

高通量测序技术在人类肠道菌群检测中的应用

张桓毓*

(山西大学, 太原 030006)

摘要: 肠道菌群与人体健康息息相关, 准确全面检测肠道菌群至关重要。本文详细阐述了高通量测序技术的基本原理、主要类型及其在人类肠道菌群检测方面的应用情况, 同时介绍了肠道菌群对人类健康的重要影响, 探讨高通量测序技术如何助力肠道菌群的多样性分析、功能研究以及疾病关联探索等, 分析该技术应用过程中的优势与局限性, 旨在为深入了解肠道菌群与人体健康的关系以及相关研究和临床应用提供全面的参考。

关键词: 高通量测序技术; 人类肠道菌群; 检测应用

0 引言

人类肠道内栖息着数量庞大、种类繁多的微生物群落, 这些肠道菌群与人体健康息息相关, 它们参与了人体的诸多生理过程, 如食物消化、营养物质吸收、免疫系统调节、抵御外来病原体入侵等。近年来, 随着对肠道菌群研究的不断深入, 准确、全面地检测和分析肠道菌群的组成及功能变得愈发重要。高通量测序技术的出现为肠道菌群的研究带来了革命性的突破, 该技术能够以高通量、低成本、高灵敏度的方式对肠道菌群进行深度测序, 从而揭示肠道微生物群落的复杂结构和功能特征。本文通过探讨高通量测序技术在人类肠道菌群检测中的应用, 以期探究肠道菌群与人体健康及疾病的关系提供强有力的技术支撑。

1 高通量测序技术概述

1.1 基本原理

高通量测序技术又称为新一代测序技术, 它是基于传统的 DNA 测序原理发展而来的。其核心是通过大量 DNA 分子同时进行平行测序, 然后利用计算机技术对测序数据进行快速分析和处理, 从而获得海量的 DNA 序列信息^[1-3]。在测序过程中, 首先要从样本中提取 DNA, 然后将其进行片段化处理, 并在片段两端连接上特定的接头序列, 构建测序文库。之后, 这些带有接头的 DNA 片段会被固定在特定的测序平台上, 按照相应的测序化学反应机制, 逐个碱基地进行测序反应, 同时记录下每个碱基的信号信息, 最终通过生物信息学算法将这些信号转化为 DNA 序列数据。

1.2 主要类型

罗氏 454 测序技术: 它采用焦磷酸测序法进行测序, 原理是在 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶的协同作用下, 当有碱基与模板链互补配对并掺入到正在合成的 DNA 链中时, 会释放出焦磷酸, 焦磷酸经过一系列化学反应转化为可见光信号, 通过检测光信号的强度来确定掺入的碱基种类, 从而实现测序。该技术的优势在于测序读长较长, 能够一次性获得较长的 DNA 序列信息, 对于基因组结构复杂、重复序列较多的区域有较好的测序效果, 但通量相对较低, 测序成本较高, 目前已逐渐被其他更先进的技术所替代^[4-7]。

Illumina 测序技术: Illumina 测序技术是目前应用最为广泛的高通量测序技术之一, 它基于边合成边测序的原理。在测序过程中, DNA 模板被固定在流动池表面, 通过引物与模板链结合, 然后在 DNA 聚合酶的作用下, 逐个加入带有荧光标记的可逆终止子核苷酸, 每次加入一种核苷酸后, 通过激光激发荧光信号来识别掺入的碱基, 然后去除荧光标记并进行下一轮的碱基掺入, 如此循环往复, 实现对 DNA 片段的测序。Illumina 技术通量极高、测序成本低、准确性高, 但其测序读长相对较短, 对于一些长片段的基因组组装等应用可能存在一定局限。

PacBio 测序技术: PacBio 测序技术采用单分子实时测序 (SMRT) 原理, 它能够对单个 DNA 分子进行实时测序。在特制的纳米孔中, DNA 聚合酶与模板 DNA 结合, 当有碱基掺入到正在合成的 DNA 链中时, 会产生不同的荧光信号, 通过检测这些实时的荧光信号来确定碱基序列。该技术的最大特点是测序读长非常长, 可达到数千甚至上万个碱基, 能够很好地解决基因组中的复杂结构和重复序列问题, 同时对甲基化等 DNA

