

استفاده از روش PCR رقابتی و Real-time PCR مطلق به منظور کمی سنجی جمعیت باکتری تولید کننده بوتیرات: بوتیریوبیوریو فیبری سالونس

مجتبی طهمورث پور^{1*} - امیر طاهری² - محمد هادی سخاوتی³

تاریخ دریافت: 1393/03/31

تاریخ پذیرش: 1393/11/02

چکیده

سویه‌های باکتری بوتیریوبیوریو فیبری سالونس به عنوان عمده‌ترین گروه باکتری‌های تولید کننده بوتیرات در دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات و همچنین انسان شناخته شده‌اند. در این مطالعه دو تکنیک مبتنی بر DNA شامل PCR رقابتی و Real-time PCR به منظور شمارش باکتری‌های گونه بوتیریوبیوریو فیبری سالونس استفاده شدند. در ابتدا آغازگرهای اختصاصی برای منطقه 16S rDNA باکتری بوتیریوبیوریو فیبری سالونس به منظور تکثیر یک قطعه 213 جفت بازی استفاده شدند. یک قطعه رقابتگر با تفاوت طول 50 جفت باز بیشتر ساخته شد و در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. کمیت رقابتگر پلاسمیدی با استفاده از نانودراپ اسپکتروفوتومتری سنجیده شد و به صورت سریالی رقیق سازی شد. رقت‌های حاصل به همراه DNA استخراج شده از مایع شکمبه بطور همزمان تکثیر شدند. به منظور کمی‌سازی محصولات PCR پس از عکس برداری از ژل آگارز و استفاده از نرم افزار ImageJ، مقادیر تکثیر شده از DNA هدف در مقابل مقادیر تکثیر شده از رقابتگر به صورت لگاریتمی ترسیم شدند. از ضریب تبیین (R^2) به عنوان معیاری جهت ارزیابی دقت تکنیک استفاده گردید. برای توسعه Real-time PCR، قطعه 213 جفت بازی تکثیر شده و همسانه‌سازی شده در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد. نتایج نشان دادند که هر دو روش قابلیت استفاده برای شمارش باکتری‌های جنس بوتیریوبیوریو فیبری سالونس را دارا هستند و بنابراین می‌توانند به عنوان ابزارهای مناسب در تحقیقات مرتبط با این باکتری مورد استفاده قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: بوتیریوبیوریو فیبری سالونس، کمی سنجی اسیدهای نوکلئیک، QC PCR، Real-time PCR.

مقدمه

سویه‌های بوتیریوبیوریو، مهمترین باکتری‌های تولید کننده بوتیرات در دستگاه گوارش نشخوار کنندگان هستند (5) که به تعداد کمتری در روده‌های انسان (20)، سگ و گربه (1) نیز وجود دارند. قابلیت آن‌ها در تولید باکتریوسین (21) و اسید لینولئیک کنژوگه (10) می باشد که می‌توانند از طریق جلوگیری از ابتلا به سرطان، جلوگیری از تصلب شرایین و بهبود عملکرد سیستم ایمنی (20) برای سلامتی مفید باشند. از این رو توسعه روش‌های شمارش این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به عنوان یک ابزار تحقیقاتی برای مطالعه اندازه جمعیت آن‌ها، تشخیص فاکتورهای موثر بر رشد آن‌ها و همچنین بسیاری از

کاربردهای دیگر مفید باشد.

تکنیک PCR رقابتی کمی (Quantitative Competitive PCR، QCPCR) شامل تکثیر همزمان یک قطعه از DNA هدف به همراه مقادیر شناخته شده‌ای از DNA رقابتگر است که دارای همولوژی بسیار زیادی با قطعه هدف می باشد. در این صورت، هر گونه متغیر پیش بینی شده و پیش بینی نشده که فرآیند تکثیر را در PCR تحت تأثیر قرار دهد، بر روی هر دو قطعه اثر مشابهی خواهد گذاشت (8، 11). بنابراین QCPCR این امکان را فراهم می‌آورد که تعداد مطلق مولکول هدف را در نمونه مورد مطالعه در قیاس با مقادیر شناخته شده قطعه رقابتگر بدست آورد. اگرچه QCPCR نیاز به مراحل نسبتاً سنگین پس از PCR دارد اما صحت آن را در برخی مطالعات بیشتر از دیگر تکنیک‌های کمی و حتی بیشتر از Real-time PCR گزارش شده است (6، 13، 18، 24). از این تکنیک تا کنون برای شمارش بسیاری از میکروارگانیسم‌های مرتبط با دستگاه گوارش نشخوار کنندگان استفاده شده است (22). قابلیت اعتماد روش‌های کمی برای تعیین کمیت دقیق مقادیر

