

快速评价肠道微生物的 qPCR 方法的建立

梁海慧¹, 张扬², 边爱淑², 周凡入¹, 李学龙¹, 张秀峰³, 尹秀山^{*1}

1 沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142

2 沈阳医学院附属二四二医院消化内科, 辽宁 沈阳 110034

3 鉴微(沈阳)生物科技有限公司, 辽宁 沈阳 110044

梁海慧, 张扬, 边爱淑, 周凡入, 李学龙, 张秀峰, 尹秀山. 快速评价肠道微生物的 qPCR 方法的建立[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5045-5057.

LIANG Haihui, ZHANG Yang, BIAN Aishu, ZHOU Fanru, LI Xuelong, ZHANG Xiufeng, YIN Xiushan. A qPCR method for rapid detection of gut microorganisms[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5045-5057.

摘要: 【背景】近些年, 16S rRNA 基因测序与宏基因组分析常用于肠道微生物病原体检测。【目的】为了使检测不受限于高成本与耗时长的问题, 基于荧光探针的实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR), 建立一种评估人类肠道微生物群组成的平台用于检测肠道微生物丰度。【方法】从公共数据库筛选 10 种肠道中普遍存在的微生物分类群, 使用 20 个粪便样本验证为 10 种靶标所设计的特异性引物与探针, 最后通过比较 qPCR 方法和 16S rRNA 基因测序技术的检测结果来评估该平台的有效性。【结果】10 对引物及其探针对靶标分类群具有特异性并且在 HITdb 数据库中靶向菌种的覆盖率超过 70%; 样本检测结果的变异系数(coefficient of variation, CV)小于 10%, 证明了该方法具有很高的稳定性; qPCR 方法检测样本中物种的相对丰度与 16S rRNA 基因序列生物信息学分析结果大部分具有显著相关性($P < 0.05$)。【结论】本研究根据 HITdb 数据库设计的靶向微生物群的引物和探针检测到的粪便样本中微生物的相对丰度结果与 16S rRNA 基因测序结果相吻合, 可以提供精确且低成本的肠道微生物群分析基础, 同时也为临床诊断制定治疗方案提供了快速有效的参考信息。

关键词: 肠道微生物; 16S rRNA; qPCR; 菌群丰度

资助项目: 辽宁省振兴人才计划(XLYC2002027)

This work was supported by the Liaoning Revitalization Talents Program (XLYC2002027).

*Corresponding author. E-mail: xiushanyin@me.com

Received: 2023-03-31; Accepted: 2023-05-29; Published online: 2023-06-14

A qPCR method for rapid detection of gut microorganisms

LIANG Haihui¹, ZHANG Yang², BIAN Aishu², ZHOU Fanru¹, LI Xuelong¹,
ZHANG Xiufeng³, YIN Xiushan^{*1}

1 College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, Liaoning, China

2 Department of Gastroenterology, 242 Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning, China

3 IDM Biotechnology (Shenyang) Limited Company, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: [Background] In recent years, 16S rRNA gene sequencing and metagenomic analysis have been commonly used for detecting microbial pathogens in the gut. **[Objective]** To overcome the limitations of high cost and long detection time, we established a method for analyzing the composition of human gut microbiota based on real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), which can measure the abundance of gut microorganisms. **[Methods]** Ten microbial taxa commonly detected in the intestine were selected from public databases. We designed specific primers and probes for the ten targets and validated them using 20 fecal samples. Furthermore, we compared the results of qPCR and 16S rRNA gene sequencing to evaluate the performance of the established method. **[Results]** The ten pairs of primers and probes were specific to the targeted taxa, and the coverage of targeted bacteria in the HITdb database exceeded 70%. The coefficient of variation (CV) of sample detection results was less than 10%, indicating that the method was highly stable. The results of qPCR and 16S rRNA gene sequencing for measuring the microbial abundance were correlated ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The results of the relative abundance of microorganisms detected in fecal samples using the primers and probes designed based on the HITdb database were consistent with those obtained by 16S rRNA gene sequencing. This study provides an accurate and cost-effective method for analyzing gut microbiota and the reference information for clinical diagnosis and treatment.

Keywords: gut microorganism; 16S rRNA; qPCR; microbial abundance

肠道微生物群是人体内基因多样性最复杂的微生物生态系统^[1-2]。肠道微生物寄生在人体肠道中,与人们的安全密切相关^[3-4]。微生物群是实现宿主一系列生物过程的关键因素^[5]。肠道微生物包括细菌、病毒、真菌和其他一些单细胞真核生物,主要细菌门有拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和梭杆菌门^[6],对人类和动物的新陈代谢和免疫系统有重大影响。人类肠道微生物群在宿主体内的功能有肠道发育、稳态及对病原体的抗性^[7]。在正常情况下,肠道微生物在肠道中保持动态平衡,从

而在人体中发挥重要作用^[8]。如果这种平衡被打破,在某些情况下就会形成肠道菌群失调^[9]。研究表明,肠道菌群失调可能会引起代谢性疾病,包括肥胖和糖尿病^[10],以及抗生素相关的腹泻^[11]、炎症性肠病^[12]、克罗恩病、溃疡性结肠炎^[13]和结直肠癌^[14]等各种肠道疾病^[15-16]。

目前有 2 种主要的高通量测序方法检测肠道微生物。第 1 种方法是使用靶向扩增子测序,通过 PCR 扩增和测序保守的 DNA 靶标,如核糖体 DNA (rDNA) 编码的 16S rRNA, 16S rRNA 基因在细菌中高度保守且普遍存在,其包含 9 个高

变区(V1-V9), 并且这些高变区在细菌种属之间有所不同^[17-19]。第 2 种方法是宏基因组测序, 使用鸟枪法对从样品中分离的总基因组 DNA 进行测序, 非选择性地捕获样品中的所有 DNA 序列^[20]。需要注意的是这 2 种方法都有其局限性, 例如存在误差率和灵敏度等问题, 而且这些方法通常需要昂贵的设备与试剂, 并且需要很大的空间用于严格分区实验室, 再由专业人员在样本量足够的条件下进行分析操作至少 12 h, 甚至 24 h 以上才能获得测试结果。此外, 数据分析也是极为重要的步骤, 需要借助专业软件进行分析解读。

