

高通量测序法研究不同 pH 的饮用水 对 SPF 小鼠肠道微生物的影响

余 强^{1,2#}, 刘月环^{2#}, 王志远², 吴旧生^{1*}

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

【摘要】 目的 研究不同 pH 饮用水对 SPF 小鼠肠道微生物多样性的影响。**方法** 21 日龄 SPF 小鼠 90 只随机分成 3 组, 每组 30 只, 分别给予三类水, 即酸化水 (pH 3.0), 中性水 (pH 7.0) 和碱性水 (pH 9.0), 并进行为期三个月的饲养。每组分别在饲养 4 周、8 周、12 周末各处死 10 只动物, 取血清按 SPF 国标项目检测了细菌、病毒、寄生虫, 取回盲部内容物, 根据细菌 16S rRNA 的保守性设计引物, 构建文库, 进行高通量 (Illumina) 测序, 获得 10 G 的数据, 并对数据进行统计, 聚类分析。**结果** 以 pH 3.0 处理的小鼠肠道微生物丰富度适中, 稳定性高。**结论** 在规模化饲养条件下, 选取 pH 3.0 饮用水小鼠能较长时间维持肠道微生物多样性, 稳定性达到一个平台。本研究为长期稳定维持动物质量的生产实践提供了理论与技术支持, 也是胃肠道宏基因组学技术在动物质量控制领域的一个具体应用。

【关键词】 肠道微生物; 16S rRNA; 高通量测序; 饮用水; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2017) 07-0040-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.008

Effect of drinking water at different pH on intestinal microbial diversity in SPF mice evaluated by high throughput sequencing

YU Qiang^{1,2#}, LIU Yue-huan^{2#}, WANG Zhi-yuan², WU Jiu-sheng^{1*}

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)

【Abstract】 Objective To study the effect of drinking water at different pH on intestinal microbial diversity in SPF mice. **Methods** Ninety 21-day-old SPF mice were randomly divided into three groups; drinking acidified water (pH 3.0), neutral water (pH 7.0) and alkaline water (pH 9.0), respectively, for 3 months, 30 mice in each group. 10 mice were sacrificed at the end of 4, 8 and 12 weeks in each group. Bacteria, virus and parasites in serum were detected according to the national standard for SPF. Then, primer sequences were designed according to the conservativeness of bacteria 16S rRNA, and libraries were constructed. Subsequently, the ileocecal contents were subjected to high-throughput sequencing (Illumina). 10 G data were obtained and analyzed. **Results** The sequencing results revealed that the intestinal microbial abundance of the mice receiving pH 3.0 drinking water was moderate with a high stability. **Conclusions** Under the conditions of large-scale breeding, the mice receiving pH 3.0 drinking water can maintain the intestinal

【基金项目】 浙江省公益技术应用研究计划 (2011C37096, 2015C37102); 浙江省医药卫生平台骨干人才基金 (2015RCA006); 浙江省自然科学基金 (LY16H030011)。

【作者简介】 余强 (1980 -), 男, 实验师, 硕士生, 本科, 研究方向: 实验动物学。Email: yu_q2008@163.com; 刘月环 (1974 -), 女, 副研究员, 博士后, 研究方向: 实验动物生物技术。Email: yuehuanliu@163.com. #共同第一作者

【通讯作者】 吴旧生 (1969 -), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 实验动物医学。Email: wjosh@zju.edu.cn

microbial diversity for a long time, and reach a stable platform. This study provides theoretical and technical support for the stable long-term maintenance of animal quality production. It is also a specific application of gastrointestinal macrogenomics in animal quality control.

【Key words】 Intestinal microflora; 16S rRNA; High throughput sequencing; Drinking water; Mice

目前,大多数实验动物中心都采用动物饮用水作酸化处理的办法来解决清洁级以上实验动物的饮水问题^[1]。有些单位将饮用水高压灭菌(121℃, 25 ~ 30 min)后酸化至 pH 2.5 左右(pH 2.5 ~ 3.0)效果比较理想,也有一些单位使用碱化水(pH 9.0)长期饲养动物,效果也相对理想。最近有报道表明,动物肠道微生物对其实验结果有相对大的影响,许多科研结果不能重复也归咎于肠菌的影响^[2]。16S rRNA 是原核生物核糖体 30S 小亚基的组成部分,它包含 10 个保守区和 9 个高变区,其中保守区为细菌共有,而高变区则有种属特异性,其基因序列随着菌种间的亲缘关系不同而有一定差异。所以,高变区序列是能解释细菌物种间差异的特征核酸序列,可作为细菌系统发育和分类鉴定的指标。因此可按这一特征设计 16S rDNA 引物,并扩增、测序来鉴定样本中的微生物种类^[3]。鉴于目前还没有酸化水对小鼠肠道微生物结构与稳定性的影响报道,本文利用 16S rRNA 高通量测序技术探讨了不同 pH 饮用水连续饲养三个月小鼠的肠道微生物稳定性和多样性,为今后动物质量控制打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物与回盲部肠内容物取样

