

肠道细菌乳糖酶基因多样性分析通用引物*

龙承星^{1,2} 贺璐¹ 刘又嘉¹ 惠华英^{1**} 谭周进^{1**} 李丹丹¹

¹湖南中医药大学 长沙 410208

²湖南人文科技学院数学与金融学院 娄底 417000

摘要 为深入研究肠道细菌乳糖酶基因多样性, 根据NCBI公布的细菌乳糖酶基因[Beta-galactosidase (*lacZ*)]序列, 利用软件Primer Premier 5.0前后设计合成7对通用引物, 经过PCR扩增、宏基因组测序和生物信息学分析进行引物筛选。PCR扩增电泳中, 436R、375R、217R和406R四对引物没有扩增出目的片段, 436、324和194三对引物均有目的条带扩增。内容物样品扩增, 436引物条带最清晰, 灵敏性高, 324和194引物条带质量相差不大; 粘膜样品扩增, 324引物均扩增出目的条带, 条带清晰明亮。436引物只扩增出一个样品的目的条带, 灵敏度较差; 194引物扩增杂带多, 特异性差。样品序列统计方面, 删除宿主序列信息后, 内容物样品中, 194、324和436三对引物最终序列比例均达98%以上; 粘膜样品中, 194引物特异性最差, 436引物最好, 324引物居中。OTU聚类 and 注释方面, 内容物样品中, 324引物扩增物种也较436引物多; 粘膜样品中, 324引物能聚类最多的物种。Alpha多样性方面, 内容物样品中, 324引物的Chao1、ACE、Simpson、Shannon指数较436引物大, 436引物的Simpson、Shannon指数较194引物大; 粘膜样品中, 324引物的Chao1、ACE、Simpson、Shannon指数均较436引物大。综合分析, 对肠道内容物和肠道粘膜细菌乳糖酶基因多样性研究选用324通用引物最佳。(图1表7参26)

关键词 细菌乳糖酶; 通用引物; Miseq宏基因组测序; PCR扩增; 功能基因; 肠道微生物
CLC Q93-33 : Q78

Universal primer for analysis of the diversity of intestinal bacterial lactase gene*

LONG Chengxing^{1,2}, HE Lu¹, LIU Youjia¹, HUI Huaying^{1**}, TAN Zhoujin^{1**} & LI Dandan¹

¹Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

²College of Mathematics and Finance, Hunan Institute of Humanities Science and Technology, Loudi 417000, China

Abstract In order to further study the diversity of the intestinal bacterial lactase gene, seven pairs of universal primers were designed and synthesized by using the premier 5.0 software according to the bacterial lactase gene (beta-galactosidase (*lacZ*)) sequence published in NCBI database, and metagenomic DNA was screened through PCR amplification, sequencing, and bioinformatics analysis. Four pairs of primers of 436R, 375R, 217R, and 406R did not amplify the target fragment in PCR amplification, while primers of 436, 324, or 194 all had the target fragment amplified. For amplification on the content sample, the expected bands of primer 436 were the most bright and clear with high sensitivity of the primer. The band quality between 194 and 324 showed no difference; for amplification on the mucosal sample, primer 324 amplified expected bands, which were clear and bright. Primer 436 amplified one sample only, and its sensitivity was poor. Primer 194 amplified multiple bands and the specificity was poor. In the aspect of sample sequence statistics, the final sequence ratio of primers 194, 324, and 436 was higher than 98% in the content samples. In the mucosal samples, the specificity of the primer 194 was the lowest. Primer 436 was found to be the best, followed by primer 324 after removal of the host sequence. In the aspect of OTU clustering and annotation, in the content samples, primer 324 amplified more species than primer 436. Primer 324 was able to cluster most species in the mucosal samples. For alpha diversity, in the content samples, the Chao1, ACE, Simpson, and Shannon indices of primer 324 were higher than those of primer 436. The Simpson and Shannon indices of primer 436 were higher than those of primer 194. The Chao1, ACE, Simpson, and Shannon indices of primer 324 were all higher than those of primer 436 in the mucosal sample. In the comprehensive analysis, the universal primer 324 was found to be the best to study the diversity of the bacterial lactase gene in the intestinal contents and mucosa.

Keywords bacterial lactase; universal primer; Miseq metagenomic sequencing; PCR amplification; functional gene; intestinal microorganism

收稿日期 Received: 2016-10-10 接受日期 Accepted: 2016-11-10

*国家自然科学基金项目 (81573951) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (81573951)

**通讯作者 Corresponding authors (E-mail: huihuaying2003@126.com; tanzhjin@sohu.com)

随着分子生物学技术的发展,以传统的微生物分离培养方法研究微生物种群结构,会导致微生物多样性信息的严重缺失^[1],从分子水平更全面认识微生物多样性特征及变化成为可能.基于16S rDNA的微生物多样性分析,能够反映环境中微生物的群落结构^[2-3].但是,微生物的各种转化功能实际上通过酶来完成的,酶的本质是具有催化功能的蛋白质,由功能基因编码,酶及其功能基因的研究逐渐备受学者们的青睐^[4].微生物通过编码相关酶的功能基因作为微生物功能标记物,成为了微生物生态学中微生物多样性研究的又一新的研究领域.近10年来,以功能基因多样性为核心的分子生态学研究迅速发展,为从功能基因角度了解微生物的生态功能提供了一个新的切入点.应用功能基因组学技术从基因组文库中发掘基因组进化和功能信息,用参与相关微生物生态过程的功能基因多样性(包括丰度和结构)来指示微生物的生态功能具有现实意义.

