

检测肠道细菌 *Feacalibacterium prausnitzii* 的三对 PCR 引物的特异性比较

冯洁¹, 华蔚颖¹, 赵立平^{1,2}, 赵宇峰², 申剑^{2*}

¹上海交通大学生命科学技术学院, 教育部微生物代谢重点实验室; ²上海交通大学系统生物医学研究院, 上海 200240

摘要:【目的】比较 3 对基于 16S rRNA 基因、用于检测人肠道中重要细菌 *Feacalibacterium prausnitzii* 的引物 (FPR-1/FPR-2、FPR-2F/Fprau645R 和 Fprau223F/Fprau420R) 的特异性。【方法】用 Clustal X 比对每个引物与 *F. prausnitzii* 和其他细菌的 16S rRNA 基因的序列。在 Ribosomal Database Project (RDP) 数据库中使用 Probe Match 工具比较每个引物匹配的 *Faecalibacterium* spp. 序列数目。利用本课题组建立的中国人粪便菌群的 16S rRNA 基因全长文库的 7255 个克隆序列, 用 Simulated PCR (SPCR) 预测每对引物检测到的 *F. prausnitzii* 和其他细菌的克隆数; 用 3 对引物分别对代表克隆进行 PCR 扩增。用 3 对引物分别对 14 个健康人的粪便样品进行实时定量 PCR。【结果】引物 Fprau645R 的 3'端最后一个碱基与非 *F. prausnitzii* 序列的错配度高于其它引物, 它在 RDP 中匹配的 *Faecalibacterium* spp. 序列数占其匹配的细菌序列数的百分比 (97.6%) 显著高于其他引物。SPCR 预测, 3 对引物检测到的 *F. prausnitzii* 克隆数均为 1171 左右; 在检测到的非 *Faecalibacterium* spp. 克隆中, FPR-2F/Fprau645R 主要是 *Subdoligranulum* spp., 而 FPR-1/FPR-2 和 Fprau223F/Fprau420R 还有 *Oscillibacter* spp.、*Ruminococcus* spp. 和 unclassified Ruminococcaceae 等。真实 PCR 与 SPCR 的结果吻合。实时定量 PCR 中, FPR-1/FPR-2 和 Fprau223F/Fprau420R 检测到的细菌数量高于 FPR-2F/Fprau645R。【结论】3 对引物能检测到 *F. prausnitzii* 和 *Subdoligranulum* spp., FPR-2F/Fprau645R 的特异性优于 FPR-1/FPR-2 和 Fprau223F/Fprau420R。

关键词: *Feacalibacterium prausnitzii*, 引物, 特异性, 肠道菌群

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 06-0819-09

人的肠道中定植有超过 10^{14} 个、上千种不同的细菌^[1]。肠道菌群参与人体的消化、营养吸收、能量供应的代谢过程, 调节宿主的脂肪代谢和免疫系统^[2-3], 影响宿主的生理代谢。肠道菌群的紊乱与结肠癌^[4]、非炎症性肠病^[5]、炎症性肠病^[6]、肥胖^[7]、糖尿病^[8]和儿童自闭症^[9]等疾病的发生发展有密切关系。

Feacalibacterium prausnitzii 是人肠道中数量最占优势的细菌之一, 占细菌总数的 7% 以上, 并在人群中广泛分布^[10]。它是严格厌氧的革兰氏阴性菌, 形态呈杆状, 无鞭毛。*F. prausnitzii* 最初被划分在 *Fusobacterium* 属, 但研究发现其 16S rRNA 基因序列与 *Fusobacterium* 属其他细菌的同源性很低 (序列相似度小于 77%), 所以 Duncan 等人在 2002 年建立了

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30730005)

* 通信作者。Tel: +86-21-34204878; E-mail: shenjian1981@googlemail.com

作者简介: 冯洁 (1985-), 女, 山西人, 硕士研究生, 从事微生物分子生态学研究。E-mail: fengjie_sjtu@gmail.com

收稿日期: 2011-01-21; 修回日期: 2011-03-06

Feacalibacterium 属, 目前 *F. prausnitzii* 是 *Feacalibacterium* 属中唯一的菌种。在肠道微生物分子生态研究中, 研究者根据 *F. prausnitzii* 的 16S rRNA 基因序列, 把它划分在 *Clostridium leptum* 类群^[11], *Subdoligranulum variabile* 是与 *F. prausnitzii* 在 16S rRNA 基因的系统进化地位上很相近的细菌^[12]。

肠道 *F. prausnitzii* 具有重要的生理功能。它是人肠道中最主要的产丁酸盐细菌之一, 而丁酸是肠道上皮细胞主要的能量来源, 所以 *F. prausnitzii* 可以为肠道上皮提供能量^[13-14]。本课题组发现人肠道 *F. prausnitzii* 的数量与宿主尿液中 8 种代谢物的浓度 (二甲胺、乳酸盐和氨基异丁酸盐等) 显著相关, 说明 *F. prausnitzii* 与人体代谢的相互作用十分活跃^[15]。Sokol 等人发现, 肠道 *F. prausnitzii* 数量较高的克罗恩氏病患者在手术后的复发率较低; 在体外细胞实验中, *F. prausnitzii* 及其代谢产物阻断了 Caco-2 细胞和人大外周血单核细胞 (PBMC) 转录因子 NF- κ B 的活化和白细胞介素 IL-8 的产生, 增加 PBMC 对抗炎因子 (IL-10) 的分泌、减少促炎性因子 (IL-12 和 IFN- γ) 的分泌; 而且给结肠炎模型小鼠口服或者腹腔注射 *F. prausnitzii* 活菌或含有其代谢物的培养物上清液, 肠道炎症得到改善; 因此 *F. prausnitzii* 具有抗炎特性, 极有潜力成为治疗肠道炎症的益生菌药物^[6]。

