(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112368398 A
(43)申请公布日 2021.02.12

(21)申请号 201980041614.5
(22)申请日 2019.01.08
(30)优先权数据
10-2018-0046321 2018.04.20 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/000280 2019.01.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/203422 KO 2019.10.24
(71)申请人 梨花女子大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 金英珠 俞泳我 李庆珠 杜智恩 权恩震 朴美惠
(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224
代理人 刘培培
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6883(2006.01)
C12Q 1/689(2006.01)

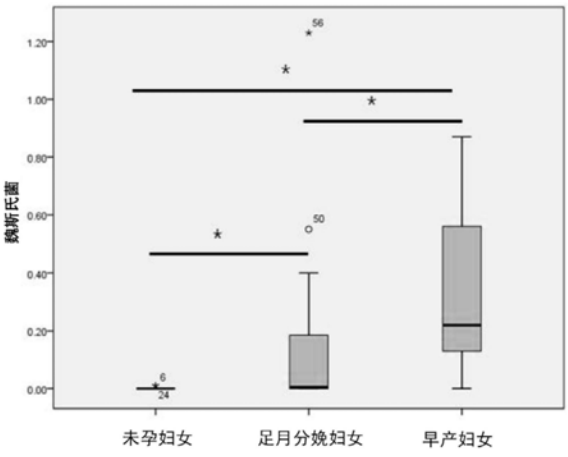
权利要求书1页 说明书20页
序列表1页 附图13页

(54)发明名称

利用血液微生物群落的变化预测早产风险

(57)摘要

本发明涉及利用血液中微生物组的变化来预测早产,更具体地,提供了用于通过检测来自孕妇的血液的魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属、梭菌属或乳杆菌属来诊断早产风险的组合物。



CN 112368398 A

1.一种用于诊断孕妇的早产风险的组合物,包含能够检测来自所述孕妇的血液样品的选自由魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属和梭菌属组成的组中的至少一种微生物的试剂。

2.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述组合物进一步包含能够检测乳杆菌属的微生物的试剂。

3.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,能够检测所述微生物的所述试剂是对所述微生物特异的引物、探针、反义寡核苷酸、适体或抗体。

4.根据权利要求3所述的组合物,其特征在于,所述引物是能够扩增所述微生物的16S rRNA的引物。

5.一种用于诊断早产风险的试剂盒,包含权利要求1至4中任一项所述的组合物。

6.一种用于提供诊断早产风险所需的信息的方法,包括检测来自孕妇血液样品的选自由魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属和梭菌属组成的组中的至少一种微生物。

7.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括检测乳杆菌属的微生物。

8.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法包括:

(a)从孕妇血液中提取基因组DNA,

(b)使对魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属或梭菌属特异的引物与提取的基因组DNA反应,和

(c)扩增反应物。

9.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,步骤(c)通过聚合酶链反应进行。

10.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:将步骤(c)的扩增产物的量与从正常孕妇血液中获得的基因组DNA的扩增产物进行比较。

11.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,当与正常孕妇相比,从所述孕妇血液中检测到的魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属或梭菌属的扩增DNA产物的量更高时,将所述早产风险评估为高。

12.根据权利要求7所述的方法,其特征在于,当与正常孕妇相比,从所述孕妇血液中检测到的选自由魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属和梭菌属组成的组中的至少一种菌株的扩增DNA产物的量更高并且乳杆菌属的基因组DNA的扩增产物的量更高时,将所述早产风险评估为高。

利用血液微生物群落的变化预测早产风险

技术领域

[0001] 本发明涉及通过检测孕妇血液中的微生物组来诊断早产风险的组合物、诊断试剂盒和诊断方法。更特别地，本发明涉及通过检测孕妇血液中的魏斯氏菌属(Weissella sp.)、热产醋菌属(Thermacetogenium sp.)、乳杆菌属(Lactobacillus sp.)或梭菌属(Clostridium sp.)来诊断早产风险的组合物、诊断试剂盒和诊断方法。

背景技术

[0002] 早产(PTB)通常是指在妊娠20至37周之间的分娩，早产新生儿有较高的死亡风险，早产占所有婴儿死亡的约60％，甚至存活的婴儿也由于神经系统发育障碍、呼吸系统并发症、出生后生长迟缓等而需要重症监护，此外，严重的长期或短期疾病的发病率较高。大约70％的早产是由诸如子宫内感染和炎症的各种病理过程引起的未足月阵痛(PTL)和未足月胎膜早破(PPROM)所引起的。然而，与早产有关的机制仍不明确，并且通常与自然阵痛有关的危险因素包括生殖系统感染、多胎妊娠、中期和晚期妊娠出血、既往早产史等。

[0003] 众所周知，提高早产儿存活率的最小孕周为27周，最小出生体重为0.9kg，新生儿的患病和死亡主要受孕周(即成熟度)的影响，其次是出生体重。因此，当在妊娠较早的周出现早产的征兆时，通过适当的分娩延迟治疗来增加婴儿的成熟度是确保母亲和新生儿健康和生活的质量和成本的重要关键点。

[0004] 迄今为止，已经对有早产风险的孕妇给予子宫收缩抑制剂、抗生素治疗、类固醇和孕酮。但是，在已经发生未足月阵痛和未足月胎膜早破的情况下，抗生素对子宫内感染和炎症的治疗作用是有限的，并且不能防止早产。此外，由于宫颈机能不全的孕妇有很大的感染和流产的风险，因此进行宫颈缝缩术来治疗和预防早产，但众所周知，这不能作为根本性治疗，只是有助于将短的妊娠期延长。

[0005] 因此，与其选择在未足月胎膜早破或早产的症状后进行治疗，不如通过提前预测早产风险来选择有早产风险的孕妇群体，然后通过对她们进行适当的管理来防止早产或开发有效的治疗方法。此外，早产越早，新生儿中留下后遗症的可能性就越大，并且后遗症的程度也就越严重，因此，如果可以预测早产，那么预计早产儿和残疾儿童的发生率将大大减少。

[0006] 预测早产的一般方法是从产科、人口统计学上以及根据各种综合症来鉴别需要给予特别注意的妇女群，但是存在的问题是该方法不灵敏也不具有特异性。为了克服这个问题，已经进行许多研究以发现用于预测意外早产或胎膜破裂的生化标志物，已经将诸如血浆雌二醇-17β、孕酮和C反应蛋白的物质作为候选物，但这些也都被证明不太准确。因此，需要开发一种更易于检测并且具有高灵敏度和特异性的标志物。

[0007] 随着基因测序技术的最新发展，已经可以研究人体各个区域的人微生物组，但是直到现在，几乎没有以鉴定血液中微生物群落(微生物组)与早产风险之间的关联并用于诊断早产风险为目的的研究。而且，尚未在经历早产和未足月胎膜早破的韩国孕妇中进行过这样的血液微生物表征的研究。

发明内容

[0008] 【技术问题】

[0009] 据此,本发明人对未足月阵痛或未足月胎膜早破(其为早产的主要原因)的孕妇的血液中的微生物进行了表征,并使用基因序列分析确认了预测早产的血液中的微生物群落,从而完成了本发明。

[0010] 本发明试图通过分析孕妇血液中的微生物组来发现指示早产风险的预测性标志物,从而为早产的预测做出贡献。

[0011] 为此,一种实施方式提供了用于诊断产妇早产风险的组合物,该组合物包含能够检测魏斯氏菌属微生物的试剂。

[0012] 另一种实施方式提供了用于诊断产妇早产风险的试剂盒,该试剂盒包含该组合物。

[0013] 另一种实施方式提供了用于提供诊断早产风险所需的信息的方法,该方法包括检测孕妇血液中的魏斯氏菌属微生物。

[0014] 【技术方案】

[0015] 根据一个方面,本发明涉及用于诊断孕妇的早产风险的组合物,该组合物包含能够检测选自由魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属(Faecalibacterium sp.)和梭菌属组成的组中的至少一种微生物的试剂。

[0016] 优选地,本发明的用于诊断的组合物可以进一步包含能够检测乳杆菌属的微生物的试剂。

[0017] 优选地,能够检测微生物的试剂可以是对微生物特异的引物、探针、反义寡核苷酸、适体或抗体。

[0018] 更优选地,该引物可以是能够扩增微生物的16S rRNA(16S rDNA)的引物。例如,能够扩增微生物的16S rRNA的引物可以是由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的序列组成的引物。

[0019] 另一方面,本发明涉及用于诊断早产风险的试剂盒,该试剂盒包含该组合物。

[0020] 另一方面,本发明是用于提供诊断早产风险所需的信息的方法,该方法包括检测孕妇血液中的选自由魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属和梭菌属组成的组中的至少一种微生物,以便提供诊断早产风险所需的信息。

[0021] 优选地,该用于提供诊断早产风险所需的信息的方法可以进一步包括检测乳杆菌属的微生物。

[0022] 另外,优选地,该方法可以包括:

[0023] (a)从孕妇血液中提取基因组DNA,

[0024] (b)使对魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属或梭菌属特异的引物与提取的基因组DNA 反应,和

[0025] (c)扩增反应物。

[0026] 此外,优选地,步骤(c)可以通过聚合酶链反应进行。

[0027] 此外,优选地,步骤(c)可以进一步包括将扩增产物的量与正常孕妇血液的扩增产物或截止值进行比较。

[0028] 另外,优选地,它可以是这样的方法,在该方法中,当孕妇血液中检测到的魏斯氏菌属、热产醋菌属、粪杆菌属或梭菌属的扩增DNA产物的量与正常孕妇中的量相比进一步增

加时，则早产风险被评估为高。

[0029] 此外，优选地，它可以是这样的方法，在该方法中，当孕妇血液中检测到的由魏斯氏菌属、热产醋菌属、梭菌属、粪杆菌属和乳杆菌属组成的菌株的基因组DNA的扩增产物的量与正常孕妇中的量相比进一步增加时，则早产风险被评估为高。

[0030] 在下文中，将更详细地描述本发明。

[0031] 在本发明中，作为分析因未足月阵痛和未足月胎膜早破而住院的孕妇血液中的微生物群落的构成对早产的影响的结果，已经确认魏斯氏菌属的增加、乳杆菌属的增加、粪杆菌属的增加、热产醋菌属的增加和/或梭菌属的增加会影响早产。

[0032] 因此，在本发明中，通过检测孕妇血液中的魏斯氏菌属、粪杆菌属、热产醋菌属或梭菌属微生物，可以诊断孕妇早产的风险，为此，本发明提供了用于检测魏斯氏菌属、粪杆菌属、热产醋菌属或梭菌属微生物的组合物、试剂盒和方法。优选地，本发明可以通过进一步检测乳杆菌属微生物来诊断孕妇早产的风险，并且还提供用于该目的的组合物、试剂盒和方法。

[0033] 本文中，术语“微生物组”是指在人体中共存的微生物的全部遗传信息，在本发明中，血液中的微生物组定义为血液中存在的微生物的全部遗传信息。

[0034] 本文中，术语“风险诊断”或“风险预测”是指针对孕妇确定是否有少于37个妊娠周的早产的可能性，少于37周的早产的可能性是否相对较高，或者是否有显示少于37周的早产的迹象的可能性。本发明可以用于通过对少于37周的早产风险高的孕妇进行特殊和适当的管理来延迟或预防孕妇的早产。另外，本发明可以在临床上用于通过在早期诊断少于37周的早产并选择最合适的治疗方法来确定治疗。

[0035] 在本文中，“魏斯氏菌”是指由在分类学上属于魏斯氏菌属的物种组成的微生物或其群落。在本发明中，魏斯氏菌不仅包括常规报道的菌株，而且还包括与先前报道的魏斯氏菌的16S rRNA序列相比具有优选70％或更高、更优选80％或更高、再更优选90％或更高、最优选 95％或更高的序列同源性的所有微生物。

[0036] 在本文中，“热产醋菌”是指由在分类学上属于热产醋菌属的物种组成的微生物或其群落。在本发明中，热产醋菌不仅包括常规报道的菌株，而且还包括与先前报道的热产醋菌的16S rRNA序列相比具有优选70％或更高、更优选80％或更高、再更优选90％或更高、最优选 95％或更高的序列同源性的所有微生物。

[0037] 在本文中，“乳杆菌”是指由在分类学上属于乳杆菌属的物种组成的微生物或其群落。在本发明中，乳杆菌不仅包括常规报道的菌株，而且还包括与先前报道的乳杆菌的16S rRNA 序列相比具有优选70％或更高、更优选80％或更高、再更优选90％或更高、最优选95％或更高的序列同源性的所有微生物。

[0038] 在本文中，“梭菌”是指由在分类学上属于梭菌属的物种组成的微生物或其群落。在本发明中，梭菌不仅包括常规报道的菌株，而且还包括与先前报道的梭菌的16S rRNA序列相比具有优选70％或更高、更优选80％或更高、再更优选90％或更高、最优选95％或更高的序列同源性的所有微生物。

[0039] 在本文中，“粪杆菌”是指由在分类学上属于粪杆菌属的物种组成的微生物或其群落。在本发明中，粪杆菌不仅包括常规报道的菌株，而且还包括与先前报道的粪杆菌的16S rRNA 序列相比具有优选70％或更高、更优选80％或更高、再更优选90％或更高、最优选

95％或更高的序列同源性的所有微生物。

[0040] 在本文中，术语“能够检测的试剂”是指可以用于检测血液中魏斯氏菌、乳杆菌、梭菌和/ 或粪杆菌的存在的物质，魏斯氏菌、乳杆菌、梭菌和/或粪杆菌是用于诊断早产风险的标志物。例如，它可以是能够特异性地检测特定地存在于魏斯氏菌、乳杆菌、梭菌和/或粪杆菌中的诸如蛋白质、核酸、脂质、糖脂、糖蛋白或糖类(单糖、二糖、寡糖等)等有机生物分子的引物、探针、反义寡核苷酸、适体或抗体。