1-استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

2- فارغ التحصیل دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

3- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

* نویسنده مسئول: (m_tahmoorespur@yahoo.com)

استخراج DNA ساخت شرکت BIONEER کشور کره جنوبی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

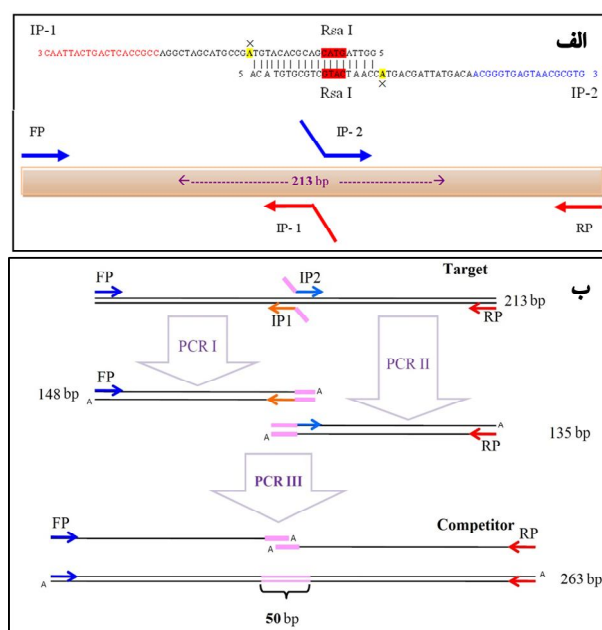
آغازگرها و تکثیر قطعات ژنومی

آغازگرهای اختصاصی بوتیریوبیوریو (FP: 5'-AGA GTT TGA) RP: 5'-CAC GTT GT و TCC TGG CTC AGG A-3' (CAT GCA ACA TCG T-3') برای تکثیر قسمتی از منطقه ژنومی 16S rDNA (213 جفت باز به عنوان قطعه هدف) انتخاب شده از گزارشات قبلی استفاده شدند (9). واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر با استفاده از کیت Gene Pack PCR Universal، کشور روسیه شامل 2 میکرولیتر DNA ژنومی، 2 میکرولیتر از مخلوط آغازگرها 5 پیکومولار، 10 میکرولیتر Dilluent، 3 میکرولیتر Master Mix و 8 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Personal T با استفاده از برنامه حرارتی که شامل یک چرخه واسرشت ابتدایی در 94 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه، 35 چرخه تکثیر شامل 94 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، 56/5 درجه سانتیگراد به مدت 15 ثانیه و 72 درجه سانتیگراد به مدت 15 ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط انتهایی در 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه انجام شد.

بهینه‌سازی تکنیک PCR رقابتی

جهت ساخت قطعه رقابتگر همولوگ با قطعه هدف یک جفت آغازگر (IP-1 و IP-2) با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 به طوری که در شکل 1 نشان داده شده است طراحی گردیدند. جهت اضافه شدن یک قطعه 50 نوکلئوتیدی در داخل قطعه 213 جفت بازی تکثیر شده از ژنوم 16S rDNA باکتری بوتیریوبیوریو، به انتهای 5' هر یک از آغازگرهای طراحی شده حدود 30 نوکلئوتید (اصطلاحاً به شکل overhang) اضافه گردید به طوری که بیست باز از این توالی‌ها با یکدیگر مکمل برگشتی بودند. همچنین به منظور مورد آزمون قرار دادن صحت توالی قطعه رقابتگر پس از همسانه‌سازی، در بین این توالی یک جایگاه برشی برای آنزیم *Rsa I* در نظر گرفته شد. با توجه به استفاده از آنزیم Taq پلیمرز در این واکنش‌ها و توجه به اینکه این آنزیم در پایانه‌های 3' محصولات خود یک نوکلئوتید آدنین اضافه می‌کند در این آغازگرها در نواحی مشخص شده با علامت × در شکل 1، یک نوکلئوتید آدنین در نظر گرفته شد تا محصولات تولید شده با احتساب یک نوکلئوتید آدنین اضافی بتوانند با هم تشکیل پیوند هیدروژنی دهند و به تبع آن واکنش PCRIII صورت بگیرد. جهت ساخت و تکثیر قطعه رقابتگر بوسیله SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR) سه واکنش طرح ریزی شد. در واکنش اول (PCR I) مخلوطی از آغازگرهای FP و IP-1،

