

微生物群落多样性的基本概念

环境中微生物的群落结构及多样性和微生物的功能及代谢机理是微生物生态学的研究热点。长期以来，由于受到技术限制，对微生物群落结构和多样性的认识还不全面，对微生物功能及代谢机理方面了解的也很少。但随着高通量测序、基因芯片等新技术的不断更新，微生物分子生态学的研究方法和研究途径也在不断变化。第二代高通量测序技术（尤其是 Roche 454 高通量测序技术）的成熟和普及，使我们能够对环境微生物进行深度测序，灵敏地探测出环境微生物群落结构随外界环境的改变而发生的极其微弱的变化，对于我们研究微生物与环境的关系、环境治理和微生物资源的利用以及人类医疗健康有着重要的理论和现实意义。

在国内，微生物多样性的研究涉及农业、土壤、林业、海洋、矿井、人体医学等诸多领域。以在医疗领域的应用为例，通过比较正常和疾病状态下或疾病不同进程中人体微生物群落的结构和功能变化，可以对正常人群与某些疾病患者体内的微生物群体多样性进行比较分析，研究获得人体微生物群落变化同疾病之间的关系；通过深度测序还可以快速地发现和检测常见病原及新发传染病病原微生物。

研究方法进展

环境微生物多样性的研究方法很多，从国内外目前采用的方法来看大致上包括以下四类：传统的微生物平板纯培养方法、微平板分析方法、磷脂脂肪酸法以及分子生物学方法等等。

近几年，随着分子生物学的发展，尤其是高通量测序技术的研发及应用，为微生物分子生态学的研究策略注入了新的力量。

目前用于研究微生物多样性的分子生物学技术主要包括：DGGE/TGGE/TTGE、T-RFLP、SSCP、FISH、印记杂交、定量 PCR、基因芯片等。DGGE 等分子指纹图谱技术，在其实验结果中往往只含有数十条条带，只能反映出样品中少数优势菌的信息；另一方面，由于分辨率的误差，部分电泳条带中可能包含不只一种 16S rDNA 序列，因此要获悉电泳图谱中具体的菌种信息，还需对每一条带构建克隆文库，并筛选克隆进行测序，此实验操作相对繁琐；此外，采用这种方法无法对样品中的微生物做到绝对定量。生物芯片是通过固定在芯片上的探针来获得微生物多样性的信息，“只能验证已知，却无法探索未知”，此方法通过信号强弱判断微生物的丰度也不是非常的准确。

而近年来以 454 焦磷酸测序为代表的高通量测序技术凭借低成本、高通量、流程自动化的优势为研究微生物群落结构提供了新的技术平台。Roche 454 高通量测序技术能同时对样品中的优势物种、稀有物种及一些未知的物种进行检测，获得样品中的微生物群落组成，并将其含量进行数字化。最近，美吉生物推出了新的测序平台——MiSeq。MiSeq 高通量测序平台集中了 Roche 454 和 Illumina HiSeq 2500 的优点，不仅可实现对多样品的多个可变区同时测序，而且在测序速度和测序通量上都有进一步提升，目前此平台已在微生物多样性群落结构研究方面受到了广大学者的认可。

第二代高通量测序技术



产品优势

无需培养分离菌群：

直接从环境样本中扩增核糖体 RNA 高变区进行测序，解决了大部分菌株不可培养的难题。

客观还原菌群结构：

专业、成熟、稳定的样本制备流程，严格控制 PCR 循环数，客观还原样品本身的菌群结构及丰度比例。

痕量菌检测：

充分发挥高通量测序的大数据量优势，能检测出丰度低至万分之一的痕量菌。

服务流程



样本要求



环境样品

土壤：5-10g；

水体：2L 水样或 0.22 μ m 滤膜过滤；

粪便：3g；

黏膜：指甲大小；

植物内生菌：10-20g 叶片；3-5g 根系；

底泥：5-10g；

血液：10mL；

叶片：50-100g。

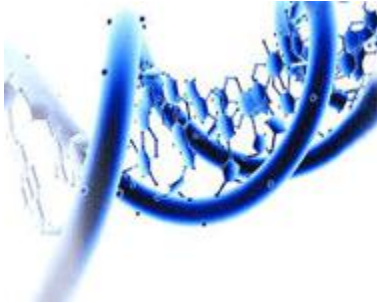


DNA

浓度 > 10ng/ μ L

总量 > 500ng 的 DNA，

OD_{260/280} 介于 1.8-2.0 之间并确保 DNA 无降解。



PCR 产物

（仅限 Roche 454 平台）

PCR 产物浓度 > 5ng/ μ L，总量 > 100ng，OD_{260/280} 介于 1.8-2.0 之间并确保 PCR 产物无降解；

PCR 产物需经电泳切胶回收纯化；

送样管管口使用 Parafilm 封口膜密封；

样品保存期间切忌反复冻融，使用干冰运输。

生信分析

1. 稀释性曲线 (Rarefaction Curve)

采用对测序序列进行随机抽样的方法，以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建曲线，即稀释性曲线。

当曲线趋于平坦时，说明测序数据量合理，更多的数据量对发现新 OTU 的边际贡献很小；反之则表明继续测序还可能产生较多新的 OTU。

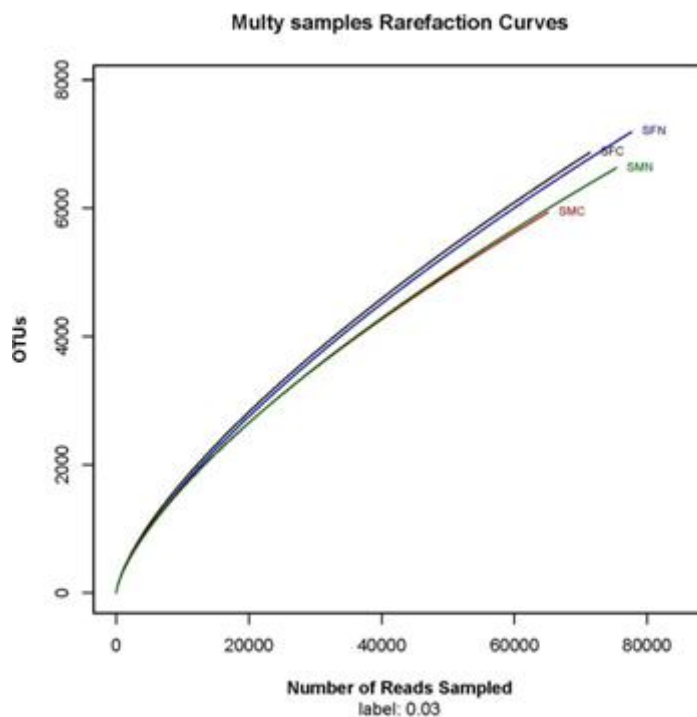


图 1

横轴: 从某个样品中随机抽取的测序条数; "Label 0.03" 表示该分析是基于 OTU 序列差异水平在 0.03, 即相似度为 97% 的水平上进行运算的, 客户可以选取其他不同的相似度水平。

