

变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化

朱伟云 姚文 毛胜勇

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要 利用 PCR 和 DGGE 技术分析了 12 头仔猪在断奶后其粪样细菌区系的变化。粪样细菌 16S rDNA 的 V6~V8 可变区经 PCR 扩增,扩增产物经 DGGE 电泳后再进行相似性分析。结果表明,仔猪断奶当天粪样 DGGE 谱带少,同窝仔猪间图谱相似。断奶后,随着断奶时间的推移,每头仔猪的 DGGE 图谱带逐渐增多,变得复杂和多样,仔猪个体间 DGGE 图谱差异逐渐增大。仔猪是否同窝以及所采食日粮类型对 DGGE 图谱没有明显影响。相似性分析还表明,日粮中添加寡果糖的仔猪在断奶后第 1 周,其粪样微生物区系变化迅速,而后缓慢。

关键词 变性梯度凝胶电泳 断奶仔猪 粪样细菌

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)04-0503-06

仔猪肠道微生物区系随宿主日龄增加逐渐变得复杂多样,且形成一个相对动态平衡、稳定的微生态系统,对宿主的生长和健康起着重要作用。但报道认为,自然界中很多微生物不能用现有的培养方法进行分离和鉴定或是不能培养^[1,2],而且仔猪胃肠道中大部分微生物的生长需要厌氧环境,因此人们对仔猪肠道及粪样微生物及其变化规律的了解甚少。

近年来,基于 16S rRNA 的分子生物学技术促进了微生态研究的发展,特别是被称为 DNA 指纹技术的变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)能有效分析复杂微生物群落及其多样性且无须培养微生物,而越来越受到重视。DGGE 基本原理是长度相同而碱基组成不同的 DNA 序列在不同变性条件(如尿素浓度)下变性,在变性梯度凝胶上特定位置形成泳带。该技术自从 1993 年被 Muyzer 等首次用于分析土壤环境的微生物区系以来^[3],已迅速用于其它环境微生态和人肠道微生态的研究^[4]。

Simpson 等^[5]分析了 DGGE 技术在研究猪肠道微生物区系方面的应用条件,并比较了断奶前仔猪、断奶后仔猪与肥育猪等不同个体的肠道和粪样细菌群体组成结构,但是该研究忽视了这些猪之间本身存在的个体差异的影响。Simpson 等^[6]利用 PCR/DGGE 技术分析了断奶仔猪饲喂外源乳酸菌后第 15 天粪样细菌群体,并对其中一头仔猪的粪样进行了 PCR/DGGE 跟踪研究。本研究采用 PCR/DGGE 技术跟踪研究 12 头仔猪断奶后两星期其粪样中细菌区系的动态变化规律,同时在实验设计上采用了来自同窝仔猪饲喂同种饲料,不同窝仔猪不同饲料的办法,以分析探讨仔猪个体对其粪样细菌群体变化的影响。

基金项目 国家杰出青年科学基金(30025034)

作者简介 朱伟云(1962-)女,江苏吴江人,博士,教授,主要从事消化道微生物研究。Tel:86-25-4395380;Fax:86-25-4395314;E-mail:zhuweiyun@hotmail.com

收稿日期 2002-11-11,修回日期 2002-12-11

1 材料和方法

1.1 试验设计与粪样的收集、处理

来自 A、B、C 3 窝的 12 头仔猪(3 × 4)在 21d 断奶后,分别饲喂下述 3 类日粮:a)基本日粮;b)基本日粮 + 果寡糖/甜菜汁;c)基本日粮 + 甜菜汁。在断奶第 1、6、7 和 13 天从仔猪肛门处采集粪样,其中断奶当天(断奶第 1 天)的粪样是在饲喂日粮前采集的。样品中添加甘油于 -20℃ 下冻存。在 DNA 提取前,解冻样品,移去液相取约 3g 湿重的粪样,移入 50mL 冰冻的磷酸钾缓冲液中(pH7.0)混匀,取 1mL 液体立即用于 DNA 的提取。

