



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

Corso di Laurea triennale interfacoltà in Biotecnologie

**SEQUENZIAMENTO DI MICROBIOTA INTESTINALE MEDIANTE
TECNOLOGIA NGS ILLUMINA**

Relatore:

Professore SERGIO UZZAU

Elaborato finale di:

ALDO RICCI

Anno accademico 2013-2014

Indice

1 Introduzione	2
2 Scopo delle attività di laboratorio	3
3 Materiali e metodi	3
3.1 Prelievo campioni	3
3.2 Estrazione DNA	5
3.3 Amplificazione DNA ribosomiale 16S	8
3.4 Purificazione amplificati	9
3.5 Preparazione librerie	9
3.5.1 Tagmentazione DNA	9
3.5.2 Amplificazione PCR	10
3.5.3 Normalizzazione librerie	10
3.5.4 Generazione cluster	10
3.6 Sequenziamento	11
3.7 Analisi risultati	11
4 Bibliografia	12

1 Introduzione

Il corpo umano è colonizzato da un numero di batteri che supera quello delle cellule umane (circa 10^{14}), la maggior parte di essi è presente nel tratto gastrointestinale.

Studiare le relazioni che si instaurano tra batteri e organismo ospite, sullo sviluppo di patologie e/o i benefici che si traggono da questa convivenza è, attualmente, uno dei più innovativi campi di ricerca microbiotica in ambito internazionale.

Le ricerche sono state svolte con maggiore profondità successivamente al sequenziamento del genoma umano (anni 2000), quando risultò chiaro che tale progetto sarebbe stato insufficiente se non si fossero implementate le conoscenze sul sinergismo tra uomo e batteri.

A tal proposito, nacque nel 2001 il Progetto microbioma umano, un iniziativa del National Institute of Health statunitense, che si pose come fine quello di caratterizzare da un punto di vista genetico le comunità microbiche, commensali, simbiotiche e patogeniche che colonizzano ogni porzione del corpo (microbioma), incentrando la ricerca su 4 aree principali : bocca, intestino, vagina e pelle.

L'obiettivo fu quello di caratterizzare il microbioma umano e poterne studiare la variabilità tra individui di età, sesso e etnia differente, inoltre si cercò di dimostrare la relazione tra la diversificazione del microbioma e lo sviluppo di determinate patologie, in modo da poter migliorare, in futuro, la salute umana tramite il monitoraggio e la manipolazione del microbioma stesso. (1)

Il tratto gastrointestinale è stata una delle aree che ha suscitato il maggior interesse all'interno della comunità scientifica; come già detto, esso presenta un gran numero di procarioti (alcuni trilioni), che vivono in simbiosi con l'organismo e formano un complesso chiamato Microbiota intestinale.

Studi metagenomici e metatrascrittomici (svolti sul tessuto intestinale e successivamente su campioni di feci), mostrano come il microbiota intestinale, sia principalmente composto da batteri appartenenti al phyla Firmicutes e Bacteroidetes; essi colonizzano il tratto gastrointestinale fin dai primi momenti della vita, e la loro composizione può variare in relazione all'alimentazione e agli stili di vita degli individui.

Il microbiota risulta coinvolto anche in processi metabolici. Infatti, tramite l'analisi dell'espressione degli mRNA, è stato possibile evidenziare la presenza di geni codificanti enzimi coinvolti in diversi processi fisiologici, legati alla digestione e alla produzione di energia (es. fermentazione zuccheri, sintesi biotina, digestione mucina). Inoltre, si è mostrata una discreta relazione tra variabilità nella

composizione del microbiota e aumento di peso, e come tale cambiamento (disbiosi), possa portare allo sviluppo di patologie come obesità e infiammazioni croniche. (2)

Risulta dunque chiara l'importanza che assume lo studio del microbiota intestinale, per la prevenzione e la cura di determinate patologie e disfunzioni, in modo da migliorare la salute umana.