纵轴: 基于该测序条数能构建的 OTU 数量。

曲线解读:

Ø 图 1 中每条曲线代表一个样品, 用不同颜色标记;

Ø 随测序深度增加, 被发现 OTU 的数量增加。当曲线趋于平缓时表示此时的测序数据量较为合理。

2. Shannon-Wiener 曲线

反映样品中微生物多样性的指数, 利用各样品的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线, 以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。

当曲线趋向平坦时, 说明测序数据量足够大, 可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息。

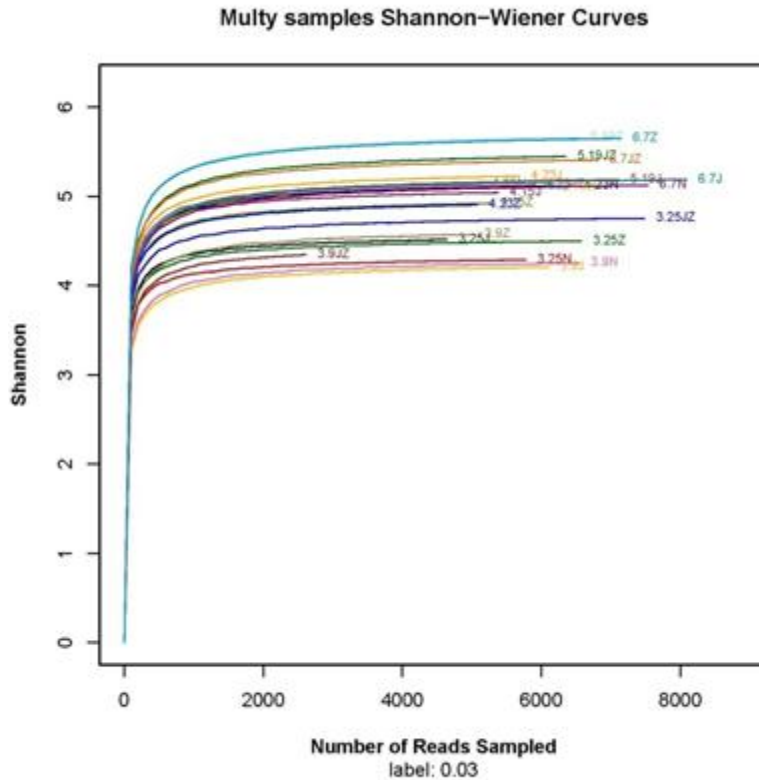


图 2

横轴：从某个样品中随机抽取的测序条数。

纵轴：Shannon-Wiener 指数，用来估算群落多样性的高低。

$$H_{\text{shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

Shannon 指数计算公式：

其中，

S_{obs} = 实际测量出的 OTU 数目；

n_i = 含有 i 条序列的 OTU 数目；

N = 所有的序列数。

曲线解读：

Ø 图 2 每条曲线代表一个样品，用不同颜色标记，末端数字为实际测序条数；

Ø 起初曲线直线上升，是由于测序条数远不足覆盖样品导致；

Ø 数值升高直至平滑说明测序条数足以覆盖样品中的大部分微生物。

3.Rank-Abundance 曲线

用于同时解释样品多样性的两个方面，即样品所含物种的丰富程度和均匀程度。

物种的丰富程度由曲线在横轴上的长度来反映，曲线越宽，表示物种的组成越丰富；

物种组成的均匀程度由曲线的形状来反映，曲线越平坦，表示物种组成的均匀程度越高。

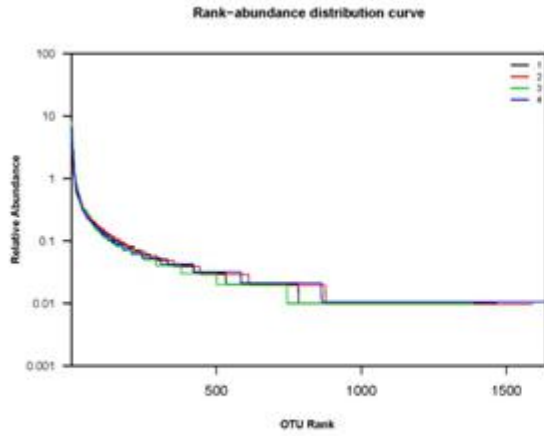


图 3

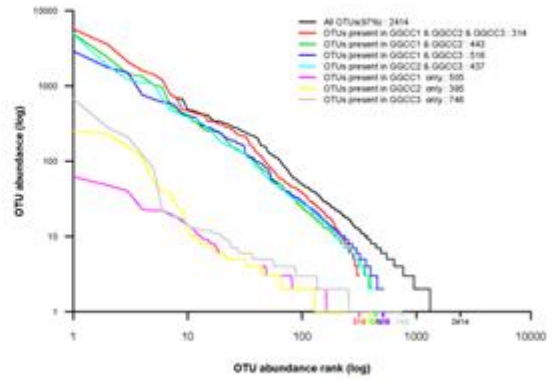


图 4

横轴：OTU 相对丰度含量等级降序排列。

纵轴：相对丰度比例。

曲线解读：

Ø 图 3 与图 4 中每条曲线对应一个样本（参考右上角图标）；

Ø 图 3 与图 4 中横坐标表示的是 OTU（物种）丰度排列顺序，纵坐标对应的是 OTU（物种）所占相对丰度比例（图 3 为相对百分比例，图 4 为换算后 Log 值），曲线趋于水平则表示样品中各物种所占比例相似；曲线整体斜率越大则表示样品中各物种所占比例差异较大。

