

微生物组

白皮书

纳米孔测序在微生物组研究中的优势

nanoporetech.com/publications

内容

1

微生物组研究面临的挑战

2

从微生物组到宏转录组以及其他领域

3

试剂盒与分析工作流程

4

个案研究

5

总结

6

关于Oxford Nanopore Technologies公司

7

参考文献

引言

微生物组学的研究——即给定样本中所有微生物的遗传物质的研究最近引起了相当大的关注,而这主要是因为人们认识到我们身体和环境的微生物的组成会对我们的健康产生深层影响。

现代测序技术的出现为微生物分析领域带来了显著优势。

例如,人类微生物组的组成与肥胖¹、免疫²和精神疾病³有关。值得注意的是,聚焦于分析极端环境⁴、水体⁵、土壤⁶、建筑⁷等中的微生物组的研究也在急速增长。

传统的微生物组研究依赖于培养,这需要很长的从样本得到结果的时间,且因微生物对于实验处理的不同敏感度而易产生偏差⁸。现代测序技术的出现为微生物分析领域带来了极大优势。微生物分析的速度和准确度(即物种鉴定和丰度)已大幅提高,培养不再必需。但尽管如此,传统测序方法依然面临一些挑战。

本文将探讨微生物组研究面临的挑战,并提供实际案例来说明如何通过使用纳米孔测序技术克服这些挑战。



1

微生物组研究面临的挑战

准确的微生物鉴定

用于鉴定生物样本中的微生物有两种常用方法。其中，宏基因组测序法是对样本中任何微生物的全基因组进行测序，这种无偏差的方法无需进行培养，故而能鉴定目前无法培养的生物。而传统的短读长测序技术很难可靠地解析重复区域⁹，以致在近缘物种的分类学分类和基因组组装中挑战重重。加之其他如得出检测结果所需的时间和成本效益等考量，16S rRNA基因测序应运而生。

纳米孔技术允许引物的设计覆盖16S基因全长甚至整个核糖体操纵子。

16S rRNA基因测序广为应用的原因，是因其结合了保守和高度可变区，能进行准确的物种区分。然而，通常用于这类实验的16S引物并不覆盖整个16S基因区域，由于有些带有分类信息的区域落在被分析的扩增子之外，这可能降低物种鉴定的分辨率¹⁰。

纳米孔长读长更适合组装重复的基

因组区域，提高宏基因组物种鉴定的精度^{4,11}。此外，在基于16S的研究中，纳米孔技术允许引物的设计覆盖整个16S基因¹⁰甚至整个核糖体操纵子¹²，这通常使得纳米孔测序在准确分辨更多物种的表现优于传统测序平台¹⁰。

在采集点分析

为了最准确地了解微生物群组的组成，最好能对样本进行快速分析——最理想就是在采集点分析。但由于传统测序仪器体积庞大以及基础设施要求高，研究人员经常是在采集样本后，将之储存很长一段时间（冒着材料丢失或样本组成改变的风险¹³），然后运送至中央实验室。

Oxford Nanopore的MiniION™重量不到100克，可轻易放进飞机行李箱运输¹¹，通过笔记本电脑上的USB端口或IT配件MiniIT™为DNA或RNA测序供电，适合移动式的研究环境。因此，样本在分析之前无需冷冻并储存数周甚至数天。例如，据报道，使用MiniION在北极环境中从样本采集到测序数据生成仅需不到40小时¹¹。Oxford Nanopore也正在开发Flongle™——一款测序芯片适配器，其设计旨在为较小规模、较频繁进行的测试和实验提供更加符合成本效益的分析。

除此之外, 使用Oxford Nanopore的VoITRAX™系统, 只需要最低限度的实验室设备即可进行便携式的文库制备。结合使用这些设备可以灵活的当场采集并分析样本, 这不仅可以减少从样本采集到获得检测结果所需的时间, 更可以通过生成数据推算样本采集量, 避免取样不足或过多, 进一步精简项目工作流程。

精简的工作流程搭配实时分析, 使得宏基因组物种鉴定仅需20分钟即可完成——即从拿到样本到出检测结果的时间¹⁵。

样本到检测结果用时减少

当监测微生物组中的变化和处理大量样本时, 能够快速且简易处理样本有很多

优势。比如, 在临床研究和疾病监测的应用中, 准确快速进行样本分析的潜力可在未来有望导向更快地实行恰当的治疗干预或病原体遏制策略¹⁴。

纳米孔测序使样本分析在实验室或现场皆可行, 配上Oxford Nanopore最新基于转座酶的文库制备试剂盒, 仅需10分钟的动手操作时间(基因组DNA提取之后)。

