

张飞燕,金洁,刘超,等. 基于高通量测序技术测定普通棉耳狨猴粪便微生物多样性[J].中国实验动物学报, 2019,27(3):366-373.

Zhang FY, Jin J, Liu C, et al. Analysis of microbial diversity in feces of the common cotton-eared marmosets by high-throughput sequencing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3):366-373.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.015

# 基于高通量测序技术测定普通棉耳狨猴 粪便微生物多样性

张飞燕<sup>1</sup>,金洁<sup>1</sup>,刘超<sup>1</sup>,王芸<sup>1</sup>,谢丽分<sup>1</sup>,张晓迪<sup>1</sup>,邬继文<sup>1</sup>,吕龙宝<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所,昆明 650000; 2. 中国科学院昆明灵长类研究中心,昆明 650223)

**【摘要】** **目的** 应用高通量测序技术分析普通棉耳狨猴粪便菌群的结构与组成,为进一步开发利用新型实验动物奠定基础。**方法** 采集4只成年雄性普通棉耳狨猴粪便,用细菌16S rRNA通用引物扩增V3~V4区,采用Illumina MiSeq测序平台对普通棉耳狨猴粪便微生物进行研究。**结果** 共测序获得315 511条有效序列与596个OTU。普通棉耳狨猴粪便中的细菌共鉴定出9个门、14个纲、26个目、50个科、82个属和64个种和226个OTU。其中,1)优势门是拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes),平均含量分别为54.52%和25.39% 2)丰度最高的纲为拟杆菌纲(Bacteroidia)和厌氧菌纲(Negativicutes),平均含量为54.5%和17%。3)乳杆菌目(Lactobacillales)和拟杆菌目(Bacteroidales)的丰度最高,为50.01%和20.52%。4)普雷沃菌科(Prevotellaceae)和双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae)所占丰度最高,平均含量分别为43.14%和11.33%。5)双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)的丰度较高,平均含量分别为11.33%和11.12%。6)有益菌群双歧杆菌属丰度较高,但在所检测样本中都含有。7)丰度最高的前10个种,归类为7个科、5个纲。这10个种占到33.16%,其他53种总和仅占到0.74%,其他未鉴定出菌种,且相对丰度还较高,需要进一步研究。8)PICRUSt功能预测分析:氨基酸转运等代谢功能和蛋白质翻译、折叠遗传信息处理功能丰度较高。**结论** 应用高通量测序技术,较全面的检测了普通棉耳狨猴粪便菌群,普通棉耳狨猴粪便细菌组成具有丰富的多样性,其中还有许多未被分类鉴定且相对丰度较高的细菌,需要进一步研究。

**【关键词】** 普通棉耳狨猴;粪便;高通量测序;物种组成;优势菌群

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)03-0366-08

## Analysis of microbial diversity in feces of the common cotton-eared marmosets by high-throughput sequencing

ZHANG Feiyan<sup>1</sup>, JIN Jie<sup>1</sup>, LIU Chao<sup>1</sup>, WANG Yun<sup>1</sup>, XIE Lifan<sup>1</sup>, ZHANG Xiaodi<sup>1</sup>, WU Jiwen<sup>1</sup>, LYU Longbao<sup>1,2\*</sup>

(1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650000, China.

2. Kunming Primate Research Center, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Corresponding author: LYU Longbao. E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

**【Abstract】** **Objective** To analyze the structure and composition of intestinal flora in the common cotton-eared marmoset using the Illumina MiSeq sequencing platform. **Methods** Feces of the common cotton-eared marmoset were collected and investigated for microbial diversity using the Illumina MiSeq sequencing platform. **Results** In total, 315511 sequences and 596 OTUs were obtained after sequencing. According to the Shannon-Wiener curve, the sequencing data