迄今为止,功能基因多样性研究多与碳、氮、硫等元素的物质循环和污染物降解的过程相关^[5].不少研究者^[6-7]通过对土壤反硝化细菌中的亚硝酸还原酶(*nirK*)和氧化二氮还原酶(*nosZ*)基因的多样性研究来探讨反硝化细菌的群落结构和多样性以及它们受环境因素的影响,也有学者从固氮生物的固氮酶基因(*nifH*)多样性对固氮生物群落进行全面的研 究^[8].Knief等也通过靶定甲烷单加氧酶(*pmoA*)基因研究天然林地、再生林地和玉米地等不同土地利用方式下的甲烷氧化基因多样性^[9].利用功能基因研究土壤微生物功能群多样性,为从分子生物全面评价不同环境因子对土壤微生物功能群多样性的影响具有重要作用.人体肠道中含有大量的微生物,肠道微生物的群落结构在机体物质代谢、能量吸收、胃肠道功能完善和免疫功能调节等方面发挥着重要作用.目前对于肠道环境微生物多样性研究多基于16S rDNA进行,主要是探讨其中的功能微生物类群,关于肠道微生物功能基因的研究较少,通过对肠道微生物功能基因多样性的研究,有望在肠道菌群生态功能上取得新的进展.

乳糖酶又称 β -D-半乳糖苷酶(EC3.2.1.23),是一种水解乳糖成葡萄糖和半乳糖的二糖酶,可由肠道粘膜产生,也可由肠道微生物产生.乳糖酶是腹泻相关的重要肠道功能酶,机体一旦乳糖酶缺乏或活性降低,乳糖将不被吸收和水解,直接到达小肠下段和结肠,在肠道细菌的作用下产生短链脂肪酸,CO₂和CH₄等低分子物质,其高渗作用使肠道水分增加,出现腹胀、腹痛和腹泻等临床症状,称为乳糖不耐受^[10].目前认为感染性腹泻、抗生素相关腹泻、迁延性腹泻和乳糖酶缺乏性腹泻均与乳糖酶活性低有关.乳糖酶基因在哺乳动物的研究主要在于动物乳糖酶基因多态性位点检测与酶活性的相关性,关于肠道微生物乳糖酶基因多样性与肠道生态功能的研究目前没有报道.为了探析七味白术散对疾病相关功能酶的影响与疗效的相关性,综合运用生物信息学引物设计软件,靶定编码微生物乳糖酶的基因,设计筛选出高通量测序研究乳糖酶基因多样性的引物,建立肠道细菌乳糖酶基因高通量测序技术,旨在从肠道微生物乳糖酶基因多样性方面揭示七味白术散的疗效机理.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级KM小鼠18只,体重为(20±2)g,雌雄各半,购于湖南斯莱克斯实验动物有限公司,动物许可证号为SYXK(湘)2013-0005.

1.1.2 屏蔽环境实验设施 湖南中医药大学动物实验中心.

1.1.3 饲料 由湖南中医药大学动物实验中心提供.

1.1.4 序列 从NCBI数据库中下载已经公布的细菌乳糖酶基因核苷酸序89条,从中选取来源于双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、链球菌属(*Streptococcus*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、梭菌属(*Clostridium*)等乳糖酶基因序列,利用这些序列进行通用引物的设计.选择的微生物种类均在肠道环境中存在.

1.1.5 主要试剂和设备 DNA提取试剂:蛋白酶K、溶菌酶、Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和TE buffer均购于北京鼎国生物技术有限公司. DNA Marker: DL2000,由上海派森诺生物科技有限公司提供. 10% SDS、0.1 mol/L PBS缓冲液、5 mol/L NaCl、CTAB/NaCl由实验室配置. 主要设备:测序仪(Miseq System SY-410-1003)为美国Illumina公司产品. 紫外分光光度计(Nano drop 2000/2000C,美国Thermo Scientific公司),对宏基因组DNA进行质量检测.

1.1.6 七味白术散 人参(山西)6g、木香(云南)6g、白茯苓(云南)10g、炒白术(浙江)10g、藿香叶(广东)10g、葛根(湖南)10g、甘草(内蒙古)3g.均购自湖南中医药大学第一附属医院.以上为一副汤药量,冷水漫过药物浸泡半小时,先用大火煮沸,再改用小火煎煮,煎煮两次,每次煎煮时间为20-30 min.将两次煎煮的药物合并后即制成七味白术散汤剂,4℃冰箱保存备用.