F. prausnitzii 严格厌氧, 现在也没有选择性培养基可用于这种细菌的分离培养, 目前研究者们从人的粪便中只分离出 4 株 *F. prausnitzii*^[11], 所以传统的微生物培养方法不能满足人们对 *F. prausnitzii* 的研究需求。研究者们设计了基于 *F. prausnitzii* 16S rRNA 基因的特异性引物, 利用实时定量 PCR 研究肠道 *F. prausnitzii* 与食物、药物和人体健康的关系, Wang 等人发现 *F. prausnitzii* 是人粪便中数量最占优势的细菌之一^[16], Willing 等发现回肠性克罗恩氏病人肠道中的 *F. prausnitzii* 数量显著减少^[17], Balamurugan 等发现印度肥胖儿童的肠道 *F. prausnitzii* 的数量显著高于正常体重儿童^[18], Ramirez 等发现益生元菊粉 (Inulin) 可以显著提高人肠道中 *F. prausnitzii* 的数量^[19], Bartosch 等发现住院且接受抗生素治疗的老年病人肠道中的 *F. prausnitzii* 数量显著低于健康老年人和住院但不接受抗生素治疗的老年病人^[20]。而 *F. prausnitzii* 特异性引物的选取对于研究结果的精确性是至关重要的。本研究旨在比较文献中使用的 3 对 *F.*

prausnitzii 特异性引物 (FPR-1/FPR-2^[10]、FPR-2F/Fprau645R^[19] 和 Fprau223F/Fprau420R^[20]), 从中选择出特异性最佳的 1 对引物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和粪便样品: 本研究 PCR 扩增中用到的质粒模板均来自本实验室建立的人肠道菌群 *C. leptum* 类群的 16S rRNA 基因克隆文库^[21], 这个文库包括来自 *F. prausnitzii*、*S. variabile*、*Eubacterium desmolans*、以及其他未知细菌的序列, 在 Genbank 中的序列号为 DQ350780 到 DQ350810。

我们采集了 14 个健康人的粪便样品, 其中男性 10 名, 女性 4 名, 他们在采样前的 3 个月内未使用过抗生素, 也没有胃肠道的疾病。

1.1.2 主要试剂、试剂盒和仪器: 用于 PCR 的全套试剂购自中国大连 TaKaRa 公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。质粒提取试剂盒采用美国 OMEGA 公司的 Plasmid Mini Kit I。基因组 DNA 提取试剂盒采用德国 Invitex 公司的 InviMag[®] Stool DNA Kit。荧光定量 PCR 采用杭州博日科技有限公司的 BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit。PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品。实时定量 PCR 仪采用 MJ Research 公司产品, 配套软件为 Opticon Monitor 3。

1.1.3 引物: 用于比较的 3 对引物 (FPR-1/FPR-2、FPR-2F/Fprau645R 和 Fprau223F/Fprau420R) 如表 1 所示。其中, FPR-1 与 Fprau223F 的序列基本相同, 但 Fprau223F 的 3' 端比 FPR-1 多出 TTAG 4 个碱基。FPR-2 和 Fprau420R 序列相同, FPR-2F 为 FPR-2 和 Fprau420R 的反向互补序列。

1.2 序列的比对和系统发育分析

应用 Clustal X 软件, 对每个引物的序列、以及 *F. prausnitzii* 和其他细菌的 16S rRNA 基因的序列进行比对, 找出错配碱基。

为确定感兴趣的细菌的 16S rRNA 基因序列的系统发育地位, 使用 SIMO 网站 (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/taxonomy.htm) 的在线序列分析工具 (Online Sequence Analysis Service) 将这些序列与 Ribosomal Database Project (RDP) 数据库中的序列进行比对 (blast), 寻找其最近邻居及序列相似性。

表 1 三对 *F. prausnitzii* 特异性引物信息Table 1 The information of the three *F. prausnitzii*-specific primer pairs

Primer pairs (Forward/Reverse)	Sequences (5'→3')	Product size/bp	References
FPR-1/FPR-2	AGATGGCCTCGCGTCCGA/CCGAAGACCTTCTTCTCCTCC	199	[10] [16]
FPR-2F/Fprau645R	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG/AATTCCGCCTACCTCTGCACT	248	[19]
Fprau223F/Fprau420R	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG/CCGAAGACCTTCTTCTCCTCC	198	[20]

1.3 RDP 的 Probe Match 分析

使用 RDP (Release10) 的 Probe Match 工具, 将 6 个引物分别与 RDP 数据库中的 16S rRNA 基因进行比对, 得到每个引物能够匹配的细菌序列总数目和 *Feecalibacterium* spp. 序列数目。