大量研究表明, 肠道微生物群的高通量测序检测仍存在着操作复杂、需要专业实验室和实验人员、检测时间长、成本高等缺陷^[21]。因此, 本研究介绍了一种先进的检测和分析方法——实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR), 它是定量研究肠道微生物群落的最佳方法之一。作为检测和量化相关微生物的工具, qPCR 已广泛应用于微生物生态学, 这有助于更好地了解肠道微生物群落的复杂性^[22-23]。我们可以利用 qPCR 快速检测肠道微生物群, 分析人体肠道微生物组的主要成分, 其中分析的样本类型可以从粪便样本到拭子和活检, 以及人体肠道模拟器的内容物^[24], 分析结果可以用于探索与疾病、饮食和生活方式等因素的关联^[25-27]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit, Qiagen 公司; Animal Detection U+Probe Master Mix, Vazyme 公司; 胶回收试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; KAPA HiFi HotStart PCR Kit, 罗氏诊断产品(上海)有限公司; MiniSeq Mid Output Kit, Illumina 公司。CFX connect™ 荧光定量 PCR 检测系统, Bio-Rad 公司。

1.2 靶标筛选

通过人类肠道宏基因组公共数据库(GMrepo, <https://gmrepo.humangut.info./home>)获得大量肠道微生物样本的数据, 并在出现频率和相对丰度的条件下对样本数据进行筛选, 得出所需的流行物种列表, 选择从门到属与人类健康关联较大的靶标分类群。

1.3 引物探针的设计与验证

为了识别针对特定肠道微生物群的引物和探针, 分析基因序列以识别在给定群体中高度保守的区域以及足以将该群体与肠道微生物组的其他成员区分的区域。

首先使用 NCBI 设计引物和探针。在选择每个靶标的特定保守区序列后, 通过 NCBI-BLAST 算法获得所选基因序列的物种特异性, 设计参数(如引物长度、探针长度、扩增子长度、熔解温度和 GC 含量等)以获得更高的成功率。为了提高探针的稳定性、特异性和灵敏度, 每个探针至少包含 4 个锁定的特异性碱基。

接着通过 PCR 与 qPCR 扩增验证引物、探针的稳定性与特异性。通过 BLAST 搜索将扩增的序列与相应的微生物基因组进行比较, 验证引物和探针靶向微生物的覆盖度。PCR 扩增验证引物特异性的反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Mix 25 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (终浓度 0.4 μ mol/L), DNA 模板 1 ng, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。得到的 PCR 产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证目的条带, 再通过 qPCR 检测多重反应中所有引物的稳定性。qPCR 反应总体系为 20 μ L: Animal Detection U+Probe Master Mix 10 μ L, 上、下游引物终浓度各 0.5 μ mol/L, 探针终浓度 0.25 μ mol/L, DNA 模板 1 ng, ddH₂O 补足 20 μ L。qPCR 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,

40 个循环。

1.4 样本收集与 DNA 提取

本试验所有粪便样本在沈阳医学院附属二四二医院教科的辅佐下由消化内科采集。采集的样本对应人群男女比例为 1:1, 年龄在 22-45 岁之间, 样本未被尿液或污水污染且存放于 -80 °C, 用干冰运输。通过使用 QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit 从上述粪便样品中提取 DNA。该试剂盒可以从粪便和肠道样本中分离微生物和宿主基因组 DNA, 为粪便 DNA 的提取提供一种专有的方法, 即使是最困难的粪便类型, 也能有效地去除 PCR 抑制剂。试验时, 每份粪便样本称

取 200 mg 用于提取 DNA。提取后测量 DNA 浓度, 并储存在 -20 °C 以便进一步分析。

试验符合规定, 获得的所有数据均是保密的, 只有研究人员和参与者才能根据要求访问这些数据。参与者均已告知研究的性质、生物样本的使用以及在研究前提供书面知情同意书, 而且本试验已经得到了沈阳医学院附属二四二医院伦理委员会的批准(2022002)。

1.5 肠道微生物群的 qPCR 检测

使用 CFX connect™ 荧光定量 PCR 检测系统在 0.1 mL PCR 八连管(NEST)中进行反应。引物和探针的序列见表 1。进行 qPCR 检测前通过设

表 1 10 种靶标的引物与探针

Table 1 Primers and probes for 10 targets

Target	Primer and probe (5'→3')
<i>Firmicutes</i>	F: GTGYCAGCMGCCGCGTAA R: GGACTACNVGGGTWTCTAAT P: FAM-TAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCG-BHQ1
<i>Fusobacteria</i>	F: AAGCGCGTCTAGGTGGTTATGT R: TGTAGTTCCGCTTACCTCTCCAG P: FAM-CAACGCAATACAGAGTTGAGCCCTGCATT-BHQ1
<i>Veillonellaceae</i>	F: AGAAAACAGGTGGTGCACGG R: RATAGGGGTTGCGCTCGTT P: HEX-CGTCAGCTYGTGTCGTGAGATGTTG-BHQ2
<i>Lachnospiraceae</i>	F: GAKCAAACAGGATTAGATAACC R: AATTAACCACATGCTCC P: HEX-TACGTYCGCAAGAATGAAACTC-BHQ2
<i>Akkermansia</i>	F: GCTCACCAAGGCGATGACGG R: TGCTCCCACATGACAGGGGTTTAC P: Texas Red-CCATTGTGAATGATTCTCGACTGCTGCCA-BHQ2
<i>Bacteroides</i>	F: VGATGGGGATGCGTTCCATTAG R: CATCCTTACGCTACTTGGCTGG P: HEX-CGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTC-BHQ2
<i>Enterococcus</i>	F: TGGAAACAGGTGCTAATACCG R: TGAGCCGTTACCTCACCAAC P: FAM-TGGACCCGCGGTGCATTAGC-BHQ1
<i>Lactobacillus</i>	F: GTAATACGTAGGTGGCAAGCG R: CACCGCTACACATGGAGTTC P: HEX-TCCGGATTTATTGGGCGTAA-BHQ2
<i>Prevotella</i>	F: GTAACGCGTATCCAACCTRC R: GACCTTCCTCTCAGAACCCC P: Texas Red-CTGATTAGCTTGTGGCGGG-BHQ2
<i>Streptococcus</i>	F: GATACATAGCCGACCTGAGAGGGTG R: ACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGG P: Texas Red-CCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGC-BHQ2

