文章编号:1000-5404(2008)16-1549-04

论著

16S rRNA基因克隆文库用于菌群分析的效能研究和评价

张守印[1],郭学青[2],李振军[1],叶长芸[1],赵爱兰[1],徐建国[1] ([1]中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,国家传染病预防控制重点实验室,北京 102206;[2]北京军区总医院263临床部检验科,北京 101149)

摘 要:目的 建立16S rRNA基因克隆文库进行菌群相对定量的方法,评价其对细菌的检测效率以及对混合菌群中低含量细菌的分析能力。**方法** 取脆弱类杆菌等9种细菌以相同及级差比例制备细菌悬液,分别用或不用变溶菌素处理后,用试剂盒提取核酸,16S rRNA基因通用引物进行PCR扩增、纯化、连接、克隆和测序,建立16S rRNA基因克隆文库,将序列与数据库进行比对分析。**结果** 相同比例制备的菌悬液,加或不加变溶菌素提取的核酸,掺入的9种细菌均可检出。级差比例制备的菌悬液,加变溶菌素提取核酸,掺入的9种细菌均可检出;不加变溶菌素提取核酸,数量少难裂解的革兰阳性菌双歧杆菌未能检出。混合菌悬液中各种细菌的比例与文库反映的各种细菌的比例有数量对应关系,但不是线性对应关系。**结论** 16S rRNA基因序列分析是一种较好的细菌菌群分析方法,它可以同时检出多种细菌,并能对混合细菌标本进行菌群相对定量,反映菌群中各种细菌的丰度,但不能准确定量菌群中各种细菌的数量。

关键词: 16S rRNA基因;序列分析;菌群分析
中图法分类号: Q785;R372 **文献标识码:** A

Evaluation of 16S rRNA gene clone library in analyzing bacterial flora by mixed bacterial suspension

ZHANG Shou-yin[1], GUO Xue-qing[2], LI Zhen-jun[1], YE Chang-yun[1], ZHAO Ai-lan[1], XU Jian-guo[1] ([1]State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Diseases Prevention and Control, China CDC, Beijing 102206; [2]Department of Laboratory Medicine, No. 263 Clinic of General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 101149, China)

Abstract: Objective To evaluate the detection efficiency of 16S rRNA gene clone library in relative quantification of bacteria in the flora and its analyzing capacity to low-density bacteria. Methods In order to obtain definite background of experimental specimen, self-mixed bacterial suspensions including 9 kinds of bacteria in equal proportion or at gradient ratios were prepared to replace the conventional clinical bacterial samples. The suspensions were lyzed in presence or absence of mutanolysin, and then genomic DNA was extracted with common method. 16S rRNA gene clone library was established by amplifying targeted 16S rRNA gene conserved regions of the bacteria, purifying PCR products, inserting them to plasmid pGEM-T easy vector, transforming in DH5α, and cloning and sequencing the recombinants. Nucleotide sequences were blasted with GenBank database. Results For the bacterial suspension in equal proportion, all 9 bacteria were detectable when the genomic DNAs were extracted with or without mutanolysin. But for the bacterial suspension mixed at gradient ratios, all 9 bacteria were detectable when mutanolysin was used in lysis, and bifidobacterium at small amount was undetectable when DNA extraction was lyzed without mutanolysin. The bacterial ratios indicated by the library had certain correspondence to that in the mixed bacterial suspension, but not in a linear relationship. Conclusion The 16S rRNA gene sequences technology is a good method to analyze bacterial flora, capable of multiple bacterial dectection, and can relatively quantify the bacteria in the flora. It can indicate the abundance of the bacteria, but not their exact amounts.

Key words: 16S rRNA gene; sequence analysis; bacterial flora

基金项目: 国家科技攻关计划课题(2003BA712A02)
Supported by the National Key Sci & Tech Project of China(2003BA712A02)
作者简介: 张守印,男,山西省曲沃县人,博士,助理研究员,主要从事分子诊断和新发传染病方面的研究。电话:(010)61731691,E-mail:zhangshouyin@icdc.cn
通信作者: 徐建国,电话:(010)61739579,E-mail:xujianguo@icdc.cn
收稿日期: 2007-10-26;**修回日期:** 2008-01-21

