



## 미생물 군집분석 결과보고서

2022. 11. 01.

확인	시험자 성명	연수지 	승인자 성명	정문규 
----	-----------	--	-----------	--

위탁기관 : 단지바이오

분석기관 : 한국의과학연구원 마이크로바이옴센터



## 결과 SUMMARY

1. (Phylum) 계열에서 미생물 군집을 살펴보면 식물보약제 시료의 경우 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 문이 우점을 차지하였지만 나머지 4개의 시료에서는 퍼미큐테스(*Firmicutes*) 문이 우점을 차지하였다.

2. 속(Genus) 계열의 결과에서 썩썩황제와 BA 시료에서는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속이 우점을 차지하고 있으며 썩썩튼튼과 한방킬2 시료는 클로스트리듐(*Clostridium*) 속이 식물보약제 시료는 엔테로박테리아(*Enterobacterales*) 속이 우점을 차지하는 것을 확인하였다.

## 목 차

I. 서론	(1)
1. 목적	(1)
2. 분석기간	(1)
II. 재료 및 방법	(1)
1. 시료	(1)
2. 분석방법	(1)
III. 결과	(4)
1. Alpha Diversity 분석결과	(4)
2. Community Diversity 분석 결과	(5)
IV. 결론	(12)

# I. 서론

## 1. 목적

본 분석은 단지바이오에서 의뢰된 시료의 미생물 군집비교를 위한 분석으로 시료의 미생물 genomic DNA를 통해 군집분석을 진행하고자 한다.

## 2. 분석기간

2022. 09. - 2022. 10.

# II. 재료 및 방법

## 1. 시료

본 분석에서 진행된 시료는 단지바이오에서 제공한 시료를 대상으로 총 7개의 시료를 수집하여 분석을 진행하였다.

## 2. 분석방법

### 1) NGS분석을 위한 라이브러리 제작

- 시료에서 genomic DNA을 분리 및 정제하기 위해 QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen)을 사용함.
- 시료를 2 ml microcentrifuge tube에 넣고 ASL 버퍼 1.4 ml을 첨가하고 1분간 vortexing한 후 70 °C에서 5분동안 반응시킴.
- 15초동안 vortexing하고 1분동안 시료를 원심분리한 후 상등액을 2 ml microcentrifuge tube에 옮기고 InhibitEX Tablet을 넣어 섞어 준 후 1분 동안 반응시키고 3분동안 원심분리를 하여 얻은 상등액을 1.5 ml microcentrifuge tube 옮기고 다시 3분동안 원심분리를 진행.

- 시료에 15  $\mu\text{l}$ 의 proteinase K를 첨가하고 200  $\mu\text{l}$  AL buffer를 넣고 15초 동안 vortexing한 후 70  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분동안 반응한 뒤 QIAmp spin column에 옮기고 1분동안 원심분리 한후 AW1 buffer 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 1분동안 원심분리한 후 후 하부액을 버리고 AW2 buffer 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 3분동안 원심분리를 함.
- 12,000rpm에서 1~2분간 원심분리 하면서 멤브레인을 말려 준 후, collection tube를 버리고 recovery tube를 장착하여 AE buffer 100  $\mu\text{l}$ 를 중앙에 분주하여 실온에서 1분 동안 incubate함. 12,000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 DNA를 추출하고 total DNA의 농도를 정량함.

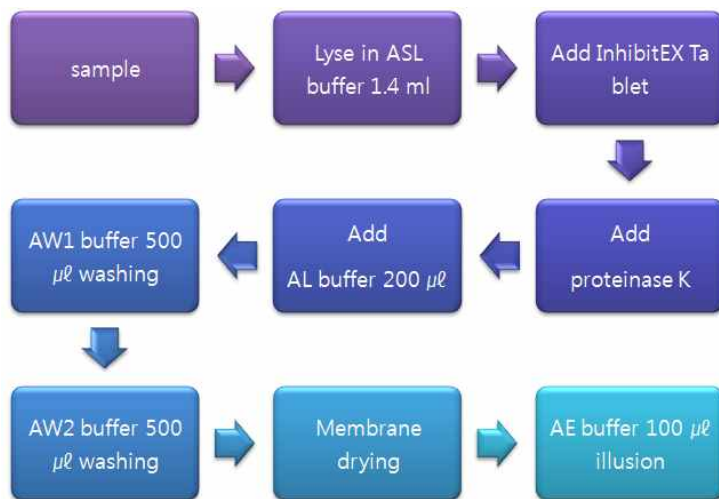


그림 1. Process of genomic DNA preparation and purification.

