

肠道菌群的检测方法及研究进展

刘玉婷, 郝微微, 温红珠, 邵兰君

背景资料

肠道菌群对人体的健康起着保护作用, 但是菌群在数量、种属、比例等方面失调与疾病的发生有关, 随着检测技术的进展, 对肠道菌群的认识也在不断推进, 本文就几种常用的分子生物学技术检测方法作简要阐述.

刘玉婷, 温红珠, 邵兰君, 上海中医药大学附属龙华医院消化科 上海市 200032

郝微微, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院消化科 上海市 200437

刘玉婷, 硕士研究生, 主要从事中医药防治胃肠疾病的研究.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, No. 81403362; 国家中医临床研究基地龙医团队基金资助项目, No. LYTD-09; 2012年度上海市自然科学基金资助项目, No. 12ZR1432000.

作者贡献分布: 本文由郝微微指导完成; 资料搜集与分析由刘玉婷完成; 资料筛选由温红珠与邵兰君完成; 综述由刘玉婷完成.

通讯作者: 郝微微, 主任医师, 200437, 上海市甘河路110号, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院消化科. hao2364@hotmail.com

收稿日期: 2016-04-25
修回日期: 2016-06-21
接受日期: 2016-06-27
在线出版日期: 2016-07-18

Intestinal flora: Detection methods and research advances

Yu-Ting Liu, Wei-Wei Hao, Hong-Zhu Wen, Lan-Jun Shao

Yu-Ting Liu, Hong-Zhu Wen, Lan-Jun Shao, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China

Wei-Wei Hao, Department of Gastroenterology, Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81403362; National TCM Clinical Research Base Longyi Team Project, No. LYTD-09; 2012 Shanghai Natural Science Foundation, No. 12ZR1432000.

同行评议者
谭周进, 教授, 湖南中医药大学

Correspondence to: Wei-Wei Hao, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, 110 Ganhe

Road, Shanghai 200437, China. hao2364@hotmail.com

Received: 2016-04-25
Revised: 2016-06-21
Accepted: 2016-06-27
Published online: 2016-07-18

Abstract

There are a large number of microorganisms in the human intestine, and they play an important role in digestion and absorption, energy metabolism, immune regulation, disease-resistant ability and so on, and are associated with the development of many diseases. The intestinal flora is of important significance for clinical treatment. This review focuses on a variety of molecular biology technologies for intestinal flora research, such as polymerase chain reaction (PCR), PCR-based 16 S rDNA fingerprinting, fluorescence in situ hybridization, gene chip, metagenome sequencing and so on, as well as the prospects for the research of intestinal flora.

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Intestinal flora; Detection methods; Molecular biology techniques

Liu YT, Hao WW, Wen HZ, Shao LJ. Intestinal flora: Detection methods and research advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(20): 3142-3148 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i20/3142.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i20.3142>

摘要

人的肠道中栖息着大量微生物, 在消化吸

收、能量代谢、免疫调节、抗病能力等方面发挥着重要作用, 与很多疾病的发生发展相关. 研究肠道菌群对临床治疗具有非常重要的意义. 本综述着重论述聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)、基于PCR基础上的16S rDNA指纹图谱技术、荧光原位杂交、基因芯片、宏基因组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, 希望为临床研究提供参考.

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 肠道菌群; 检测方法; 分子生物学技术

核心提示: 分子生物学技术为菌群的研究提供了一个新视角, 然而人类已经不仅仅满足于从定性和定量的角度去分析肠道菌群的变化, 测序技术使大规模菌群多样性研究成为可能.

刘玉婷, 郝微微, 温红珠, 邵兰君. 肠道菌群的检测方法及其研究进展. 世界华人消化杂志 2016; 24(20): 3142-3148 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i20/3142.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i20.3142>

0 引言

人的肠道中寄存着数量巨大、组成复杂的细菌群, 也是人体最庞大、最复杂的微生物群落, 包括大约30属1000多种细菌^[1]. 一般情况下, 肠道菌群与人体及外部环境保持着一个平衡状态, 对人体的健康起着保护作用. 然而, 一旦菌群在数量、种属、比例等方面失调, 这种平衡被打破, 就可引起疾病. 比如, 有研究^[2-4]发现溃疡性结肠炎患者粪便中双歧杆菌的数量明显减少, 肠球菌增加. 肝硬化患者肠杆菌科细菌明显增多, 双歧杆菌和乳酸杆菌减少^[5,6]. 同时, 许多疾病也可以引起菌群的失调, 从而加重病情. 肠道细菌的分析是一种非常复杂的工作, 随着检测技术的进展, 对肠道细菌的认识也在不断推进. 下面就几种常用的检测方法作简要分析.