采用16S rRNA基因克隆文库的方法分析菌群组成已广泛应用于环境和临床微生物中[1-3],它既可以分析标本中细菌的种类,又可以反映标本中各种细菌的相对比例,可以相对定量,最重要的是可通过这种方式检测到实验室条件下不能培养的细菌,所以在微生物检测方面具有独特的优势。但该方法技术环节多,影响因素复杂,对该方法的定量效果应进行评价。目前采用的评价方法是临床标本[4],但临床标本中的菌群背景不清楚,用菌群组成不清楚的标本进行评价难以取得理想的效果,不能真正反映标本中菌群数量与文库中代表各种细菌序列数之间的对应关系;而用混合菌液制成的模拟标本进行评价可以解决背景不清楚的问题,评价效果更为明确。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

核酸提取试剂盒购自Qiagen公司,变溶菌素(mutanolysin)购自Sigma公司,PCR试剂购自ABI公司,纯化和T载体连接试剂盒购自Promega公司,感受态细胞购自天根生物技术公司,PCR扩增仪购自MJ Research公司,电泳仪购自北京六一仪器厂,凝胶成像系统购自Bio-Rad公司。

1.2 菌株来源

脆弱类杆菌和厌氧消化链球菌购自法国巴斯德研究所,青春双歧杆菌和缓症链球菌购自中国药品生物制品检定所,大肠杆菌、乳酸乳球菌、金黄色葡萄球菌、屎肠球菌和蜡样芽孢杆菌由本室保存。

1.3 细菌培养和计数

大肠杆菌、缓症链球菌、屎肠球菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌在脑心浸液琼脂培养基,乳酸乳球菌在BL培养基上划线分离,37 ℃培养过夜。双歧杆菌在中国医学菌种保藏中心编号的87号培养基,类杆菌和消化链球菌在中国医学菌种保藏中心编号的20号培养基上划线分离,置厌氧环境下37 ℃培养48 h。以上各种细菌分别挑取单菌落,大肠杆菌、缓症链球菌、屎肠球菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和乳酸乳球菌在脑心浸液培养基中37 ℃培养24 h,双歧杆菌划密线接种87号培养基,类杆菌和消化链球菌划密线接种20号培养基培养,置厌氧环境下37 ℃培养48 h。液体培养基培养的细菌,于15 ml离心管10 000 r/min,离心10 min集菌,琼脂平板上生长的细菌,刮取细菌于磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中离心集菌,收集的细菌用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)洗3遍,配制菌悬液。用细菌计数板计数,计算各种细菌悬液的细菌数。

1.4 单种细菌加变溶菌素的核酸提取

在提取核酸时,革兰阳、阴性菌的提取效率差别很大,某些革兰阳性菌难破壁,不能被细菌裂解剂和溶菌酶裂解,在提取核酸时,需进行特殊的处理。变溶菌素是一种高效广谱的裂解酶[5],对多种溶菌酶不能裂解的细菌可发挥裂解作用,所以在实验中提取核酸时加入变溶菌素。

对1.3中计数菌液每种各取2份,每份1 ml,离心集菌。用Mes缓冲液(pH 6.0)将变溶菌素稀释成300 U/ml。对各菌液中的1份加200 μl变溶菌素37 ℃作用1 h后用试剂盒提取核酸,另1份直接用核酸提取试剂盒提取核酸,具体步骤按QIAamp DNA Mini Kit试剂盒操作说明进行。核酸提取效率以细菌的裂解率表示,结果以单位数(U)表示,单位的定义为:在pH 6.0,37 ℃条件下,裂解肠球菌细胞壁悬液1 ml/min,$D(600)$变化0.01为1个单位。

1.5 细菌混合悬液的配制

根据细菌的计数结果配制两种细菌混合悬液:取上述9种细菌配制等菌量混合菌液一,混合液中各种细菌数量相等;不同细菌种类数量相差10倍的混合菌液二,混合液中脆弱类杆菌、青春双歧杆菌和厌氧消化链球菌的数量是大肠杆菌、缓症链球菌、屎肠球菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和乳酸乳球菌的10倍。

1.6 核酸提取

取混合菌液一400 μl分为均等的2份,加入2支离心管中,10 000 r/min离心10 min集菌,弃上清;1份加入200 μl变溶菌素(浓度300 U/ml)37 ℃作用1 h提取核酸,另1份直接用核酸提取试剂盒提取核酸,具体步骤按QIAamp DNA Mini Kit试剂盒操作说明进行。

取混合菌液二2 ml分为均等的2份,离心集菌,弃上清;1份加入200 μl变溶菌素(浓度300 U/ml)37 ℃作用1 h提取核酸,另1份不加直接用核酸提取试剂盒提取核酸,具体步骤按QIAamp DNA Mini Kit试剂盒操作说明进行。