ناچیز اسیدهای نوکلئیک در نمونه‌های بیولوژیکی همچنان یکی از نیازهای مهم آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقاتی می‌باشد. تکنیک‌های QCPCR و Real-time PCR از جمله مطلوب‌ترین روش‌ها برای فایق آمدن بر محدودیت‌های روش‌های مبتنی بر PCR های سنتی هستند که در آن‌ها صحت کمیت سنجی اسیدهای نوکلئیک در نمونه‌های زیستی به شدت پایین است (24). هدف اصلی این مطالعه توسعه روش‌های کمی برای شمارش سویه‌های متعلق به گونه بوتیریوبیوریو فیبری سالونس در نمونه‌های زیستی مانند مایع شکمبه بود. این روش‌ها می‌توانند به عنوان ابزارهای تحقیقاتی مناسب در مطالعه اثر تیمارهای غذایی مختلف و ... بر روی فلور میکروبی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و یا انسان به کار روند.



شکل 1- الف) آغازگرهای IP-1 و IP-2، ب) محصولات تولید شده در هر یک از واکنش‌های PCR I، PCR II، PCR III و PCR III

Figure 1- A) Primers IP-1 and IP-2, B) PCR products in each reactions, PCRI, PCRII and PCRIII

مواد و روش‌ها

نمونه مایع شکمبه و استخراج DNA

نمونه های مایع شکمبه از یک گوسفند فیستولا گذاری شده که با ترکیبی از کنسانتره و علوفه تغذیه می شد گرفته شد. به منظور حصول اطمینان از اینکه نمونه ای یکنواخت از قطعات گیاهی و مایع شکمبه برای استخراج DNA استفاده می شود، با استفاده از یک پیپت با نوک بزرگ (wide bore pipette) 500 میکرولیتر از یک نمونه 20 میلی لیتری برداشته شد. استخراج DNA با استفاده از کیت

Biosystems) تکثیر شدند. از هر رقت دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی استفاده شده عبارت بود از: دو دقیقه در دمای 50 درجه سانتیگراد و پس از آن 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد، 37 چرخه تکثیر شامل 15 ثانیه در دمای 95 درجه سانتیگراد، 30 ثانیه در دمای 60 درجه سانتیگراد 30 ثانیه در دمای 72 درجه سانتیگراد که جمع آوری داده‌ها نیز در آن صورت می‌گرفت. اختصاصیت شرایط واکنش با استفاده از تجزیه و تحلیل منحنی ذوب از 65 تا 99 درجه سانتیگراد بررسی شد.

خط آستانه به منظور برآورد Ct ها از روی منحنی تکثیر نمونه‌ها با استفاده از تنظیمات اتوماتیک نرم افزار SDS version 2.0 (Applied Biosystems) رسم گردید. یک منحنی استاندارد با استفاده از رسم کردن مقادیر Ct های به دست آمده در مقابل لگاریتم طبیعی غلظت‌ها (تعداد نسخه‌ها در هر میکرولیتر) به دست آمد (23). به منظور محاسبه شیب نمودار، کارایی PCR (17) و ضریب تبیین (R^2) از همان مقادیر Ct محاسبه شده استفاده گردید.

نتایج و بحث

آغازگرهای اختصاصی گونه بوتیریویبریو فیبری سالونس با موفقیت به منظور تکثیر یک قطعه اختصاصی از ژنوم این باکتری استفاده شدند. این جفت آغازگر را می‌توان جهت تکثیر سویه‌های مختلفی از این گونه استفاده کرد از جمله: OB143، OB156، OB148، OB149، OB150، OB153، OB155، OB157، OB192، OB224 و OB189 (15). ساخت قطعه رقابتگر همولوگ با قطعه الگو با اضافه کردن 50 نوکلئوتید در وسط قطعه رقابتگر با استفاده از چند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (SOE-PCR) و استفاده از یک جفت آغازگر داخلی با موفقیت صورت پذیرفت (شکل 2 الف). صحت این پلاسمید نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت (شکل 2 ب و پ). لذا تکنیک SOE-PCR یک روش کارآمد برای دستکاری قطعات ژنومی در آزمایشگاه می‌باشد.

