



团 体 标 准

T/COCIA 52—2024

口腔菌群多样性的检测方法

Analytical method for oral flora diversity

2024 - 12 - 27 发布

2024 - 12 - 27 实施

中国口腔清洁护理用品工业协会 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国口腔清洁护理用品工业协会提出。

本文件由全国口腔护理用品标准化技术委员会牙膏分技术委员会（SAC/TC492/SC1）归口。

本文件起草单位：上海格芒生物科技有限公司、山东大学、重庆登康口腔护理用品股份有限公司、深圳小阔科技有限公司、杭州纳美智康科技有限公司、扬州倍加洁日化有限公司。

本文件主要起草人：冯强、王培宇、刘旭、宋文竹、孟雷、蒋建卓、尹阔、陈泽惠、余洁、韩金豆。

本文件为首次发布。

口腔菌群多样性的检测方法

1 范围

本文件规定了人体口腔菌群的取样方法、检测方法及微生物菌群分析指标的技术要求。
本文件适用于口腔菌群多样性分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 37874-2019 核酸提取纯化方法评价通则

GB/T 40458-2021 用于病原微生物高通量检测的核酸提取技术规范

DB21/T 3646-2022 斑海豹肠道微生物菌群健康评估规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

口腔菌群 oral flora

生活在人类口腔中的菌群包括细菌、真菌、病毒等。这些微生物在口腔内形成了一个复杂的生态系统，它们与宿主之间存在着共生关系。

3.2

口腔菌群多样性检测 analytical of oral flora diversity

口腔菌群多样性检测是一种用于评估口腔菌群种类、数量及分布等多种特性的检测技术。目前应用最广泛的是采用16S rRNA基因测序技术对口腔中的细菌进行鉴定和分类，分析不同细菌的丰富度和均匀度，以评估口腔健康状况和疾病风险。

4 检测方法原理

在提取口腔菌群DNA的基础上，采用Nanopore测序仪对细菌16S rRNA基因全长进行测序。测序芯片上有纳米孔，膜两侧有离子溶液和电位差，离子流动形成电流。DNA在马达蛋白牵引下通过纳米孔，不同碱基（A、T、C、G）化学结构和带电性质不同，通过纳米孔时对离子电流产生独特干扰。灵敏设备记录电流变化信号，用算法分析解读，确定碱基序列。经过严格的质量控制后，将序列与数据库进行比对，最后通过统计分析得出口腔菌群的多样性信息，涵盖细菌种类、相对丰度等内容。

5 试剂和材料

- 5.1 无菌离心管。
- 5.2 无菌刮匙。
- 5.3 无菌舌刷。
- 5.4 细菌 DNA 提取试剂盒 (Vazyme # DC112-01)。
- 5.5 DNA 建库试剂盒 (Vazyme #TS201)。

6 仪器设备

- 6.1 高速离心机。
- 6.2 超低温冰箱。
- 6.3 Nanopore 测序仪 (GridION X5)。

7 取样方法

7.1 取样要求

- 1) 对受检者的唾液、牙菌斑和舌背分别采集样本，且三个部位都要取样。
- 2) 取样过程中，取样人员使用无菌手套、无菌棉签或采样器具，避免污染；且对取样人员进行统一的培训，减少由于取样操作不同产生的误差。

7.2 取样

7.2.1 唾液样本

一天中不同时间点唾液的流率有所不同，也会受进食、口腔卫生措施的影响，因此样本采集建议选择晨起刷牙之前或两餐之间。

受试者取样前需用清水漱口，去除口中可能含有的食物残渣。受试者手持唾液收集容器；静坐，低头，口微张、睁开眼、头微微前倾；避免吞咽，先将唾液聚集在口底，再吐到容器内。通常耗时5-10 min，最后将样本置于冰盒中转运。将收集的唾液分装入1.5 mL无菌离心管中，低温离心 ($13,000 \times g$, 4°C) 15 min，沉淀用于微生物检测分析。

7.2.2 牙齿牙菌斑样本

取样前请受检者用清水漱口，去除口中可能含有的食物残渣。取样时用无菌棉球隔湿，然后用无菌探针/匙形刮治器刮取磨牙咬合面和磨牙邻面的菌斑样本，收集到0.5 mL无菌离心管中；也可以使用无菌小毛刷或刮板收集磨牙咬合面和磨牙邻面菌斑，然后在准备好的缓冲液中荡洗1 min，将样本洗脱下来。低温离心 ($13,000 \times g$, 4°C) 15 min，轻轻吸取弃去上清，保留沉淀。最后，将收集的样本放入冰盒中转运。