结合实时数据分析, 这些精简的工作流程使得如物种鉴定等应用仅需20分钟就能完成——即从拿到样本到出检测结果的时间¹⁵。实时测序设备还允许一旦生成足够数据或鉴定出某一特定物种, 即可停止测序, 这进一步突显了纳米孔测序对于交付快速、具执行潜力信息的优势。

图1
MinION: 口袋大小的便携式设备。



MinION

图2
VoITRAX: 设计旨在自动进行文库制备。



VoITRAX

图3
Flongle: 一款测序芯片适配器, 能在较小、一次性的测序芯片上进行直接、实时的DNA或RNA测序。



Flongle

2

从微生物组到宏转录组以及其他领域

高通量测序技术的出现不仅让研究人员能鉴定物种、从微生物组样本构建基因组，还可以研究基因表达。

这样的宏转录组研究能让人们更详细地了解复杂微生物群落之间的相互作用和它们对特定环境的反应。

纳米孔测序技术对微生物群落的表征比以往的平台更完整。

在此基础上，DNA和RNA修饰（例如：甲基化）在微生物群落中的角色也越来越受到关注¹⁶；然而，由于需要亚硫酸盐处理或抗体沉降（pull-down）样本预处理，这样的修饰不易用传统技术进行检测。

纳米孔平台能够对宏基因组或靶向富集样本中的基因组DNA和cDNA进行测序¹⁷，生成的长读长适用于准确的分类学归类和转录组学研究。

此技术还能进行直接RNA测序，而不会引入逆转录或PCR扩增相关的偏差¹⁸。此外，直接DNA和RNA测序设备能够检测化学修饰（例如：甲基化），而不需要亚硫酸盐处理或基于抗体的试验^{19,20}。

因此，纳米孔测序技术对微生物群落的表征比以往的平台更完整，大幅减少这类研究相关的时间和成本。

3

试剂盒与分析工作流程

Oxford Nanopore为微生物组研究中使用的宏基因组和基于16S的测序方法提供易于遵循的工作流程。

16S 分析

Oxford Nanopore推出了一款带有条码标签的16S文库制备试剂盒, 用于从多个样本进行具有成本效益的物种鉴定(图4)。在基因组提取后, 整个工作流程仅需40分钟, 实际动手操作时间不到20分钟²¹。此外, 还提供了一个用于分析16S数据的生物信息学流程, 交付随着测序而被实时更新的报告。此报告是基于将碱基识别过的序列与NCBI 16S细菌数据库(通过BLAST) 进行比对的结果。

宏基因组分析

Oxford Nanopore提供一系列的DNA文库制备试剂盒, 包含低起始量和条码标签选项, 以满足所有实验需求。文库制备最少仅需10分钟。数据分析使用WIMP生物信息学工作流程实现, 可以在测序进行的同时实时鉴定宏基因组样本中的细菌、真菌、古细菌和病毒(图5)。WIMP使用Centrifuge软件工具²², 当使用含有多个高度相似的参考基因组时(例如, 一个细菌物种的不同株系), 该工具能准确鉴定读长。WIMP工作流程也能量化样本中的微生物。