1.4 SPCR 分析

利用 SPCR 程序^[22]、和本课题组建立的 7 个健康中国人的粪便菌群 16S rRNA 基因全长序列的克隆文库(包含 7255 条序列, Genbank 中的序列号为 EF398274-EF405528 和 EF395822-EF395843)^[15], 模拟预测每对引物在人粪便菌群中检测到的 *F. prausnitzii* 克隆和其他细菌克隆的数目。将每对引物的序列和克隆序列导入 SPCR, 将 SPCR 产物扩增系数 (product amplification coefficient) 设置为 0.90 (原文献推荐将此参数设置为 0.80, 提高此参数的设置相当于模拟提高真实 PCR 的严谨性^[22]), SPCR 程序根据序列和设置参数导出每对引物可以匹配的克隆。

1.5 PCR 扩增

25 μ L 的 PCR 反应体系包含: 15.9 μ L ddH₂O、2.5 μ L 10 \times Buffer (Mg²⁺ free)、2 μ L MgCl₂ 溶液 (25 mM)、2.5 μ L deoxynucleoside triphosphates (2.5 mmol/L)、上下游引物溶液 (12.5 pmol/ μ L) 各 0.5 μ L、0.5 U Taq DNA 聚合酶、1 ng 质粒 DNA 模板。

3 对引物的 PCR 扩增程序参照源文献的程序。以 FPR-1/FPR-2 为引物的 PCR 扩增程序为^[10]: 94 $^{\circ}$ C 15 s; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 74 $^{\circ}$ C 35 s, 35 个循环 (变性和退火的时间比源程序略长); 72 $^{\circ}$ C 2 min; 45 $^{\circ}$ C 2 s。以 FPR-2F/Fprau645R 为引物的 PCR 扩增程序为^[19]: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。以 Fprau223F/Fprau420R 为引物的 PCR 扩增程序为^[20]: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

使用 1.2% (wt/vol) 的琼脂糖凝胶 (含有 0.5 mg/ml 的溴化乙锭) 电泳检测 PCR 产物的片段

大小。

1.6 粪便总 DNA 提取

使用试剂盒 InviMag[®] Stool DNA Kit 提取 14 个健康人的粪便的总 DNA, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.7 实时定量 PCR 扩增

利用 BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit 进行实时定量 PCR。25 μ L 的反应体系如下: 6.35 μ L ddH₂O、12.5 μ L 2 \times Sybmix (来自试剂盒)、上下游引物 (12.5 pmol/ μ L) 各 1 μ L、0.75 U Taq DNA 聚合酶、40 ng 粪便总 DNA 模板。以 FPR-1/FPR-2 为引物的实时定量 PCR 扩增程序在源文献的 PCR 程序^[10]的基础上做适当修改 (变性和退火的时间比源程序略长): 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 74 $^{\circ}$ C 35 s, 86 $^{\circ}$ C 读板 10 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min; 45 $^{\circ}$ C 2 s; 熔解曲线测定 60 - 95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 读板 10 s。以 FPR-2F/Fprau645R 为引物的实时定量 PCR 扩增程序为^[19]: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 83 $^{\circ}$ C 读板 10 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 熔解曲线测定 60 - 95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 读板 10 s。以 Fprau223F/Fprau420R 为引物的实时定量 PCR 扩增程序在源文献程序^[20]的基础上增加了延伸时间: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 86 $^{\circ}$ C 读板 10 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 熔解曲线测定 60 - 95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 读板 10 s。每个样品重复测定 2 次。用每纳克粪便基因组 DNA 中检测到的 16S rRNA 基因的拷贝数 (copies/ng DNA) 表示细菌的数量。

本课题组建立了人肠道菌群 *C. leptum* 类群的 16S rRNA 基因克隆文库^[21], 从中选取克隆 Clept20 (其最近邻居是 *F. prausnitzii* L2-6, 序列相似度 99.2%), 提取质粒, 用 DNA 浓度仪 DyNA quant[™] 200 (Hoefer, San Francisco, USA) 测定浓度。然后用双蒸水梯度稀释, 稀释后的浓度从 1 \times 10² 到 1 \times 10⁹ copies/ μ L。从不同浓度的质粒稀释液中取 2 μ L 的作为实时定量 PCR 的模板, 做标准曲线。

用配对 t 检验 (Paired t test) 比较 3 对引物在相

同样品中检测到细菌数目。 $P \leq 0.05$ 作为有统计学显著差异的标准。统计分析用软件 SPSS 13.0 完成。

2 结果

2.1 引物序列与 *F. prausnitzii* 和其他细菌的 16S rRNA 基因的比对

6 个引物的序列与 *F. prausnitzii* 和其他细菌的 16S rRNA 基因比对结果如表 2 所示。由于 FPR-2 (3'-5')、Fprau420R (3'-5') 和 FPR-2F (5'-3') 的目标序列完全相同,所以 Fprau420R (3'-5') 和 FPR-2F (5'-3') 的比对结果详见表 2 中 FPR-2 (3'-5') 这一列。

