

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(8):1033-1039; 4 August 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

江苏无锡健康与肠病人群肠道脱硫弧菌数量及肠道菌群多样性

丁俊荣[#], 张秋香[#], 刘小鸣, 王刚, 田丰伟, 张灏, 陈卫^{*}

江南大学食品学院, 食品生物技术中心, 无锡 214122

摘要: 【目的】研究息肉、溃疡性结肠炎、直肠结肠癌和健康人群肠道中脱硫弧菌数量的差异, 及不同人群肠道菌群的多样性, 分析脱硫弧菌数量及肠道菌群多样性与肠道疾病之间的潜在关系。【方法】采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 的方法, 对 58 名受试者肠道脱硫弧菌的数量进行定量分析。采用 PCR-DGGE 技术, 对不同人群的肠道脱硫弧菌和肠道菌群结构进行分析, 结合 16S rRNA V3 区测序分析不同人群肠道菌群多样性的差异。【结果】RT-PCR 分析显示, 所有受试者均为脱硫弧菌阳性, 其中息肉 (2.9×10^6 cfu/mL) 和溃疡性结肠炎人群 (1.2×10^6 cfu/mL) 肠道中脱硫弧菌的数量明显高于健康人群 (7.0×10^5 cfu/mL), 直肠结肠癌人群 (6.8×10^5 cfu/mL) 肠道中脱硫弧菌的数量与健康人群无明显差异。DGGE 图谱聚类分析结果表明, 肠道疾病人群肠道中脱硫弧菌的菌群相似度较高, 而与健康人群之间的差异较大。16S rRNA V3 区基因测序显示肠道疾病人群与健康人群在肠道菌群多样性和优势菌群方面均有明显差异。【结论】通过 RT-PCR 与 DGGE 相结合的方法, 说明肠道脱硫弧菌数量的增多是息肉和溃疡性结肠炎疾病的一个重要特征, 且其菌群组成在肠道疾病人群与健康人群之间存在明显差异。与健康人群相比, 肠道疾病人群的肠道微生物多样性升高, 优势菌群发生偏移, 菌群失衡。

关键词: 荧光定量 PCR, DGGE, 脱硫弧菌, 肠道疾病, 16S rRNA, *dsrB*

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-1033-07

硫酸盐还原菌 (sulphate-reducing bacteria, SRB) 是人体肠道中一类厌氧的革兰氏阴性菌, 可以分解短链脂肪酸、氨基酸、有机酸等营养物质, 并还原硫酸盐产生 H_2S ^[1-3]。内源性的 H_2S 可能会对肠道上皮细胞产生毒害作用, 阻碍结肠细胞的丁酸盐氧化途径, 引发细胞凋亡和慢性炎症^[4]。通过纯培养技术, 研究者发现健康人群的 SRB 阳性率为 24%, 明显低于炎

症性肠病人群 (68%)^[5]。脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*, DSV) 是人体结肠 SRB 的优势菌群, 占人体结肠 SRB 的 66%^[6], 具有穿过肠道粘液层, 在肠道定植的能力^[7]。脱硫弧菌的代谢产物是慢性胃肠道疾病的潜在致病因素^[6], 能够促进 IL-6 和 IL-8 的分泌^[8], 诱发炎症反应。因此, 人体肠道中 DSV 的数量和多样性可能与某些肠道疾病的发生存在一定的联系。

基金项目: 国家“十二五”863 计划 (2011AA100901); 江南大学学科交叉基金项目 (JUSRP31103)

^{*} 通信作者。Tel: +86-510-85912087; E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

作者简介: [#] 并列第一作者。丁俊荣 (1986-), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生态学, E-mail: junrong888@126.com; 张秋香 (1979-), 女, 湖北人, 博士, 主要从事微生物学教学及微生物分子生物学研究, E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-02-21; 修回日期: 2012-04-06

