

16S rDNA 技术研究新生腹泻仔猪粪样细菌区系的多样性变化

姚 文,朱伟云*,毛胜勇

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要:用 PCR/DGGE 技术跟踪一窝 5 头新生腹泻仔猪自然康复、补饲、断奶过程中粪样细菌区系的演变,构建 3 头仔猪 42 日龄粪样的 16S rDNA 克隆库,分析匹配于 DGGE 优势谱带 23 个克隆的 16S rDNA 序列。结果表明,DGGE 图谱由简单(2 日龄)到复杂(10 日龄),再回复简单(16 日龄)到复杂(断奶),最后趋于稳定。2、16 日龄 DGGE 图谱最简单、相似,最优势谱带为大肠杆菌;10 日龄补饲后 3 天图谱复杂,大肠杆菌存在但不是最优势谱带,补饲前后图谱的相似性低,补饲导致了粪样细菌区系结构的显著变化;断奶前(27 日龄)和后(35、42 日龄)图谱复杂,优势谱带、图谱相似性均趋向稳定。序列分析表明,23 个克隆中除 5 个与未知细菌最相似外,其余最相似菌分属于肠球菌(*Enterococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)、梭菌(*Clostridium*)、消化链球菌(*Peptostreptococcus*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)。

关键词:变性梯度凝胶电泳;16S rDNA 系列分析;多样性指数;仔猪;粪样细菌区系

中图分类号:Q938,S828 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)01-0150-04

仔猪肠道微生物区系随宿主日龄增加、日粮变更逐渐变化,一个相对稳定、动态平衡的微生态系统,对宿主的生长和健康意义重大。由于尚无适合所有肠道细菌生长的选择性培养基,传统培养技术难于反映肠道微生物区系的全貌。迄今已知的动物肠道微生物不到五分之一,对仔猪肠道微生物区系组成和变化的了解更加薄弱。

变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)因能有效分析复杂微生物群落及其多样性,而广泛用于研究哺乳动物肠道微生物区系^[1-3]。文献^[4-6]报道利用 PCR/DGGE 技术研究了仔猪断奶前后粪样细菌区系变化以及饲料成分的影响,发现断奶后第一周仔猪粪细菌区系变化迅速,可发酵碳水化合物(FOS)和甜菜渣可选择性地促进特定细菌的生长,加速断奶后仔猪粪细菌区系的稳定。

我国目前仔猪管理中多采用 7 日龄补饲开食料,21 或 28 日龄断奶的饲喂模式。这种早期补饲、早期断奶的模式可大大提高母猪的利用效率,但也导致很多养殖场仔猪腹泻率居高不下,生长停滞,甚至死亡,造成很大的经济损失。相对于不补饲的仔猪腹泻多发生于断奶后 3~10d,补饲的仔猪在补饲后一周左右腹泻发生率很高。本研究旨在利用 PCR/DGGE 结合 16S rDNA 序列分析技术,探讨补饲开食料对仔猪粪样菌群变化及其对仔猪腹泻的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、动物管理模式和样品收集 选取南京某猪

场一窝大米杂交仔猪中的 5 头,初生 1 日龄时表现腹泻,常规管理,7 日龄起补饲开食料(猪场常用的商品仔猪料),28 日龄断奶。分别于出生后 2、10、16、27、35、42 日龄,收集粪样待测。

1.1.2 主要试剂和仪器:FastDNA SPIN Kit(Q-BIO gene);Taq 酶;pGEM-T 载体(Promega);引物合成(Invitrogen);Qiaquick PCR 产物纯化试剂盒(Westburg, the Netherlands);序列分析试剂盒(Amersham,UK);PCR 仪(Biometra, UK);DCode 系统、GS-800 校正型光密度仪和 Molecular Analyst 1.12(Bio-Rad);LICOR DNA sequencer 4000(LiCor,USA)。

1.2 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

总 DNA 提取采用 FastDNA SPIN Kit 试剂盒。一对细菌通用引物 U0968f-GC 和 L1401r^[7]用于引导 16S rDNA 第 6 至第 8 可变区的 PCR 扩增反应^[8]。

1.3 DGGE 和 DGGE 凝胶的分析

参照 Muyzer 等^[7]的方法。变性物:甲酰胺和尿素,梯度:30%~60%,电泳条件 0.5xTAE 中,60°C,85V 电泳 16h 以上。应用 Molecular Analyst 对凝胶进行相似性分析^[8]和多样性指数分析(Shannon Index)^[9]。