每个引物与来自于 *F. prausnitzii* 的对应序列是完全匹配的。

Fprau645R、FPR-2、FPR-2F 和 Fprau420R 与 *S. variable* 序列不匹配的碱基数目为 1; FPR-1 和 Fprau223F 与 *S. variable* 的不匹配碱基数目大于或等于 2。Fprau645R 与既非 *F. prausnitzii* 也非 *S. variable* 的细菌的不匹配碱基数目大于或等于 4; 其余引物与既非 *F. prausnitzii* 也非 *S. variable* 的细菌的不匹配碱基数目一般大于或等于 2。

在引物的 3' 端最后一个碱基位点上, Fprau645R 与 *F. prausnitzii* 和 *S. variable* 匹配, 但与大多数其他细菌不匹配; 而其余 5 个引物与 *F. prausnitzii*、*S. variable* 和其他细菌基本都匹配。

表 2 *F. prausnitzii* 特异性引物与 *F. prausnitzii* 和其他细菌的 16S rRNA 基因的序列比对[§]

Table 2 The alignment of sequences of the *F. prausnitzii*-specific primers and the 16S rRNA gene of bacteria[§]

Species	Strains & Clones	FPR-1 (5' — 3')	FPR-2 (3' — 5') ^a	Fprau645R (3' — 5')	Fprau223F (5' — 3')
	Target sequence*	AGATGGCCTCGCTCCGA	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG	AGTGCAGAGGTAGCGGAATT	GATGGCCTCGCTCCGATTAG
<i>F. prausnitzii</i>	<i>F. prausnitzii</i> A2-165
	<i>F. prausnitzii</i> ATCC 27768
	Clone Clept99; AJ413954
	Clone Clept20; AJ413954
	Clone Clept1; AJ413954
<i>S. variable</i>	<i>S. variable</i> DSM 15176	G.....A.....A**T.....*T.....*G.....*A.....
	Clone Clept18; AJ518869	G.....A.....A**T.....*T.....*G.....*A.....
Non-F.prau & Non-S. var [‡]	Clone Clept6; L76596*G.....*T..	*AG.....*T.....	GAA *T.....*C.....*G.....*T.....
	Clone Clept93; Z49863*T..	*A.....*C.....	*TC *G.....*C *A.....*T.....
	Clone Clept35; L34618*AG.....*T..	CATT.....*C.....	GA.....*G.....*C.....*AG.....*T.....
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ATCC 19208*G.....*T..*T.....	GAA *T.....*A.....*G.....*T.....
	<i>Papillibacter cinnamivorans</i> DSM12816*AG.....*T..	*A.....*C.....	*TC *G.....*AT.....*AG.....*T.....
	<i>Oscillibacter valericigenes</i> Sjm18-20*T..	*A.....*CT.....	GAA *T.....*A.....*T.....
	<i>Ruminococcus albus</i> ATCC 27211*AG.....*T..	*AG.....*T.....*A..	GAA *T.....*A.....*AG.....*T.....
	<i>Sporobacter termitidis</i> SYR Z49863	G.....*AG.....*T..	*A.....*C.....	*TC *G.....*C.....*AG.....*T.....
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ATCC 27651	G.....*A *C.....*G *GT..	*AGT.....*GT.....	GCA *A *A.....*ATA *T.....*A *C.....*G *GT.....
	<i>Bifidobacterium longum</i> bv. <i>Infantis</i> Y1	G.....*GG.....*T..	*CG.....*G.....*C.....	GCG *T.....*G *A *GACT.....*GG.....*T.....*C..

[§], The 16S rRNA gene sequences of clones come from a *C. leptum* group-specific clone library constructed in our laboratory from the fecal sample of a healthy Chinese person, and their phylogeny was determined based on the sequences^[21]; the Genbank accession numbers of the clone sequences are provided. ·, one base of the primer which matches the corresponding base in the 16S rRNA gene of bacteria. *, Target sequence means the positive strand sequence of 16S rRNA gene targeted by the primers. ‡, Non-F.prau & Non-S. var represents the clones and bacteria that do not belong to *F. prausnitzii* or *S. variable*. ^a, Here only showed the alignment result of FPR-2, because the target sequences of FPR-2 (3'-5'), Fprau420R (3'-5') and FPR-2F (5'-3') are the same.

2.2 引物的 RDP Probe Match 分析

引物的 Probe Match 分析结果见图 1。我们比较了 6 个引物在 RDP 数据库中匹配的 *Faecalibacterium* spp. 序列数目, 发现 FPR-2, FPR-2F, Fprau420R 最多 (8966), FPR-1 (8634) 和 Fprau223F (8607) 居中, Fprau645R 最低 (8074)。同时比较了不同引物匹配的 *Faecalibacterium* spp. 序列数目占其匹配的细菌序列总数的百分比, Fprau645R 的百分比最高, 为 97.6%; 其次为 FPR-1, 为 95.4%, FPR-2, FPR-2F 和 Fprau420R 为 92.9%; Fprau223F 百分比最低, 为 92.8%。