图4
使用带实时分析的16S测序快速鉴定微生物。

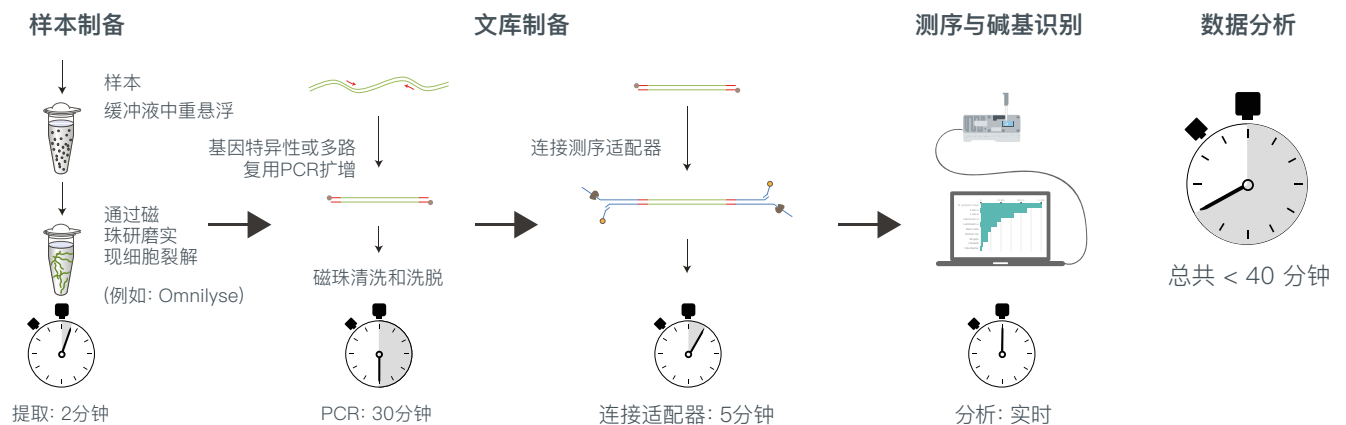
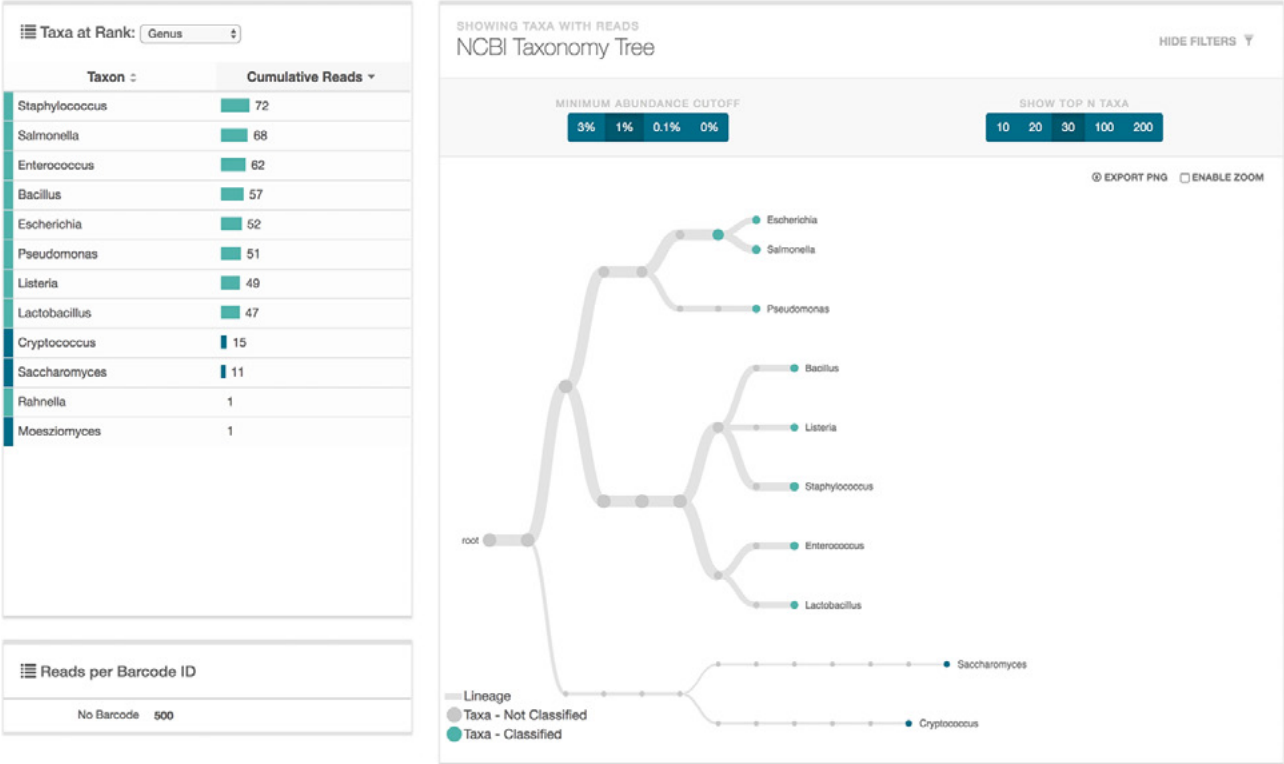


