

· 基础论著 ·

# 基于TaqMan-MGB探针荧光定量PCR技术 检定细菌和人基因组拷贝数比值方法 的建立

潘晓微<sup>1</sup> 王贤军<sup>2</sup> 刘云惠<sup>3</sup> 杨宁敏<sup>3</sup>

**【摘要】目的** 建立一种可以检测细菌和人基因组拷贝数比值的方法。**方法** 分别设计细菌和人基因组特异性引物及通用探针。以大肠埃希菌和幽门螺杆菌混合菌液及人全血样本模拟混合样本。采用TaqMan-MGB荧光PCR方法对不同稀释浓度的混合样本进行定量分析。通过比较实测比值(Ct值换算成拷贝数的比值)与理论比值,评估本研究方法的可行性和准确性。**结果** 经变异系数法(CV)分析,6个不同浓度样本(DB1、DB2、DB3、DH1、DH2和DH3)的CV值依次为4.48%、1.57%、4.67%、1.55%、0.49%和1.29%。9组模拟混合样本中,实测比值(DB/DH拷贝数)和理论比值的误差均小于0.1,且两组数值相关性极显著( $r = 1.000$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 本研究建立的基于TaqMan-MGB探针荧光定量PCR技术检定细菌和人基因组拷贝数比值的方法重复性和准确度良好,可用于细菌和人类组织样本基因组拷贝数比例的检定。

**【关键词】** 细菌; 人类; 探针荧光定量PCR; 基因组

**Establishment of method for determining the copy number ratio between bacterial and human genome based on TaqMan-MGB fluorescent quantitative PCR** Pan Xiaowei<sup>1</sup>, Wang Xianjun<sup>2</sup>, Liu Yunhui<sup>3</sup>, Yang Ningmin<sup>3</sup>.  
<sup>1</sup>Clinical Laboratory, Ruian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ruian 325200, China; <sup>2</sup>Clinical Laboratory, Hangzhou The First People's Hospital, Hangzhou 518000, China; <sup>3</sup>Shenzhen Zhiyuan Precision Medical Co., Ltd., Shenzhen 518000, China

Corresponding author: Wang Xianjun, Email: wangxj0525@126.com

**【Abstract】Objective** To establish a method for determining the copy number ratio of bacterial and human genome. **Methods** The specific primers and universal probes were designed for bacterial and human gene, respectively. The mixed samples consisted of *E. coli*, *Helicobacter pylori* and human blood and were quantified by TaqMan-MGB fluorescent PCR. The feasibility and accuracy were evaluated by comparing the measured ratio (the ratio of the Ct values converted into the copy number) and the theoretical ratio. **Results** The co-efficient of variation (CV) values of six samples (DB1, DB2, DB3, DH1, DH2 and DH3) were 4.48%, 1.57%, 4.67%, 1.55%, 0.49% and 1.29% by CV analysis, respectively. In the nine mixed samples, the error was less than 0.1 for the measured ratio (DB/DH) and the theoretical ratio, in which the correlation was significant between the two groups ( $r = 1.000$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusions** The method for determining the copy number ratio between bacterial and human genome based on TaqMan-MGB fluorescent quantitative PCR was reproducible and accurate, and could be used to determine the copy number ratio between bacteria and human genome.

**【Key words】** Bacteria; Human; Probe real-time fluorescence quantitative PCR; Genome

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.02.019

基金项目: 浙江省自然科学基金(No. LY13H190003)

作者单位: 325200 瑞安市, 瑞安市中医院检验科<sup>1</sup>; 310006 杭州市, 杭州市第一人民医院检验科<sup>2</sup>; 518000 深圳市, 深圳致远精准医疗有限公司<sup>3</sup>

通信作者: 王贤军, Email: wangxj0525@126.com

近来,越来越多的研究致力于人体菌群与疾病的相关性。菌群在人体消化道内与其他理化因素构成的微生态是否能够正常运转,对人体健康发挥举足轻重的影响<sup>[1-2]</sup>。大量研究显示,消化道菌群失调不仅会导致代胃肠炎、肠癌等消化性疾病,而且还与代谢综合征、肥胖和2型糖尿病等消化道外疾病相关<sup>[3-7]</sup>。

