

# 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<sup>1\*</sup>, 吕青青<sup>1</sup>, 戴磊<sup>1</sup>

1. 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

**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, R045A)
2. TB Green 酶 (TAKARA, RR820A)
3. Omega 胶回收试剂盒 (Omega, D2500-01)
4. 琼脂糖
5. 引物 ( 27F-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG , 1541R-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA ; 331F-TCCTACGGGAGGCAGCAGT, 797R-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT ) [1]

## 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

## A. 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 <sub>2</sub> 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  $5.1 \times 10^5$  ng/nmol (<https://www.genscript.com/conversion.html>), 所以标准品中含有  $3.57 \times 10^{-4}$  nmol 分子, 根据阿伏伽德罗常数计算 1 μl 标准品中含有  $2.14 \times 10^{11}$  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/μl。

## B. 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 (μl)
TB Green 酶	-	10
331F	4 μM	1
797R	4 μM	1
全长 16S rRNA 基因 DNA 标准品	梯度浓度	1
ddH <sub>2</sub> 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.

## C. 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

下图 1 展示了溶解曲线、标准曲线和待测样品的检测结果。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。

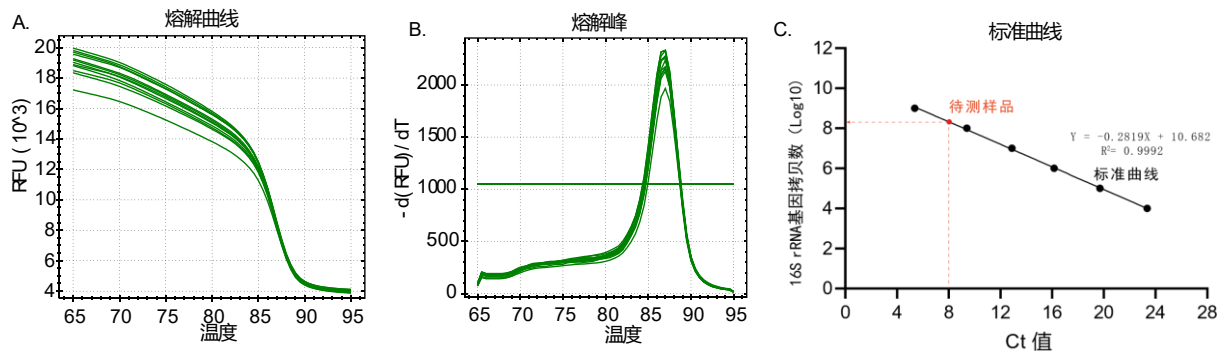


图 1. RT-PCR 方法检测粪便样本中微生物 16S rRNA 基因拷贝数溶解曲线和标准曲线

## 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.