,et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions,seasonality and their spoilage potential[J]. **International Dairy Journal**,2016,57:80-90.
[20] 于国萍,陈媛,姚宇秀,等. 利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析原料乳的菌群分布[J]. 食品科学,2018,39(16):186-191.
[21] 禹飞,梁俊峰,史静龙,等. 林冠受损对小坑林场土壤固碳微生物群落结构的影响[J]. 微生物学通报,2017,44(10):2297-2306.
[22] SPERANSKAYA A S,KHAFIZOV K,AYGININ A A,et al. Comparative analysis of Illumina and Ion Torrent high-throughput sequencing platforms for identification of plant components in herbal teas[J]. **Food Control**,2018,93:315-324.
[23] 王一然,岳喜庆,陶冬冰,等. 高通量测序技术在乳品微生物研究中的应用[J]. 乳业科学与技术,2018,41(3):37-41.
[24] 刘畅,汪汉成,谢红炼,等. 感赤星病烟叶的真菌群落结构分析[J]. 贵州农业科学,2019,47(7):54-59.

科 技 信 息

澳新拟批准一种谷氨酰胺酶作为加工助剂

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,2021 年 2 月 25 日,澳新食品标准局发布 151–21 号通知,其中 A1223 号申请,申请将来自黑曲霉的谷氨酰胺酶(Glutaminase)作为加工助剂。

据通知,该谷氨酰胺酶用于某些调味料的生产加工中。

[信息来源]食品伙伴网.澳新拟批准一种谷氨酰胺酶作为加工助剂[EB/OL]. (2021–2–25). http://news.foodmate.net/2021/02/585886.html