* 通信作者: 张桓毓, 研究方向为生物科学。E-mail: 1174416939@qq.com

修饰信息也能同步检测，但通量相对 Illumina 技术略低，测序成本相对较高^[8-10]。

2 肠道菌群对人体健康的重要作用

参与营养物质代谢：肠道菌群能够帮助人体分解和消化一些难以被自身消化酶消化的食物成分，例如膳食纤维等。它们通过发酵作用将膳食纤维转化为短链脂肪酸，如乙酸、丙酸和丁酸等，这些短链脂肪酸不仅可以为肠道上皮细胞提供能量，还能调节肠道的酸碱环境，促进肠道蠕动，维持肠道正常的生理功能。此外，肠道菌群还参与了维生素(如维生素 K、部分 B 族维生素等)的合成以及一些矿物质(如钙、铁等)的吸收过程，对人体的营养均衡起着重要作用^[11]。

免疫调节作用：肠道菌群与人体免疫系统之间存在着密切的相互作用，它们可以刺激肠道免疫系统的发育和成熟，帮助维持免疫系统的平衡。肠道菌群能够诱导肠道黏膜产生免疫球蛋白 A(IgA)，增强肠道黏膜的屏障功能，防止病原体的入侵。同时，它们还可以调节免疫细胞(如 T 细胞、B 细胞等)的分化和活性，使其对外来病原体产生适当的免疫应答，避免过度的免疫反应导致自身免疫性疾病的发生。

疾病防御功能：正常的肠道菌群在肠道内形成了一道天然的生物屏障，通过竞争营养物质、占位效应以及分泌抗菌物质等方式，抑制外来病原菌的生长和定植，从而降低人体感染疾病的风险。例如，一些肠道有益菌能够产生细菌素等抗菌物质，直接杀死有害菌，维持肠道微生态的稳定。

3 高通量测序技术在肠道菌群检测中的应用

3.1 肠道菌群多样性分析

物种丰富度评估：高通量测序技术可以通过对肠道菌群的 16SrRNA 基因进行测序来准确评估肠道微生物的物种丰富度。16SrRNA 基因在细菌中普遍存在且具有高度的保守性和特异性，不同细菌物种的 16SrRNA 基因序列存在一定差异。在一项针对不同饮食习惯人群的肠道菌群研究中，利用高通量测序技术发现，长期摄入高纤维食物的人群肠道内拟杆菌门的细菌相对丰富，而高脂肪饮食人群肠道内厚壁菌门的细菌比例往往较高，这反映了饮食对肠道菌群物种组成的影响^[12]。

菌群结构分析：高通量测序技术能深入分析肠道菌群的结构，包括不同细菌门类、属种之间的相对比例关系以及它们在肠道内的分布情况等。通过对测序数据进行聚类分析、主成分分析等生物信息学方法处理，可以直观地展现肠道菌群的整体结构特征，并比较不同个体、不同群体之间肠道菌群结构的差异。例如，在某些肠道疾病患者的肠道菌群研究中，发现其肠道菌群结构相较于健康人群发生了明显改变，有益菌数量减少，有害菌数量增多，且菌群的多样性也显著降低。

3.2 肠道菌群功能研究

代谢途径分析：利用高通量测序技术结合宏基因组学方法，可以对肠道菌群的整个基因组进行测序分析，从而了解肠道菌群所具备的代谢功能以及参与的代谢途径。通过对测序获得的基因序列进行功能注释和代谢通路分析，能够揭示肠道菌群在营养物质代谢、药物代谢以及生物活性物质合成等方面的具体作用。例如，研究发现肠道菌群中的某些细菌能够通过特定的代谢途径将食物中的前体物质转化为具有生理活性的物质，如将大豆异黄酮转化为具有更强雌激素活性的代谢产物，对人体健康产生影响^[13]。

