

分子生物学技术在肠道菌群研究中的进展

黄卫强 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:人的肠道中栖息着大量微生物,这些微生物与宿主形成一个相互依赖且相互制约的微生物生态系统。肠道菌群结构与遗传、饮食、疾病、环境等因素存在千丝万缕的联系,其地位与作用相当于一个后天获得的“器官”,对人体的消化、营养吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节、抗病等诸多方面有不可替代的作用,因此,研究人的肠道菌群具有十分重要的意义和作用。本综述着重论述荧光原位杂交(FISH)、基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳(Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术、实时荧光定量 PCR (Real-time polymerase chain reaction)技术、基因芯片(Gene chip)技术及以焦磷酸测序平台为代表的第二代测序技术等多种分子生物学技术在肠道菌群研究方面的应用,并对未来肠道菌群方面的研究进行展望。

关键词:肠道菌群, 荧光原位杂交, 基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳, 实时荧光定量 PCR, 基因芯片, 焦磷酸测序

Research advancement of molecular biological technology in the study of intestinal flora

HUANG Wei-Qiang ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: Abundant of microorganism colonized in the gastrointestinal tract. They constructed a mutually dependent and restrained micro-ecological environment with the host. The composition of gut microbiota was closely related with the gene, dietary, health state and environment of the host. Furthermore, the gut microbiota was regarded as a post natal acquired organ and they played important roles in nutrient absorption and digestion, energy supply, fat regulating, intestinal epithelium renewal stimulating and immune system directing. This review focused on the research advancement of some modern molecular biotechnology in intestine microorganism research, including fluorescence *in situ* hybridization (FISH), polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), gene chip and pyrosequencing platform as the representative of the second generation sequencing technology. In additions, it also made a future prospect for the study of intestinal flora.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100902); 内蒙古自治区应用技术研发资金计划项目(No. 20110734)

*通讯作者: Tel: 86-471-4319940; Fax: 86-471-4305357; ✉: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2013-07-10; 接受日期: 2013-11-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

Keywords: Intestinal flora, FISH, PCR-DGGE, RT-PCR, Gene chip, Pyrophosphate sequencing

人的肠道,像一艘承载微生物的“航空母舰”,栖息着种类繁多、数量庞大的微生物。有报道称,人的肠道内定殖有 400–500 种不同的细菌。其细胞数量(约 10^{14})是人体细胞数量(约 10^{13})的 10 倍左右^[1],其中优势菌大多为厌氧菌。可培养的肠道菌大致分为:肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、肠球菌(*Enterococcus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、梭菌属(*Clostridium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和酵母菌属(*Yeast*)^[2]八大部分,这些菌属对于庞大的肠道菌群而言,仅仅是冰山一角。未被人们所熟知的肠道菌仍占总肠道菌群数的 80%^[3]。从功能的角度,肠道菌群的地位与作用几乎相当于一个后天获得的“器官”,对人体健康和正常的生理代谢有重要作用,如帮助人类消化食物^[4]、代谢药物及外源复合物^[5]、合成维生素^[6]、抑制病原体的侵袭^[7]、影响免疫机能的发育等。同时,肠道菌群还为宿主基因水平上的功能多样性研究提供了方向^[8]。从进化的角度,肠道菌群与宿主一同进化,直接或间接参与人体的消化、营养吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节、抗病等诸多方面^[9-10]。健康的宿主与健康的肠道菌群密不可分,宿主在受肠道菌群影响的同时也会影响肠道菌群的结构与组成,这些影响因素包括遗传因素^[11-13]、饮食差异^[14]、健康状态^[15]、环境因素^[16]等多个方面;相关报道还表明,疾病和药物也会改变肠道菌群的结构和活性^[17-18]。由此可见,这个繁冗的“肠道菌群大本营”亟待深入研究。

1 适用于肠道菌群研究的分子生物学技术

许多经典方法在肠道菌群研究方面一直沿用,如研究菌落特征、菌体形态、生理生化特征、代谢产物等指标,这些传统方法主要是建立在纯培养技术之上的,所以相对而言耗时、费力且操作复杂,而且很大程度上受培养条件的制约,这往往造成研究结果的不稳定性,导致不能全面、客观地反映肠