4. 样本群落组成分析：多样本柱状图/ 单样本饼状图

根据分类学分析结果，可以得知一个或多个样品在各分类水平上的物种组成比例情况，反映样品在不同分类学水平上的群落结构。

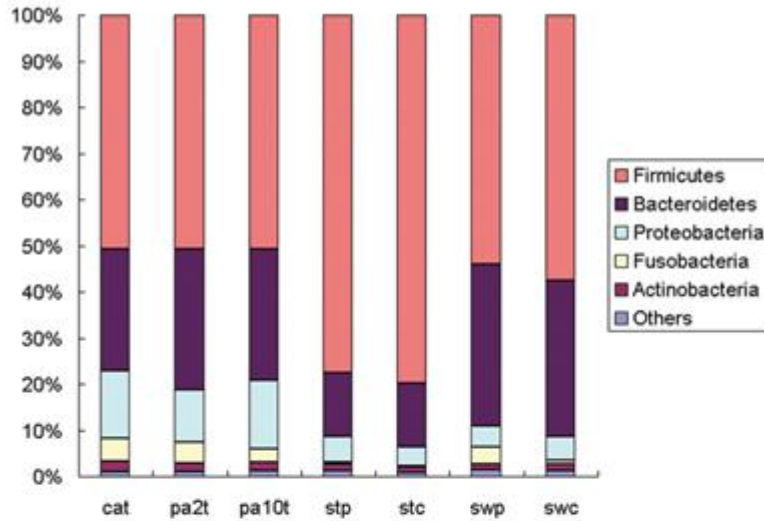


图 5

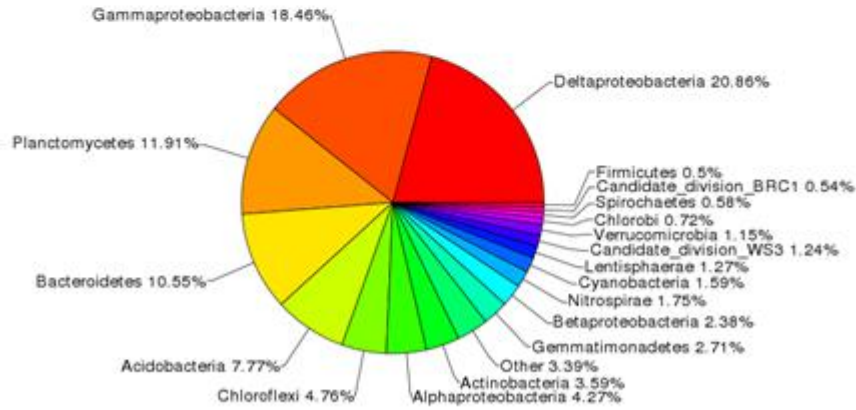


图 6

柱状图（图 5）

横轴：各样品的编号。

纵轴：相对丰度比例。

图标解读：

Ø 颜色对应此分类学水平下各物种名称，不同色块宽度表示不同物种相对丰度比例；

Ø 可以在不同分类学水平下作图分析。

饼状图（图 6）

在某一分类学水平上，不同菌群所占的相对丰度比例。不同颜色代表不同的物种。

5. 样品 OTU 分布 Venn 图

用于统计多个样品中共有或独有的 OTU 数目，可以比较直观地表现各环境样品之间的 OTU 组成相似程度。

不同样品用不同颜色标记，各个数字代表了某个样品独有或几种样品共有的 OTU 数量，对应的 OTU 编号会以 EXCEL 表的形式在结题报告中呈现。

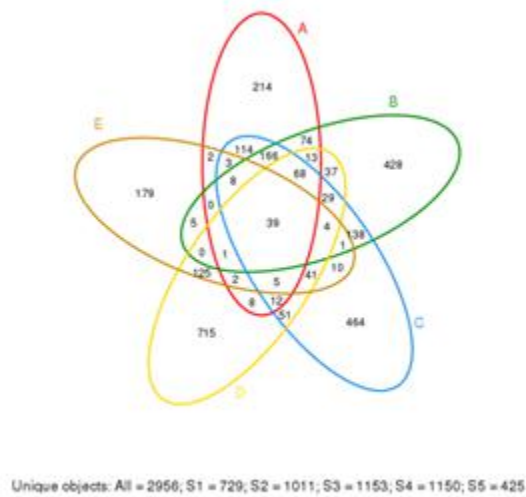


图 7

分析要求

单张分析图，样本分组至少两个，最多 5 个。

Ø 默认设置为 97% 相似度水平下以 OTU 为单位进行分析作图。

6. Heatmap 图

用颜色变化来反映二维矩阵或表格中的数据信息，它可以直观地将数据值的大小以定义的颜色深浅表示出来。将高丰度和低丰度的物种分块聚集，通过颜色梯度及相似程度来反映多个样品在各分类水平上群落组成的相似性和差异性。

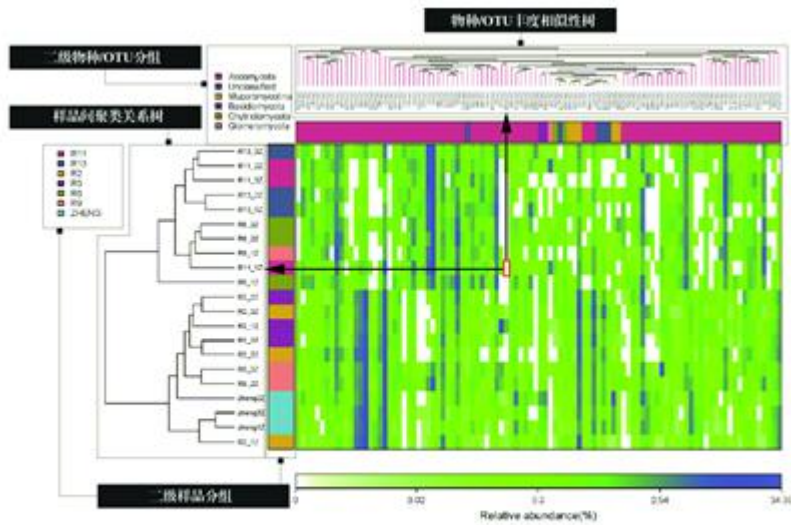


图 8

相对丰度比例:

热图（图 8）中每小格代表其所在样品中某个 OTU 的相对丰度。以图 8 为例，红框高亮的小格所对应的信息为：样本（R11-12）中 OTU（OTU128）的相对丰度比例大概为 0.2%。

丰度比例计算公式（Bray Curtis 算法）：

$$D_{\text{Bray-Curtis}} = 1 - 2 \frac{\sum \min(S_{A,i}, S_{B,i})}{\sum S_{A,i} + \sum S_{B,i}}$$

其中，

$S_{A,i}$ = 表示 A 样品中第 i 个 OTU 所含的序列数

$S_{B,i}$ = 表示 B 样品中第 i 个 OTU 所含的序列数

样品间聚类关系树：

进化树表示在选用成图数据中，样本与样本间序列的进化关系（差异关系）。处于同一分支内的样品序列进化关系相近。

物种/OTU 丰度相似性树：

丰度相似性树表示选用成图的数据中样品与样品中的 OTU 或序列在丰度上的相似程度。丰度最相近的会分配到同一分支上。

客户自定义分组：根据研究需求对菌群物种/OTU 研究样本进行二级分组

Ø 二级物种/OTU 分组：将下级分类学水平物种或 OTU 分配到对应的上级分类学水平，以不同颜色区分；

Ø 二级样品分组：根据研究需要，对样品进行人为的分组，以不同颜色区分。

7. 主成分分析 PCA (Principal Component Analysis)