传统培养法检测 SRB 耗时,而且不能对细菌的数量进行准确定量。基于 PCR 反应的检测方法具有准确、灵敏的优点,被广泛应用于细菌的定量研究中。亚硫酸盐异构还原酶(DsrAB)是 SRB 产生 H₂S 的关键酶,被作为生物标记广泛应用于 SRB 的多样性和种系发生的研究中^[9]。目前国内外的研究中,DSV 与肠道疾病的关系还存在争议,对肠道菌群与肠道疾病的关系也没有较系统的研究。本研究采用 RT-PCR 和 DGGE 相结合的方法,分析息肉、溃疡性结肠炎、直肠结肠癌和健康人群肠道中的 DSV 的数量变化,及不同人群肠道菌群的多样性,探讨 DSV 和肠道菌群多样性与肠道疾病的潜在关系,对预防肠道疾病,揭示其致病机理和研究治疗肠道疾病的相关药物具有一定的意义。

表 1 受试者资料

Table 1 Subject Characteristics

Characteristic	CRC	PP	UC	H
number (subjects)	15	15	13	15
male	10	9	7	6
female	5	6	6	9
age (mean ± SD)	57.5 ± 10.1	56.9 ± 8.7	47.4 ± 13.6	50.4 ± 15.1
age (minimum)	45	45	24	27
age (maximum)	81	69	68	69

CRC = colorectal cancer; PP = polypus; UC = ulcerative colitis; H = healthy.

1.2 菌种和质粒

脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774)购自北京中原公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10 为本实验室保存菌种;质粒 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.3 肠道细菌基因组 DNA 的提取

每个样品取 500 μL 肠道内容物,使用 OMEGA 公司的 Blood DNA Kit 提取肠道细菌的基因组 DNA,溶于 100 μL TE 溶液中。

1.4 制作 RT-PCR 检测 DSV 的标准曲线

标准曲线的制作参考 Fite 等^[10]建立的方法。

1.4.1 构建重组质粒:提取脱硫弧菌 ATCC 27774 基因组 DNA,采用脱硫弧菌 16S rRNA 特异性引物 DSV691-F 和 DSV826-R (表 2) 扩增 135 bp 的 16S rRNA 基因片段。PCR 反应程序为 95℃ 5 min;95℃ 45 s,60℃ 30 s,72℃ 10 s,30 个循环;72℃ 5 min;4℃ 保存。PCR 产物连接 pMD19-T 载体,转入 *E. coli* TOP10 中,对阳性菌进行测序比对分析。

1.4.2 建立 DSV 的标准曲线:用核酸蛋白测定仪测定重组质粒的浓度为 133.9 ng/μL,根据已知的重组质粒全序列和阿伏加德罗常数(6.02 × 10⁶ 分子数/

1 材料和方法

1.1 样品采集

于无锡市第四人民医院采集 58 名受试者的肠道内容物,分别为:直肠结肠癌患者(colorectal cancer, CRC) 15 人,息肉患者(polypus, PP) 15 人,溃疡性结肠炎患者(ulcerative colitis, UC) 13 人,肠道健康人群(healthy, H) 15 人。以一次性无菌收集器采集样品,转移至 50mL 无菌离心管中,于 2 小时内将样品送至实验室并保存于-70℃ 冰箱。受试者在样品采集的前 3 个月内未使用抗生素,也无肠道传染性疾病或肠道结构异常。样品的采集经过受试者的同意,他们的具体信息见表 1。

mol),计算其分子拷贝数为 4.39 × 10¹⁰ 拷贝/μL。重组质粒进行 10 倍梯度稀释,以 DSV691-F、DSV826-R 为引物,在实时荧光定量 PCR 仪 CFX96 上进行温度梯度扩增,每个样品做 3 个平行。按照荧光定量 PCR 试剂盒 SsoFast EvaGreen Supermix 的说明,配制 RT-PCR 体系为:1 × EvaGreen supermix 10 μL,20 μmol/L 的引物各 0.4 μL,模板 1 μL,补水至 20 μL。扩增条件为 98℃ 2 min;98℃ 5 s,55℃ -65℃ 10 s,40 个循环。循环结束后绘制溶解曲线:从 70℃ 梯度升温至 90℃,每隔 0.5℃ 读板 1 次,持续 5 s。确定最佳退火温度,根据最佳退火温度进行 RT-PCR,建立标准曲线。

1.5 RT-PCR 检测 DSV

以受试者肠道细菌基因组 DNA 为模板,DSV691-F、DSV826-R 为引物进行扩增,RT-PCR 体系同 1.4.2,扩增条件为 98℃ 2 min;98℃ 5 s,60℃ 10 s,40 个循环。溶解曲线的绘制同上,每个样品做 3 个平行,样品与标准质粒同时进行 RT-PCR 反应。