1 细菌培养

传统培养法是微生物鉴定的基本方法, 但存在耗时长、培养要求高、影响因素多等问题. 更重要的是, 因为有些微生物要求的生长条件苛刻, 有些是绝对的严格厌氧菌, 还有些是在自然环境中与其他微生物形成共生关系, 实验室

很难模拟自然环境的条件, 因而无法得到其纯培养物; 而且细菌培养涉及多种培养基的选择和对微生物的检测, 这在很大程度上取决于技术人员的经验和技巧^[7]. 此外, 培养法只能培养活的细菌, 而死的细菌却无法计数, 因此, 培养法得出菌群失调的理论不够精确. 而分子生物学技术方法的出现则为这些细菌的检测提供了可能, 它具有检测时间短、灵敏度高、结果准确等优势, 弥补了传统培养法的诸多不足, 被广泛地应用于肠道微生态生物研究^[8].

2 聚合酶链式反应技术

聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)是一种用于放大扩增特定DNA片段的分子生物学技术, 主要通过变性、退火、延伸三个步骤完成. 参与复制的主要因素有DNA聚合酶、连接酶、引物、核苷酸原料等.

2.1 针对16S rRNA/DNA的PCR 16SrRNA基因是编码rRNA相对应的DNA序列, 存在于所有细菌的基因组中, 具有高度保守性及变异性. 根据保守性设计出细菌通用引物, 而可变区的差异可以用来区分不同的细菌, 一个16SrRNA的基因序列就代表着一种原核生物^[9]. Tiveljung等^[10]使用16SrDNA扩增技术, 在克隆恩病患者病变肠组织中检测到李斯特菌和大肠埃希菌, 从而推测出菌群紊乱与发病有关. 但是该方法存在一定的局限性.

2.2 实时荧光定量PCR 实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)反应中, 引入荧光化学物质, 随着PCR反应的进行, 产物不断累积, 荧光信号也不断增强, 这时对荧光信号进行检测, 通过标准曲线对未知模板进行分析, 从而实现起始模板的定量和定性分析. 因此, 与常规PCR相比, 实时荧光定量分析具有特异性强、灵敏度高、重复性好、自动化程度高的特点, 与DGGE等传统分子技术相比, 该技术可定量到种的水平, 具有其独特的优势^[11].

国内已有学者建立了较为系统的包括硬壁菌门菌等在内的9种肠道菌群及总量的荧光定量PCR检测体系, 不仅可以检测肠道各菌群的组成及特征, 还可以定量分析, 动态监测肠道菌群的数量变化, 相对于之前的检测方法更加系统和全面^[12-14]. Li等^[15]采用实时荧光定量PCR研究急性重症胰腺炎大鼠肠道菌群的变

■ 研究前沿
宏基因组测序为后续研究肠道微生物与人的肥胖、肠炎等疾病的关系提供重要的理论依据. 已有学者提出将宏基因组学与代谢组学结合, 通过检测肠道菌群及其代谢产物来评价药物、食物等对人体的功效.

■ 相关报道

国外Håkansson采用T-RFLP分析溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)小鼠的肠道菌群的多样性和群落结构,发现肠道菌群发生了改变,从而证明肠道菌群在UC的发病中起了一定的作用。

化,发现盲肠部位的大肠杆菌数量增多,而乳杆菌和双歧杆菌的数量大大减少。Kim等^[16]采用实时荧光定量PCR对30例功能性便秘患者的研究发现,他们肠道菌群的双歧杆菌和拟杆菌的数量减少,通过益生菌的治疗,肠道菌群可以恢复正常。