实验小鼠由浙江省医学科学院实验动物中心提供【SCXK(浙)2014-0001】,实验在浙江省医学科学院实验动物中心进行【SYXK(浙)2014-0008】。选取 21 日龄 SPF 级 ICR 小鼠(雌、雄鼠兼用)90 只,随机分成 3 组,每组 30 只,分别给予酸化水(pH 3.0)、中性水(pH 7.0)和碱性水(pH 9.0),三类水进行为期三个月的饲养,每组分别在饲养 4 周、8 周、12 周末处死 10 只动物,取血按 GB14922.2-2011 进行检测,回盲部 V 形剪口,灭菌牙签挑取内容物。

1.2 肠菌基因组提取

1.2.1 DNA 质量检测

用常规细菌提取试剂盒分别提取 90 个个体基因组,同组处理内容物混在一起组成样本池,进行 16S rRNA 建库,样本分别标号为 I1、I4、I7、I10、I13、I16、I19、I22、I25。其中 I1、I10、I19 为同个 pH 3.0

值,I4、I13、I22 为同个 pH 7.0 值,I7、I16、I25 为同个 pH 9.0 值,I1、I4、I7 为同个处理时间(饲养 4 周),I10、I13、I16 为同个处理时间(饲养 8 周),I19、I22、I25 为同个处理时间(饲养 12 周)。用 1% 琼脂糖电泳检测 DNA 样品有无杂质和降解;Nano Photometer 分光光度计检测 DNA 样品的纯度;Qubit 2.0 Fluorometer 检测 DNA 样品的浓度。

1.2.2 16S rDNA 文库制备

取 10 ng 的 DNA 模板,对目的区域进行扩增:根据测序区域的不同,选择对应区域的扩增引物: V3 区引物为 338F-533R, V3 + V4 区引物为 314F-805R, V6 区引物为 967F-1046R;使用 Takara 的 Ex Taq 酶,确保扩增效率和准确性。继而对扩增出的目的片段进行富集,同时加入特异 index 序列。建库流程见图 1。

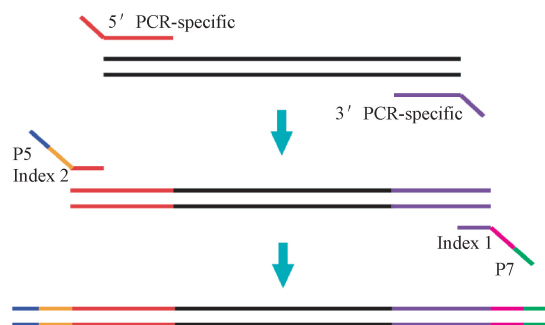


图 1 小鼠肠菌 16S rDNA 文库建立流程图

Fig. 1 A diagram of construction of the mouse intestinal bacteria 16S rDNA library

1.2.3 库检

库检流程:构建文库 → Qubit 2.0 进行初步定量 → 稀释文库至 1 ng/μL → Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测, insert size 符合预期后 → Bio-Rad CFX 96 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad KIT iQ SYBR GRN 进行 QPCR, 对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。

1.2.4 测序

检测合格的文库,采用 Hiseq 进行测序,测序策略为 PE250。其实验流程如下:DNA 提取 → 高变区扩增及产物纯化 → 目的片段富集及产物纯化 → 末端修复,加接头 → 文库库检 → 上机测序。

1.3 信息分析流程

测序所得序列应去除问题序列,如低质量碱基、接头污染序列等并完成数据过滤,得到目标序列用于分析。过滤后的序列称为 Clean Reads。首先,将双端测序的相应的 Read1(5'端测序所得序列片段)与 Read2(3'端测序所得序列片段)利用序列拼接方法 PEAR^[4]进行拼接;然后,对拼接后的序列利用软件 QIIME 1.8.0 版本进行分析^[5-7],信息分析流程如下:原始下机序列 → 质控 → 序列拼接 → 参考库对比 → OTUs 分析 → 多样性分析 → 聚类热图分析。

2 结果

2.1 回盲部肠菌原始序列数据

Illumina 高通量测序结果最初以原始图像数据文件的存在,经 CASAVA 软件进行碱基识别(base calling)后,转为原始测序序列(raw data),其结果以 FASTQ(简称为 fq)文件的形式存储。FASTQ 文件信息的内容包含了所测序列的名称、碱基序列及相对应的测序质量信息。在 FASTQ 格式文件中,每个碱基对应一个碱基质量字符,每个碱基质量字符对应的 ASCII 码值减去 33(Sanger 质量值体系),即为