2 Scopo delle attività di laboratorio

Le attività si inseriscono nell'ambito di una ricerca finalizzata all'identificazione di associazioni tra microbiota intestinale e tratti genetici e quantitativi dell'ospite in una popolazione di grande interesse genetico della Sardegna (popolazione Progenia, Ogliastra). Le attività svolte nel corso del tirocinio, sono state rivolte all'analisi tassonomica della composizione del microbiota intestinale, mediante il sequenziamento (tecnologia NGS illumina) della regione 16s del DNA ribosomiale (DNA metagenomico), ed a mettere in evidenza le differenze eventualmente presenti, tra 2 metodi di estrazione del DNA, tra i campioni appartenenti a soggetti di età e sesso diverso.

Lo studio è svolto partendo da un totale di 96 campioni di feci prelevate da un gruppo di individui sani e non trattati con antibiotici, della provincia dell'Ogliastra, suddivisi a metà tra donne e uomini e appartenenti a 3 fasce di età : 18-30 , 31-40, 41-50 anni.

3 Materiali e metodi

3.1 Prelievo campioni

I 96 campioni (precedentemente congelati e conservati a -80 °C), sono stati divisi in 4 set da 24 e, dopo lo scongelamento a temperatura ambiente, si è prelevato da ognuno di essi, un quantitativo di feci che rispettasse il range richiesto (180-220mg) dal protocollo di estrazione del DNA (QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit). I dati relativi alle pesate di tutti i campioni sono riportati nella tabella 1, da notare come per alcuni campioni è stato prelevato un quantitativo superiore o inferiore in base alle caratteristiche delle feci (es. molto diluita dopo lo scongelamento). Inoltre, dall'analisi macroscopica iniziale, un campione si è mostrato non idoneo e non è stato preso in considerazione.

Durante la fase di prelievo sono state anche riportate annotazioni sul colore e sulla consistenza di alcuni campioni.

Campione	Pesata g	Campione	Pesata g	Campione	Pesata g	Ca72mpione	Pesata
1	0,207	25	0,334	49	0,234	73	0,245
2	0,206	26	0,33	50	0,189	74	0,282
3	0,197	27	0,202	51	0,216	75	0,219
4	0,208	28	0,383	52	0,235	76	0,25
5	0,192	29	0,145	53	0,199	77	0,196
6	0,213	30	0,32	54	0,252	78	0,281
7	0,192	31	0,256	55	0,197	79	0,219
8	0,219	32	0,239	56	0,183	80	0,275
9	0,226	33	0,233	57	0,273	81	0,239
10	0,218	34	0,147	58	0,233	82	0,232
11	0,216	35	0,225	59*	0,228	83	0,04
12	0,213	36	0,21	60	0,176	84	0,214
13	0,2	37	0,269	61	0,285	85	0,285
14	0,256	38	0,219	62**	0,182	86	0,272
15	0,193	39	0,075	63	0,261	87	0,237
16	0,196	40	0,264	64	0,249	88	0,191
17	0,2	41	0,182	65	0,246	89	0,289
18	0,2	42	0,363	66	0,547	90	0,279
19	0,208	43	0,256	67	0,285	91	0,239
20	0,22	44*	0,244	68	0,186	92	0,183
21	0,199	45	0,342	69	Pochissimo	93	0,254
22	0,183	46*	0,229	70	0,219	94	0,278
23	0,22	47	0,237	71	0,261	95	0,113
24	0,22	48	0,269	72	0,17	96	0,217

Tabella1: i campioni con le pesate più elevate sono quelli che risultano più liquidi dopo lo scongelamento; * feci scure; **feci molli.

3.2 Estrazione DNA

L'estrazione del DNA dai campioni è stata effettuata seguendo 3 metodi differenti: Metodo QIAGEN QIAmp® Fast DNA stool kit(56 campioni); un metodo ibrido tra Stool e Soil (38 campioni); metodo E.Z.N.A.® Soil DNA kit (per due campioni, 26 e 67 che sono stati anche trattati con gli altri 2 metodi di estrazione). Si analizzeranno in seguito le differenze da un punto di vista tassonomico tra i campioni trattati con metodi differenti.