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در صحت و دقت PCR رقابتی، میزان شباهت قطعه رقابتگر و قطعه هدف است. در این مطالعه قطعه رقابتگر بیشترین همولوژی را با قطعه هدف داشت. لذا نتایج از صحت بالایی برخوردارند و به این لحاظ یکی از نقاط قوت تکنیک توسعه یافته می‌تواند به حساب آید. تا کنون از روش‌های متفاوتی برای ساخت قطعه رقابتگر مورد استفاده در PCR رقابتی استفاده شده است (4، 19) و کارایی آنها با هم مقایسه شده است (24، 25).

پس از تکثیر همزمان دو قطعه الگو و رقابتگر، تشخیص هر دو بر روی ژل آگارز قابل تشخیص بود. محدوده 10^{-1} تا 10^{-6} از رقت‌های ساخته شده از رقابتگر برای انجام واکنش QC-PCR انتخاب گردید.

واکنش دوم (PCR II)، مخلوطی از آغازگرهای IP-2 و RP و واکنش سوم (PCR III)، مخلوطی از آغازگرهای FP و RP استفاده شد با این تفاوت که در واکنش سوم از محصولات واکنش‌های PCR I و PCR II به عنوان DNA الگو استفاده شد. قطعه رقابتگر پس از تکثیر در واکنش انتهایی با استفاده از کیت استخراج از ژل (Fermentas) تخلیص و در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T همسانه سازی شد. به منظور تخلیص پلاسمید از کیت Plasmid Purification (Roche) استفاده گردید. به منظور تعیین کمیت و کیفیت پلاسمید نوترکیب استخراج شده به ترتیب از نانودراپ اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، و به منظور تأیید صحت آن از هضم آنزیمی *RsaI* و همچنین هضم آنزیمی همزمان *EcoRI* و *BamHI* استفاده گردید. پلاسمید تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

شدت باندهای الگو و رقابتگر با واحد اختیاری (Arbitrary units) به منظور کمی‌سازی محصولات حاصل از واکنش QPCR با استفاده از نرم‌افزار Image J مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌های حاصل از این تحلیل به صورت رابطه خطی بین log نسبت شدت باند رقابتگر با رقت‌های مورد استفاده به شدت باند الگو بوسیله نرم‌افزار Excel مورد بررسی قرار گرفت. در این رابطه میزان R^2 به عنوان شاخصی از راندمان مناسب PCR رقابتی در نظر گرفته شد.

بهینه‌سازی تکنیک Real-time PCR

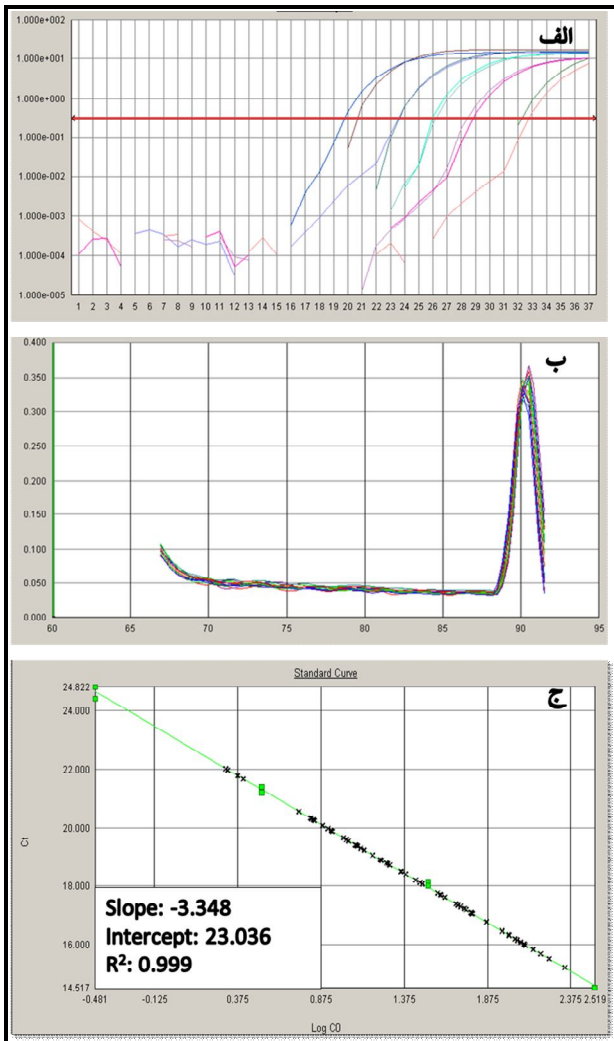
قطعه اختصاصی تکثیر شده از قسمت 16S rDNA باکتری بوتیریویبریو فیبری سالونس به منظور تولید استاندارد در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T همسانه سازی شد. خالص سازی و تعیین کمیت و کیفیت پلاسمید نوترکیب به ترتیب با استفاده از کیت Plasmid Purification (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، نانودراپ اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید و تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شد. تعداد نسخه‌های پلاسمید در هر میکرولیتر از پلاسمید استخراج شده با استفاده از فرمول ارایه شده توسط (12) محاسبه گردید:

$$\text{Number of copies}/\mu\text{l} = \frac{6.022 \times 10^{23} (\text{molecules/mole}) \times \text{DNA concentration (g}/\mu\text{l)}}{\text{Number of bases pairs} \times 660 \text{ daltons}}$$

که در این فرمول $10^{23} \times 6/022$ (تعداد مولکول در هر مول) عدد آووگادرو و 660 دالتون وزن متوسط یک جفت باز به تنهایی است. استاندارد ساخته شده به صورت سریالی رقیق سازی شد و با استفاده از کیت SYBR Green Master Mix (Fermentas) به منظور تکثیر در دستگاه ABI 7100 Real-Time PCR (Applied

است (3, 16).

در مطالعه حاضر، تکنیک Real-time PCR نیز به منظور کمی سازی جمعیت باکتری های گونه بوتیریویبریو فیبری سالونس در نمونه های زیستی بهینه سازی شد (شکل 3). تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نشان داد که واکنش دارای شرایط مناسب برای تکثیر اختصاصی ژن هدف را داراست. همچنین پارامترهای مربوط به منحنی استاندارد نیز با مقادیر پیشنهاد شده در دستورالعمل های برای رسم منحنی استاندارد مطابقت داشت.

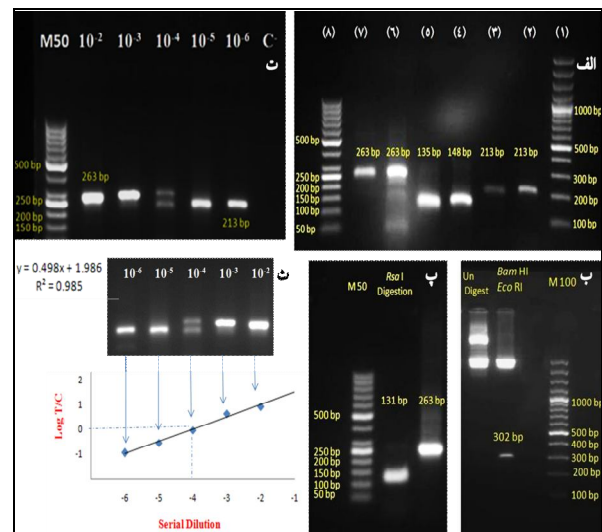


شکل 3- نتایج Real-time PCR (الف) منحنی های تکثیر از غلظت های سریالی استاندارد (ب) منحنی ذوب واکنش ها و (ج) نمودار استاندارد رسم شده توسط نرم افزار SDS و پارامترهای برآورد شده.

Figure 3- The results of Real-time PCR. A) The plots of different serial dilution as a standard. B) The plot of melting reactions C) Standard diagram and predicted parameters.