置引物浓度梯度与温度梯度测试反应条件, 每个样品设置 2-3 组平行试验, 反应总体积(20 μL): Animal Detection U+Probe Master Mix 10 μL , 上、下游引物终浓度各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 探针终浓度 0.25 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板 1 ng, ddH₂O 补足 20 μL 。

所有 qPCR 反应均通过以下热循环程序进行: 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min (此步使用 UDG 酶, 建立 PCR 防污染体系, 保证 PCR 扩增结果的准确性); 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

通过 qPCR 获得的基因扩增水平显示为与初始 DNA 浓度成反比的循环阈值(cycle threshold, C_t 值)。初始 DNA 浓度越高, C_t 值越小; 初始 DNA 浓度越低, C_t 值越大。利用已知起始拷贝数的标准品制作标准曲线, 通过获得的样品 C_t 值, 从标准曲线上计算出该样品的拷贝数。CFX connectTM 软件控制程序根据设定的校准曲线值自动计算数量平均值。在数据自动处理之后, 通过手动校准来校正某些曲线自动读取的不准确性。将定量值导出到电子表格中进一步分析数据, 并将分析结果与 16S rRNA 基因测序结果进行比较。

1.6 16S rRNA 基因测序

通过 PCR 引物 515F (5'-GTGCCAGCMGC CGCGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3')扩增 16S rRNA 基因的 V4 高变区。

扩增试剂盒是含有热启动高保真 DNA 聚合酶的热启动多重扩增试剂盒。PCR 反应体系: 5 \times KAPA HiFi Buffer 5 μL , KAPA dNTP Mix (10 mmol/L) 0.75 μL , 正、反向引物(10 mmol/L) 0.75 μL , KAPA HiFi Hot Start DNA 酶(1 U/ μL) 0.5 μL , DNA 模板 3 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,

72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用凝胶回收试剂盒回收目的片段, 使用 MiniSeq Mid Output Kit 在 Illuminia MiniSeq 平台上进行高通量测序。

2 结果与分析

本研究的 qPCR 方法是使用带有寡核苷酸探针的 qPCR 半定量检测肠道微生物类群。它提供了一种有效的方法来检测肠道微生物群组成, 并以此来评估饮食习惯和身体健康水平。该方法用于检测和定量如表 1 中所列微生物的特异性寡核苷酸探针。

2.1 流行肠道微生物群落与靶标筛选

通过检索大量关于肠道微生物的文献, 选取 GMrepo 数据库作为参考数据库。从公共数据库中筛选表型(腹泻、健康)和成人扩增子的样本数据, 以获得流行肠道微生物群落图谱。在常见肠道微生物群落中, 通过定量分析和相对丰度值, 最终靶标包括表 2 所示的 10 个分类群, 这 10 个靶标在常见肠道菌群中的覆盖率达到 80%以上。继续从公共数据库中下载了 487 份肠道微生物健康的样本, 通过使用人类内部 16S rRNA 基因参考分类法(HITdb)评估靶标对类别的覆盖率。结果表明, 选定靶标对类别的覆盖率超过 70% (图 1)。

2.2 引物和探针的设计结果与 qPCR 反应条件的优化

根据前文的分析, 从分类单元特定的保守区中得出一致序列, 使用 NCBI 设计引物和探针。引物和探针的设计需满足以下要求: 引物的熔解温度(T_m)为 58-62 $^{\circ}\text{C}$, 探针的熔解温度为 65-75 $^{\circ}\text{C}$, GC 含量为 40%-65%。以这种方式选择的 10 对引物和探针对所调查的分类群

表 2 与人类健康相关的 10 个微生物群作为靶标

Table 2 List of the 10 target taxa in this study

Target	Associations	References
<i>Firmicutes</i>	It is one of the main phyla of human and animal gut microbiota and can produce resistant endospores, bile acid and other important nutritional signaling molecule	[24]
<i>Fusobacteria</i>	Can produce a large amount of butyric acid alone and amplify during the development of colorectal cancer	[15]
<i>Veillonellaceae</i>	It is the main microbiota associated with the severity of fibrosis in obese subjects	[10]
<i>Lachnospiraceae</i>	It is colonized in the intestinal tract from birth and is one of the main producers of short-chain fatty acid	[3]
<i>Akkermansia</i>	It is colonized in the Slime layer of the gastrointestinal tract and takes mucin as the only source of carbon and nitrogen, playing a key role in maintaining intestinal health and regulating host metabolism	[24]
<i>Bacteroides</i>	Gut microbiota can protect against pathogens and provide nutrition for other microorganisms in the gut	[4]
<i>Enterococcus</i>	Multidrug resistance has become the main cause of global healthcare related infections	[24]
<i>Lactobacillus</i>	Play a key role in food biotechnology and human and animal gut health	[7]
<i>Prevotella</i>	Related to human infection, such as gut diseases such as Ulcerative colitis	[13]
<i>Streptococcus</i>	One of the most invasive bacterial communities that can cause diseases such as pneumonia and arthritis	[28]

具有特异性。基于 qPCR 的方法，每个分类单元包含一对引物和一个寡核苷酸探针(表 1)。

以人类粪便 DNA 为模板，PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳验证了引物的特异性，结果

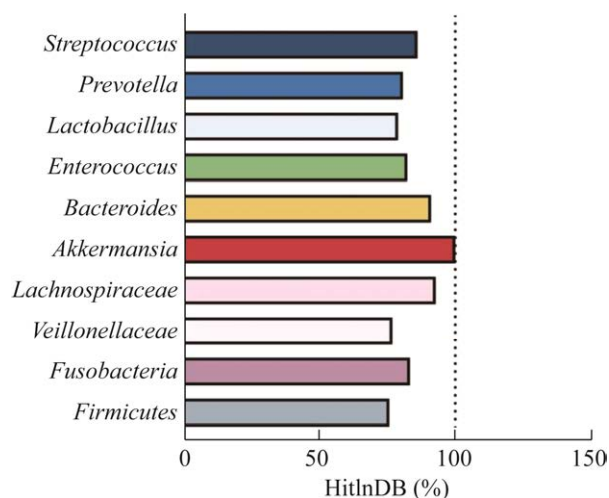


图 1 HITdb 评估目标类别的覆盖率

Figure 1 HITdb evaluates coverage of target categories.

