

规模化牛场犊牛直肠细菌多样性分析

许强^{1,2}, 康立超^{1*}, 薄新文¹, 马勋^{2*}

¹新疆农垦科学院, 新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000

²石河子大学动物科技学院, 石河子 832003

摘要: 【目的】研究腹泻犊牛直肠细菌多样性, 以及与健康犊牛直肠细菌多样性的差异。【方法】通过建立直肠菌群 16S rRNA 基因克隆文库, 分别用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hha* I 对阳性克隆的 PCR 产物进行限制性酶切片段长度多态性 (RFLP) 分析, 通过测定 16S rRNA 基因序列, 绘制系统发育树, 确定犊牛直肠菌群的组成。【结果】腹泻组克隆阳性率达 98.75% (474/480), 优势菌群以乳杆菌属 (14%)、肠球菌属 (10%) 和埃希菌属 (8%) 等需氧和兼性厌氧菌为主, 健康组克隆阳性率达 96.45% (488/506), 优势菌群以梭菌属 (13%)、双歧杆菌属 (8%) 和巨型球菌属 (5%) 等专性厌氧菌为主。【结论】2 周龄犊牛直肠菌群复杂多样, 并且具有自己的独特性菌群, 且腹泻时乳杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属等显著增加。

关键词: 犊牛直肠, 微生物多样性, RFLP, 16S rRNA 序列

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)03-0304-07

犊牛腹泻的高发病率和高死亡率给整个规模化养牛产业带来了巨大的经济损失, 有报道称, 超过 50% 的初生犊牛的死亡都是由腹泻引起的^[1]。目前, 国内关于犊牛腹泻的研究多集中于某个血清型病原菌的流行病学的调查研究或是针对病例爆发的病原菌的分离鉴定以及治疗方面的研究^[2], 而对腹泻发生时肠道微生物的多样性及其变化的研究报道很少。瘤胃是反刍动物营养代谢中最重要的一环^[3], 也是研究微生物多样性的热点^[4]。然而犊牛瘤胃尚未发育完全, 故其肠道微生物菌群在宿主健康和营养中的作用相当重要和显著。开展关于犊牛肠道微生物多样性研究, 不仅可以比较全面地了解肠道微生物菌群, 促进肠道微生物资源的开发和利用, 而且还能对初生犊牛动物营养研究以及犊牛腹泻的发生提供实验依据, 为更好的预防和控制犊牛

腹泻有着重要的意义。

由于目前能进行培养的细菌仅有 1% - 10%, 远远不能满足微生物生态生物学的研究需要^[5]。分子生物学技术的发展使得人们对环境微生物的组成、分布、丰度和动态等的研究更直接、更深入。16S rRNA 基因是原核生物进化的标尺^[6], 当前 16S rRNA 基因文库方法被广泛应用于各种环境的细菌菌群分析中。

本研究利用 16S rRNA 基因文库方法和限制性片段长度多态性技术 (RFLP, Restricted Fragment Length Polymorphisms) 分析 2 周龄荷斯坦犊牛直肠中主要菌群的组成, 比较分析犊牛肠道优势菌群是否有独特性, 同时比较腹泻犊牛与健康犊牛菌群组成间的区别, 为预防和控制犊牛腹泻提供理论依据。

* 通信作者: Tel: +86-993-6683156; E-mail: klc003@163.com (康立超), maxun779@126.com (马勋)

作者简介: 许强 (1986 -) 男, 四川人, 硕士, 动物传染病诊断与防治。E-mail: eszero6130@163.com

收稿日期: 2011-11-22; 修回日期: 2012-01-18

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 选取同一饲养管理条件下, 2 周龄荷斯坦奶犊牛, 腹泻症状明显的犊牛 4 头, 健康犊牛 4 头(包括一头 7 日龄犊牛)。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 引物购自北京华大基因公司; 限制性内切酶 *Msp* I、*Hha* I 和 pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; *E. coli* DH5 α 由本实验室保存。