1.6 肠道 DSV 的多样性分析

1.6.1 PCR 扩增 dsrB 基因:采用巢式 PCR 扩增 dsrB 基因。以受试者肠道细菌基因组 DNA 为模板,DSR1F 和 DSR4R (表 2) 为引物,扩增脱硫弧菌

dsrAB 基因。PCR 反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 63℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。随后以 *dsrAB* 为模板, 采用带 GC 夹的特异性引物 GC-DSRp2060F 和 DSR4R (表 2) 扩增 *dsrB* 基因。PCR 反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 64℃ 45 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.6.2 DGGE 分析 DSV 多样性: 采用 DGGE 的方法, 每个人群选择一个代表性样本, 每个样本做一个平行, 用 Bio-Rad D-Code System 分析 *dsrB* 基因。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 20% - 60%, 电泳条件为: 80V, 65℃, 1 × TAE 缓冲液中电泳 12 h, 凝胶用 Gold View 染色。

1.7 肠道菌群的多样性分析

1.7.1 PCR 扩增肠道菌群 16S rRNA V3 区: 采用巢式-PCR 扩增肠道菌群 16S rRNA V3 区。以受试

者肠道细菌基因组 DNA 为模板, 27F 和 1492R (表 2) 为引物, 扩增肠道细菌 1500 bp 的 16S rRNA。随后以 16S rRNA 为模板, 通用引物 341GC-F 和 534-R (表 2) 为引物, 扩增细菌 16S rRNA V3 区。PCR 反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.7.2 DGGE 分析肠道菌群多样性: 采用 DGGE 的方法, 8% 的聚丙烯酰胺凝胶分离 58 个样品的 16S rRNA V3 区基因。变性梯度为 10% - 60%, 电泳条件如 1.6.2。每组选择 3-4 个代表性样本, 优势条带切胶回收, 加 50 μL 无菌水, 4℃ 过夜。以上清为模板, 341-F 和 534-R 为引物 (表 2), PCR 扩增 16S rRNA V3 区片段, 反应程序如 1.7.1。PCR 片段连接 pMD19-T 载体, 转入 *E. coli* TOP10, 取阳性菌测序并进行 Blast 比对分析。

表 2 PCR 引物

Table 2 Summary of primers

Gene	Primer set	Primer sequences (5'→3')	References
<i>Desulfovibrio</i> 16S rRNA	DSV691-FDSV826-R	CCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGACATCTAGCATCCATCGT TTACAGC	[10]
<i>dsrAB</i>	DSR1F DSR4R	AC [C/G] CACTGGAAGCAGCGTGTAGCACTTACCGCA	[11]
GC- <i>dsrB</i>	GC-DSRp2060FDSR4R	CGCCCCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGGCGGGGACGGGGGGCA ACATCGTYCAY ACCCAGGGGTGTAGCACTTACCGCA	[12]
16S rRNA	27F1492R	AGAGTTGATCCTGGCTCAGGGTTACCTTGTACGACTT	universal primer
16S rRNA V3	341GC-F341-F534-R	CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGGCGGGGACGGGGGGCCTACGGGA GGCAGCAGCCTACGGGAGGCAGCAGATTACCGCGGCTGCTGG	universal primer

1.8 数据分析

1.8.1 RT-PCR 数据分析: DSV 每个菌体中 16S rRNA 的拷贝数为 5, 实时荧光定量值除以 5, 得到样品中 DSV 的绝对值。对每个人群肠道中的 DSV 数量进行均值统计分析, 用 SPSS 软件进行 One-Way ANOVA 检验。

1.8.2 DGGE 图谱分析: 用 Quantity One 软件对 DGGE 谱图进行分析, 对每条泳道的条带进行统计分析, 用 Complete Linkage 的方法进行聚类分析。

2 结果

2.1 不同人群肠道中 DSV 数量的比较

以 PCR 循环数为横坐标, 检测到的荧光强度为纵坐标绘制标准质粒的 RT-PCR 扩增曲线。以质粒模板量的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制检测 DSV 的标准曲线, 通过标准曲线对不同样品中 DSV 的数量进行定量。