基因表达分析：除了宏基因组学研究，高通量测序技术还可应用于肠道菌群的转录组学研究，即通过对肠道菌群的 RNA 进行测序，分析不同环境条件下肠道菌群基因的表达情况，从而了解肠道菌群的功能动态变化。例如，在给予益生菌干预后，通过对肠道菌群转录组的测序分析，可以观察到与益生菌益生功能相关的基因表达上调，如参与短链脂肪酸合成、免疫调节等功能的基因表达变化，进一步揭示益生菌对肠道菌群功能的影响机制。

3.3 肠道菌群与疾病的关联研究

疾病诊断标志物探索：高通量测序技术为寻找肠道菌群相关的疾病诊断标志物提供了有力手段。通过对比健康人群和疾病患者肠道菌群的组成、结构及功能差异，筛选出在疾病状态下发生显著变化的特定细菌种类、基因或代谢产物等，将其作为潜在的疾病诊断标志物。例如，在结直肠癌的研究中，发现一些特定的肠道细菌在结直肠癌患者的肠道中丰度明显升高，有望成为结直肠癌早期诊断的生物标志物，辅助临床诊断，提高诊断的准确性和及时性。

疾病发生发展机制研究：深入探究肠道菌群与疾病的关联，有助于揭示疾病的发生发展机制。许多研究表明，肠道菌群失衡可能通过多种途径参与疾病的发生，如肠道菌群失调引发的肠道屏障功能破坏、慢性炎症反应以及代谢紊乱等，进而影响到全身多个系统的功能，与肥胖、糖尿病、心血管疾病、神经系统疾病等多种慢性疾病的发生发展密切相关。高通量测序技术可以帮助我们全面了解肠道菌群在这些过程中的变化情况，为进一步阐明疾病机制提供依据。例如，在肥胖相关研究中，发现肥胖人群肠道内的菌群结构与正常体重人群存在差异，且肠道菌群通过影响能量代谢、肠道激素分泌等途径在肥胖的发生发展中起到了重要作用^[14]。

4 高通量测序技术在肠道菌群检测中的优势与局限性

4.1 高通量测序技术在肠道菌群检测中的优势

高通量和高灵敏度：高通量测序技术够一次性对大量的 DNA 样本进行测序，获取海量的测序数据，从而检测到肠道菌

群中含量极低的微生物种类，即使是那些在肠道内占比很少的稀有菌群也能被准确鉴定出来。此种测序的能力大大提高了肠道菌群检测的全面性和准确性，并且提供了更为详细的肠道菌群图谱。

无需培养微生物：传统的肠道菌群检测方法大多需要先对微生物进行培养，然而肠道菌群中有很多微生物难以培养，这会极大限制传统方法的检测范围，导致检测结果的不完整性。高通量测序技术则无需培养微生物，直接从样本中提取DNA进行测序分析，能够涵盖肠道内几乎所有的微生物群落，真实反映肠道菌群的实际情况。

多学科结合应用广泛：高通量测序技术与生物信息学、宏基因组学、转录组学等多学科技术相结合，不仅能够分析肠道菌群的组成结构，还能深入探究其功能、基因表达以及与疾病的复杂关系等，为肠道菌群的全方位研究提供了丰富的手段和方法。

4.2 高通量测序技术在肠道菌群检测中的局限性

(1) 测序数据解读复杂：由于高通量测序技术产生的数据量极其庞大，涉及复杂的生物信息学分析流程，如序列比对、聚类分析、功能注释等，对数据分析人员的专业素质要求较高，且分析结果的准确性和可靠性也容易受到算法、数据库等因素的影响，需要谨慎解读和验证^[15]。

(2) 存在一定误差和偏差：在样本采集、DNA提取、文库构建以及测序过程中，都可能引入误差和偏差，例如样本采集过程中如果不能保证样本的一致性和代表性，或者DNA提取效率不一致等，都会影响最终的测序结果，导致对肠道菌群的评估出现偏差。