1.2 采样

无菌采取直肠粪便于无菌器皿中, 置于 -80°C 冷冻备用。

1.3 样品总 DNA 的提取和 16S rRNA 基因的扩增

参照吴高峰^[7]的方法提取样品总 DNA。用细菌 16S rRNA 基因通用引物^[8] (F27: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', R1492: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。25 μL 反应体系如下: 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL , 引物 F27(10 $\mu\text{mol/L}$) 和 R1492(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , *rTaq* 酶 0.3 μL , 加水补足 25 μL 。PCR 反应程序如下: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 56°C 45 s, 72°C 2 min, 28 个循环; 72°C 延伸 7 min。

1.4 克隆文库的构建^[9]

按照北京天根 DNA 胶回收试剂盒说明将 PCR 扩增的目的条带割胶回收纯化。纯化后的 PCR 产物通过 T4 DNA 连接酶与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 通过 Amp 抗性筛选克隆, 分别建立 8 头犊牛的 16S rRNA 基因克隆文库。

1.5 克隆文库的检验及 RFLP 分析

对文库中的克隆用引物 M13-47 和 RV-M^[10] 进行菌体 PCR, 以检测插入子的正确性。菌落 PCR 产物用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hha* I 分别进行单酶切, 37°C 酶切 3 h。酶切产物用 3.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 110 V, 电泳时间为 1 h。相同带型归为一类, 每一个带型作为一个分类操作单元(OTU, Operational Taxonomic Unit)^[11]。使用软件 SPADE(Species Prediction And Diversity Estimation) 进行细菌多样性指数分析。将 RFLP 图谱中优势代表克隆

送华大基因(北京)测其 16S rRNA 基因全长序列。

1.6 系统发育分析

将测序序列通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 找到 GenBank 数据库中与之相近的已知序列并下载, 使用 ClustalX 1.83 软件进行多序列比对后, 在 MEGA4.0 软件中, 用 Neighbor-Joining 方法^[12] 选择 Bootstrap 为 1000 个重复, 构建系统发育树进行分析。

本研究所得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的索引号为: JQ083405-JQ083429。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

8 个样品总 DNA 通过通用引物 (F27, R1492) 进行扩增, 在预计 1500 bp 处成功扩增 16S rRNA 基因片段, 且无杂带(图 1)。

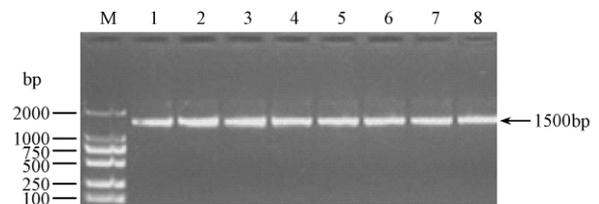


图 1 细菌 16S rRNA 基因扩增电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified 16S rRNA using primers F27 and R1492. M: DNA marker DL2000; 1-4: Diarrhoea sample; 5-8: Health sample.

2.2 克隆文库的构建

纯化后的 PCR 产物通过 T4 DNA 连接酶与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。Amp 抗性筛选克隆构建 16S rRNA 基因克隆文库, 应用 M13-47 和 RV-M 引物进行菌落 PCR, 扩增克隆子的插入序列, 排除假阳性克隆。腹泻样品 480 个克隆得到 474 个阳性克隆, 健康样品 506 个克隆得到 488 个阳性克隆(其中 7 日龄健康犊牛 120 个克隆得到 114 个阳性克隆)。

2.3 克隆文库的检验及样品多样性指数分析

用 *Msp* I 和 *Hha* I 酶切菌落 PCR 产物, 琼脂糖凝胶电泳, 得到酶切图谱(图 2)。通过比较酶切图谱统计出, 腹泻组 474 个阳性克隆酶切共获得 91 种 OTUs(各个样品文库分别获得 41、39、33、38 种 OTUs); 健康组 488 个阳性克隆共获得 143 种 OTUs

(7日龄样品获得31种OTUs,2周龄样品分别获得44、50、63种OTUs)。由OTU所含克隆分布情况(表1)可以看出,腹泻组91种OTUs中,有45种OTUs仅含1个克隆,低于健康组的76种,腹泻组含