1.7 克隆文库构建

利用细菌通用引物对样品进行16S rRNA基因的全长扩增。引物序列为:5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′和5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′,PCR扩增体系(50 μl):5 μl Buffer,5 μl $MgCl_2$,4 μl dNTPs,上下游引物各1.25 μl,Ampli *Taq* Gold酶0.5 μl,BSA 5 μl,双蒸水27 μl,模板1 μl。反应条件:95 ℃预变性12 min;95 ℃ 50 s、52 ℃ 50 s、72 ℃ 90 s、20个循环;72 ℃ 10 min。PCR扩增产物纯化按Wizard PCR Preps DNA Purification System说明书操作步骤进行,连接按pGEM-T Easy Vector Systems说明书操作步骤进行,转化按天根生物技术公司的DH5α感受态细胞试剂说明操作步骤进行。每份标本平行做2次。每次挑取120个转化子分别送上海生工公司测序。测序结果用Chimera Check v2.7检测嵌合体;用16S rRNA基因共有序列数据库,进行序列比对。

2 结果

2.1 变溶菌素对细菌核酸提取的影响

本实验选择的7种革兰阳性菌加入变溶菌素后核酸提取效率分别提高1.47~12.80倍,而对革兰阴性菌的核酸提取效率没有影响,见表1。

2.2 混合菌液一的16S rRNA基因文库细菌组成分析

2次实验可检出模拟标本中的细菌,加变溶菌素后某些种属细菌有提高,如双歧杆菌不加变溶菌素时2次平行实验分别检出0、1个,加入变溶菌素后2次平行实验分别检出6、5个;葡萄球菌不加变溶菌素时2次平行实验分别检出2、1个,加入变溶菌素后2次平行实验分别检出5、7个。见表2。

表 1　加变溶菌素与不加变溶菌素核酸提取效果比较

细菌种属	加变溶菌素后核酸提取量(ng/μl)	不加变溶菌素核酸提取量(ng/μl)	两组比值
青春双歧杆菌	40.45	3.16	12.80
脆弱类杆菌	63.52	62.86	1.01
厌氧消化链球菌	32.15	15.87	2.03
大肠杆菌	52.87	53.34	0.99
金黄色葡萄球菌	30.24	11.09	2.73
屎肠球菌	36.02	16.88	2.13
缓症链球菌	34.16	12.87	2.65
乳酸乳球菌	38.25	20.41	1.87
蜡样芽孢杆菌	36.53	24.88	1.47

表 2　混合菌液一 16S rRNA 基因文库统计结果

细菌种属	加变溶菌素平行实验第 1 次(克隆子数)	加变溶菌素平行实验第 2 次(克隆子数)	不加变溶菌素平行实验第 1 次(克隆子数)	不加变溶菌素平行实验第 2 次(克隆子数)
脆弱类杆菌	17	19	25	21
青春双歧杆菌	6	5	0	1
厌氧消化链球菌	8	7	6	5
大肠杆菌	19	17	21	28
金黄色葡萄球菌	5	7	2	1
屎肠球菌	12	11	8	6
缓症链球菌	11	10	7	6
乳酸乳球菌	9	8	7	8
蜡样芽孢杆菌	18	20	24	19
合计	105	104	100	95

2.3　混合菌液二的 16S rRNA 基因文库细菌组成分析

对不同细菌种类数量相差 10 倍配制的混合菌液,2 次实验都可检出模拟标本中的细菌,见表 3。

表 3　混合菌液二 16S rRNA 基因文库统计结果

细菌种属	平行实验一(克隆子数)	平行实验二(克隆子数)	合计
脆弱类杆菌	32	26	58
青春双歧杆菌	11	14	25
厌氧消化链球菌	27	21	48
大肠杆菌	7	11	18
金黄色葡萄球菌	3	1	4
屎肠球菌	5	8	13
缓症链球菌	4	6	10
乳酸乳球菌	3	2	5
蜡样芽孢杆菌	6	8	14
合计	98	97	195

3　讨论

通过模拟标本用 16S rRNA 基因克隆文库分析菌群组成情况。变溶菌素处理等比例菌液组中,选择 120 个克隆子测序后进行分析,能检测到掺入标本中的各种细菌,检出量 5 ~20 个。类杆菌、大肠杆菌和蜡样芽孢杆菌的检出量较高,葡萄球菌和双歧杆菌的检出量较低。而不用变溶菌素处理采用同步实验建立的 16S rRNA 基因克隆文库,选择 120 个克隆子测序后进行分析,2 次平行实验中 1 次未检测到双歧杆菌,另 1 次检测到 1 个。

