

黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 常见 SPF 级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 229-235.
Huang SW, Min FG, Wang J, et al. Diversity of intestinal flora in commonly used SPF mice and rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 229-235.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.016

常见 SPF 级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究

黄树武, 闵凡贵, 王静, 潘金春*

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室 广东广州 510663)

【摘要】 目的 研究常见 SPF 级小鼠和大鼠的肠道菌群多样性。方法 分别采集广东地区三家实验动物生产单位的 C57BL/6、ICR、BALB/c 小鼠和 Wistar、SD 大鼠的盲肠内容物样品, 用细菌 16S rDNA 通用引物扩增 V4-V5 区域, 采用 Illumina Miseq 2× 300 bp 测序平台进行测序, 使用生物信息学方法进行微生物群落分析、Alpha 多样性分析与 Beta 多样性分析。结果 对序列去杂优化后 OTU 聚类分析, 稀释性曲线说明本次测序的数据量合理; 实验小鼠和大鼠肠道菌群共分成八个门, 其中拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*) 占据主要地位, 属水平上主要是拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Hungatella*、副杆菌属(*Parabacteroides*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*) 等; 样品间差异性分析显示相同设施来源动物的菌群组成相似性较高; Alpha 分析结果显示来源于同种设施的动物物种丰富度相近; Beta 分析显示相同设施动物的肠道菌群差异较小, 但品系对肠道菌群差异性有所影响。结论 不同来源设施的饲养环境是动物肠道菌群多样性的主要影响因素, 不同品系对肠道菌群多样性有一定影响。

【关键词】 小鼠; 大鼠; 肠道菌群; Illumina miseq
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0229-07

Diversity of intestinal flora in commonly used SPF mice and rats

HUANG Shuwu, MIN Fangui, WANG Jing, PAN Jinchun*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: PAN Jinchun. E-mail: jcp@sinasina.com

【Abstract】 **Objective** To study the diversity of intestinal flora in commonly used SPF mice and rats. **Methods** The cecum contents of C57BL/6, ICR, BALB/c mice as well as Wistar and SD rats were collected from three experimental animal production units in the Guangdong area. The V4-V5 region was amplified using 16S rDNA primers and sequenced by the Illumina Miseq 2x 300 bp sequencing platform. Microbial community analysis, alpha diversity analysis, and beta diversity analysis were carried out by bioinformatics. **Results** In OTU cluster analysis after sequence removal optimization, the dilution curve indicated that the data quantity of the sequencing was reasonable. The intestinal microflora of mice and rats were divided into eight phyla. *Bacteroidetes* and *Firmicute* phyla occupied the main position, mainly in the level of *Bacteroides*, followed by the genres *Hungatella* and *Parabacteroides* and then *Lactobacillus*. Analysis of the differences among the samples showed that the flora composition of animals from the same facility, and that of the same strains from the same facility was also similar. Alpha analysis showed that the species richness was similar in animals from the same facility, and beta analysis showed little difference in intestinal flora of the same origin animals. Moreover, the strain had an effect on the difference of intestinal flora. **Conclusions** The origin is the main factor influencing the diversity of intestinal flora, and

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2016A030303024, 2017B030314171, 2017A070702001, 2018B030317001)。
Funded by Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2016A030303024, 2017B030314171, 2017A070702001, 2018B030317001)。
[作者简介] 黄树武 (1990—), 男, 医学学士, 研究方向: 实验动物质量监测和微生物学研究。Email: hsw2015@gdliami.com
[通信作者] 潘金春 (1979—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量监测和比较医学研究。Email: jcp@sinasina.com

the strain has a certain influence on their diversity.