图5
WIMP报告示例。



RNA分析

纳米孔测序文库制备试剂盒可用于直接和间接 (cDNA) RNA分析。仅50 ng的起始RNA就能实现全长cDNA分析, 而文库制备时间不到1.5小时。

直接RNA测序能从全长RNA转录物同步分析表观遗传修饰和核苷酸序列。研究人员已经开发了数个分析流程, 可进行读长比对、异构体鉴定和定量分析。

4

个案研究



个案研究1

与婴儿相关的肠道微生物群 (BAMBI) ——临床案例

坏死性小肠结肠炎 (Necrotising enterocolitis (NEC)) 是对早产和体重不足的婴儿影响最严重的肠胃疾病之一²³，微生物菌群失调 (失衡) 已被认定为该疾病最可能的潜在原因²⁴。先前的研究显示，患有NEC的早产儿有更多的潜在致病菌，而有益的两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 则较少²⁴。

英国诺里奇厄勒姆研究所 (Earlham Institute) 的Matthew Clark博士和Richard Leggett博士的团队正在使用宏基因组纳米孔测序来分析早产儿的肠胃微生物群，不仅鉴定其中的物种，还将其量化并分析其抗微生物药物耐药性 (AMR)²⁵。他们的研究是与英国诺里奇卡德拉姆生物科学研究所 (Quadram Institute of Biosciences) Lindsay Hall博士一起进行的益生菌治疗临床试验的一部分。

纳米孔测序能在测序的1小时内进行病原体鉴定和AMR分析。

通过一个时程实验 (time-course experiment)，该团队得以观察益生菌和抗生素治疗对微生物组成的影响²⁵。施用益生菌后，婴儿肠道中的两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*，鉴定至种属层级) 增加，长读长纳米孔测序和短读长平台都得出类似的分析。

有趣的是，研究人员还注意到纳米孔宏基因组测序方法与使用短读长测序平台的16S rRNA分析相比，能得出更细化的分类，而后者无法区分肠杆菌属 (*Enterobacteriaceae*) 中的物种²⁵。

该团队利用对一位重症婴儿粪便样本进行的实时分析，成功在测序一小时内识别出了病原体肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的存在，并进行了相应的AMR分析²⁵。

研究人员发现纳米孔测序数据的质量与短读长测序技术相当，但关键的是，前者需要的时间很短，只需要5小时，而短读长技术则需要39小时。

最后，这些研究人员强调了纳米孔技术未来可如何应用于临床应用：“我们的结果显示，MinION测序仪能在短短数小时内从临床样本进阶成为潜在的定制化的患者抗微生物治疗方案”²⁵。

个案研究2

长读长在16S微生物组研究中的优势

鼠肠道微生物组

基于16S的种属鉴定是微生物组研究中最常用的方法²⁶。Shin 等¹⁰使用16S法, 并应用短读长测序技术或长读长纳米孔测序技术来研究鼠肠道微生物群的组成。

种属鉴定时常用的V3-V4 16S区的方法, 其敏感度不如通过纳米孔测序实现的全长16S基因的方法敏感度高。

这两种方法之间的一个关键区别在于, 短读长实验中, V3-V4 16S高变区被用来进行引物设计和扩增子生成 (平均读长—447bp), 而纳米孔测序使用了全长16S基因 (平均读长—1393bp)。

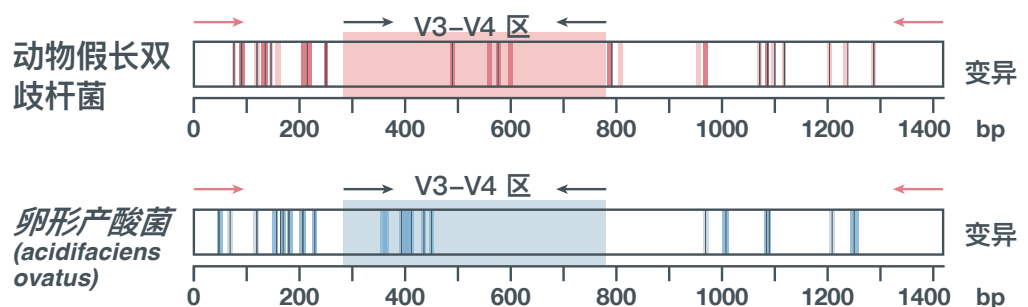
两个平台得出的测序数据在除种属层级外的所有分类层级都表现出了高度一致性 ($R^2=0.8-0.9$)。研究显示, 纳米孔数据能鉴定出更多种属 (即动物双歧杆菌和假长双歧杆菌, 肠道微生物组²⁷中众所周知的成员), 从而实现更加完整的微生物群代表架构。