1.2 DNA 提取与 PCR 反应

参照 Zoetendal 等^[7]方法,先用珠磨法机械破碎粪样,后用酚和氯仿/异戊酯提取粪样总 DNA,随后对细菌的 16S rDNA 的 V6 ~ V8 区片段进行 PCR 反应。PCR 引物为带有 GC 夹子的 U968-GC 和 L140^[8],其中 GC 夹子为 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG CCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC。

1.3 DGGE 与计算机分析

参照 Muyzer 等^[3]方法,对细菌 16S rDNA 的 V6 ~ V8 可变区的扩增产物进行 DGGE 分析。DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含丙酰胺、二丙酰胺、尿素、甲酰胺和甘油),其中尿素浓度梯度为 38% ~ 48%,并用凝胶结合板垫着凝胶。电泳采用 D code DGGE 系统(Bio-Rad),电泳缓冲液为 40mmol/L 的 Tris-乙醇(pH8.0),首先在 200V 电压下预电泳 5 ~ 10min,随后在 85 V 的固定电压下电泳 16h。电泳结束后,进行硝酸银染色^[9],凝胶显色定影后用透明玻璃纸封好,在 60℃ 干燥过夜。DGGE 凝胶采用分子分析家软件包(Molecular Analyst, BioRad)进行相似性分析,不同时间段相似值间进行 Student T 检验。

2 结果和分析

2.1 母猪对仔猪粪样细菌群体的影响

图 1 是仔猪断奶当天在饲喂日粮前的粪样细菌 DGGE 图谱,图谱上的泳带反映了粪样中的优势菌群,泳带数量和位置的复杂性说明了菌群的多样性。同窝仔猪其 DGGE 图谱具有很多相同泳带,且泳带数量相近。来自不同窝的仔猪,其 DGGE 图谱也有共同泳带,但大多数泳带的位置不同及图谱总带数

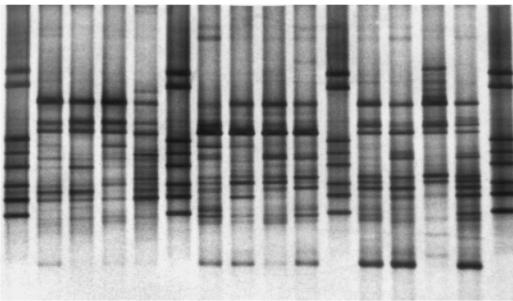


图 1 仔猪断奶时粪样细菌 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE from faecal bacteria on day 1 of weaning

Litter A : Piglets 1, 2, 3, 4 ;Litter B : Piglets 5, 6, 7, 8 ;Litter C : Piglets 9, 10, 11, 12 ; m : marker. The same as follows.

有明显的差异。DGGE 图谱经相似性分析后发现这 12 头仔猪的 DGGE 图谱属于明显的 3 组(图 2-a)。除样本 4 和 9 外,同窝仔猪的粪样 DGGE 谱则可归为一组,带谱间相似性大于 70%,不同窝仔猪的 DGGE 分属不同组,各组间相似性低于 60%。这些结果表明,当仔猪哺乳时,同窝仔猪之间具有相似的优势细菌群。对于不同窝仔猪,虽然有些细菌为所有仔猪共有,但是细菌菌群差异较大,这说明母猪对其哺乳仔猪体内的优势菌群有一定的影响。