7.2.3 舌背样本

取样前请受检者用清水漱口，去除口中可能含有的食物残渣。受试者微张口、伸舌，用无菌毛刷从舌背一侧呈叠瓦状刷到另一侧，将含有样本的毛刷部分剪下，放入无菌管内。加入缓冲液荡洗。将毛刷从液体中取出，低温离心 ($13,000 \times g$, 4°C) 15 min，轻轻吸取弃去上清，底层沉淀为舌背菌斑样本。

7.3 保存

短期（1个月）内可存放于-20℃冰箱；长期（超过1个月）贮存需加入冷冻保护剂（甘油、二甲基亚砷或脱脂牛奶）置于-80℃超低温冰箱中。

8 DNA提取及测序

采用DNA提取试剂盒提取样本中的DNA。Nanodrop检测DNA总量、浓度及纯度，要求DNA浓度 $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ，总量 $\geq 100\text{ng}$ ， $\text{OD}_{260/280}$ 介于1.8至2.0之间。然后通过特定的试剂盒和步骤制备测序文库。基于Nanopore测序平台对口腔菌群的16S rRNA基因全长进行测序。

微生物菌群多样性分析结果会受到DNA提取和测序方法的影响。因此，为了确保不同样本间的比较具有科学性和可靠性，同一研究项目中的所有样本均应采用统一的提取和测序技术。

9 口腔菌群多样性分析

9.1 原始数据处理

使用QIIME 2软件，运行qiime tools import命令导入测序数据。使用qiime dada2 denoise-paired命令对导入的数据进行质量控制、去噪以及去除嵌合体等操作，从而得到最终可用的高质量序列。

9.2 OUT 聚类

使用QIIME 2软件的qiime vsearch cluster-features-de-novo命令进行OTU聚类。其中--p-perc-identity参数指定了序列相似性的阈值，设置为97%。使用qiime feature-classifier classify-sklearn命令对OTU进行分类学分析，需要先准备好合适的分类学参考数据库（如Greengenes、SILVA等），以获得每个OTU的物种分类信息，分别在各个分类水平：kingdom（界），phylum（门），class（纲），order（目），family（科），genus（属），species（种）统计各样本的群落组成。使用phyloseq包中的函数将QIIME 2处理后的数据文件导入到R语言中并创建phyloseq对象并使用pheatmap包绘制OTU丰度热图，直观展示样本不同分类水平上的微生物组成。

9.3 口腔菌群 α 多样性分析

在R语言环境下，从phyloseq对象中提取OTU丰度数据，使用vegan包中的diversity函数来计算Shannon指数和Simpson指数，estimateR函数计算Chao1指数。其中，Shannon指数和Simpson指数体现菌群多样性，Chao1指数体现菌群丰度。然后使用ggplot2包绘制不同指数的箱线图来直观地展示不同样本的 α 多样性情况。

9.4 口腔菌群 β 多样性分析

在R语言环境下，对口腔菌群的 β 多样性进行分析，主要涉及计算样本间的Bray-Curtis距离矩阵和Jaccard指数，并进行主坐标分析（PCoA）。使用vegan包中的vegdist函数来计算样本间的Bray-Curtis距离矩阵和Jaccard指数。使用vegan包中的cmdscale函数来计算PCoA坐标。使用ggplot2功能来可视化PCoA结果，通过添加置信椭圆或不同颜色/形状的标记来区分不同的样本组，以揭示不同样本间的菌群组成差异。

10 结果报告

报告应包括以下内容：

10.1 样本信息（如受检者姓名、年龄、性别等）。

10.2 口腔菌群种类及丰度。

10.3 口腔菌群 α 、 β 多样性分析报告。

11 质量控制

11.1 实验室应建立完善的质量控制体系，确保检测过程的准确性和可靠性。

11.2 定期对实验人员进行培训，提高检测能力。

11.3 定期对实验设备进行校准和维护，确保设备性能良好。

11.4 引入质控样本进行检测，以评估实验室的准确性和可重复性。

12 储存和运输

12.1 样本在采集后立即进行处理，如无法立即处理，应在 4℃ 条件下储存，并在 24 小时内进行检测。

12.2 运输过程中应保证样本不受污染，温度适宜，如需长距离运输，可使用干冰或冷藏箱等方式保持样本的低温状态。

中国口腔清洁护理用品工业协会
团 体 标 准
口腔菌群多样性的检测方法

T/COCIA 52— 2024

*

中国口腔清洁护理用品工业协会
地址： 北京市西城区阜外大街乙 22 号
邮政编码： 100833
电话： （010） 68396721
网址： [http:// www.cocia.org](http://www.cocia.org)
Email： cocia@126.com

*

版权所有 侵权必究

印数： 100 册 定价： 60.00 元