该研究表明, 种属鉴定时常用的V3-V4 16S区的方法, 其敏感度不如通过纳米孔测序实现的全长16S基因的方法敏感度高¹⁰。

由此得出结论, 相比于短读长技术, 纳米孔测序的长读长优势有助于更精确地分析鼠肠道微生物组。

图6

16S rRNA基因序列中的变异性。16S rRNA基因序列间检测到的变异在16S rDNA序列上表现为竖线。黑色及红色箭头分别代表V3-V4区扩增引物组的结合位置以及16S rDNA序列 (纳米孔测序) 的近全长区。图像改编自Shin等¹⁰。



个案研究3

使用核糖体操纵子进行种属鉴定

罗格斯大学的Lee Kerkhof教授通过纳米孔测序进行细菌微生物组分析,使用的是完整的rRNA操纵子序列,而非仅用16S^{12,18}。正向引物在16S rRNA基因序列内生成,而反向引物在23S rRNA基因内生成,形成了一个4.2kb的片段(图7)。

该团队测序了6个环境样本,每个样本都由农田土壤DNA和生物反应器DNA组成,混合比例各异。12个小时的测序生成了1000多个操作分类单元(OTU)*,各重复之间的一致性较好。该团队成功构建了共有操纵子,每个rRNA操纵子均含有一条16S和23S基因。

该研究结论认为,操纵子的纳米孔测序,相比于使用短读长的标准16S测序,有更高的分类分辨率。该团队还报告说,其使用的方法实现了OTU的精确定量。

综上,Kerkhof教授评论道:“我们的分析表明,MinION有能力提供足够优质的rRNA操纵子序列数据,来表征复杂环境样本中的生物群,并提供可再现、量化且一致的结果”²⁸。该团队现正在拓展其研究以阐明外部因素(如暴露于毒素中)对鼠微生物组组成的影响¹²。

图7
核糖体操纵子测序(4.2kb)扩增子结构,包含近全长的16S和23S序列。图像改编自Kerkhof¹²。



* 微生物根据超过预定阈值的DNA序列的相似性,被聚类至单个操作分类单元。

个案研究4

冰上微生物群便携式鸟枪法宏基因组测序

冰川饱含丰富的微生物群, 它们在维持冰川特性和决定融化速度方面扮演着重要角色¹³。因此, 研究冰川微生物组对理解全球变暖的影响十分重要。阿伯里斯特威斯大学 (英国) 的Arwyn Edwards博士率先在位于斯瓦巴特群岛 (地处挪威和北极之间) 建立了便携式实验室, 使用 Oxford Nanopore公司的MinION研究冰川微生物组¹³。

Edwards博士的团队着手使用宏基因组法就地研究冰尘 (由岩石颗粒和微生物组成的风力堆积物) 和赤雪藻华¹³ (图8)。该研究所需的全部仪器被装在两个标准尺寸的飞机行李箱中运到了现场。

该团队在采集样本后36小时之内便获得了原始测序数据。WIMP生物信息学工作流程用于解析被测序的宏基因样本中的微生物组成, 结果显示, 变形菌门为主导群落, 与之前使用短读长技术进行研究的预测一致。其余鉴定出的微生物大部分也都与先前的预期相符。

近期, 该团队评估了16S纳米孔测序的效用, 以了解不同生态条件对当地微生物群落的影响, 初步结果显示, 微生物组的组成发生了显著变化²⁹。

Edwards博士的研究结果证明了纳米孔测序技术在偏远、极端和资源有限环境中进行精确微生物组分析的效用。

图8

在斯瓦巴特群岛来自冰尘 (a) 和赤雪藻华 (b) 的样本采集。
图片由英国阿伯里斯特威斯大学的Arwyn Edwards博士提供



(a)



(b)