显示了清晰单一的条带，片段大小与预估一致，未出现非特异性扩增条带(图 2)。

为了测试反应条件，通过改变反应中的引物浓度与退火温度，分别设置了 0.25–2.00 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度与 50–65 $^{\circ}\text{C}$ 的温度梯度，通过扩增曲线与 C_t 值的结果和成本的考虑，以及防止出现非特异性扩增，将引物终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 作为最终反应条件(图 3)。

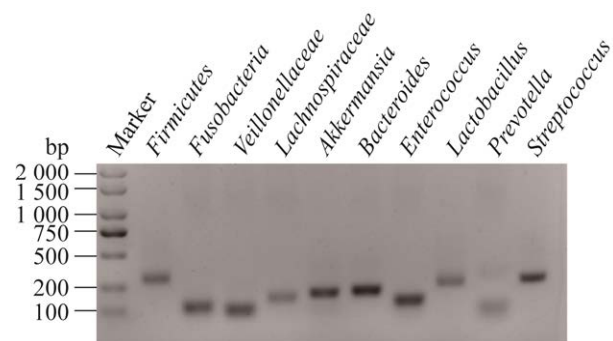


图 2 琼脂糖凝胶电泳验证引物特异性

Figure 2 Verification of primer specificity by agarose gel electrophoresis.

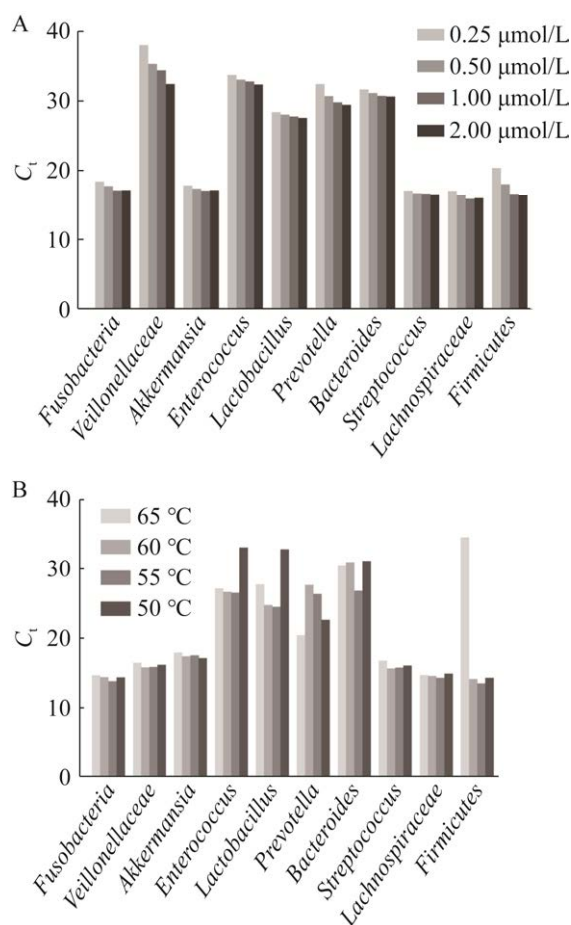


图3 确定 qPCR 反应条件 A: 10 对引物浓度梯度. B: 退火反应温度梯度
Figure 3 Determine the qPCR reaction conditions. A: Primer concentration gradient. B: Temperature gradient.

为了评估检测结果的稳定性, 进行了一孔三靶标的多重扩增与单孔单靶标的单重扩增的差异化分析, 结果显示, 多靶标与单靶标扩增之间并无显著差异, 证明了多靶标在反应时引物之间并不会受到干扰(图 4)。

2.3 标准曲线与 qPCR 方法的特性

根据数据库中已覆盖微生物基因组序列选择一段并合成质粒(金唯智)作为标准品。用稀释 10 倍的标准品绘制标准曲线(具体拷贝数可根据浓度计算)(图 5)。

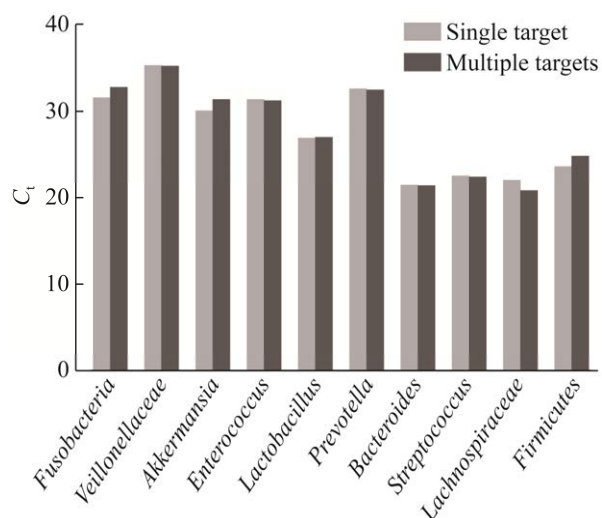


图4 10 种靶标多重扩增与单重扩增的差异性
Figure 4 Differences between multiple amplification and single amplification of 10 targets.

根据连续 10 倍稀释的质粒标准品的扩增分析 qPCR 方法的特性。其中一个引物组的扩增示例如图 6 所示。所有引物组在 83.65%–113.39% 的效率范围内工作, 测定系数高($R^2 > 0.9958$), 证实了结果的高再现性(表 3)。通过与高通量 16S rRNA 基因测序结果比较, 评估证明了 qPCR 方法的特异性。

2.4 qPCR 稳定性检验

通过计算试验样品的变异系数验证了 qPCR 方法具有良好的稳定性, 并且试验样品的 C_t 值满足要求, 同一组重复试验样品 C_t 值的 CV 一般小于 10% (表 4), 证明了该方法具有很高的稳定性。对于体外诊断试剂而言, 精确度对产品质量表征的重要性不言而喻。

2.5 qPCR 与 16S rRNA 基因测序结果比较

通过 qPCR 和 16S rRNA 文库制备(V4 区)测序检测相同的粪便 DNA 样品。qPCR 结果通过标准曲线计算每个目标中每个样品的拷贝数, 并使用细菌总数计算相对丰度。16S rRNA 基因测序结果使用每次读取的分类来获得每个样本的总成分和对应于 qPCR 物种的每个已识