[0041] 优选地，在本发明中，能够检测的试剂可以是能够检测魏斯氏菌、乳杆菌、热产醋菌、梭菌和/或粪杆菌的引物。优选的是，该引物特异性地检测魏斯氏菌、乳杆菌、热产醋菌、梭菌和/或粪杆菌的基因组序列，并且不与其他微生物的基因组序列特异性结合。更优选地，它可以是能够扩增选自由魏斯氏菌、乳杆菌、热产醋菌、梭菌和粪杆菌组成的组中的至少一种微生物的16S rRNA的引物。

[0042] 在本文中，术语“引物”是指能够形成与模板链互补的碱基对并且充当模板链复制的起点的7至50个核酸序列。引物通常是合成的，但是可以以天然产生的核酸使用。引物的序列不必须与模板的序列精确地相同，充分互补以便能够与模板杂交就是足够的。可以混入不改变引物的基本特性的其他特性。可以混入的其他特性的实例可以是甲基化、加帽、将至少一种核酸替换为同源物和核酸之间的修饰等，但不限于此。优选地，本发明的引物可以是能够扩增魏斯氏菌、乳杆菌、热产醋菌、梭菌和/或粪杆菌微生物的16S rRNA的引物。

[0043] 本文中，术语“16S rRNA”是组成原核生物核糖体的30S亚基的rRNA，因为存在所有物种共有的保守区和可以对特定物种进行分类的高变区，因此可以通过测序来鉴定微生物。特别是，由于同种物种之间几乎没有多样性，而其他物种之间呈现出多样性，因此可以通过比较16S rRNA的序列来有效地鉴定原核生物。另外，16S rDNA是编码16S rRNA的基因，因此可以通过利用16S rDNA来鉴定微生物。

[0044] 作为一个优选实施方式，在本发明中，引物可以用于扩增魏斯氏菌属、乳杆菌属、热产醋菌属、梭菌属和/或粪杆菌属特有的16S rRNA(或16S rDNA)序列，并且可以通过所需产物(为序列扩增的结果)的生成来检测魏斯氏菌属、乳杆菌属、热产醋菌属、梭菌属和/或粪杆菌属的存在。对于使用引物进行序列扩增的方法，可以使用本领域已知的各种方法。例如，可以使用聚合酶链反应(PCR)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、多重PCR、降落PCR、热启动PCR、巢式PCR、增效PCR、实时PCR、差异显示PCR(DD-PCR)、cDNA末端快速扩增(RACE)、反向聚合酶链反应、小载体PCR、TAIL-PCR(热不对称交错PCR)、连接酶链反应、修复链反应、转录介导的扩增、自主序列复制或靶序列的选择性扩增反应，但本发明的范围不限于此。

[0045] 另外，在本发明中，用于检测微生物的试剂可以是抗体，并且可以使用基于抗原-抗体反应的免疫学方法来检测相应的微生物。用于此的分析方法包括蛋白质印迹、ELISA(酶联免疫吸附测定)、放射免疫测定(RIA)、放射免疫扩散、Ouchterlony放射免疫扩散、火箭免疫电泳、免疫组织染色、免疫沉淀测定、补体结合测定、FACS(荧光活化细胞分选仪)或蛋白质芯片等，但不限于此。

[0046] 另外，本领域广泛使用的分子和免疫学方法可以用于检测本发明的微生物。

[0047] 包含本发明的用于检测微生物的试剂的用于诊断的组合物可以被提供为以诊断试剂盒的形式来实现。本发明的试剂盒包含用于检测相应微生物的检测剂，例如引物、探针、反义寡核苷酸、适体或抗体等，并且还可以包含适合于分析方法的其它成分组合物、溶

液或装置中的至少一种。

[0048] 作为一个具体的实施方式，在本发明中，包含对魏斯氏菌属、乳杆菌属、热产醋菌属、梭菌属和/或粪杆菌属特异的引物的试剂盒可以是包含用于进行诸如PCR等扩增反应的基本要素的试剂盒。例如，用于PCR的试剂盒可以包括试管或其他合适的容器、反应缓冲液、脱氧核苷酸(dNTP)、诸如Taq聚合酶和逆转录酶的酶、DNA酶、RNA酶抑制剂、DEPC-水或无菌水等。

[0049] 此外，本发明提供了通过检测孕妇血液中的魏斯氏菌属、热产醋菌属、梭菌属和/或粪杆菌属微生物来诊断孕妇早产风险的方法。

[0050] 换句话说，本发明提供了用于检测孕妇血液中的魏斯氏菌属、热产醋菌属、梭菌属和/或粪杆菌属微生物以提供诊断孕妇早产风险所需的信息的方法。另外，它提供了用于提供诊断早产风险所需的信息的方法，所述方法包括检测孕妇血液中的魏斯氏菌属、热产醋菌属、梭菌属和/或粪杆菌属微生物。

[0051] 优选地，该方法可以另外包括检测乳杆菌属微生物。

[0052] 作为一个优选实施方式，该方法可以通过包括以下步骤来实现：

[0053] (a)从孕妇血液中提取基因组DNA，

[0054] (b)使对魏斯氏菌属、乳杆菌属、粪杆菌属或梭菌属特异的引物与提取的基因组DNA 反应，和

[0055] (c)扩增反应物。

[0056] 在步骤(b)中，从孕妇血液中提取基因组DNA可以通过应用本领域已知的常见技术来进行，对魏斯氏菌属、粪杆菌属和/或梭菌属微生物特异的引物如上所述。

[0057] 在步骤(c)中，对于扩增反应物的方法，可以使用本领域已知的常见扩增技术，例如聚合酶链反应、逆转录聚合酶链反应、多重PCR、降落PCR、热启动PCR、巢式PCR、增效 PCR、实时PCR、差异显示PCR、cDNA末端快速扩增、反向PCR、小载体PCR、TAIL-PCR、连接酶链反应、修复链反应、转录介导的扩增、自主序列复制或靶序列的选择性扩增反应，但本发明的范围不限于此。

[0058] 步骤(c)中，可以进一步将反应物的扩增产物的量与正常孕妇血液的扩增产物或截止值进行比较，并且当确定魏斯氏菌的扩增产物与正常孕妇血液的扩增产物或截止值相比显著增加时，可以确定相应的孕妇的早产风险高。

[0059] 此外，该方法可以进一步包括检测乳杆菌属微生物，并且当确定孕妇血液中乳杆菌属的扩增产物与正常孕妇血液的扩增产物或截止值相比显著增加时，可以确定相应的孕妇的早产风险高。

[0060] 在本发明中，微生物的比例是指在样品中，整个微生物组的16s RNA序列的扩增产物量中目的微生物的16s rRNA序列所占据的扩增量，例如可以表示为扩增产物的重量%(w/w%) 或扩增产物拷贝数等，其体现16s rRNA序列的扩增量。

[0061] 【有益效果】

[0062] 本发明的组合物提供了用于诊断早产风险的微生物生物标志物，该微生物生物标志物可以通过简单的血液采集和开发快速诊断试剂盒来使早产风险的检测更快。

附图说明

[0063] 图1a显示了根据主坐标分析的未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女中的微生物多样性。

[0064] 图1b显示了根据以第一分量和第二分量为轴的二维散点图的未孕妇女、足月分娩妇女和 PTB妇女中的微生物多样性。

[0065] 图1c显示了根据hitmap的未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女中的微生物多样性。

[0066] 图2a显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的16S宏基因组学读数。

[0067] 图2b显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的香农指数。

[0068] 图3a显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的在门水平上的细菌谱的差异。

[0069] 图3b显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的在纲水平上的细菌谱的差异。

[0070] 图4a显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的魏斯氏菌属的比例。

[0071] 图4b显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的乳杆菌属的比例。

[0072] 图4c显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的梭菌属的比例。

[0073] 图4d显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的热产醋菌属的比例。

[0074] 图4e显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的WD2101菌株的比例。

[0075] 图4f显示了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的TM7菌株的比例。

具体实施方式

[0076] 在下文中，将通过以下实施例更详细地描述本发明。然而，这些实施例仅用于举例说明本发明，本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0077] 实施例1：实验材料的选择

[0078] 对于未孕妇女、足月分娩孕妇和早产孕妇的血液中的微生物组的分析，选择了在梨花女子大学木洞医院住院的41名未孕妇女、20名足月分娩孕妇和21名早产孕妇。正常足月分娩组选择为在妊娠37周后经历足月分娩的孕妇。当孕妇出现阵痛或胎膜破裂症状时，将母体血液收集在装有EDTA的试管中，将血浆分离并在-70℃下保存。

[0079] 仅使用了25-42周的单胎生产数据，排除了多胎、死产、畸形儿生产、慢性高血压、胎盘前置和胎盘早剥的情况。

[0080] 根据常规健康检查，从没有妊娠相关疾病的健康女性中选出未孕妇女。

[0081] 该实验的所有程序和过程均获得梨花女子大学木洞医院的机构审查委员会的批准(证书编号ECT 06-127-7)，并根据机构审查委员会的准则进行了实验。获得了所有对象的知情同意。

[0082] 实施例2：DNA提取和16S rRNA测序

[0083] 根据制造商的方案，使用PowerMax Soil DNA分离试剂盒(MOBIO，卡尔斯巴德，CA，美国)从实施例1的血液样品中提取细菌DNA。

[0084] 根据Illumina 16S宏基因组测序文库方案(Illumina,圣地亚哥,CA,美国),扩增细菌基因组DNA的16S rRNA基因V3-V4高变区(519F-816R)。用于扩增的条形码化的融合引物序列如下

[0085] 16S_V3_F引物(SEQ ID NO:1)

[0086] 5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3′

[0087] 16S_V4_F引物(SEQ ID NO:2)

[0088] 5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC -3.

[0089] 根据MiSeq系统指南(Illumina)使用PCR产物来制备文库,并使用QIAxpert(QIAGEN,希尔登,德国)对文库进行定量。提取并定量PCR产物后,使用MiSeq(Illumina)根据制造商的方案来分析每个样品的等摩尔比,并分析序列。

[0090] 实施例3:细菌组成的分析

[0091] 使用MiSeq(Illumina)根据条形码算法和引物序列来处理实施例2中获得的序列信息。使用分析程序MDx-Pro ver.1(MD Healthcare,首尔,韩国)进行分类分配(taxonomic assignment)。

[0092] 对于序列号分析的结果,在检查了读取长度(=300bp)和质量得分(平均Phred得分=20) 之后,选择了高质量的读数。使用序列聚类算法CD-HIT对操作分类单位进行聚类。随后,根据GreenGenes 8.15.13的16sRNA序列数据库,使用UCLST和QIIME进行分类分配。基于序列相似性,将所有16sRNA序列分配到分类学水平。图4a至图4f通过堆叠条形图来表示未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液中的6种细菌群落组成。如果由于数据库中缺少序列或冗余序列而无法在属水平分配实例集群(case cluster),则将分类单元(taxon)分配到更高的水平,如括号中所示。通过线性归一化将数据归一化为平均值为0,标准差为1。使用Matlab计算并绘制了主坐标分析和具有第一分量和第二分量的轴的二维散点图。此外,应用R包中的分级聚类来鉴定具有相似细菌组成的样品组。

[0093] 实施例4:统计分析

[0094] 将实验结果表示为平均值±标准偏差。使用studentt检验比较了PTB妇女和足月分娩妇女的基本特征,包括年龄、产妇特点、分娩结果等。

[0095] 根据香农指数的显著差异,使用Kruskal-Wallis检验分析了由PTB妇女、足月分娩妇女和未孕妇女组成的三个组之间的聚类特征,并使用Mann Whitney检验比较了足月分娩妇女和 PTB妇女。使用SAS软件(9.3版;SAS研究所,凯瑞,NC,美国)进行统计分析。当p值小于0.05时,结果被认为是统计学显著的。

[0096] 【实验结果】

[0097] 1.对象的一般特征

[0098] 未孕妇女均健康,且平均年龄为36岁。孕妇的一般特征见表1。

[0099] [表1]

[0100]

	足月分娩妇女 (N=20)	早产妇女 (N=21)	p 值
母亲			
年龄(岁)	31.60±2.91	30.91±4.37	0.55
BMI(kg/m^2)	26.81±3.13	26.12±4.67	0.59
胎次			
未经产的	10(50.0)	9(42.9)	0.71
经产的	10(50.0)	12(57.1)	
分娩方式，n(%)			
阴道分娩	13(65.0)	16(76.2)	0.43
剖腹产	7(35.0)	5(23.8)	
教育(年)			
≤12	5(26.3)	10(52.6)	0.10
>12	14(73.7)	9(47.4)	
婴儿			
孕龄(周)	39.65±1.04[a]	29.67±3.58	<0.0001
性别			
男性	11(55.0)	12(57.1)	0.89
女性	9(45.0)	9(42.9)	
重量(kg)	3.36±0.36[a]	1.48±0.60	<0.0001
1 分钟时的 AS	9.65±0.59[a]	6.33±3.06	<0.0001
5 分钟时的 AS	10.00±0.00[a]	7.48±3.12	0.001

[0101] 数据以平均值±SD或数字(%)表达。[a]p-值通过student t检验计算。BMI,身体质量指数;剖腹产(C-section,caesarean section);AS,Apgar评分

[0102] 足月分娩妇女的平均年龄为31.6岁,早产妇女的平均年龄为30.9岁。早产组的分娩时的孕龄、新生儿体重和Apgar评分显著较低(p<0.05)。

[0103] 2.微生物群落多样性

[0104] 通过高通量宏基因组测序来分析血液中细菌DNA的分类学多样性和谱。在按操作分类单元和分类分配进行聚类之后,比较了未孕妇女(n=41)、足月分娩妇女(n=20)和PTB妇女(n=21)的血液微生物组成的特征。