25个克隆以上的OTUs有4种,多于健康组的1种。选取其中占优势比例(所含克隆百分比>2%,即克隆数9个以上)的OTU的代表性克隆送往华大基因测序。

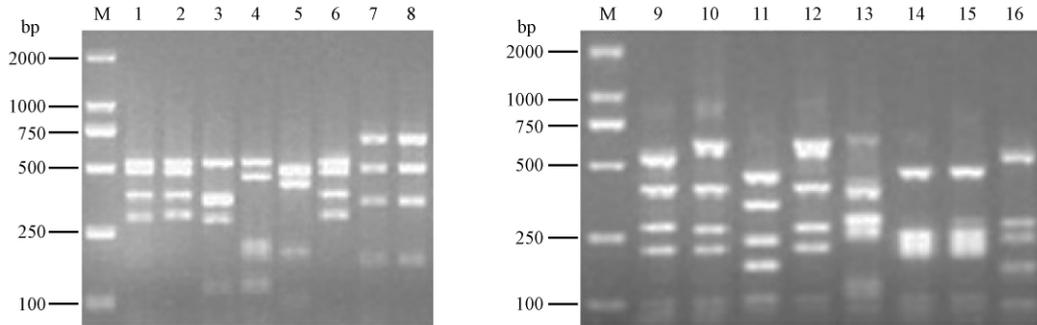


图2 克隆子插入片段的酶切电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of insert segment of clones. 1-8: digest by *Hha* I. 9-16: digest by *Msp* I; M: DNA marker DL2000.

表1 OTU所含克隆分布情况

Table 1 Distribution of OTU within samples

Number of clones per OTU	Number of OTUs		Number of clones per OTU	Number of OTUs	
	Diarrhoea	Health		Diarrhoea	Health
1	45	76	17	0	1
2-8	32	52	19	1	0
9	1	2	22	1	0
10	1	2	23	0	2
11	0	3	25	1	0
12	3	0	32	1	0
13	2	1	40	1	1
14	0	2	54	1	0
16	1	1			

使用软件 SPADE 进行细菌多样性指数分析(表2)。构建的腹泻样品文库库容(C)为90.50%,健康组为84.43%,说明文库库容量足够,可以反映犊牛直肠微生物多样性。在95%的可置信区间,腹泻组和健康组的物种丰富度(Species Richness)分别为

206.4,386.8;香农指数(Shanno Index)分别为3.902,4.572;辛普森指数(Simpson Index)分别为0.03994,0.02250。由结果可以得出,腹泻样品的物种丰富度低于健康组,香农指数和辛普森指数也显示出腹泻组的细菌多样性低于健康组。

表2 腹泻和健康样品中细菌多样性指数比较

Table 2 Comparison of diversity index of diarrhea and health sample

Sample	No. of OTUs	Species Richness		Shanno Index		Simpson Index	
		ACE-1	95% CIs	Chao&Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Diarrhoea	91	206.4	(143.5,344.5)	3.902	(3.661,4.143)	0.03994	(0.02695,0.05293)
Health	143	386.8	(275.6,591.2)	4.572	(4.352,4.792)	0.02250	(0.01500,0.03000)

2.4 序列分析

腹泻组和健康组代表性克隆序列同 GenBank 中已知序列进行比对,共同构建系统发育树(图3)。可以看出腹泻组主要分属乳杆菌属、肠球菌属、埃希

菌属、弧菌属和大量的不可培养菌,共占到总克隆数的61%,其中乳杆菌属占到克隆总数的14%,是腹泻犊牛直肠环境的优势菌;肠球菌属、埃希菌属和弧菌属分别占到了总克隆数的10%、8%和5%,属于