- 추출된 DNA는 NGS분석의 template DNA로 활용되며 NGS의 분석 프로세스는 다음과 같음.

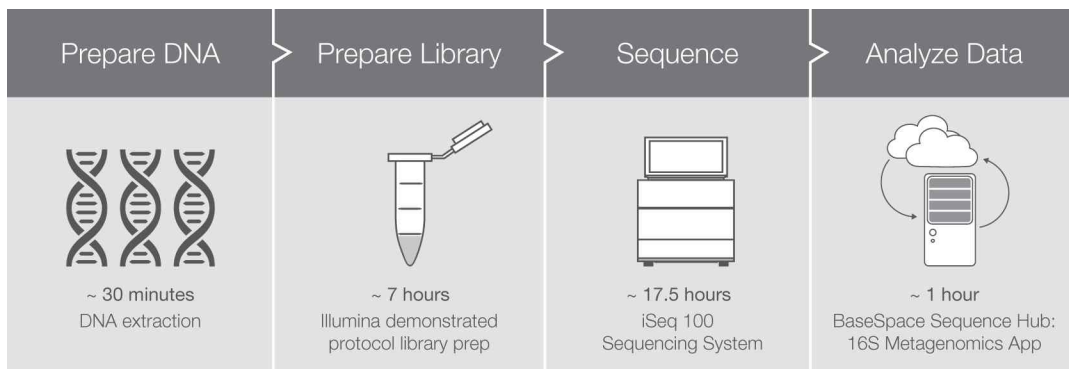


그림 2. 16S metagenomics sequencing workflow.

- 앞의 DNA 추출을 통해 prepare DNA과정을 수행하였으며 NGS를 분석하기 위한 시료를

만들기 위한 라이브러리 제작과정은 다음과 같다.

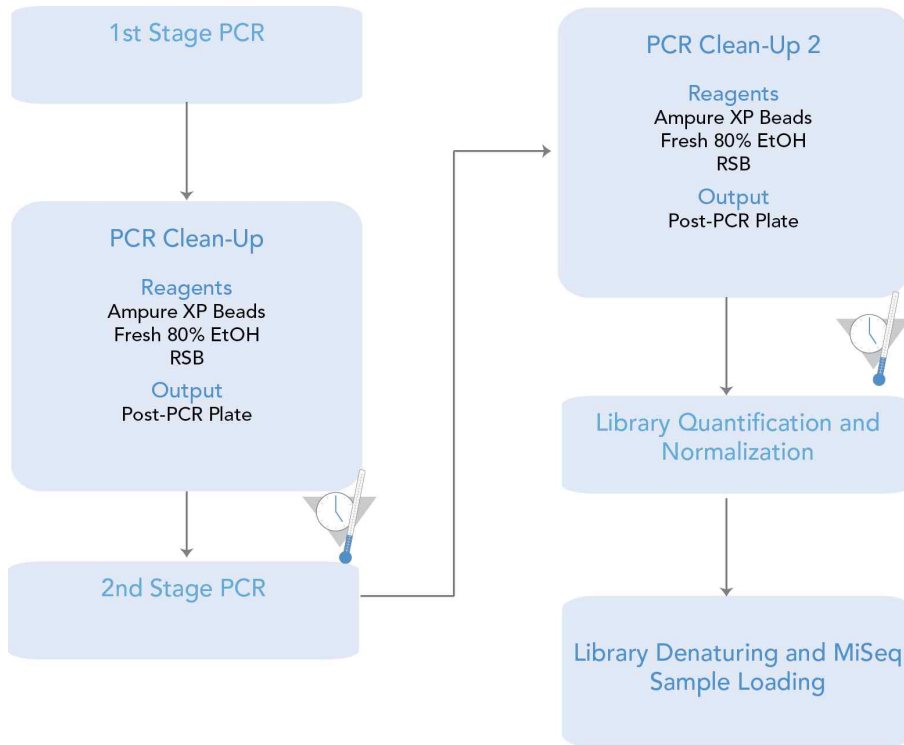


그림 3. 16S Library Preparation Workflow

- 1차와 2차 PCR 진행 후 최종적으로 만들어진 라이브러리는 품질을 확인하게 되며 Agilent Bioanalyzer 1000 장비와 Qbit장비를 활용하여 DNA의 양을 정량을 확인하고 NGS장비에 시료를 loading함.