[0105] 主坐标分析图和分级聚类分析结果使相似的细菌组成可视化,该结果显示孕妇(包括足月分娩妇女和PTB妇女)之间存在差异,但很难在足月分娩妇女和PTB妇女的血液微生物群之间区隔开来(图1a、1b、1c)。

[0106] 然而,当分析宏基因组序列读数的平均值时,PTB妇女显著高于未孕妇女和足月分娩妇女(p<0.05)(图2a)。另外,足月分娩妇女具有最低的香农指数,由此表明微生物群落的多样性最高(p<0.05)(图2b)。

[0107] 3.PTB妇女的血液细菌组成与足月分娩妇女的血液细菌组成不同

[0108] 为了表征三组中的细菌组成,在丰度大于1%的门水平下绘制了一个饼图(图3a)。在所有组中,以丰度显示了厚壁菌门(Firmicutes phylum)、拟杆菌门(Bacteoidetes phylum)、变形菌门(Proteobacteria phylum)和放线菌门(Actinobacteria phylum)。显示属于古菌域 (Archaea)的泉古菌门(Crenarchaeota phylum)和广古菌门(Euryarchaeota phylum)在孕妇中比在未孕妇女中更多(p<0.001)。与早产妇女和未孕妇女相比,足月分娩妇女中厚壁菌门和拟杆菌门多半是缺乏的(p<0.001),与未孕妇女和足月分娩妇女相比,早

产妇女中变形菌门多半是缺乏的(p<0.001)。从图3b中可以看出,三组之间在纲水平上有很大差异。芽孢杆菌纲(Bacilli class)在孕妇中比未孕妇女中更丰富(p<0.001)。尽管在PTB妇女中变形菌门的丰度低,但是α-变形菌纲(Alphaproteobacteria class)在PTB妇女中比足月分娩妇女更为丰富(p<0.001)。然而,PTB妇女中β-变形菌纲(Betaproteobacteria class)和γ-变形菌纲 (Gammaproteobacteria class)更为缺乏。

[0109] 如表2所示,关于丰度超过0.1%的微生物的详细信息,包括梭杆菌(Fusobacterium)和丙酸杆菌(Propionibacterium)在内的17个属在孕妇中比未孕妇女显示为富集得更多,而包括双歧杆菌(Bifidobacterium)在内的25个属则是缺乏的(p<0.05)。

[0110] 如表3所示,在孕妇中,假单胞菌(Pseudomonas)和代尔夫特菌(Delftia)是富集的。

[0111] 从表4可以看出,包括拟杆菌(Bacteroide)和瘤胃球菌(Ruminococcus)在内的6个属在未孕妇女和PTB妇女中显示为更丰富(p<0.01)。此外,包括罗斯氏菌(Rothia)和劳特罗普氏菌(Lautropia)在内的3个属在未孕妇女和PTB妇女中更为缺乏。

[0112] 如表5所示,乳杆菌属、魏斯氏菌属、梭菌属、热产醋菌属、WD2101目和TM7-1纲在PTB妇女中显示为大幅增加(p<0.01)。其中,乳杆菌属、魏斯氏菌属、梭菌属和热产醋菌属 4个属属于厚壁菌门,乳杆菌属和魏氏菌属为芽孢杆菌纲,梭菌属和热产醋菌属为梭菌纲 (p<0.001)。此外,在PTB妇女中,潜在的致病性TM7-1增加了(p<0.001)。

[0113] [表2]

[0114]

种系型	未孕妇女		早产妇女		足月分娩妇女		p 值
	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	
孕妇血液样品中富集的种系型							
k_古菌域;p_泉古菌门;c_MCG	0.0010	0.0062	0.3704	0.4282	0.2044	0.2386	0.0000
k_古菌域;p_泉古菌门;c_MCG;o_pGrfC26	0.0011	0.0070	1.2940	0.7923	1.6515	1.4430	0.0000
k_古菌域;p_泉古菌门;c_奇古菌门(Thaumarchaeota);o_餐古菌目(Cenarchaeales);f_餐古菌科(Cenarchaeaceae);g_氨氧化古菌属(Nitrosopumilus)	0.0005	0.0034	0.6386	0.5444	0.9204	1.1164	0.0000
k_古菌域;p_泉古菌门;c_奇古菌门;o_餐古菌目;f_SAGMA-X科	0.0000	0.0003	0.8260	0.7653	0.7512	0.8821	0.0000
k_古菌域;p_广古菌门;c_甲烷杆菌纲(Methanobacteria);o_甲烷杆菌目(Methanobacteriales);f_甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae);g_甲烷杆菌属(Methanobacterium)	0.0424	0.0766	0.3281	0.3313	0.3174	0.3720	0.0000
k_古菌域;p_广古菌门;c_甲烷微菌纲(Methanomicrobia);o_甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales);f_ANME-2a-2b	0.0000	0.0000	0.9386	0.6009	1.0087	1.4770	0.0000
k_古菌域;p_广古菌门;c_甲烷微菌纲;o_甲烷八叠球菌目;f_ANME-2D	0.0000	0.0000	0.4137	0.3097	0.5512	0.6327	0.0000
k_古菌域;p_广古菌门;c_甲烷微菌纲;o_甲烷八叠球菌目;f_鬃毛甲烷菌科(Methanosaetaceae);g_鬃毛甲烷菌属(Methanosaeta)	0.0911	0.1616	0.5391	0.4198	0.3157	0.2954	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲(Actinobacteria);o_放线菌目(Actinomycetales);f_棒状杆菌科(Corynebacteriaceae);g_棒状杆菌属(Corynebacterium)	1.7318	6.7509	2.9806	1.2914	2.5090	1.8558	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_放线	1.3194	2.5347	5.1811	1.5418	4.1784	2.2459	0.0000

[0115]

菌纲;o_放线菌目;f_丙酸杆菌科(Propionibacteriaceae);g_丙酸杆菌属(Propionibacterium)							
k_细菌域;p_蓝藻门(Cyanobacteria);c_绿藻纲(Chloroplast);o_不等鞭毛目(Stramenopiles);f_;g_	0.0461	0.0745	0.2501	0.3237	0.2205	0.4134	0.0124
k_细菌域;p_蓝藻门;c_绿藻纲(Chloroplast);o_木霉菌目(Streptophyta)	0.3818	0.8386	3.0669	1.4653	1.9649	1.8149	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲;o_芽孢杆菌目(Bacillales);f_葡萄球菌科(Staphylococcaceae);g_葡萄球菌属(Staphylococcus)	0.1887	0.2802	1.6973	0.8316	2.2843	1.4521	0.0000
k_细菌域;p_梭杆菌门(Fusobacteria);c_梭杆菌纲(Fusobacteriia);o_梭杆菌目(Fusobacteriales);f_梭杆菌科(Fusobacteriaceae);g_梭杆菌属(Fusobacterium)	0.0038	0.0160	0.2431	0.2530	0.3789	0.5883	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲;o_立克次氏体目(Rickettsiales);f_线粒体科(mitochondria);其他	0.0521	0.1336	0.7450	0.5283	0.4030	0.5153	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲;o_伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales);f_草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)	0.2457	0.2165	0.6050	0.3560	1.0894	1.1506	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲;o_奈瑟氏球菌目(Neisseriales);f_奈瑟氏球菌科(Neisseriaceae);g_奈瑟氏球菌属(Neisseria)	0.0133	0.0383	0.0730	0.1125	0.5443	2.2490	0.0012
未分配	4.0873	1.2345	24.6875	11.5106	36.8536	20.8460	0.0000
孕妇血液样品中低丰度的种系型							
k_细菌域;p_酸杆菌门(Acidobacteria);c_酸杆菌纲(Acidobacteriia);o_酸杆菌目(Acidobacteriales);f_克氏菌科(Koribacteraceae);g_	0.3573	0.2538	0.0459	0.0884	0.0249	0.0823	0.0000
k_细菌域;p_酸杆菌门;c_DA052;o_Ellin6513;f_;g_	0.2186	0.1833	0.0300	0.0732	0.0221	0.0950	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_酸微菌纲(Acidimicrobiia);o_酸微菌目;f_C111;g_	0.2277	0.1814	0.0792	0.1236	0.0436	0.1326	0.0000

[0116]

k_细菌域;p_放线菌门;c_酸微菌纲;o_酸微菌目;f_EB1017;g_	0.2462	0.2136	0.0430	0.0870	0.1281	0.3196	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲;o_放线菌目;f_;g_	0.4081	0.2991	0.1778	0.1901	0.1708	0.5354	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲;o_双歧杆菌目(Bifidobacteriales);f_双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae);g_双歧杆菌属(Bifidobacterium)	3.1407	2.3639	0.5443	0.4067	0.6145	0.9518	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_红蝽菌纲(Coriobacteriia);o_红蝽菌目(Coriobacteriales);f_红蝽菌科(Coriobacteriaceae);g_	0.5639	0.3363	0.0475	0.0854	0.0102	0.0336	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_红蝽菌纲;o_红蝽菌目;f_红蝽菌科;g_柯林斯氏菌属(Collinsella)	2.0090	1.6569	0.0048	0.0218	0.0000	0.0000	0.0000
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_[腐螺旋菌纲(Saprospirae)];o_[腐螺旋菌目(Saprospirales)];f_噬几丁质菌科(Chitinophagaceae);g_	0.5011	0.3170	0.2628	0.2869	0.2615	0.4521	0.0040
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲(Bacteroidia);o_拟杆菌目(Bacteroidales);f_S24-7;g_	5.0790	3.4588	0.0529	0.0682	0.1141	0.2902	0.0000
k_细菌域;p_绿屈挠菌门(Chloroflexi);c_厌氧绳菌纲(Anaerolineae);o_厌氧绳菌目(Anaerolineales);f_厌氧绳菌科(Anaerolinaceae);g_T78	0.3883	0.6213	0.0386	0.0933	0.0148	0.0442	0.0000
k_细菌域;p_绿屈挠菌门;c_Ellin6529;o_;f_;g_	0.4352	0.2960	0.1373	0.1184	0.0951	0.1439	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲;o_芽孢杆菌目;f_芽孢杆菌科(Bacillaceae);g_芽孢杆菌属(Bacillus)	0.4561	0.4775	0.2071	0.1996	0.2300	0.2797	0.0033
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲;o_芽孢杆菌目;f_动性球菌科(Planococcaceae);g_赖氨酸芽孢杆菌属(Lysinibacillus)	0.2843	0.3263	0.0896	0.1092	0.1823	0.3990	0.0003
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲;o_乳杆菌目(Lactobacillales);f_肠球菌科(Enterococcaceae);g_肠球菌属(Enterococcus)	0.8784	0.7591	0.0540	0.0826	0.2357	0.5498	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌	0.7946	0.9045	0.1065	0.1175	0.0717	0.1974	0.0000

[0117]

纲(Clostridia);o_梭菌目(Clostridiales);f_瘤胃菌科(Ruminococcaceae);g_粪杆菌属(Faecalibacterium)							
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_丹毒丝菌纲(Erysipelotrichi);o_丹毒丝菌目(Erysipelotrichales);f_丹毒丝菌科(Erysipelotrichaceae);g_别样棒菌属(Allobaculum)	1.8151	1.4577	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲;o_Ellin329;f_;g_	0.2252	0.1782	0.1092	0.1784	0.0168	0.0411	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲;o_根瘤菌目(Rhizobiales);f_生丝微菌科(Hyphomicrobiaceae);g_红游动菌属(Rhodoplanes)	0.6332	0.3548	0.2697	0.3348	0.1923	0.3555	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲;o_根瘤菌目;f_根瘤菌科(Rhizobiaceae);g_根瘤菌属(Rhizobium)	0.8360	0.7578	0.0234	0.0688	0.0003	0.0007	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲;o_红螺菌目(Rhodospirillales);f_红螺菌科(Rhodospirillaceae);g_	0.4318	0.3492	0.0532	0.1077	0.0900	0.3633	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲;o_伯克霍尔德氏菌目;f_丛毛单胞菌科(Comamonadaceae);g_	0.4346	0.2803	0.1810	0.1818	0.4484	0.7039	0.0007
k_细菌域;p_变形菌门;c_δ-变形菌纲(Deltaproteobacteria);o_脱硫单胞菌目(Desulfuromonadales);f_土杆菌科;g_土杆菌属(Geobacter)	0.3151	0.5503	0.0046	0.0198	0.0036	0.0121	0.0000
k_细菌域;p_软壁菌门(Tenericutes);c_柔膜菌纲(Mollicutes);o_虫原体目(Entomoplasmatales);f_;g_	0.3772	0.3804	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
k_细菌域;p_疣微菌门;c_[嗜酸甲烷氧化菌纲(Methylacidiphilae)];o_嗜酸甲烷氧化菌目(Methylacidiphilales);f_嗜酸甲烷氧化菌科(Methylacidiphilaceae);g_嗜酸甲烷氧化菌属暂定种	0.4062	0.3515	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

[0118]

(Candidatus Methylacidiphilum)							

[0119] [表3]

[0120]