2.3 基于PCR基础上的16S rDNA指纹技术

2.3.1 肠道细菌基因间重复序列-PCR: 肠道细菌基因间重复序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)是由Sharple等于1990年在肠道细菌(霍乱弧菌*V. cholerae*除外)基因组中发现的长约124-127 bp的非编码保守重复序列,ERIC-PCR扩增产物的大小为50-3000 bp,每种菌株均存在着数目不等的各自独特的电泳带型,且主带型能够重复稳定出现,可用来区别不同种的细菌和同一种细菌中不同菌株^[17]。Di Giovanni等^[18]于1999年首次将这种ERIC-PCR技术应用到混合菌群群落结构的分析研究上,得到能够反映菌群组成差异的、重复性好而又稳定的指纹图谱。因此,ERIC-PCR的指纹图谱能很好地记录混合菌群的微生物生态结构信息。在医学研究中,该技术主要用来分析肠道菌群的多样性,通过不同样品间条带的分布、亮度和数量的变化,推测出菌群的变化,也可回收DNA主带,进行克隆测序,可知样品中的优势菌群,探讨菌群与疾病的关系。鲁海峰曾采用ERIC-PCR的方法对熊猫肠道微生物结构进行研究,得到大熊猫不同个体肠道微生物群落结构比较相似且稳定的结论^[19]。Li等^[20]也采用ERIC-PCR技术研究IBD患者的肠道菌群,证明了健康人比IBD患者的肠道菌群多样性更明显。

2.3.2 变性梯度凝胶电泳/TGGE-PCR: 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术是由Fischer于1979年提出的一种用于检测DNA突变的电泳技术,起初主要用于医学上, Muyzer等^[21]在1993年首次将这项技术应用到微生物群落结构研究方面,发现其在研究微生物种群方面具有很大的优势。他既可以对比分析不同的微生物群落之间的差异,也可以研究同一微生物群落的变化情况。DGGE的原理是使用具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶,双链DNA片段在聚丙烯酰胺凝胶电泳时的迁移行为主要取决于其分子的大小和带电荷的多少,使同样长度但序列

不同的DNA片段区分开来。DGGE分辨率高,适用于检测100-500 bp的片段,不需同位素掺入,避免了同位素污染。由于肠道微生物种类很多,只有占群落1%以上的种群才能被检测出来^[21,22]。DGGE具有技术可靠、可重复、快速和容易操作的特点,可直接显示微生物群落中优势组成成分,可同时对多个样品进行分析^[23,24]。

周帅等^[25]采用DGGE-PCR方法研究脓毒症大鼠肠道菌群的变化,发现回肠部大肠杆菌增多,乳酸菌和毛螺旋菌科细菌减少,而结肠部大肠杆菌和口腔普雷沃菌增加,乳杆菌减少,证明了回肠和结肠的菌群发生显著改变,不同肠段的菌群变化规律也不同。

温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)技术的基本原理与DGGE技术相似,凝胶温度梯度呈线性增加,可以有效分离PCR产物及目的片段。TGGE技术与化学变性剂形成梯度的DGGE技术相比,梯度形成更加便捷,重现性更强^[26]。Wei等^[27]采用TGGE-PCR对三只大熊猫的肠道菌群进行研究,认为熊猫的肠道细菌的种类与其他食草动物有很大区别,而肠道菌群的失衡导致竹子在肠道中不易被消化。国内学者用TGGE技术分析人肠道中双歧杆菌的组成。之所以采用TGGE技术,是因为其可以显著节约样品DNA。通常用于TGGE分析的DNA仅需十到几十纳克,而DGGE一般需180-300 ng,对一些肠道内双歧杆菌含量较少的个体的样品,选择TGGE更为灵敏^[28]。

2.3.3 末端限制性片段长度多态性分析: 末端限制性片段长度多态性分析(Terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术综合了PCR技术、DNA限制性酶切技术、毛细管电泳技术、荧光标记技术和DNA自动测序仪等技术,通过对特定DNA片段多态性的测定来分析比较微生物的群落结构。T-RFLP技术不仅可以进行微生物种类的定性分析,也可以进行定量分析。此外,RFLP还显示出各菌株间的DNA差异,故可用作种以下菌株的鉴定。熊婧采用T-RFLP技术分析微生物群落中双歧杆菌的特异性^[29]。

Håkansson等^[30]采用T-RFLP分析DSS诱导的溃疡性结肠炎小鼠的肠道菌群的多样性和群落结构,发现肠道菌群的总量及乳杆菌、大肠杆菌等的数量均发生了改变,从而证明肠