### III. 결과

#### 1. Alpha Diversity 분석 결과

No.	Sample ID	Target Reads count	Shannon Species Diversity	Good's coverage of library(%)
1	쑥쑥황제	96,523	2.42	99.89
2	쑥쑥튼튼	78,073	2.4	99.88
3	식물보약제	93,184	2.34	99.92
4	한방길II	97,012	1.6	99.84
5	BA	96,248	2.15	99.88

- 1) Number Read Count : Next Generation sequencing을 통해 읽은 염기서열 수
- 2) Shannon Species Diversity : 미생물 다양성 지수로 높을수록 다양한 균집임.
- 3) Good's coverage of library : 시료에 포함되어 있는 미생물의 검출 비율

## 2. Community Diversity 분석 결과

종속과목강문계는 생물을 분류할 때 사용하는 단계이며 미생물 군집을 비교할 때 상위 분류계열인 문(Phylum)개열에서 최하위 계열인 종(Species)의 결과를 비교하게 됩니다. 각 계열의 뜻은 다음과 같습니다.

### 종(Species)

생물분류의 기본 단위로서 일반적으로 생물의 종류라고 하는 것이 이것에 해당됨.

### 속(Genus)

형태에 중점을 두어 유사한 종을 모은 군.

### 과(Family)

생물 분류에 사용하는 기본적 종류의 구별 단계로 린네의 계층분류에서 목과 속의 중간에 있는 계급명

### 목(Order)

강과 과 사이에 위치하는 분류군의 기본 단위 중에 하나로서 과보다는 큰 의미로 과를 묶어 놓은 것

### 강(Class)

위의 목보다 큰 의미로써 목을 다시 묶어놓은 것

### 문(Phylum)

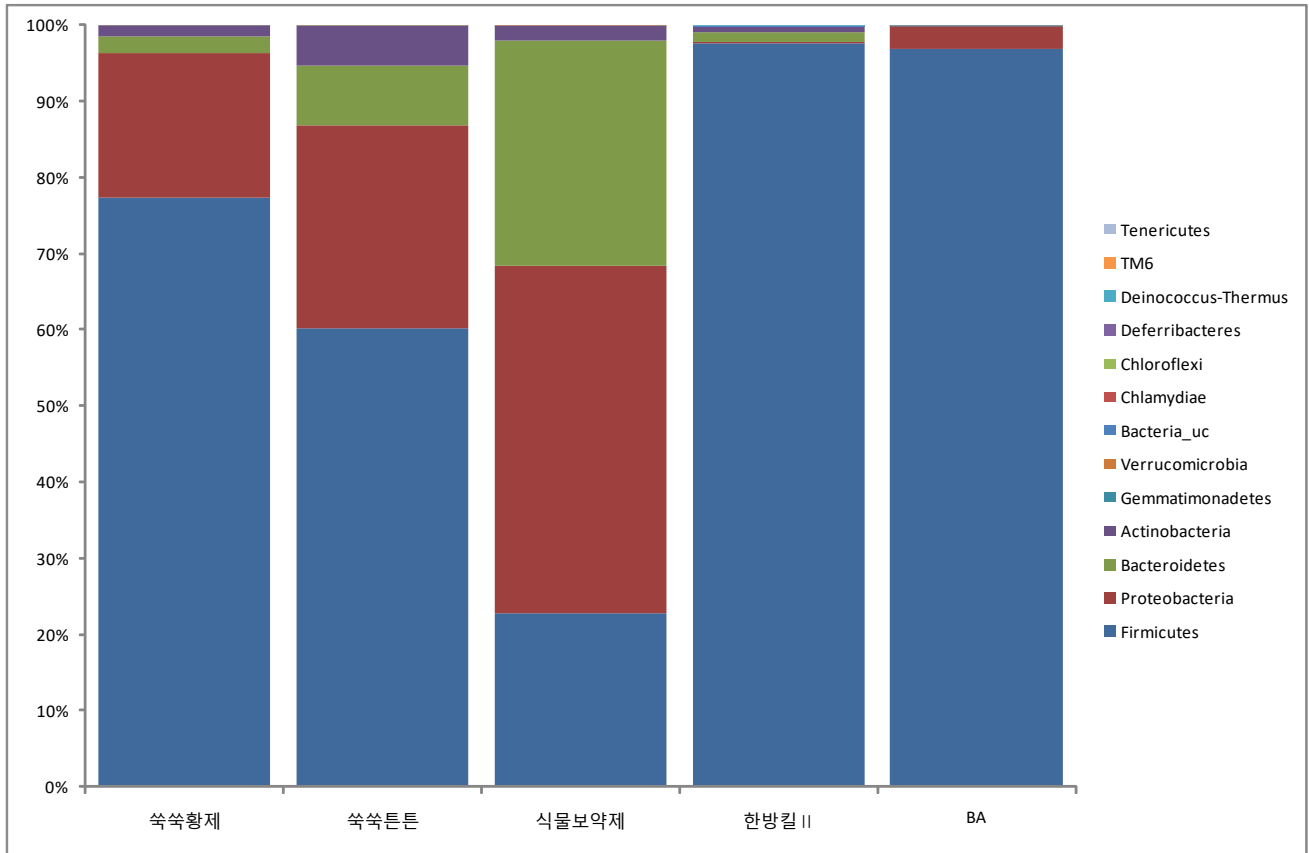
강보다 큰 의미로서 강들을 묶어놓은 분류.