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将18只KM小鼠在适宜环境下(室温23-25℃,相对湿度50%-70%,清洁安静)适应性喂养2d后,随机分成正常组和模型组,正常组(tlc)6只,模型组12只,雌雄各半.模型组根据文献[11]进行造模,造模成功后,将模型组分为自然恢复组(tlm)和七味白术散治疗组(tlq).正常组和自然恢复组给予无菌水,治疗组用七味白术散汤药按照临床等效剂量给药,即七味白术散剂量0.16 g kg⁻¹ d⁻¹,按0.4 mL/(只·次)灌胃,每天2次,连续治疗3d.然后,将小鼠断颈处死,供宏基因组DNA提取.

1.2.2 第一次引物设计 利用DANMAN软件查找序列的保守区域,分别在保守区域的两端设计上下游引物,引物设计采用软件Primer Premier 5.0进行.引物设计由上海派森诺生物科技有限公司完成.引物设计见表1.

1.2.3 肠道内容及肠道粘膜宏基因组DNA的提取 小鼠断颈处死后,无菌采集各组空肠到回肠段内容物,并称取一定量的肠道内容物用无菌PBS稀释后,加入少许无菌玻璃珠,200 r/min恒温振荡器振荡30 min,使肠道微生物均匀分散出单个菌落,200 r/min离心提取上清液用于后续的基因提取.空肠到回肠段肠道内容物用无菌镊子挤出后,剖开肠道,无菌生理盐水漂洗干净,沥干,冰浴条件下用盖玻片轻

轻刮取肠粘膜，取一定量的肠道粘膜于离心管中，并加入2倍肠重的生理盐水，在低温条件下低速匀浆1 min，3 000 r/min离心10 min提取上清液用于后续基因的提取^[12]。宏基因组的提取步骤参照文献[13]进行，DNA样品 -20 ℃保存备用。内容物DNA用n注明，粘膜DNA用m注明，分别用阿拉伯数字标注样品号，如tlcn3即为正常组小鼠肠道内容物第3号DNA样品、tlmm1即为自然恢复组小鼠肠道粘膜第1号DNA样品。

1.2.4 第一次PCR扩增样品 随机将正常组的肠道内容物和粘膜2个宏基因组DNA样品分别用于4对引物的筛选和验证。

1.2.5 第一次PCR扩增 使用设计的4对通用引物分别对内容物和粘膜2个宏基因组DNA样品进行扩增，反应条件和体系见表2。

1.2.6 第二次引物设计 根据第一次引物设计的经验，控

制简并碱基的数量，重新设计了3对通用引物，具体如表3。

1.2.7 第二次样品选取 从提取的样品DNA中随机选取肠道内容物样品tlcn3、tlqn3、tlqn1和肠道粘膜样品tlcm2、tlmm1、tlqm3，取样过程中注意对样品的保护，防止样品降解。

1.2.8 第二次PCR扩增 重新设计的3对引物先通过梯度PCR进行退火温度的摸索，再分别对选取的内容物和粘膜样品进行扩增，具体扩增条件及体系见表4。

1.2.9 Miseq宏基因组测序 PCR产物胶回收后进行定量，通过3'-5'核酸外切酶及聚合酶的共同作用，修复带有突出末端的DNA片段。在修复平整的DNA片段3'端引入单碱基“A”，接头3'末端含有单碱基“T”，从而保证DNA片段和接头能够通过“A”“T”互补配对连接，并防止接头连接DNA片段的过程中，DNA片段彼此相连。在连接酶的作用下，孵

表1 第一次设计的4对通用引物

Table 1 4 pairs of universal primer designed first time

引物名称 Primer name	引物 Primer	扩增长度 Length	序列来源 Sequences resource
436 R	上游Upstream: 5'-GGNGSNGAYTAYAAAYCCNCARTGG-3' 下游Downstream: 5'-TAYTCRTTDBHNAYRTGCCA-3'	436	LC015363, JX188444, AY359872, AJ224436, CP003403, CP012257, FN543093, CP003218, CP013962, CP006566, KP325414, EU590652, FN424352, KF420202, GU323918, EU585783
375 R	上游Upstream: 5'-ACNACABAAYWTYMATRCTG-3' 下游Downstream: 5'-AACYSAYNRCVWHRTGVAA-3'	375	AY359872, JX188444, LC015363, KP325414, EU590652, FN424352, CP013962, CP003218, CP012257, FN543093, FN424354, EU513599,
217 R	上游Upstream: 5'-GGHGSNGAYAAYCCNGAVTGG-3' 下游Downstream: 5'-ASCCAHRBYGGHNBNGHNSCNSTBG-3'	217	LC015363, JX188444, AY359872, AJ224436, CP003403, CP012257, FN543093, CP003218, CP013962, CP006566, KP325414, EU590652, FN424352, D49537, AJ539085
406 R	上游Upstream: 5'-CGYCCNGTNTAYGARGGBG-3' 下游Downstream: 5'-ASTCCCAVAYRAARCBTG-3'	406	D42077, DQ266449, CP012999, X80037, M63636, EU513599, FN424354, HM178943, U12334, AB243756