通过 RT-PCR 对不同人群肠道中 DSV 的数量

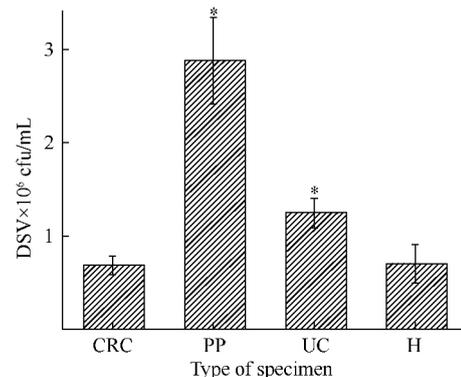


图 1 不同人群肠道脱硫弧菌的定量分析

Fig. 1 Quantitation of *Desulfovibrios* from intestinal content in different subjects. CRC = colorectal cancer; PP = polypus; UC = ulcerative colitis; H = healthy. Values are mean for each group. * : $p < 0.05$ compared with healthy controls.

进行定量, 结果如图 1 所示。DSV 的阳性率为 100%, 说明它是人体肠道的常驻菌群。息肉 (2.9×10^6 cfu/mL 肠道内容物) 和溃疡性结肠炎人群 (1.2×10^6 cfu/mL 肠道内容物) 肠道中 DSV 的数量

明显高于健康人群 (7.0×10^5 cfu/mL 肠道内容物) ($p < 0.05$), 直肠结肠癌人群 (6.8×10^5 cfu/mL 肠道内容物) 与健康人群相比, 肠道中 DSV 的数量无明显变化 ($p > 0.05$)。

2.2 不同人群肠道 DSV 多样性的分析

为分析不同人群肠道中 DSV 的多样性, 对 DSV

的 *dsrB* 基因进行 DGGE 分析, 结果如图 2-A 和 2-B 所示。肠道疾病人群肠道中 DSV 的某些菌群的数量明显增多。用 Quantity One 软件中 Complete Linkage 的方法对 DGGE 图谱进行系统发育树分析 (图 2-C), 健康人群与肠病人群明显分为两支, 说明他们肠道中的 DSV 菌群存在差异。

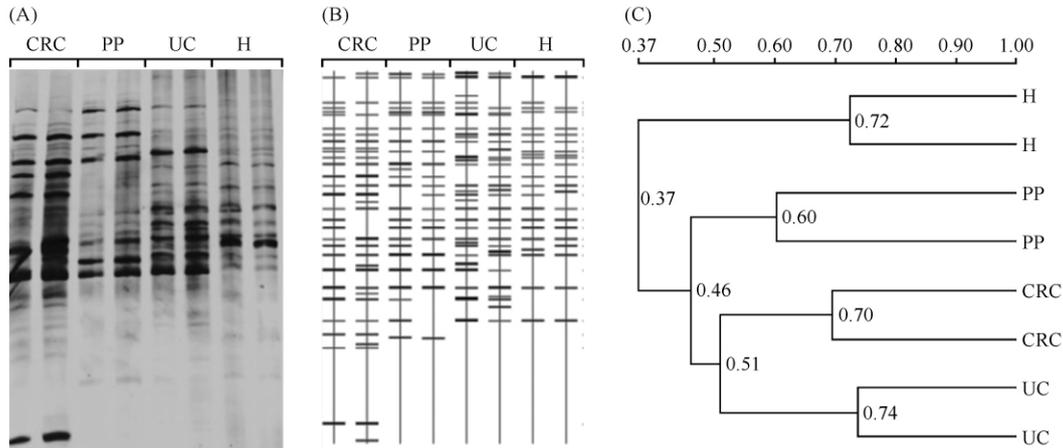


图 2 不同人群 DSV 的 DGGE 指纹图谱 (A、B) 及聚类分析结果 (C)

Fig. 2 DGGE profiles of *Desulfovibrios* in different subjects. (A) (B) and cluster analysis (C) of different subjects. CRC = colorectal cancer; PP = polypus; UC = ulcerative colitis; H = healthy.