【Keywords】 mice; rats; intestinal flora; Illumina Miseq

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

据统计,人体携带的正常微生物达 10^{14} 个,胃肠道菌群占人体总微生物量的 78%^[1]。胃肠道作为人和动物体最庞大而复杂的生物群落,正常情况下肠道菌群保持着共生和拮抗的关系,从消化、营养吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节、药物代谢和毒性等诸多方面影响人和动物的健康状况^[2]。

在实验动物中,以小鼠、大鼠为主的啮齿类实验动物占据主要地位,2015 年其使用量合计约占实验动物使用总量的 74%^[3]。目前已经有相关研究开展小鼠和大鼠的肠道菌群与心血管疾病、代谢性疾病、病原感染等疾病的关系^[4-5],肠道菌群代谢产物研究,肠道菌群多样性影响因素研究^[6]等,但实验大小鼠常用品系肠道微生态情况研究尚不够充分,且研究方法多采用培养法、扩增核糖体 DNA 限制性分析、PCR-DGGE 电泳等传统方法,导致结果差异较大。

本研究采用新一代 Illumina Miseq 测序技术及生物信息学分析手段,对常用的实验小鼠和大鼠开

展肠道菌群多样性分析,可以全面、平行分析多个样本中的微生物群落信息,从而掌握常用小鼠和大鼠肠道菌群多样性背景,其数据易于分享和比对,解决目前研究中存在的不足,为微生态与相关疾病、代谢产物、药物筛选和评价等相关研究提供基础性资料,以及在选择肠道微生态研究用模型动物时提供参考依据,对促进生物医学的发展有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级小鼠和大鼠来自广东地区三家实验动物生产单位,三个生产单位分别用代号 DJ【生产许可证号:SCXK(粤)2018-0044】、ZY【生产许可证号:SCXK(粤)2018-0034】、SY【生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002】表示,动物包括小鼠品系 C57BL/6、ICR、BALB/c 和大鼠品系 Wistar、SD,具体信息见表 1。

表 1 SPF 级小鼠和大鼠的信息

Table 1 Information of the SPF grade laboratory animals

品种 Breed	品系 Strains	性别 Sex	周龄 Week age	数量(只) Number	来源 Source	动物编号 Animal number
小鼠 Mouse	C57BL/6	雄 Male	5	3	DJ	DJ-1、DJ-2、DJ-3
	C57BL/6	雄 Male	5	3	ZY	ZY-1、ZY-2、ZY-3
	ICR	雌 Female	5	4	DJ	DJ-11、DJ-12、DJ-13、DJ-14
	BALB/c	雌 Female	5	3	ZY	ZY-4、ZY-5、ZY-6
大鼠 Rat	Wistar	雄 Male	3	3	ZY	ZY-7、ZY-8、ZY-9
	SD	雄 Male	3	3	ZY	ZY-10、ZY-11、ZY-12
	SD	雌 Female	3	3	SY	SY-1、SY-2、SY-3

1.1.2 仪器与试剂

仪器为 FTC-3000TM 实时荧光定量 PCR 仪。试剂为 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司;AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;PCR 反应所用试剂 10× PCR 缓冲液、4x dNTP、Taq 酶、DL-2000 marker、蛋白酶 K、琼脂糖(电泳级)、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶、Tax/Plus 聚合酶等均购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

采用 CO₂ 吸入法对动物进行麻醉,再用颈椎脱

臼的方法实施安乐死,动物安乐死后解剖取盲肠内容物约 1 g,实验操作在广东省实验动物监测所实验设施【使用许可证编号:SYXK(粤)2016-0122】,所有操作符合动物福利和伦理要求。

1.2.2 DNA 文库制备与高通量测序

使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒抽提样品基因组 DNA。根据细菌 16S rDNA V4-V5 区域设计特异引物序列,构建目标区域和带有“5' Miseq 接头-barcode-测序引物-特异引物-3'”的融合引物。采用两步 PCR 扩增的方法构建 NDA 文库(引物序列见表 2),首先采用内侧引物扩增目的片段,后将目的片段使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒进行胶

回收,而后将回收产物作为模板采用外侧引物进行二次 PCR 扩增,并使用 FTC-3000T^{real-time} PCR 仪进行定量,均一化混匀后文库制备结束,采用

Illumina Miseq 2× 300 bp 高通量测序平台对回收产物进行测序分析。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences		
引物名称 Primers	引物位置 Positions	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
16S rDNA V4-V5	515F	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'
	926R	5'-CCGTCAATTCMTTGTAGTTT-3'
内侧引物 Inner primer	Forward	5'-TTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-特异引物 515F-3'
	Reverse	5'-GAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA-特异引物 926R-3'
外侧引物 Lateral primer	Forward	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC- barcode -TCTTTCCCTACACGACGCTC -3'
	Reverse	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-barcode-GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGA-3'