道菌群在溃疡性结肠炎的发病中起了一定的作用。Wang等^[31]采用T-RFLP技术分析哺乳期前后婴儿肠道菌群的变化, 并指出T-RFLP技术在研究粪便微生物群变化方面有很大的优势。此外, 国内也有学者建立了人粪便菌群柔嫩梭菌类群特异性的T-RFLP方法, 并认为, 虽然T-RFLP与DGGE灵敏度相同, 但T-RFLP技术重复性更好, 定量更准确, 实验流程也比DGGE的操作步骤简单很多, 适用于大规模样品的比对, 且不同批次的样品之间误差较小, 减少人为误差, 并能最低检测到群落中比例为1%的细菌, 具有高重复性、高通量、易于数字化等特点^[32]。但是T-RFLP的成本要比DGGE高。

3 分子探针技术及基因芯片技术

3.1 荧光原位杂交 荧光原位杂交(*fluorescent in situ hybridization*, FISH)是在放射性原位杂交基础上, 以荧光标记取代同位素标记而形成的一种杂交方法。将带有荧光标记的寡核苷酸探针直接与经过处理的细胞杂交, 使探针渗透到细胞内的核酸, 用荧光显微镜即可观察到带有杂交荧光标记探针的细胞, 通过计算杂交率来定量检测和鉴定细菌。他不需要通过纯化或扩增步骤, 即可在自然或人工的微生物环境中监测和鉴定不同的微生物个体, 同时对群落组成进行分析。在临床工作中, 荧光原位杂交技术一般用于对已知菌群的检测, 却不能检测未知菌群。钟燕等^[33]选用5种特异性的16S rRNA寡核苷酸探针, 应用荧光原位杂交技术分析乳糖不耐受者双歧杆菌的构成。但是, 由于部分微生物也会发出免疫荧光, 所以会产生一定的假阳性和假阴性, 而且, 若细菌中rRNA含量较低, 则检出率也会下降, 这些都会造成实验误差。

3.2 基因芯片技术 基因芯片又称为DNA微阵列, 是在分子杂交技术基础上发展起来的一种新型分子生物技术。基本原理是将大量探针固定于支持物上, 然后与标记的样品进行杂交, 通过荧光扫描及计算机分析样品中的基因序列及表达信息, 有高通量、高信息量、快速、样品用量少、造价低、用途广泛等优点。可以同时对上千个基因进行快速分析, 因此对像肠道菌群这样成分复杂的样品, 基因芯片展现出很大的优势极大提高了检测效率^[34,35]。翟俊辉等^[36]成功制备了大肠埃希菌、伤寒沙门菌等20多种细菌的基因芯片, 成功的检测到临床常

见的感染性细菌。

陈燕飞^[37]运用美国俄克拉荷马大学环境基因研究中心研发的第5代功能基因芯片, 对酒精性肝硬化、乙型肝炎肝硬化和正常对照三组研究人群的粪便微生物功能结构进行分析, 发现肝硬化患者肠道微生物功能基因结构与正常对照显著不同、涉及营养物质代谢的功能基因显著减少。

临床上, 基因芯片技术多用于对致病菌的检测。毛正果等^[38]建立的针对16SrRNA序列的基因芯片检测系统, 能够成功地鉴定临床常见的14种肠道致病菌。王军等^[39]也对7种腹泻病致病菌进行检测, 检测阳性符合率为100%, 敏感性高于粪便培养方法^[40,41]。

虽然基因芯片技术已经广泛应用于微生物研究领域, 但也存在一定的缺陷。基因芯片的提取纯化过程需要手动操作, 不可避免会引起人为误差, 所以, 选择误差较小的提取方法是整个检测的基础^[42]。而且, 由于探针的杂交有一定的错配率, 如何区分由此所造成的假阳性是临床微生物芯片面临的主要挑战。另外, 基因芯片的技术成本昂贵、复杂、无法鉴定亚群以及灵敏度等问题也限制了基因芯片的发展。