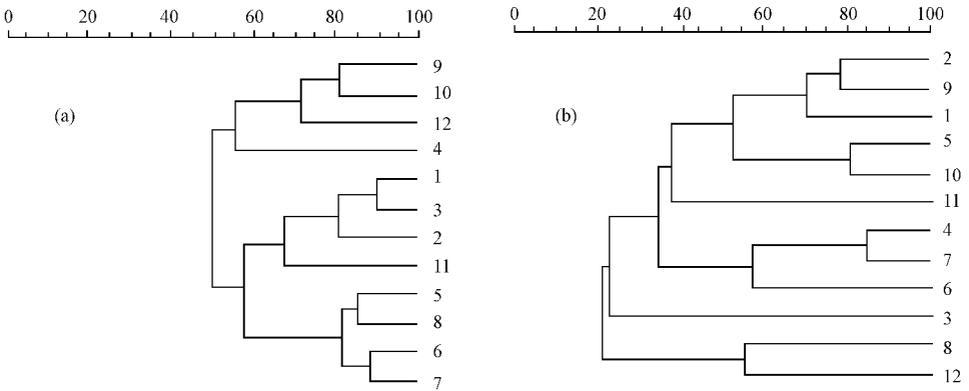


图2 仔猪粪样 DGGE 图谱的相似性分析

Fig.2 Similarities between DGGE profiles of faecal samples

2.2 断奶 13 d 时仔猪粪样细菌群体

与断奶当天相比,断奶第 13 天后,仔猪粪样 DGGE 带谱上泳带数量明显增多,带谱更为复杂,如 18 号仔猪,断奶当天可见 16 条带,断奶后 13d 可见 29 条带(图 3)。虽然 12 头仔猪的粪样中存在一些共同泳带,但是个体间大多数优势带在位置、灰度及数量上差异明显,即使来自同一母猪的仔猪个体间也存在明显差异。虽然本研究采用同窝仔猪日粮相同、不同窝不同日粮的设计,但是相似性分析表明(图 2-b),在断奶第 1 天时所见(图 1)的 DGGE 带谱分组在断奶 13d 时(图 3)已消失,仔猪窝之间没有明显的差异。个体间相似性很低,例如,编号为 5、6、7、8 的同窝仔猪在断奶第 1 天其相似性在 80% 以上,但在断奶 13d 时相似性仅为 20%~35%。这些结果表明,断奶 13d 后仔猪体内已形成各自特征性的菌群,母体来源和日粮对其粪样细菌群体组成没有明显的影响。

2.3 仔猪断奶后粪样细菌群体的变化规律

本研究通过对仔猪断奶后不同时期粪样 DGGE 分析,来监测仔猪断奶后细菌群体变化过程。如 B 窝仔猪在图 4 显示,同窝仔猪在断奶不同时间的粪样在同一 DGGE 凝胶上进行图谱分析都表明,仔猪在断奶当天的一些优势泳带在断奶第 6 天时消失,很多泳带在第 13 天时消失,另一方面,新的泳带在第 6、7 或 13 天陆续出现。从总体看,随时间延长,带的数量逐渐增多。相似性分析表明,在断奶后 13d 内,DGGE 图谱变化迅速,在断奶第 6~7 天样本 DGGE 间的相似值最高,这与预料的相同。A 窝与 C 窝仔猪的粪样 DGGE 图谱在仔猪断奶第 1 周和在第 2 周的变化相似值上无显著的统计差异,表明其细菌群体变化速度较稳定。但是对编号为 5、6、7 及 8 的 B 窝仔猪(图 5),在断奶当天仔猪粪样 DGGE 图谱相似,与其它时间粪样的相似值低于 20%,*t* 检验分析表明它们与其它组之间存在显著

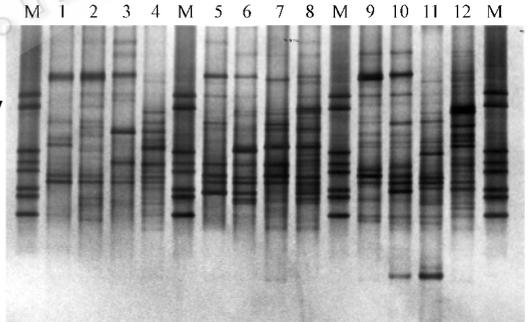


图3 仔猪断奶 13d 时粪样 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE from faecal bacteria on day 13 of weaning