[作者简介] 张飞燕(1993—),女,硕士,研究方向:主要从事动物质量控制与检测。Email: 1175905001@qq.com

[通信作者] 吕龙宝(1974—),男,研究员,研究方向:主要从事实验动物学研究。Email: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

were reliable for all bacteria in the samples. The bacteria in the common cotton-eared marmoset included 9 phyla, 14 classes, 26 orders, 50 families, 82 genera, and 64 species. Among them, Firmicutes and Bacteroidetes had the highest abundance (54.52% and 25.39%, respectively). The dominant classes were Bacteroidia and Negativicutes at 54.5% and 17%, respectively. The abundance of Lactobacillales and Bacteroidales was higher at 50.01% and 20.52%, respectively. Dominant families were Prevotellaceae and Bifidobacteriaceae at 43.14% and 11.33% respectively. *Lactobacillus* and *Streptococcus* were dominant at 20.03% and 19.62%, respectively. The abundance of beneficial bacteria, such as *Bifidobacterium*, was high, which were found in samples. The top 10 species with the highest abundance were classified into seven families and five classes. These 10 species accounted for 33.16%, and the other 53 species only accounted for 0.74%. Other species were not identified, and the abundance was relatively high, which require further study. PICRUST functional prediction showed an abundance of functional genes such as those involved in amino acid transport and metabolism as well as genetic information processing. **Conclusions** The composition of fecal microbiota in common cotton-eared marmoset has rich diversity. Many bacteria that are relatively abundant remain unidentified, and further study is warranted.

**【Keywords】** common cotton-eared marmoset; feces; Illumina MiSeq; species composition; microbial diversity

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

微生物区系的生长受到胃肠道功能的影响,胃肠道的定植以共生的方式进化,微生物群对宿主有多种有益的作用<sup>[1]</sup>。微生物菌群通过抑制致病性肠内生物(如志贺菌、沙门菌)的定殖来保护宿主不受感染<sup>[2]</sup>。另外,微生物群对宿主的生理、能量代谢等也起重要作用。因此,普通绵耳狨猴肠道菌群的完整性与稳定性与健康息息相关。早期的培养技术,使用多种培养基和多个条件培养微生物,仅能检测到肠道微生物的一小部分,这部分细菌仅占胃肠道微生物的1%左右<sup>[3]</sup>。分子鉴定方法仍然存在分辨率较低、重复性差、操作繁琐等缺点,如 DGGE 技术,只能对 200~700 bp 的片段有效地分离,过大或者过小的片段分离效果都不是很好等问题<sup>[4]</sup>,仅能检测到占总量 1% 以上的微生物。基于高通量测序能全面检测样品,数据量大、测序快速等优点,已被普遍用于细菌多样性分析<sup>[5]</sup>。

普通绵耳狨猴是一种体型小的新大陆猴,雌雄的身高相仿,雄性平均高 188 mm,雌性平均高 184 mm,雄性体重比雌性稍重,成年雌性体重在 230~340 g,成年雄性体重在 250~450 g,毛色由棕、灰、黄三色组成,耳朵周围由白色的毛形成簇,尾巴带有条纹,面部皮肤较暗,暴露于灯光下颜色较深,前额皮肤呈白色。普通绵耳狨猴体型比恒河猴小,更容易安置;每年生育 2 次,繁殖率高、方便实验操作且不易携带猴 B 病毒等优势,此外,狨猴比体型较大的猴成熟和衰老的速度更快,更有利于发育和衰老疾病的研究<sup>[6-7]</sup>。近年来,美国等国家兴起了狨猴热,呼吁加强狨猴科学研究。狨猴作为诸多学科研究用的非人灵长类实验动物,相关标准也在拟定,

然而,目前有关普通绵耳狨猴肠道细菌的报道较少。这些研究主要采用的是传统的培养技术,以及以克隆/测序为主要手段的分子生物学技术。缺乏有关普通绵耳狨猴肠道细菌的高通量测序研究。因此,普通棉耳狨猴在其实验动物化培育过程中,微生物检测及其相关研究很重要。本试验旨在应用高通量测序技术研究本单位引进的实验用普通棉耳狨猴细菌结构与组成,为进一步开发利用这一新型实验动物奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

