

## 1. Microbe-seq 的技术原理是什么？

Microbe-seq 基于微流控技术对单个微生物进行捕获。将捕获有单个微生物的液滴与含有裂解试剂的液体进行合并，让微生物释放出基因组信息后，在加入随机 6 碱基和 phi29 酶后进行多重替代扩增 (MDA)。之后对扩增得到的基因组进行片段化处理。接着，会在每一个液滴中加入一个微球，微球上面具有独特的 barcode 标签用来对液滴中的基因组进行标记，之后，打破液滴，对得到的基因组片段进行测序，从而实现高通量（一次 6000 个以上）单细菌的基因组测序。

## 2. Microbe-seq 技术有具体的应用案例文章发表吗？

Microbe-seq 是比较新的技术，自从去年六月份后，我们已经和许多微生物领域专家展开了合作，得到了大量有趣的实验数据。从今年下半年开始，将会陆陆续续有应用文章发表见刊。

## 3. 单细胞微生物基因组的优势特色是什么？

首先，这项技术是全球范围内首次实现高通量单细胞微生物基因组检测的技术，它能够同时兼顾通量与微生物基因组检测精度，因此对于绘制特定样本中的微生物图谱、高效挖掘微生物资源等研究需求具有显著的优势。其次，相较于传统的微生物组检测技术，它具有物种鉴定精度更高（对标宏基因组。宏基因组一般在种水平，本技术达到菌株水平）、检测通量高且单个细胞基因组检测成本低（对标纯培养微生物基因组以及基于孔板的单细胞微生物



基因组)、水平基因转移、噬菌体-宿主关联及精准溯源等分析优势，能够帮助研究者更深层次了解微生物组背后的调控机制。

#### **4. Microbe-seq 与传统测序技术如宏基因组技术相比，其优势是什么？**

目前宏基因组技术常用的分箱组装算法存在两个问题：（1）菌株水平的分辨率；（2）无法准确描述质粒、噬菌体等可移动基因元件的归属问题。通过单细胞微生物基因组测序，由于测序获得的每一条 reads 都带有细胞条形码，可以精准区分每个细胞的基因组信息，从而实现同种不同株的检测精度，以及对水平基因转移事件的精准溯源。

#### **5. Microbe-seq 的这些技术优势怎么具体体现在应用层面？**

首先，针对菌株水平鉴定精度这一优势，同种不同株的微生物往往在功能上存在巨大的差异。以大肠杆菌为例，E. coli O157 是一种临床上常见的条件致病菌，而 E. coli K12 则是一株在实验室及工业界中常用的非致病菌株。因此，在菌株分辨率下对微生物组进行研究，是更深层次了解微生物背后调控机制的必要手段。其次，针对水平基因转移溯源，人们可以通过使用单细胞微生物基因组技术使得目前一些微生物共生互作相关研究——例如人体中病原菌与共生菌的耐药基因转移、环境中微生物功能基因的分享及协同进化等方向得到更深入地探索。

#### **6. 除了 Microbe-seq 特有的一些优势之外，在物种丰度定量准确性等指标上是否与传统的测序技术，比如宏基因组技术进行过比较？**

有的。发表在 Science 上的技术文章中，已经对该技术的可靠性进行了充分论证。首先，Microbe-seq 和宏基因组技术项目，无论在物种检出以及丰度定量上都高度一致。其次，基于 Microbe-seq 组装出的微生物基因组中大部分与金标准微生物基因组的平均核苷酸一致性 (ANI) 在 99.5% 以上。

## 7. Microbe-seq 可用于什么样本？

Microbe-seq 可用于各种微生物样本，除了粪便样本以外，还可以检测包括口腔拭子、生殖道拭子、肠道内容物、土壤、活性污泥、水体滤膜、海洋沉积物等各类医学、农业、工业及环境微生物样本。