表2 4对通用PCR引物扩增条件及体系

Table 2 PCR amplification conditions and system of four pairs of universal primers

引物名称 Primer name	宏基因组DNA扩增样品 Sample of metagenomic DNA	扩增体系 Amplification system	扩增条件 Amplification condition
436R	内容物、粘膜 Intestinal content, intestinal mucosa	总量: 25 μL. 具体为: 灭菌超纯水8.75 μL, 5 × Q5 Reaction Buffer 5.0 μL, 5 × Q5 GC high Enhancer 5.0 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 引物F/R (10 μmol/L) 1.0 μL/1.0 μL, Q5 Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL. Total: 25 μL. Specifically: sterilized ddH ₂ O 8.75 μL, 5 × Q5 Reaction Buffer 5.0 μL, 5 × Q5 GC high Enhancer 5.0 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2.0 μL, primer F/R (10 μmol/L) 1.0 μL/1.0 μL, Q5 Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL	先通过梯度PCR进行退火温度的摸索，选择的退火温度为49、52.5、57.3、61.8、66.2 ℃共5个梯度。具体为98 ℃预变性 2 min; 98 ℃变性15 s, 退火30 s, 72 ℃延伸30 s, 30个循环; 72 ℃延伸5 min. The annealing temperature was explored by gradient PCR including 49, 52.5, 57.3, 61.8 and 66.2 ℃. Initial denaturation at 98 ℃ for 2 min, denaturation at 98 ℃ for 15 s, annealing for 30 s and extension at 72 ℃ for 30 s, repeated for 30 cycles; final extension at 72 ℃ for 5 min.
375R	内容物、粘膜 Intestinal content, intestinal mucosa	同436R Same as 436R	同436R, 只需将30个循环改为27个循环即可 Same as 436R (just change the 30 cycles to 27 cycles)
217R	内容物、粘膜 Intestinal content, intestinal mucosa	同436R Same as 436R	同375R Same as 375R
406R	内容物、粘膜 Intestinal content, intestinal mucosa	同436R Same as 436R	同436R Same as 436R

表3 第二次设计的3对通用引物

Tab.3 3 pairs of universal primer designed secondly

引物名称 Primer name	引物 Primer	扩增长度 Length	序列来源 Sequences resource
436	上游Upstream: 5'-GACTAYAAAYCCGGAVCAGTGG-3' 下游Downstream: 5'-TATTCRTTGGARATATGCCA-3'	436	双歧杆菌、肠杆菌、乳杆菌 <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Lactobacillus</i>
324	上游Upstream: 5'-TRRGCAACGAATACGGSTG-3' 下游Downstream: 5'-ACCATGAARTTSGTGGSARCGG-3'	324	乳杆菌和大肠杆菌 <i>Lactobacillus</i> and <i>Escherichia coli</i>
194	上游Upstream: 5'-CCGYTSACCACSAAYTTCATGGT-3' 下游Downstream: 5'-GCBGAGGTGGADTGYTCCAT-3'	194	乳杆菌和大肠杆菌 <i>Lactobacillus</i> and <i>Escherichia coli</i>

表4 3对通用引物PCR扩增条件及体系
Table 4 PCR amplification conditions and system of three pairs of universal primers

引物名称 Primer name	引物 Primer	扩增体系 Amplification system	扩增条件 Amplification condition
436	tlcn3, tlqn3, tlqn1, tlcm2, tlmm1, tlqm3	总量: 25 μ L. 具体为: 水11.25 μ L, Q5 high-fidelity DNA polymerase 0.25 μ L, 5 $\times$ Reaction Buffer 5 μ L, 5 $\times$ High GC Buffer 5 μ L, dNTP (10 mol/L) 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 1 μ L. Total: 25 μ L. Specifically, ddH ₂ O 11.25 μ L, Q5 high-fidelity DNA polymerase 0.25 μ L, 5 $\times$ Reaction Buffer 5 μ L, 5 $\times$ High GC Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L, DNA Template 1 μ L, Forwardprimer (10 μ mol/L) 1 μ L, Reverseprimer (10 μ mol/L) 1 μ L.	98 $^{\circ}$ C 预变性30 s后进行32个循环, 循环参数为 98 $^{\circ}$ C 15 s, 46 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 再72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 扩增结束后设置4 $^{\circ}$ C 保温. Initial denaturation at 98 $^{\circ}$ C for 30 s; denaturation at 98 $^{\circ}$ C for 15 s, 46 $^{\circ}$ C for 30 s and extension at 72 $^{\circ}$ C for 30 s, repeated for 32 cycles; final extension at 72 $^{\circ}$ C for 5 min; preservation at 4 $^{\circ}$ C.
324	同436 Same as 436	同436 Same as 436	同436 Same as 436
194	同436 Same as 436	同436 Same as 436	同436 Same as 436

tlcn3、tlqn3、tlqn1: 肠道内容物DNA样品; tlmm1、tlqm3、tlcm2: 肠道粘膜DNA样品.
tlcn3, tlqn3, tlqn1: DNA sample of intestinal contents; tlmm1, tlqm3, tlcm2: DNA sample of intestinal mucosa.