雄性棉耳狨猴 4 只,来源于重庆第三军医大动物中心,体重 370~420 g,饲养和实验均在中国科学院昆明灵长类研究中心进行【SCXK(滇)K2017-003】和【SYXK(滇)K2017-0008】,恒温恒湿环境,室温控制在 26~28℃,相对湿度在 35%~60%,每天自然光照时间为 7:30-18:30,期间配合日光灯照射。每日饲喂配合饲料,辅以清洁水果,自由饮水。

#### 1.1.2 样本采集

准备好粪便容器收集粪样,戴无菌手套采取新鲜粪便中段内部 5 g 左右,编号 C1、C2、C3、C4,迅速放到液氮罐中,带回实验室-80℃冰箱待检。所有粪样采集时争取在排泄后 10 min 内完成。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

Phusion © High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, 高效高保真酶(New England Biolabs 公司), GeneJET 胶回收试剂盒(Thermo Scientific 公

司), IonS5TMXL 测序平台。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌总 DNA 提取及 PCR 扩增

采用 CTAB 方法对 4 个样本的基因组 DNA 进行提取, 之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 稀释样品至 1 ng/ $\mu$ L。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 针对 16S RNA 的 V3-V4 区 (338F-806R), 使用带 Barcode 的特异引物进行 PCR 扩增。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测; 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 剪切回收目标条带。使用 Thermo GeneJET 胶回收试剂盒 (Thermo Scientific 公司) 回收。

### 1.2.2 文库构建和上机测序

使用 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后, 使用 Thermofisher 的 Ion S5TMXL 进行上机测序。

## 1.3 统计学分析

测序后的数据进行统计优化分析, 样品复杂度分析, 计算 Chao 指数、Ace 指数、Sobs 指数和覆盖指数 (Coverage) 等多样性指数, 绘制样品稀释曲线, 对 OTUs 代表序列在不同分类水平上进行物种注释及粪便有益菌群分析。

## 2 实验结果

### 2.1 测序水平

本研究利用 Illumina MiSeq 测序平台对 4 个普通棉耳猴粪便样本的 V3-V4 区进行测序研究, 测序数据经过滤嵌合体后优化分析, 共得到 31 5511 条有效序列, 平均每个样本获得 78 878 条序列; 通过对测序数据按 97% 的相似水平进行聚类分析, 共获得 596 个 OTU, 平均每个样本 149 个。

### 2.2 样品的复杂度分析

对 4 个样品在 97% 一致性阈值下的  $\alpha$  多样性指数 (Alpha Diversity) 分析指数 (Shannon、Simpson、chao1、ACE、Good's coverage) 进行统计分析, 普通棉耳猴粪便细菌的 Shannon 指数是 3.786, Chao 指数是 160, Simpson 指数为 0.88, 通过 Shannon 稀释曲线分析 (图 1), 4 个样本的曲线都趋近平缓, 并且覆盖度 Good's coverage 达到 99.99%, 两者共同说明了对所取样本微生物群落的检测比率接近饱和, 目前的测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种。

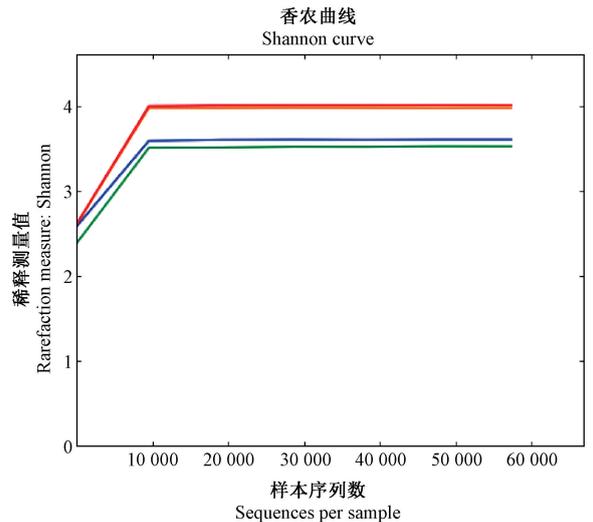


图 1 Shannon 指数稀释曲线

Figure 1 Shannon rarefaction curves

选用 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离两个指标来衡量两个样品间的相异系数, 其值越小, 表示这两个样品在物种多样性方面存在的差异越小。以 Weighted Unifrac 和 Unweighted Unifrac 距离绘制的 Heatmap 展示结果 (图 2), 图中样品 C4 与 C1 的加权及非加权距离分别为 0.211 和 0.310, C3 与 C1 的加权及非加权距离分别为 0.693 和 0.348, 样品 C2 与 C1 的加权及非加权距离分别为 0.159 和 0.342, 说明 C2 与 C1 样品的物种组成相似, C4 与 C1 的物种多样性差异比 C3 与 C1 之间的物种多样性差异小。