Il protocollo QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit consente una rapida e ottima estrazione di DNA, dal punto di vista quali/quantitativo, partendo sia da campioni freschi che da quelli congelati.

Ai campioni si aggiunge inizialmente 1 ml di InhibitEX buffer che rimuove eventuali inibitori della PCR presenti nel campione, e si riscalda la sospensione a 95°C in modo da lisare le cellule batteriche attraverso lo shock termico. Successivamente l'omogenato viene sottoposto a centrifugazione, si raccolgono 200 µl di soprnatante e si aggiungono 25 µl di proteinasi K che ha il compito di idrolizzare le proteine presenti e facilitare la lisi cellulare. A questi vengono aggiunti 200µl di buffer AI e la soluzione è incubata a 70°C per 10 minuti per poter completare la lisi .

Al lisato si aggiunge etanolo (al 96-100%) e si carica su colonnine che trattengono il DNA e permettono l'eluizione. Dopo due cicli di lavaggio con i buffer AW1 e AW2 (a differenti concentrazioni di etanolo), si aggiungono 50 µl di acqua per permettere la definitiva eluizione del DNA attraverso la colonnina.

Il protocollo E.Z.N.A.® Soil DNA consente l'estrazione del DNA tramite un metodo che si serve di un trattamento meccanico (-con l'uso di perline di vetro), termico e chimico (come per lo Stool).

Un quantitativo del campione prelevato (da 0,2 a 1 g), è aggiunto in un tubetto contenente delle perline di vetro; si tratta il campione con 2 differenti buffer (SLX-Mlus Buffer e DS buffer) alternando ogni aggiunta a una vortexata, e si incuba a 70°C per 10 minuti. A seguito di una centrifugazione a 3,000rpm *per 3 minuti*, 800µl del soprnatante sono trattati col buffer P2 e incubati in ghiaccio per 5 minuti. Dopo aver centrifugato a 13,000 si aggiungono al soprnatante 0,7 volumi di isopropanolo, si mescola per inversione e si centrifuga alla stessa velocità per 10 min a 4°C (formazione pellet), si aspira il soprnatante e si scarta; si aggiungono 200µl del buffer di eluizione (acqua), e si dissolve il pellet attraverso l'incubazione a 70°C per 10 min. Si prosegue con l'aggiunta del reagente HTR (100µl) che rende limpido il soprnatante "intrappolando" ogni impurità. Dopo averlo centrifugato a 13,000x g, il soprnatante pulito si trasferisce in una colonnina dotata di membrana, si centrifuga e si scarta il filtrato; Si aggiungono 300µl del buffer

XP1 e successivamente 700µl del Buffer di lavaggio SPW, tra un aggiunta e l'altra si centrifuga a 10,000 x g e si elimina il filtrato.

La colonnina contenente il campione si trasferisce in un nuovo tubetto e il DNA si fa eluire attraverso la membrana tramite l'aggiunta di acqua e un ultima centrifuga a 13,000 x g (Elution step)

Il terzo metodo usato (metodo ibrido tra Stool e soil), prevede l'estrazione del DNA seguendo interamente il protocollo stool e, successivamente la purificazione tramite il metodo Soil, partendo dall'aggiunta di 100 µl del reagente HTR fino alla finale eluizione del DNA (elution step).

A questo punto si è proceduto con l'analisi quali/quantitativa del DNA estratto. L'integrità dell'estratto genomico è stata valutata tramite gel d'agarosio allo 0,8%, mentre le rese di estrazione del Dna tramite l'utilizzo del Qubit.

Il Qubit è un fluorimetro che consente di misurare la concentrazione di DNA, RNA e proteine presenti in un campione, attraverso misure di fluorescenza, in maniera più precisa rispetto allo spettrofotometro a raggi UV.

L'analisi quantitativa del DNA è svolta mediante l'utilizzo di intercalanti del DNA (HS kit) che emettono fluorescenza una volta legati al dsDNA.