## 8. Microbe-seq 对样本的要求是什么？

新鲜采集样本加入带有甘油和 pbs 的保存液（具体配方请见送样建议）中冻存，并保证有效细胞数大于  $1 \times 10^7$ 。

## 9. Microbe-seq 在捕获时对对象的大小有要求吗？

在 Microbe-seq 实验中，液滴的直径大约为数十微米，只要不是那些极特殊的，细胞直径大于 50 微米的微生物都可以被捕获。

## 10. Microbe-seq 项目适用于杂质较多的环境样本吗？

适用。对于环境样本，前期就会通过多步实验处理（如离心、过细胞筛等）方式尽可能的去除杂质。即使剩余的少量杂质在上机时被液滴捕获到，它所能释放出来的基因组信息也十分有限，测序后得到的 reads 也相对较少，在数据质控环节会被剔除，不影响正常分析。

## 11. Microbe-seq 能否用于真菌？

Microbe-seq 原先的裂解反应体系是针对细菌开发，如果要检测其它类型微生物，需要对裂解体系进行优化测试。目前我们已经开发出可同时有效裂解细菌+酵母的单细胞反应体系。其余真菌，如丝状真菌，担子菌等尚有待验证。

## 12. Microbe-seq 可以检测病毒吗？

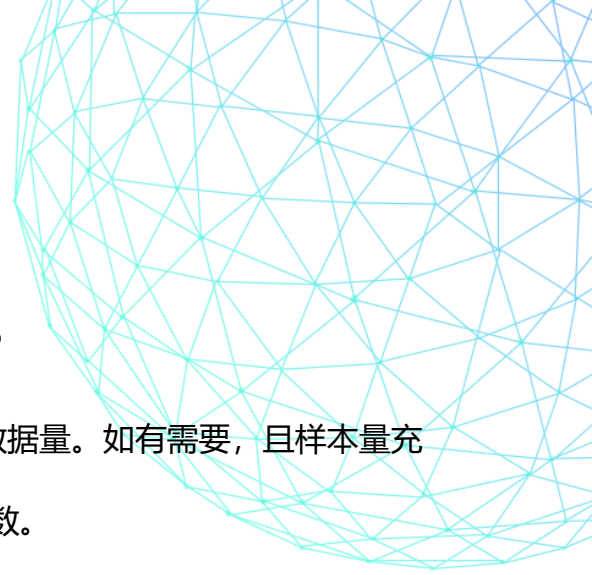
目前尚未开发针对游离病毒的检测和分析方法。细菌胞内的 DNA 病毒可以被检测和分析到。通过本技术可以在菌株水平实现噬菌体与细菌宿主的关联分析。

## 13. Microbe-seq 技术可以做转录组吗？

该技术目前只适用于单细胞微生物基因组。

## 14. Microbe-seq 一次能捕获到多少细胞？

在投入微生物量充足的情况下，能保证一次实验获得至少 6000 个以上细胞。



## 15. Microbe-seq 能测到多少细胞？测序量多少？

一个反应的试剂盒至少可测到 6000 个细胞，150G 的数据量。如有需要，且样本量充足的情况下，可选择消耗多个反应试剂盒以达到更高的细胞数。

## 16. Microbe-seq 需要最低的细胞数是多少？

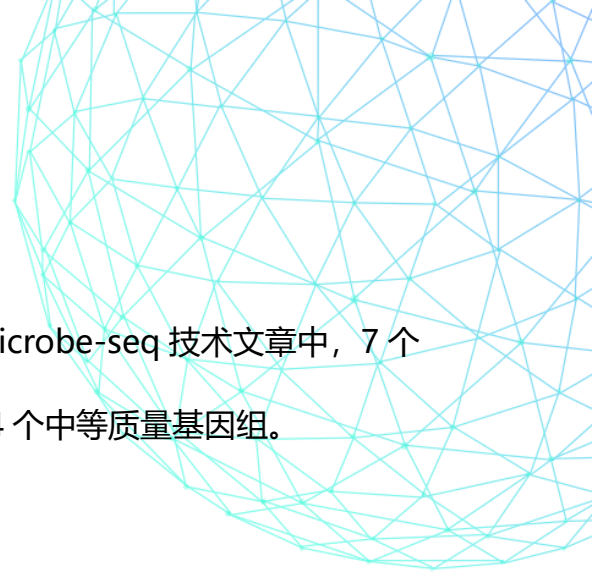
如需达到标准 6000 个细胞的检出，一般需要投入至少 100 万细胞。如部分样本实在低于 100 万细胞，也能继续往下进行实验，风险是无法获得足够多的有效细胞。在有效细胞数量不足的情况下，后续的基因组组装质量也会降低。