استاندارد استفاده شده در این مطالعه به صورت پلاسمید نو ترکیب

مشاهده محصولات تولید شده، بر روی ژل آگارز 1/5 درصد با استفاده از اشعه ماوراءبنفش نشان داد که در رقت های 10^{-2} و 10^{-3} قطعه رقابتگر و در رقت های 10^{-5} و 10^{-6} قطعه الگو بیشتر تکثیر می شوند و یا به عبارتی در رقابت با قطعه دیگر پیروز می شوند (شکل 2 ت). نتایج به دست آمده نشان داد رابطه خطی بالایی بین $\text{Log}(C/T)$: (رقابتگر، T: هدف) و رقت های ساخته شده از رقابتگر وجود دارد ($R^2 = 0.985$) و لذا می توان از این روش به منظور مقایسه جمعیت باکتری بوتیریویبریو فیبری سالونس در نمونه های مختلف زیستی استفاده نمود.



شکل 2- الف) نتایج SOE-PCR. چاهک شماره 2 و 3، قطعه 213 جفت بازی تکثیر شده از منطقه 16S rDNA باکتری بوتیریویبریو فیبری سالونس، چاهک های شماره 4، 5 و 6 به ترتیب محصولات PCRI، PCRII و PCRIII. چاهک 7 قطعه رقابتگر استخراج شده از ژل. چاهک های 1 و 8 مارکرهای DNA. ب و پ) تأیید صحت قطعه رقابتگر و پلاسمید نو ترکیب حاوی آن. ت و ث) نتایج PCR رقابتی و پلات لگاریتمی شدت نوری باند های مربوط به هدف (T) از نمونه استخراج شده از مایع شکمبه و رقابتگر (C) در مقابل غلظت های سریالی از رقابتگر

Figure 2- The result of SOE-PCR. Lane 2 and 3: 213 bp fragment which amplified from *Butyrivibrio fibrisolvens* bacteria 16S rDNA region. Lane 4, 5 and 6 PCR products of PCRI, PCRII and PCRIII, respectively. Lane 7: the competitor fragment which extracted from gel. Lane 1 and 8 DNA marker. Confirmation of competitor fragment and recombinant plasmid. The results of QC-PCR and the logarithmic plot of band intensities regard to target (T) and competitor against serial dilution of competitor

مطالعات دیگری نیز توسعه تکنیک PCR رقابتی را به منظور سنجش کمیت سوپه های مختلف باکتری بوتیریویبریو را گزارش کرده اند (15, 19) و تغییرات جمعیتی باکتری بوتیریویبریو فیبری سالونس تا کنون در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته

مراحل آزمایشگاهی سنگین تری برخوردار است و همچنین نیاز به بهینه سازی های متفاوتی در هر یک از مراحل ساخت رقابتگر و همچنین پس از PCR دارد. در مقابل تکنیک Real-time PCR از مراحل آزمایشگاهی به نسبت ساده تر و سریع تری بهره مند است. در این مطالعه مقایسه بین دقت دو روش صورت نگرفت، با این حال هر دو روش در صورت انجام صحیح مراحل از دقت بالایی برخوردارند.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه دو روش کمیت سنجی اسیدهای نوکلئیک در نمونه های زیستی به منظور شمارش باکتری های جنس بوتیریویبریو فیبری سالونس بهینه سازی شدند. از هر دو روش می توان به عنوان ابزاری مناسب در تحقیقات مرتبط با فلور میکروبی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و یا انسان استفاده نمود.

حامل DNA هدف بود که مشخص شده است این نوع از استاندارد بهترین نوع استاندارد برای استفاده در این تکنیک است (7). از استانداردهای دیگری مانند محصولات PCR تخلیص شده و یا پلاسمید خطی نیز می توان به این منظور استفاده نمود اما باید در نظر داشت که این استانداردها نسبت به پلاسمید حلقوی از عدم پایداری قابل ملاحظه ای برخوردارند.

از تکنیک Real-time PCR نیز به منظور شمارش میکروارگانیسم های موجود در فلور شکمبه و به خصوص جنس بوتیریویبریو استفاده شده است (2). در این مطالعه از این تکنیک به منظور شمارش تعداد باکتری های بوتیریویبریو فیبری سالونس در هر میلی لیتر از مایع شکمبه استفاده گردید، با این حال امکان استفاده از این تکنیک به صورت نسبی نیز وجود دارد که در این صورت جمعیت باکتری های مورد نظر به صورتی نسبتی از کل باکتری های موجود بیان می شوند (14).