在多元统计分析中，主成分分析是一种简化数据集的技术。主成分分析经常用于减少数据集的维数，同时保持数据集中对方差贡献最大的特征，从而有效地找出数据中最“主要”的元素和结构，去除噪音和冗余，将原有的复杂数据降维，揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构。

通过分析不同样品的 OTU 组成可以反映样品间的差异和距离，PCA 运用方差分解，将多组数据的差异反映在二维坐标图上，坐标轴为能够最大程度反映方差的两个特征值。如样品组成越相似，反映在 PCA 图中的距离越近。

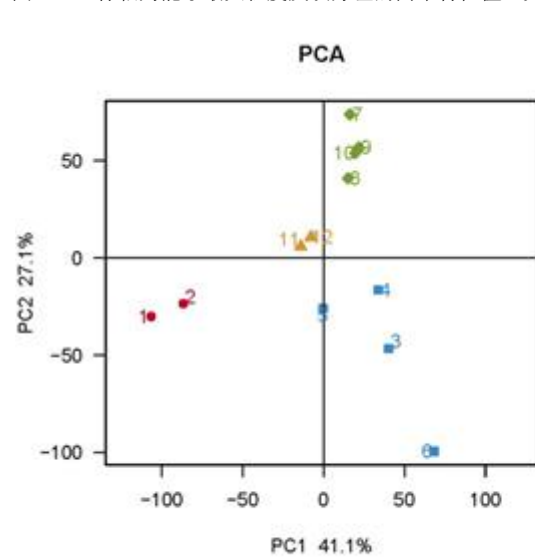


图 9

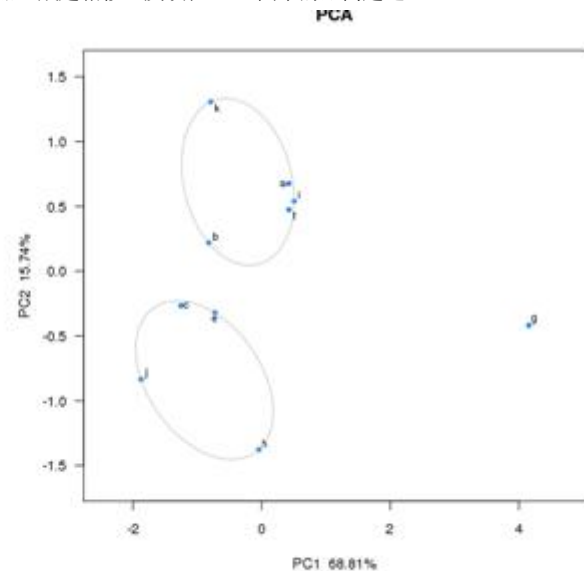


图 10

横轴和纵轴：以百分数的形式体现主成分主要影响程度。以图 9 为例，主成分 1 (PC1) 和主成分 2 (PC2) 是造成四组样品（红色，蓝色，黄色和绿色）的两个最大差异特征，贡献率分别为 41.1% 和 27.1%。

十字交叉线：在图 9 中作为 0 点基线存在，起到辅助分析的作用，本身没有意义。

图例解读：

Ø PCA 分析图是基于每个样品中所含有的全部 OTU 完成的；

Ø 图 9 中每个点代表了一个样本；颜色则代表不同的样品分组；

- Ø 两点之间在横、纵坐标上的距离，代表了样品受主成分（PC1 或 PC2）影响下的相似性距离；
- Ø 样本数量越多，该分析意义越大；反之样本数量过少，会产生个体差异，导致 PCA 分析成图后形成较大距离的分开，建议多组样品时，每组不少于 5 个，不分组时样品不少于 10 个；
- Ø 图 10 中的圆圈为聚类分析结果，圆圈内的样品，其相似距离比较接近。

8. RDA/ CCA 分析图

基于对应分析发展的一种排序方法，将对应分析与多元回归分析相结合，每一步计算均与环境因子进行回归，又称多元直接梯度分析。主要用来反映菌群与环境因子之间的关系。RDA 是基于线性模型，CCA 是基于单峰模型。分析可以检测环境因子、样品、菌群三者之间的关系或者两两之间的关系。

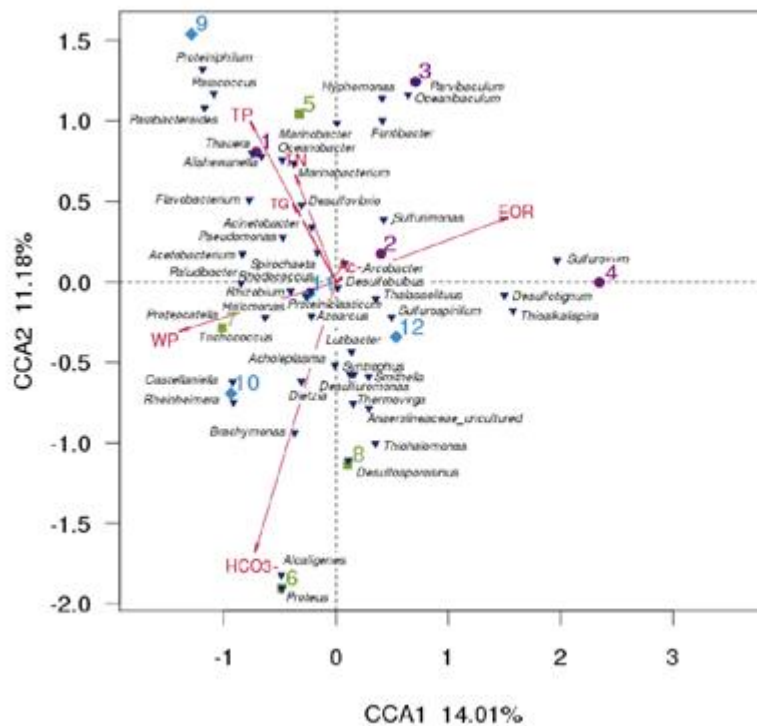


图 11

横轴和纵轴：RDA 和 CCA 分析，模型不同，横纵坐标上的刻度为每个样品或者物种在与环境因子进行回归分析计算时产生的值，可以绘制于二维图形中。

图例解读：

- Ø 冗余分析可以基于所有样品的 OTU 作图，也可以基于样品中优势物种作图；
- Ø 箭头射线：图 11 中的箭头分别代表不同的环境因子（即图中的碳酸氢根离子 HCO_3^- ，醋酸根离子 AC^- 等，图中的其它环境因子因研究不同代表的意义不同，因此不再赘述）；
- Ø 夹角：环境因子之间的夹角为锐角时表示两个环境因子之间呈正相关关系，钝角时呈负相关关系。环境因子的射线越长，说明该影响因子的影响程度越大；
- Ø 图 11 中不同颜色的点表示不同组别的样品或者同一组别不同时期的样品，图中的拉丁文代表物种名称，可以将关注的优势物种也纳入图中；
- Ø 环境因子数量要少于样本数量，同时在分析时，需要提供环境因子的数据，比如 pH 值，测定的温度值等。