1. 2. 3 生物信息学分析

Miseq 测序原始序列用 Trimmomatic 和 FLASH 软件进行质控、过滤、拼接,再用 Mothur 软件处理去除错误序列、重复序列以获得优化序列,优化序列用 USEARCH 和 Mothur 软件进行运算分类单位 (operational taxonomic units, OTU) 聚类分析 (在 97% 的相似性水平下划分) 和物种分类学分析,基于 OTU 聚类分析结果,再用 Mothur 软件和 R 语言进行 Alpha 对样品微生物群落的丰度和多样性进行分析;基于分类学信息,可以在各个分类水平上进行群落结构的统计分析,并对样本之间进行 Beta 多样性分析,并绘制图表。

2 结果

2.1 序列优化及统计

22 个样品进行处理共获得 696 394 个优化序列,平均每个样品 31 000 多个序列。这些序列在 97% 的相似水平下聚类获得 OTU,平均每个样品获得 151 个 OTU,但样品间数量差异较大,其中来源 DJ 的 OTU 平均为 253 个,来源 SY 的 OTU 平均为 310 个,来源 ZY 的 OTU 数量较少,平均为 53 个。

2.2 OTU 聚类分析

为验证样品的测序深度,从样品中随机抽取一定数量的个体,以个体数与物种数来构建稀释性曲线 (rarefaction curves),结果显示所有样品的曲线都趋于平缓 (图 1),说明本次测序的数据量合理,能够覆盖样本的绝大部分微生物。

分别用 Jaccard 法和 Bray-Cutis 法计算样品之间的差异性,并采用 UPGAM 法绘制树形图 (图 2)。结果显示,同一设施来源的动物菌群组成相似性较高;且来源于相同设施的同一品系动物之间存在一定相似性,如 DJ-1 ~ DJ-3、DJ-11 ~ DJ-14、SY-1 ~ SY-3 等。

