

Application of PCR-DGGE Fingerprinting to Analyze the Microbial Community Diversity from Autism Gut

Renmin ZHANG¹, Dongrui ZHOU^{1,*}, Yuan SONG², Caihe DU¹, Tingting WEI¹, Fang HU¹, Fei XIAO¹, Beili SUN³, Xueying XIE³, Zuhong LU^{1,3,*}

¹ Research Center for Learning Science, Southeast University, Nanjing 210096, China

² Child Health Division, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215002, China

³ State Key Lab of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China

*Corresponding author Email: junbai1013@seu.edu.cn, zhlu@seu.edu.cn

Abstract: Objective: PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) was applied to analyze autism gut microbial communities. **Materials and methods:** We extracted the total microbial genome DNA of each fecal sample from two group subjects: the control and ASD (autism spectrum disorders) groups, amplified the V3 regions of microbial 16S rDNA genes. The gut microbial diversities were detected by PCR- DGGE. **Results:** DGGE analysis revealed diverse bacterial populations among the individuals and between the two groups, the similarity values of the comparisons of the bacterial DGGE bands patterns of the control and ASD groups ranged from 0.41 to 0.72 and 0.20 to 0.48 respectively. **Conclusions:** PCR-based DGGE can be used to detect the intestinal microbial diversities as an effective tool, and the intestinal microbial diversities may take a significant role in the autistic etiology.

Keywords: PCR-DGGE; gut microbial; ASD; 16S rDNA.

PCR-DGGE指纹图谱技术分析孤独症儿童肠道菌群结构

张仁敏¹, 周东蕊^{1,*}, 宋媛², 杜彩贺¹, 魏婷婷¹, 胡芳¹, 肖飞¹, 孙蓓丽³, 谢雪英³, 陆祖宏^{1,3,*}

¹东南大学学习科学研究中心, 南京, 中国, 210096

²苏州市立医院儿童保健科, 苏州, 中国, 215002

³东南大学生物电子学国家重点实验室, 南京, 中国, 210096

*Email: junbai1013@seu.edu.cn, zhlu@seu.edu.cn

摘要: 目的 应用PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis, 变性梯度凝胶电泳)指纹图谱技术对孤独症肠道微生物菌群结构进行研究。**材料和方法** 分别提取正常儿童和孤独症儿童粪便细菌总基因组DNA, PCR扩增细菌16S rDNA基因V3可变区, DGGE方法检测PCR产物。**结果** 建立了健康儿童和孤独症儿童肠道菌群组成的DGGE指纹图谱, 分析结果表明正常儿童肠道菌群有较高的相似度(0.41-0.72), 孤独症儿童肠道菌群有较低的相似度(0.20-0.48)。**结论** PCR-DGGE技术是一种快速有效的用于分析研究儿童肠道菌群结构的技术。孤独症儿童肠道菌群结构与正常组儿童相似度较低, 提示肠道菌群结构紊乱与孤独症的发生有相关性。

关键词: PCR-DGGE; 肠道菌群; 孤独症; 16S rDNA

1 引言

孤独症 (autism spectrum disorders, ASD) 是儿童时期广泛性发育障碍中最为典型和常见的一种疾病, 以交流障碍、语言障碍、刻板兴趣和行为为特征, 一般在3岁前发病, 是一类由多因素导致的综合征。多项研究发现孤独症儿童多数具有肠胃问题, 如便秘, 腹泻, 有时交替出现, 胃肠道产生大量的异常气体, 打嗝, 大便异味等; 并且孤独症患者中多数人有经常服用抗生药的历史^[1], 口服抗生素容易打乱肠道微生物的保

护作用, 为致病菌提供一个好的生存环境。Bolte^[1] (1998) 最早报导了肠道梭菌属细菌 (也可能是其他类型的细菌) 可能是引起迟发性儿童孤独症的重要原因。Helena (2005) 等^[2]研究发现91.4%的孤独症患者都有过胃肠紊乱的问题, 而选择的健康孩子中没有发现有肠道疾病。由此发现胃肠道微生物组成紊乱可能与孤独症的发生有一定关系。

肠道微生物群落的分析方法主要有沿用已久的传统培养法和近年来兴起的基于基因序列的微生物分子生态学方法, 而后者成为越来越重要的研究方法。16S

rDNA 在细菌中普遍存在,其可变区和保守区交错排列,可用于研究细菌的种系发生学关系,基于16S rDNA 的序列分析方法被称为细菌鉴别和分类的“金标准”^[3]。近年来,基于16S rDNA序列的DGGE (denatured gradient gel electrophoresis, 变性梯度凝胶电泳)指纹图谱技术,被广泛运用于分析临床^[4]等样品细菌群落结构的研究中。本研究选取了20例健康儿童粪便样本和45例诊断为孤独症的儿童粪便标本,PCR扩增16S rDNA基因的V3区,产物进行DGGE分析,以探讨孤独症儿童粪便样本中的菌群组成情况。