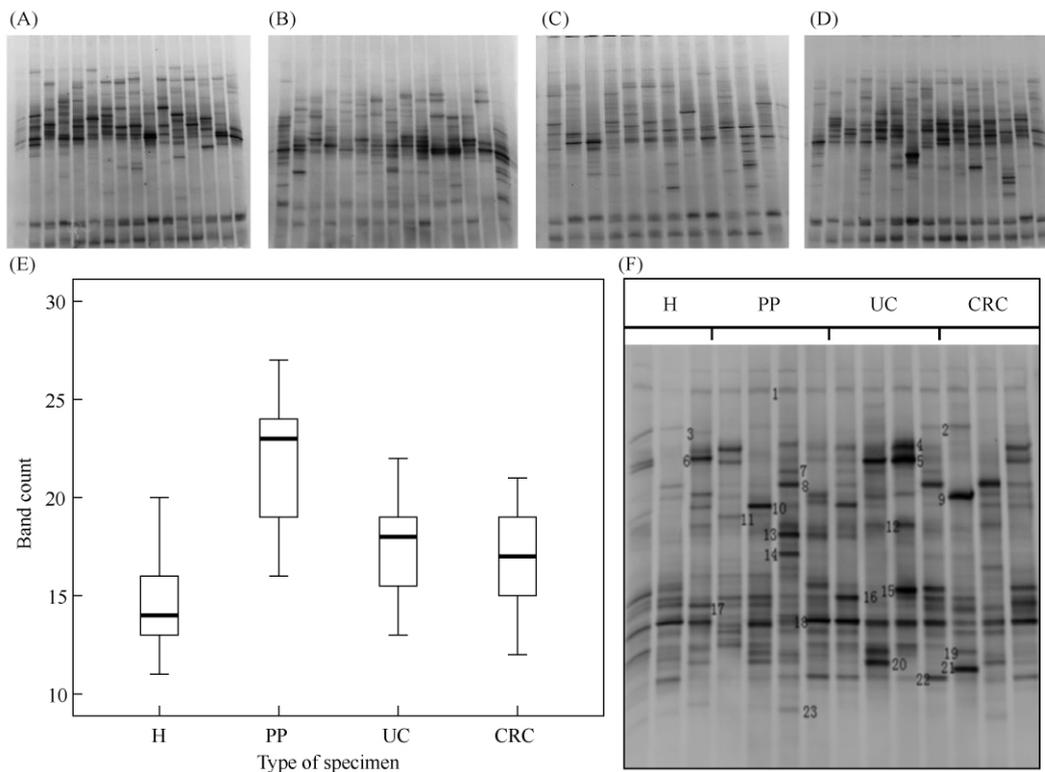


图 3 不同人群肠道菌群的 DGGE 指纹图谱

Fig. 3 DGGE profiles of intestinal flora in different subjects. (A) Healthy group; (B) Polypus group; (C) Ulcerative colitis group; (D) Colorectal cancer group. (E) Band number of different groups (Box plots presenting the median and range of band counts of all samples taken from CRC, PP, UC, and controls. Boxes have lines at the lower, median, and upper values). (F) DGGE profiles of intestinal flora in representative sample. H = healthy; PP = polypus; UC = ulcerative colitis; CRC = colorectal cancer.

以上结果表明, 息肉、溃疡性肠炎的发生与 DSV 的数量变化及多样性之间存在一定的联系。直肠结肠癌的发生虽然与 DSV 的数量无明显关系, 但是与 DSV 的多样性之间存在一定的联系。

2.3 不同人群肠道菌群多样性分析

对不同人群肠道菌群 16S rRNA 基因的 V3 区进行 DGGE 分析, 并用 Quantity One 软件统计分析 DGGE 条带数目(图 3), 结果发现肠道疾病人群的菌群多样性高于肠道健康人群, 在息肉人群中尤为明显。回收优势条带进行测序(表 3), 发现不同人群肠道中的优势菌群有所变化: 拟杆菌群 (*Bacteroides*) 和厚壁菌门梭菌属的普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 同是 4 种人群的优势菌群, 而脱硫弧菌 *Desulfovibrio gabonensis* 和硫酸盐还原菌 *Anaerofilum pentosovorans* 是肠道疾病人群的优势菌群, 它们在肠道的代谢反应中都能产生 H_2S 。两形真杆菌 (*Eubacterium bifforme*) 也是肠道疾病人群的优势菌群, 部分种类是条件致病菌, 在肠道菌群失衡的时候会对人体产生有害作用。肠道疾病人群与健康人群优势菌群及菌群多样性的差异, 可能是肠道菌群失调, 及产生肠道疾病的原因。