由于环境中大多数微生物(> 99%)在无法体外分离培养,传统微生物培养法和16S rDNA分子生物学方法等都无法采集与分析完整的人体微生物群落信息<sup>[8-9]</sup>。高通量测序技术以及宏基因组学的迅速发展,使菌群研究已深入到基因水平<sup>[10-12]</sup>。然而,随着高通量测序检测虽然测序量大,检测覆盖深<sup>[13]</sup>,但若样本中目标DNA丰度过低,存在得不到有效数据量的风险。尤其面对临床上人类组织和细菌(病毒)的混合样本,在未知两者基因组拷贝的情况下,盲目的凭借经验去扩增建库,势必造成巨大的有效数据量损失。故测序前对混合样本进行精确的DNA含量判定十分重要。现售的定量检测试剂盒只能无差别的根据建库接头序列数量来定量,通过区分混合样本中不同物种DNA定量比例的试剂盒尚未报道。为了能得到混合样本中不同类别基因自的比例含量,从而更准确的判定高通量测序上载量,建立一种检定细菌和人类基因组拷贝数相对比值的方法非常必要。

目前, DNA定量方法主要包括紫外分光光度法、荧光染料法、实时荧光定量PCR法和数字PCR等<sup>[14]</sup>。然而,紫外分光光度法、荧光染料法只能对样本总量定量且灵敏度低。实时荧光定量PCR主要集中对样本中某一种或者某一类微生物定量,不能满足同时跨物种定量。数字PCR操作复杂、要求且价格昂贵,不适合大面积临床推广。*TaqMan-MGB*荧光定量PCR技术是现今较为成熟精确的定量技术,具有荧光本底低,干扰性低和专一性强的优势,被广泛应用于多种病原微

生物的检测工作中<sup>[15-18]</sup>。本研究运用除引物外,其他条件均完全相同的两套平行*TaqMan-MGB*荧光定量系统,对同一份人和细菌混合样本中的人、细菌的基因组拷贝数分别进行定量,得到两者的相对基因拷贝数比值,从而为提高临床和科研样本进行高通量测序成功率提供技术支持,现报道如下。

## 材料与amp;方法

### 一、研究对象

大肠埃希菌、幽门螺杆菌混合样本和健康人全血样本。

### 二、主要使用仪器和试剂

Roche lightcycler II 荧光定量PCR仪(Roche公司), PureLink™ Genomic DNA Mini Kit购自美国Invitrogen公司和KAPA PROBE FAST Universal qPCR Kits购自美国KAPA公司。

### 三、方法

1. 细菌基因探针和引物设计: 根据GenBank公布的23S rRNA保守区域基因序列,使用Primer 5.0设计*TaqMan-MGB*探针和引物,引物由华大基因公司合成,探针由Invitrogen公司合成,引物和探针序列见表1。

2. 人类基因探针和引物的设计: 将设计的细菌探针序列通过NCBI限定Homo sapiens (human) Nucleotide进行Blast筛选,结果发现在人类基因Dss1(蛋白酶体泛素受体亚基)的保守区域中存在相同序列。使用Primer 5.0设计Dss1基因引物,引物序列见表1。在GenBank数据库中使用Blast工具比对设计完成的引物和探针序列,以保证其扩增的特异性。

3. 样本全基因组DNA提取: 按照Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Mini Kit说明书中的Gram Negative Bacterial Cell Lysate Protocol和Mammalian Cells and Blood Lysate Protocol分别提取得到大肠埃

表1 引物和探针序列

目标基因	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)
23S rRNA-F	TYAGAACGTCGTGAGACAGTT	179
23S rRNA-R	CCTGCTTAGATGCTTTCAGCR	
Dss1-F	TCAGTGTGGCTACTGTTGTTC	179
Dss1-R	GGAAACAGTTTTGGCAACTG	
探针	AGTACGAGAGGAC-MGB	

注: Y表示C或者T

希菌和幽门螺旋杆菌混合DNA提取物 (DB) 和人类全血DNA提取物 (DH)。

4. 荧光定量PCR方法的建立: 使用KAPA PROBE FAST Universal qPCR Kits对两组样本进行Real-time qPCR。具体体系: 模板2  $\mu\text{l}$ 、浓度为10 pmol/L引物和探针各1  $\mu\text{l}$ 、KAPA PROBE FAST Universal qPCR mix 10  $\mu\text{l}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ 补足至20  $\mu\text{l}$ 。具体扩增程序: 94  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 58  $^{\circ}\text{C}$ 、20 s, 40个循环, 在58  $^{\circ}\text{C}$ 时收集检测荧光信号。