1.4 16S rDNA 全序列的克隆和序列分析

引物 8f 和 1510r 用于扩增仔猪粪样细菌 16S rDNA 全序列^[10]。扩增产物纯化后,插入 pGEM-T 载体并转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109。以 T7 和 SP6^[2]为引物进行 PCR 反应以检测插入子的大小。插入子正确(约 1.6kb)的克隆与原样品在 DGGE 胶上进行比较,寻找匹配的条带。与原样品有匹配条带的克隆的质粒纯化后用 T7 序列分析试剂盒进行测

基金项目:国家杰出青年科学基金(30025034);国家 973 项目(2004CB117500-4)

* 通讯作者。Tel 86-25-84395523;Fax 86-25-84395314;E-mail:ZHUWEIYUNNJAU@hotmail.com

作者简介:姚文(1967-),女,江苏常熟人,副教授,在职博士研究生,主要从事动物营养学和动物消化道微生物学的研究。E-mail:yaowen67jp@yahoo.com

收稿日期:2005-06-02;接受日期:2005-06-23;修回日期:2005-08-02

序 PCR 反应、电泳和自动测序并在此基础上进行人工校正。序列的同源性通过互联网与 GenBank 进行比较。

1.5 核苷酸序列的基因库登录号 (Accession number)

本实验所测仔猪粪样细菌的 16S rDNA 半序列均已被 GenBank 收录,图 4 中 1 号仔猪优势带克隆登录号分别为: XSHA39(AY601712), XSHA12(AY601713), XSHA24(AY601714), XSHA8(AY601715), XSHA11(AY601716), XSHA15(AY601717), XSHA34(AY601718), XSHA35(AY601719), XSHA5(AY601720)。

2 结果和分析

2.1 仔猪粪样细菌组成随日龄增加和饲喂制度改变而变化的趋势

5 头新生腹泻仔猪均来自同一窝, 体况、摄食行为等均正

常。二日龄取样时仔猪黄色软粪可从肛门挤入无菌离心管; 10 日龄时肛门周围无黄色粪便残渣, 必须用无菌棉签插入肛门沾取粪样; 16 日龄时 2 号、5 号仔猪粪样黄软; 27、35、42 日龄时粪样正常。5 头仔猪粪样的 DGGE 图谱(图 1), 共同表现出了由简单到复杂, 再回复简单到复杂, 最后趋于稳定的变化趋势。二日龄 5 头仔猪的优势谱带一致, 由该谱带产生的克隆在 DGGE 凝胶上与构建克隆的载体菌 *E. coli* JM109 位置相同(结果没有在此显示)因而可认为是大肠杆菌。10 日龄(饲喂开食料后的第 3 天)区系由超过 10 条清晰可辨的谱带组成, 大肠杆菌依然存在但不是主要优势菌。16 日龄(饲喂开食料后的第 9 天)图谱再次简单化, 大肠杆菌再次成为主要优势菌。断奶后(35、42 日龄)图谱中的优势谱带趋向稳定, 与断奶前(27 日龄)优势谱带比较有一定的差异。

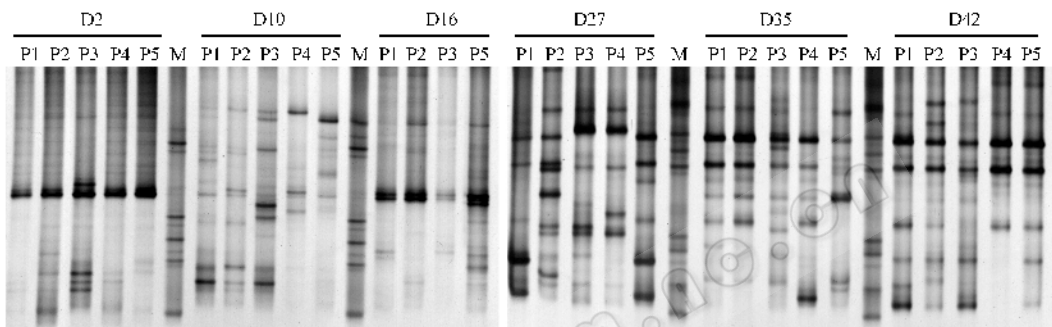


图 1 仔猪粪细菌 16S rDNA 的 V6-V8 区扩增产物的 DGGE 图谱

Fig.1 Bacterial DGGE profiles generated from V6-V8 16S rDNA fragments of piglets fecal samples

Dx: The age of piglet; Px: The number of piglet; M: Marker.