育含有标签的接头与DNA片段, 使其相连. 利用PCR选择性的富集两端连有接头的DNA片段, 同时扩增DNA文库. 定量并质检后, 逐步稀释定量上机测序, 按照美国 Illumina公司标准流程进行. Miseq宏基因组测序由上海派森诺生物科技有限公司完成.

1.2.10 生物信息学分析指标 OTU聚类及注释: 应用 Qiime软件将相似度大于0.97的序列归为1个操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU) [14]. 在Qiime中采用 Uclust [15] 对序列进行聚类, 统计各样品所含的OTU数量. 在Qiime中调用BLAST的方法 [16] 对序列数据库进行比对, 获得每个OTU代表序列的分类学信息.

Alpha多样性分析: 对于微生物群落而言, 有多种指数来反应其Alpha多样性, 包括侧重于体现群落丰富度 (即群落中微生物成员如OTU的数量) 的Chao1指数 [17] 和ACE指数 [18] 以及兼顾群落均匀度 (即各成员间的丰度差异大小) 的Shannon指数 [19] 和Simpson指数 [20]. 利用Qiime软件分别对每个样本计算上述四种多样性指数. 一般而言, Chao1或ACE指数越大, 表明群落的丰富度越高, Shannon和Simpson指数越高, 表明群落多样性越高.

2 结果与分析

2.1 第一次引物设计PCR扩增结果

436R、375R、217R和406R四对引物选择正粘和正内两个样品进行PCR扩增, 先通过梯度PCR进行退火温度的摸索, 选择的退火温度为49、52.5、57.3、61.8、66.2 $^{\circ}$ C共5个梯度, 循环数设置两个 (375R和217R为27个循环, 406R和436R为30个循环), 从扩增结果看出, 所有样品所有引物都没有扩增出目的条带, 不能用于后续测序分析.

2.2 第二次引物设计PCR扩增结果

如图1所示, 194、324和436三对引物在扩增内容物和粘膜样品中均有扩增出目的条带, 从内容物样品来看, 436引物相对较好, 目的条带清晰, 324引物和194引物都只扩增出一个样品.

从粘膜样品来看, 324引物均扩增出样品目的条带, 且条带清晰明亮. 436引物只扩增出一个样品, 灵敏度差. 194引物扩增出的样品条带模糊, 杂带多, 特异性差.

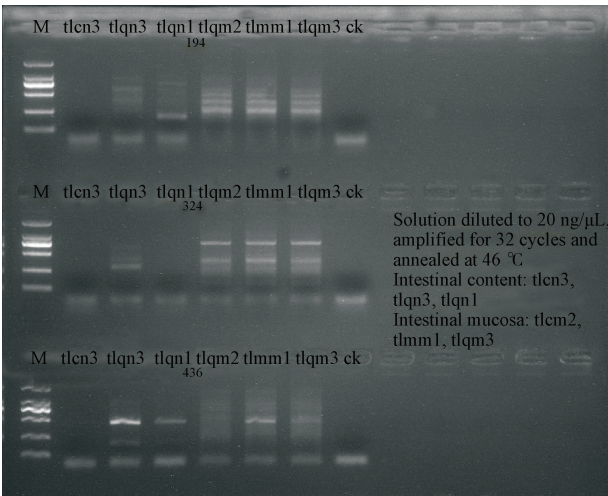


图1 3对通用引物PCR扩增电泳图. CK: 无菌水. tlcn3、tlqn3、tlqn1: 肠道内容物DNA样品; tlmm1、tlqm3、tlcm2: 肠道粘膜DNA样品.
Fig. 1 PCR amplified electrophoresis map of three pairs of universal primers. CK: Sterile water. tlcn3, tlqn3, tlqn1: DNA sample of intestinal contents; tlmm1, tlqm3, tlqm2: DNA sample of intestinal mucosa.

2.3 微生物序列分析统计表

将194、324和436三对引物各自扩增出的样品目的条带经过回收、建库、上机测序后所得到的原始序列数以及剔除宿主序列后最终序列数及所占比例如表5所示. 在扩增内容物样品中, 3对引物剔除宿主信息后, 最终序列比均高达98%以上, 在这一序列数量上, 3对引物没有优劣之分.

扩增粘膜样品由表可知, 194引物特异性最差, 在剔除宿主信息后序列占比最高只达52.98%, 最低甚至达0.3%, 说明194引物扩增出序列大部分都是宿主自身信息, 并不是产乳糖酶微生物. 436引物最好, 最终所占比可达90%以上, 其次是324引物, 最终序列也可高达74.63%.

2.4 样品OTU数

将非特异性序列剔除后, 剩余序列按97%以上相似度的序列归为1个OTU, 1个OTU代表一个物种. 如表6所示, 内容物样品中, 扩增tlqn1样品, 194引物获得456个OTU, 436引物获得215个OTU. 扩增tlqn3样品, 436引物获得215个OTU, 324引物获得848个OTU, 说明324引物扩增物种多于436引物.