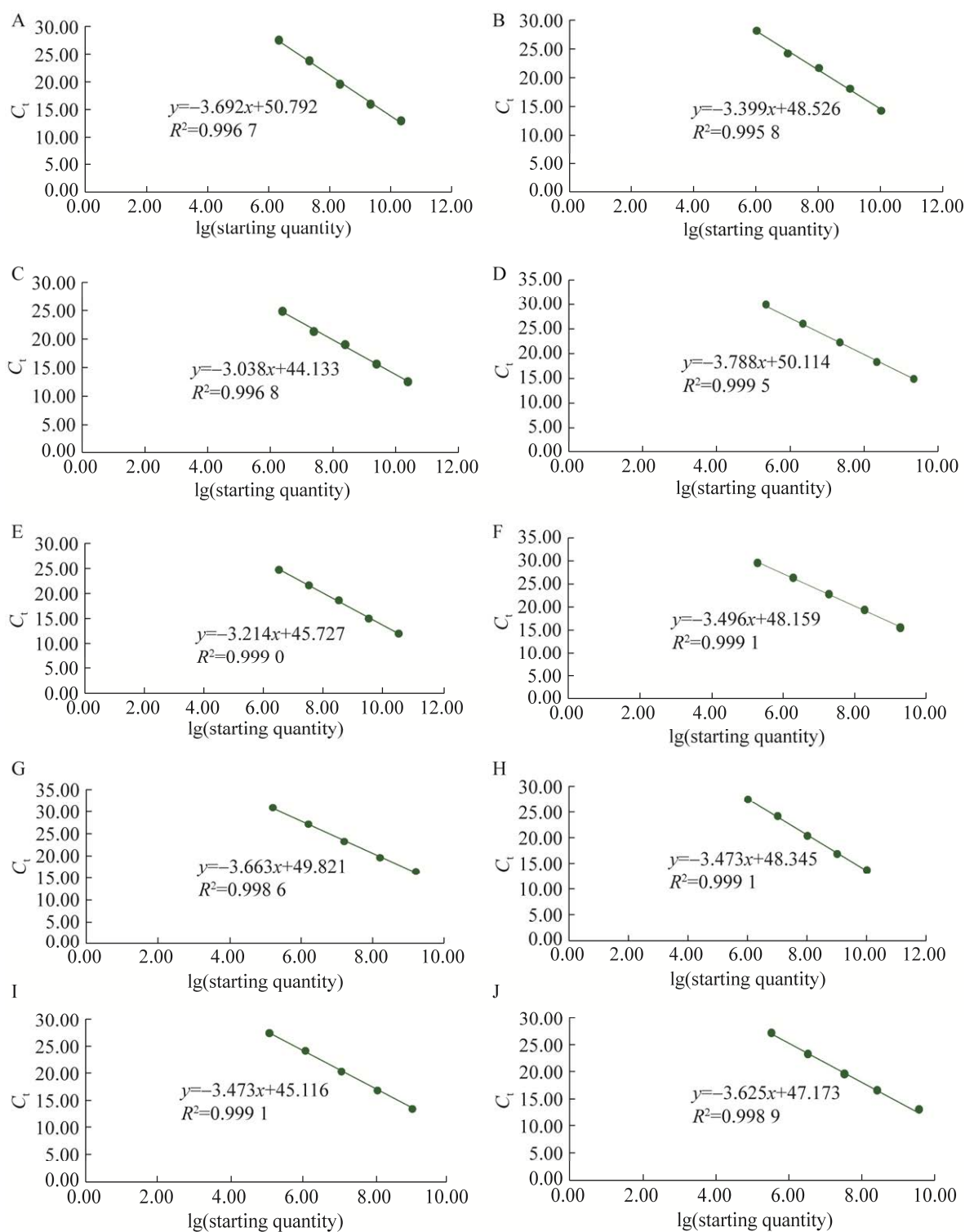


图5 10种靶标的标准曲线

Figure 5 Standard curves for 10 targets. A: *Firmicutes*. B: *Fusobacteria*. C: *Veillonellaceae*. D: *Lachnospiraceae*. E: *Akkermansia*. F: *Bacteroides*. G: *Enterococcus*. H: *Lactobacillus*. I: *Prevotella*. J: *Streptococcus*.

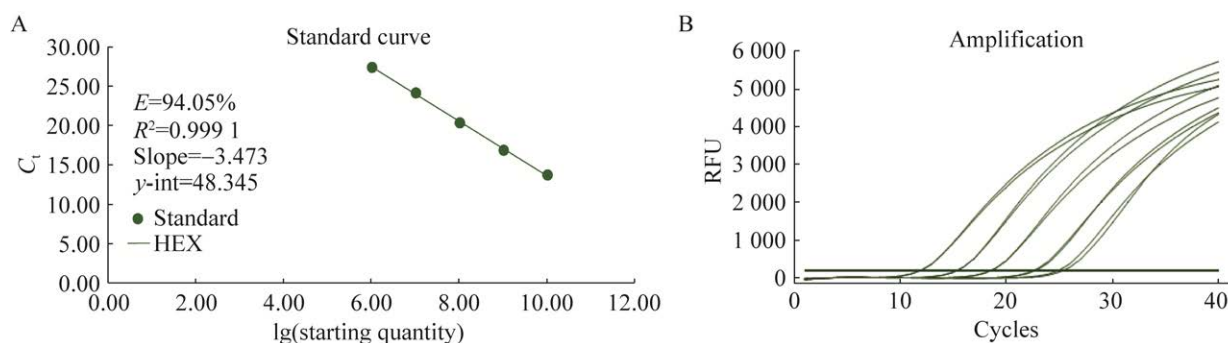


图 6 *Lactobacillus* 的标准曲线与扩增曲线 A: *Lactobacillus* 的标准曲线. B: *Lactobacillus* 的扩增曲线
Figure 6 Example of amplification results (for *Lactobacillus* target). A: Standard curve of *Lactobacillus*. B: Amplification curve of *Lactobacillus*.