该碱基的测序质量得分。

2.2 数据统计与质控

首先去除接头污染(接头污染是指由于插入片段过短而导致部分 read 序列中含有测序引物序列,对于双端测序,若一端受到接头污染,则去掉两端的 reads);然后去除低质量的 reads(reads 中质量值 $Q \leq 19$ 的碱基占总碱基的 30% 以上,对于双端测序,若一端为低质量 reads,则会去掉两端 reads);最后去除含 N 比例大于 5% 的 reads(对于双端测序,若一端含 N 比例大于 5%,则会去掉两端 reads)。Q 值是 Phred Quality Score 的简称;N 碱基是指未知碱基。结果见表 1。

2.3 序列拼接

对过滤后的序列,采用 PEAR^[4]序列拼接算法将双末端测序序列根据末尾的重叠情况合并成一条序列,再进行下一步分析。PEAR 程序可以合并来自可变长度靶片段的原始 Illumina 双端 reads。它通过统计检验来减少假阳性结果的数量。各个样本的拼接成功比例均大于 98%(横坐标表示样本,纵坐标表示拼接成功序列占总数的百分比。结果见图 2)。

表 1 数据过滤统计结果
Tab.1 Results of data filtering statistics

样本 Samples	I1	I4	I7	I10	I13	I16	I19	I22	I25
原始读段 Raw reads	157,138	106,892	99,190	107,376	110,916	128,342	110,630	107,446	113,748
原始碱基数 Raw bases	39,284,500	26,723,000	24,797,500	26,844,000	27,729,000	32,085,500	27,657,500	26,861,500	28,437,000
过滤读段 Filter reads	100,886	85,894	81,070	87,804	90,664	101,718	89,878	86,498	92,138
过滤率(%) Filtration rate	64.2021	80.35587322	81.73202944	81.77246312	81.74113744	79.25542691	81.24197776	80.50369488	81.00186377
过滤碱基数 Filter bases	25,221,500	21,473,500	20,267,500	21,951,000	22,666,000	25,429,500	22,469,500	21,624,500	23,034,500
测序质量值大于 30 的原始读段 Raw Q30 bases	66.0801	76.74837032	77.20318984	77.4888951	77.58874103	76.29006872	77.52216939	77.33233438	77.05615571
rate(%) 测序质量值大于 30 过滤读段 Clean Q30 Bases	82.3245	83.2045	83.247	83.633	83.6585	83.296	83.6945	83.71	83.2925
rate(%)									

注:(1)Raw Q30 Bases Rate(%):Raw Reads 中测序质量值大于 30(错误率小于 0.1%)的碱基占总碱基(Raw Reads)的比例。(2)Filter Q30 Bases Rate(%):Filter Reads 中测序质量值大于 30(错误率小于 0.1%)的碱基占总碱基(Filter Reads)的比例。
Note. (1) Raw Q30 B base rate(%): raw reads percentage of base (raw reads) with a base value greater than 30 (error rate less than 0.1%). (2) Filter Q30 base rate(%): filter read percentage of base (filter reads) with a mass value greater than 30 (error rate less than 0.1%).

2.4 OTUs 分析

2.4.1 OTUs 统计及分布

OTUs,即分类操作单元,它代表的是一类相似序列的集合,默认将序列相似度大于 97% 的 Tags 归为一类 OTUs,认为它们具有相同的物种来源,从中选出代表序列可以简化数据集,以便进行下一步的

分析,本实验得到的序列与参考数据库中的 OTUs 序列进行比对,挑选相似度大于 97% 的序列归为一类 OTUs。物种的识别是根据数据库中各物种相应的识别序列与我们挑选的 OTUs 进行比对的结果。剔除所有样品中的序列数小于 2 条的 OTUs。结果见表 2。

表 2 OTUs 数目
Tab.2 Number of OTUs

样本 Samples	I1	I4	I7	I10	I13	I16	I19	I22	I25
标准化的序列标签 Normalized tags	40518	40518	40518	40518	40518	40518	40518	40518	40518
序列标签总数 Totalaligned tags	11856	16358	27310	15331	18129	18238	11995	19728	19045
注释上的序列比例 Alignedrate (%)	29. 26	40. 37	67. 4	37. 84	44. 74	45. 01	29. 6	48. 69	47
总输出数 Total OTUs number	636	689	48	547	137	443	1076	441	149

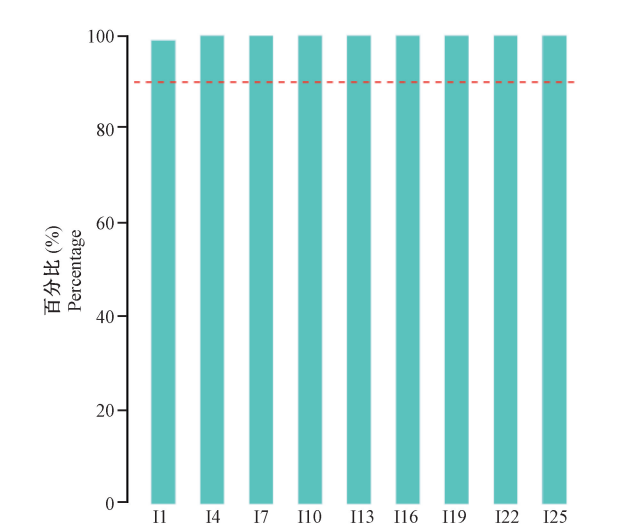


图 2 序列拼接百分率(红色虚线表示拼接比例为 90%)