2.3 引物的 SPCR 分析

本课题组建立了 7 个健康中国人的粪便菌群的 16S rRNA 基因的全长文库, 包含 7255 个克隆^[15]。序列的系统发育分析表明, 1177 个克隆序列与 *F. prausnitzii* 的 16S rRNA 基因全长序列的相似性大于 97%, 被归于 *F. prausnitzii*。利用文库的序列和 Simulated PCR (SPCR) 程序, 我们预测了每对引物可以检测到的人粪便中 *F. prausnitzii* 和其他细菌的克隆数 (表 3)。

表 3 SPCR 预测每对引物在人粪便菌群 16S rRNA 基因克隆文库中检测到的细菌种类及数目

Table 3 The taxonomy and number of the clones detected by individual *F. prausnitzii*-specific primer pairs in the human fecal 16S rRNA gene clone library according to the prediction by SPCR

Taxonomy of the clones detected by the primer pairs in SPCR*	Percent of detected specific bacteria taxon accounting to all detected clones by each primer pair (The Number of detected clones belonging to specific bacteria taxon)		
	FPR-1/FPR-2	FPR-2F/Fprau645R	Fprau223F/Fprau420R
<i>F. prausnitzii</i>	61.8% (1171)	82.5% (1171)	61.4% (1172)
<i>Faecalibacterium</i> spp.	62.0% (1175)	82.7% (1174)	61.6% (1176)
<i>Subdoligranulum</i> spp.	10.0% (189)	13.5% (192)	10.1% (192)
<i>Anaerotruncus</i> spp.	0.5% (9)	N/A	0.5% (9)
<i>Bacillus</i> spp.	0.05% (1)	N/A	0.05% (1)
<i>Butyrivibrio</i> spp.	0.05% (1)	N/A	0.05% (1)
<i>Eubacterium</i> spp.	2.1% (40)	0.07% (1)	2.1% (40)
<i>Oscillibacter</i> spp.	9.0% (172)	0.2% (3)	9.0% (172)
<i>Paenibacillus</i> spp.	1.2% (23)	N/A	1.2% (24)
<i>Ruminococcus</i> spp.	6.5% (123)	N/A	6.5% (123)
unclassified Ruminococcaceae	4.9% (92)	0.2% (3)	4.9% (93)
unclassified Clostridiales	3.6% (69)	0.1% (2)	3.6% (69)
<i>Fusobacterium</i> spp.	N/A	0.3% (4)	N/A
unclassified Lachnospiraceae	N/A	2.9% (41)	N/A
<i>Akkermansia</i> spp.	N/A	N/A	0.4% (8)
<i>Acetivibrio</i> spp.	N/A	N/A	0.05% (1)
No. of all detected clones	1894	1420	1909

* , SPCR products amplification coefficient was set at 0.90. "N/A" means no clone sequence belonging to the corresponding taxon was detected by the primer pair according to the SPCR prediction.

FPR-1/FPR-2、FPR-2F/Fprau645R 和 Fprau223F/Fprau420R 分别检测到 1171、1171 和 1172 个属于 *F.*

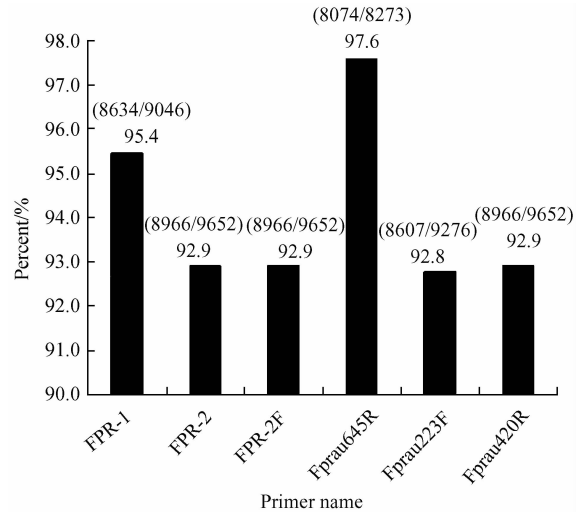


图 1 六个引物在 RDP 数据库中匹配的 *Faecalibacterium* 序列数占其匹配的细菌序列数的百分比

Fig. 1 The percentage of the number of *Faecalibacterium* spp. sequences matched by individual primers accounting for that of matched bacteria sequences in the RDP database. In the bracket on the top of each column, the numerator and the denominator represents the number of matched *Faecalibacterium* sequences and bacteria sequences, respectively, in the RDP database.

prausnitzii 的克隆, 数目非常接近; 但这 3 对引物检测到的克隆总数分别为 1894、1420 和 1909; 所以 FPR-

2F/Fprau645R 在人粪便菌群中检测到的 *F. prausnitzii* 克隆数占其检测到的克隆总数的百分比最高,为 82.5%,高于 FPR-1/FPR-2 (61.8%) 和 Fprau223F/Fprau420R (61.4%)。

FPR-1/FPR-2、FPR-2F/Fprau645R 和 Fprau223F/Fprau420R 分别检测到 10、7、12 个非 *Faecalibacterium* 类群。汇总占检测出的克隆总数的百分比大于 1% 的非 *Faecalibacterium* 类群,我们发现, FPR-1/FPR-2 和 Fprau223F/Fprau420R 的结果类似,它们检测到的非 *Faecalibacterium* 的克隆主要有: *Subdoligranulum* spp. (10%)、*Oscillibacter* spp. (9%)、*Ruminococcus* spp. (7%)、unclassified Ruminococcaceae (5%)、unclassified Clostridiales (4%)、*Eubacterium* spp. (2%) 和 *Paenibacillus* spp. (1%); 而 FPR-2F/Fprau645R 只有 *Subdoligranulum* spp. (14%) 和 unclassified Lachnospiraceae (3%)。