表 3 分析 qPCR 特性

Table 3 Analytical characteristics of the qPCR

Target	Slope	y-int	R^2	E (%)
<i>Firmicutes</i>	-3.692	50.792	0.996 7	86.58
<i>Fusobacteria</i>	-3.399	48.526	0.995 8	96.88
<i>Veillonellaceae</i>	-3.038	44.133	0.998 8	113.39
<i>Lachnospiraceae</i>	-3.788	50.114	0.999 5	83.65
<i>Akkermansia</i>	-3.214	45.727	0.999 0	104.71
<i>Bacteroides</i>	-3.496	48.159	0.999 1	93.21
<i>Enterococcus</i>	-3.663	49.821	0.998 6	87.50
<i>Lactobacillus</i>	-3.473	48.345	0.999 1	94.06
<i>Prevotella</i>	-3.473	45.116	0.999 1	94.06
<i>Streptococcus</i>	-3.625	47.173	0.998 9	88.74

表 4 变异系数评估靶标精度

Table 4 Evaluation of target accuracy by coefficient of variation (CV<10%)

Target	Mean	Standard deviation (SD)	CV (%)
<i>Firmicutes</i>	17.19	0.12	0.70
<i>Fusobacteria</i>	36.97	0.25	0.68
<i>Veillonellaceae</i>	19.45	0.15	0.78
<i>Lachnospiraceae</i>	16.14	0.08	0.53
<i>Akkermansia</i>	25.82	0.13	0.51
<i>Bacteroides</i>	23.49	0.19	0.82
<i>Enterococcus</i>	25.54	0.09	0.35
<i>Lactobacillus</i>	30.59	0.18	0.60
<i>Prevotella</i>	20.10	0.11	0.56
<i>Streptococcus</i>	21.72	0.18	0.82

别分类单元的相对丰度。总而言之,当所有分类群和样本的相对丰度值合并时,qPCR 检测结果和 16S rRNA 基因测序结果具有显著相关性(图 7)。

对于 10 个目标类群,大部分靶标的水平在两种方法之间具有显著相关性($P<0.05$) (图 8 和表 5)。其余分类群 *Lactobacillus*、*Lachnospiraceae*、*Enterococcus* 和 *Firmicutes* 相关性不显著($P=0.780 4$, $P=0.362 3$)。

3 讨论

3.1 qPCR 的应用前景

在新型冠状病毒疫情初期,qPCR 被医院、疾控中心以及许多商业实验室和检测机构广泛应用于诊断和监测该病毒的传播。然而从当前流行态势来看,全球报告的新型冠状病毒感染人数、住院人数和 ICU 住院人数、病亡人数都处于持续下降状态,qPCR 相关仪器使用频率也随之降低。为此,我们建立的 qPCR 检测肠道微生物平台可以为科研人员在检测微生物方面提供一个新的发展方向。

3.2 qPCR 检测肠道微生物群的应用优势

由于肠道微生物群失调会导致多种疾病的发展,使用益生元和益生菌来改变肠道微生物

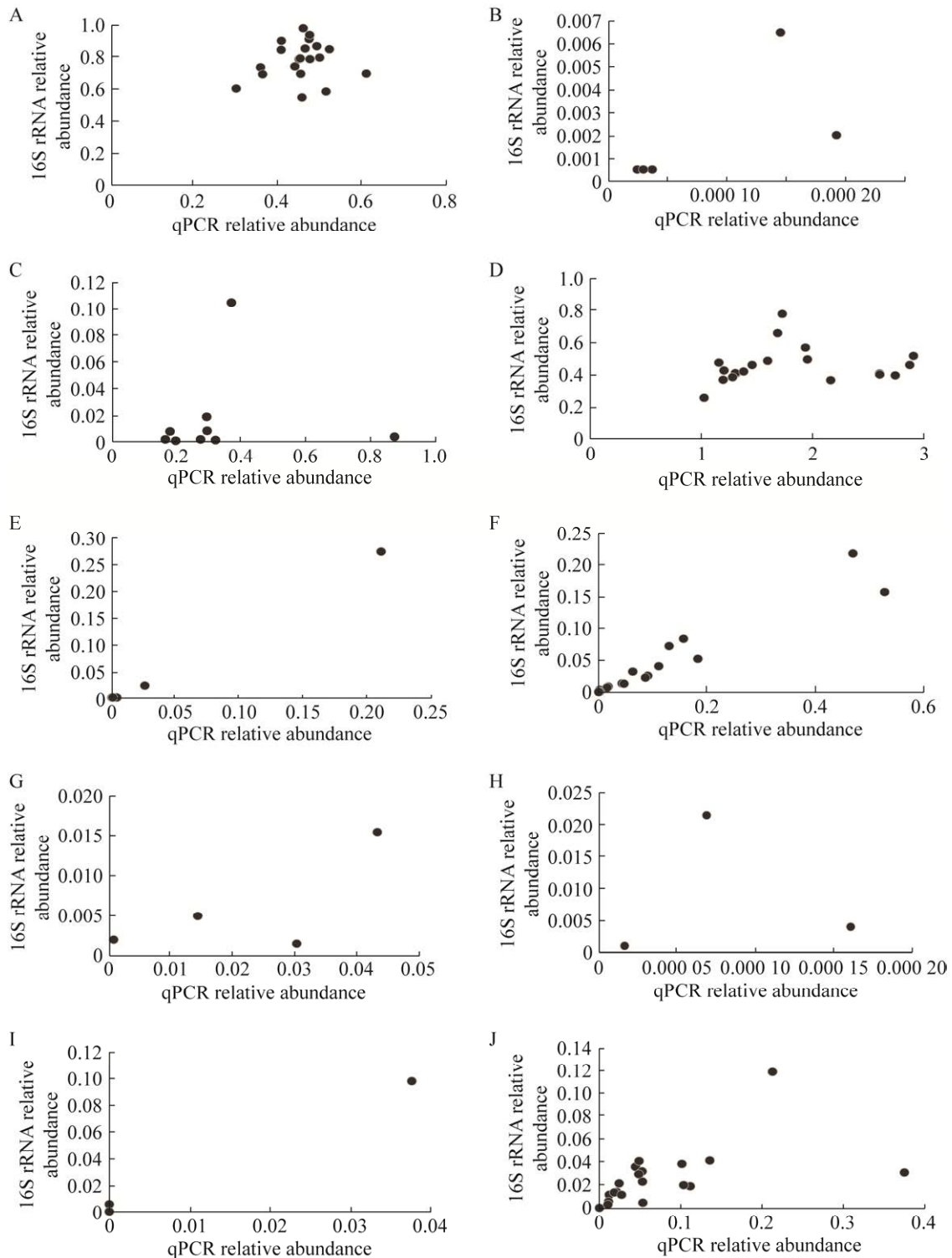


图7 20个样本检测10种靶标两种方法的相关性散点图

Figure 7 Correlation scatter between two methods for detecting 10 targets with 20 samples ($n=20$). A: Firmicutes. B: Fusobacteria. C: Veillonellaceae. D: Lachnospiraceae. E: Akkermansia. F: Bacteroides. G: Enterococcus. H: Lactobacillus. I: Prevotella. J: Streptococcus.