个案研究5

粉红微生物组

西澳大利亚的希利尔湖是被eXtreme微生物组项目 (XMP-extrememicrobiome.org) 选作进行微生物组研究的几个地点之一。该湖水的含盐量是海水含盐量的十倍, 并呈现出亮粉红色⁴ (图9)。

这一不寻常的颜色被认为是源自一种红色藻类 (杜氏盐藻), 但没有人对此进行过正式研究。直到近期, 来自澳大利亚基因组研究所 (Australian Genome Research Facility) 的Ken McGrath博士的团队采集了顶层和下层湖水以及沉积物样本, 用于进行宏基因组分析。

传统的基于培养的分析可以解析13种不同微生物, 培养法偏向于细菌种属⁴。使用短读长测序技术进行的基于16S的微生物分析建立了更完整的分类代表性, 但种属层级的鉴定还存在问题。

相比之下, 使用纳米孔技术的全鸟枪DNA测序法实现了种属层级的分类学分类, 仅在测序开始2小时后, 便开始出现更为完整的分析图谱。测序开始24小时后便可获得最终结果, 并成功鉴定了藻类、古细菌、细菌和病毒。

XMP项目发现, *Salinibacter ruber* 这种红色细菌在湖泊宏基因组学图谱中占据主导地位, 而杜氏盐藻含量相对较低, 该项目得出的结论是, 湖水的粉红色是由该细菌引起的, 而不是之前认为的藻类。

在希利尔湖微生物组研究以及XMP其余的工作中, 均是在极端缺少研究的环境下, 将纳米孔测序置于微生物组研究的最前线。

图9
希利尔湖。图片由澳大利亚基因组研究所Ken McGrath博士提供。



个案研究6

16S rRNA直接测序

迄今为止,大部分微生物组学研究的重点是通过DNA分析阐明微生物组成和基因组结构。然而,测序技术和工作流程的进步使得研究人员可以对RNA进行探究,深入了解复杂细菌群落中的基因表达³⁰。表观遗传修饰的分析进一步细化了微生物群落及其环境响应的表征。但是,这种修饰在使用传统测序技术时会被抹掉³¹。

在—项原理验证研究中, 加州大学圣克鲁兹分校的Andrew Smith博士及其同事使用纳米孔测序直接分析大肠杆菌全长 (1.5kb) 16S核糖体RNA (rRNA), 以通过单次测序运行表征核苷酸和表观遗传构成³¹。16S rRNA 是小核糖体有亚基的核心组成部分。核糖体亚基在所有活细胞中均有表达并在RNA翻译过程中扮演重要角色。许多抗生素都是以原核核糖体为靶点。这些核糖体通过核苷酸替换或碱基修

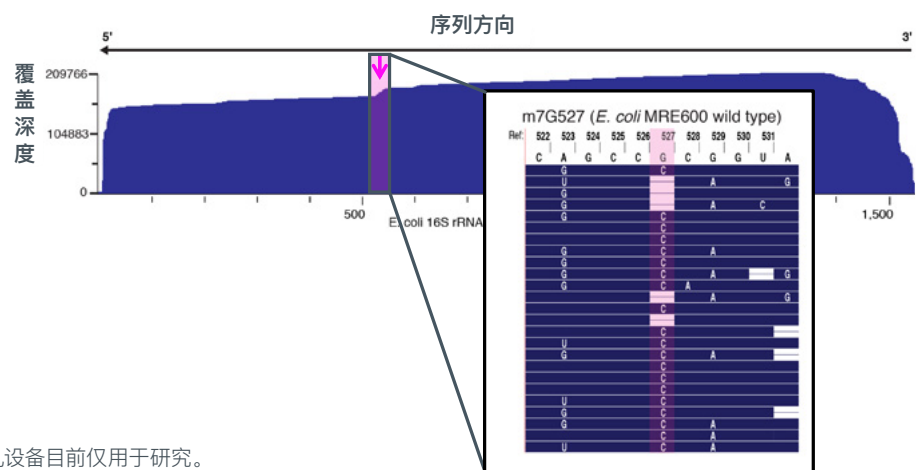
饰的增加或减少, 获得耐药性, 使得该分析日益重要³¹。

该团队开发出了一种富集策略,使得人们可以在4.5 μg总人类RNA背景中研究仅5pg的大肠杆菌16S rRNA。此外,该团队报告说,该分析有可能在潜在临床可行的时间框架内进行,从采样到出结果只需两小时。事实上,纳米孔技术提供的实时分析可以在测序开始后的20秒内生成16S rRNA序列。