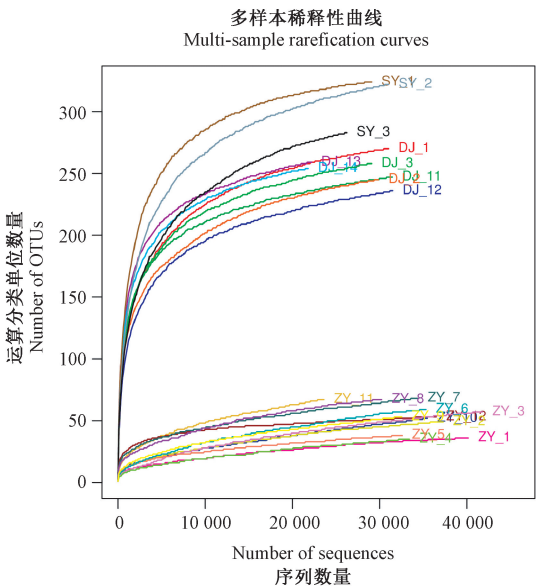
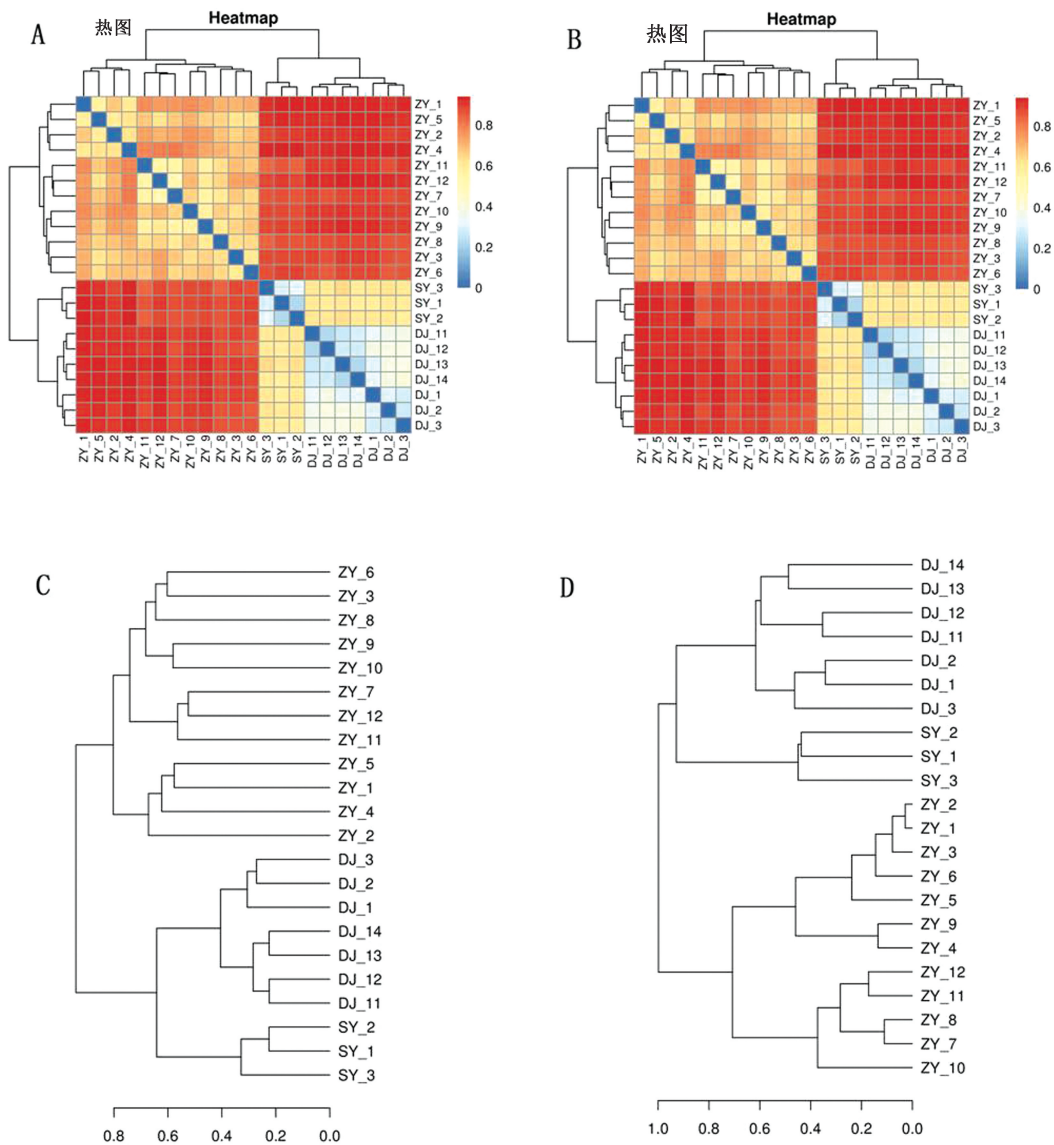


图 1 稀释性曲线
Figure 1 Rarefaction curves

2.3 物种信息分析

从门水平聚类分析,小鼠、大鼠肠道菌群主要分成拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、脱铁杆菌门 (Deferribacteres)、变形菌门 (Proteobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、无壁菌门 (Tenericutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 八个门 (图 3A),其中拟杆菌门、厚壁菌门占据主要地位,二者合计所占比例达到 85% 以上。从来源来看,菌群组成略有差异,来源 DJ 的动物缺少放线菌门和梭杆菌门,来源 ZY 的动物缺少放线菌门,来源 SY 的动物缺少梭杆菌门。品种品系也存在差异,小鼠没有放线菌门,大鼠没有梭杆菌门,ICR 小鼠还没有梭杆菌门,Wistar 大鼠还没有放线菌门。从聚类结果看,来源 SY 和 ZY 的相似性较高。



注:A.矩阵热图(Jaccard 法);B.矩阵热图(Bray-Cutis 法);C.树状图(Jaccard 法);D. 树状图(Bray-Cutis 法)

图 2 多样本相似性分析

Note. A. Matrix heat map (Jaccard). B. Matrix heat map (Bray-Cutis). C. Tree pattern (Jaccard). D. Tree pattern (Bray-Cutis).