Fig.2 Percentage of sequence splicing (red dotted line indicates 90% splicing ratio)

2.4.2 OTUs 丰度排秩分析

OTUs 丰度排秩 (rank-abundance) 是根据每个 OTUs 所含序列数的多少对 OTUs 进行排序,丰度排秩可以很直观的看出在每个样本里 OTUs 所包含的序列数的分布情况,曲线越平缓,OTUs 分布越均匀,结果见图 3。横坐标表示 OTUs 按包含的序列数目排秩,纵坐标表示该 OTUs 包含的序列数的相对丰度,每一条线表示对应一个样本的 OTUs 分布情况。结果表明样品 OTUs 丰度排秩从高到低依次为 I19 > I1 > I4 > I10 > I22 > I16 > I25 > I13 > I7。

2.4.3 样品聚类树图

对所得各样品的物种分布数据,标准化之后,计算 Bray-Curtis 距离值^[8],利用层次聚类算法对各样品进行聚类。通过聚类分析我们可以直观的看出样品间的相似情况以及离群点的存在情况。Bray-Curtis 距离计算公式如下:

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2 * \sum_k C_k}{\sum_m S_{im} + \sum_n S_{jn}}$$

其中,BC_{ij}表示样本 i 和 j 之间的 Bray-Curtis 距离,k 表示两个样本共有的 OTUs 的个数,m、n 分别表示两个样本所有的 OTUs 总数;C_k 表示共有的包含较少序列的 OTUs 的序列数,S_{im}表示样本 i 中某个 OTUs 所包含的序列数,S_{jn}表示样本 j 中某个 OTUs 所包含的序列数。Bray-Curtis 距离介于 0 ~ 1 之间,为 0 表示两个样本的物种组成完全一致,为 1 则表示两样本的物种组成完全不一致。通过计算此距离得到的样本聚类树见图 4。(横坐标表示样本,纵坐标表示距离值,分支点处的纵坐标表示分支的类之间的距离,不同颜色表示不同分组)结果表明样品 I4 与 I10 的物种组成最相似。

2.5 进化树分析

根据已知的参考数据库中的亲缘关系,我们利用 PyNAST 序列比对算法^[6]对得到的 OTUs 构建进化树,利用 Graphlan^[9] 软件得到如下进化树,见图 5。结果显示了每个样本不同阶段共有的菌群,不同颜色分别代表在整棵树里面比较重要的一些子树,包含序列越多圆圈越大。

2.6 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析了样品内菌群的多样性情

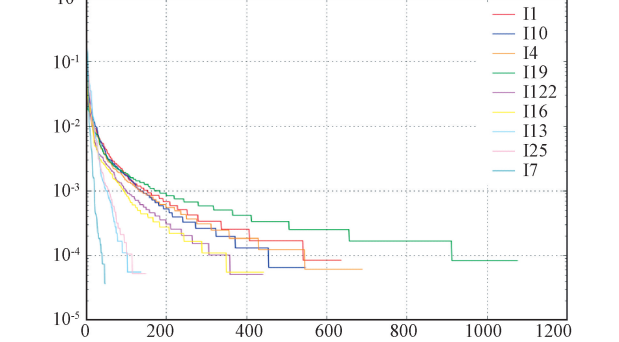


图 3 OTUs 丰度排秩

Fig.3 OTUs abundance rankings of the samples

况,主要包括菌种的类别丰富度以及菌种数目均匀度两大指标。Alpha 多样性越高表示菌群种类丰富度越好,菌种数目越均匀,菌群愈稳定。Alpha 多样性指标值采用四种不同的计算指标分析求得。

2. 6. 1 香隆指数(Shannon index)

Shannon index 是根据样品中的物种种类以及每个物种的比例来计算的多样性指标,计算公式如下:

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

H'表示 Shannon index 值,R 表示样品中物种的种类数,pi 第 i 个物种所占百分比;

Shannon index 值与样品深度的关系见图 6。横坐标表示取样深度即序列的条数,纵坐标表示 Shannon index 值,菌种分布越均匀,其 Shannon 值越大。结果表明 I19 样品微生物分布最均匀,I1、I10、I4 次之,I22、I16、I13、I25 再次之,最后是 I7。