2.4 真实 PCR 验证

本实验室建立了人肠道中的优势细菌类群——*C. leptum* 类群的 16S rRNA 基因克隆文库, *F. prausnitzii* 是这个类群的主要成员之一^[21]; 我们从这个文库中选择了来自 *F. prausnitzii*、*S. variable* 和其他细菌的代表质粒,并以这些质粒为模板,分别用 3 对引物进行 PCR 扩增(图 2)。

来自 *F. prausnitzii* (质粒编号 24, 25, 26, 34 和 87) 和 *S. variable* 的克隆(质粒编号 4 和 18)的 3 对引物的扩增产物均为阳性。而 Fprau223F/Fprau420R 还将 *Oscillibacter* spp. (质粒编号 28 和 48)、unclassified Ruminococcaceae (质粒编号 58 和 93, 其中质粒编号 58 的序列与它的最近邻居 *Ruminococcus* sp. EU815223 有 93.0% 的相似性; 质粒编号 93 的序列与最近邻居 Lachnospiraceae bacterium AF550610 有 91.6% 的相似性) 和 *Butyricoccus* sp. (质粒编号 35) 的基因片段扩增出来。FPR-1/FPR-2 的结果与 Fprau223F/Fprau420R 类似,只是没有将 *Butyricoccus* sp. (质粒编号 35) 的基因片段扩增出来。FPR-2F/Fprau645R 只将 *Oscillibacter* sp. (质粒编号 48) 的基因片段扩增出来。

2.5 实时定量 PCR

以 14 个健康人的粪便样品的基因组 DNA 为模板,分别用 3 对引物进行实时定量 PCR,并比较 3 对引物检测到的细菌数量。

配对 t 检验显示, FPR-1/FPR-2 检测到的细菌数量高于 FPR-2F/Fprau645R ($P = 0.056$); Fprau223F/Fprau420R 的检测结果显著高于 FPR-2F/Fprau645R ($P = 0.010$)。

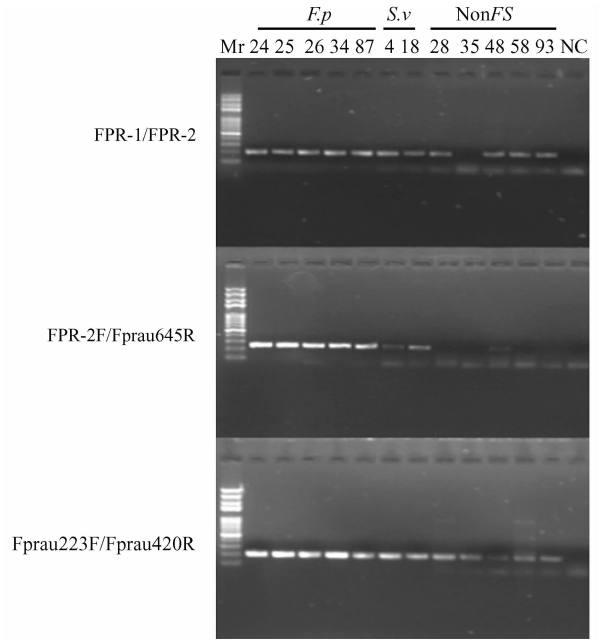


图 2 三对引物对不同细菌 16S rRNA 基因克隆片段的 PCR 扩增的产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of the amplicons amplified with the three primer pairs and the cloned 16S rRNA gene of different bacteria. The number above each lane is the ID number of the clone from the *C. leptum* subgroup-specific clone library from a healthy Chinese person^[21]. The clone 24, 25, 26, 34 and 87 are from *F. prausnitzii*; the clone 4 and 18 are from *S. variable*; the clone 28 and 48 are from *Oscillibacter* spp.; the clone 35 is from *Butyricoccus* sp.; the clone 58 and 93 are from unclassified Ruminococcaceae. Mr, DNA marker; NC, negative control; *F. p.*, *F. prausnitzii*; *S. v.*, *S. variable*; NonFS, neither *F. prausnitzii* nor *S. variable*.

FPR-1/FPR-2 在每纳克粪便总 DNA 中检测到的 16S rRNA 基因的拷贝数平均是 FPR-2F/Fprau645R 的 2.0 倍(范围 1.1 - 4.6 倍); Fprau223F/Fprau420R 在每纳克粪便总 DNA 中检测到的 16S rRNA 基因的拷贝数平均是 FPR-2F/Fprau645R 的 3.2 倍(范围 1.2 - 10.8 倍)。

3 讨论

用实时定量 PCR 研究肠道 *F. prausnitzii* 与人体健康和疾病的关系时,选择特异性好的引物是数据准确的保证。我们在相关文献中发现, FPR-1/FPR-2、FPR-2F/Fprau645R 和 Fprau223F/Fprau420R 这 3 对引物被广泛用于人肠道 *F. prausnitzii* 的定量分析^[10, 16, 19-20],但目前还没有研究比较这 3 对引物的特异性。