9. 单样品/ 多样品分类学系统组成树

根据 NCBI 提供的已有微生物物种的分类学信息数据库，将测序得到的物种丰度信息回归至数据库的分类学系统关系树中，从整个分类系统上全面了解样品中所有微生物的进化关系和丰度差异。

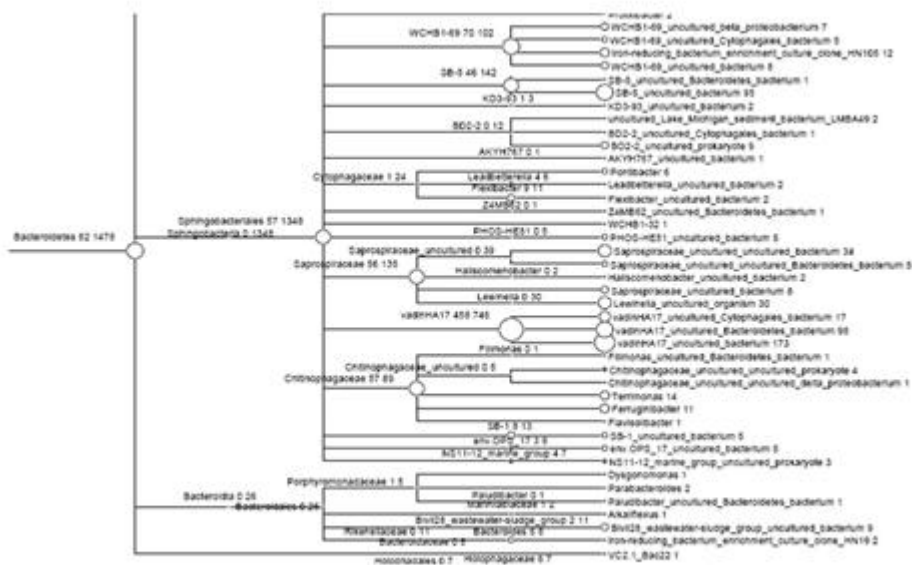


图 12

单样品图 (图 12)：可以了解单样品中的序列在各个分类学水平上的分布情况。



图 13

图例解读：

- Ø 图 12 中不同的层次反映不同的分类学水平；
- Ø 分支处的圆面积说明了分布在该分类学水平，且无法继续往下级水平比对的序列数量，面积越大，说明此类序列越多；
- Ø 每个分支上的名词后面的两组数字分别表示比对到该分支上的序列数和驻留在该节点上的序列数；
- Ø 图 13 中为某单一水平物种分布情况，并非序列分布。