### 예시)

1. 사람 : 동물계-척추동물문-포유류강-영장목-사람과-사람속-사람종
2. 개 : 동물계-척추동물문-포유류강-식육목-개과-개속-늑대종-개아종
3. 고양이 : 동물계-척추동물문-포유류강-식육목-고양이과-고양이속-야생고양이종-고양이아종

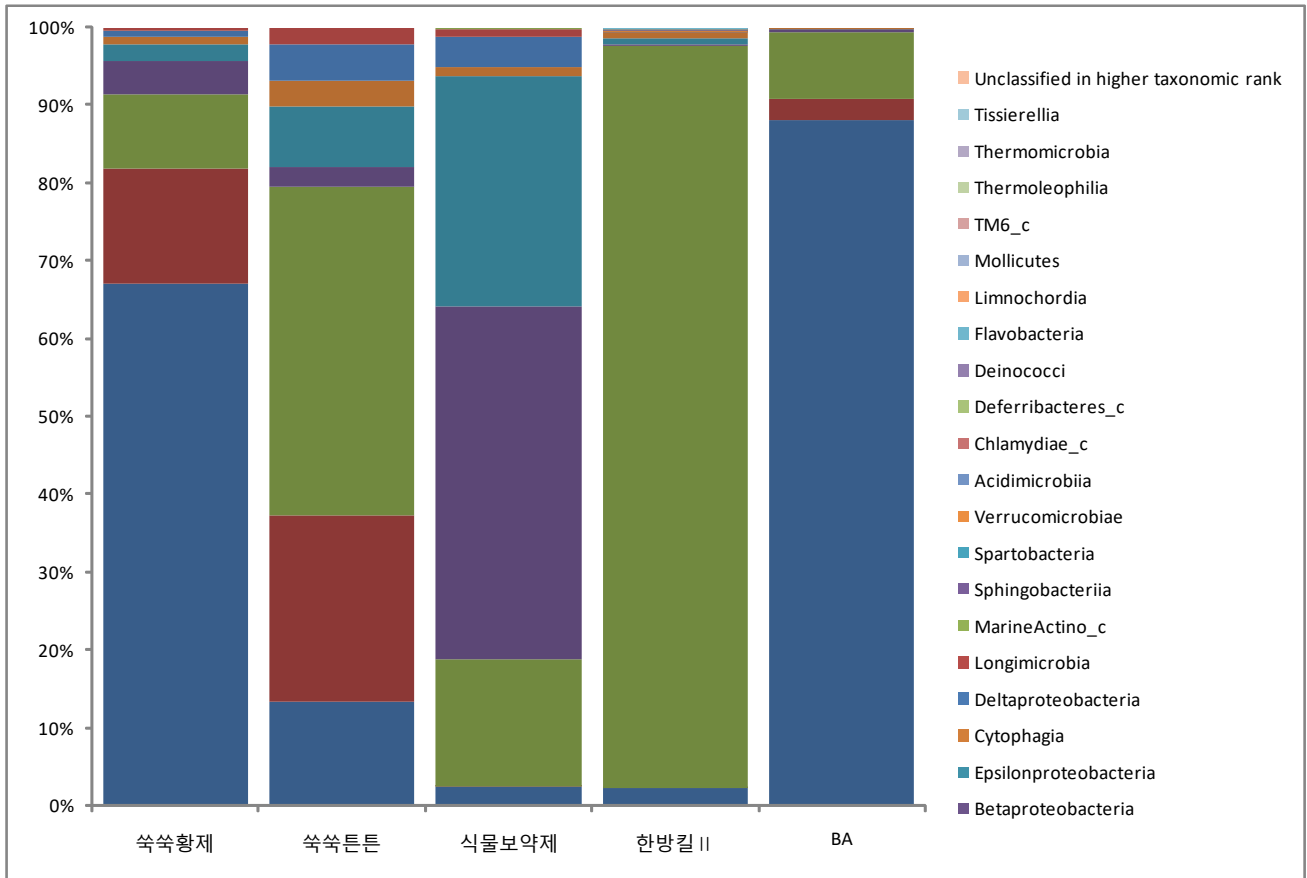