Prima di procedere con l'analisi del DNA è necessario creare la working solution (fondamentale per la lettura delle concentrazioni), cioè la soluzione contenente il reagente HS e un buffer rispettivamente in rapporto 1:200.

Successivamente lo strumento è calibrato usando 2 soluzioni composte da DNA standard con concentrazione 0 ng/µl e l'altra da DNA standard con concentrazione 10 ng/µl; Poi si è proceduto con la lettura del DNA estratto (soluzione composta da 195 µl di WS + 5 µl DNA). I risultati ottenuti (vedi Tabella 2) hanno dimostrato l'assenza di relazione tra quantità di campione prelevato e concentrazione DNA.

Campione	Conc. DNA ng/μl	Campione	Conc. DNA ng/μl	Campione	Conc. DNA ng/μl	Campione	Conc. DNA ng/μl
1	19,4	25	3,78	49	14,6	73	3,39
2	16,16	26	29,2	50	6,36	74	2,8
3	1,42	27	8,28	51	13,07	75	5,24
4	3,58	28	26,2	52	2,44	76	21,9
5	12	29	21,8	53	14,3	77	0,8
6	8,2	30	4,32	54	24,1	78	6,2
7	45,6	31	19,2	55	17,3	79	7,68
8	15,9	32	9,44	56	8,28	80	4,8
9	12,6	33	9,60	57	9,76	81	13,8
10	2,66	34	1,86	58	6,96	82	0,72
11	9,64	35	20,7	59	3,42	83	7,99
12	30,6	36	7,28	60	2,31	84	11,1
13	5,84	37	5,92	61	82,4	85	6,12
14	27,4	38	4,60	62	6,16	86	2,96
15	1,8	39	10,6	63	5,72	87	1,46
16	2,28	40	4,08	64	4,48	88	3,18
17	2,12	41	6,88	65	9,4	89	6
18	9,84	42	6,16	66	11,1	90	6,96
19	23,4	43	3,90	67	30,8	91	18,8
20	38	44	22,6	68	3,28	92	6,36
21	4,76	45	8	69	1,73	93	1,28
22	21,1	46	10,9	70	6,08	94	3,80
23	28,8	47	8,04	71	18,5	95	5,08
24	12,9	48	8,32	72	22,9	96	9,2

Tabella 2: I campioni con concentrazione maggiore di 10ng/μl sono stati diluiti per facilitare l'amplificazione successiva

3.3 Amplificazione DNA ribosomiale 16S

L'amplificazione del gene codificante per l'rRNA 16s è eseguita tramite l'utilizzo di primers specifici in grado di legare le sequenze conservate che fiancheggiano le regioni ipervariabili, e permettere così l'amplificazione di queste ultime, che sono fondamentali per gli studi filogenetici e tassonomici. (3); (4).

Si prepara la miscela di reazione (all'interno di un tubetto per PCR), contenente in totale 25µl composti da: nucleotidi, taq polimerasi, MgCl₂, acqua, i due primers specifici (forward e reverse), e 5 µl di DNA; si regola il termociclatore : 2 min. 94°C (denaturazione), 0,30 secondi 55°C, 2 min. 68°C (annealing), 7 min. 72°C (estensione) e si avvia l'amplificazione per un totale di 28 cicli.

Le amplificazioni sono state svolte in doppio per ogni campione, in modo da evitare eventuali bias di amplificazione dovuti dalla presenza di contaminanti e dall'eventuale competizione con altri microorganismi.

Dopo l'amplificazione, i campioni sono caricati sul gel di agarosio 2% per verificare se l'amplificazione è avvenuta: partendo da una popolazione composta da 96 campioni si è riusciti ad amplificarne 92: 54 campioni estratti unicamente con metodo Stool, 36 estratti con metodo ibrido e 2 campioni estratti con Soil, stool e metodo ibrido. (vedi alcune estrazioni in figura 1 e2).