在本研究中,我们使用了序列比对、RDP 数据库的 Probe Match、SPCR 预测和真实 PCR 验证的方

法对比了3对引物的特异性,多种方法的结果可以相互补充、相互印证,为其他引物的特异性评估提供了方法学参考。将不同细菌的基因序列与引物序列进行比对是评估引物特异性的常用方法^[10, 23-24],但用于序列比对的细菌种类往往有限(最多十几个),并不能代表复杂环境样品中细菌组成的多样性和复杂性。RDP数据库包含了大量的、来源广泛的不同细菌的16S rRNA基因的序列信息,用RDP的Probe Match工具^[25]可以快速查看引物匹配的序列数目,比较全面的评估引物的特异性;但Probe Match只给出属水平以上的序列数目,不能评估引物对菌种的匹配情况,而且Probe Match是针对单个引物进行分析,不能对上下游引物进行整体分析。SPCR程序^[22]是评估每个模板和上下游引物在结合位点的匹配度,得出相应的评估值,评估值越高,说明匹配度越好,从而量化PCR的预测结果。SPCR的优势在于,它直接评估每对引物(而不是单个引物)的特异性,而且它允许用户自由导入模板序列数据库,比如我们使用了人粪便菌群的16S rRNA基因全长文库的7255个克隆序列^[15]来评估每对*F. prausnitzii*特异性引物的特异性,比RDP的Probe Match分析更加接近真实PCR的情况。同时,我们还以*F. prausnitzii*和其他细菌的16S rRNA基因克隆为模板,分别用3对引物进行PCR扩增,验证生物信息学的分析结果。

SPCR的预测结果显示,在中国人粪便菌群16S rRNA基因全长文库的7255个克隆序列中,3对引物均特异性选择出1171左右个来自*F. prausnitzii*的克隆;真实PCR中,3对引物都可以把来自*F. prausnitzii*不同菌株的16S rRNA基因片段扩增出来;说明这3对引物针对不同*F. prausnitzii*菌株的检测没有明显的偏好性。

但引物对FPR-2F/Fprau645R的特异性优于FPR-1/FPR-2和Fprau223F/Fprau420R。这是因为引物Fprau645R的特异性高于FPR-1、FPR-2、FPR-2F、Fprau223F和Fprau420R。首先,引物的3'端最后一个碱基与模板是否匹配是决定引物特异性的最关键的因素之一^[26];Fprau645R的3'端最后一个碱基与*F. prausnitzii*和*S. variabile*的16S rRNA基因的对应碱基匹配,而与大多数其它细菌都不匹配;相比之下,FPR-1、FPR-2、FPR-2F、Fprau223F和Fprau420R的3'端最后一个碱基与非*F. prausnitzii*细菌大都相匹配。第二,用RDP Probe Match比较不同引物在RDP数据库中匹配的*Faecalibacterium* spp. 序列数目占其匹配的细菌序列总数的百分比,发现Fprau645R的百分比最高,为97.6%;其次为

FPR-1,为95.4%;FPR-2、FPR-2F、Fprau420R和Fprau223F为92.9%左右。第三,SPCR预测和真实PCR的结果显示,在检测到的非*Faecalibacterium* spp. 克隆中,FPR-2F/Fprau645R主要是*Subdoligranulum* spp. 和 unclassified Lachnospiraceae。而FPR-1/FPR-2和Fprau223F/Fprau420R还有*Oscillibacter* spp.、*Ruminococcus* spp.、unclassified Ruminococcaceae、*Eubacterium* spp. 和 *Paenibacillus* spp. 等。值得注意的一点是,这3对引物都可以将*S. variabile*的16S rRNA基因片段扩增出来,*S. variabile*在系统进化分类地位上与*F. prausnitzii*非常接近^[12],因此需要设法减少*S. variabile*对*F. prausnitzii*定量分析的干扰。第四,分别用3对引物对14个粪便样品进行实时定量PCR,发现FPR-2F/Fprau645R检测到的细菌数量低于FPR-1/FPR-2和Fprau223F/Fprau420R,这与SPCR预测结果(FPR-2F/Fprau645R检测到的克隆总数目低于FPR-1/FPR-2和Fprau223F/Fprau420R)一致,而且,SPCR的结果显示3对引物针对不同*F. prausnitzii*菌株的检测没有明显的偏好性,所以实时定量PCR的结果也说明FPR-2F/Fprau645R特异性较好。

综上所述,3对来源于文献的*F. prausnitzii*特异性引物(FPR-1/FPR-2、FPR-2F/Fprau645R和Fprau223F/Fprau420R)中,FPR-2F/Fprau645R的特异性优于FPR-1/FPR-2和Fprau223F/Fprau420R。但3对引物都可以将*S. variabile*的16S rRNA基因片段扩增出来,因此有必要进一步优化这3对引物的PCR程序、或者设计特异性更强的PCR引物,尽可能地减少非特异的扩增,使得菌种的鉴定和定量的结果更加精确。

参考文献

- [1] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431-438.
- [2] Kelly D, Conway S, Aminov R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunology*, 2005, 26(6): 326-333.
- [3] Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JL. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [4] Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, 61(9): 3202-3207.