图 2 为不同日龄仔猪粪样 DGGE 图谱的相似性。2 日龄和 16 日龄的 DGGE 图谱最为相似, 相似性为 71.9%。10 日龄与 2 日龄和 16 日龄的 DGGE 图谱差异很大, 相似性仅为 24.7% 和 18.5%; 10 日龄与 27、35、42 日龄的 DGGE 图谱间相似性却相对较高, 分别为 29.94%、31.64% 和 44.3%。27 日龄(断奶前)与 35、42 日龄图谱相似性也较低, 分别为 26.28% 和 39.2%, 但高于开食前后图谱的相似性。35 和 42 日龄

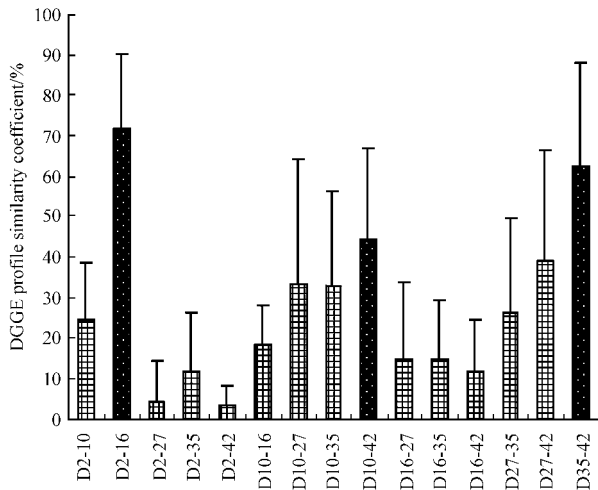


图 2 不同日龄间仔猪粪样 DGGE 图谱的相似性分析

Fig.2 Similarity coefficient for fecal bacterial DGGE profiles of piglets at different age. Dx: the age of piglet.

DGGE 图谱的相似性很高, 为 62.34%。

2.2 细菌区系组成多样性的分析

相似性分析仅着眼于比较两个区系形成的 DGGE 图谱中共有的谱带数目(细菌种类), 多样性分析既比较区系中的细菌种类(DGGE 谱带数目), 又兼顾各种细菌的数量(DGGE 谱带密度), 因而能更全面地反映细菌区系的全貌。如图 3 所示, 2 日龄区系的多样性为 1.38 ± 0.55 , 相对简单; 10 日龄时, 多样性指数增至 2.12 ± 0.24 ; 16 日龄时, 多样性指数又迅速降至 1.97 ± 0.26 , 说明开食料的添加对哺乳仔猪而言是很大的应激, 极易使本不稳定的微生物区系失去平衡, 随后多样性指数又回升至 27 日龄的 2.19 ± 0.29 , 35 日龄的 2.20 ± 0.17 和 42 日龄的 2.14 ± 0.20 , 相对比较稳定, 没有出现大的波动, 仔猪也未表现断奶腹泻症状。

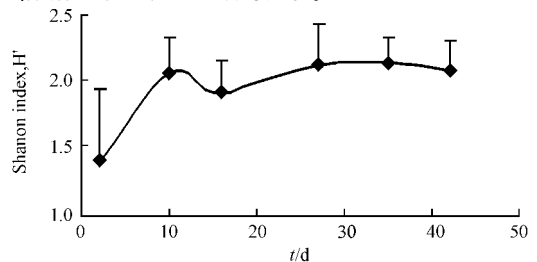


图 3 仔猪粪细菌区系多样性的 Shannon-Weaver 指数分析

Fig.3 Diversity indices of piglet fecal bacterial community

2.3 DGGE 图谱中优势条带的分子鉴定

为鉴定仔猪粪样细菌区系的组成,构建了 1、2、5 号仔猪 42 日龄粪便样品的 16S rDNA 克隆库,并对 23 个与原始样品在 DGGE 图谱上有匹配带的克隆进行了 16S rDNA 全序列分析,所获序列与现有的基因库进行了比较。除 5 个克隆的最相似菌为未培养细菌外,其余克隆的最相似菌分属于肠球菌 (*Enterococcus*)、链球菌 (*Streptococcus*)、梭菌 (*Clostridium*)、消化链球菌 (*Peptostreptococcus*) 和乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 5 个属。