Figure 2 Multi-sample similarity analysis

从属水平聚类分析,除未分类的细菌外,小鼠、大鼠肠道菌群共分成 63 个属,其中比例最高的是拟杆菌属(*Bacteroides*),平均约占 40%。其次较多的属包括 *Hungatella*、副杆状菌属(*Parabacteroides*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、*Mucispirillum*、*Ruminiclostridium*、*Akkermansia*、罗氏菌属(*Roseburia*)等(图 3B)。从品种、品系比较看,主要优势菌属组成都较接近,部分品种、品系可能缺乏一些低丰度的菌属,如大鼠未检测到巨单胞菌属(*Megamonas*)、*Papillibacter*、*Catenibacterium*、梭菌属(*Fusobacterium*)等 4 种菌属,小鼠未检测到 *Romboutsia*、*Butyricimonas*、

Adlercreutzia、变形杆菌属(*Proteus*)、*Faecalibaculum*、*Allobaculum*、*Arenimonas*、*Gordonibacter* 等 8 种菌属。从聚类结果看,来源 DJ 和 SY 的相似性较高。

2.4 Alpha 多样性分析

通过单样品的多样性分析(Alpha 多样性)可以反映微生物群落的丰度和多样性,估计环境群落的物种丰度和多样性。本次样品文库的平均覆盖率(coverage 指数)为 99.91%,反应本次测序深度能代表样品的真实情况。根据香农指数、辛普森指数、Chao 指数和 Ace 指数结果(图 4),总体看来来源于 DJ、SY 的动物物种丰富度差不多,都高于来自 ZY

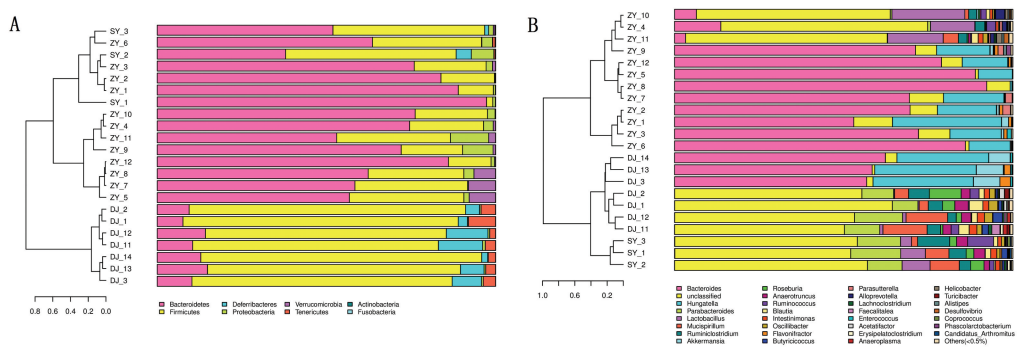


图 3 门(A)与属(B)水平聚类树与柱状图组合分析结果

Figure 3 Results of cluster tree and histogram combination analysis on phylum(A) and genus(B) levels