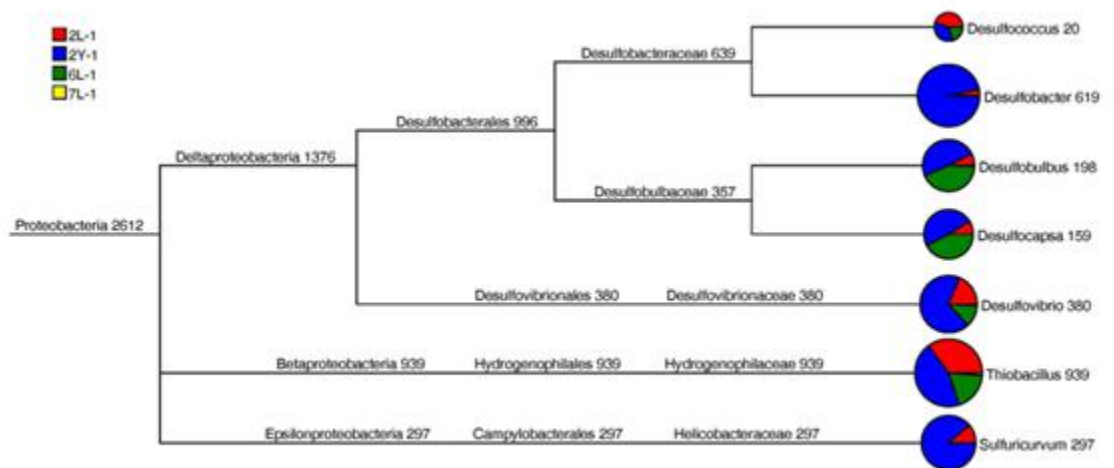


图 14

多样品图（图 14）：比对多个样品在不同分类学分支上序列数量差异。

图例解读：

Ø 比对不同样品在某分支上的序列数量差异，通过带颜色的饼状图呈现，饼状图的面积越大，说明在分支处的序列数量越多，不同的颜色代表不同的样品。

Ø 某颜色的扇形面积越大，说明在该分支上，其对应样品的序列数比其他样品多。

Ø 多样品在做该分析时，建议样品数量控制在 10 个以内，或者将重复样本数据合并成一个样本后，总样品数在 10 个以内。

10. 系统发生进化树

在分子进化研究中，基于系统发生的推断来揭示某一分类水平上序列间碱基的差异，进而构建进化树。

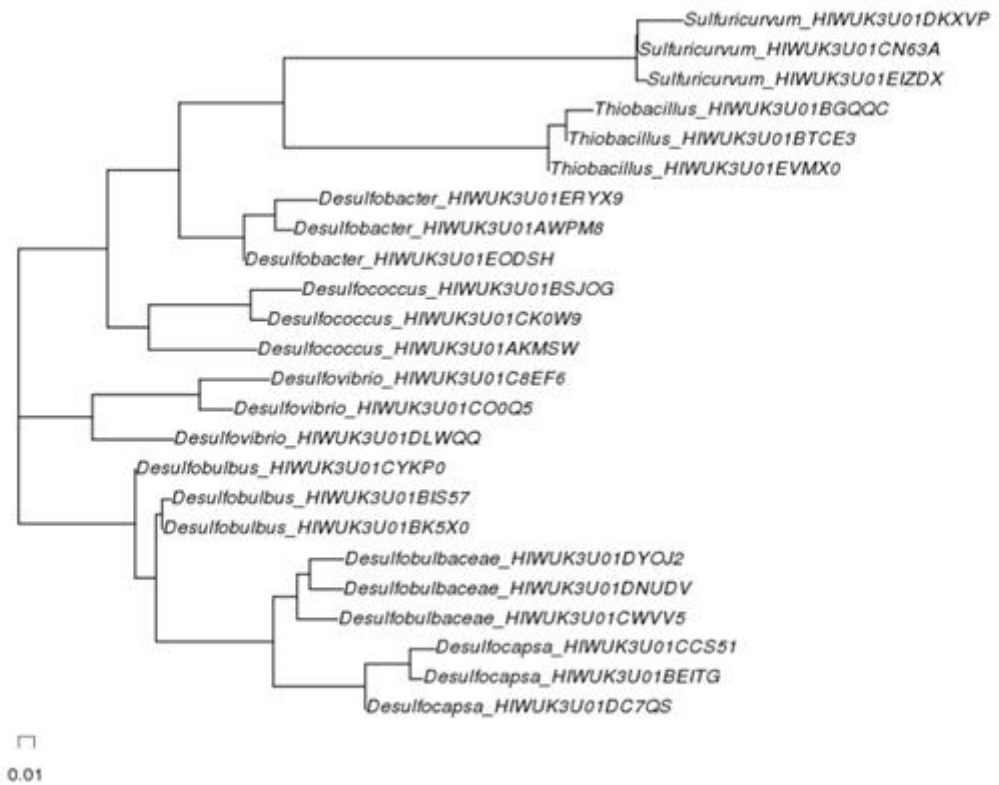


图 15

图例解读:

Ø 图 15 中体现的是序列进化差异情况，处在同一分支上的物种说明进化关系较近。

Ø 图 15 左下角的图例为距离标尺，分支距离越长，进化关系越远。

11. (un)Weighted UniFrac PCoA/Tree 分析

利用各样品序列间的进化信息来计算样品间距离，反映环境样品在进化树中是否有显著的微生物群落差异。

PCoA (principal co-ordinates analysis) 是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法，通过一系列的特征值和特征向量进行排序后，选择主要排在前几位的特征值，PCoA 可以找到 距离矩阵中最主要的坐标，结果是数据矩阵的一个旋转，它没有改变样品点之间的相互位置关系，只是改变了坐标系统。通过 PCoA 可以观察个体或群体间的差异。

Ø 建议不分组时，样本数量不少于 10 个；多组样本时，每组样本数量不少于 5 个；

Ø 图 18 中的点代表样本，点与点之间的距离表示差异程度。

13. 含相似性树柱状图

根据样品中相似程度进行排布，并绘制对应样本树状图反映样本中群落结构。

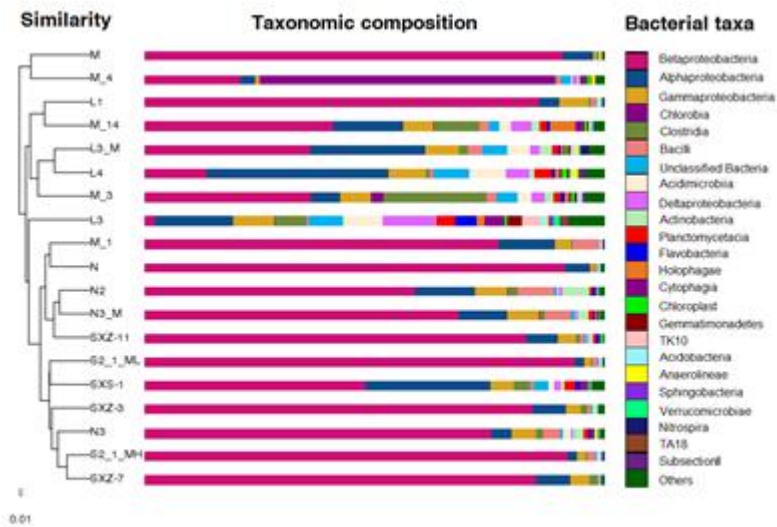


图 19

图例解读：

Ø 图 19 中左侧是相似性树状图，样本之间的差异越小，样本便会处在相近的同一分支上；

Ø 右侧柱状图，展示样本中微生物的群落结构。不同颜色代表不同物种。

14. Unifrac 显著性差异分析

比较样品间进化差异的显著性分析。

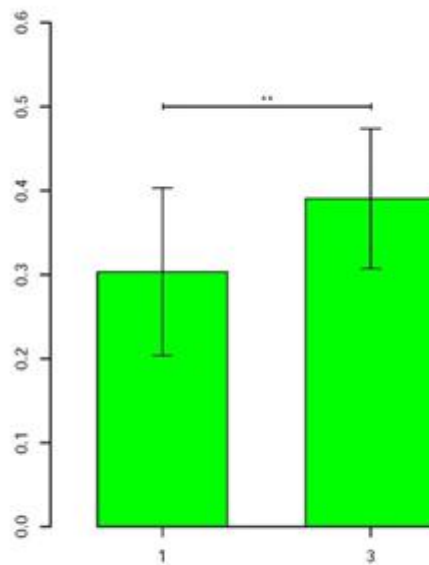


图 20

图例解读:

Ø 图 20 横坐标为两组样品;

Ø 纵轴坐标为 unifrac 进化距离 (序列差异)。

15. 单因素 unweighted unifrac PCA 分析

在某单一因素上, 进行 unweighted unifrac PCA 分析。

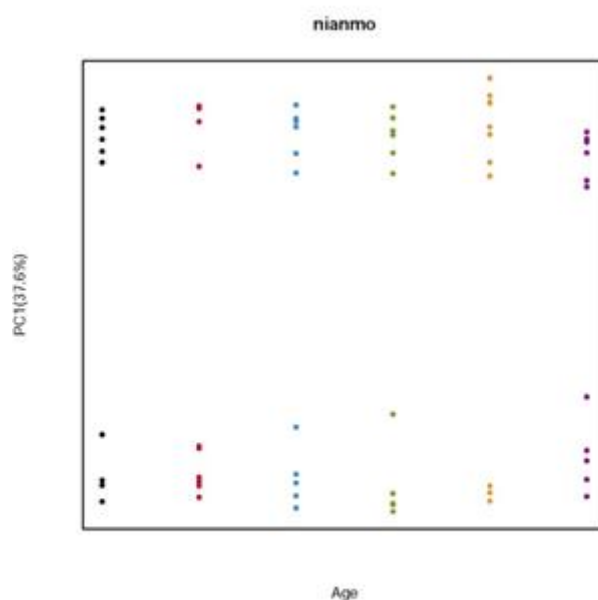


图 21

图例解读:

Ø 图 21 横轴为不同变量 (本例为不同年龄阶段) 下的样品;

Ø 纵坐标为主成分, 图 21 中显示同一年龄阶段内和不同年龄阶段间的由主成分导致的差异情况。

16. 个性化分析案例展示

案例描述一

Community composition of root-associated fungi in a Quercus-dominated temperate forest: "codominance" of mycorrhizal and root-endophytic fungi. Ecol Evol. 2013 May; 3(5):1281-93.