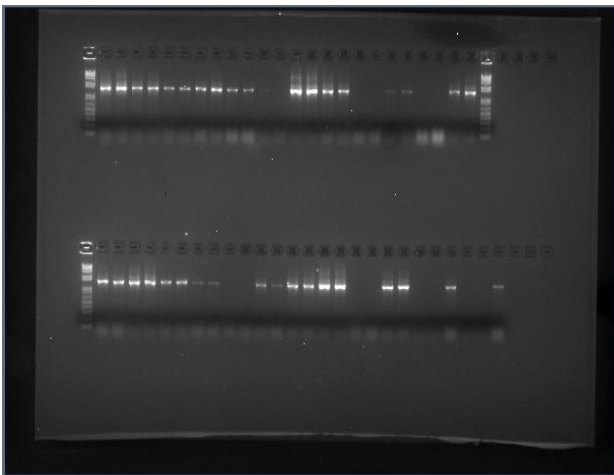


Figura 1: amplificazione di 24 campioni estratti con stool kit

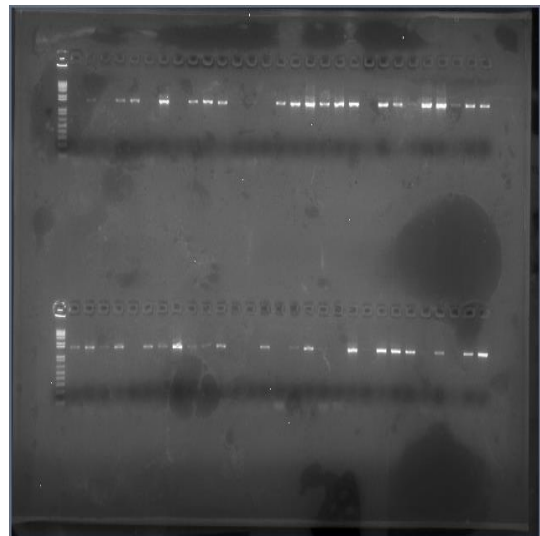


Figura2: Amplificazione campioni estratti con metodo ibrido

3.4 Purificazione amplificati

Si usa il sistema di purificazione Agencourt® AMPure® che attraverso un buffer, e l'utilizzo di microsfere magnetiche, è in grado di eliminare tutti i residui derivati dalla PCR attraverso un solo ciclo di lavaggio.

Per prima cosa si posiziona su una piastra il prodotto della PCR e si aggiunge un quantitativo di microsfere magnetiche (in base al volume del prodotto stesso); la piastra di reazione si pone su un supporto magnetico che separa i magneti (che legano il DNA), dalla soluzione che sarà eliminata; segue poi un doppio lavaggio con etanolo al 70% (200µl); dopo l'evaporazione dell'etanolo il DNA si fa eluire tramite l'aggiunta di 40µl di acqua.

Prima di proseguire con la creazione delle librerie genomiche, è stato necessario determinare la concentrazione del DNA in ogni campione e diluirla se necessario, fino ad avere una concentrazione di 0,2ng/µl, in modo da prelevarne 5 ul e avere una concentrazione finale di 1ng/µl richiesta per le librerie.

3.5 Preparazione librerie

Si segue il protocollo Nextera® XT DNA per la preparazione delle librerie per 96 campioni.

I campioni di DNA vengono preparati attraverso un processo di frammentazione casuale.

Ai frammenti così ottenuti, vengono aggiunte delle sequenze predefinite (note come "adattatori"), che sono necessarie per ancorare e immobilizzare i frammenti al supporto sul quale avrà luogo la reazione di sequenziamento. I frammenti di DNA così preparati, tramite l'aggiunta degli adattatori, costituiscono la cosiddetta libreria di sequenziamento (**sequencing library**).

3.5.1 Tagmentazione DNA

È il primo step, prevede la frammentazione del DNA (in frammenti di circa 300bp), mediata da trasposomi che aggiungono degli adattatori alle due estremità (necessari per la successiva fase di amplificazione degli inserti di DNA).