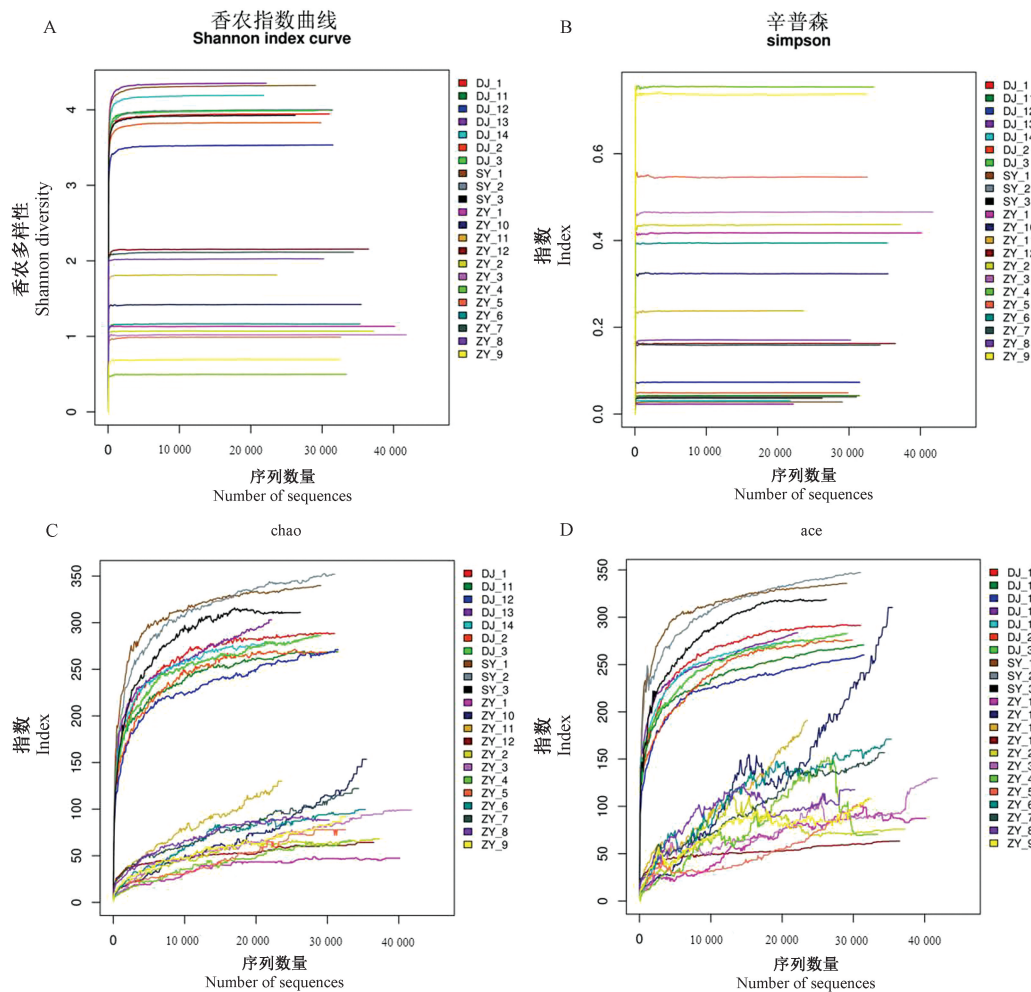


图 4 Alpha 多样性分析

Figure 4 Alpha diversity analysis

动物的物种。

2.5 Beta 多样性分析

PCoA(principal co-ordinates analysis)是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法,通过 PCoA 分析可以观察个体或群体间的差异。本研究的 PCoA 分析显示来源于 DJ、SY、ZY 的动物分成了三

个群落,且在考虑序列丰度的情况下更为明显(图 5)。通过 Unifrac 分析制作差异性矩阵热图(图 6),在不考虑序列丰度的情况下(weighted unifrac),结果显示与上述差异性分析结果略有差异,来源 SY 与 ZY 的动物菌群差异更小一点;而在考虑序列丰度的情况下(unweighted unifrac),结果显示与上述