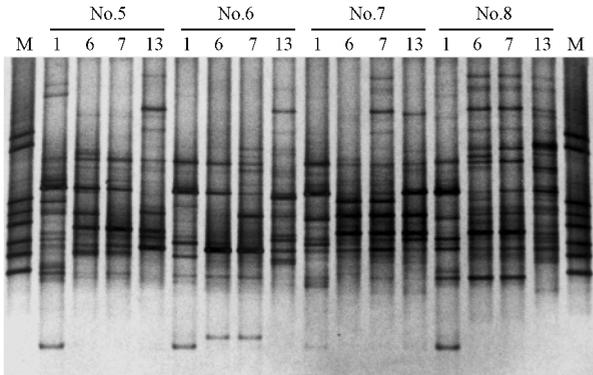


图4 4头仔猪在断奶第1、6、7、13天时粪样DGGE

Fig.4 DGGE profiles of faecal samples collected on day 1, 6, 7, 13 of weaning

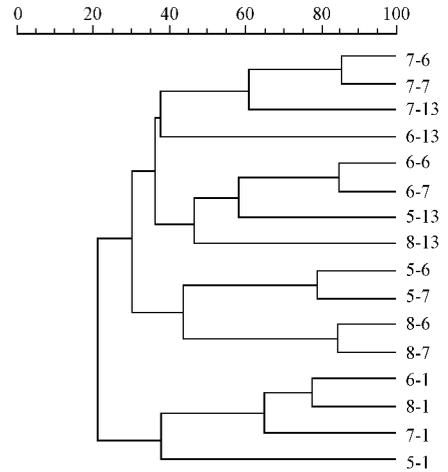


图5 仔猪断奶第1、6、7、13天时粪样DGGE相似性

Fig.5 DGGE profile similarities of faecal samples collected on day 1, 6, 7, 13 of weaning

差异,虽然从第1~6天的时间比第6~13天的短,但是前两者的相似值比后两者间的显著要低。这些结果说明,B窝仔猪断奶后细菌群体在断奶第1周内急剧变化,而后缓慢,这可能与其日粮中寡果糖有关。

3 讨论

PCR/DGGE方法最大优点是无需平板培养分离,是近年来用于多种生态环境微生物区系研究的最主要的分子生物学手段之一。Simpson等和Zhu等率先把PCR/DGGE技术应用于猪肠道各部位和断奶仔猪粪样细菌群体的分析^[5,10]。本文采用该技术首次研究了仔猪断奶后粪样细菌群体的变化规律,并结合相似性分析比较仔猪个体间细菌群体多样性。研究结果说明,PCR/DGGE在研究仔猪粪样微生物区系变化规律上是一种非常有效的技术。

本研究对12头仔猪从断奶第1天开始间隔采集粪样,跟踪分析粪样中细菌群体变化。研究结果显示,所试的仔猪在断奶后其粪样中细菌群体均迅速变得复杂多样,而且相似性分析也证实断奶当天和断奶后13d时粪样细菌群体发生很大变化。这与Simpson等^[6]的结果不一致,其很可能的原因是在该研究中,粪样是在试验仔猪在断奶7d后(即28日龄)开始采集并进行分析的。虽然肠道及粪样中微生物区系因仔猪断奶可发生剧烈变化,但是经过7d的对饲料的适应可逐渐稳定下来。另外,该研究关于这一结果只是根据对一头仔猪粪样的跟踪分析,因此该结果的代表性差。本研究结果还表明,每头仔猪,即使是来自同窝的也具有各自独特的粪样细菌群体。这一结果与Simpson等^[6]关于猪以及Zoetendal等^[7]关于人粪样的PCR/TCGE研究报道相似,都说明宿主动物本身的影响。