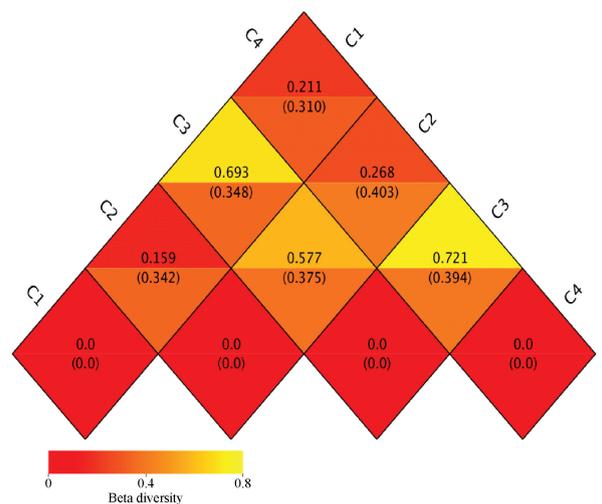


图 2 Beta 多样性指数热图

Figure 2 Beta diversity index heatmap

### 2.3 物种注释

本研究普通棉耳猴粪便细菌鉴定出有 9 个

门、14 个纲、26 个目、50 个科、82 个属和 64 个种和 226 个 OTU。

### 2.3.1 在门水平上的菌群组成

在门水平上,物种组成分析共获得 9 个门,拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为优势菌门,其次门水平含量大于 1% 的有放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)。其他 3 个门为柔膜菌门(Tenericutes)、Spirochaetes、Melainabacteria 仅占到 0.008%。柔膜菌门(Tenericutes)和 Melainabacteria 仅在 C4 样品中存在(图 3)。