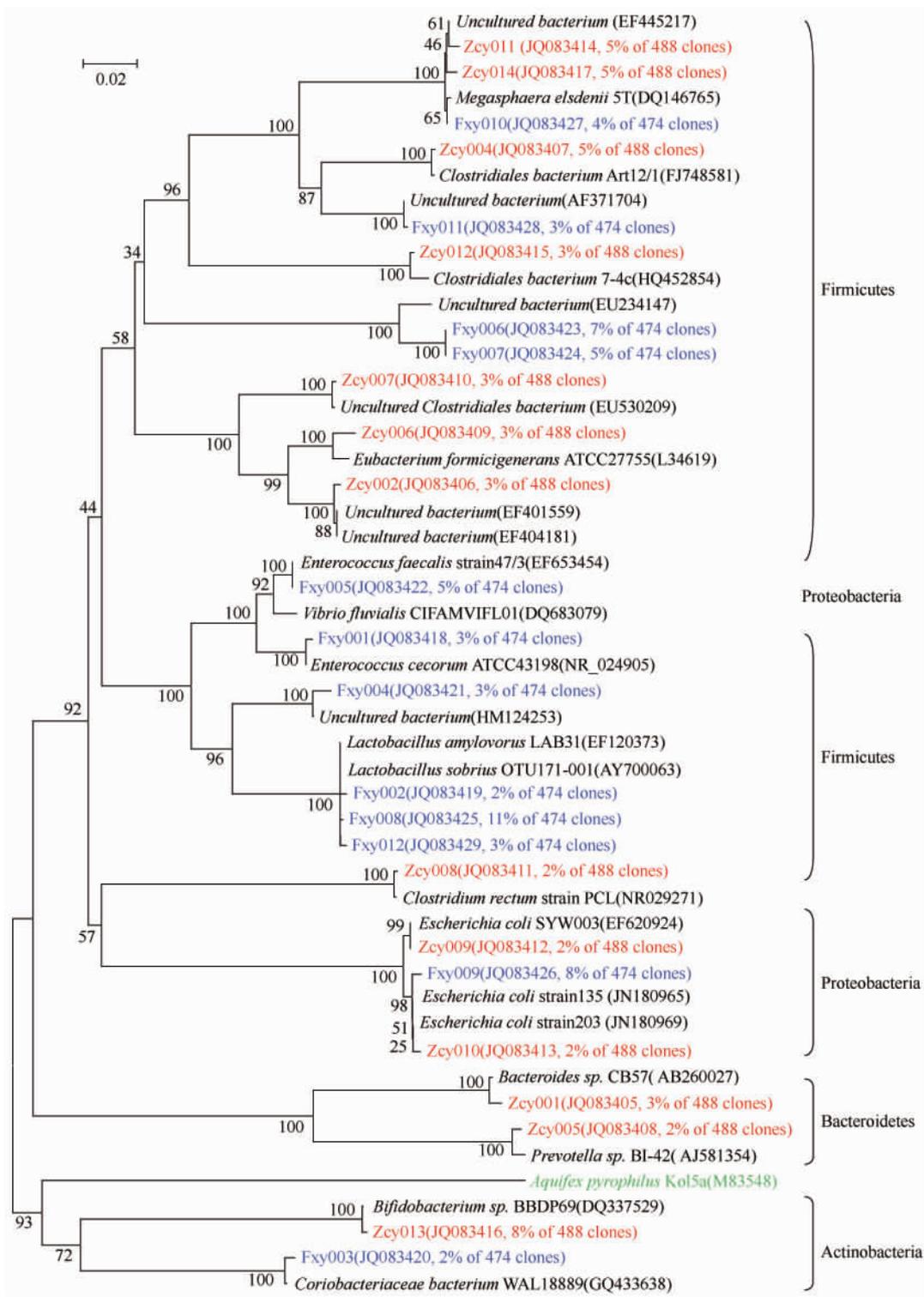


图3 优势克隆序列与已知序列以16S rRNA基因为基础构建的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences. Blue, the diarrhoea clones; Red, the health clones. The numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap support, based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled data sets. Bar 2% sequence divergence. *Aquifex pyrophilus* (green) is an outgroup.

较优菌群。还有一部分不可培养菌,它们占到了总克隆数的 20% 以上。而健康组主要分属于梭菌属、双歧杆菌属、拟杆菌属、乳杆菌属、普氏菌属、真杆菌属、埃希菌属、巨型球菌属和一些未知的不可培养菌,共占到总克隆数的 46%。其中梭菌属占到克隆总数的 13%,是健康犊牛直肠环境的优势菌。双歧杆菌属、巨型球菌属分别占到了总克隆数的 8% 和 5%,属于较优势菌群,还有一部分不可培养菌占到克隆总数的 8%。