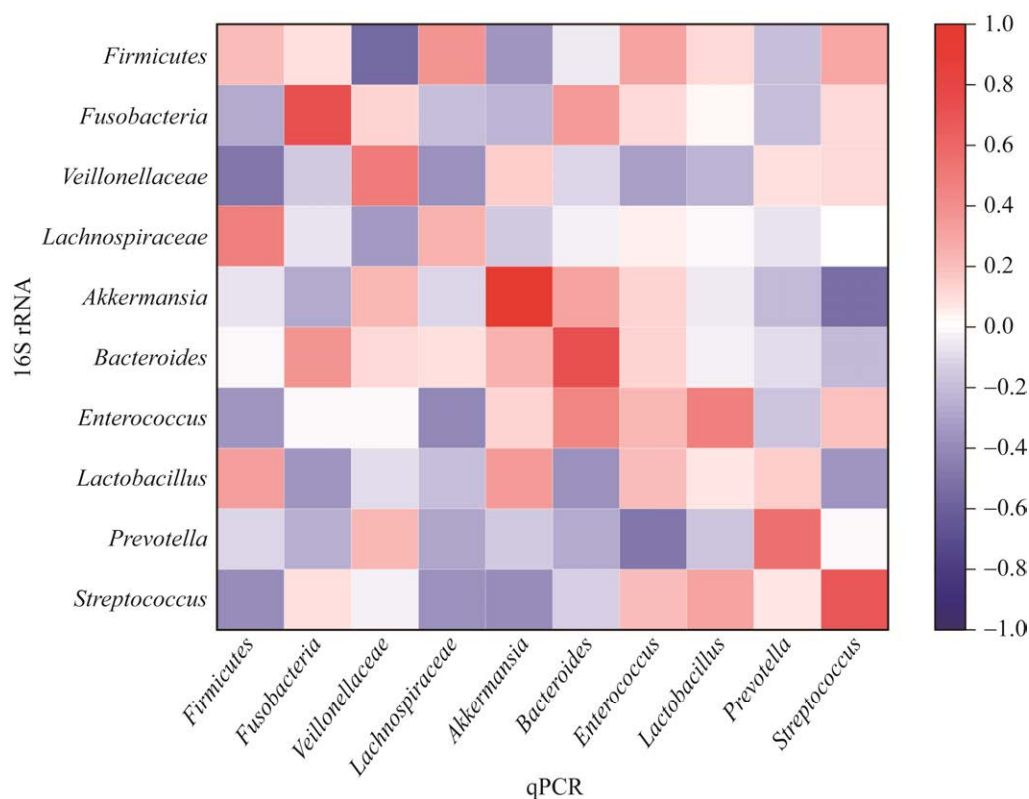


图 8 qPCR 和 16S rRNA 基因测序评价靶标类群水平之间的相关性

Figure 8 Correlation between levels of target taxa evaluated using qPCR values and 16S rRNA gene sequencing. Rows-qPCR data, columns-16S rRNA; Color shows Spearman's correlation coefficient ($P < 0.05$).

群引起了人们的兴趣^[29]。然而,在大量益生菌菌株且不能直接比较的情况下,很难知道患者是否会从服用特定的益生菌中受益。为了帮助人们了解自身肠道健康状况、指导饮食和营养

表 5 qPCR 与 16S rRNA 值的靶标相关性

Table 5 Taxon correlation between PCR and 16S rRNA values

Target	Spearman coefficient	P value
<i>Firmicutes</i>	0.215 12	3.62×10^{-1}
<i>Fusobacteria</i>	0.726 75	2.84×10^{-4}
<i>Veillonellaceae</i>	0.490 74	2.80×10^{-2}
<i>Lachnospiraceae</i>	0.252 73	2.82×10^{-1}
<i>Akkermansia</i>	0.946 28	2.91×10^{-10}
<i>Bacteroides</i>	0.737 36	2.08×10^{-4}
<i>Enterococcus</i>	0.232 31	3.24×10^{-1}
<i>Lactobacillus</i>	0.066 56	7.80×10^{-1}
<i>Prevotella</i>	0.557 35	1.07×10^{-2}
<i>Streptococcus</i>	0.688 98	7.80×10^{-4}

改善,并为相关疾病的诊断和治疗提供重要参考,专家们开发了一些肠道微生物的检测方法,16S rRNA 基因测序无疑是目前微生物检测中最成熟可靠的方法。但该方法由于某些微生物在 16S rRNA 基因上存在变异或缺失,可能存在误识别和漏检,并且对于检测结果的数据解释和分析较复杂,以至于检测时间需 3-7 d,检测费用在极限压缩的情况下达到每个样本 200 元以上。为此,本研究建立了 qPCR 方法,通过 FAM、HEX 和 Texas red 这三通道针对厚壁菌门、梭杆菌门和阿克曼菌属等 10 种肠道中重要的微生物菌进行相对定量检测。经过一系列验证,本研究设计的引物覆盖度达到 80%以上,引物探针的特异性也很高。在多靶标同时检测的情况下,干扰小到可以忽略不计,并且仅 2 h

便可得到检测结果, 成本只需 3-5 元。该方法不仅可以缩短检测时间, 而且在操作和成本上具有相当大的优势。

另外, qPCR 方法与 16S rRNA 基因测序结果的相当一致性表明, 该方法适用于分析人体肠道微生物组的主要成分。相较而言, 本研究所设计快速检测的 qPCR 方法在时间短、成本低的条件下仍能反映肠道微生物的丰度变化, 该方法提供的肠道微生物组分的总体标准曲线仍可用于评估总体失调程度。该方法还可以定量分析微生物的数量, 从而可以更准确地评估肠道微生物群落的组成和相对数量的变化。

4 结论

本研究建立了一种基于荧光标记探针的 qPCR 检测方法, 用于在核酸水平上定量检测肠道微生物, 所设计的引物特异性高, 可以多靶标同时检测, 是一种前瞻性、可迅速评价人肠内微生物组组成的技术。使用 qPCR 和 16S rRNA 基因测序技术两种方法检测肠道微生物的结果大部分一致, 表明了 qPCR 方法的有效性, 而且该方法具有操作简单、时间短、成本低且稳定性高等优点, 在临床和观察性研究中可以更广泛地应用于饮食与疾病等领域。