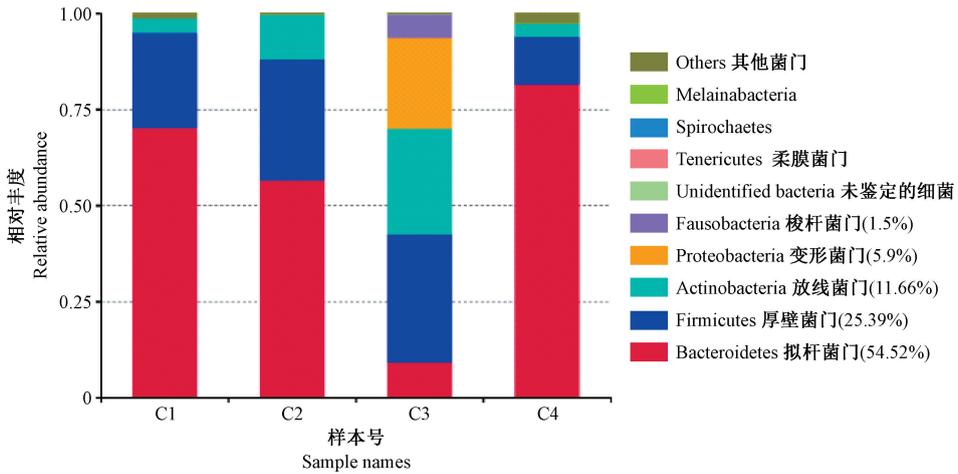


图 3 门水平上的菌群组成

Figure 3 Community analysis pieplot on phylum level

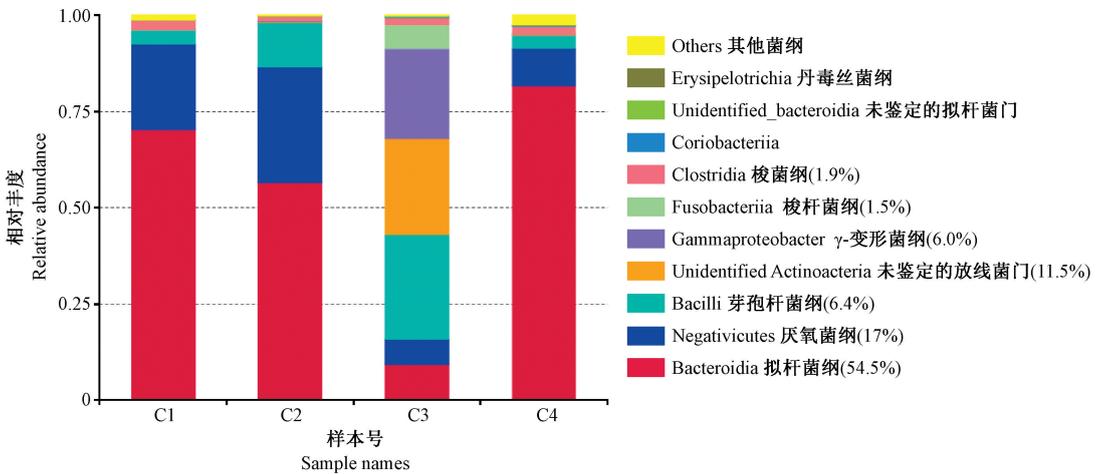


图 4 纲水平上的菌群组成

Figure 4 Community analysis pieplot on class level

### 2.3.3 在目水平上的菌群组成

在目水平上,共获得 26 目,拟杆菌目(Bacteroidales)和 Selenomonadales 目,丰度大于 1% 的目有双歧杆菌目(Bifidobacteriales),乳杆菌目

### 2.3.2 在纲水平上的菌群组成

在纲水平上,共获得 14 个纲,拟杆菌纲(Bacteroidia)和厌氧菌纲(Negativicutes)为优势菌纲。其次丰度大于 1% 的纲有放线菌纲(Actinobacteria),芽孢杆菌纲(Bacilli), $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria),梭菌纲(Clostridia),梭杆菌纲(Fusobacteriia)。丰度排在前十的纲还有丹毒丝菌纲(Erysipelotrichia)、Coriobacteriia 纲。其中  $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)三大纲均匀分布在 C3 样品中(图 4)。

(Lactobacillales),巴斯德菌目(Pasteurellales),肠杆菌目(Enterobacteriales),梭菌目(Clostridiales),梭杆菌目(Fusobacteriales)。丰度排在前十的目还有芽孢杆菌目(Bacillales)、Coriobacteriales。(见图 5)

### 2.3.4 在科水平上的菌群组成

在科水平上,共获得 50 个科,普雷沃菌科 (Prevotellaceae) 和双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae) 所占丰度最高,其次丰度大于 1% 的拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、氨基酸球菌科

(Acidaminococcaceae)、韦荣球菌科 (Veillonellaceae)、明串珠菌科 (Leuconostocaceae)、巴斯德菌科 (Pasteurellaceae)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)、梭杆菌科 (Fusobacteriaceae)、链球菌科 (Streptococcaceae)。(见图 6)