Nei 96 pozzetti della piastra di tagmentazione si aggiungono 10µl del buffer di tagmentazione del DNA, 5µl del Dna dei nostri campioni (con concentrazione pari a 0,2 ng/µl totale 1 ng/µl) e 5 µl del mix di tagmentazione contenente i trasposoni, si centrifuga a 280 xg per 1 minuto a 20 °C e si avvia un ciclo di termociclatore programmato a: 55°C per 5 minuti e 10°C per un minuto.

Si prosegue successivamente, con il blocco dell'azione dei trasposoni attraverso l'aggiunta di 5µl del buffer di neutralizzazione e una centrifugata a 280 xg a 20°C per 1 minuto.

3.5.2 Amplificazione PCR

In questa fase, il DNA tagmentato si amplifica con un programma limitato di PCR; si aggiungono così i primers index 1 e 2 (sequenze fondamentali per il riconoscimento dei campioni dopo il sequenziamento), e le sequenze necessarie per la formazione dei clusters.

In ogni pozzetto della piastra contenente le porzioni di DNA tagmentato di ogni campione, si aggiungono rispettivamente 15 μ di buffer per PCR e 15 μ l di entrambi gli index (facendo in modo di differenziare i campioni tra di loro per permetterne il riconoscimento post sequenziamento), e si avvia la PCR programmata a 72°C per 3 min.; 95°C per 30 secondi; poi 12 cicli a 95°C per 10 secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi; un altro ciclo a 72°C per 5 minuti e uno step finale a 10 °C per 1 minuto.

A seguito dell'amplificazione si esegue una purificazione, in cui, 50 μ l del prodotto della PCR sono trattati con sfere metalliche, posti su un supporto magnetico e, dopo avere eliminato il surnatante, si eseguono 2 lavaggi con etanolo 80%; successivamente, si fa evaporare e si ripone la piastra sul supporto magnetico. A questo punto, il surnatante (contenente il filamento di DNA purificato), viene prelevato e posto in una nuova piastra (con 96 pozzetti), per la successiva normalizzazione delle librerie.

3.5.3 Normalizzazione librerie

Questo processo normalizza le quantità di ogni libreria in modo da avere un uguale rappresentazione delle librerie nel pool di campioni.

Si prelevano 20 μ l da ogni pozzetto e si posizionano su una piastra (per la normalizzazione delle librerie), si aggiunge una miscela composta da 45 μ l di buffer e microsferette metalliche, si posiziona la piastra su un supporto magnetico e si elimina il surnatante; si eseguono 2 lavaggi con un buffer specifico (45 μ l) ponendo la piastra sul supporto magnetico, e eliminando il surnatante tra un lavaggio e l'altro. Dopo aver aggiunto 30 μ l di NaOH (che denatura il doppio filamento di DNA), aver vortexato, e posto la piastra sul supporto magnetico, si prelevano 30 μ l del surnatante da ogni pozzetto e si caricano su una nuova piastra.

Al termine di queste reazioni si hanno librerie composte da DNA a singolo filamento.

3.5.4 Generazione cluster

Prima di procedere con la generazione dei cluster e il sequenziamento, volumi uguali delle librerie normalizzate (5 μ l) si combinano, diluiscono in un buffer di ibridazione e denaturano al calore.

Ai 120 μ l della soluzione finale (mix delle librerie più buffer di ibridazione), si aggiungono 150 μ l di primers e, dopo aver sistemato i reagenti nella piastra si avvia il macchinario (Cbot) e inizia la

generazione dei clusters (tramite il metodo “bridge amplification”), su un supporto fisso (flow cell) cha, al termine della reazione avrà centinaia di milioni di clusters ognuno dei quali contenente circa 1000 identiche copie di un singolo filamento di DNA.

3.6 Sequenziamento

Il sequenziamento è stato svolto utilizzando il sequenziatore HiScan SQ.

Si tratta di un sequenziamento massivo parallelo di milioni di frammenti tramite sintesi, e si basa su un metodo che utilizza terminatori reversibili (4 nucleotidi marcati con composti fluorescenti), che permettono il rilevamento di singole basi ogni volta che vengono incorporati nella catena di DNA crescente. Il sequenziamento è svolto inoltre con paired-end reads (partendo da entrambe le estremità dei filamenti), e la lunghezza di entrambe le reads è di 101 bp.