道菌群的真实情况。分子生物学技术的快速发展为肠道菌群研究提供了全新的方法和思维,它克服了传统方法的限制,使得科研工作者可以从基因水平估计出种的丰度和均匀度,分清楚种的变异情况,从而客观地认识微生物天然的生态状况。特别是宏基因组理论的提出以及与之相结合的技术逐步问世,更提供了成套的基于非培养的微生物研究技术^[19]。1996年,Suan等利用不依赖于培养的分子生物学技术第一次较为全面地对人体粪便肠道菌群进行了研究,显示只有24%的序列是前人已发现的肠道菌群,而76%的序列属于亟待研究的未知菌,这进一步说明了肠道菌群的多样性远远超乎人们的想象^[20]。经过长期的摸索和试验,科研工作者们总结出了一系列适用于肠道菌群研究的分子生物学技术,主要包括荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳(Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术、实时荧光定量PCR (Real-time polymerase chain reaction)技术、基因芯片(Gene chip)技术及测序技术等。

1.1 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交技术是20世纪80年代在核酸分子杂交基础上发展起来的一门技术,1989年DeLong等^[21]首次使用荧光标记寡核苷酸探针检测单个微生物细胞。经过多年的逐步发展和完善,形成了现在的FISH技术。它是一种应用非放射性荧光物质依靠核酸探针杂交原理在核中或染色体上显示DNA序列位置的方法^[22]。该方法根据目标微生物16S rRNA基因序列的相对保守区域设计寡聚核苷酸探针,利用荧光素进行标记,与靶细菌杂交,通过检测目标序列来确定微生物的种类、数量及空间分布。2002年Swidsnski A.等利用FISH技术研究了肠炎患者的肠粘膜菌群,发现随着病人疾病程度的加重,其肠粘膜上的菌群密度也增大^[23]。同年,Kaouthar B. A.等利用FISH技术对人类粪便中难

于培养的卵胃球菌样细菌(*Rum inococcusobeum-likebacteria*)进行了鉴定和计数,发现此类细菌是人类粪便中极其重要的组成部分^[24]。2004年,Matsuki等^[25]应用FISH技术对6名健康志愿者肠道内的6大优势菌群进行了研究,结果显示球形梭菌(*Clostridia coccoides*)的含量为10.4 logCFU/g,柔嫩梭菌(*Clostridia leptum*)为10.1 logCFU/g,脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis* group)为10.7 logCFU/g,双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)为9.8 logCFU/g,奇异菌属(*Atopobiumcluster*)为9.9 logCFU/g,普氏菌属(*Prevotella*)为10.1 logCFU/g。

实际上,FISH技术仍然存在一些不足。从研究对象来看,FISH技术只能面向已知序列的微生物进行研究;并且从研究范围上讲,FISH只能鉴定到门、纲的分类级别,且细菌普遍存在自发荧光现象及探针的特异性不足还可能导致假阳性结果。所以FISH技术还需要与其它分子生物学技术结合使用,才能达到更好的效果。

1.2 基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳技术

该技术是近年来国内外应用比较广泛的分子生物学技术之一。这一方法的原理是先在体外循环进行DNA模板解链、引物与DNA模板结合、DNA聚合酶催化形成新的DNA链的过程,以此来快速扩增目的基因或DNA序列。在这个基础上,根据双链DNA分子碱基组成的差异,在变性凝胶电泳时所需不同的变性剂梯度而滞留于凝胶的不同位置,形成相互分开的谱带^[26],从而可以分离大小相近的DNA片段,检测到只有一个碱基差异的DNA片段,进而通过凝胶上形成条带的数目和丰度反映微生物多样性信息,然后与GenBank中的标准序列进行比较,就可以得出它们的遗传相关性。Muyzer G.等^[27]首次将该技术应用于微生态的研究,克服了传统方法由于微生物难培养或不可培养所带来的局限,并且具有可重复性、高效、操作简便等优点,因此在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面显示出明显的优越性。当然