样本来源	样本数量	高变区	测序平台	测序量 (reads)
植物根系/ 泥土	159/38	ITS	Roche GS	70,495

样本来自于以日本橡木为主的温带森林, 使用 454 测序分析多个生态系统的真菌多样性。样品来源为植物根系样本, 从 12 株植物中提取了 159 份根系。分析结果表明, 外生真菌群落和根系内生真菌群落互相作用, 维持了这种以日本橡木为主的温带森林的生态环境。

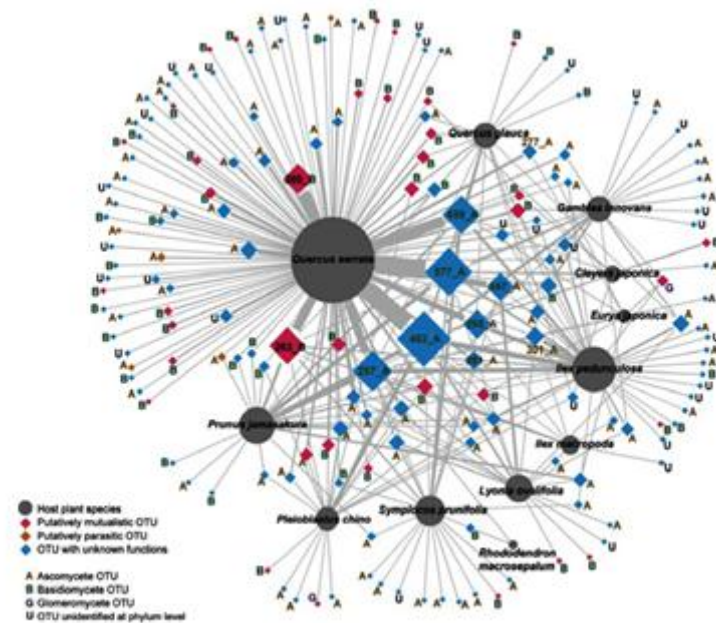


图 22

图例解读:

- Ø 图 22 构建了地下植物与真菌的相互关系网络;
- Ø 图 22 中灰色圆点表示与植物共生的微生物物种, 菱形代表真菌 OTU, 它们之间的关系用灰色连接线表示;
- Ø 它们之间的密集程度越高表示它们之间相互作用被观察的次数越多;
- Ø 互利共生真菌 OTU 用粉色菱形表示; 寄生微生物 OTU 用橘色菱形表示; 未知功能 OTU 用蓝色菱形表示;
- Ø A: 子囊真菌门; B: 担子菌门; G: 球囊菌门; U: 表示门水平未知真菌。

案例描述二

The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing. *Sci Rep*. 2013;3:1413.

室内微生物群落对日常生活中人类健康起着重要作用, 尤其是医院的重症监护室。采用扩增焦磷酸测序研究 ICU 中微生物群落可以检测多种微生物序列, 与现有的传统标准培养技术相比, 有极大的优越性。

传统培养方式只能检测总细菌多样性的 2.5%。结合外部环境与物种系统发育谱分析发现, 许多微生物与潜在的人类病原菌相关, 当然也包含有益菌, 一共 7 个门 76 个属。此外, 丙酸杆菌属, 假单胞菌属和伯克霍尔德氏菌被确定为感染的重要来源。在地板, 医疗器械和工作间微生物组成有显著差异, 但网络分析和一致性分子指纹印记分析发现这三个地点微生物组成也有一定的相似性。这些信息将帮助加护病房进行新的公共卫生风险评估, 帮助建立新的卫生协议, 帮助深入了解医院获得性感染的情况。

样本来源	样本数量	高变区	测序平台	测序量 (reads)
重症监护室 (ICU) 中地板, 医疗设备 & 工作间表面样品	34	16S rRNA	Roche 454 FLX+	5000/样本

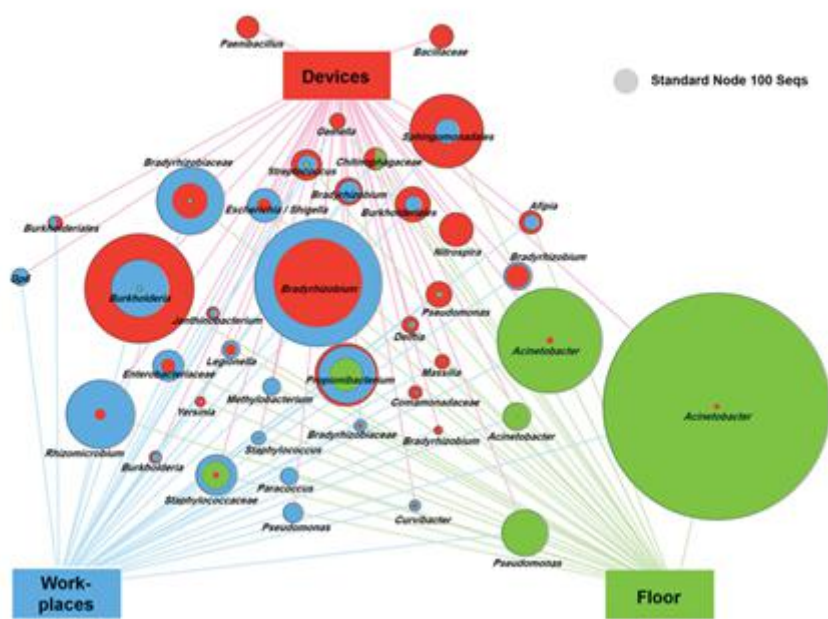


图23

图 23 为丰度最高的 40 种菌(OTU) 在不同采样区域的分布情况。不同颜色代表不同样本来源，绿色为 ICU 地板，红色为医疗设备，蓝色为工作间。结点面积表示该 OTU 在三个采样区域之间的相对丰度。

案例描述三

Skin Microbiome Imbalance in Patients with STAT1/STAT3 Defects Impairs Innate Host Defense Responses. Journal of

Innate Immunity. 2013, DOI: 10.1159/000351912.