3.7 Analisi risultati

I dati post sequenziamento sono stati analizzati utilizzando Qime, un software bioinformatico specifico per il microbioma, che consente l’analisi e la rielaborazione dei risultati tramite grafici e tabelle. Il funzionamento di Qime prevede la clusterizzazione in otus delle Reads in base alla percentuale di identità (97%); ad ogni otu, corrisponde un inquadramento tassonomico sulla base dell’allineamento ad un database specifico (greengenes).

L’analisi preliminare delle abbondanze mostra una grande variabilità tassonomica all’interno dei campioni, sebbene Firmicutes e/o Bacteroidetes risultino costantemente i 2 phyla principali (Grafico1); inoltre si può notare come, il rapporto Firmicutes/Bacteroidetes, risenta del metodo di estrazione utilizzato (Grafico2). Con l’analisi della Beta diversità, tramite PCA, è stato possibile osservare, come atteso, che le distribuzioni dei taxa nei campioni fecali non sono dipendenti dal genere e/o dall’età degli individui e, dunque, non rappresentano una covariata (Grafico3).

Si evidenzia, invece, una distribuzione continua e mutualmente esclusiva della % di Bacteroidetes e Firmicutes, e un’assenza di “core” microbiota nei 96 campioni.

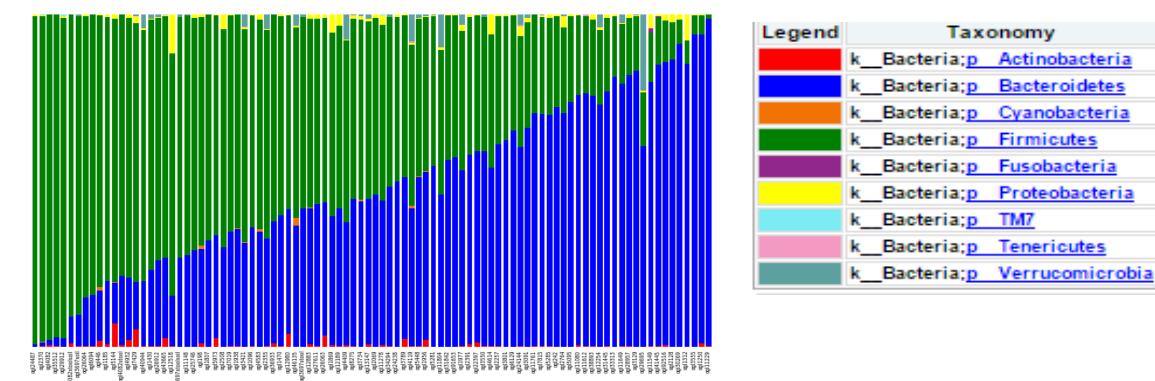


Grafico1. Variabilità tassonomica all’interno dei campioni

Taxon	ogl3697soil	ogl3697stool	ogl3697stoolsoil	ogl4082soil	ogl4082stool	ogl4082stoolsoil
k__Bacteria;p__Firmicutes	89,797%	57,585%	72,982%	97,973%	78,458%	90,917%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	9,283%	41,525%	26,288%	1,450%	21,058%	8,191%
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	0,407%	0,795%	0,663%	0,000%	0,000%	0,000%
k__Bacteria;p__Proteobacteria	0,011%	0,072%	0,049%	0,014%	0,026%	0,043%
k__Bacteria;p__TM7	0,027%	0,012%	0,019%	0,000%	0,000%	0,000%
k__Bacteria;p__Actinobacteria	0,452%	0,006%	0,000%	0,563%	0,455%	0,846%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,022%	0,005%	0,000%	0,000%	0,003%	0,003%

Grafico2. Concentrazione di Firmicutes e Bacteroidetes ottenuta utilizzando diversi metodi di estrazione