## 17. Microbe-seq 在用液滴进行单个微生物捕获的时候，会不会出现空的液滴或者是一个液滴中捕获多个微生物的情况？

根据泊松分布原理，当投入的液滴远大于微生物数量时，绝大部分的滴液内至多包含一个微生物。因此，只要按照 Microbe-seq 标准的实验步骤操作，一次实验最终会得到大量的空液滴、少量含有单个细胞的液滴以及极少量含有多个细胞的液滴。其中，空液滴因为无法被有效地扩增 DNA，最终被测到的有效 reads 会低于质控阈值从而被剔除；包含多个细胞的液滴则会通过污染度评估被剔除。

## 18. Microbe-seq 能组装出多少基因组？组装质量如何？

组装基因组的数量和组装质量与样本类型、样本中微生物的多样性和组装方法等多种因素有关，我们不作保证。一般来说，测到的细胞数量越多，样本中微生物多样性越低，组装



质量越好。这里给出一个参考依据，发表在 Science 上的 Microbe-seq 技术文章中，7 个样本共 21900 个细胞，总共组装出 52 个高质量基因组和 24 个中等质量基因组。

## 19. Microbe-seq 可以测平板上培养的菌落吗？

技术上，只要是细胞数量大于 100 万的样本都可以检测。同时，需要充分考虑使用本技术检测纯培养菌落的意义。一般只有假设菌落内部的微生物群体会出现基因组水平上的变化和差异才有必要使用本技术去检测，不然直接进行 bulk 的微生物基因组测序即可。

## 20. 针对单一纯培养菌株，可否利用 Microbe-seq 技术检测它们在培养过程中产生的差异（如自然突变、诱导突变、质粒丢失等）？

Microbe-seq 可以做到菌株水平的鉴定。但对于这种单菌落中部分菌株存在的变异，如果是变异程度特别小的话（例如自然突变），目前的技术不能有效分辨突变 SNP 与测序错误。但若是变异程度高，理论上可以检测到。

## 21. 从人或动物中取出的微生物样本，Microbe-seq 会不会存在测到宿主细胞的数据占比过高的问题？

部分样本会存在宿主细胞比例占比过高的问题，但我们有相应的解决方案——在微生物制备时，会针对性地裂解宿主细胞，最大程度上提高有效测序数据。在生物信息分析时，会对每个细胞进行物种注释，剔除属于宿主的细胞信息后进行后续分析。





## 22. Microbe-seq 可以应用于噬菌体与宿主的关联分析，这一部分如何实现？

Microbe-seq 技术基于微流控技术，利用生成的液滴对细菌进行捕获，在捕获时，液滴不仅包裹了单个细菌，也可能包裹了和该细菌有直接接触的噬菌体。并且，Microbe-seq 技术在每个液滴中都加入了一个微球，用来对这个液滴中的基因组信息进行标记，这样就能知道测到的噬菌体和微生物的序列片段是否来自于同一个液滴。该技术发表在 Science 的文章中，就利用 Microbe-seq，发现了人肠道中的普通拟杆菌是噬菌体 crAssphage 主要的体内宿主物种。

## 23. Microbe-seq 技术的测序方法、测序参数、质控参数是怎样？

本技术目前适配的是 illumina PE150 测序，后续测序质控参数与其它基于 illumina PE150 的测序产品一致。

## 24. Microbe-seq 项目最终交付的数据形式是什么样的？

如果不需要分析，Microbe-seq 项目最终交付的是去完 barcode 的每个细胞测序 reads 的 fastq 文件。如果包含分析，交付数据则包括每个细胞测序 reads 的 fastq 文件、组装后基因组的 fasta 文件，分析报告及相应图表附件。

## 25. 微生物的基因组相似度都有百分之七八十，整体 20%左右的微生物基因组覆盖度，如何有效进行分类工作？



20%的覆盖度是指只用一个细胞 reads 进行组装后得到的基因组的完整图，并不是 reads 在基因组上覆盖度的意思。在用细胞 reads call SNP 的时候，细胞和细胞之间是有足够多共同覆盖区域的，这些覆盖区域内的 SNP 差异足够对细胞进行菌株水平的分类。