5. 标准品的制备与标准曲线的建立: DB和DH两组样本分别依次10倍比稀释至 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ , 这6个浓度的稀释液为待测标准品, 进行荧光定量PCR扩增, 经电脑软件分析结果后自动生成标准曲线, 设定初始拷贝数得到样本的DNA拷贝数相对值。

6. 样品模拟实验: 使用KAPA PROBE FAST Universal qPCR Kits定量DH初始浓度Ct值, 稀释DB至该值, 作为DB的原始起始浓度。两组样本10倍比稀释, 选取两组的 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  (DB1、DB2、DB3和DH1、DH2、DH3) 浓度稀释液两两正交混合后, 计算理论DB/DH值。用两对特异性引物分别检测同一个混合液, 得到两组分的拷贝相对数, 计算实测DB/DH值。通过理论值和实测值两项比较, 估算实验方法的精确度。

### 三、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。样本重复实验的可靠性采用变异系数法分析。DB/DH的实测值与理论值的比较采用线性相关性分析。

## 结 果

### 一、DB标准曲线的建立

将DB稀释的标准样品, 按照本方法检测得到相应的Ct值, 扩增曲线和标准曲线如图1: 从两张曲线图可看出标准曲线斜率 (slope) 达-3.802,  $r = -1.00$ 基本达到线性, 可以作为标准品使用, 该组引物和探针扩增曲线状态良好。

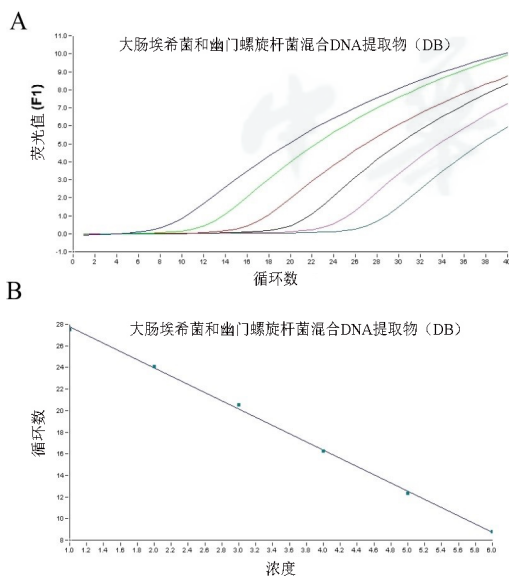
### 二、DH标准曲线的建立

将DH稀释得到的标准样品, 按照本方法检测得到相应的Ct值, 扩增曲线和标准曲线如图2: 从两张曲线图可看出标准曲线斜率 (slope) 达-3.368,  $r = -1.00$ , 线性水平良好, 可作为标准品使用, 该组引物和探针扩增曲线状态说明本研究设计合理, 达到预期目的。

### 三、样品模拟实验

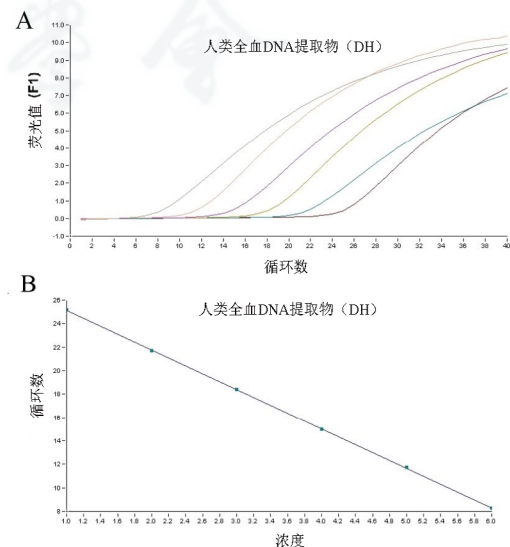
为使结果更加直观, 本实验调平两个反应中模板的起始浓度, 再进行10倍比稀释, 最后两两正交混合后分别用两对引物进行荧光定量PCR, 得到的实测值与理论值均为相对值。实际计算结果详见表2。