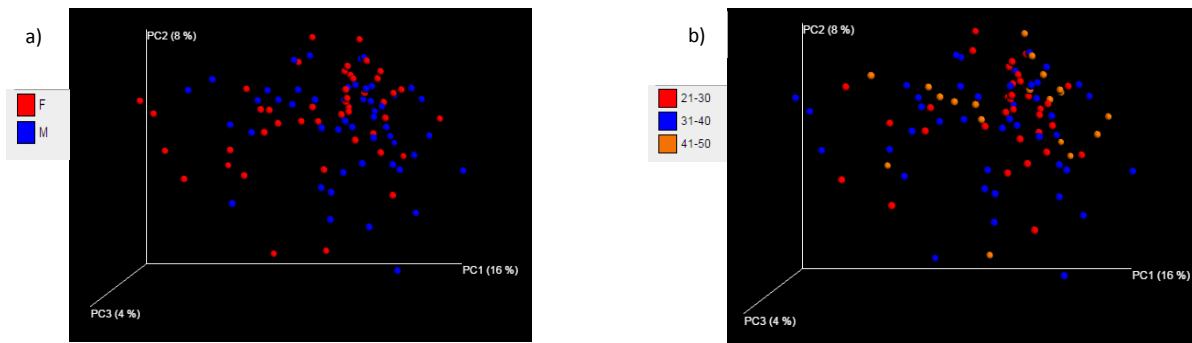


Grafico 3. PCA: si evidenzia l'assenza di clusterizzazione in termini di genere sessuale (a), e fasce di età (b).

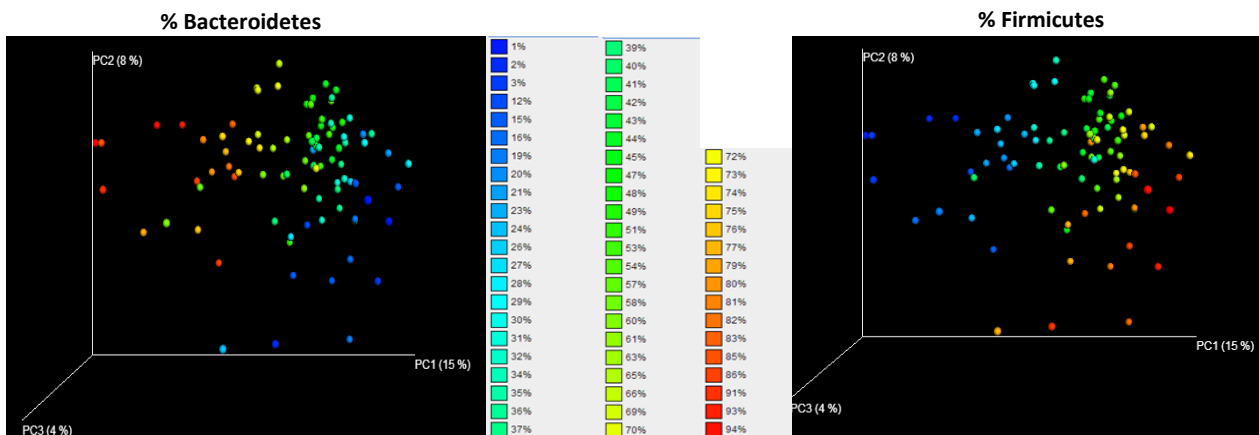


Grafico 4. PCA: clusterizzazione dei due phyla (Bacteroidetes e firmicutes).

4 Bibliografia

- 1 The NIH Human Microbiome Project; The NIH HMP Working Group; Cold SPRING Harbor Laboratory Press; august 2010; 19:2317-3223.
- 2 ___(The gut microbiome: scourge ì, sentinel or spectator?)
- 3 "Identification of bacteria using two degenerate 16s rDNA sequencing primers"; K. Boye, E. Høgdall, M. Borre; Microbiol Res. 1999 May;154(1):23-6.)
- 4 "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study"; WILLIAM G. WEISBURG,* SUSAN M. BARNES, DALE A. PELLETIER, AND DAVID J. LANE)