2 材料与方法

2.1 材料

所用45份孤独症粪便样本于2009年采自苏州市立医院和南京市明心幼儿园2~9岁孤独症小孩,20份健康儿童粪便样本于2009年采自东南大学幼儿园4~6岁小孩,采集后立即-70℃冻存。同时对胃肠道问题信息进行了采集。

2.2 方法

2.2.1 肠道细菌总DNA的提取

提取方法参照文献^[5]进行,将得到的总细菌DNA溶于100ul无菌水中,用NanoDrop ND21000 核酸浓度测定仪测定总DNA浓度,置-20℃保存备用。

2.2.2 V3区16S rDNA PCR扩增

利用P2、P3引物进行16S rDNA V3区的扩增,引物序列参照文献^[6]设计并合成。通用引物序列:P2:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', P3:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' (引物5'端粗体部分为40bp“GC夹”),产物长度230bp左右。25ul体系中含有0.5 ul dNTP, 2.5ul 10 × Buffer (Mg²⁺ free), 2.5ul MgCl₂, 0.5ul Tag酶,每种引物1um, 50ng DNA模板。

PCR反应程序如下:先采用“Touchdown PCR”^[6], 94℃变性4 min, 循环为94℃, 1min; 65℃, 1min; 72℃1 min, 之后每2个循环退火温度下降1℃, 直到退火温度为55℃, 以55℃为退火温度循环4次。最后是72℃延伸10min。然后进行“Reconditioning PCR”^[7], 94℃变性4 min, 循环为94℃, 1min; 55℃, 1min; 72℃1 min, 循环6次, 最后72℃延伸10min。2次PCR中均采用超纯水作为阴性对照保证PCR过程中没有污染。

PCR产物用1.5%琼脂糖电泳检测。

2.2.3 DGGE分析并对其图谱进行相似性比较

DGGE指纹图谱的构建采用Bio-Rad DCode system进行。丙烯酰胺凝胶浓度为8%,平行电泳变性梯度为22%~58%(100%变性剂为7mol/L尿素和40%去离子甲酰胺),PCR产物的上样量为每个泳道约5ul。使用1×TAE 缓冲液在200 V、60℃条件下预电泳5 min,然后在150V、60℃条件下电泳5h。电泳后凝胶使用Gel Red进行染色。最后使用Bio-Rad凝胶成像系统进行拍照,其图谱采用UPGAMA聚类构建系统树进行聚类分析。

3 结果

3.1 孤独症儿童胃肠道问题调查统计

45份孤独症样本的胃肠道问题统计结果发现大部分孤独症儿童都存在饮食障碍(n=31, 68.89%)、便秘(n=24, 53.33%)、腹泻(n=11, 24.44%)以及便秘腹泻交替(n=7, 15.56%)现象。

3.2 V3区16S rDNA PCR 扩增结果

所有样本都成功扩增出菌群16S rDNA V3区产物,产物长度230bp左右。

3.3 DGGE 图谱的菌群结构组成分析和聚类分析

45份孤独症样本与正常样本的DGGE图谱显示正常组与孤独症组差异很大,聚类分析显示正常组的聚类相似度较高,而孤独症的与正常的聚类相似度较低(文章未把所有结果放里面)。图1(A)显示6名正常(C1-C6)和10名孤独症儿童(1-10)肠道菌群DGGE指纹图谱,每一条泳道代表1名儿童肠道菌群DGGE指纹图谱。不同位置的条带代表不同的细菌,亮度反映出细菌相对量的多少。图1(A)中从不同泳道的条带数量、位置和亮度的差异表明16名儿童肠道菌群的结构组成是不一样的,反映了肠道细菌的结构存在明显的多样性差异,同时也呈现不同的优势菌条带。从图1中可以看出,在正常儿童肠道中占优势的条带主要是a和b,而孤独症儿童中每个个体中肠道中占优势的条带都不太一样,而且明显比正常儿童肠道中占优势的亮的条带要多,一些特别亮的条带有a, b, c, d, e, f, g等。

DGGE图谱的聚类分析图1(B)显示正常儿童肠道菌群图谱相似度最低能达到0.41,最高能达到0.72;而孤独症儿童之间相似度比较低,最高只能达到0.48。

从图中可以看出,8号个体与其他个体的相似度最低,只有0.20左右,结合调查问卷分析发现,8号个体经常有便秘,大便为褐色干的大便;而且8号个体的DGGE图谱显示条带a特别粗亮。1、4和6号个体DGGE图谱显示条带d和b特别粗亮,结合调查资料发现1号和6号个体都有服用药物(4号资料缺),饮食也存在问题。9号个体DGGE图谱显示条带g比较粗亮,结合资料发现,9号个体饮食存在障碍,大便为黄色稀的大便。由于肠道菌群与饮食、年龄、个体基因以及生活环境等^[8]有关,因此每个个体肠道菌群结构呈现多样性。