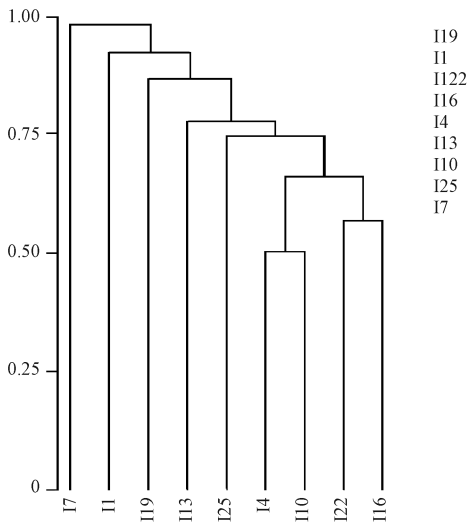


图 4 样品聚类图
Fig. 4 Clustering chart of the samples

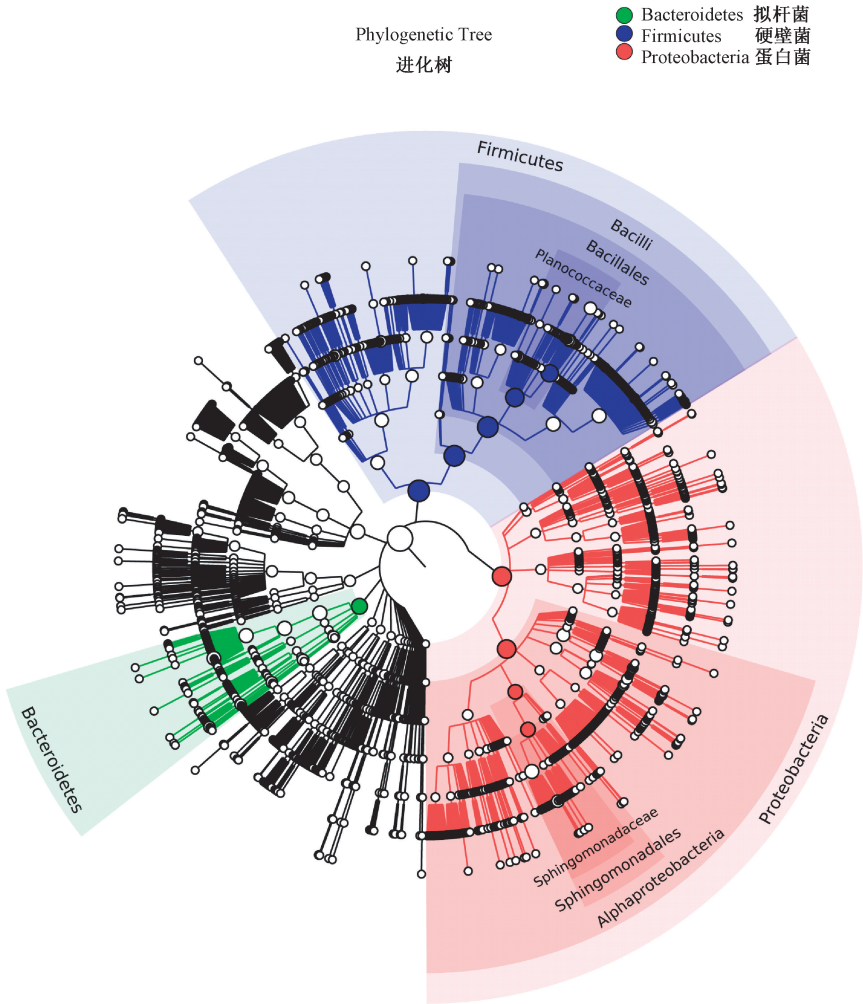


图 5 样品进化树分析
Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of the samples

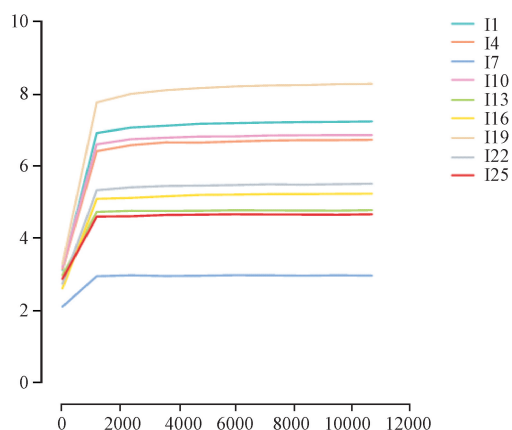


图 6 香隆指数

Fig. 6 Shannon indexes of the samples

2. 6. 2 Chao1

Chao1 是一个可以不基于进化树来进行评价物种丰度的一个指数,计算的公式为:

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

其中, S_{obs} 是观察到的物种数, n_1 是观察到的 singletons 的种类数, n_2 是观察到的 doubletons 的种类数。Chao 1 在低丰度样品特别多时更能体现真实的多样性情况;Chao 1 值与样品深度的关系,见图 7。横坐标表示取样深度即序列的条数,纵坐标表示 Chao 1 Index 值。结果表明 I19 样品微生物丰度最好,I4、I1、I10、I16、I22 次之,最后是 I25、I13、I7。