تکنیک PCR رقابتی در قیاس با تکنیک Real-time PCR از

منابع

- 1- Asanuma, N., M. Kawato., and T. Hino. 2001. Presence of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the digestive tract of dogs and cats, and its contribution to butyrate production. *The Journal of general and applied microbiology*, 47(6): 313-319.
- 2- Balamurugan, R., S. P. Chittaranjan., A. M. Chandragunasekaran., and B. S. Ramakrishna. 2009. Molecular detection of the ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*, in feces from rural residents of southern India. *Microbial ecology in health and disease*, 21(1): 38-43.
- 3- Boeckert, C., B. Vlaeminck., V. Fievez., L. Maignien., J. Dijkstra., and N. Boon. 2008. Accumulation of trans C18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Applied and environmental microbiology*, 74(22): 6923-6930.
- 4- Celi, F. S., M. E. Zenilman., and A. R. Shuldiner. 1993. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Research*, 21(4): 1047.
- 5- Cheng, K. J., and J. W. Costerton. 1977. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a gram-positive bacterium. *Journal of Bacteriology*, 129(3): 1506-1512.
- 6- Deutsch, S., U. Choudhury., G. Merla., C. Howald., A. Sylvan., and S. E. Antonarakis. 2004. Detection of aneuploidies by paralogous sequence quantification. *Journal of Medical Genetics*, 41(12): 908-915.
- 7- Dhanasekaran, S., T. M. Doherty., and J. Kenneth. 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of immunological methods*, 354(1): 34-39.
- 8- Diviacco, S., P. Norio., L. Zentilin., S. Menzo., M. Clementi., G. Biamonti., S. Riva., A. Falaschi., and M. Giacca. 1992. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene*, 122(2): 313-320.
- 9- Forster, R. J., J. Gong., and R. M. Teather. 1997. Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 63(4): 1256-1260.
- 10- Fukuda, S., Y. Suzuki., M. Murai., N. Asanuma., and T. Hino. 2006. Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4): 787-794.
- 11- Gilliland, G., S. Perrin., K. Blanchard., and H. F. Bunn. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7):2725-2729.
- 12- Godornes, C., B. T. Leader., B. J. Molini., A. Centurion-Lara., and S. A. Lukehart. 2007. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine*, 38(1): 1-7.
- 13- Kato, K., R. Yamashita., R. Matoba., M. Monden., S. Noguchi., T. Takagi., and K. Nakai. 2005. Cancer gene expression database (CGED): a database for gene expression profiling with accompanying clinical information of human cancer tissues. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue): D533-536.

- 14- Kim, M., and Z. Yu. 2012. Quantitative comparisons of select cultured and uncultured microbial populations in the rumen of cattle fed different diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1): 28.
- 15- Kobayashi, Y., R. J. Forster., and R. M. Teather. 2000. Development of a competitive polymerase chain reaction assay for the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156 and its use for tracking an OB156-derived recombinant. *FEMS Microbiology Letters*, 188(2): 185-190.
- 16- Koike, S., J. Pan., Y. Kobayashi., and K. Tanaka. 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science*, 86(4): 1429-1435.
- 17- Lee, C., J. Kim., S. G. Shin., and S. Hwang. 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 123(3): 273-280.
- 18- Lusic, M., A. Marcello., A. Cereseto., and M. Giacca. 2003. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO Journal*, 22(24): 6550-6561.
- 19- Mrazek, J., and J. Kopečný. 2001. Development of competitive PCR for detection of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. *Folia Microbiologica, (Praha)*. 46(1): 63-65.
- 20- Ohkawara, S., H. Furuya., K. Nagashima., N. Asanuma., and T. Hino. 2005. Oral administration of *butyrivibrio fibrisolvens*, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *Journal of Nutrition*, 135(12): 2878-2883.
- 21- Rychlik, J. L., and J. B. Russell. 2002. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1040-1046.
- 22- Sekhavati, M. H., M. D. Mesgaran., M. R. Nassiri., T. Mohammadabadi., F. Rezaii., and A. Fani Maleki. 2009. Development and use of quantitative competitive PCR assays for relative quantifying rumen anaerobic fungal populations in both in vitro and in vivo systems. *Mycological Research*, 113(Pt 10): 1146-1153.
- 23- Yu, Y., C. Lee., J. Kim., and S. Hwang. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6): 670-679.
- 24- Zentilin, L. and M. Giacca. 2007. Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. *Nature Protocols*, 2(9): 2092-2104.
- 25- Zimmermann, K. and J. W. Mannhalter. 1996. Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques*, 21(2): 268-279.