(3) 成本相对较高：尽管随着技术的不断发展，高通量测序的成本已经有所降低，但相较于一些传统的肠道菌群检测方法，仍然需要投入较多的资金，这在一定程度上限制了高通量测序技术大规模的应用，尤其是在一些基层医疗机构或小规模研究项目中的推广。

5 结束语

高通量测序技术凭借其独特的优势，在人类肠道菌群检测领域发挥了重要作用，为肠道菌群多样性分析、功能研究以及与疾病关联的探索等方面提供了强大的技术支持，使人们对肠道菌群与人类健康的关系有了更深入的认识。尽管目前高通量测序技术还存在一些局限性，但随着技术的不断发展和完善，其在未来的应用前景十分广阔，有望为人类健康事业带来更多的福祉。

参考文献

[1] 萨仁高娃,陈莹,刁楠,等.二代高通量测序技术在发酵蔬菜

微生物菌群研究中的应用[J].食品安全质量检测学报,2025,16(01):207-215.

[2] 张玉超,朱思洁,刘良禹,等.基于16SrRNA技术与代谢组学探究枳椇果梗多糖对酒精暴露小鼠肠损伤的改善作用[J].食品科学,2025,46(03):110-118.

[3] 吴慧丹,黄峥,阳丽君,等.基于高通量测序的营养不良儿童肠道菌群多样性研究[J].中国现代药物应用,2024,18(01):175-180.

[4] 李杨,赵梦珺,卢红巧,等.基于16SrDNA高通量测序技术的重度低龄儿童龋患者口腔微生物及肠道菌群群落分析[J].上海口腔医学,2024,33(02):164-169.

[5] 葛哲,付仕忠.靶向高通量测序技术在肺炎病原学诊断中的应用进展[J].现代临床医学,2024,50(05):375-377,392.

[6] 翟刚.16S-rRNA测序技术分析早产儿肠道细菌基因组指导新生儿坏死性小肠结肠炎手术时机选择的研究[J].中国医药科学,2024,14(11):130-133.

[7] 庞李艳,王红兵,王晓虎,等.野鸟携带病原体情况及高通量测序技术研究进展[J].广东畜牧兽医科技,2024,49(06):90-98.

[8] 王华文,张颖,陈民.基于16SrRNA技术探讨健脾祛痰法调节血脂异常患者肠道菌群变化特征[J].辽宁中医药大学学报,2024,26(05):183-192.

[9] 白茹,袁青青,张晓乐,等.健康与致病菌感染双峰驼肠道细菌和真菌群落的比较分析[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2024,43(04):36-43.

[10] 张永玉,龚娅,刘荣碧,等.基于16SrRNA高通量测序技术初步探讨双歧杆菌乳杆菌三联活菌片对系统性红斑狼疮模型小鼠MRL/lpr肠道菌群的影响[J].风湿病与关节炎,2024,13(01):1-7.

[11] 张江浩,万里新,尚付梅,等.高通量测序技术分析化疗对食管癌患者肠道菌群的影响及其与化疗效果的关系[J].中国医药,2023,18(04):536-541.

[12] 凌宝殿,谢志军,张文娟,等.基于高通量测序技术研究原发性胃癌患者胃肠道菌群特征[J].赣南医学院学报,2023,43(03):228-234.

[13] 代秋颖,周悦,程一凡,等.基于高通量测序技术研究非哺乳期乳腺炎患者肠道菌群结构特征[J].复旦学报(医学版),2023,50(03):379-389.

[14] 袁梦华,扈新刚,赵燕.基于16sRNA测序技术探讨不同体质腹型肥胖者肠道菌群特征[J].山东中医杂志,2024,43(07):694-699.

[15] 董文迪,金霞霞,莫珊,等.基于高通量测序对中国南北方地区学龄前健康儿童肠道菌群的横断面调查[J].中国循证儿科杂志,2023,18(06):452-455.