3 讨论

本研究分别构建了新疆地区腹泻和健康荷斯坦犊牛直肠粪便样品中细菌的 16S rRNA 基因文库,分析了文库中克隆的酶切分型以及代表克隆的 16S rRNA 基因全序列。结果显示,当犊牛发生腹泻时,直肠菌群种类和数量发生了显著变化,腹泻组(474 个克隆分属 91 个 OTUs)远远没有健康组(488 个克隆分属 143 个 OTUs)的菌群丰富多样,腹泻组高达 20% 的细菌是不可培养的,远远高于健康组的 8%,同时,腹泻组的优势菌主要分属乳杆菌属(14%)、肠球菌属(10%)、埃希菌属(8%)、弧菌属(5%),直肠内可引起犊牛腹泻的大肠杆菌数量的显著增加,以及可导致动物发生剧烈腹泻的弧菌等需氧、兼性厌氧菌成为优势菌,打破了原本肠道正常菌群以双歧杆菌、梭菌、巨型球菌等专性厌氧菌为优势菌群的平衡状态,最终导致犊牛发生腹泻。本研究结果表明,犊牛腹泻与肠道内专性厌氧菌种类数量的减少以及需氧、兼性厌氧菌种类数量的增加有关,且犊牛腹泻时,直肠菌群有 20% 为目前还未获得培养的细菌。

本研究中 2 周龄健康犊牛肠道菌群以梭菌、双歧杆菌和埃氏巨型球菌为主,与成年牛和其他幼龄动物相比,具有独特性。健康成年牛肠道正常优势菌群为拟杆菌和螺菌^[13];哺乳羔羊粪内以类杆菌、乳杆菌为最优势菌群^[14];哺乳仔猪肠道正常菌群多以乳杆菌和链球菌为主^[7,15];哺乳家兔肠道主要菌群为消化球菌、双歧杆菌、乳杆菌^[16]。Zcy011 序列

与来源于牛、羊瘤胃的菌株埃氏巨型球菌(DQ146765)同源性高达 99%,属于同一类细菌,该菌为牛、羊瘤胃内分解乳酸产丙酸,防止乳酸积累造成酸中毒的优势细菌^[17],而瘤胃从犊牛出生第三周(21 天)才开始发育,因此推测埃氏巨型球菌在犊牛瘤胃尚未开始发育时在肠道中发挥着分解乳酸的作用。

健康犊牛不同周龄直肠菌群多样性也不同,7 日龄犊牛的其文库酶切类型为 31 种,明显少于 2 周龄犊牛的 52 种,1 周龄犊牛多样性不丰富且均匀度偏低,菌群优势度偏高,奇异度较大,测序结果以梭菌属、双歧杆菌属、巨型球菌属为主,占到文库 65% 比例,而 2 周龄犊牛以乳杆菌属、拟杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属、真杆菌属、埃希菌属、普氏菌属、巨型球菌属为主,占到文库 43% 比例。提示犊牛从出生到 2 周龄期间直肠菌群一直在不断地发生着动态变化,细菌总数量在增加,优势菌群种类在增加的同时,数量在直肠环境中所占比例有所下降,犊牛直肠优势菌群以专性厌氧菌为主。因为 1 周龄健康犊牛样本偏少,结论有待进一步验证。

本研究与何邵阳等^[18]采用稀释滴种法对腹泻犊牛直肠正常菌群的变化报道相似,但也有差异。相似处在于何邵阳报道犊牛腹泻时,直肠中大肠杆菌数量明显增加,双歧杆菌数量明显减少,这与本文结果一致。差异性在于其报道腹泻时乳杆菌数量低于健康样,而本文腹泻样中乳杆菌为优势菌,发生了变化,推测造成该结果有差异的原因与直肠肠道环境 pH 值的变化和埃氏巨型球菌数量的减少有关。埃氏巨型球菌数量的减少,导致直肠内乳酸的分解效率降低,造成乳酸的积累,从而直肠内形成弱酸性环境,这有利于乳杆菌的大量生长繁殖,最终乳杆菌成为优势菌。

本研究结果表明,将 RFLP 和 16S rRNA 基因文库方法结合,用于研究犊牛直肠细菌的多样性和组成的变化非常有效,它能够直观反映直肠细菌种类的变化,进一步将其与其他研究方法一起应用,能更好地揭示直肠菌群的功能。