种系型	未孕妇女		早产妇女		足月分娩妇女		p 值
	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	
足月分娩孕妇血液样品中富集的种系型							
k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲;o_假单胞菌目(Pseudomonadales);f_假单胞菌科(Pseudomonadaceae);g_假单胞菌属	0.4142	0.2593	1.0945	0.5858	4.3279	3.3250	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲;o_伯克霍尔德氏菌目;f_丛毛单胞菌科;g_代尔夫特菌属	0.5752	0.6053	0.8264	0.3741	3.0679	2.3863	0.0000
足月分娩孕妇血液样品中低丰度的种系型							
k_细菌域;p_酸杆菌门;c_酸杆菌门-6;o_iii1-15	0.4912	0.2900	0.1816	0.1585	0.0824	0.1947	0.0000
k_细菌域;p_酸杆菌门;c_索利氏菌纲(Solibacteres);o_索利氏菌目(Solibacterales);f_索利氏菌科(Solibacteraceae);g_索利氏菌属暂定种(Candidatus Solibacter)	0.3557	0.2264	0.1988	0.1991	0.0484	0.1701	0.0000
k_细菌域;p_放线菌门;c_嗜热油菌纲(Thermoleophilia);o_盖勒氏菌目(Gaiellales);f_盖勒氏菌科(Gaiellaceae)	0.5513	0.2899	0.0905	0.0887	0.0420	0.1209	0.0000
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲;o_拟杆菌目	0.7320	0.5199	0.4142	0.5777	0.2507	0.4504	0.0001
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲;o_拟杆菌目;f_卟啉单胞菌科(Porphyromonadaceae);g_副拟杆菌属(Parabacteroides)	0.5481	0.4746	0.1509	0.1758	0.0495	0.1556	0.0000
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲;o_拟杆菌目;f_普雷沃氏菌科(Prevotellaceae);g_普雷沃氏菌属(Prevotella)	0.8695	0.4109	0.4197	0.2892	0.3897	0.6860	0.0000
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲;o_拟杆菌目;f_理研菌科(Rikenellaceae)	0.9178	0.9229	0.2460	0.1610	0.1100	0.2355	0.0000
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_黄杆菌纲(Flavobacteriia);o_黄杆菌目(Flavobacteriales);f_黄杆菌科(Flavobacteriaceae);g_黄杆菌	0.2488	0.2476	0.0933	0.1185	0.0441	0.1319	0.0000

[0121]

属(Flavobacterium)							
k_细菌域;p_绿屈挠菌门;c_纤线杆菌纲(Ktedonobacteria);o_JG30-KF-AS9	0.2570	0.1936	0.0838	0.1310	0.0000	0.0000	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目	7.8066	3.6059	2.6156	0.9292	1.4241	1.2970	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_毛螺菌科(Lachnospiraceae);g_	3.3558	1.3433	0.6128	0.4883	0.3641	0.5321	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_毛螺菌科;g_[瘤胃球菌属(Ruminococcus)]	0.4195	0.3136	0.2678	0.3830	0.0807	0.2309	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_毛螺菌科;g_布劳特氏菌属(Blautia)	0.4189	0.3470	0.0708	0.1157	0.0190	0.0838	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_毛螺菌科;g_粪球菌属(Coprococcus)	0.5752	0.3781	0.1295	0.1483	0.0639	0.1865	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_毛螺菌科;g_毛螺菌属(Lachnospira)	0.2295	0.2505	0.0327	0.0698	0.0072	0.0321	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_毛螺菌科;其他	0.2650	0.2400	0.0841	0.0936	0.0032	0.0041	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_瘤胃菌科;g_	3.4054	1.7340	2.1825	0.6248	1.1830	1.0543	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_瘤胃菌科;g_颤螺菌属(Oscillospira)	2.0946	1.2227	0.9134	0.3301	0.2916	0.5739	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_丹毒丝菌纲;o_丹毒丝菌目;f_丹毒丝菌科	0.3296	0.2979	0.1298	0.1261	0.0046	0.0200	0.0000
k_细菌域;p_浮霉状菌门(Planctomycetes);c_浮霉状菌纲(Planctomycetia);o_出芽菌目(Gemmatales);f_出芽菌科(Gemmataceae)	0.3596	0.2773	0.1468	0.1752	0.0296	0.0791	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_δ-变形菌纲;o_粘球菌目(Myxococcales)	0.4190	0.2449	0.0641	0.0852	0.0173	0.0553	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲;o_肠杆菌目(Enterobacteriales);f_肠杆菌科(Enterobacteriaceae)	2.7008	1.7836	0.2924	0.1894	0.1787	0.4539	0.0000
k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲;o_假单胞菌目;f_假单	0.3904	0.2961	0.1958	0.1737	0.0333	0.0507	0.0000

[0122]

胞菌科							
k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲;o_黄单胞菌目(Xanthomonadales);f_华杆菌科(Sinobacteraceae)	0.2034	0.1906	0.1074	0.1212	0.0868	0.2180	0.0011
k_细菌域;p_疣微菌门;c_[斯巴杆菌纲(Spartobacteria)];o_[西索恩氏菌目(Chthoniobacterales)];f_[西索恩氏菌科(Chthoniobacteraceae)];g_DA101	0.5567	0.3660	0.3102	0.1895	0.1411	0.2104	0.0000
k_细菌域;p_疣微菌门;c_疣微菌纲(Verrucomicrobiae);o_疣微菌目(Verrucomicrobiales);f_疣微菌科(Verrucomicrobiaceae);g_阿克曼氏菌(Akkermansia)	0.2839	0.3117	0.0793	0.1583	0.0074	0.0255	0.0000

[0123] [表4]

[0124]

种系型	未孕妇女		早产妇女		足月分娩妇女		p 值
	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	
未孕妇女和早产孕妇中富集的种系型							
k_细菌域;p_酸杆菌门;c_索利氏菌纲;o_索利氏菌目	0.2657	0.2177	0.2008	0.3153	0.0457	0.1651	0.0000
k_细菌域;p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲;o_拟杆菌目;f_ 拟杆菌科(Bacteroidaceae);g_ 拟杆菌属	9.6044	5.9431	9.8477	2.2891	4.1241	2.8917	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_瘤胃菌科;g_瘤胃球菌属	0.9052	0.4308	0.9408	0.3488	0.4985	0.6471	0.0024
k_细菌域;p_OD1;c_ZB2	0.1457	0.1724	0.2298	0.3004	0.0460	0.1170	0.0017
k_细菌域;p_浮霉状菌门;c_浮霉状菌纲;o_出芽菌目;f_异球形菌科(Isosphaeraceae)	0.1904	0.1574	0.1768	0.2378	0.0731	0.1689	0.0015
k_细菌域;p_浮霉状菌门;c_浮霉状菌纲;o_小梨形菌目(Planctomycetia);f_小梨形菌科(Pirellulaceae)	0.2384	0.2062	0.1980	0.2390	0.1357	0.3837	0.0034
未孕妇女和早产孕妇中低丰度的种系型							
k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲;o_放线菌目;f_微球菌科(Micrococcaceae);g_罗斯氏菌属	0.0051	0.0139	0.0295	0.0797	0.5515	2.1427	0.0002
k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变	0.0015	0.0052	0.0021	0.0044	1.0982	4.8506	0.0000

[0125]

形菌纲;o_伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales);f_伯克霍尔德氏菌科(Burkholderiaceae);g_劳特罗普氏菌属(Lautropia)							
k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲;o_黄单胞菌目;f_黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)	0.2053	0.1992	0.2495	0.2096	1.3036	1.1821	0.0000

[0126] [表5]

[0127]

种系型	未孕妇女		早产妇女		足月分娩妇女		p 值
	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲;o_乳杆菌目;f_乳杆菌科(Lactobacillaceae);g_乳杆菌属(Lactobacillus)	1.6006	2.6890	3.4836	1.3976	1.6499	1.1057	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲;o_乳杆菌目;f_明串珠菌科(Leuconostocaceae);g_魏斯氏菌属	0.0004	0.0015	0.3377	0.2606	0.1507	0.2974	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_梭菌目;f_梭菌科(Clostridiaceae);g_梭菌属	0.1148	0.1488	0.6855	0.4927	0.3015	0.3833	0.0000
k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲;o_热厌氧杆菌目(Thermoanaerobacterales);f_热厌氧杆菌科(Thermoanaerobacteraceae);g_热产醋菌属	0.0000	0.0000	0.3886	0.3090	0.1163	0.2317	0.0000
k_细菌域;p_浮霉状菌门;c_Phycisphaerae;o_WD2101;f_;g_	0.5722	0.3452	0.7884	0.4805	0.3282	0.5364	0.0007
k_细菌域;p_TM7;c_TM7-1;o_;f_;g_	0.1351	0.1225	0.3784	0.2754	0.0686	0.1685	0.0000

[0128] 4.实验结论

[0129] 本发明研究了PTB妇女、未孕妇女和孕妇的血液微生物群的特征。另外，本发明首先研究了妊娠期间的血液微生物组成和结构。尽管在足月分娩妇女和PTB妇女之间，个体之间的组成相似，但PTB妇女的血液微生物群落组成与足月分娩妇女和未孕妇女的不同。在所有组中均观察到了厚壁菌门菌株、拟杆菌门菌株、变形菌门菌株和放线菌门菌株的富集，但是属于古菌域菌株的泉古菌门菌株和广古菌门菌株在孕妇中比在未孕妇女中更丰富。值得注意的是，在PTB妇女中，变形菌门通常是缺乏的，而乳杆菌、魏斯氏菌和和潜在的致病性TM7 显示出最大的富集。

[0130] 图3a是显示未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的在门水平的微生物含量的图。图3b是显示未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中的在纲水平的微生物含量的图。

[0131] 对于健康的妊娠，人体所有器官中的微生物群都会经历与代谢变化和免疫适应有关的深刻变化。但是，细菌感染通过有机会进入诸如蜕膜、胎盘和胎膜的妊娠组织而威胁孕

妇和胎儿。此外,80%的发生在妊娠30周之前的早产是由细菌感染引起的。感染的主要途径包括:(1)从下尿路上行至子宫内,(2)从腹膜腔下行至子宫内,以及(3)通过母体循环。

[0132] 健康人的血液被认为是无菌环境,缺乏可培养的微生物。然而,血液微生物群的存在与多种传染性和非传染性疾病相关。据一项基于序列的研究报道,在健康的男性和女性中,血液中存在的大多数细菌的DNA位于血沉棕黄层(平均为93.74%)和红细胞(6.23%)中。血液微生物群主要可以从胃肠道或口腔进行迁移;其组成向致病状态的转变称为"失调"。血液微生物群的失调与II型糖尿病和心血管疾病密切相关。另外,口腔细菌向血液中的迁移牵涉到牙周疾病引起的心内膜炎和心肌梗塞和/或脑梗塞的发展,特别是在早产患者中。

[0133] 根据本发明,与未孕妇女相比,足月分娩妇女和PTB妇女的血液样品中微生物群落的丰富度降低了,而宏基因组序列读数在PTB妇女的血液中显示最高的水平。这表明尽管在足月分娩妇女与PTB妇女之间血液样本中的个体间差异相似,但PTB妇女的血液微生物群的群落结构与足月分娩妇女不同。在足月分娩妇女的血液样本中,厚壁菌门和拟杆菌门表现出最大的缺乏,而变形菌门则是丰富富集的。

[0134] 在大多数情况下,在晚期妊娠期间观察到变形菌门和放线菌门的富集。值得注意的是,在与炎症相关的失调的情况下,屡次观察到晚期妊娠中变形菌门的富集。这表明尽管妊娠不是疾病,但在妊娠期间肠道微生物群的转变会导致血液微生物群的失调。

[0135] 根据本发明,显示与足月分娩妇女相比,来自PTB妇女和未孕妇女的血液样品中梭菌纲和拟杆菌纲的富集更多。另外,梭菌纲的粪杆菌属和梭菌属在未孕妇女和PTB妇女中也占主导地位,而在足月分娩妇女中这些微生物较不丰富。

[0136] 图4a至图4f比较了未孕妇女、足月分娩妇女和PTB妇女的血液样本中每种微生物的比率。

[0137] 梭菌是人的厌氧胃肠道菌丛和宫颈阴道菌丛的重要成员。人的梭菌感染可以由内源性感染或外源性感染引起,并且可以诱发疾病,例如梭菌组织毒性综合征。拟杆菌纲由一个目组成,拟杆菌属通过排除潜在的病原体而为其宿主提供一些好处。但是,诸如脆弱拟杆菌(B. fragilis)和多形拟杆菌(B.thetaiotaomicron)的拟杆菌纲菌株是机会主义的病原体,其引起腹膜腔感染并使β-内酰胺抗生素失活,并且与早产有关。此外,与足月分娩妇女相比,PTB 妇女的血液样品中TM7门是富集的。TM7门通常与诸如炎性肠病和牙周病的人炎性粘膜疾病有关。

[0138] 本发明发现,与足月分娩妇女相比,PTB妇女的血液中的乳杆菌属和魏斯氏菌属更丰富。然而,在本发明人的先前研究中,与正常分娩组相比,阴道微生物群中的乳杆菌和魏斯氏菌的减少与早产有关。

[0139] 本发明分析了PTB妇女和足月分娩妇女中的血液微生物组的特征。结果,可以确认的是,孕妇的血液微生物群揭示了疾病相关的微生物群的失调,此外,足月分娩妇女的血液微生物群含有与健康有关的微生物,而PTB妇女的血液微生物组中各种病原微生物的数量增加了。

[0140] 表6显示未孕妇女、PTB妇女和足月分娩腐女的在属水平的血液微生物含量。

[0141]