表 3 肠道菌群 DGGE 特征条带序列比对结果

Table 3 Alignment of intestinal flora DGGE band to its most-similar GenBank sequence

DGGE band ^a	Closest relative	Similarity/%
1	<i>Parabacteroides distasonis</i>	97
2	<i>Clostridium spiroforme</i>	95
3	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	99
4	<i>Bacteroides helcogenes</i>	92
5	<i>Bacteroides dorei</i>	100
6	<i>Bacteroides eggerthii</i>	93
7	<i>Robinsoniella peoriensis</i>	99
9	<i>Ruminococcus bromii</i>	98
10	<i>Eubacterium bifforme</i>	100
11	<i>Bacteroides plebeius</i>	98
12	<i>Bacteroides uniformis</i>	100
13	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	100
14	<i>Eubacterium bifforme</i>	98
15	<i>Clostridium rectum</i>	99
16	<i>Ruminococcus callidus</i>	100
17	<i>Dorea formicigenerans</i>	98
18	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	100
19	<i>Ruminococcus gnavus</i>	100
20	<i>Desulfovibrio gabonensis</i>	100
21	<i>Anaerofilum pentosovorans</i>	93

^a Numbers correspond to bands in Fig. 4. Band 8, 22, 23 were failing in sequencing.

The V3 regions of the 16S rRNA gene sequences were compared with those in GenBank, National Centre for Biotechnology Information (NCBI).

3 讨论

肠道疾病与 DSV 的关系一直是一个备受争议的问题。本研究中, DSV 在所检人群中普遍存在, 与人的年龄和性别没有关系, 这与 Fite 等^[10]的研究结果一致。通过 RT-PCR 研究发现, 肠道中 DSV 数量的增多是息肉和溃疡性结肠炎疾病的一个重要特点, 在息肉人群中尤为明显。Rowan 等人也发现, DSV 的数量在溃疡性结肠炎患者肠道中明显增多^[13]。肠道中 DSV 数量增多, 一方面使肠道菌群失调, 影响肠道菌群与宿主的共生关系, 影响肠道健康, 从而引发肠道疾病。有研究报道证实, 炎症性肠病和肠道易激综合征患者的肠道菌群组成明显改变^[14, 15]。另一方面, DSV 数量的增多, 使肠道中产生的 H_2S 增多, 抑制肠道中丁酸盐等短链脂肪酸的氧化, 对结肠上皮细胞产生毒害作用, 使肠道上皮细胞的 H_2S 解毒途径遭到破坏从而引发肠道疾病。因此, DSV 成为影响肠道健康的一个重要因素。在本研究中, 直肠结肠癌患者肠道中 DSV 的数量与健康人群相比没有明显的变化, 而 Scanlan 等^[11]的研究发现直肠结肠癌患者肠道中 DSV 的数量 (10^5 /克粪便) 少于健康人群 (10^6 /克粪便), 这个差异可能是由于东西方人群的饮食及生活习惯的不同而造成的。

DGGE 是一种半定量的研究方法, 能直观地反映群落动态和菌群多样性。本研究中肠道疾病人群肠道菌群多样性高于健康人群, 优势条带测序分析结果表明, 所鉴定优势条带中阴性菌与阳性菌含量比大约为 4:1。拟杆菌群 (*Bacteroides*) 是人体结肠的优势菌群^[16], 本研究对不同人群肠道菌群 DGGE 的分析, 同样证明了这一点。在研究中发现, 3 种肠道疾病人群与健康人群相比, 肠道菌群多样性和优势菌群明显改变, 造成肠道菌群的微环境改变, 这种变化可能与环境、饮食改变或者肠道免疫反应有关。与健康人群相比, 硫酸盐还原菌 *Desulfovibrio gabonensis* 和 *Anaerofilum pentosovorans* 是肠道疾病组的优势菌群, 这两种肠道细菌在肠道中能够产生 H_2S , 说明肠道疾病与 SRB 之间存在一定的关系。通过对不同人群肠道 DSV 的 DGGE 分析及聚类分析, 发现 3 种肠道疾病患者肠道中 DSV 的优势菌群表现出很大的差异, 说明 3 种肠道疾病的发生或恶