PCR-DGGE技术还存在一定的局限性。例如,用于DGGE分析的PCR产物,一般要求DNA长度在500 bp以下,否则DGGE的分辨率会下降,而且PCR产物在电泳时有时会出现“共迁移”现象,使不同序列的DNA片段出现在同一条带上,这给条带的回收及测序带来困难^[28]。此外,PCR-DGGE的指纹图谱上通常仅显示微生物群落中的优势种群,所以只能对菌体数量大于总菌量1%的菌群进行分析。另外,DGGE的结果会受到较多因素的影响,如采样过程中的无菌操作、样品预处理过程、引物的选择、预试验测定的电泳条件等。当然,这些不足可以通过和其他一些方法如传统培养、杂交技术以及测序技术等相配合来进行部分弥补^[29],从而更全面地认识微生态的组成和动态变化。所以,在对像肠道菌群这样复杂环境样品的微生物多样性研究中,PCR-DGGE技术仍然是一种很好的研究手段。

1.3 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术是定量 PCR (QPCR)的一种,简称为 QRT-PCR,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。常规 PCR 由于本身的平台效应不能够进行精确定量,而荧光定量 PCR 由于利用扩增进入指数增长期的 C_t 值来定量起始模板的量,真正反映产物含量与模板浓度直接关系,使得整个 PCR 过程中的产物含量随时得到监测成为了可能,实现了极为精确的核酸定量检测。RT-PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出,其问世实现了 PCR 从定性到定量的飞跃^[19]。由于该方法高效、准确的定量特性,目前,已成功用于人类、仔猪肠道及反刍动物瘤胃中某些特定菌群的定量分析。2004 年,Bartosch S.等使用 RT-PCR 和 DGGE 相结合的方法对健康老人和长期服用抗生素类药物老人的肠道菌群进行了分析。结果表明,健康老人肠道菌群的种类和有益菌群的数量明显高于长期服用抗生素类药物的老人^[30]。Chen Y.等应用 RT-PCR 对肝硬化患者与健康人粪便中微生物群

落的比较,研究结果提供了迄今为止最全面的肝硬化患者的肠道菌群结构和组成,为以后肝硬化病的研究奠定了基础^[3]。2009年,Endo A.等利用RT-PCR等技术对12匹南非马的粪便进行了分析,发现乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和魏斯氏菌(*Weissella*)是这些马肠道中的优势菌群^[31]。

当然,RT-PCR尚存在一些不足之处。例如荧光素种类以及检测光源的局限性就会不同程度地限制实时定量PCR的复合式检测应用能力。所以在应用于肠道菌群研究时,RT-PCR还需要与传统的研究方法配合使用,这样才能发挥更高的功效。

1.4 基因芯片技术

基因芯片技术是近年快速发展的一种基于杂交测序(Sequencing by hybridization, SBH)的分子生物学技术,是指在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将制备的DNA探针以显微打印的方式有序地固化于支持物表面,然后与标记的样品核酸杂交,最终得出遗传信息、基因序列及表达的信息等相应的生物学信息。有报道表明,基因芯片对每种靶细菌的灵敏度均可以达到 10^3 CFU/mL,而实验中的PCR电泳检测的灵敏度只达到 10^5 CFU/mL,明显低于基因芯片技术^[32],并且可以同时对上千个基因进行快速分析。因此该技术的高通量、灵敏度、自动化程度和准确性都很可观。基于这些特点,在对成分复杂的样品,如肠道菌群进行研究时,基因芯片技术展现出很大的优势^[33]。在对肠道菌群基因的功能进行研究时,基因芯片同样可以自动、快速地检测出成千上万种基因的表达状况,极大地提高了基因表达研究的效率和准确性。Dobrindt U.等^[34]应用基因芯片技术研究分析了肠道环境中共36株大肠杆菌,研究表明研究对象中部分有致病菌性的大肠杆菌在变异过程中一部分基因片段发生缺失,以及通过噬菌体而获得基因片段,此外该项研究还发现大量与大肠杆菌基因组中与毒力相关的关键基因,这实质上是对基因保守区域和非保守区域开展的,以此为契机分析不同微生物之间的亲缘关系与进化关系^[35]。近年来,这项