4 宏基因组(metagenome)测序

宏基因组是指环境中全部微小生物(目前主要包括细菌和真菌)DNA的总和, 宏基因组学是由Pace和andelsman于上世纪90年代提出的一门应用学科, 直接提取环境样品中的宏基因组进行高通量测序和生物信息学分析, 寻找和发现新的功能基因及活性代谢产物的一种方法。Relman实验室和美国基因组研究所于2005年第一次全面开展人类肠道宏基因组学的研究, 完善我们对肠道微生物多样性的认识^[43]。国外Manichanh等^[44]首次采用宏基因组学方法发现克隆恩病(*Crohn's disease*, CD)患者粪便样品中厚壁菌门的多样性较健康人群明显减少, 发现了一种新物种的存在。2010年, 欧盟资助的“人类肠道元基因组计划(MetaHIT)”进行了迄今最大的肠道细菌基因研究, 为后续研究肠道微生物与人的肥胖、肠炎等疾病的关系提供重要的理论依^[45]。国内学者利用宏基因组学的方法, 对乙型肝炎肝硬化患者肠道微生物群落结构及功能代谢进行了全面分析, 发现乙型

应用要点

肠道菌群的研究是目前的研究热点, 该综述主要介绍各种检测方法, 为临床科研工作提供参考价值。

■名词解释

宏基因组: 一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象, 以功能基因筛选和测序分析为研究手段, 以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系为研究目的的新的微生物研究方法。

肝炎肝硬化患者肠道菌群结构发生改变, 为肝硬化患者的微生态治疗提供理论依据^[46]。虽然宏基因组测序使大量的新的微生物种群和新的基因得以发现, 但无法完成某一菌体的具体数量。还有学者提出宏基因组学与代谢组学的联合应用可以为疾病发生机制的探讨提供理论依据, 也可以通过检测肠道菌群及其代谢产物来评价药物、食物等对人体的功效^[47]。

5 结论

就目前现状看, 肠道菌群的检测方法研究已经发展到相当高的水平, 传统细菌培养法已经不能满足人们对菌群的认识。分子生物学技术的开展, 为研究者们提供了一个新的视角。然而随着科学的发展, 人类也逐渐不仅仅满足于从定性和定量的角度去分析肠道菌群的变化, 而且分子生物技术过程繁琐复杂, 结果相对不精确, 覆盖物种有限的缺点也越来越不能满足科学的严谨性。测序技术能直接对PCR扩增的16S rDNA片段进行测序, 全面、平行分析多个样本中的微生物群落信息, 使大规模菌群多样性研究成为可能, 为认识肠道菌群打开了一扇大门^[48]。近几年来, 国外学者采用测序技术研究肠道菌群的多样性及与疾病的关系^[49]。目前粪便菌群移植(fecal microbiota transplantation, FMT)在很多消化道疾病的治疗上取得了一定的进步, 已有不少研究者采用分子生物学技术研究FMT后患者粪便菌群的变化。FMT也逐渐成为研究的热点, 但是对于其具体的作用机制尚不清楚, 能否通过测序技术明确具体的功能菌群, 提高移植的安全性, 尚有待研究^[50]。从发展趋势来看, 将不同的研究技术相互结合来研究肠道菌群, 将这有助于我们更进一步了解胃肠道微生态系统, 为临床治疗提供新的思路和方法。

6 参考文献

- 1 Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124: 837-848 [PMID: 16497592]
- 2 Sha S, Xu B, Wang X, Zhang Y, Wang H, Kong X, Zhu H, Wu K. The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75: 245-251 [PMID: 23276768 DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.022]
- 3 Schwieritz A, Jacobi M, Frick JS, Richter M, Rusch K, Köhler H. Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 2010; 157:

- 240-244.e1 [PMID: 20400104 DOI: 10.1016/j.jpeds.2010.02.046]
- 4 Macfarlane S, Furrie E, Cummings JH, Macfarlane GT. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1690-1699 [PMID: 15227614 DOI: 10.1086/420823]
- 5 Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1493-1502 [PMID: 16570339 DOI: 10.3748/wjg.v12.i10.1493]
- 6 Zhao HY, Wang HJ, Lu Z, Xu SZ. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 64-67 [PMID: 15612659 DOI: 10.1111/j.1443-9573.2004.00157.x]
- 7 Vocale C, Rimoldi SG, Pagani C, Grande R, Pedna F, Arghittu M, Lunghi G, Maraschini A, Gismondo MR, Landini MP, Torresani E, Topin F, Sambri V. Comparative evaluation of the new xTAG GPP multiplex assay in the laboratory diagnosis of acute gastroenteritis. Clinical assessment and potential application from a multicentre Italian study. *Int J Infect Dis* 2015; 34: 33-37 [PMID: 25749649 DOI: 10.1016/j.ijid.2015.02.011]
- 8 马素霞, 李小丽, 郑晓燕. PCR法与细菌培养法在急性腹泻患者沙门氏菌检测中的应用比较. *中国病原生物学杂志* 2008; 3: 735-737
- 9 廖炆, 刘作义. 分子生物学技术对肠道菌群检测分析的研究现状. *中国微生态学杂志* 2009; 21: 285-287
- 10 Tiveljung A, Söderholm JD, Olaison G, Jonasson J, Monstein HJ. Presence of eubacteria in biopsies from Crohn's disease inflammatory lesions as determined by 16S rRNA gene-based PCR. *J Med Microbiol* 1999; 48: 263-268 [PMID: 10334593 DOI: 10.1099/00222615-48-3-263]
- 11 赵洁, 马晨, 席晓敏. 实时荧光定量PCR技术在肠道微生物领域中的研究进展. *生物技术通报* 2014; 12: 61-66
- 12 程悦, 左浩江, 廖虹瑜. 肠道常见菌群荧光定量PCR检测方法的建立. *现代预防医学* 2014; 41: 4338-4341
- 13 郭世奎, 包维民, 龚昆梅. SYBR Green I实时荧光定量PCR法分析结肠癌患者肠道菌群变化. *中国普外基础与临床杂志* 2010; 17: 463-466
- 14 Castillo M, Martín-Orúe SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martín M, Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet Microbiol* 2006; 114: 165-170 [PMID: 16384658 DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.11.055]
- 15 Li Y, Wu H, Deng Y, Liao R, Xi L, Yao P. [Changes of Intestinal Mucosal Barrier and Intestinal Flora in Rats with Severe Acute Pancreatitis]. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2015; 32: 412-417 [PMID: 26211263]
- 16 Kim SE, Choi SC, Park KS, Park MI, Shin JE, Lee TH, Jung KW, Koo HS, Myung SJ. Change of Fecal Flora and Effectiveness of the Short-term VSL#3 Probiotic Treatment in Patients With Functional Constipation. *J Neurogastroenterol Motil* 2015; 21: 111-120 [PMID: 25537674 DOI: 10.5056/jnm14048]
- 17 Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 1992; 174: 4525-4529 [PMID:

- 1624445]
- 18 Di Giovanni GD, Watrud LS, Seidler RJ, Widmer F. Fingerprinting of mixed bacterial strains and BIOLOG gram-negative (GN) substrate communities by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). *Curr Microbiol* 1999; 38: 217-223 [PMID: 10069857]
- 19 鲁海峰, 魏桂芳, 李仲达. ERIC-PCR分子杂交技术分析大熊猫肠道菌群结构. *中国微生物杂志* 2005; 17: 81-84
- 20 Li RM, Han Y, Wang JH, Wang ZH. [An analysis of the DNA fingerprinting of intestinal flora in inflammatory bowel disease]. *Zhonghua Neike Zazhi* 2007; 46: 96-98 [PMID: 17445429]
- 21 Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 317-322 [PMID: 10383868 DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80055-1]
- 22 Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 475-482 [PMID: 12514030 DOI: 10.1128/AEM.69.1.475-482.2003]
- 23 刘霞. 应用PCR-DGGE和rep-PCR技术对大鼠及成人肝硬化肝移植后肠道菌群多样性的研究. 杭州: 浙江大学, 2011
- 24 Dar SA, Kuenen JG, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2325-2330 [PMID: 15870318]
- 25 周帅, 王晨阳, 范朝刚. 变形梯度凝胶电泳研究脓毒症大鼠肠道菌群的变化. *肠外与肠内营养* 2014; 21: 236-240
- 26 官曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE技术及其在微生物分子生态学中的应用. *微生物学报* 2004; 44: 845-848
- 27 Wei G, Lu H, Zhou Z, Xie H, Wang A, Nelson K, Zhao L. The microbial community in the feces of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as determined by PCR-TGGE profiling and clone library analysis. *Microb Ecol* 2007; 54: 194-202 [PMID: 17394039 DOI: 10.1007/s00248-007-9225-2]
- 28 庞小燕, 张宝让, 魏桂芳. 应用TGGE技术分析人肠道中双歧杆菌的组成. *微生物学报* 2005; 45: 738-743
- 29 熊婧, 张思璐, 魏霜. 属特异性T-RFLP技术在双歧杆菌群落分析中的应用. *微生物学通报* 2014; 41: 2538-2546
- 30 Håkansson Å, Tormo-Badia N, Baridi A, Xu J, Molin G, Hagslätt ML, Karlsson C, Jeppsson B, Cilio CM, Ahrné S. Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clin Exp Med* 2015; 15: 107-120 [PMID: 24414342 DOI: 10.1007/s10238-013-0270-5]
- 31 Wang M, Ahrné S, Antonsson M, Molin G. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *J Microbiol Methods* 2004; 59: 53-69 [PMID: 15325753 DOI: 10.1016/j.mimet.2004.06.002]
- 32 柳欣源, 申剑, 王婷婷. T-RFLP技术在人肠道柔嫩梭菌类群的组成分析中的应用. *中国微生态学杂志* 2009; 21: 696-700
- 33 钟燕, 黄承钰. 应用荧光原位杂交技术分析乳糖不耐受者结肠菌群. *营养学报* 2003; 25: 415-417
- 34 Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 2003; 185: 1831-1840 [PMID: 12618447 DOI: 10.1128/JB.185.6.1831-1840.2003]
- 35 Wang J, Puel JL. From cochlear cell death pathways to new pharmacological therapies. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8: 1006-1019 [PMID: 18782053 DOI: 10.2174/138955708785740599]
- 36 翟俊辉, 郭兆彪. 16SrDNA基因芯片检测临床常见感染性细菌. *临床检验杂志* 2002; 20: 133-136
- 37 陈燕飞. 肝硬化患者肠道微生态研究: 从结构到功能. 杭州: 浙江大学, 2013
- 38 毛正果, 郑浩轩, 王新颖. 基因芯片检测常见肠道致病菌感染的评价. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 809-812
- 39 王军, 逢建涛, 刘玉瑜. 基因芯片检测7种常见腹泻病致病菌方法研究. *中国人兽共患病学报* 2012; 28: 938-941
- 40 Liu Y, Bowen NJ, Matyunina L, McDonald J, Prausnitz MR. Gene transfection enhanced by ultrasound exposure combined with drug treatment guided by gene chip analysis. *Int J Hyperthermia* 2012; 28: 349-361 [PMID: 22621736 DOI: 10.3109/02656736.2012.669513]
- 41 Østerberg FW, Rizzi G, Donolato M, Bejhed RS, Mezger A, Strömberg M, Nilsson M, Strømme M, Svedlindh P, Hansen MF. On-chip detection of rolling circle amplified DNA molecules from *Bacillus globigii* spores and *Vibrio cholerae*. *Small* 2014; 10: 2877-2882 [PMID: 24616417 DOI: 10.1002/smll.201303325]
- 42 Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods* 2010; 81: 127-134 [PMID: 20171997 DOI: 10.1016/j.mimet.2010.02.007]
- 43 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-1638 [PMID: 15831718 DOI: 10.1126/science.1110591]
- 44 Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; 55: 205-211 [PMID: 16188921 DOI: 10.1136/gut.2005.073817]
- 45 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork

同行评价

本文综述了肠道菌群检测方法, 能较全面概括目前常用的分子生物学技术, 为选择何种检测方法提供了指导, 因此, 本综述具有较强的临床意义。

- P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65 [PMID: 20203603 DOI: 10.1038/nature08821]
- 46 魏晓. 乙肝肝硬化患者肠道微生物宏基因组学的研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012
- 47 Tuohy KM, Gougoulas C, Shen Q, Walton G, Fava F, Ramnani P. Studying the human gut microbiota in the trans-omics era--focus on metagenomics and metabonomics. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1415-1427 [PMID: 19442166]
- 48 黄卫强, 张和平. 分子生物学技术在肠道菌群研究中的进展. *微生物学通报* 2014; 41: 1195-1202
- 49 Kaakoush NO, Day AS, Huinao KD, Leach ST, Lemberg DA, Dowd SE, Mitchell HM. Microbial dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3258-3266 [PMID: 22837318 DOI: 10.1128/JCM.01396-12]
- 50 Grehan MJ, Borody TJ, Leis SM, Campbell J, Mitchell H, Wettstein A. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 551-561 [PMID: 20716985 DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181e5d06b]

编辑: 于明茜 电编: 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

•消息•

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