致谢

感谢徐军明提供测序支持。

REFERENCES

- [1] CANI PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises[J]. *Gut*, 2018, 67(9): 1716-1725.
- [2] RINNINELLA E, RAOUL P, CINTONI M, FRANCESCHI F, MIGGIANO GAD, GASBARRINI A, MELE MC. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(1): 14.
- [3] ZHAO JF, ZHANG XY, LIU HB, BROWN MA, QIAO SY. Dietary protein and gut microbiota composition and function[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2019, 20(2): 145-154.
- [4] SATURIO S, SUÁREZ M, MANCABELLI L, FERNÁNDEZ N, MANTECÓN L, de LOS REYES-GAVILÁN CG, VENTURA M, GUEIMONDE M, ARBOLEYA S, SOLÍS G. Effect of intrapartum antibiotics prophylaxis on the bifidobacterial establishment within the neonatal gut[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1867.
- [5] HEINTZ-BUSCHART A, WILMES P. Human gut microbiome: function matters[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(7): 563-574.
- [6] ADAK A, KHAN MR. An insight into gut microbiota and its functionalities[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2019, 76(3): 473-493.
- [7] HILLS RD Jr, PONTEFRACCT BA, MISHCON HR, BLACK CA, SUTTON SC, THEBERGE CR. Gut microbiome: profound implications for diet and disease[J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1613.
- [8] SAKKAS H, BOZIDIS P, TOUZIOS C, KOLIOS D, ATHANASIOU G, ATHANASOPOULOU E, GEROU I, GARTZONIKA C. Nutritional status and the influence of the vegan diet on the gut microbiota and human health[J]. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2020, 56(2): 88.
- [9] MENG X, ZHANG G, CAO H, YU D, FANG X, de VOS WM, WU H. Gut dysbacteriosis and intestinal disease: mechanism and treatment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(4): 787-805.
- [10] GOMES AC, HOFFMANN C, MOTA JF. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity[J]. *Gut Microbes*, 2018, 9(4): 308-325.
- [11] LI YX, XIA ST, JIANG XH, FENG C, GONG SM, MA J, FANG ZF, YIN J, YIN YL. Gut microbiota and diarrhea: an updated review[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 625210.
- [12] 曹莞婷, 范一宏, 吕宾. 肠道菌群对炎症性肠病诊断的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(3): 190-196.
CAO WT, FAN YH, LV B. Intestinal microbial markers for diagnosis of inflammatory bowel disease[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2019, 27(3): 190-196 (in Chinese).
- [13] KHAN I, ULLAH N, ZHA LJ, BAI YR, KHAN A, ZHAO T, CHE TJ, ZHANG CJ. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): cause

- or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome[J]. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 2019, 8(3): 126.
- [14] LEE M, CHANG EB. Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome-searching the crime scene for clues[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(2): 524-537.
- [15] 宋德心, 王伟东, 高瑞祺, 卫江鹏, 李晓华, 王士祺, 余鹏飞. 肠道菌群在结直肠癌发生发展和诊断治疗中的作用研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(4): 527-536.
- SONG DX, WANG WD, GAO RQ, WEI JP, LI XH, WANG SQ, YU PF. Research progress on role of intestinal flora in occurrence and development as well as diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2022, 31(4): 527-536 (in Chinese).
- [16] KIM SK, GUEVARRA RB, KIM YT, KWON J, KIM H, CHO JH, KIM HB, LEE JH. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(9): 1335-1340.
- [17] DAVIDSON RM, EPPERSON LE. Microbiome sequencing methods for studying human diseases[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N J), 2018, 1706: 77-90.
- [18] ZHOU H, ZHAO X, SUN L, LIU YJ, LV Y, GANG XK, WANG GX. Gut microbiota profile in patients with type 1 diabetes based on 16S rRNA gene sequencing: a systematic review[J]. *Disease Markers*, 2020, 2020: 1-11.
- [19] O'DEA C, HUERLIMANN R, MASTERS N, KUBALLA A, VEAL C, FISHER P, STRATTON H, KATOULI M. Microbial diversity profiling of gut microbiota of *Macropus giganteus* using three hypervariable regions of the bacterial 16S rRNA[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1721.
- [20] BOERS SA, JANSEN R, HAYS JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2019, 38(6): 1059-1070.
- [21] GALLOWAY-PEÑA J, HANSON B. Tools for analysis of the microbiome[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2020, 65(3): 674-685.
- [22] JEONG J, MUN S, OH Y, CHO CS, YUN K, AHN Y, CHUNG WH, LIM MY, LEE KE, HWANG TS, HAN K. A qRT-PCR method capable of quantifying specific microorganisms compared to NGS-based metagenome profiling data[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 324.
- [23] POSTERARO B, de MAIO F, GASBARRINI A. Profiling the gastrointestinal microbiota[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2021: 83-92.
- [24] 汪洪涛. 肠道微生物与人体健康的关系及其影响因素研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(1): 175-181.
- WANG HT. Research progress on the relationship between intestinal microorganisms and human health and its influencing factors[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(1): 175-181 (in Chinese).
- [25] KURINA I, POPENKO A, KLIMENKO N, KOSHECHKIN S, CHUPRIKOVA L, FILIPENKO M, TYAKHT A, ALEXEEV D. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 52: 101570.
- [26] CHEN L, ZHANG XY, ZHI XS, DAI Y, ZHANG P, XIAO YC, SHEN ZY. Tracking faecal microorganisms using the qPCR method in a typical urban catchment in China[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2020, 192(3): 158.
- [27] CHEN SW, GONG PM, ZHANG JM, SHAN YJ, HAN X, ZHANG LW. Use of qPCR for the analysis of population heterogeneity and dynamics during *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* batch culture[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2021, 49(1): 1-10.
- [28] SCHRIEFER AE, CLIFTEN PF, HIBBERD MC, SAWYER C, BROWN-KENNERLY V, BURCEA L, KLOTZ E, CROSBY SD, GORDON JI, HEAD RD. A multi-amplicon 16S rRNA sequencing and analysis method for improved taxonomic profiling of bacterial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 154: 6-13.
- [29] ŻÓLKIEWICZ J, MARZEC A, RUSZCZYŃSKI M, FELESZKO W. Postbiotics-a step beyond pre- and probiotics[J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2189.