粘膜样品中, 扩增tlmm1样品, 194引物得到481个OTU, 324引物得到528个OTU, 436引物得到214个OTU; 扩增tlcm2

表5 样品序列数统计表
Table 5 Sample sequence number statistics

样品来源 Sample source	样品 Sample	引物 Primer	原始OTU 序列数 Original OTU sequence number	剔除宿主信息 后序列数 Sequence number after excluding host information	比例 Ratio
肠道 内容物 Intestinal content	tlqn1	194	295221	291970	0.988987911
	tlqn1	436	57920	57864	0.999033149
	tlqn3	324	130211	128214	0.984663354
	tlqn3	436	106430	106384	0.999567791
肠道粘膜 Intestinal mucosa	tlcm2	194	38252	490	0.012809788
	tlqm3	194	87356	311	0.003560145
	tlcm2	324	16952	7998	0.471802737
	tlqm3	324	19200	14329	0.746302083
	tlmm1	436	36228	33710	0.930495749
	tlmm1	194	12292	6513	0.529856817
	tlmm1	324	81054	20255	0.249895132

tlqn3、tlqn1: 肠道内容物DNA样品; tlmm1、tlqm3、tlcm2: 肠道粘膜DNA样品.

tlqn3, tlqn1: DNA sample of intestinal contents; tlmm1, tlqm3, tlcm2: DNA sample of intestinal mucosa.

样品, 194引物有162个OTU, 324引物有713个OTU; 扩增tlqm3样品, 194引物有109个OTU, 324引物有639个OTU, 说明324引物扩增粘膜样品能获得更多的物种信息.

表6 样品OTU数
Tab.6 Sample OTU numbers

样品来源 Sample source	样品 Sample	引物 Primer	OTU
肠道内容物 Intestinal content	tlqn1	194	456
	tlqn1	436	215
	tlqn3	436	215
	tlqn3	324	848
肠道粘膜 Intestinal mucosa	tlcm2	194	262
	tlcm2	324	713
	tlqm3	194	109
	tlqm3	324	639
	tlmm1	194	481
	tlmm1	324	528
	tlmm1	436	214

tlqn3、tlqn1: 肠道内容物DNA样品; tlmm1、tlqm3、tlcm2: 肠道粘膜DNA样品.

tlqn3, tlqn1: DNA sample of intestinal contents; tlmm1, tlqm3, tlcm2: DNA sample of intestinal mucosa.

2.5 Alpha多样性分析

为了比较不同样本的多样性, 首先对OTU丰度矩阵中的全体样本根据最低测序深度统一进行随机重抽样(即“序列量拉平处理”), 从而校正测序深度引起的多样性差异. 随后, 使用Qiime软件分别对每个样本计算上述4种多样性指数. 内容物样品多样性指数由表7可知, 扩增同一样品tlqn1, 194引物 Chao1和ACE指数较436引物大, 而Simpson和Shannon指数较436引物小, 说明194引物虽然能扩增到更多的微生物, 但微生物的丰度不高. 扩增tlqn3样品, 324引物的Chao1、ACE、Simpson、Shannon指数都较436引物大, 说明324引物的多样性优于436引物.

粘膜样品中, 同一样品tlmm1扩增, 324引物的Chao1、ACE、Simpson、Shannon指数均比436引物大(194引物先前在序列数统计中特异性极差就不在此进行比较), 说明324引

物相对于436引物能扩增到更多的产乳糖酶细菌.

表7 样品生物多样性指数表
Table 7 Biodiversity index table

样品来源 Sample source	样品 Sample	引物 Primer	Chao1	ACE	Simpson	Shannon
肠道内容物 Intestinal content	tlqn1	194	64	148.6340	0.646427	1.883830
	tlqn1	436	37	54.8374	0.650091	2.131071
	tlqn3	324	147	247.4541	0.762913	3.149682
	tlqn3	436	14	41.0386	0.567230	1.489156
肠道粘膜 Intestinal mucosa	tlmm1	194	477	477	0.964769	6.296447
	tlmm1	324	101	149.0662	0.736811	2.776748
	tlmm1	436	49	60.1768	0.475914	1.598624

tlqn3、tlqn1: 肠道内容物DNA样品; tlmm1: 肠道粘膜DNA样品.

tlqn3, tlqn1: DNA sample of intestinal contents; tlmm1: DNA sample of intestinal mucosa.

3 讨论与结论

设计通用引物进行微生物多样性分析方法, 已在生物界和医学界得到应用, 这种方法只需设计一对引物, 即可完成某一大类微生物的综合检测^[21-22]. 通用引物的设计是微生物多样性分析的前提和关键, 其设计的好坏一般通过特异性和灵敏度两个方面进行评价, 也有学者从通用性和适应性角度进行筛选^[23]. 在引物筛选过程中多数学者一般终止于PCR扩增阶段, 通过是否有目的条带, 是否有杂带, 条带是否清晰明亮以及引物的检出下限、检出率等方面来进行引物的验证^[24]. 随着一代测序技术的发展, 不仅通过PCR扩增, 甚至通过测序对序列进行BLAST同源性比对, 对引物的特异性得到进一步的验证^[25-26].