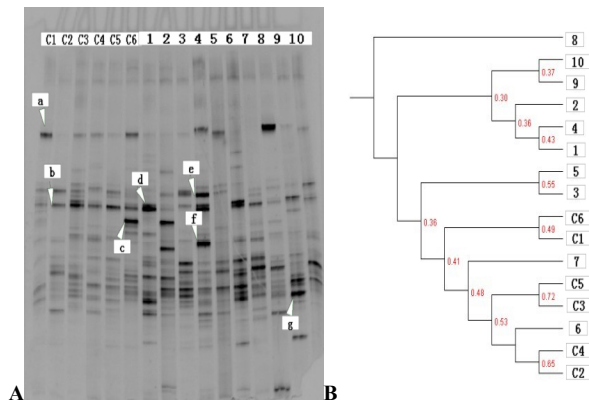


Figure 1. A: DGGE profiles of V3 region PCR amplification products of the 16 samples; B: Intragroup similarity dendrogram of DGGE profiles. C1 to C6 is the control group, 1 to 10 is the ASD group

图 1. A: 16 个样本的 DGGE 图谱; B: 系统树。C1-C6 为健康儿童样本, 1-10 为孤独症儿童样本

4 讨论

DGGE 技术是由Muzyer等^[6]1993 年首次将该技术应用用于分子微生物学研究领域。它主要是利用梯度变性胶来分离DNA 片段,只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等足够精细,有一个碱基差异的DNA 片段都可被分开。DGGE 具有传统微生物分析方法无可比拟的优势,在实验室得到广泛的应用。

在本研究中, 16S rDNA V3区的PCR-DGGE图谱能够很好地对人体肠道主要菌群组成进行区分。本研究中的16份粪便标本的DGGE 图谱显示高度的多态性,而且不同标本间的带型均存在很大的差异。比较正

常儿童样本和孤独症样本的DGGE图谱发现,孤独症样本的菌群组成与正常儿童的差异很大。孤独症儿童样本中粗亮的条带要比正常组的多,说明孤独症儿童肠道中这些粗亮的条带代表的细菌占优势,提示这些占优势的菌群与孤独症的发生有相关性。为了进一步证明肠道菌群紊乱与孤独症的发生的相关性,还需要测序等进一步的研究工作证明。

致谢

南京市明心幼儿园、苏州工业园区博爱学校为本研究提供孤独症儿童粪便样本,东南大学幼儿园为本研究提供健康儿童粪便样本,东南大学学习科学研究中心邓慧华教授对本研究提供帮助。

国家高新技术(863)项目(编号:2006AA020702)和国家自然科学基金项目(编号:30600152)对本研究提供资助。

References (参考文献)

- [1] Bolte ER. Autism and Clostridium tetani. Med Hypotheses[J]. 1998, 51(2):133-44.
- [2] Helena M. R. T. Parracho, Max O. Bingham,† Glenn R. Gibson and Anne L. McCartney. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children[J]. Journal of Medical Microbiology .2005, 54: 987-991.
- [3] Relman DA , Schmidt TM , MacDermott RP , et al . Identification of the uncultured bacillus of Whipple' s disease[J]. N Engl JMed ,1992 , 327 (5) :2932301.
- [4] LU Shan ,SUN Hui ,XION G Yan-wen ,ZHOU Yong-yun ,YE Chang-yun.The fecal bacterial community in infantile diarrheal samples explored by PCR-denatured gradient gel electrophoresis technique based on 16S Rdna[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(3).
卢珊,孙晖,熊衍文,周永运,叶长芸。婴幼儿腹泻粪便标本菌群的16S rDNA PCR-DGGE分析[J]。中国人兽共患病学报, 2009, 25 (3).
- [5] Chen Bei, Huang Rui. Comparison of Bacterial Genomic DNA Extraction Methods from Human Fecal Samples[J]. Chin J Hemorrh. 2007, 17(2):210-214.
陈蓓,黄瑞。粪便标本中细菌DNA提取方法的比较[J]。中国血液流变学杂志, 2007,17(2) :210-214。
- [6] Muyzer, G. E; C. de Waal; A. G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S Rrna[J]. Appl Environ Microbiol. 1993, 59:695-700.
- [7] Janelle R. Thompson, Luisa A. Marcelino and Martin F. Polz. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'[J]. Nucleic Acids Research. 2002, 30(9): 2083-2088.
- [8] Les Dethlefsen, Paul B. Eckburg, Elisabeth M. Bik and David A. Relman . Assembly of the human intestinal microbiota[J]. TRENDS in Ecology and Evolution. 2006, 21(9):517-523.