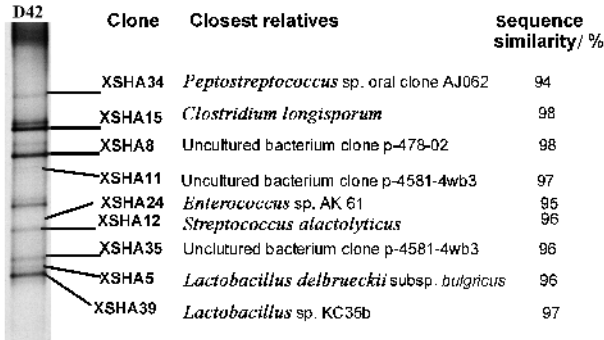


图 4 1 号仔猪粪细菌 16S rDNA 序列的最相似菌与同源 16S rDNA 的 V6-V8 的对应关系

Fig.4 Identification of dominant bands in DGGE pattern of the V6 to V8 regions of fecal samples from piglet 1

3 讨论

胎猪胃肠道无菌,随着出生时母体阴道和出生后环境微生物的入侵,胃肠道微生物区系逐步建立,往往首先检测到的是大肠杆菌和链球菌^[12],有些仔猪因而表现为新生腹泻(黄痢或白痢),一般随着仔猪的哺乳会自动恢复,并在仔猪肠道中建立起以乳酸菌为优势菌的微生物区系,这种微生物区系在哺乳期间相对稳定^[13]。但是环境因素、日粮变更、运输等因素均能诱发其变化,导致肠道中乳酸杆菌数目下降和 Coliforms 数目上升^[14]。由于传统微生物培养方法不能培养所有的胃肠道厌氧细菌,对其变化的描述多局限于乳酸杆菌和 Coliforms。

本研究利用 PCR/DGGE 技术跟踪研究了 5 头新生腹泻仔猪从新生至断奶后两周粪样菌群的演变过程。二日龄 5 头仔猪的优势谱带单一,为大肠杆菌,这与已有的报道一致^[12],10 日龄区系的复杂化、多样化主要来源于开食料,但这种变化是暂时的。由于 7 日龄仔猪的胃肠道并不适应于固体饲料,开食料有诱导仔猪腹泻的趋势,同时开食料来源的细菌并不能全部在肠道内定植,只有那些能适应胃肠道环境的细菌才能参与组成胃肠道正常的微生物区系。断奶也引起了微生物区系的显著变化,但这种变化没有开食前后的变化剧烈。提示开食料虽然导致了补饲后仔猪粪样细菌区系多样性的迅速增加和快速下降,使仔猪表现出腹泻趋势,但却使断奶前后仔猪粪样细菌区系多样性维持了相对的稳定,有一定的缓解断奶腹泻的作用。35 和 42 日龄 DGGE 图谱的相似性很高、多样性指数稳定,说明断奶后随着日龄的

增加,健康仔猪的微生物区系组成逐渐趋向稳定。

本研究结果表明大肠杆菌同样存在于健康仔猪的粪便中,但不表现为优势菌,而是腹泻仔猪粪便中的优势菌,说明大肠杆菌的过度繁殖、成为肠道中优势菌与腹泻的关系很大。而 42 日龄健康仔猪的粪样细菌区系,与通过培养技术获得的健康成年猪粪便菌群组成相比,未检测到真杆菌属 (*Eubacterium*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和普雷沃菌属 (*Prevotella*)^[15],与 Konstantinov^[5]构建自 28 日龄断奶并饲喂了 15d 2.5% FOS 和 5% 甜菜渣仔猪的粪样细菌区系相比,未检测到真杆菌属和瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)。说明宿主动物的年龄、日粮组成对粪样细菌区系的组成均有很大的影响。

造成哺乳仔猪腹泻的因素是多方面的,本研究中我们主要着眼于补饲和断奶引起的日粮变更对哺乳仔猪粪样细菌区系的作用,我们的结果显示早期补饲开食料可缓解断奶导致的粪样细菌区系的迅速变化,但同时会增加仔猪哺乳期间粪样细菌区系的不稳定性,从而易诱发哺乳仔猪的腹泻。因此如何帮助哺乳仔猪尽快建立正常健康的肠道微生物区系对防治其腹泻意义重大,这也是我们今后的主要研究内容。