技术正广泛应用于病原微生物的检测研究^[36]。戈海泽等^[37]在针对细菌16S rRNA、23S rRNA基因序列建立的基因芯片检测系统,可以快速准确地鉴定临床常见的十余种肠道致病菌,较传统的细菌培养检测技术具有更高的效率,实现了更清晰、更快速地诊断患者的病症,从而得到及时治疗。当然,基因芯片技术研究体系仍然存在一定的提升空间,比如提高芯片的特异性、增加信号检测的灵敏度,这些都可以为肠道菌群的研究提供更为广阔的应用前景,从而推动该领域研究达到一个新的高度。

1.5 以焦磷酸测序平台为代表的第2代测序技术

肠道菌群的发展、进化与宿主的代谢、遗传、饮食习惯都存在一定的关系。在目前看来,尽管上述方法的应用为人们认识肠道菌群生态学提供了新的视角,然而仅从定性和定量的角度去分析肠道菌群的变化还是不能达到预期的目的,因为这些方法没能实现在一次试验中全面、平行分析多个样本中的微生物群落信息,因而也不能对不同来源的多样本间微生物分子生态学进行关联分析。因此,从某种程度上讲,这些区别于传统研究方法的非培养的分子生物学技术仍然不能满足人们研究肠道菌群领域的需求。测序技术的出现,无疑是注入了一股新鲜的血液,使得肠道菌群领域的研究迎来了突飞猛进的“第二春”。尤其是基于焦磷酸测序原理的Recho454第2代测序平台(Pyrosequencing)的问世更是为全面、快速、准确地研究微生态环境中微生物多样性提供了全新的方式,该方法的原理是:在焦磷酸测序的反应体系中会存在4种酶,分别为DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶,反应底物为5'-磷酸硫酸以及荧光素,在反应体系中还包括待测序DNA单链和测序引物。当引物与模板DNA复性后,在上述4种酶的协同作用下,每一个dNTP的聚合会与一次荧光信号的释放偶联起来,最终以荧光信号的形式实时记录模板DNA的核苷酸序列。焦磷酸测序的出现在文库制备、模板制备、测序三大困扰一代测序的瓶颈上取得了巨大的突破。真正做到了低价大规模平行测序

反应。目前已经开展的研究有从头测序、重测序、SNP (Single nucleotide polymorphism) 单核苷酸多态性、转录组及表达谱分析、小分子 RNA 研究、转录调控研究。

1.5.1 利用测序技术研究肠道菌群多样性:随着科学技术的不断进步,一些科研工作者逐步发现,过去只拘泥于以“核心菌群”为概念对肠道菌群开展研究的思维方式已经不能满足如今的科研需求,目前国际上一些较为前沿的实验已在推行倾向于“肠道菌群的动态组合”为概念的研究方式。这样一来,使得肠道菌群多样性的研究更加趋于多元化和系统化^[18]。2010年,Carlotta D. F.等^[38]应用焦磷酸测序技术对15名欧洲儿童和14名非洲布基纳法索儿童的肠道菌群进行了研究,发现在这29名儿童肠道菌群中,放线菌(*Actinobacteria*)、拟杆菌(*Bacteroides*)、厚壁菌(*Firmicutes*)、变形菌(*Proteobacteria*)这四大类占到了94.2%,这个结果也与之前的研究结果大致符合。该研究结果表明,饮食习惯和环境差异对肠道菌群的结构和组成均存在较大影响。随着454测序仪的不断更新,片段读长也在逐渐增加。Drago L.等利用焦磷酸测序技术从定量和定性两个角度对百岁老人和成年人的肠道菌群进行了分析研究,发现分离自百岁老人和年轻成人的乳杆菌和双歧杆菌是大致相当的,其中长双歧杆菌被认为是百岁老人肠道的特征菌群,乳杆菌的各亚种的比例在两个组别之间存在显著的差异。此外,百岁老人与成年人相比,肠道中肠杆菌科细菌明显减少了,而梭状芽胞杆菌有明显增多^[2]。Turroni F.等对意大利、西班牙和爱尔兰3个地区的以母乳或配方奶为喂养方式,阴道或剖腹产为分娩方式的11个健康婴幼儿肠道粪便样品的双歧杆菌的V6、V8两个高可变区的16S rRNA PCR扩增产物进行焦磷酸测序。结果表明,婴儿粪便中占主导地位的是双歧杆菌,占到了80.6%。并且分类学水平的研究显示婴儿肠道菌群主要被双歧杆菌中的长双歧杆菌主导,而其他的双歧杆菌亚种尚存在一些不明的影响因素^[39]。