化与肠道 DSV 的菌群多样性之间也有联系。

通过对 4 种人群肠道 DSV 和肠道菌群的研究表明, DSV 的数量和肠道菌群多样性与部分肠道疾病的发生存在一定的联系。息肉、溃疡性结肠炎患者肠道中 DSV 的数量明显增多, 多样性也存在差异, 肠道疾病患者肠道中 DSV 的菌群相似度较高, 肠道菌群失调。DSV 发挥作用的机理及肠道菌群失调对肠道疾病的影响还需进一步实验证实。

参考文献

- [1] Postgate JR. The sulphate-reducing bacteria. 1st. London: Cambridge Univ Pr, 1979.
- [2] Gibson G. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 1990, 69(6): 769-797.
- [3] Gibson G, Macfarlane G, Cummings J. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *Journal of Applied Microbiology*, 1988, 65(2): 103-111.
- [4] Hulin S, Singh S, Chapman M, Allan A, Langman M, Eggo M. Sulphide-induced energy deficiency in colonic cells is prevented by glucose but not by butyrate. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2002, 16(2): 325-331.
- [5] Loubinoux J, Bronowicki JP, Pereira IAC, Mouguel JL, Faou AE. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS microbiology ecology*, 2002, 40(2): 107-112.
- [6] Gibson G, Macfarlane G, Cummings J. Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut*, 1993, 34(4): 437-439.
- [7] Devereux R, Delaney M, Widdel F, Stahl D. Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(12): 6689-6695.
- [8] Bisson-Boutelliez C, Massin F, Dumas D, Miller N, Lozniewski A. Desulfovibrio spp. survive within KB cells and modulate inflammatory responses. *Molecular oral microbiology*, 2010, 25(3): 226-235.
- [9] Zverlov V, Klein M, Lücker S, Friedrich MW, Kellermann J, Stahl DA, Loy A, Wagner M. Lateral gene transfer of dissimilatory (bi) sulfite reductase revisited. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(6): 2203-2208.
- [10] Fite A, Macfarlane GT, Cummings JH, Hopkins MJ, Kong SC, Furrer E, Macfarlane S. Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. *Gut*, 2004, 53(4): 523-529.
- [11] Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Culture-independent analysis of desulfovibrios in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals. *FEMS microbiology ecology*, 2009, 69(2): 213-221.
- [12] Stubner S. Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 2004, 57(2): 219-230.
- [13] Rowan F, Docherty NG, Murphy M, Murphy B, Coffey JC, O'Connell PR. Desulfovibrio Bacterial Species Are Increased in Ulcerative Colitis. *Diseases of the Colon & Rectum*, 2010, 53(11): 1530-1536.
- [14] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [15] Mättö J, Maunuksela L, Kajander K, Palva A, Korpela R, Kassinen A, Saarela M. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome - a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2005, 43(2): 213-222.
- [16] Salyers A. Bacteroides of the human lower intestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*, 1984, 38(1): 293-313.

Quantity of *Desulfovibrios* and analysis of intestinal microbiota diversity in health and intestinal disease people in Wuxi, Jiangsu province

Junrong Ding[#], Qiuxiang Zhang[#], Xiaoming Liu, Gang Wang, Fengwei Tian, Hao Zhang, Wei Chen^{*}

Research Center of Food Biotechnology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [Objective] This paper provides an overview of *Desulfovibrio* (DSV) incidence and its effect on bacterial diversity in human gastrointestinal tract of four groups: ulcerative colitis (UC), colorectal cancer (CRC), polypus (PP) and the healthy control (H). [Methods] Real time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) assays were used to enumerate DSV in gastrointestinal tract of 58 subjects. Diversity of gut microbiota was analyzed by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) and 16S rRNA V3 sequencing. [Results] RT-PCR detected DSV in all samples. Significantly increased numbers of DSV were observed for UC and PP groups compared with CRC and H groups. No significant difference was observed for CRC and H groups with gene copy numbers of DSV. Alterations of DSV and gut microbiota were observed in disease groups. [Conclusion] We found that quantity and diversity of DSV are significantly increased in UC and PP compared to controls. The increased numbers of DSV in disease groups suggests a possible harmful role.

Keywords: real time PCR, DGGE, *Desulfovibrio*, intestinal diseases, 16S rRNA, *dsrB*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2011AA100901) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP31103)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-510-85912087; E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

[#]Those authors contributed equally to this work.

Received: 21 February 2012/Revised: 6 April 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内,“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。