致谢 本文在完成过程中得到了荷兰瓦赫宁根大学 Tamminga S. 教授、Akkermans A. D. L. 博士和 Williams B. A. 博士的大力支持和帮助,在此致以诚挚的谢意。

参 考 文 献

- [1] Simpson J, McCracken V, White B, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **36**: 167 - 179.
- [2] Zoetendal E, Akkermans A, de Vos W. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3854 - 3859.
- [3] Zoetendal E, Koike S, Mackie R, et al. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *Journal of Nutrition* 2004, **134**(2): 465 - 472.
- [4] 朱伟云,姚文,毛胜勇.变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化. *微生物学报* 2003, **43**(4): 503 - 508.
- [5] Konstantinov S, Zhu W, Williams B, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology* 2003, **43**: 225 - 235.
- [6] Zhu W, Williams B, Tamminga S, et al. Analysis of 16S rDNA reveals bacterial shift during in vitro fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faeces as inoculum. *Anaerobe* 2003, **9**(4): 175 - 180.
- [7] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rDNA in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**: 5636 - 5643.

- [8] Muyzer G, de Waal E, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 695 - 700.
- [9] Ward J. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of American Statistical Association*, 1963, **58**: 236 - 244.
- [10] Shannon C, Weaver W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1963.
- [11] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow W. ed. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: J. Wiley and Sons, 1991, 115 - 175.
- [12] Ewing W, Cole D. *The Living Gut: An Introduction to Microorganisms in Nutrition*. Durgannon: University of Nottingham Press, 1994.
- [13] Mathew A, Upchurch W, Chattin S. Incidence of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. *Journal of Animal Science*, 1998, **76**: 429 - 434.
- [14] Tannock G, Svage D. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 1974, **9**: 591 - 598.
- [15] Stewart C. Microorganisms in hindgut fermentors. In: Mackie R, et al. ed. *Gastrointestinal Microbiology*. New York: Chapman and Hall, 1997, Vol. 2. 142 - 186.

Tracking of the development of fecal bacterial community of diarrhea piglets by 16S rDNA techniques

YAO Wen, ZHU Wei-yun, MAO Sheng-yong

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used to track the development of fecal bacterial community of 5 diarrhea piglets. Clone libraries were created from complete 16S rDNA of 42-day fecal sample of piglet 1, 2 and 5. From the library, clones had their V6-V8 regions matched predominant bands on the DGGE gel were then sequenced and their 16S rDNAs subjected to an online similarity search. Results revealed that DGGE profiles from fecal samples of 5 piglets changed from simple to complex, and then returned simple to complex, finally trended to be stable and diverse. DGGE profiles from day 2 and 16 fecal samples of 5 piglets were simplest, with high similarity (84%). Their most predominant bands were *E. coli*. Their Shannon index were 1.38 ± 0.55 and 1.97 ± 0.26 respectively. DGGE profiles from day 10 of 5 piglets became quite complex, and had quite low similarity (10%) with DGGE profiles from day 2 and 16 fecal samples of 5 piglets. The Shannon index was 2.12 ± 0.24 . *E. coli* still existed, but it was not the most predominant band. There were significant differences of predominant bands between DGGE profiles from day 27 fecal samples and those from day 35 and 42 fecal samples, with 26.28% and 39.2% of similarity respectively. The predominant bands from day 35 and 42 fecal samples of 5 piglets were trended to be stable, with 55% of similarity. The Shannon index of day 27, day 35 and 42 fecal bacterial communities were 2.19 ± 0.29 , 2.20 ± 0.17 and 2.14 ± 0.20 respectively. The fecal bacterial communities of day 42 health piglets were mainly consisted of species of *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* and *Lactobacillus*.

Keywords: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rDNA sequence analysis; Shannon index; Similarity dendrograms; Piglet; Fecal bacterial community

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

* Corresponding author. Tel: 86-25-84395523; E-mail: zhuweiyunjau@hotmail.com

First author. Tel: 86-25-84395523; E-mail: yaowen67jp@yahoo.com

Received: 2 June 2005/Accepted: 23 June 2005/Revised: 2 August 2005