

小鼠粪便样本中 16S 拷贝数的定量检测

Quantitative Analysis of 16S rRNA Gene Copies in Mouse Fecal Sample

刘红宾*, 吕青青, 戴磊

中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳, 广东省

*通讯作者邮箱: binhongliu@126.com

引用格式: 刘红宾, 吕青青, 戴磊. (2020). 小鼠粪便样本中 16S 拷贝数的定量检测. *Bio-101* e2003368. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003368.

How to cite: Liu, H. B., Lv, Q. Q. and Dai, L. (2020). Quantitative Analysis of 16S rRNA Gene Copies in Mouse Fecal Sample. *Bio-101* e2003368. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003368. (in Chinese)

摘要: 16S rRNA 基因和宏基因组测序技术是研究肠道菌群结构与功能的重要手段, 由此可以获取微生物群落的结构和功能组成信息; 然而, 二者得到的数据均为相对丰度类型, 大大削弱了不同样品间的可比性, 也难以揭示生物量水平的菌群结构和功能变化。本文旨在运用实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time PCR) 技术对小鼠粪便中的 16S rRNA 基因进行定量检测, 为准确分析肠道菌群的结构提供技术参考。

关键词: 16S rRNA 基因, 绝对定量, 肠道菌群

材料与试剂

试剂:

1. 高保真酶 (PrimeSTAR, TAKARA, catalog number: R045A)
2. TB Green 酶 (TAKARA, catalog number: RR820A)
3. Omega 胶回收试剂盒 (Omega, catalog number: D2500-01)
4. 琼脂糖
5. 引物

(27F-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1541R-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA; 31F-TCCTACGGGAGGCAGCAGT, 797R-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT) (Jian 等, 2016)

仪器设备

1. Nanodrop 2000
2. 电泳仪
3. 普通 PCR 仪 (Bio-read)
4. 荧光定量 PCR 仪 (Bio-read)

实验步骤

一、全长 16S rRNA 基因标准品制备

1. 全长 16S rRNA 基因扩增

PCR 扩增体系:

试剂	浓度	体积 (μl)
PrimerSTAR	-	25
27F	2 μM	5
1541R	2 μM	5
小鼠粪便 DNA	60-80 ng/μl	1
ddH ₂ O		14

PCR 扩增程序 (30 个循环):

98 °C	5 min
98 °C	10 s
55 °C	15 s
72 °C	15 s
12 °C	∞

2. 全长 16S rRNA 基因扩增产物回收

按照胶回收试剂盒说明书, 对 PCR 扩增产物进行回收, 并利用 Nanodrop 对其浓度进行测定。

3. 全长 16S rRNA 基因扩增产物拷贝数确定

举例: Nanodrop 测得胶回收的 16S 片段的浓度为 182 ng/μl, 由于 1,500 bp 的 16S

核酸的分子量为 5.1×10^5 ng/nmol (<https://www.genscript.com/conversion.html>), 所以标准品中含有 3.57×10^{-4} nmol 分子, 根据阿伏伽德罗常数计算 1 μ l 标准品中含有 2.14×10^{11} 个拷贝。

4. 全长 16S rRNA 基因扩增产物梯度稀释

将标准品做 10 倍系列稀释, 使其形成 10^9 - 10^4 拷贝/ μ l。

二、16S rRNA 基因拷贝数标准曲线的制备

1. 全长 16S rRNA 基因梯度拷贝数标准品的定量 PCR 检测

Real-time PCR 扩增体系:

试剂	浓度	体积 (μ l)
TB Green 酶	-	10
331F	4 μ M	1
797R	4 μ M	1
全长 16S rRNA 基因 DNA	梯度浓度	1
标准品		
ddH ₂ O		7

PCR 扩增程序 (40 个循环):

98 °C	3 min
98 °C	5 s
55 °C	30 s
+ Plant Read	
72 °C	30 s
Melt curve 65 °C to 95 °C, increment 0.5 °C	
for 0:05 + Plate Read	
12 °C	∞

2. 构建 16S rRNA 基因梯度拷贝数标准曲线

以不同拷贝数的阳性模板的对数为横坐标, 以 PCR 反应过程中到达荧光阈值的

初始循环数 (Ct) 为纵坐标得到标准曲线, 为待测样品的定量提供了定量检测的参照标准。

三、小鼠粪便 DNA 待测样品中 16S rRNA 基因拷贝数的定量检测

对小鼠粪便 DNA 待测样品, 按照“全长 16S rRNA 基因梯度拷贝数标准品的定量 PCR 检测”中的程序与条件, 进行 real-time PCR 检测。依据建立的标准曲线, 计算出待测样品中的 16S rRNA 基因拷贝数。

结果与分析

图 1 展示了溶解曲线、标准曲线和待测样品的检测结果, 溶解曲线结果显示扩增片段的单一特异性, 标准曲线的相关性表明该方法对于检测不同 16S rRNA 基因拷贝数的样本具有很好的线性关系。依据标准曲线方程, Ct 值为 8 的小鼠粪便 DNA 样品中含有的 16S rRNA 基因拷贝数为 $10^{(-0.2819 \times 8 + 10.682)} = 2.67 \times 10^8$ 个。

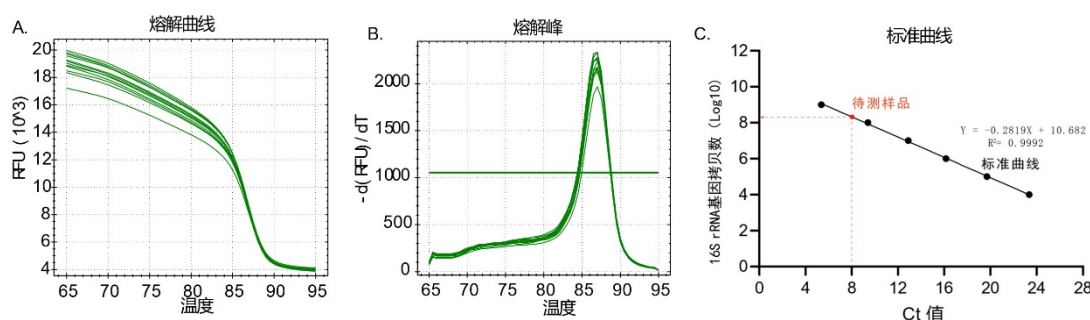


图 1. RT-PCR 方法检测粪便样本中微生物 16S rRNA 基因拷贝数溶解曲线 (A-B) 和标准曲线 (C)

致谢

本文得到青年千人人才计划资助。

参考文献

- Jian, C., Luukkonen, P., Yki-Jarvinen, H., Salonen, A. and Korpela, K. (2020). [Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling](#). *PLoS One* 15(1): e0227285.