[表 6]属	未孕妇女		PTB 妇女		足月分娩妇女		p 值
	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	平均值(%)	SD	
氨氧化古菌属	0.0005	0.0034	0.6386	0.5444	0.9204	1.1164	0.0000
甲烷杆菌属	0.0424	0.0766	0.3281	0.3313	0.3174	0.3720	0.0000
鬃毛甲烷菌属	0.0911	0.1616	0.5391	0.4198	0.3157	0.2954	0.0000
棒状杆菌属	1.7318	6.7509	2.9806	1.2914	2.5090	1.8558	0.0000
丙酸杆菌属	1.3194	2.5347	5.1811	1.5418	4.1784	2.2459	0.0000
葡萄球菌属	0.1887	0.2802	1.6973	0.8316	2.2843	1.4521	0.0000
梭杆菌属	0.0038	0.0160	0.2431	0.2530	0.3789	0.5883	0.0000
奈瑟氏球菌属	0.0133	0.0383	0.0730	0.1125	0.5443	2.2490	0.0012
双歧杆菌属	3.1407	2.3639	0.5443	0.4067	0.6145	0.9518	0.0000
柯林斯氏菌属	2.0090	1.6569	0.0048	0.0218	0.0000	0.0000	0.0000
芽孢杆菌属	0.4561	0.4775	0.2071	0.1996	0.2300	0.2797	0.0033
赖氨酸芽孢杆菌属	0.2843	0.3263	0.0896	0.1092	0.1823	0.3990	0.0003
肠球菌属	0.8784	0.7591	0.0540	0.0826	0.2357	0.5498	0.0000
粪杆菌属	0.7946	0.9045	0.1065	0.1175	0.0717	0.1974	0.0000
别样棒菌属	1.8151	1.4577	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
红游动菌属	0.6332	0.3548	0.2697	0.3348	0.1923	0.3555	0.0000
根瘤菌属	0.8360	0.7578	0.0234	0.0688	0.0003	0.0007	0.0000
土杆菌属	0.3151	0.5503	0.0046	0.0198	0.0036	0.0121	0.0000

[0142]

嗜酸甲烷氧化菌属暂定种	0.4062	0.3515	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
假单胞菌属	0.4142	0.2593	1.0945	0.5858	4.3279	3.3250	0.0000
代尔夫特菌属	0.5752	0.6053	0.8264	0.3741	3.0679	2.3863	0.0000
索利氏菌属暂定种	0.3557	0.2264	0.1988	0.1991	0.0484	0.1701	0.0000
副拟杆菌属	0.5481	0.4746	0.1509	0.1758	0.0495	0.1556	0.0000
普雷沃氏菌属	0.8695	0.4109	0.4197	0.2892	0.3897	0.6860	0.0000
黄杆菌属	0.2488	0.2476	0.0933	0.1185	0.0441	0.1319	0.0000
布劳特氏菌属	0.4189	0.3470	0.0708	0.1157	0.0190	0.0838	0.0000
粪球菌属	0.5752	0.3781	0.1295	0.1483	0.0639	0.1865	0.0000
毛螺菌属	0.2295	0.2505	0.0327	0.0698	0.0072	0.0321	0.0000
颤螺菌属	2.0946	1.2227	0.9134	0.3301	0.2916	0.5739	0.0000
拟杆菌属	9.6044	5.9431	9.8477	2.2891	4.1241	2.8917	0.0000
瘤胃球菌属	0.9052	0.4308	0.9408	0.3488	0.4985	0.6471	0.0024
罗斯氏菌属	0.0051	0.0139	0.0295	0.0797	0.5515	2.1427	0.0002
劳特罗普氏菌属	0.0015	0.0052	0.0021	0.0044	1.0982	4.8506	0.0000
乳杆菌属	1.6006	2.6890	3.4836	1.3976	1.6499	1.1057	0.0000
魏斯氏菌属	0.0004	0.0015	0.3377	0.2606	0.1507	0.2974	0.0000
梭菌属	0.1148	0.1488	0.6855	0.4927	0.3015	0.3833	0.0000
热产醋菌属	0.0000	0.0000	0.3886	0.3090	0.1163	0.2317	0.0000

<110> 梨花女子大学校产学协力团
<120> 利用血液微生物群落的变化预测早产风险
<130> OPP20202939CN
<150> KR 10-2018-0046321
<151> 2018-04-20
<150> PCT/KR2019/000280
<151> 2019-01-08
<160> 2
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 16S_V3_F引物
<400> 1
tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcctacgg gnggcwgcag 50
<210> 2
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 16S_V4_R引物
<400> 2
gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acaggactac hvgggtatct aatcc 55

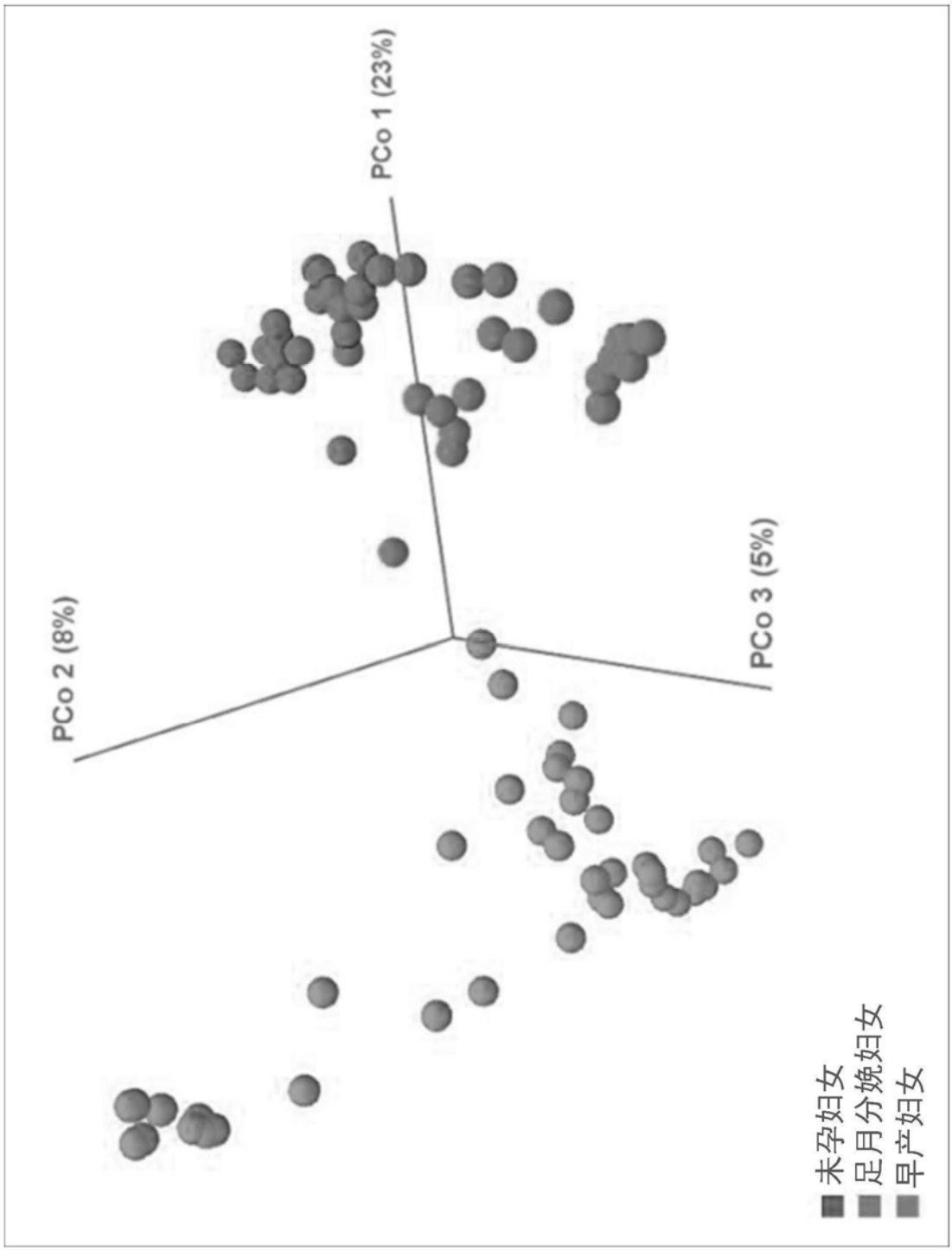


图1a

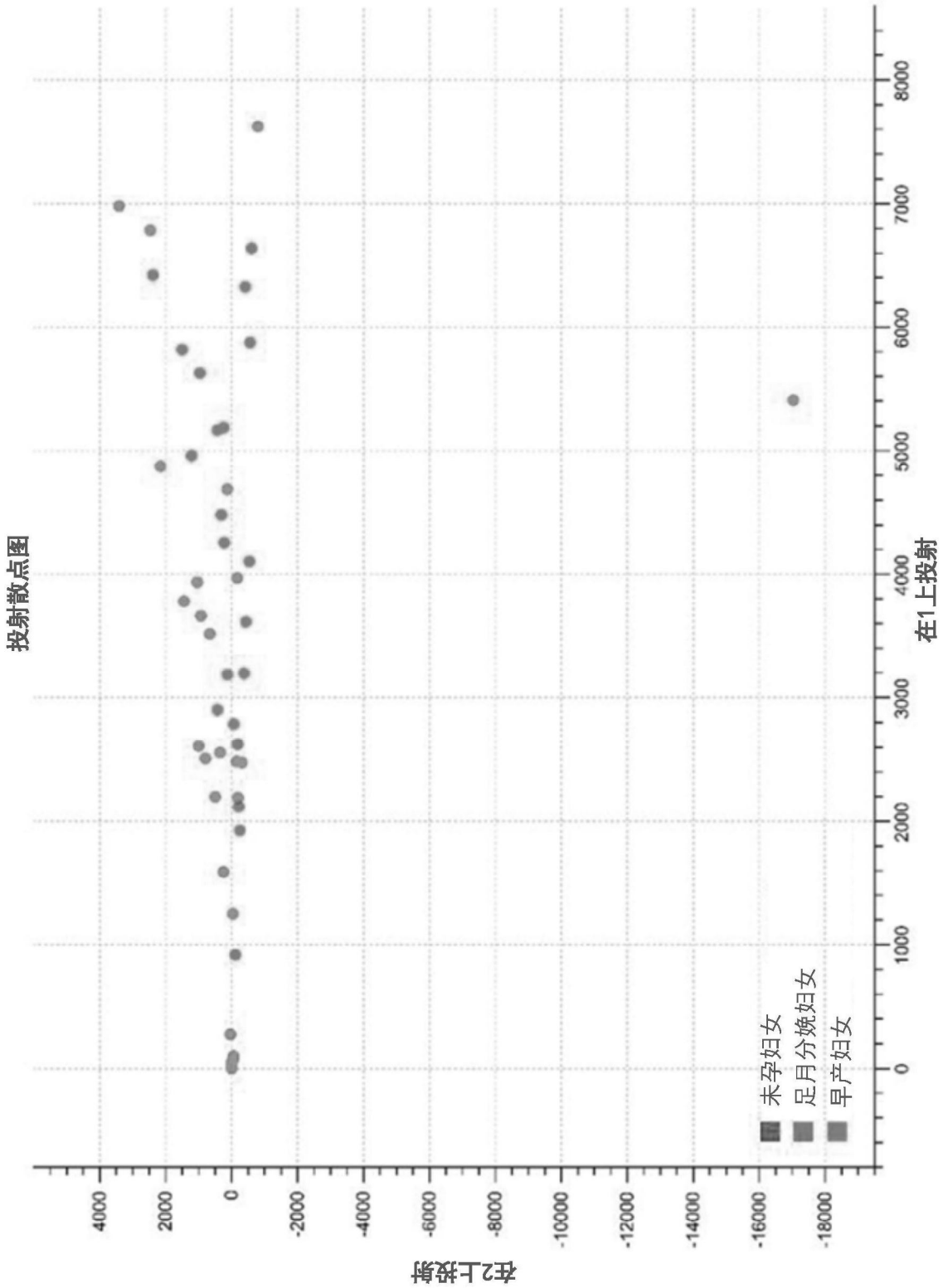

投射散点图
在1上投射
在2上投射
未孕妇女
足月分娩妇女
早产妇女
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-2000
-4000
-6000
-8000
-10000
-12000
-14000
-16000
-18000