结果显示, 本研究两组中6个不同浓度样本



注: A: 扩增曲线, B: 标准曲线, DB: 大肠埃希菌和幽门螺旋杆菌DNA提取物

图1 DB扩增曲线和标准曲线



注: A: 扩增曲线, B: 标准曲线 DH: 人全血DNA提取物

图2 DH扩增曲线和标准曲线

表2 拷贝数比例理论值与实测值

编号	DB实测值	DH实测值	DB/DH实测值	DB/DH理论值
DB1 + DH1	985	1 096	0.90	1 : 1 (10 : 10)
DB2 + DH2	9 949	9 764	1.02	1 : 1 (100 : 100)
DB3 + DH3	95 950	81 682	0.93	1 : 1 (1 000 : 1 000)
DB2 + DH1	10 180	1 015	10.03	10 : 1 (100 : 10)
DB3 + DH2	96 100	9 673	9.93	10 : 1 (1 000 : 100)
DB1 + DH2	904	9 745	0.09	1 : 10 (10 : 100)
DB2 + DH3	9 880	82 727	0.13	1 : 10 (100 : 1 000)
DB1 + DH3	968	83 818	0.01	1 : 100 (10 : 1 000)
DB3 + DH1	104 000	1 063	97.23	100 : 1 (1 000 : 10)

注: DB1、DB2 和 DB3 分别代表 DB 样本稀释浓度为  $10^1$ 、 $10^2$  和  $10^3$ ; DH1、DH2 和 DH3 代表 DH 样本稀释浓度为  $10^1$ 、 $10^2$  和  $10^3$

(DB1、DB2、DB3、DH1、DH2、DH3) 的3次重复实验结果经变异系数 (coefficient of variation, CV) 分析, 6个样本的CV值依次为4.48%、1.57%、4.67%、1.55%、0.49%和1.29%, 均 < 5%, 提示本方法的重复性好。9组模拟样本实测值与理论值误差均 < 0.1, 且两组数值相关性极显著 ( $r = 1.000$ ,  $P < 0.001$ ), 提示本方法的准确性良好。

## 讨 论

随着精准医疗计划的推行, 高通量测序凭借其高效、敏感的优势被广泛应用到临床医学和医学研究的各个方面<sup>[19-22]</sup>。菌群和人体疾病关系的相关性研究也是近几年医学研究的热门之一。在对菌群样本进行高通量测序时, 无论是进行菌群16S rRNA还是全基因组测序建库时, 由于临床样本的复杂性, 即使采用了的针对细菌基因组的提取方法, 提取的基因组样本中常混有非目标样本基因组。目标样本基因组定量的准确性与否直接关系到高通量测序的质量及获得的数据量高低, 尤其是在人菌混合样品中, 能够在高通量测序前, 判定人和细菌(病毒)的拷贝数尤为重要。

Taqman-MGB探针能分辨出模板与探针结合区一个碱基的差别, 检测特异性高<sup>[23]</sup>, 且MGB探针长度在13~19个碱基<sup>[24]</sup>, 对于在人类和细菌间寻找适宜的检测区域十分有利。本研究设计细菌的通用引物以及细菌和人类通用的探针, 并通过两个平行的荧光定量PCR分别定量人和细菌的相对拷贝数, 避免了多重荧光定量PCR过程中引物和探针相互干扰, 影响检测敏感性的弊端<sup>[25]</sup>。本研究建立人和

细菌基因组的标准曲线的相关系数均达到1.00, 表明所建立的标准曲线及方程Ct 值与拷贝数相关性高。虽然已将定量细菌和人两部分实验尽量做到平行无差别的扩增, 两组标准曲线仍无法完全重合。推测可能是因两者基因序列本身差异造成的扩增效率不一致, 但此差异对混合样本的前期定量比值的估算影响不大。

目前本研究也存在一定不足。研究中选择常见的胃肠道致病菌大肠埃希菌和幽门螺杆菌混合样本来模拟细菌混合样本, 但细菌丰度太小, 无革阳性菌, 不能全面模拟混合样本, 后期需加大菌种丰度。

综上所述, 本研究中建立的细菌和人基因组拷贝数比值检定方法, 准确度高, 可重复性强, 方法简单, 易操作, 可在短时间内完成混合样本中基因组拷贝数的比值检定。因此, 此方法可用于临床和基础研究中样本细菌和人类组织混合样本基因组拷贝数的比值检定, 判定高通量测序上机前的文库构建是否合格, 从而获得更多的有效数据。