通过研究数据, 研究人员能够在16S rRNA (图10) 的已知位点鉴定出7-甲基鸟苷 (m7G), 并观察到其他表观遗传修饰的存在, 包括假尿嘧啶核苷。

综上, 研究团队称: “这个【纳米孔】直接RNA测序技术有望快速鉴定环境和患者样本中的微生物”³¹。*

图10
纳米孔测序准确检测到了大肠杆菌16S rRNA 527位点上的m7G表观遗传修饰。图片由美国加州大学圣克鲁兹分校的Andrew Smith博士提供。



* 纳米孔设备目前仅用于研究。

5

总结

测序的出现为微生物组研究领域带来了重大改进。宏基因组学和基于16S的实验, 相比之前基于培养的方法实现了更快更准确的微生物群分析^{4,8}。但是, 在充分分析微生物组的组成方面仍然存在一些挑战。

纳米孔测序为微生物组研究提供了便携和可扩展的选项。

纳米孔测序现正被用来解决这些挑战, 为微生物组研究提供便携和可扩展的选项, 工作流程快速、精简, 并结合自动化的文库制备和实时数据分析。

此外, 直接DNA和RNA测序设备可以在得出测序数据的同时检测表观遗传修饰, 加深了我们对微生物组和微生物及其宿主环境间复杂相互作用的理解。重要的是, 长纳米孔读长能解析完整的16SrRNA基因组区域¹⁰, 甚至能解析全部的核糖体操纵子¹², 实现更为详细的种属层级的分类¹⁰。

长读长还能更准确地表示宏基因组样本中的物种多样性^{4,11}。

6

关于 Oxford Nanopore Technologies公司

Oxford Nanopore Technologies 公司通过推出MinION设备——第一款便携式实时长读长纳米孔测序仪，拓展了微生物组研究人员的能力。这些技术规格使得该技术可适用于微生物组的实地分析，搭配精简的工作流程和实时分析，能快速得出检测结果。纳米孔技术完全可扩展，GridION™ X5 和PromethION™设备可以在高通量应用中提供灵活的测序能力。

如需有关纳米孔测序的最新资讯、产品、应用信息及进展，请访问：
www.nanoporetech.com



参考文献

1. Turnbaugh, P.J. 等. 与肥胖相关的高能量采集力肠道微生物组. *自然杂志* 444, 1027–1131 (2006).
2. Kumar, P. 等. 肠道白介素-17受体信号介导肠道微生物组及自身免疫感染的相互控制. *Immunity* 44, 659–671 (2016).
3. Deans, E. 现代环境下的微生物组及精神卫生. *生理人类学期刊* 36, 1 (2017).
4. McGrath, K. eXtreme微生物组项目 (XMP) 为您呈现: 粉红湖的秘密. 讲座 (2016). 可在以下网址查看: <<https://vimeo.com/168673450>> [访问日期: 2018年1月24日]
5. Baron, J.L., Vikram, A., Duda, S., Stout, J.E. & Bibby, K. 引入现场单氯胺消毒系统后医院热水系统中微生物生态的变化. *PLoS ONE* 9, e102679 (2014).
6. Chaparro, J.M., Sheflin, A.M., Manter, D.K. & Vivanco, J.M. 操纵土壤微生物组以改善土壤健康和植物育性. *生物及土壤育性* 48, 489–499 (2012).
7. Lax, S. & Gilbert, J.A. 医院相关微生物群及其对院内感染的影响. *分子医学趋势* 21, 427–432 (2015).
8. Hodkinson, B.P. & Grice, E.A. 下一代测序: 技术回顾及创口微生物组研究工具. *创口护理进展* 4, 50–58 (2015).
9. Ashton, P.M. 等. MinION 纳米孔测序鉴定细菌抗生素耐药性岛的位置及结构. *Nat Biotech* 33, 296–300 (2015).
10. Shin, J. 等. 使用全长16S rRNA扩增子测序分析鼠肠道微生物组. *科学报告* 6, 29681 (2016).
11. Edwards, A., Debonnaire, A.R., Sattler, B., Mur, L.A.J. & Hodson, A.J. 使用纳米孔DNA测序的极端宏基因组学: 斯瓦巴特群岛实地报告, 78 N. *bioRxiv* 073965 (2016).
12. Kerkhof, L.J. 通过核糖体操纵子MinION测序进行细菌微生物组分析. (2017). 可在以下网址查看: <<https://vimeo.com/250287102>> [访问日期: 2018年1月24日]
13. Edwards, A. 用MinION对宏基因组进行游牧纳米孔测序. 讲座 (2017). 可在以下网址查看: <<https://nanoporetech.com/videos/nomadic-nanopore-sequencing-metagenomes-minion>> [访问日期: 2018年1月24日]
14. Batovska, J. 等. 使用MinION纳米孔测序进行宏基因组虫媒病毒检测. *J Virol Methods*. 249 (2017).
15. Oxford Nanopore Technologies. 快速种属鉴定DNA提取及文库制备, 有/无PCR 【在线】可在以下网址查看: <<https://nanoporetech.com/resource-centre/posters/dna-extraction-and-library-preparation-rapid-genus-and-species-level>> [访问日期: 2018年1月24日]
16. Carbonero, F. 人类表观遗传学及微生物组: 通过综合研究带来领域革命的潜力. *Future Sci OA* 3(3) (2017).
17. Oxford Nanopore Technologies. 使用长纳米孔读长的细菌比较基因组学和转录组学 [在线] 可在以下网址查看: <<https://nanoporetech.com/resource-centre/posters/bacterial-comparative-genomics-and-transcriptomics-using-long-nanopore>> [访问日期: 2018年1月24日]