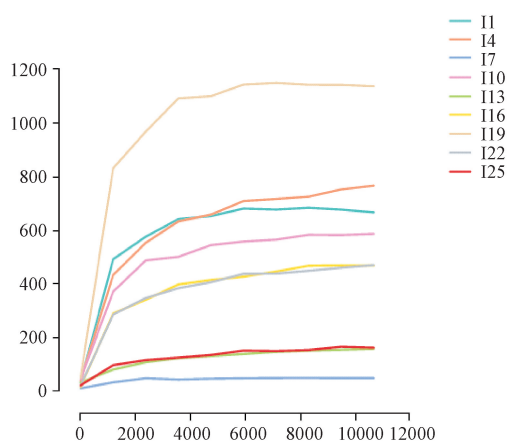


图 7 Chao1 指数

Fig. 7 Chao1 indexes of the samples

2. 6. 3 观察细菌总数 (Observed species)

Observed species 是一个不基于进化树来对物种丰富度进行检测的指数,就是某次实验中观测到的种类数。Observed species 与样品深度的关系见图 8。

横坐标表示取样深度即序列的条数,纵坐标表示 OTUs 的数目值。结果表明 I19 样品微生物最丰富,I1、I4、I10 次之,I16、I22 再次之,最后是 I25、I13、I7。

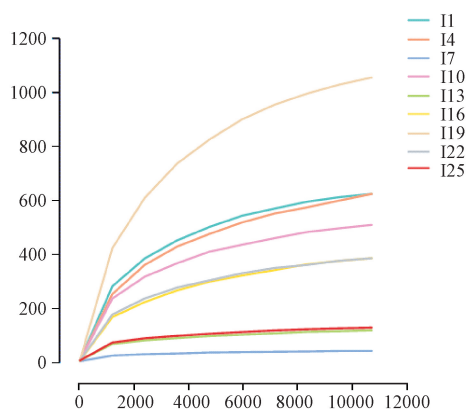


图 8 观察种类

Fig. 8 Observed types of the samples

2. 6. 4 辛普森指数 (Simpson index)

Simpson 是一种立于分布格局的多样性的测度方法。是测量一个种群的集中程度或优势程度的。根据物种在样品中的比例来计算,公式如下:

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

其中 P_i 表示物种 i 的在样品中的比例。

Simpson 值与样品深度的关系见图 9。横坐标表示取样深度即序列的条数,纵坐标表示 Simpson 值,稀有种对 Simpson 值的影响较小,而常见种对其的影响较大。

2. 7 不同 pH 饮用水对 SPF 小鼠肠道微生物多样性的影响

所有样品共有优势菌为硬壁菌门 (Firmicutes); 拟杆菌门 (Bacteroidetes); 蛋白菌门 (Proteobacteria), 并占小鼠肠道细菌总数 98% 以上。结果见表 3。

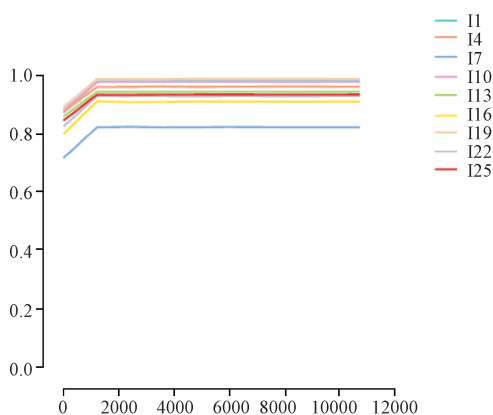


图 9 辛普森指数

Fig. 9 Simpson indexes of the samples

表 3 各样品不同饲养阶段的优势菌(每个样品每个阶段列出占比前 10 的细菌)