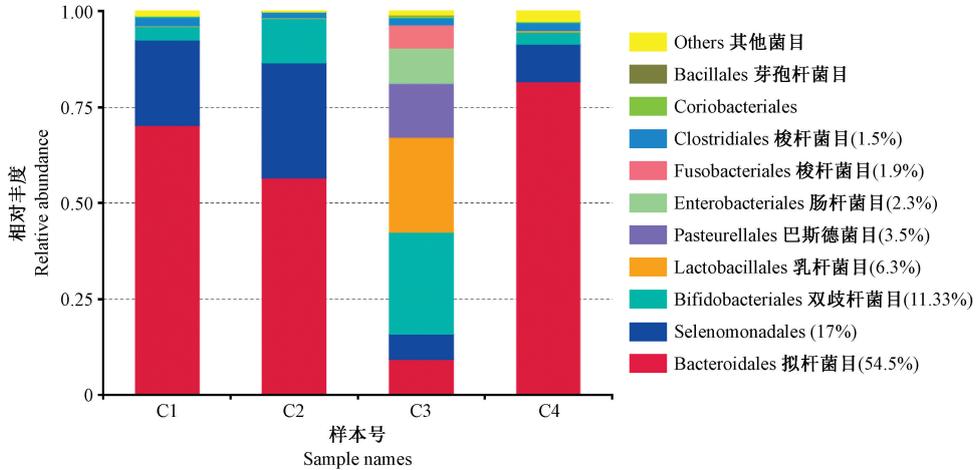


图 5 目水平上的菌群组成

Figure 5 Community analysis pieplot on order level

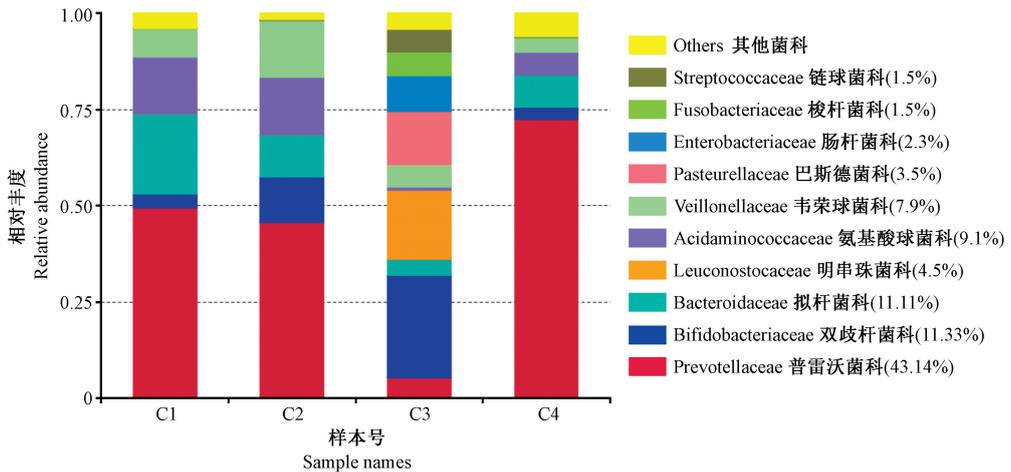


图 6 科水平上的菌群组成

Figure 6 Community analysis pieplot on family level

### 2.3.5 在属水平上的菌群组成

在属水平上,共获得 82 属,丰度前 10 的属,双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*),拟杆菌属 (*Bacteroides*),魏斯菌属 (*Weissella*),未鉴定的普雷沃菌科 (unidentified \_ Prevotellaceae),考拉杆菌属 (*Phascolarctobacterium*),*Aggregatibacter* 属,链球菌属 (*Streptococcus*),拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*),帕拉普菌属 (*Paraprevotella*),梭菌属 (*Fusobacterium*)。通过结果分析发现有益细菌双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的丰度相对较高,平均含量:

11.33%,在所检测样本中都含有。另外,通过多序列比对得到 top100 属的代表序列的系统发生关系,拟杆菌属 (*Bacteroides*) 这个属,属于 Bacteroidetes 门,在四个分组中都存在,在 C1 样本内丰度高于 C2 样本,在 C3 组内丰度最小。变形菌门中的 *Aggregatibacter* 属,厚壁菌门中的明串珠菌属 (*Leuconostoc*),魏斯菌属 (*Weissella*),梭杆菌门中的梭菌属 (*Fusobacterium*) 仅在 C3 样品中存在。放线杆菌门中的双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 在四个样品中都存在,在 C3 样品内丰度高于 C2 样本,在 C1 样

本丰度最小。(见图 7)