## 参 考 文 献

- [1] 刘瑞雪, 李勇超, 张波. 肠道菌群微生态平衡与人体健康的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 38(6): 383-387.
- [2] Vindigni SM, Zisman TL, Suskind DL, et al. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2016, 9(4): 606-625.
- [3] 陈玉霞, 詹学. 肠道菌群与炎症性肠病[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(8): 132-136.
- [4] Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015, 3(3): 207-215.
- [5] Genser L, Poitou C, Brot-Laroche É, et al. Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications

- and inflammation in obesity?[J]. *Med Sci (Paris)*,2016,32(5):461-469.
- [6] Fugmann M, Breier M, Rottenkolber M, et al. The stool microbiota of insulin resistant women with recent gestational diabetes, a high risk group for type 2 diabetes[J]. *Sci Rep*,2015,5:13212.
- [7] Villanueva-Millan MJ, Perez-Matute P, Oteo JA. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity[J]. *J Physiol Biochem*,2015,71(3):509-525.
- [8] Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P. Metagenomics: key to human gut microbiota[J]. *Dig Dis*,2011,29(6):525-530.
- [9] 张守印, 郭学青, 李振军, 等. 16S rRNA基因克隆文库用于菌群分析的效能研究和评价[J]. 第三军医大学学报,2008,30(16):1549-1552.
- [10] McAdam PR, Richardson EJ, Fitzgerald JR. High-throughput sequencing for the study of bacterial pathogen biology[J]. *Curr Opin Microbiol*,2014,19:106-113.
- [11] 郑艺, 张家超, 郭壮, 等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J]. 中国食品学报,2014,0(11):157-164.
- [12] Karlsson FH, Nookaew I, Nielsen J. Metagenomic data utilization and analysis (MEDUSA) and construction of a global gut microbial gene catalogue[J]. *PLoS Comput Biol*,2014,10(7):e1003706.
- [13] Guo Y, Han L, Sheng Q. Recent Advances in high throughput sequencing analysis[J]. *Int J Genomics*,2017,2017:2454780.
- [14] 谢浩, 胡志迪, 赵明, 等. 核酸定量检测方法研究进展[J]. 生命的化学,2014,34(6):737-743.
- [15] 郭毅, 杨靖娴, 邵冬华, 等. TaqMan-MGB探针实时荧光定量PCR快速检测光滑念珠菌[J]. 中国实验诊断学,2016(2):178-181.
- [16] Mingxiao M, Jinhua L, Yingjin S, et al. TaqMan MGB probe fluorescence real-time quantitative PCR for rapid detection of Chinese Sacbrood virus[J]. *PLoS One*,2013,8(2):e52670.
- [17] 邵冬华, 季娜, 梁国威, 等. TaqMan-MGB探针实时荧光定量PCR联合检测难辨梭菌菌属基因及毒素基因方法学的建立[J]. 中华流行病学杂志,2014,35(5):576-580.
- [18] McCleary S, Henshilwood K. Novel quantitative TaqMan(R) MGB real-time PCR for sensitive detection of *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas*[J]. *Dis Aquat Organ*,2015,114(3):239-248.
- [19] Guo T, Tan ZP, Chen HM, et al. An effective combination of whole-exome sequencing and runs of homozygosity for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia in consanguineous families[J]. *Sci Rep*,2017,7(1):7905.
- [20] Lee H, Deignan J L, Dorrani N, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders[J]. *JAMA*,2014,312(18):1880-1887.
- [21] Dewey FE, Grove ME, Pan C, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing[J]. *JAMA*,2014,311(10):1035-1045.
- [22] 李晟, 程福东, 孙啸. 高通量DNA测序技术与疾病诊断及预防[J]. 生物医学工程与临床,2016(2):210-215.
- [23] Hou YX, Xie C, Wang K, et al. Development and application of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus strains in China[J]. *J Vet Rec*,2016,60(2):127-133.
- [24] Xiao G, Qin C, Wenju Z, et al. Development of a real-time quantitative PCR assay using a TaqMan Minor Groove Binder Probe for the detection of  $\alpha$ -lactalbumin in food[J]. *J Dairy Sci*, 2016,99(3):1716-1724.
- [25] Ljungman P, Ward KN, Crooks BN, et al. Respiratory virus infections after stem cell transplantation: a prospective study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*,2001,28(5):479-484.
- (收稿日期: 2017-04-07)  
(本文编辑: 孙荣华)

潘晓微, 王贤军, 刘云惠, 等. 基于TaqMan-MGB探针荧光定量PCR技术检定细菌和人基因组拷贝数比值方法的建立[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018,12(2):193-197.

中华医学会