1.5.2 利用测序技术研究肠道菌群与疾病的关系:对于个体来讲,无论是处于健康或者疾病状态下的生理代谢特性都不可避免地受到肠道菌群结构变化的影响。相关人员通过研究肝功能受损人群的肠道,发现双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、类杆菌(*Bacteroides*)等专性厌氧菌减少,而肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、肠球菌(*Enterococcus*)、酵母菌(*Yeast*)等兼性厌氧菌增加^[12],Chen Y.等^[3]利用454焦磷酸测序对包括36例肝硬化患者和对照组的24名健康人共60名志愿者的粪便微生物群落V3区进行了研究。发现肝硬化患者粪便微生物与健康对照组相比,普雷沃氏菌(*Prevotellaceae*)显著升高,变形杆菌(*Proteus bacillus vulgaris*)和梭菌(*Clostridium*)高度富集,肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)和链球菌(*Streptococcus*)较多,发现这些肠道菌群失调对肝硬化的并发症也起到了重要的作用,其中粪肠球菌是造成肝硬化感染的主要原因之一,与之前的研究结果相吻合。Nakayama J.等^[40]用焦磷酸测序技术研究了婴儿肠道菌群与过敏疾病患病率之间的关系,得出了婴儿肠道菌群与过敏性疾病也是相关的,发现在过敏婴儿与非过敏婴儿之间变形菌的丰度存在显著差异,并且过敏婴儿肠道中的克雷伯杆菌属也是显著低于非过敏婴儿的。2008年,McKenna P.等首次利用带有Barcode的454测序技术研究了患有慢性肠炎和正常短尾猿的100个肠道菌群样品,发现患有慢性肠炎的短尾猿的肠道菌群与正常短尾猿的肠道菌群存在显著的差异^[41]。许多研究表明,关于肠道菌群及其新陈代谢的大量测序数据显示出了主要微生物之间的互利共生代谢和改变类脂物代谢作用。这些包含与类脂物代谢作用相关的基因的蛋白质对肠道菌群变化的影响可以在某种程度上解释隐藏在大量临床数据背后的一些潜在机制^[42]。因此,肠道菌群的深入研究可能会使一些疑难杂症得以治疗。Hazel Mitchell等研究了一种长期以来缺乏十分有效治疗手段的疑难杂症,这是一种消化道的慢性、反复发作和非特异性的透壁性炎症,被称为克罗恩氏病。他们用

焦磷酸测序对克罗恩氏病患者与健康人的肠道菌群进行研究发现: 克罗恩氏病患者拟杆菌门(Bacteroides)和变形菌门(Proteobacteria)的比例显著高于健康人。拟杆菌门(Bacteroides)和厚壁菌门(Firmicutes)在克罗恩氏病患者的肠道中的出现频率也是相关联的。在克罗恩氏病患者肠道中, 厚壁菌门(Firmicutes)显著低于健康人, 而这很大程度上是由于其中梭状芽胞杆菌(*Clostridium*)的变化^[43]。这项研究也从侧面反映出肠道菌群方面研究的新思路, 只有把肠道菌群作为一个动态系统而非组成菌相互独立的静止系统来分析, 才能清楚得出各组成菌的作用以及它们之间复杂的关系。就目前的研究水平而言, 肠道菌群结构的变化与某种疾病的发生、发展和痊愈究竟是谁决定和影响谁还鲜有报道, 但有一点可以肯定, 通过改变肠道菌群的结构和组成, 可以对宿主的健康产生影响, 同时也可能为某些疾病的治疗提供帮助^[19]。随着相关方面研究的不断发展, 将逐渐明确具体的微生物谱系与各类疾病的内在联系, 得出各类疾病的特定肠道菌群, 这样就可以通过检测肠道菌群的结构来分析其是否患有某种疾病。因此, 理解肠道菌群与宿主生理病理的关系将会是未来个性化医疗的重要部分。