混合菌液中造成细菌数量梯度差异后,用克隆文库的方法检测细菌数量,虽然加入少量的细菌通过 16S rRNA 基因克隆文库检出率也比较低,但并未按比例降低;并且低比例菌提取核酸经 PCR 反应扩增后,并未被高比例菌的扩增产物覆盖,这样有利于标本中较低数量菌的检出。

比较等比例与级差比例混合菌液的 16S rRNA 基因克隆文库结果,升降是有规律的,用文库方法反映的菌群比例与其他方法计数的反映的菌群比例,有一定的对应性,但无绝对的线性对应关系,即用 16S rRNA 基因克隆文库的方法分析原始标本中的菌群组成,只能反映其相对丰度,不能反映绝对丰度。若我们的目的更关注于定性方面,即能不能检出标本中的细菌,关心检出的种类,本方法能较好地满足我们的需要;若更关注于定量方面,本方法只能满足我们的部分需要,即原始标本中某种细菌数量多,通过 16S rRNA 基因克隆文库的方法反映的相对比例高,但很难达到准确定量的目的。

自从利用 16S rRNA 基因克隆文库方法研究标本中菌群多样性以来,通过该方法发现了许多新的细菌种[6,7],尤其是我们尚未培养到的细菌物种,其在这方面的巨大优势,受到微生物学家的青睐,被广泛应用于微生物种群分析。该方法研究菌群组成能不能反映原始标本中的菌群比例引起了大家的兴趣,从多个角度对其分析评价[8],有的结果差异很大,甚至是完全不同的结论[8,9],这也说明了本系统的复杂性。在本研究中,运用模拟标本 16S rRNA 基因克隆文库方法分析细菌组成,既有评价的作用,又达到质控的目的,使实验数据有比较性,结果更加可信。

建立 16S rRNA 基因文库体系的每一环节都影响到最终结果,核酸提取是关键的一步,本研究也作为重点进行了比较研究,尤其是对难裂解的革兰阳性双歧杆菌等,采用裂解效率高的变溶菌素进行了比较实验。目前对核酸提取的评价实验多是针对临床样本的,但临床样本中的菌群组成背景不清楚,用它作为评价的标准难有满意的结果。采用模拟标本可以解决这个问题。在模拟标本细菌组成的选择上,类杆菌、双歧杆菌、消化链球菌、大肠杆菌、缓症链球菌、肠球菌、乳球菌、葡萄球菌作为实验的受试菌株,因这些细菌既是肠道中的常见菌,在表型性状如革兰染色及基因特征如基因组大小、核糖体操纵子数、G + C 含量等方面各有特点,有一定的代表性,能反映复杂的肠道菌群组成情况。

在进行 16S rRNA 基因的“通用引物”扩增时,引物的通用性也是一个极为重要的问题,但有一点可以肯定,即不存在能对所有细菌进行扩增的万能引物,“通用引物”的通用性也是相对的,文献[10]报道有不能与常用的“通用引物”结合的纳古菌;因此,无论采取何种引物,都不可避免的造成某些细菌的 16S rRNA 基因不能有效扩增或扩增效率低。这是由 16S rRNA 基因的特点决定的,在实际工作中,通过设计兼并引物和多对引物同时使用可部分弥补这个问题。为了检查

我们所选细菌与“通用引物”的匹配性,检索到这些菌的16S rRNA基因序列,比对用做引物的保守区,这样可筛选到通用性好的引物。

本研究选了9种细菌作为模拟标本的组成成分,是参考肠道的菌群组成选择的,因为肠道菌群组成复杂,具有代表性。选择的9种细菌既是肠道中的优势菌,也有各自不同的特征性状,将其用于验证实验体系的效果与真正标本的结果比,虽不可能完全一致,但具有参考的价值。本实验得到的结果证明通过16S rRNA基因文库方法分析细菌组成与原始标本中细菌数有对应关系,但不是线形关系;能稳定检出级差数量的细菌,较灵敏;实验的重复性较好。

参考文献:

[1] Wang X, Hoefel D, Saint C P, *et al*. The isolation and microbial community analysis of hydrogen producing bacteria from activated sludge [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(5): 1415 – 1423.