CMC 和 HIES 均属于罕见的原发性免疫缺陷病。本文研究了 CMC 和 HIES 病人皮肤及口腔微生物与正常人群的微生物菌群差异。结果表明，相比正常人体的微生物组成（主要包括棒杆菌属和放线菌科等），病人的所携带的微生物中革兰氏阴性菌比例增加。而革兰氏阴性菌（如不动杆菌属）可以抑制机体对假丝酵母和金色葡萄球菌的免疫反应，结果很可能导致患者对这些菌感染的敏感性增加。本文的研究表明，此类免疫缺陷病人所携带的微生物菌群可以影响宿主的免疫防御系统，进而有可能通过基于微生物的辅助疗法来治疗免疫缺陷的患者。

样本来源	样本数量	高变区	测序平台	测序量 (reads)
慢性皮肤黏膜念珠菌病 (CMC)、高 IgE 综合征 (HIES) 患者皮肤及口腔微生物	60	16S rRNA V4 区	MiSeq	6389/样本

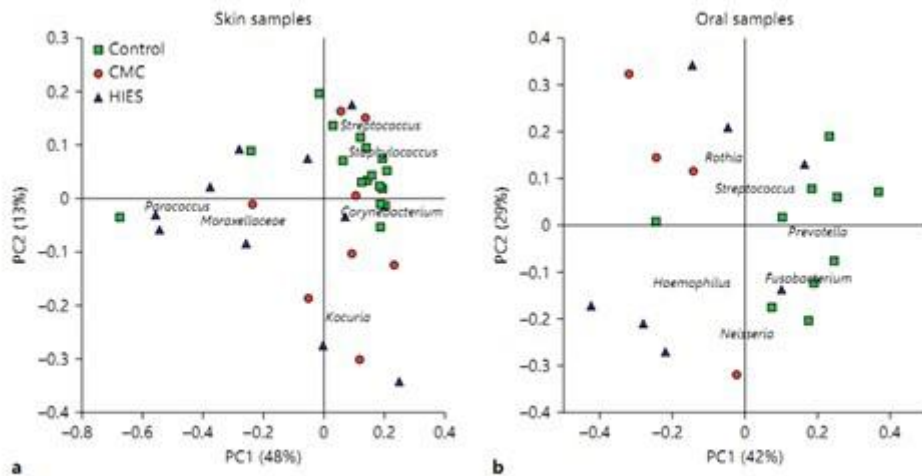


图 24

图 24 为免疫缺陷疾病各亚型患者皮肤和口腔微生物群落结构的协方差。(a) 图表示 35 个皮肤样本的微生物多样性的差异；(b) 图表示 21 个口腔样本微生物多样性差异。其中，绿色方块表示健康对照组，红色圆圈表示 CMC，蓝色三角形表示 HIES。健康人体皮肤表面的微生物主要包括葡萄球菌和棒状杆菌，而疾病组多为莫拉菌科。

培训文档



常见问题

Q1. 能对哪些环境下的样品进行分析？

A 目前已经成功运用 Roche 454 技术发表的文章涵盖农业、土壤、林业、海洋、矿井（石油等）、人体医学等诸多领域，共计近 1400 篇，Paper 目录可向本公司索取。其中有大量文献发表于国际顶级杂志上，包括 Science、Nature、ISME、PNAS、AEM 等。

Q2. DGGE 技术与 Roche 454 高通量测序技术在环境微生物群落多样性研究中有什么区别？

A DGGE 等分子指纹图谱技术，在其实验结果中往往只含有数十条条带，只能反映出样品中的优势种群，也无法得到细菌种类及其绝对含量。而 Roche 454 高通量测序技术能同时对样品中的优势种群及微量菌进行检测，获得样品中的微生物群落组成，并将其含量进行数字化。

Q3. 在医学领域有哪些应用？

A 在人类的皮肤、口腔、呼吸道、胃肠道和尿道等处存在着大量与人体健康密切相关的正常菌群。它们能够合成并辅助机体吸收一些必需氨基酸和维生素；加工诸如植物多糖等人类饮食中一些难以消化的组分；占据人体的不同粘膜表面并产生天然的抗生素，抑制有害菌的着落与生长。目前，人们已经采用传统方法对人人微生物作了许多研究，但是这种方法需要对微生物进行纯培养，从而大大限制了我们对机体正常菌群，尤其是许多不可培养微生物的认识。第二代高通

量测序技术能对人体菌群进行深度测序，从而精确检测到千分之一机体微生物群落的数量和组成结构的变化，突破了传统方法基于纯培养的限制，能使我们从整体上认识微生物群落与宿主之间的相互关系及其对人体健康的影响。例如，利用第二代高通量测序技术可以对处于疾病状态下的人体微生境进行研究，比较分析正常和疾病状态下或疾病不同进程人体微生物群落的结构和功能变化；可以对正常人群与某些疾病患者体内的微生物群体多样性进行比较分析，研究微生物群落变化同疾病之间的关系；通过深度测序还可以快速地发现和检测常见病原及新发传染病病原微生物。

Q4. 高通量测序是否需要做平行样？

A 随着高通量测序的发展，提出研究过程中设置重复样的要求，也日益被大家所接受。在高通量研究中，设置重复样不但是体现了科研的一种严谨态度，同时也体现了结果的真实性，避免了个体差异造成的影响。

目前的发展趋势：普通样品（水体，土壤，处理样本内部设置重复等）一般会要求设置重复样；对于大面积研究水体和土壤等样本时，可以采用多点采样混样研究。稀有样本（稀有动物粪便，冰川极地冰样，过多采样会影响整体环境构成的样本等）对于重复样设置的要求相对比较宽松。

Q5. 454 一块 PTP 板最多可以放多少样本？1 个相同的样本分别研究细菌，真菌，古菌是否可以放在同一块 PTP 板上测序？

A 理论上，知道每个样本的测序量和一个 454PTP 板能够容纳的测序量，便能得知可以测序的样本量。实际上，考虑到测序质量的因素，不可如此计算上样量。一块 PTP 能够容纳多少样本往往应该考虑以下两个因素：

1. **barcode 数量：**barcode 是用于区分上样样品的标签序列，标签的个数限制着一块 PTP 能够容纳多少样本；
2. **PTP 板分区情况：**PTP 板分区越多可以增加上样的样品个数，但分区越多，会影响测序总量。

一块 PTP 板，在不分区的情况下，一般可以产出 80 万条序列，综合考虑 barcode 数量，分区情况以及单样本的测序量，便可计算一块 PTP 板容纳的样本数量。

对于同一个样本，分别研究细菌，真菌，古菌一般是可以放到同一个板里进行测序，但要考虑到不同类型 PCR 产物的长度对测序结果的影响，如果 PCR 产物长度差异较大，则不可以放入同一块 PTP 板进行测序。