本研究根据NCBI公布的细菌乳糖酶基因序列, 利用双歧杆菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属、乳杆菌属、链球菌属和微球菌属等分别前后设计了2次通用引物, 共7对. 在PCR扩增的基础上再采用测序深度更深的二代测序技术来进行通用引物的筛选, 引物筛选侧重于特异性和物种多样性方面. 在第一次设计的4对引物436R、375R、217R和406R用于PCR扩增, 发现4对通用引物均没有扩增出目的条带, 可能原因是样品中含有的产乳糖酶基因的微生物较痕量, 导致扩增不出, 或者引物中含有的兼并碱基较多(正常情况下兼并碱基个数要在3个以内), 造成无法判断 T_m 值, 所以扩增不出条带. 第二次设计的3对引物194、324和436在样品PCR扩增中均有目的片段的出现, 并进行了后续的二代测序. 从特异性角度来看, 在扩增肠道粘膜样品中, 194引物特异性最差, 436引物特异性最好, 但扩增目的片段概率低, 灵敏度差, 324引物特异性相对较好, 灵敏度高; 在扩增肠道内容物样品, 324引物和194引物均扩增出一个样品, 436引物扩增出2个样品, 灵敏度高. 剔除非特异性序列后, 3对引物最终序列所占比例均高达98%以上, 说明特异性方面3对引物差异不明显. 从物种多样性角度, 扩增粘膜样品, 324引物比436引物和194引物能获得更多的OTU数, 且324引物多样性指数均高于436引物, 能扩增到更多的微生物物种. 扩增内容物样品, 324引物和194引物均比436引物获得较多OTU数. 多样性指数上, 324引物多样性指数均高于436引物, 194引物相对于436引物能扩增到较

多的物种,得到的物种丰度却低于436引物。

综上所述,无论粘膜样品还是内容物样品,324引物最佳,可用于后续细菌乳糖酶基因多样性相关研究。

参考文献 [References]