差异性分析结果一致,相同来源动物的肠道菌群差异较小,同时来源于 DJ、SY 动物之间肠道菌群的相

似性较高,且 DJ、SY 动物品系也对肠道菌群的相似性有所影响。

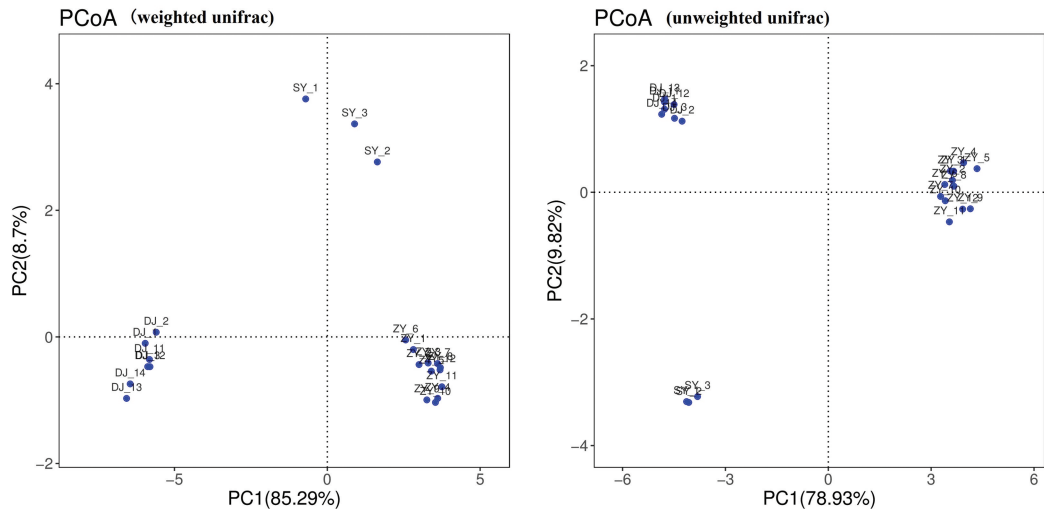


图 5 PCoA 分析
Figure 5 PCoA analysis

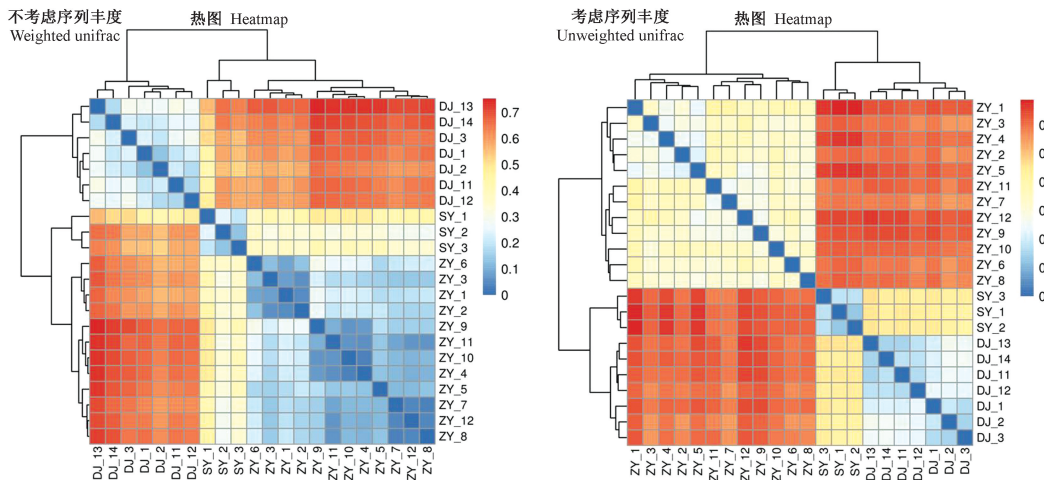


图 6 差异性矩阵热图
Figure 6 Differential matrix heat map

3 讨论

微生物的多样性及结构研究是进行复杂微生物生态系分析的基础,通过分析实验动物肠道中微生物的丰度与结构,能够揭示实验动物肠道疾病发生与微生物群落之间的关系,从而为预防和治疗肠道疾病提供合理的理论依据^[7]。

早期的研究实验小鼠肠道正常菌群主要菌属有双歧杆菌、拟杆菌(类杆菌)、肠球菌、乳杆菌、梭杆菌、真杆菌^[8]。随着高通量测序技术的发展与应用,本研究中实验小鼠、大鼠肠道菌群共分成 63 个属,其中拟杆菌属的含量最高,其次为 Hungatella、副

杆状菌属、乳酸杆菌属、Mucispirillum、Ruminiclostridium、Akkermansia、罗氏菌属。而在人肠道中较为常见的柔嫩梭菌属、真杆菌属等菌属在本研究小鼠、大鼠肠道中并未发现^[9]。李伟等^[10]对实验小鼠和大鼠肠道总菌群进行多样性比较研究,结果显示种间肠道菌群存在差异,种内雌雄个体之间并没有显著的差异,与本研究同种品系雌雄间肠道菌群无明显差别一致。