[2] Yang M X, Zhang H B. Diversity of microorganisms in decaying maize stalks revealed by a molecular method[J]. J Microbiol, 2007, 45(4): 367 – 370.

[3] Rudi K, Zimonja M, Kvenshagen B, *et al*. Alignment-independent comparisons of human gastrointestinal tract microbial communities in a multidimensional 16S rRNA gene evolutionary space[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(8): 2727 – 2734.

[4] Li M, Gong J, Cottrill M, *et al*. Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota[J]. J Microbiol Methods, 2003, 54(1): 13 – 20.

[5] Nakimbugwe D, Masschalck B, Deckers D, *et al*. Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 259(1): 41 – 46.

[6] Kang J G, Kim S H, Ahn T Y. Bacterial diversity in the human saliva from different ages[J]. J Microbiol, 2006, 44(5): 572 – 576.

[7] Oline D K. Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(11): 6965 – 6971.

[8] Acinas S G, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V, *et al*. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(12): 8966 – 8969.

[9] Kimura H, Sugihara M, Kato K, *et al*. Selective phylogenetic analysis targeted at 16S rRNA genes of thermophiles and hyperthermophiles in deep-subsurface geothermal environments[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 21 – 27.

[10] Huber H, Hohn M J, Stetter K O, *et al*. The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life [J]. Res Microbiol, 2003, 154(3): 165 – 171.

(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)16-1552-01

附耳软骨瓣折叠修复巨大附耳所致耳屏缺损

田晓菲,邱 林,傅跃先,刘 燕,甘立强 (重庆医科大学附属儿童医院烧伤整形科,重庆 400014)

临床上常见的附耳畸形表现为从耳屏到口角连线上的单个或多个肉赘,大多内含软骨,耳屏形态多数正常。但少数病例表现为耳屏处巨大肉赘,并伴耳屏不同程度缺损。此类病例如行单纯的肉赘切除,则术后耳屏缺损形态差[1]。2000年至今,我科利用附耳软骨瓣折叠填充缺损的方法成形耳屏,修复此类巨大附耳所致的耳屏缺损畸形11例12侧,获得满意的形态,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

11例患儿,女性7例,男性4例。年龄1个月至5岁,3个月以下8例。9例单侧,2例双侧,其中1例双侧中仅1侧为巨大附耳,另1例双侧均为巨大附耳,共计11例12侧,左侧4例,右侧8例。巨大附耳病例均缺乏耳屏正常形态并伴有耳屏不同程度缺损,9例10侧为耳屏上段缺损,耳屏下段基本正常;2例2侧耳屏完全缺如,表现为基底向内移位的巨大肉赘向前、内方倾斜生长,并伴患侧面部发育不良。肉赘底长1.3~1.8 cm,底宽0.5~1.2 cm,高1.0~1.7 cm。

1.2 手术方法

在静脉复合基础麻醉后,测量耳屏缺损的范围及宽度,在附耳上描出所需保留的软骨瓣的形态。保留附耳软骨瓣呈蒂在附耳基底的梯形瓣,瓣的长度为耳屏缺损的水平宽度的两倍,如此折叠后的长度即可修复耳屏缺损的宽度。保留附耳软骨瓣基底的宽度,依据缺损的长度而定,耳屏完全缺如者,保留软骨瓣基底的宽度为整个耳屏应有的正常长度(图1)。常规消毒铺巾后,采用0.5%利多卡因(内含1/400 000肾上腺素)于附耳周围浸润麻醉。在附耳上方保留软骨瓣的上线作环形切口,切除多余的皮肤及软骨组织,剥离保留软骨瓣的后缘达耳屏缺损处基底,使皮肤与软骨瓣后缘之间形成一个盲袋。将保留的梯形软骨瓣向后翻转折叠插入该盲袋后缝合固定,即可使耳屏缺损得以修复(图2)。再根据健侧耳屏峰状突起的数量、形态,在软骨边缘塑形正常的耳屏形态。最后修整皮肤,覆盖软骨,6-0带针线缝合伤口。

2 结果

所有病例术中术后经过顺利。术后伤口愈合良好,手术切口呈轻微线状痕迹,耳屏形态完全恢复正常(图3)。

(下转1556页)

作者简介:田晓菲,女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事儿童烧伤整形方面的研究。电话:13608390775, E-mail: txf0702@sina.com

收稿日期:2008-03-13;修回日期:2008-04-22