近年来,寡果糖被普遍认为是一种可能通过调控仔猪肠道内微生物区系而起到促进动物生长与保健作用的化学益生菌,但其作用尚未清楚。本研究初步显示的B组仔猪在

断奶后其粪样细菌群体迅速发展而后相对缓慢的现象,可能与日粮中添加的寡果糖的作用有关。由此可初步推测,促进仔猪肠道内微生物区系的迅速发展和建立可能是寡果糖起益生作用的一个途径。但是,关于寡果糖作用机理的进一步研究需要大量的试验进行探讨,本研究小组正在该方面进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Ward D M , Weller R , Bateson M M . 16S rRNA reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* , 1990 , **345** :63 ~ 65 .
- [2] Amann R I , Ludwig W , Schleifer K H . Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Appl Environ Microbiol* , 1995 , **59** :143 ~ 169 .
- [3] Muyzer G , de Waal E C , Uitterlinden A G . Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** :695 ~ 700 .
- [4] Muyzer G , Smalla K . Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* , 1998 , **73** :127 ~ 141 .
- [5] Simpson J M , McCracken V J , White B A , et al . Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Meth* , 1999 , **36** :167 ~ 179 .
- [6] Simpson J M , McCracken V J , Gaskins H R , et al . Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** :4705 ~ 4714 .
- [7] Zoetendal E G , Akkermans A D L , de Vos W M . Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** :3854 ~ 3859 .
- [8] Nübel U , Engelen B , Felske A , et al . Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* , 1996 , **178** :5636 ~ 5643 .
- [9] Sanguinetti C J , Dias Neto D , Simpson A J G . Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* , 1994 , **17** :915 ~ 919 .
- [10] Zhu W Y , Williams B A , Akkermans A . Development of the microbial community in weaning piglets. *Reprod Nutri Develop* , 2000 , **40** :180 .

Development of Bacterial Community in Faeces of Weaning Piglets as Revealed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Zhu Weiyun* Yao Wen Mao Shengyong

(College of Animal Science and Technology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used to monitor the development of bacterial community in faeces of 12 weaning piglets. The regions V6 to V8 of the 16S rDNA of faecal bacteria were amplified. DGGE profiles of the PCR amplicons were compared by similarity analysis. Results revealed simple DGGE profiles for faecal samples from piglets on the first day of weaning and piglets from the same sow showed similar DGGE profiles. After weaning as the piglets grew DGGE profiles became complicated and diverse. Each individual piglet had its unique DGGE profile , with low similarity between piglets. The source of sow and the diet showed no ana-

rent effect on the DGGE profiles. For the piglets fed a diet containing oligofructose, DGGE similarity analysis showed bacterial community in the faeces developed fast during the first week and relatively slow later after weaning.

Key words: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Weaning piglets, Faecal bacterial community

Foundation item: Chinese National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30025034)

* Corresponding author. Tel 86-25-4395380, Fax 86-25-4395314, E-mail zhuweiyun@jau@hotmail.com

Received date: 11-11-2002

《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围: 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高新技术创新等领域的研究成果, 包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等, 本刊均欢迎投稿。

2. 应首次发表: 所有来稿均应在未公开发表的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。

3. 介绍信: 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误, 请出示第一署名单位的介绍信。若是与国外作者合写的论文, 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。

4. 作者联系方式: 请在投稿时提供通讯作者或第一作者的 Tel、Fax 和 E-mail 地址。

5. 审稿费: 投稿时请随寄 100 元审稿费, 可通过邮局汇款(务请在汇款单上注明汇款单位和稿件第一作者, 我们将开具正式发票)。

6. 投稿及汇款地址: 100080 北京中关村 中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部

欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址: [Http://www.im.ac.cn/journals](http://www.im.ac.cn/journals)

《微生物学报》综述文章投稿说明

近一时期, 我刊一些综述类来稿存在一些问题, 主要表现为: 篇幅庞大, 罗列文献, 内容空泛, 缺乏观点。为使此栏目更加新颖并更具可读性, 特提出几点说明, 欢迎大家根据要求, 踊跃投稿, 并提出你们对该栏目的建议和想法。

1. 本刊主要刊登微型综述 (Mini review), 来稿字数最好控制在 5000 字以内 (不包括参考文献)。

2. 综述的选题要有新意, 对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。

3. 参考文献应控制在 40 篇以内, 近 3 年发表的文献不少于 10 篇。

4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展, 不要泛泛罗列文献, 只述不评。

5. 应结合自己的研究工作, 就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。

6. 欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。