图1b

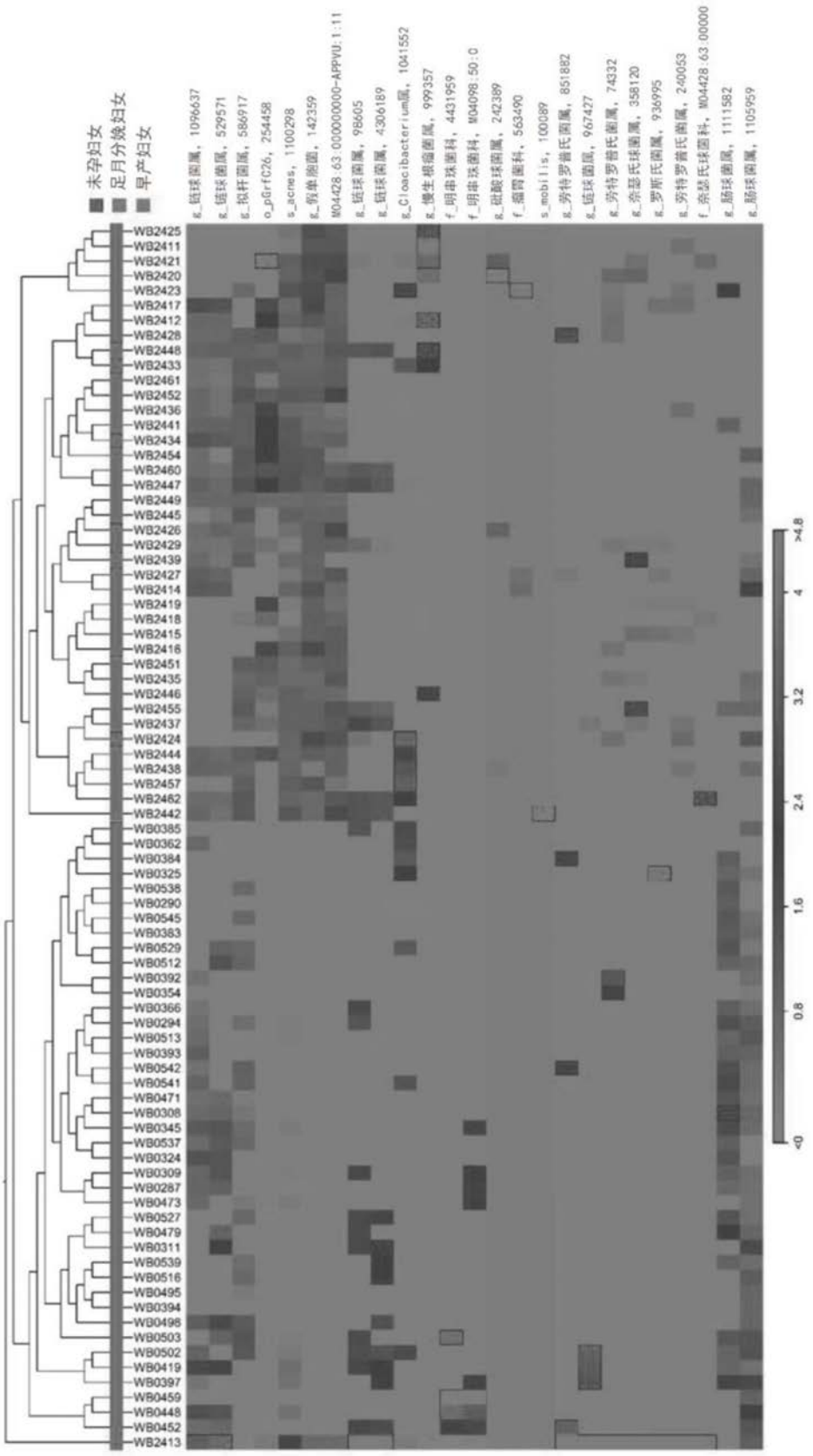

未孕妇女
足月分娩妇女
早产妇女
g_链球菌属, 1096637
g_链球菌属, 529571
g_拟杆菌属, 586917
o_pGrfC26, 254458
s_acnes, 1100298
g_假单胞菌, 142359
WO4428.63.000000000-APPVU.1:11
g_链球菌属, 98605
g_链球菌属, 4306189
g_Cloacibacterium属, 1041552
g_嗜生根瘤菌属, 999357
f_明串珠菌科, 4431959
f_明串珠菌科, WO4098.50:0
g_琥珀球菌属, 242389
f_瘤胃菌科, 563490
s_mobilis, 100089
g_劳特罗菌氏菌属, 851882
g_链球菌属, 967427
g_劳特罗菌氏菌属, 74332
g_奈瑟氏球菌属, 358120
g_罗斯氏菌属, 936995
g_劳特罗菌氏菌属, 240053
f_奈瑟氏球菌科, WO4428.63.00000
g_肠球菌属, 1111582
g_肠球菌属, 1105959
WB2425
WB2411
WB2421
WB2420
WB2423
WB2417
WB2412
WB2428
WB2448
WB2433
WB2461
WB2452
WB2436
WB2441
WB2434
WB2454
WB2460
WB2447
WB2449
WB2445
WB2426
WB2429
WB2439
WB2427
WB2414
WB2419
WB2418
WB2415
WB2416
WB2451
WB2435
WB2446
WB2455
WB2437
WB2424
WB2444
WB2438
WB2457
WB2462
WB2442
WB0385
WB0362
WB0384
WB0325
WB0538
WB0290
WB0545
WB0383
WB0529
WB0512
WB0392
WB0354
WB0366
WB0294
WB0513
WB0393
WB0542
WB0541
WB0471
WB0308
WB0345
WB0537
WB0324
WB0309
WB0287
WB0473
WB0527
WB0479
WB0311
WB0539
WB0516
WB0495
WB0394
WB0498
WB0503
WB0502
WB0419
WB0397
WB0459
WB0448
WB0452
WB2413
<0
0.8
1.6
2.4
3.2
4
>4.8

图1c

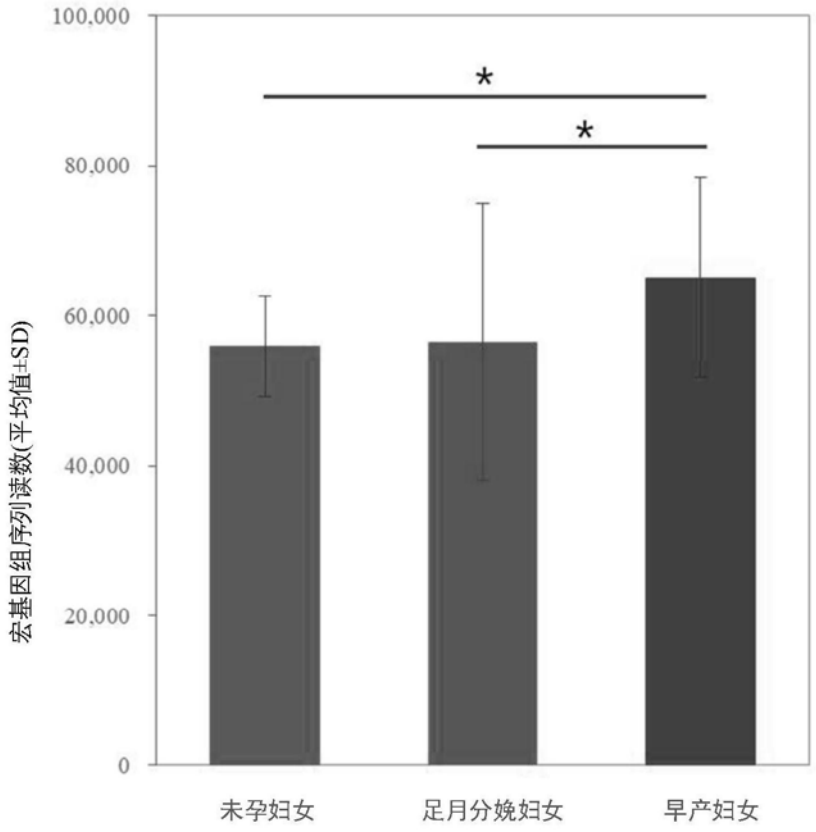

100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
宏基因组序列读数(平均值±SD)
*
*
未孕妇女
足月分娩妇女
早产妇女

图2a

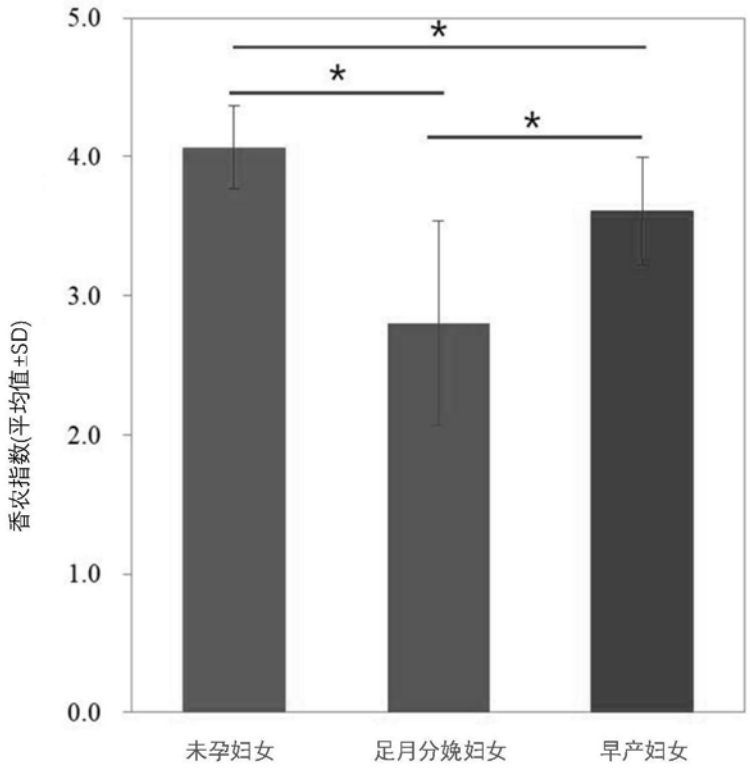


图2b

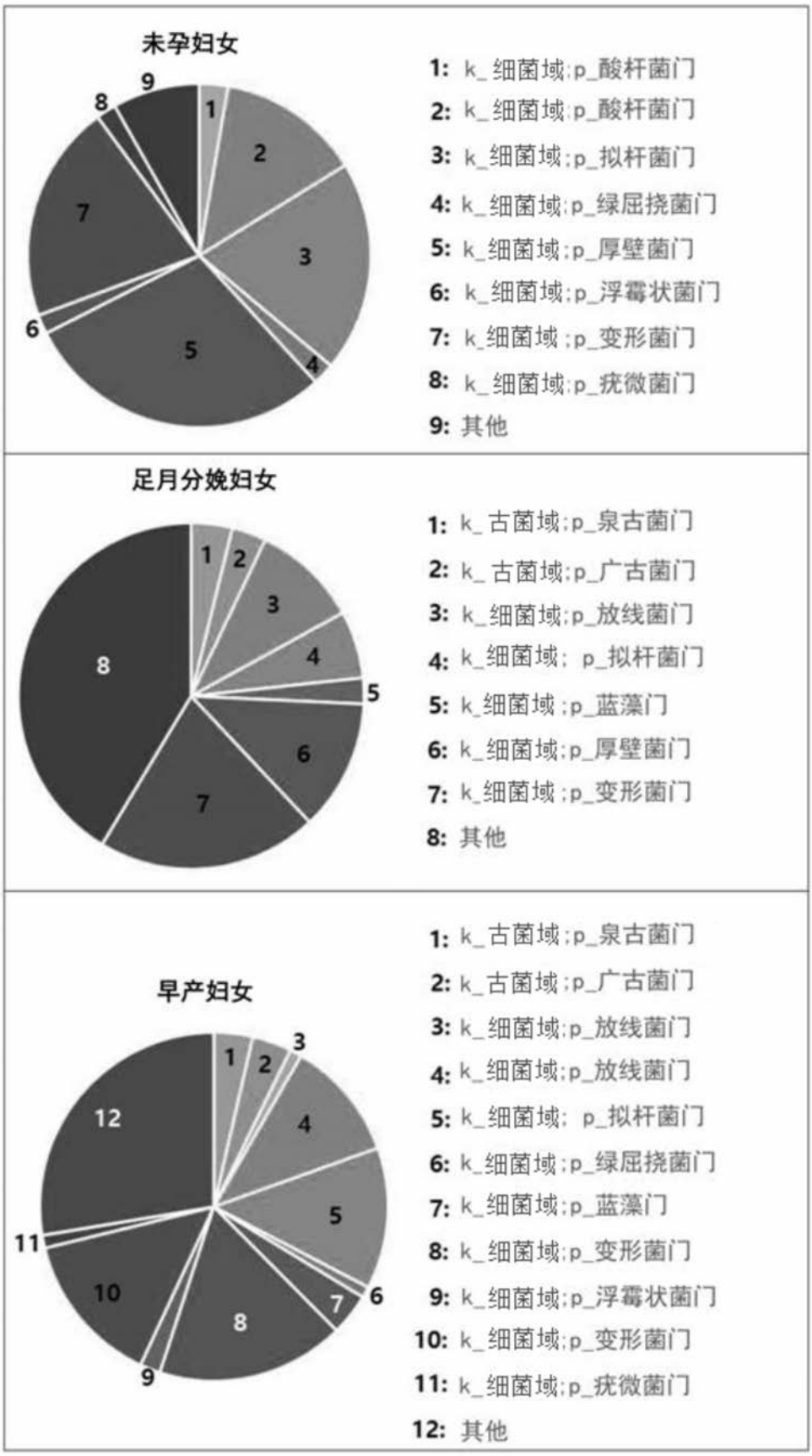

未孕妇女
1: k_细菌域;p_酸杆菌门
2: k_细菌域;p_酸杆菌门
3: k_细菌域;p_拟杆菌门
4: k_细菌域;p_绿屈挠菌门
5: k_细菌域;p_厚壁菌门
6: k_细菌域;p_浮霉状菌门
7: k_细菌域;p_变形菌门
8: k_细菌域;p_疣微菌门
9: 其他
足月分娩妇女
1: k_古菌域;p_泉古菌门
2: k_古菌域;p_广古菌门
3: k_细菌域;p_放线菌门
4: k_细菌域; p_拟杆菌门
5: k_细菌域;p_蓝藻门
6: k_细菌域;p_厚壁菌门
7: k_细菌域;p_变形菌门
8: 其他
早产妇女
1: k_古菌域;p_泉古菌门
2: k_古菌域;p_广古菌门
3: k_细菌域;p_放线菌门
4: k_细菌域;p_放线菌门
5: k_细菌域; p_拟杆菌门
6: k_细菌域;p_绿屈挠菌门
7: k_细菌域;p_蓝藻门
8: k_细菌域;p_变形菌门
9: k_细菌域;p_浮霉状菌门
10: k_细菌域;p_变形菌门
11: k_细菌域;p_疣微菌门
12: 其他