1.5.3 利用宏基因组测序理念研究肠道菌群: 一些前沿的学者认为, 要想在肠道菌群方面研究实现新的跨越, 就需要以大规模基因组学研究作为向导, 从而通过宏基因组的数据来推导肠道菌群的功能^[44]。由于宏基因组包含了可培养和不可培养在内的所有肠道菌群的基因, 因此研究结果更加全面和系统。2008年 Finkbeiner S. R.等通过对12个腹泻儿童肠道内容物进行宏基因组测序, 研究腹泻儿童肠道中病毒的生物多样性, 结果显示扩增得到的病毒序列与 GenBank 病毒库中的已知序列同源性很低, 以此推断出这些病毒与人的腹泻疾病可能存在很大的相关性^[45]。2011年, Gupta S. S.等利用宏基因组测序从营养不良和健康的儿童粪便DNA样品中分别读取了1 496 170和1 271 252个高质量的序列。研究结果表明: 营养不良儿童的肠道细菌谱

系较健康儿童是显著丰富的^[46]。不可否认, 宏基因组(Metagenomics)测序的出现进一步拓展了人类研究肠道菌群的深度和广度, 为肠道菌群方面研究提供了新的思路。

2 展望

就目前现状看, 应用分子生物学技术开展的肠道菌群研究已经发展到相当高的水平, 但研究者们并没有停止前进的脚步。近年, 新的测序技术及手段如雨后春笋般不断涌现, 第3代测序技术也随着潮流初露端倪, 它颠覆了过去依赖于以DNA模板进行PCR扩增, 使DNA模板与固体表面相结合边合成边测序的模式, 它采用直接以单分子测序的模式, 使测序的过程更加精细和准确, 结果更切合实际。如今, 业界已有多家公司正致力于这一新型测序技术的研发, 如生物科学公司(Bioscience corporation)的HeliScope单分子测序仪(HeliScope single molecular sequencer)、太平洋生物科学公司(Pacific Biosciences)的单分子实时DNA测序技术(Single molecule real-time DNA sequencing technology)以及牛津纳米孔技术公司(Oxford nanopore technologies Ltd.)的纳米孔单分子测序技术等。斯坦福大学的科研工作者已经利用Heliscope单分子测序仪, 耗资48 000美元、历时28 d, 成功对一名白人男子的基因组进行了测序, 序列读长24–70 bp, 平均读长为32 bp, 并鉴定出280万个SNP位点和752个拷贝数变异, 覆盖了人类参考基因组的90%。

Pacific Biosciences 测序公司的工程师Turner^[47]曾预言, 第3代测序将会实现更短的测序时间、更低廉的成本、更强的灵活性、更高的通量、更长的读取长度、更高的测序质量等一系列目标。随着肠道菌群研究的发展, 科研工作者们将会一如既往地致力于对已有技术最佳联合应用的反复摸索和对新型技术的不断研发, 逐步实现新型分子生物学技术和不可替代的经典传统培养方法更好的协同配合使用, 逐步将更先进的DNA测序技术推广为常规实验手段, 使科研工作者能够更全面、更