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial-cells without cultivation [J]. *Microbiol Res*, 1995, **59** (1): 143-169
- 郭抗萧,肖新云,刘又嘉,龙承星,谭周进. 七味白术散对菌群失调腹泻小鼠肠道乳酸杆菌多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (6): 1071-1075 [Guo KX, Xiao XY, Liu YJ, Long CX, Tan ZJ. Effect of Qiweiibaizhusan on the intestinal lactobacilli diversity in dysbacteria diarrheal mice [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (6): 1071-1075]
- 李丹丹,肖新云,邓艳玲,余颜,赵先平,谭周进. 脾虚便秘造模对小鼠肠道细菌多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22** (3): 437-441 [Li DD, Xiao XY, Deng YL, She Y, Zhao XP, Tan ZJ. The effects of spleen-deficient constipation model construction on the intestinal bacterial diversity in mice [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, **22** (3): 437-441]
- 费忠,李恒,龚劲松,杨涛,许正宏,史劲松. 基于宏基因组学壳聚糖酶挖掘研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (4): 597-601 [Fei Z, Li H, Gong JS, Yang T, Xu ZH, Shi JS. Studies of chitosanase mining based on metagenomic technology [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (4): 597-601]
- 张晶,张惠文,李新宇,苏振成,张成刚. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性[J]. 应用生态学报, 2006, **17** (6): 1129-1132 [Zhang J, Zhang HW, Li XY, Su ZC, Zhang CG. Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2006, **17** (6): 1129-1132]
- 罗希茜,陈哲,胡容桂,吴敏娜,秦红灵,魏文学. 长期施用氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的影响[J]. 环境科学, 2010, **31** (2): 423-429. [Luo XQ, Chen Z, Hu RG, Wu MN, Qin HL, Wei WX. Effect of long-term fertilization on the diversity of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in paddy soil [J]. *Environ Sci*, 2010, **31** (2): 423-429]
- 马驿,陈仗榴. 恩诺沙星残留对土壤中反硝化细菌氧化二氮还原酶基因 (*nosZ*) 多样性的影响[J]. 生态学报, 2010, **30** (4): 1011-1017 [Ma Y, Chen ZL. Effects of enrofloxacin on molecular diversity of nitrous oxide reductase genes (*nosZ*) [J]. *Acta Ecol Sin*, 2010, **30** (4): 1011-1017]
- 张于光,王慧敏,李迪强,肖启明,刘学端. 三江源高寒草甸土固氮酶基因(*nifH*)的多样性和系统发育树研究[J]. 微生物学报, 2005, **45** (2): 166-167 [Zhang YG, Wang HM, Li DQ, Xiao QM, Liu XD. Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in alpine prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2005, **45** (2): 166-167]
- Knief C, Lipski A, Dunfield PF. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land uses. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 3826-3831
- 张玉英,周兰兰,仰曙芬. 原发性乳糖酶缺乏的基础研究[J]. 国际儿科学杂志, 2014, **41** (3): 302-304 [Zhang YY, Zhou LL. The basic research of primary lactase deficiency [J]. *Intern J Pedi*, 2014, **41** (3): 302-304]
- 曾奥,张华玲,谭周进,蔡莹,蔡光先,周赛男. 小鼠菌群失调腹泻模型的建立及超微七味白术散的疗效[J]. 微生物学通报, 2012, **39** (9): 1341-1348 [Zeng A, Zhang HL, Tan ZJ, Cai Y, Cai GX, Zhou SN. The construction of mice diarrhea model due to dysbacteriosis and curative effect of ultra-micro Qiweiibaizhusan [J]. *J Microbiol*, 2012, **39** (9): 1341-1348]
- 张晓利,王迎春,徐倩倩,王丽叶,霍晓青,曹玲芝,张永辉,董世山. 白头翁复方对腹泻小鼠肠道粘膜乳糖酶活性的影响[J]. 河北农业大学, 2010, **33** (2): 99-102 [Zhang XL, Wang YC, Xu QQ, Wang LY, Huo XQ, Cao LZ, Zhang YH, Dong SS. The influence of decoction of compound *Radix Pulsatillae* on the lactase activity in diarrheal mice intestinal mucosa [J]. *J Agric Univ Hebei*, 2010, **33** (2): 99-102]
- 吴海,周赛男,郭纯,谭周进,蔡光先,曾奥,张华玲. 一种基于PCR分析多样性的小鼠肠道微生物宏基因组提取方法[J]. 中国微生态学杂志, 2012, **24** (7): 648-651 [Wu H, Zhou SN, Guo C, Tan ZJ, Cai GX, Zeng A, Zhang HL. A metagenome DNA extracting method of intestinal flora in mice for molecular diversity analysis based on PCR technology [J]. *Chin J Microecol*, 2012, **24** (7): 648-651]
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. *Philos Trans R Soc Lond*, 2005, **360** (1462): 1935-1943
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, **27** (16): 2194-2200
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool [J]. *J Mol Biol*, 1990, **215** (3): 403-410
- Pitta DW, Parmar N, Patel AK, Indugu N, Kumar S, Prajapathi KB, Patel AB, Reddy B, Joshi C. Bacterial diversity dynamics associated with different diets and different primer pairs in the rumen of Kankrej cattle [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (11): e111710
- Pitta DW, Pinchak E, Dowd SE, Osterstock J, Contcharova V, Yoon E, Dorton K, Yoon I, Min BR, Fulford JD, Wickersham TA, Malinowski DP. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets [J]. *Microb Ecol*, 2010, **59** (3): 511-522
- Shannon CE. The mathematical theory of communication. 1963 [J]. *MD Comp Comp Med Prac*, 1997, **14** (4): 306-317
- Mahaffee WF, Kloepper JW. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L) [J]. *Microb Ecol*, 1997, **34** (3): 210-223
- Bader JA, Shoemaker CA, Klesius PH. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare* [J]. *J Microbiol Meth*, 2003, **52** (2): 209-220
- Abu-Halaweh M, Bates J, Patel BK. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR [J]. *Res Microbiol*, 2005, **156** (1): 107-114
- 刘军,赵良杰,凡迎春,张新磊,刘其根. 鱼类环境 DNA 研究中通用引物的筛选验证[J]. 淡水渔业, 2016, **46** (1): 9-16 [Liu J, Zhao LJ, Fan YC, Zhang XL, Liu QG. Universal primer screening and verification for fish environment DNA research [J]. *Fresh Fish*, 2016, **46** (1): 9-16]
- 陈文炳,赵晨,邵碧英,江树勋,闫诚,李寿松,林河通. PCR方法检测河豚鱼的引物筛选及反应体系优化[J]. 食品科学, 2010, **31** (20): 376-381 [Chen WB, Zhao C, Shao BY, Jiang SX, Yan C, Li SS, Lin HT. Primer screening and optimization of PCR system for the detection of puffer fish [J]. *Food Sci*, 2010, **31** (20): 376-381]
- 刘永军,张崇森,王晓昌,孙茵,薛小平. 通用引物PCR方法在地表水病原菌检测中的应用[J]. 环境科学研究, 2007, **20** (2): 89-93 [Liu YJ, Zhang CM, Wang XC, Sun Y, Xue XP. Application of pathogenic bacteria detection in surface water by universal primer PCR method [J]. *Res Environ Sci*, 2007, **20** (2): 89-93]
- 马孝熙,孙伟,钱齐妮,任伟超,郭兰,张雅琴,宋明. 药材天麻ITS2特异性引物的筛选[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, **16** (2): 325-328 [Ma XX, Sun W, Qian QN, Ren WC, Zhang YQ, Song M. Highly specific DNA barcoding primers of ITS2 for gastrodia elata [J]. *World Sci Tech-Mod Trad Chin Med Mat Med*, 2012, **24** (7): 648-651]