从门水平看,实验小鼠和大鼠肠道菌群以拟杆菌门和厚壁菌门占据主要地位,其次为脱铁杆菌门、变形菌门、疣微菌门、无壁菌门、放线菌门和梭杆菌门;大小鼠与人肠道菌群相比较则存在多数门

交叉,总体组成较为接近,都以硬壁菌门和拟杆菌门占据优势;但也有部分门不相同,如小鼠和大鼠有脱铁杆菌门和无壁菌门,人有蓝菌门、螺旋体门和 Vadin BE97 门^[11]。最近有对树鼩大肠菌群的研究显示,树鼩的肠道菌群同样具有丰富的多样性,以厚壁菌门和变形菌门的丰度最高^[12]。也有研究表明不同饮食对同一鼠种肠道菌群多样性存在差异,同种饮食干预对不同品系鼠种肠道菌群多样性的影响也存在差异,但不同饮食结构的大小鼠均以拟杆菌门和厚壁菌门为主要优势菌群^[6]。

本研究结果显示,不同来源设施对动物肠道菌群多样性的影响较大,Alpha 多样性分析显示 ZY 的物种丰富度明显低于 DJ 和 SY, Beta 多样性分析也说明相同来源动物的菌群组成相似性较高;同时品系对菌群相似性也有所影响,如 DJ-1~DJ-3、DJ-11~DJ-14、SY-1~SY-3 品系内相似度较高。因此,不同来源设施的饲养环境是动物肠道菌群多样性的主要影响因素,品系对肠道菌群多样性也有一定影响。

参 考 文 献(References)

- [1] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science, 2005, 308 (5728):1635-1638.
- [2] Ley RE, Peterson DA, Gordon JL. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. Cell, 2006, 124:837-848.
- [3] 叶玉江. 中国实验动物资源调查与发展趋势[M]. 北京:科学出版社,2017:101-105.
Ye YJ. Investigation and Development trend of Laboratory Animal Resources in China [M]. Beijing: Science Press, 2017: 101-105.
- [4] 林璋,祖先鹏,谢海胜,等. 肠道菌群与人体疾病发病机制的研究进展[J]. 药学报,2016, 51 (6): 843-852.
Lin Z, Zu XP, Xie HS, et al. Research progress in mechanism of intestinal microorganisms in human diseases [J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(6): 843-852.
- [5] 郭慧玲,邵玉宇,孟和毕力格,等. 肠道菌群与疾病关系的研究进展[J]. 微生物学通报,2015, 42(2): 400-410.
Guo HL, Shao YY, Meng HBLG, et al. Research on the relation between gastrointestinal microbiota and disease [J]. Microbiol Chin, 2015, 42(2): 400-410.
- [6] 谷莉. 不同鼠种的肠道菌群在不同饮食结构干预中的组成改变[D]. 长沙:中南大学,2014.
Gu L. The effect of of different diet on intestinal flora composition in different rat species [D]. Changsha: Central South University, 2014.
- [7] 杨永华,姚健.分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用[J]. 生物多样性,2000,8(3):337-342.
Yang YH, Yao J. Molecular techniques and their application to the study of microbial diversity [J]. Biodiv Sci, 2000, 8(3): 337-342.
- [8] 范薇. 实验小鼠肠道正常菌群[J]. 中国比较医学杂志, 2004,14(1): 58-60.
Fan W. Normal Intestinal Microflora of Mice [J]. Chin J Comp Med, 2004, 14(1):58-60.
- [9] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science, 2005, 308 (5728):1635-1638.
- [10] 李伟. 几种常用实验动物与人肠道主要菌群多样性比较[D]. 重庆:西南大学,2011.
Li W. Comparison of the diversity of the faecal microbiota among laboratory mouse, rat, miniature pig and human [D]. Chongqing: Southwest University, 2011.
- [11] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285):59-65.
- [12] 郭玉倩,角建林,袁鑫,等. 树鼩大肠内容物细菌的群落多样性分析[J]. 中国比较医学杂志,2018,28(9): 7-13+32.
Guo YQ, Jiao JL, Yuan X, et al. Diversity analysis of the tree shrew hindgut microbiota by Illumina PE250 sequencing technology [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(9): 7-13+32.

[收稿日期] 2018-10-19