18. Jenjaroenpun, P 等. 使用第三代测序技术进行完整宏基因组和转录组分析: 酿酒酵母的案例CEN.PK113-7D Nucleic Acids Res (2018). doi: 10.1093/nar/gky014. [打印前电子文档]
19. McIntyre, A.B.R. 等. 纳米孔检测细菌DNA碱基修饰. bioRxiv 127100 (2017).
20. Garalde, D.R 等. 纳米孔阵列上高度并行的直接RNA测序. Nat Methods (2018). doi: 10.1038/nmeth.4577. [打印前电子文档]
21. Oxford Nanopore Technologies. 使用实时纳米孔测序进行16S分析 [在线] 可在以下网址查看: <<https://nanoporetech.com/analyse/16s>> [访问日期: 2018年1月24日]
22. Kim, D., Song, L., Breitwieser, F.P., & Salzberg, S.L.离心机: 宏基因组序列的快速灵敏分类. Genome Res. 26(12):1721-1729 (2016).
23. Deshpande, G., Rao, S., Patole, S. & Bulsara, M. 更新版早产儿预防新生儿坏死性小肠结肠炎的益生菌元分析. 儿科学杂志125, 921 (2010).
24. Clark, M. MinION 宏基因组学: metagenomics: 从模拟群落到临床样本. 讲座 (2016). 可在以下网址查看: <<https://vimeo.com/169892664>> [访问日期: 2018年1月24日]
25. Leggett, R.M. 等. 早产儿肠道微生物群快速MinION宏基因组分析以促进病原体诊断. bioRxiv 180406 (2017).
26. Ranjan, R. 等. 微生物组分析: 全基因组鸟枪法相比于16S扩增子测序的优势. Biochem Biophys Res Commun. 469(4) (2016).
27. Turroni, F. 等. 以两歧双歧杆菌为例的人类肠道共生菌. 微生物学前沿 5, 437 (2014).
28. Kerkhof, L.J. 等. 使用MinION测序核糖体操纵子分析细菌群落. 微生物组学 5:16 (2017).
29. Edwards, A. MinION 微生物组分析: 从在路上到去那里? 讲座 (2017) 可在以下网址查看: <https://vimeo.com/250451356> [访问日期: 2018年1月24日]
30. Bashardes, S. Zilberman-Schapira, G. & Elinav, E. 在微生物组研究中使用宏转录组学. Bioinform Biol Insights 10 (2016).
31. Smith, A.M. 等. 使用纳米孔直接RNA测序读取16S 核糖体RNA中的标准及修饰核苷酸. bioRxiv 132274 (2017).

Oxford Nanopore Technologies

电话 +44 (0)845 034 7900

电邮 info@nanoporetech.com

微信 Nanoporetech

推特 @nanopore

www.nanoporetech.com