- [5] Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 2003, 52(2): 237-242.
- [6] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(43): 16731-16736.
- [7] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [8] Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 2008, 455(7216): 1109-1113.
- [9] Parracho HMRT, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54(10): 987-991.
- [10] Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 341-343.
- [11] Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 6): 2141-2146.
- [12] Holmstrom K, Collins MD, Moller T, Falsen E, Lawson PA. *Subdoligranulum variable* gen. nov., sp. nov. from human feces. *Anaerobe*, 2004, 10(3): 197-203.
- [13] Hague A, Singh B, Paraskeva C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: Further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology*, 1997, 112(3): 1036-1040.
- [14] Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1654-1661.
- [15] Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2117-2122.
- [16] Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1242-1247.
- [17] Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Jarnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin Studies Reveal Specific Imbalances in the Mucosa-associated Microbiota of Patients with Ileal Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009, 15(5): 653-660.
- [18] Balamurugan R, George G, Kabeerdoss J, Hepsiba J, Chandraganasekaran AM, Ramakrishna BS. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *British Journal of Nutrition*, 2010, 103(3): 335-338.
- [19] Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 2009, 101(4): 541-550.
- [20] Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3575-3581.
- [21] Shen J, Zhang B, Wei G, Pang X, Wei H, Li M, Zhang Y, Jia W, Zhao L. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5232-5238.
- [22] Cao YF, Wang LJ, Xu KX, Kou CH, Zhang YL, Wei GF, He JJ, Wang YF, Zhao LP. Information theory-based algorithm for in silico prediction of PCR products with whole genomic sequences as templates. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 190-194.
- [23] Suau A, Rochet V, Sghir A, Gramet G, Brewaeys S, Sutren M, Rigottier-Gois L, Dore J. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(1): 139-145.
- [24] Bourne DG, McDonald IR, Murrell JC. Comparison of

pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 3802-3809.

- [25] Mao Y, Zhang X, Yan X, Liu B, Zhao L. Development of group-specific PCR-DGGE fingerprinting for monitoring structural changes of *Thauera* spp. in an industrial wastewater treatment plant responding to

operational perturbations. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(2): 231-236.

- [26] Sipos R, Szekeley AJ, Palatinszky M, Revesz S, Marialigeti K, Nikolausz M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(2): 341-350.

Specificity comparison of three *Faecalibacterium prausnitzii*-specific PCR primer pairs

Jie Feng¹, Weiying Hua¹, Liping Zhao^{1,2}, Yufeng Zhao², Jian Shen^{2*}

Key Laboratory of Microbial Metabolism, Ministry of Education, ¹College of Life Science and Biotechnology, ²College of Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [**Objective**] To compare the specificity of three 16S rRNA gene-based PCR primer pairs (FPR-1/FPR-2, FPR-2F/Fprau645R and Fprau223F/Fprau420R), which are used to specifically detect and quantify the important human gut bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. [**Methods**] Clustal X was used to align the sequences of individual primer and the 16S rRNA gene of *F. prausnitzii* and other bacteria. The number of *Faecalibacterium* spp. sequences in Ribosomal Database Project (RDP) matched by each primer was obtained by the Probe Match tool. With the full-length 16S rRNA gene clone library constructed by our laboratory which contained 7255 clones from the gut microbiota of 7 Chinese people, the Simulated PCR (SPCR) program was applied to predict the clone number of *F. prausnitzii* and other gut bacteria matched by every primer pair; PCR amplification was performed with three primer pairs and representative clones to verify the SPCR prediction. Real-time quantitative PCR was performed with three primer pairs, respectively, for fecal samples from 14 healthy individuals. [**Results**] The first base at the 3' end of Fprau645R showed the highest mismatch level for non-*F. prausnitzii* bacteria. The percentage of the number of *Faecalibacterium* spp. sequences matched by Fprau645R accounting for that of matched bacteria sequences in the RDP database was 97.6% , which was significantly higher than that of other primers. As SPCR predicted, all three primer pairs can detect about 1171 clones from *F. prausnitzii*; the clones of non-*Faecalibacterium* spp. detected by FPR-2F/Fprau645R mainly were *Subdoligranulum* spp. , but the non-*Faecalibacterium* spp. clones detected by FPR-1/FPR-2 and Fprau223F/Fprau420R were mainly *Subdoligranulum* spp. , *Oscillibacter* spp. , *Ruminococcus* spp. and unclassified Ruminococcaceae etc. The real PCR showed the same results with SPCR. The real-time quantitative PCR showed FPR-1/FPR-2 and Fprau223F/Fprau420R detected more bacteria than FPR-2F/Fprau645R. [**Conclusion**] The three primer pairs can detect *F. prausnitzii* and *Subdoligranulum* spp. , however, the specificity of FPR-2F/Fprau645R is better than FPR-1/FPR-2 and Fprau223F/Fprau420R.

Keywords: *Faecalibacterium prausnitzii*, primer, specificity, gut microbiota

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of the National Natural Science Foundation of China (30730005).

* Corresponding author. Tel: +86-21-34204878; E-mail: shenjian1981@googlemail.com

Received: 21 January 2011/Revised: 6 March 2011