Tab.3 Dominant species of the samples at different stages of feeding (listed the top 10 bacteria of each sample at each stage)			
饲养时间 Feeding time	pH 3.0	pH 7.0	pH 9.0
饲养 1 个月 Raised for one month	Koribacteraceae	Chitinophagaceae(丝状菌)	Kaistobacter(Kaistobacter 菌属)
	Ellin6513	Bacillus(杆菌)	Paracoccus(副球菌属)
	Solibacterales	Sporosarcina(芽胞八叠球菌属)	Rhodobacteraceae(红螺菌)
	Candidatus Solibacter Acidobacteriaceae(酸杆菌科)	Clostridium(产气荚膜杆菌)	Caulobacteraceae(固氮菌科)
	Candidatus Koribacter(土壤酸杆菌)	Oxalobacteraceae(草酸杆菌科)	Porphyromonas(卟啉单胞菌属)
	Rhodospirillaceae(红螺菌)	Clostridium(产气荚膜杆菌)	Actinobacillus(放线菌)
	Moraxellaceae(莫拉氏菌)	Planococcaceae(动性球菌科)	Mycoplasma(霉形体)
	Kaistobacter(Kaistobacter 菌属)	Solibacterales(酸杆菌)	Sphingomonas(鞘脂单胞菌属)
	ABS-6	Ruminococcaceae(瘤胃球菌科)	Bacillus(杆菌)
		Kaistobacter(鞘脂单胞菌目 Kaistobacter 属)	Planococcaceae(动性球菌科)
饲养 2 个月 Raised for two months	Arthrobacter(节细菌属)	Arthrobacter(节细菌属)	Solibacteraceae
	Chitinophagaceae(丝状菌)	Chitinophagaceae(丝状菌)	Chitinophagaceae(丝状菌)
	Bacillus(杆菌)	Treboxiophyceae(一种绿藻)	Alicyclobacillus(脂环酸芽孢菌)
	Sporosarcina(芽胞八叠球菌属)	Paenibacillus(类芽孢杆菌)	Bacillus(杆菌)
	Clostridium(产气荚膜杆菌)	Sporosarcina(芽胞八叠球菌属)	Planococcaceae(动性球菌科)
	Ruminococcaceae(瘤胃球菌科)	Clostridium(产气荚膜杆菌)	Sporosarcina(芽胞八叠球菌属)
	Devosia(德沃斯氏菌)	Brevundimonas(短波单胞菌属)	Kaistobacter(Kaistobacter 菌属)
	Clostridiaceae(梭菌)	Rickettsiales(立克次氏体)	Xanthomonadaceae(黄单胞菌科)
	Cellulomonas(纤维杆菌)	Kaistobacter(Kaistobacter 属)	Bacillales(芽孢杆菌)
	Coprococcus(粪球菌)	Oxalobacteraceae(草酸杆菌科)	Streptophyta(扭鞘藻门)
饲养 3 个月 Raised for three months	Chitinophagaceae(丝状菌)	Chitinophagaceae(丝状菌)	Bacillales(芽孢杆菌)
	Cytophagaceae(噬细胞菌)	Chlamydomonas(衣藻)	Bacillus(杆菌)
	Stramenopiles(不等鞭毛类)	Bacillus(杆菌)	Ammoniphilus(嗜氨微杆菌)
	Streptophyta(扭鞘藻门)	Planococcaceae(动性球菌科)	Cohnella(科内尔氏菌)
	Bacillales(硬壁菌)	Sporosarcina(芽胞八叠球菌属)	Paenibacillus(类芽孢杆菌)
	Bacillus(芽孢杆菌)	Sphingomonadaceae(鞘脂单胞菌目)	Planococcaceae(动性球菌科)
	Devosia(德沃斯氏菌)	Kaistobacter(Kaistobacter 属)	Sporosarcina(芽胞八叠球菌属)
	Rhodospirillaceae(红螺菌)	Caloramator	Candidatus Amoebophilus(噬纤维菌目)
	Haliangiaceae(侏囊菌)	Bacillales(芽孢杆菌目)	Solibacillus
	TM7-1	Paenibacillus(类芽孢杆菌)	Bacillaceae(芽孢杆菌)

3 讨论

在生物进化的漫长过程中,生物 rRNA 分子除了排列顺序有些非常缓慢的变化外,其功能几乎保持不变,从这个特性上可以检测出种系变化的关系。rRNA 结构具有保守性和高变性。保守性揭示了生物物种的亲缘关系,是系统发育重建的重要线索。高变性揭示了生物物种核酸序列的不同特征,是鉴定属种的基础。细菌 rRNA 的类型有 23S、16S 和 5S rRNA 3 种,其长度分别为 2900、1540、120 bp。5S rRNA 虽最易分析,但由于核苷酸数量少,用于分析研究的遗传信息不够准确。23S rRNA 含有最多的核苷数,几乎是 16S rRNA 的 2 倍,用于分析研究的遗传信息虽最准确但分析较困难。16S rRNA 的核苷数相对适中,较易于分析,用于分析研究的遗传信息基本满足序列测定的分析比较,也成为动物胃肠道宏基因组学研究的一个重要的理论和实践基础^[10]。根据 16S rRNA 的保守区和可变区的特性^[11],测定其基因部分序列即可达到样品分子鉴定的目的^[12],常用序列比对长度一般选为 500

bp^[13-16],有的研究人员使用 800 bp 长度进行序列比对^[17]。目前,16S rRNA/rDNA 分子鉴定技术广泛用于微生物的遗传特征研究及分子差异的研究^[18]。

人体内正常的菌群主要定植于小肠、回肠及结肠部位,这些菌群可直接参与宿主的物质代谢过程,进而影响人体健康,如 Harold Tjalsma 等^[19]报道,肠道菌群失调是直肠癌发生的一大因素。Amandine Everard 等^[20]报道,肠道菌群失调能够引发肥胖和 2 型糖尿病。Christopher T. Brown 等^[21]报道,肠道菌群失调能够引发自身免疫性疾病如 1 型糖尿病。Osawa^[22]及 Smith^[23]等研究报道动物的肠道菌群及其代谢产物能够影响宿主粘膜系统的发育、血管细胞的发生、肠道上皮细胞的更新、肠道功能的维持及参与宿主基因的表达及脂类的代谢调控。国内郭秀兰等^[24]的研究表明拟杆菌属可能是一个好的脂肪沉积的生物标识。