图3a

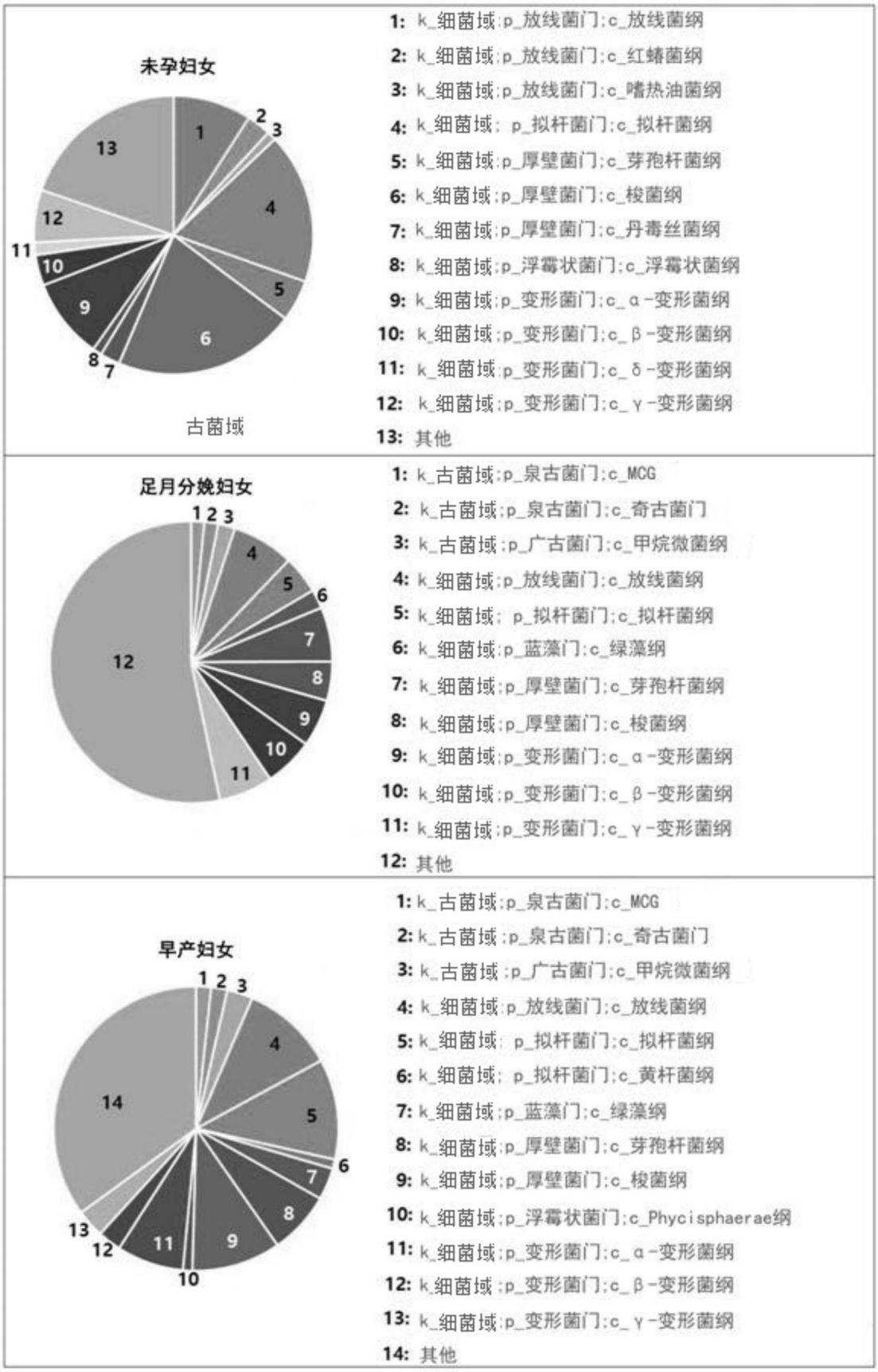

未孕妇女
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
古菌域
1: k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲
2: k_细菌域;p_放线菌门;c_红蝽菌纲
3: k_细菌域;p_放线菌门;c_嗜热油菌纲
4: k_细菌域; p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲
5: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲
6: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲
7: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_丹毒丝菌纲
8: k_细菌域;p_浮霉状菌门;c_浮霉状菌纲
9: k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲
10: k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲
11: k_细菌域;p_变形菌门;c_δ-变形菌纲
12: k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲
13: 其他
足月分娩妇女
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
1: k_古菌域;p_泉古菌门;c_MCG
2: k_古菌域;p_泉古菌门;c_奇古菌门
3: k_古菌域;p_广古菌门;c_甲烷微菌纲
4: k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲
5: k_细菌域; p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲
6: k_细菌域;p_蓝藻门;c_绿藻纲
7: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲
8: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲
9: k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲
10: k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲
11: k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲
12: 其他
早产妇女
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
1: k_古菌域;p_泉古菌门;c_MCG
2: k_古菌域;p_泉古菌门;c_奇古菌门
3: k_古菌域;p_广古菌门;c_甲烷微菌纲
4: k_细菌域;p_放线菌门;c_放线菌纲
5: k_细菌域; p_拟杆菌门;c_拟杆菌纲
6: k_细菌域; p_拟杆菌门;c_黄杆菌纲
7: k_细菌域;p_蓝藻门;c_绿藻纲
8: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_芽孢杆菌纲
9: k_细菌域;p_厚壁菌门;c_梭菌纲
10: k_细菌域;p_浮霉状菌门;c_Phycisphaerae纲
11: k_细菌域;p_变形菌门;c_α-变形菌纲
12: k_细菌域;p_变形菌门;c_β-变形菌纲
13: k_细菌域;p_变形菌门;c_γ-变形菌纲
14: 其他