参考文献

- [1] Cho YI , Kim YI , Liu SY , Kinyon JM , Yoon KJ. Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , 2010 , 22 (4) : 509-517.
- [2] 马广强. 犊牛细菌性腹泻快速诊断方法的建立与流行病学研究. 山东农业大学学位论文, 2006.
- [3] Roderick I , Bryan A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J Dairy Sci* , 1990 , 73 (10) : 2971-2995.
- [4] 于萍, 王加启, 卜登攀. 反刍动物胃肠道微生物多样性研究进展. 中国微生态学杂志 (*Chinese Journal of Microecology*) , 2009 , 21 (7) : 655-658.
- [5] Randazzo CL , Torriani S , Akkermans ADL , Vos WM , Vaughan EE. Diversity , Dynamics , and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , 68 (4) : 1882-1892.
- [6] Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* , 1987 , 51 (2) : 221-271.
- [7] 吴高峰. 应用 PCR-DGGE 技术对不同日龄仔猪直肠菌群分布规律的研究. 河南农业大学学位论文, 2009.
- [8] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing , In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* , Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. *New York: Wiley* , 1991 , 115-175.
- [9] Jiang HC , Dong HL , Zhang GX , Yu BS , Chapman LR , Fields MW. Microbial Diversity and Sediment of Lake Chaka , an Athalassohaline Lake in Northwest China. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , 72 (6) : 3832-3845.
- [10] <http://wenku.baidu.com/view/f03bfd4ba0d4a7302763ad2.html> , 2011.
- [11] Moyer CL , Tiedje JM , Dobbs FC , Karl DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , 62 (7) : 2501-2507.
- [12] Saitou N , Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* , 1987 , 4 (4) : 406-425.
- [13] 徐卉芳, 牛钟相. 肉牛粪便正常菌群研究. 黑龙江畜牧兽医 (*Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*) , 1999 , (5) : 3-4.
- [14] 王良娟, 马勋, 张再清, 秦学敏. 羔羊粪便正常菌群的研究. 中国兽医科技 (*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*) , 1994 , 24 (6) : 24-25.
- [15] 苏勇, 朱伟云. 仔猪哺乳期和断奶后胃中细菌和乳酸杆菌菌群的变化. 肠外与肠内营养 (*Parenteral & Enteral Nutrition*) , 2006 , 1 (13) : 1-4.
- [16] 朱瑞良, 牛钟相, 常伟山. 不同日龄兔肠道正常菌群的研究. 中国兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Science*) , 1996 , 16 (2) : 176-178.
- [17] 孙国权, 刘国文, 邢欣. 奶牛瘤胃埃氏巨型球菌的分离鉴定及对乳酸发酵的影响. 中国兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Science*) , 2009 , 29 (9) : 1115-1119.
- [18] 何邵阳, 徐凤宇, 管清华, 付蕾. 犊牛腹泻与肠道菌群的变化. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*) , 2000 , 22 (5) : 345-346.

Analysis of microbial diversity in rectum of calf in large-scale cattle farm

Qiang Xu^{1 2}, Lichao Kang^{1*}, Xinwen Bo¹, Xun Ma^{2*}

¹ The Breed and Biotechnology Key Laboratory of Sheep in Reproduction and Construction Group of Xinjiang, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China

² College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China

Abstract: [Objective] To analyze the diversity of bacterial community in rectum of diarrheic calves, and differences with health calves. [Methods] 16S rRNA clone libraries were constructed, positive clones were digested by *Msp* I and *Hha* I for restriction fragment length polymorphism (RFLP), and then a phylogenetic tree was depicted based on the 16S rRNA sequencing, to confirm the compose of microbe in the diarrheic calf rectum. [Results] The positive rate of clone was 98.75% (474/480) in diarrheic calves, the dominant bacteria included *Lactobacillus* (14%), *Enterococcus* (10%) and *Escherichia* (8%). The positive rate of clone was 96.45% (488/506) in health samples, the dominant bacteria included *Clostridium* (13%), *Bifidobacterium* (8%), *Megasphaera* (5%). [Conclusion] Complexity and diversity of bacterial community in rectum in 2 weeks old calves had their own features, and significant increase of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Escherichia* was found in diarrhea calves.

Keywords: calf rectum, microbial diversity, RFLP, 16S rRNA sequence

(本文责编:张晓丽)

Corresponding authors. Tel: +86-993-6683156; E-mail:klc003@163.com(Lichao Kang), E-mail: maxun779@126.com(Xun Ma)

Received: 22 November 2011/Revised: 18 January 2012

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月,第3次修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅: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. 新意: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. 述和评: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。
4. 结合作: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。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况的介绍(附已发文章)。

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。