本研究表明所有样品共有优势菌为硬壁菌门(Firmicutes);拟杆菌门(Bacteroidetes);蛋白菌门(Proteobacteria),并占小鼠肠道细菌总数 98% 以上。这与 Ley 等 2005^[25],2006^[26]报道的硬壁菌门和拟杆菌门细菌占比超过哺乳动物肠道总细菌的 98% 的结果基

本一致。硬壁菌门和拟杆菌门对健康有深远的影响,如肠道菌群与脂肪沉积的关系,Ley 等 2006^[26]对肥胖人和瘦人肠道微生物的组成情况作了比较,对粪便细菌作了 16S rRNA 基因序列克隆测序并分类计算,发现肥胖人粪便中的硬壁菌门比瘦人高($P=0.002$),而拟杆菌门比瘦人低($P<0.001$)。刘祥等 2005^[27]采取体外培养和生化反应的方法对肥胖人和瘦人的肠道菌群进行了研究,发现肥胖人肠道菌群中拟杆菌门的含量显著高于瘦人。这些结果表明脂肪沉积与肠道菌群中硬壁菌门、拟杆菌门的数量或相对丰度密切关联。在本研究多样性分析中表明 pH3.0 组小鼠肠道微生物的分布相对均匀,种类丰富及相对好的生物丰度,说明肠道微生物生态稳定,有利于小鼠的健康(同批小鼠同时委托当地实验动物质量监督检测站做细菌、病毒、寄生虫的检测,其结果均为阴性),也可能有利于减少肠道微生物对实验结果的影响,使实验数据具有更好的重复性。在长期规模化饲养条件下,选取 pH 3.0 饮用水的动物能较长时间维持动物肠道微生物多样性,稳定性达到一个平台,可以做为长期饲养的一种选择。因此本研究也为长期稳定维持动物质量的生产实践提供了理论与技术支持。

参考文献:

- [1] 徐平,毛佳贤. 小鼠饮水酸化后细菌生长情况[J]. 上海实验动物科学,1992,12(3): 157-159.
- [2] Servick K. Mouse microbes may make scientific studies harder to replicate. 2016. 8. 16. <http://www.sciencemag.org>.
- [3] Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, et al. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(12): 3886-3897.
- [4] Zhang J, Kobert K, Flouri T, et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR [J]. Bioinformatics, 2014, 30(5): 614-620.
- [5] Vasileiadis S, Puglisi E, Arena M, et al. Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled with Multi-Million read generating sequencing technologies [J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e42671.
- [6] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [7] Ahn J, Sinha R, Pei Z, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(24): 1907-1911.
- [8] Bray JR, Curtis JT. An ordination of upland forest communities of Southern Wisconsin [J]. Ecol Monogr, 1957, 27(4): 325-349.
- [9] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 814-821.
- [10] 吴旧生,王鹏歧,刘月环. 宏基因组学与动物病原微生物检测 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(9): 72-77.

- [11] Woese CR. Bacterial evolution [J]. Microbiol Rev, 1987, 51(2): 221-271.
- [12] Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, et al. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms [J]. Croat Med J, 2005, 46(4): 522-529.
- [13] Patel JB, Leonard DG, Pan X, et al. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 246-251.
- [14] Tang YW, Von Graevenitz A, Waddington MG, et al. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4): 1676-1678.
- [15] Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1447-1453.
- [16] Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, et al. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(12): 3674-3679.
- [17] Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation) [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4134-4140.
- [18] Cai HY, Arehambant M, Gyles CL, et al. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications [J]. Anim Health Res Rev, 2004, 4(2): 73-79.
- [19] Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, et al. A bacterial drive-passenger model for colorectal cancer; beyond the usual suspects [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(8): 575-582.
- [20] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. PNAS, 2013, 28(5): 9066-9071.
- [21] Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, et al. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes [J]. PLoS ONE, 2011, 6(10): e25792.
- [22] Osawa R, Kuroiso K, Goto S, et al. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(7): 3093-3097.
- [23] Smith AH, Mackie RI. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(2): 1104-1115.
- [24] 郭秀兰. 猪肠道硬壁门和拟杆菌数量的检测及其相对丰度与脂肪沉积的相关性研究 [D]. 四川农业大学博士论文. 2009
- [25] Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. PNAS, 2005, 102(31): 11070-11075.
- [26] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [27] 刘祥,张朝武,潘素华,等. 不同体脂人群肠道主要菌群的定量分析 [J]. 卫生研究,2005, 34(6): 724-725.