2-1 Phylum level 분석결과

a. 시료별 비교



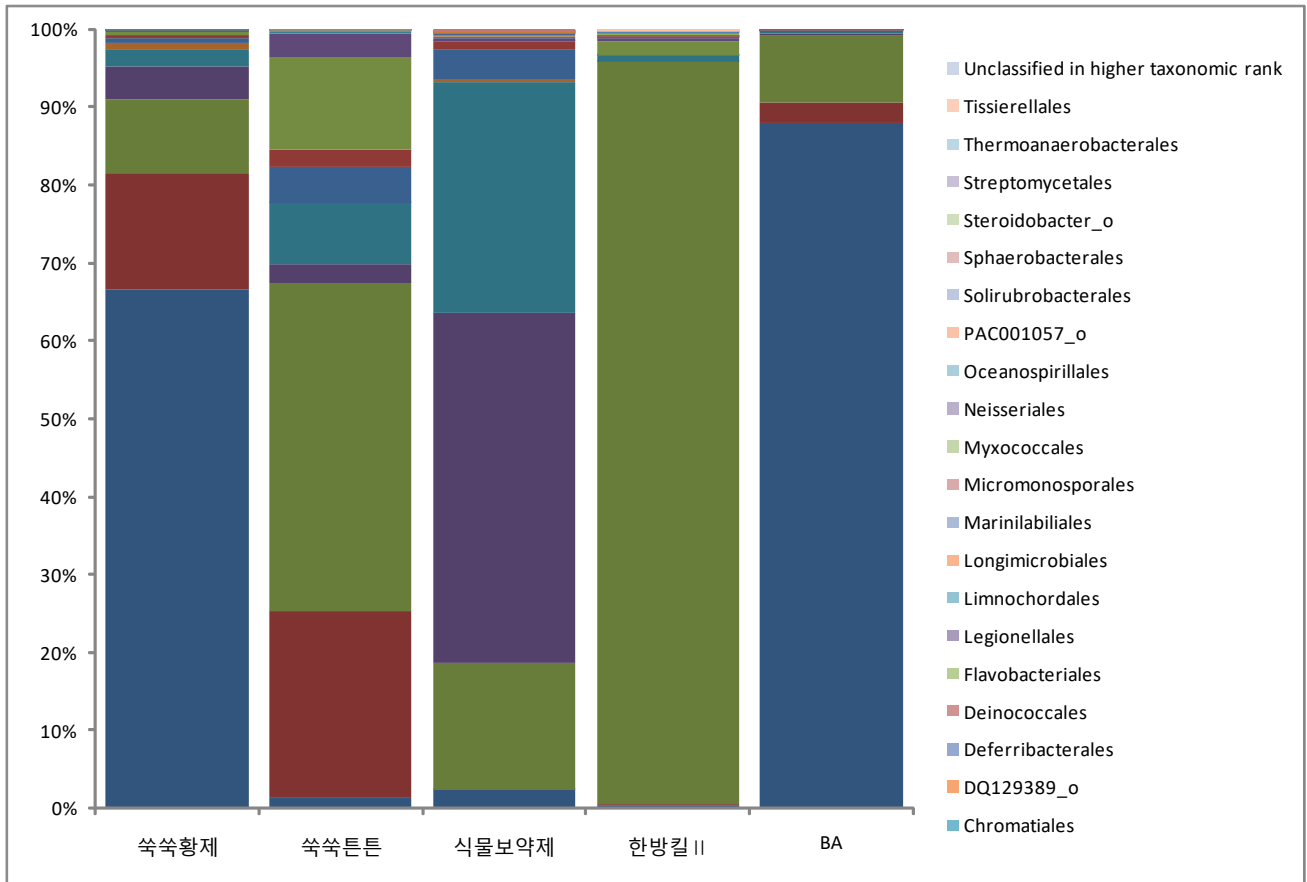
2-2 Class level 분석결과

a. 시료별 비교



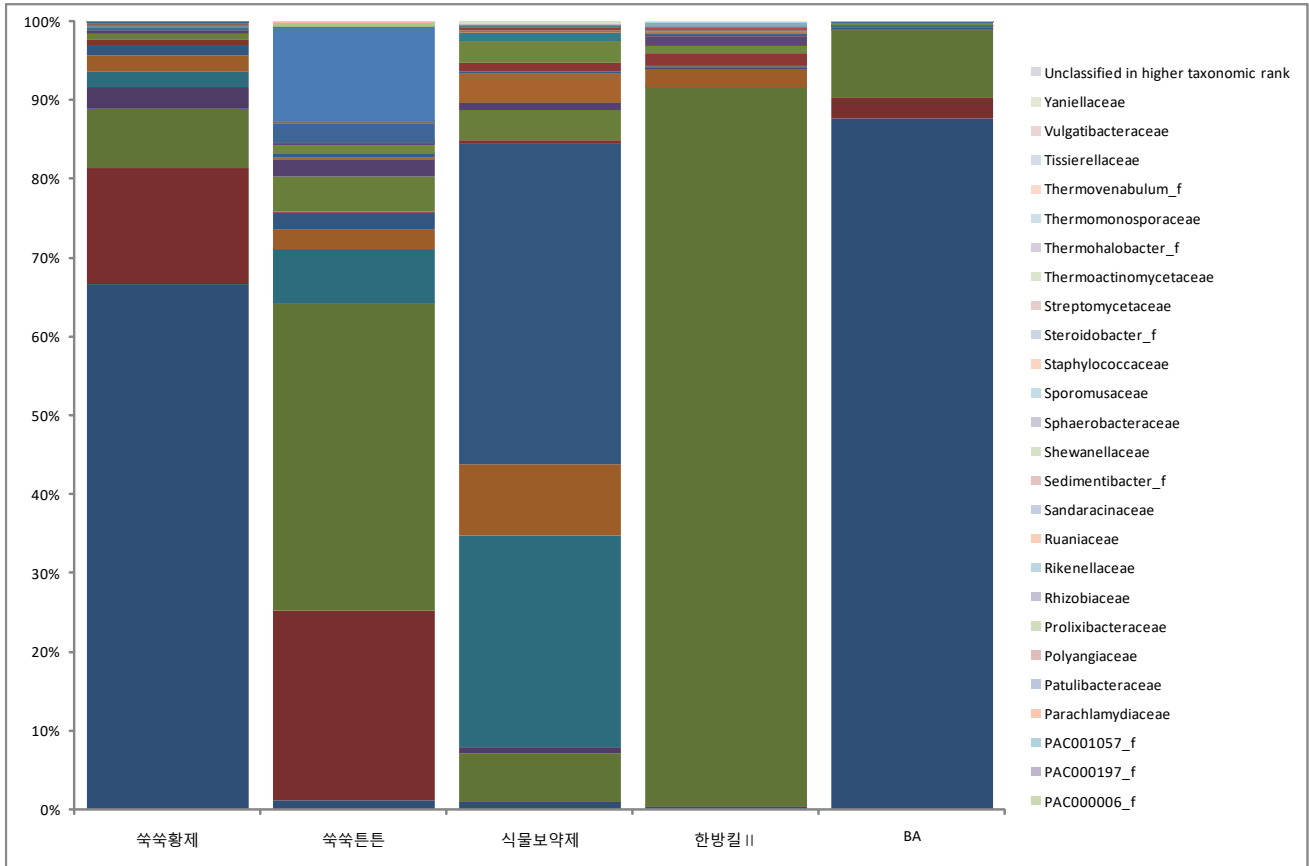
2-3 Order level 분석결과

a. 시료별 비교