精确地分析肠道菌群,从而为肠道菌群方面的研究带来新的、革命性的飞跃。

参 考 文 献

- [1] Rabiou BA, Gibson GR. Carbohydrates: a limit on bacterial diversity within the colon[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2002, 77(3): 443-453.
- [2] Drago L, Toscano M, Rodighiero V, et al. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2012, 46(8): 1-4.
- [3] Chen Y, Yang F, Lu H, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis[J]. Hepatology, 2011, 54(2): 562-572.
- [4] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5445-5451.
- [5] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(5): 431-438.
- [6] Tamura Z. Nutriology of bifidobacteria[J]. Bifidobacteria Microflora, 1983, 3: 3-16.
- [7] Huijsdens XW, Linskens RK, Koppes J, et al. Detection of helicobacter species DNA by quantitative PCR in the gastrointestinal tract of healthy individuals and of patients with inflammatory bowel disease[J]. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, 2004, 41(1): 79-84.
- [8] Dumas ME, Barton RH, Toye A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(33): 12511-12516.
- [9] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [10] Xu J, Bjursell MK, Himrod J, et al. A genomic view of the human-bacteroides thetaiotaomicron symbiosis[J]. Science, 2003, 299(5615): 2074-2076.
- [11] Finegold SM, Molitoris D, Song Y, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism[J]. Clinical Infectious Diseases, 2002, 35(1): 6-16.
- [12] Kerckhoffs AP, Samsom M, van der Rest ME, et al. Lower bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patient in irritable bowel syndrome patients[J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(23): 2887-2892.
- [13] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(7402): 222-227.
- [14] Hansen EE, Lozupone CA, Rey FE, et al. Pan-genome of the dominant human gut-associated archaeon, *Methanobrevibacter smithii*, studied in twins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(1): 4599-4606.
- [15] Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy[J]. Cell, 2012, 150(3): 470-480.
- [16] Andersen AD, Mølbak L, Michaelsen KF, et al. Molecular fingerprints of the human fecal microbiota from 9 to 18 months old and the effect of fish oil supplementation[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2011, 53(3): 303-309.
- [17] Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(1): 4578-4585.
- [18] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(1): 4554-4561.
- [19] 张家超, 孙志宏, 张和平, 等. 以 *Lactobacillus casei* Zhang 研究为例分析益生菌对肠道菌群的影响[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 58-68.
- [20] Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 4799-4807.
- [21] DeLong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylongenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single microbial cells[J]. Science, 1989, 243(4896): 1360-1363.
- [22] 马莉贞. 荧光原位杂交技术及其应用[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 2001, 19(1): 18-21.
- [23] Swidsniski A, Ladhoff A. Mucosal flora in inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 2002, 122(1): 44-54.
- [24] Zoetendal EG, Kaouthar BA. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4225-4232.
- [25] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7220-7228.
- [26] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gel: correspondence with melting theory[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983, 80(6): 1579-1583.
- [27] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [28] Yang CH, Crowley DE. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 345-551.

- [29] van der WD. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*[J]. Annual Review of Microbiology, 1989, 43: 69-87.
- [30] Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, et al. 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3575-3581.
- [31] Endo A, Futagawa EY, Dicks LM. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE[J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 651-655.
- [32] Hagens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 513-519.
- [33] Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, et al. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(7): 2398-2407.
- [34] Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, et al. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(6): 1831-1840.
- [35] Kato MM, Gao Q. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts[J]. Cell Microbiology, 2001, 3(11): 713-719.
- [36] Liu YT. A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases[J]. Infectious Disorders Drug Targets, 2008, 8(3): 183-188.
- [37] 戈海泽, 梁慧敏. 基因芯片技术在常见肠道致病菌感染检测中的应用[J]. 山东医药, 2013, 53(4): 24-26.
- [38] Carlotta DF, Duccio C, Monica DP, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(33): 14691-14696.
- [39] Turrone F, Peano C, Pass DA, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota[J]. PLoS One, 2012, 7(5): 36957-36967.
- [40] Nakayama J, Kobayashi T, Tanaka S, et al. Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, 2011, 63(3): 397-406.
- [41] McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, et al. The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(2): 20-30.
- [42] Usami M, Miyoshi M, Kanbara Y, et al. Analysis of fecal microbiota, organic acids and plasma lipids in hepatic cancer patients with or without liver cirrhosis[J]. Clinical Nutrition, 2013, 32(3): 444-451.
- [43] Kaakoush NO, Day AS, Huinao KD, et al. Microbial dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(10): 3258-3266.
- [44] Rosendale DI, Blatchford PA, Sims IM, et al. Characterizing kiwifruit carbohydrate utilization *in vitro* and its consequences for human faecal microbiota[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(12): 5863-5875.
- [45] Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, et al. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(2): 1000011-1000021.
- [46] Gupta SS, Mohammed MH, Ghosh TS, et al. Metagenome of the gut of a malnourished child[J]. Pathog, 2011, 3: 4749-4755.
- [47] Alice MC. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences single molecule real time technology[J]. Chemical and Biology, 2010, 17(7): 675-676.