图3b

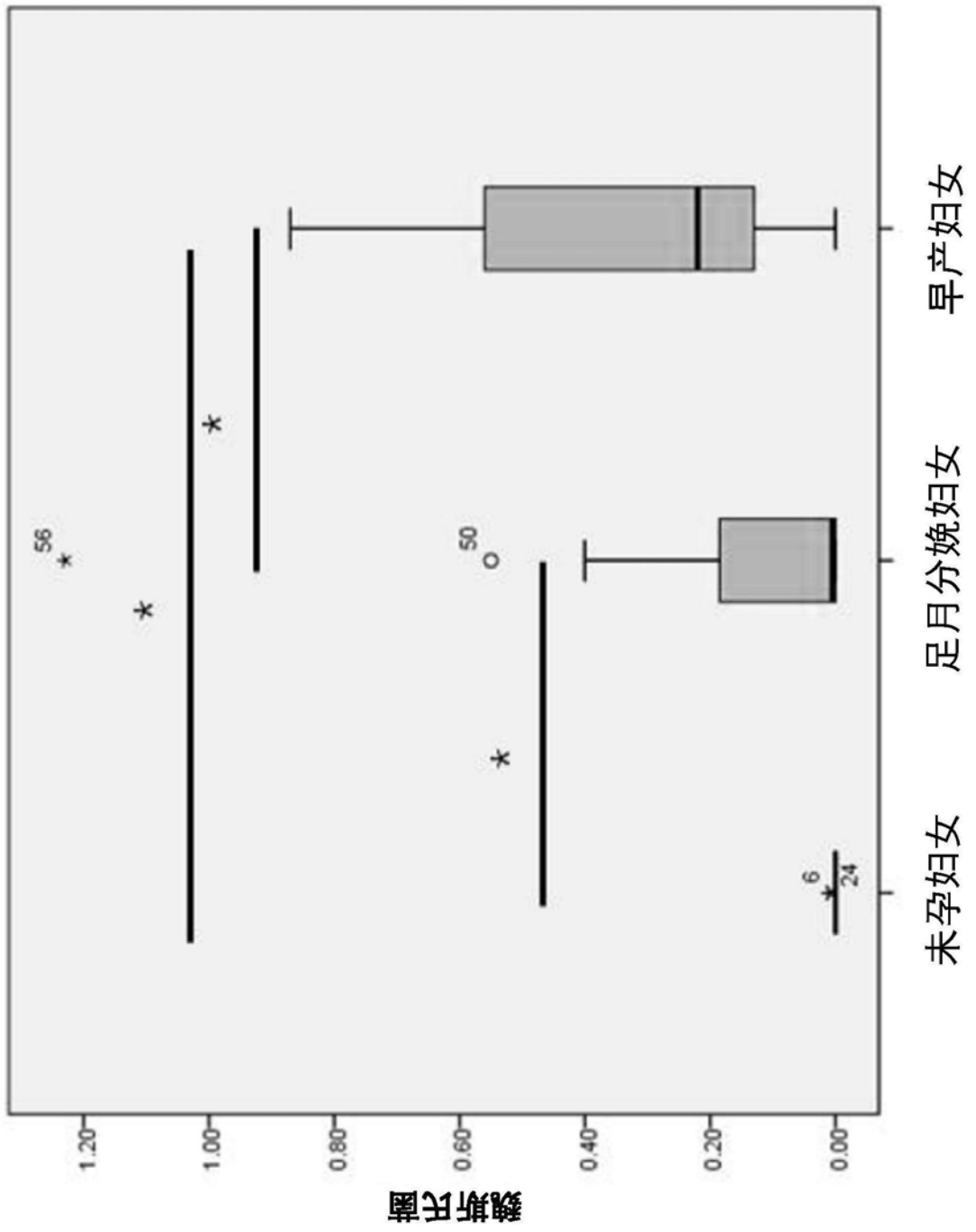


图4a

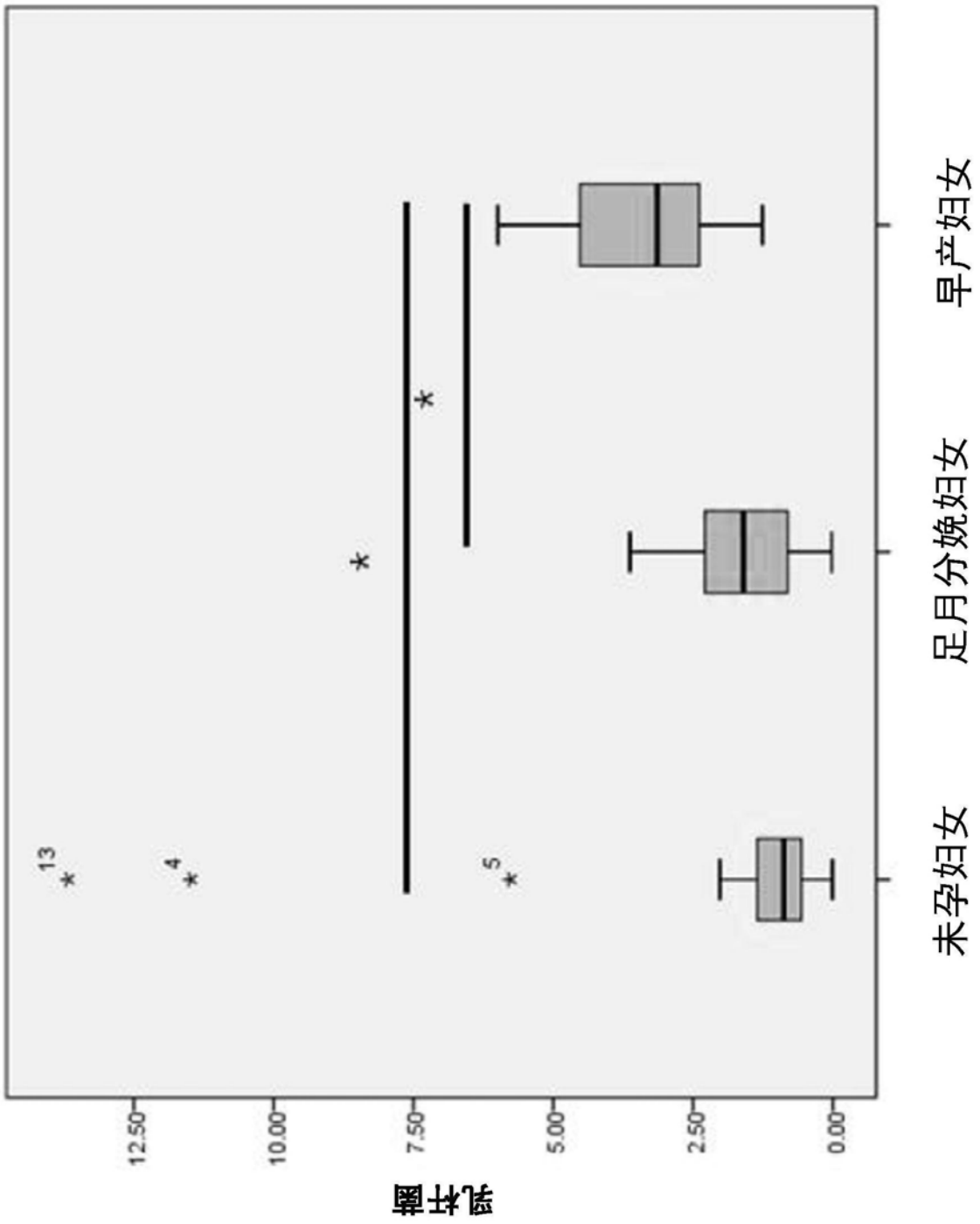


图4b

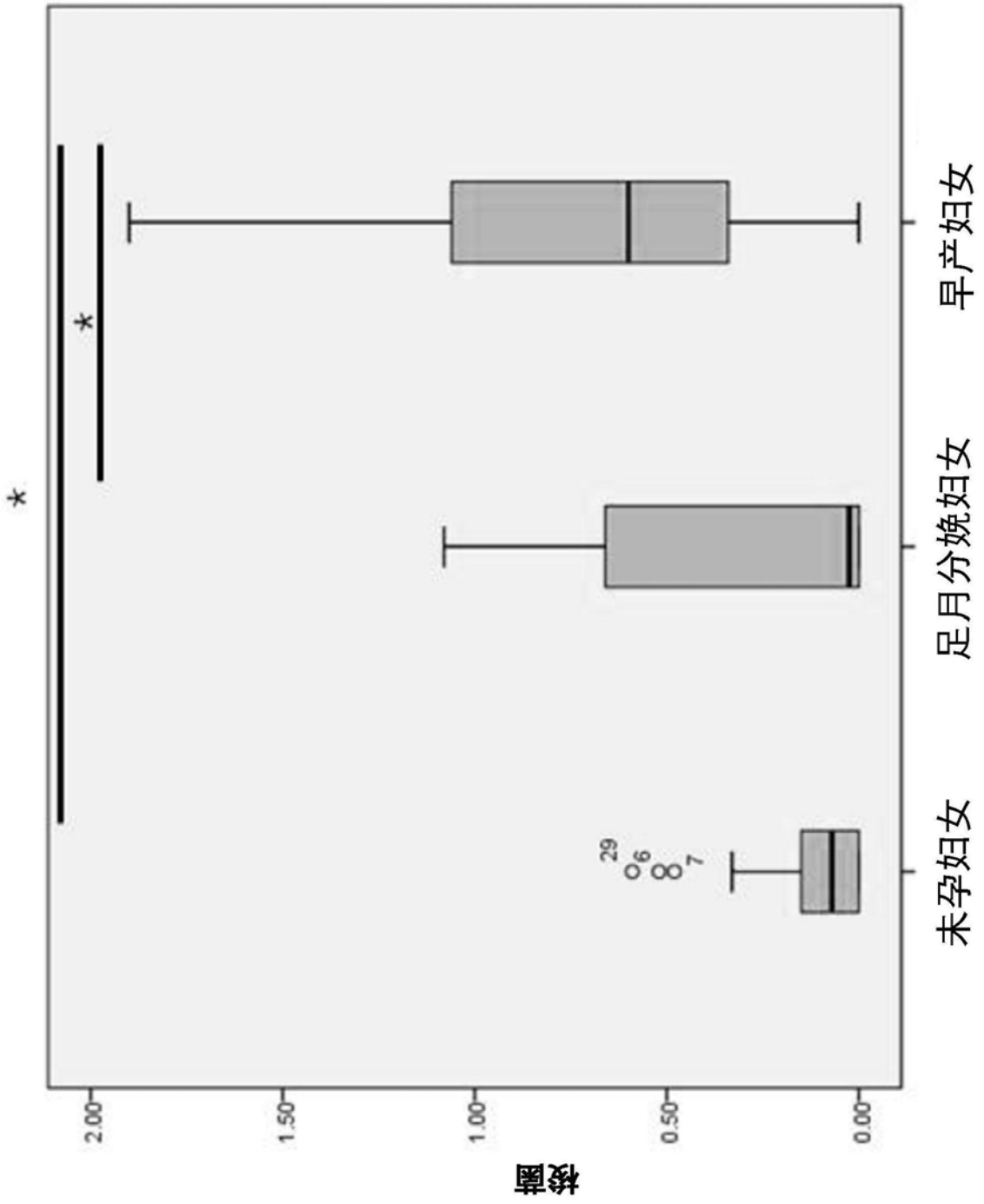


图4c

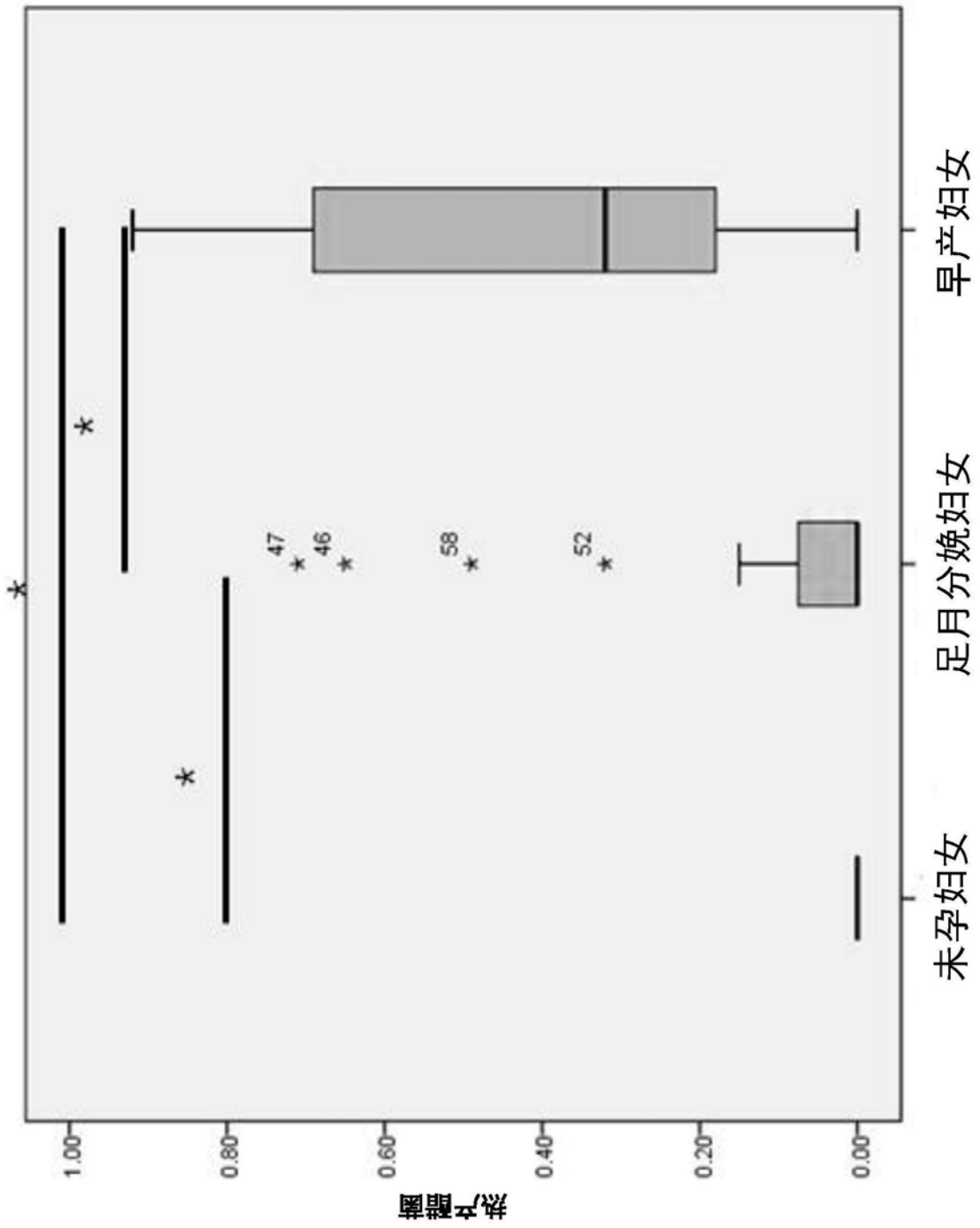


图4d

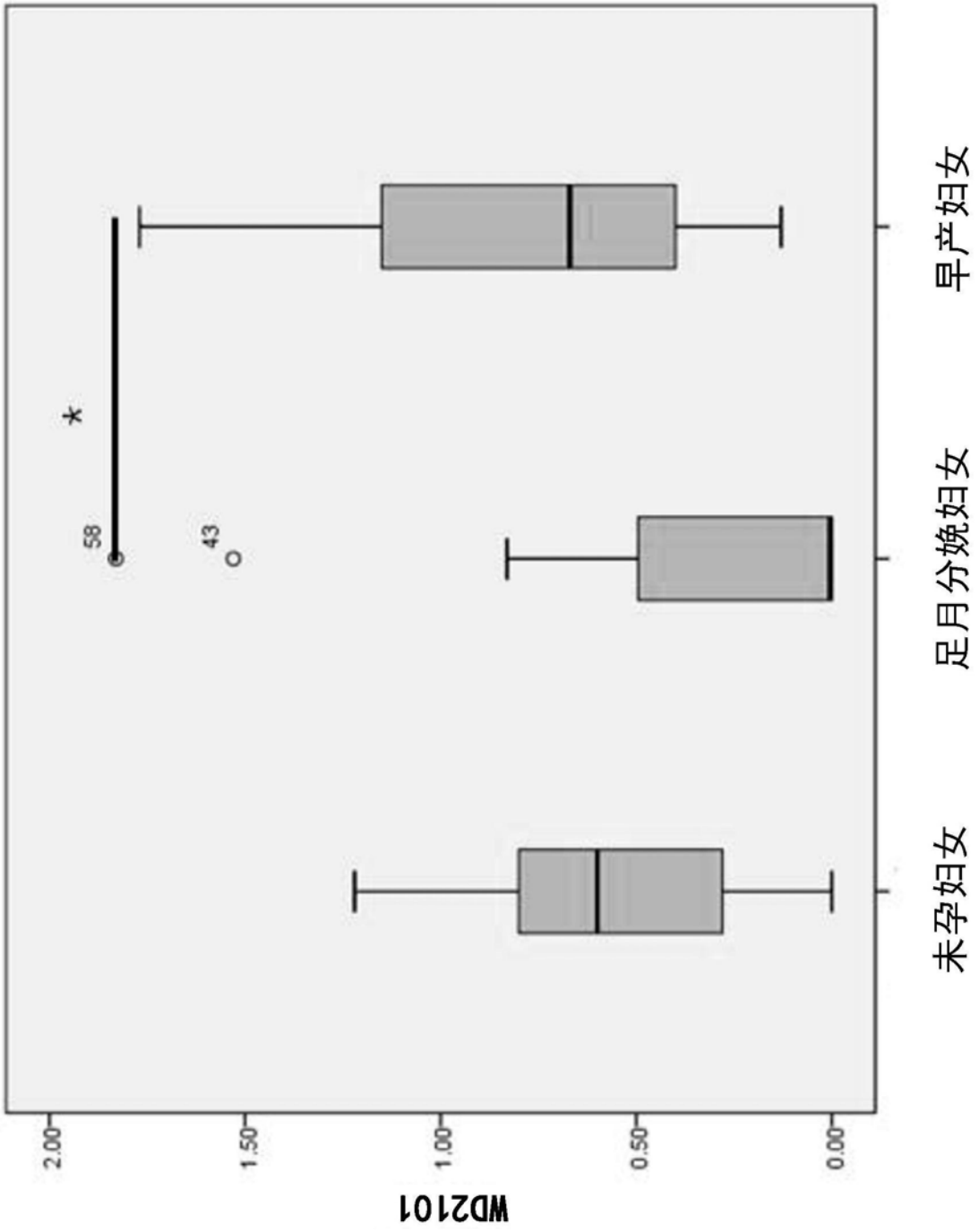


图4e

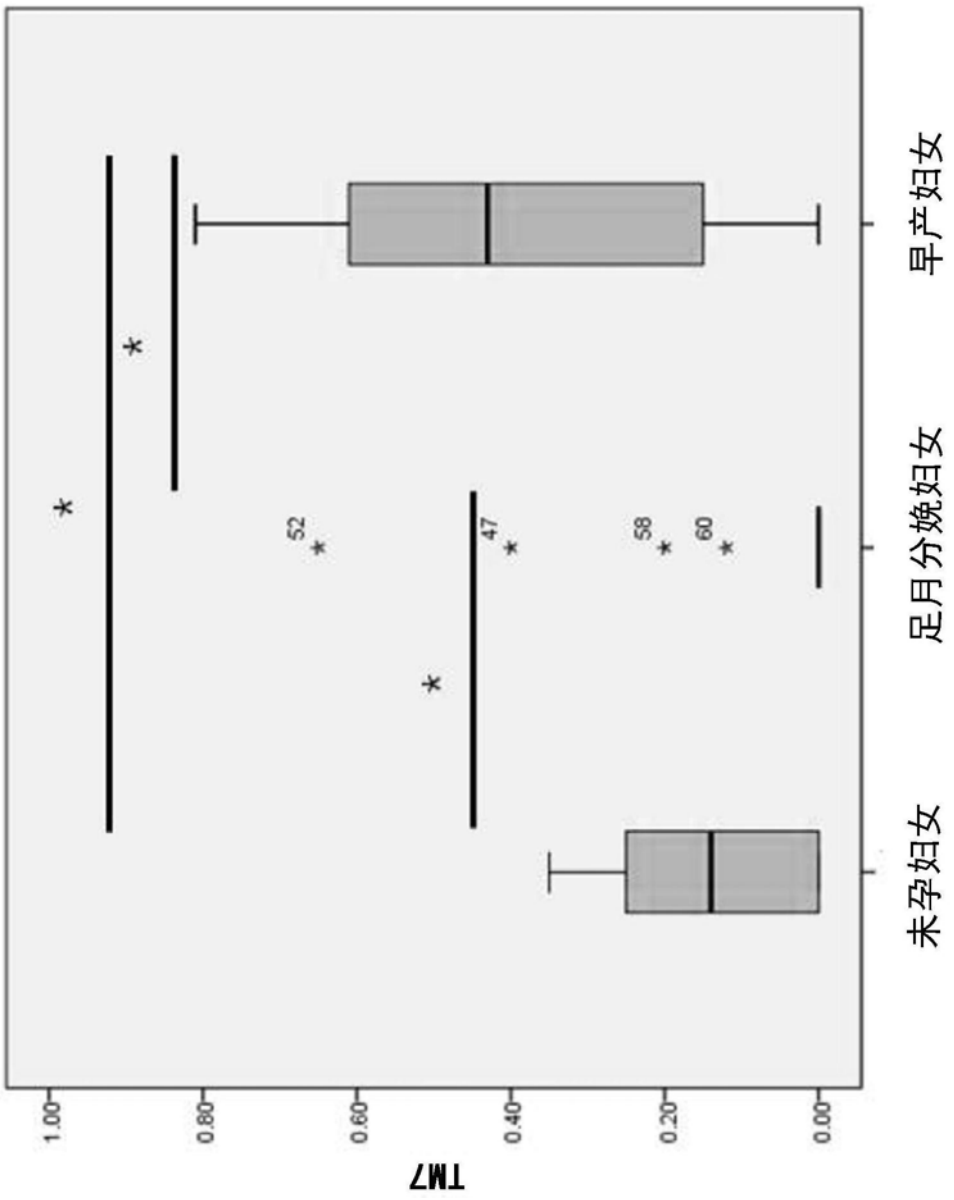


图4f