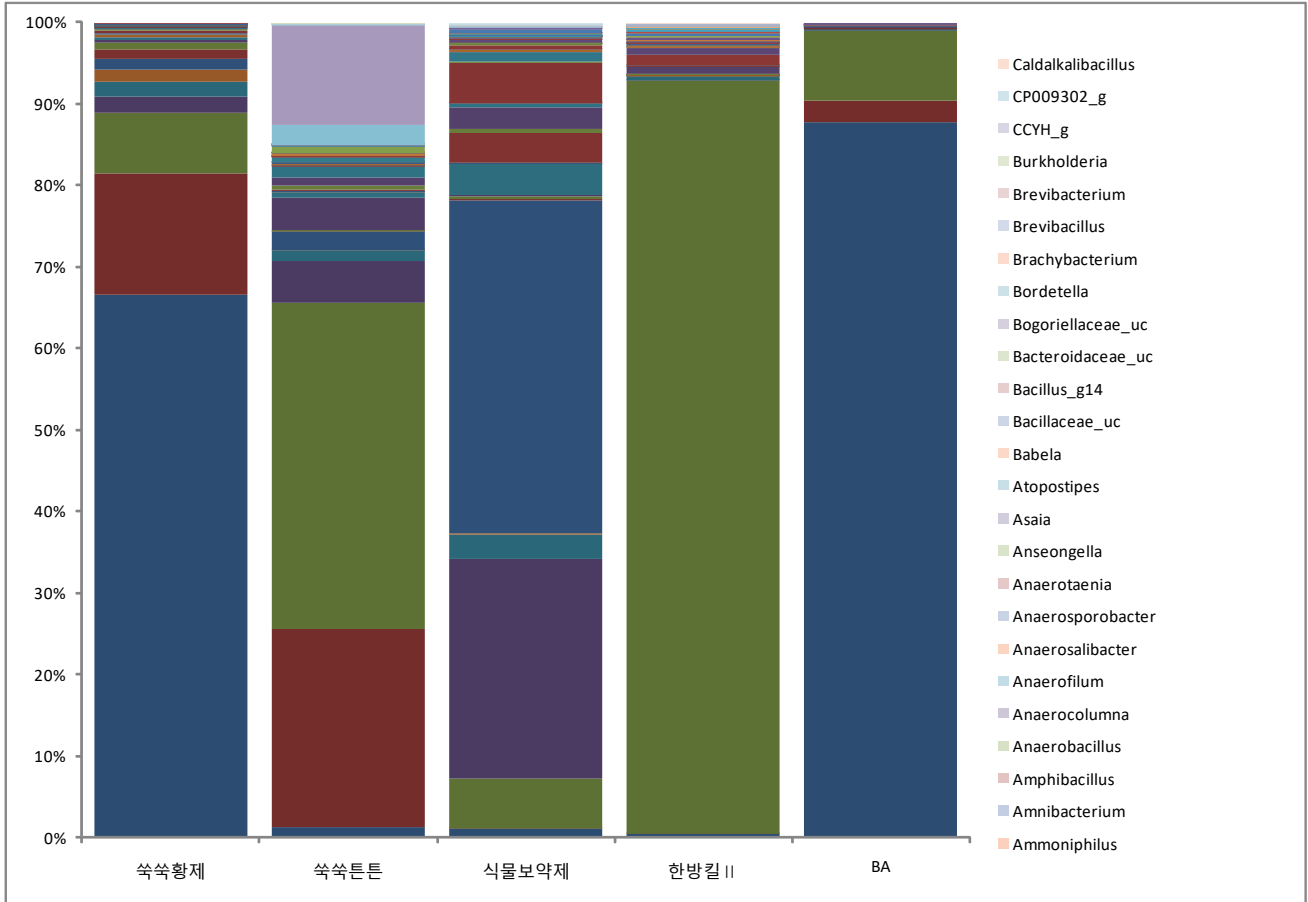
2-4 Family level 분석결과

a. 시료별 비교



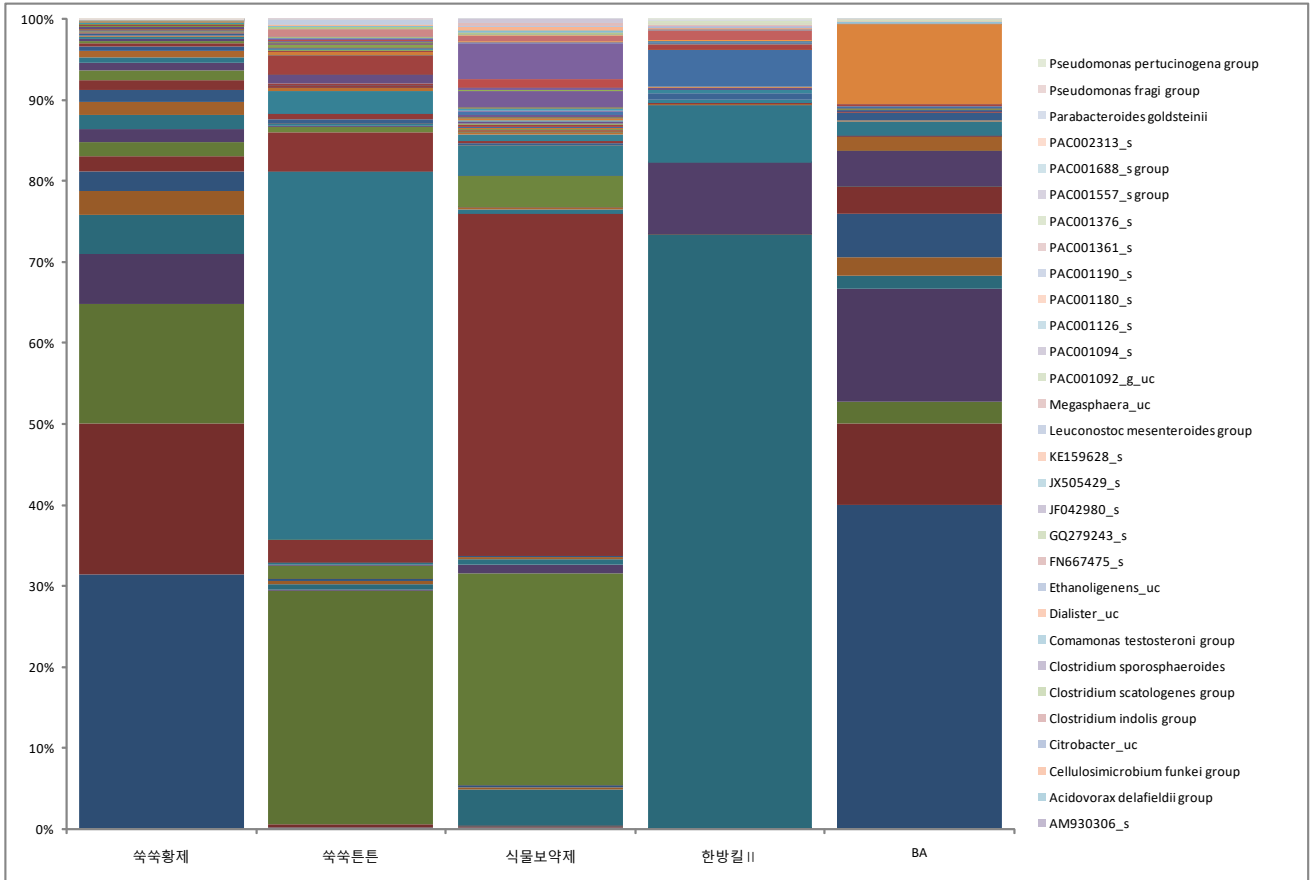
2-5 Genus level 분석결과

a. 시료별 비교



2-6 Species level 분석결과

a. 시료별 비교



## IV. 결론

1. (Phylum) 계열에서 미생물 군집을 살펴보면 식물보약제 시료의 경우 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 문이 우점을 차지하였지만 나머지 4개의 시료에서는 퍼미큐테스(*Firmicutes*) 문이 우점을 차지하였다.
2. 속(Genus) 계열의 결과에서 썩썩항제와 BA 시료에서는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속이 우점을 차지하고 있으며 썩썩튼튼과 한방킬2 시료는 클로스트리듐(*Clostridium*) 속이 식물보약제 시료는 엔테로박테리아(*Enterobacterales*) 속이 우점을 차지하는 것을 확인하였다.

- 끝 -