### 2.3.6 在种水平的菌群组成

丰度最高的前 10 个种,归类为 7 个科、5 个纲(表 1)。即拟杆菌科、普雷沃菌科、双歧杆菌科、梭杆菌科、明串珠菌科、链球菌科、巴斯德菌科。这 10

个种,隶属于拟杆菌纲、放线菌纲、梭杆菌纲、芽孢杆菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲 5 个纲。这 10 个种占到 33.16%,其他 53 种总和仅占到 0.74%,其他未鉴定出的大部分菌种,相对丰度还较高,需要进一步的研究。

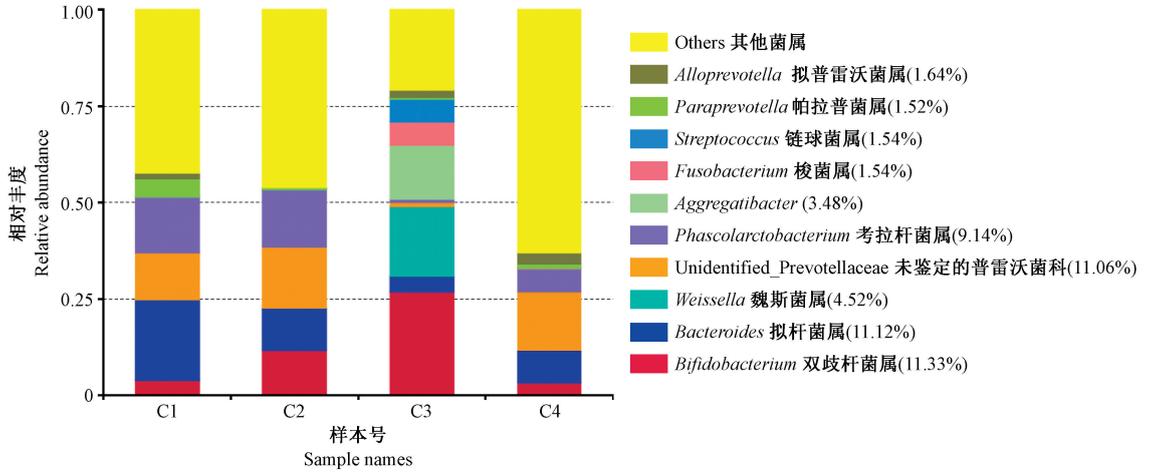


图 7 属水平上的菌群组成

Figure 7 Community analysis pieplot on genus level

表 1 种水平上丰度较高的 10 个种及其在纲和科水平上的归类

Table 1 Ten species with higher abundance and their classification on class and family levels

纲 Classes	科 Families	种 Species	丰度(%) Abundance(%)
拟杆菌纲 Bacteroidia	拟杆菌科 Bacteroidaceae	普通拟杆菌 <i>Bacteroides vulgatus</i>	8.35
		卵形拟杆菌 <i>Bacteroides ovatus</i>	2.31
		单形拟杆菌 <i>Bacteroides uniformis</i>	0.11
		人体普菌 <i>Prevotella copri</i>	8.11
放线菌纲 Actinobacteria	双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae	双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium sp_MRM_522</i>	4.38
梭杆菌纲 Fusobacteriia	梭杆菌科 Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium canifelinum</i>	1.00
	明串珠菌科 Leuconostocaceae	食窦魏斯菌 <i>Weissella cibaria</i>	4.52
芽孢杆菌纲 Bacilli	链球菌科 Streptococcaceae	血链球菌 <i>Streptococcus sanguinis</i>	7.57
		中间链球菌 <i>Streptococcus intermedius</i>	1.80
$\gamma$ -变形菌纲 Gammaproteobacteria	巴斯德菌科 Pasteurellaceae	嗜沫凝聚杆菌 <i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	3.48

### 2.3.7 PICRUS 功能预测

根据所有样品在 KEGG 数据库中的功能预测及丰度信息,选取丰度排名前 35 的功能及它们在

每个样品中的丰度信息绘制热图,并从功能差异层面进行聚类。以基于 ko 的丰度聚类热图为例展示如下(图 8);通过功能预测,发现氨基酸转运代谢、

能量代谢等代谢功能很丰富,以及蛋白修饰、折叠、翻译等遗传功能丰富,结果表明狢猴体内的微生物代谢和遗传信息处理功能很丰富。

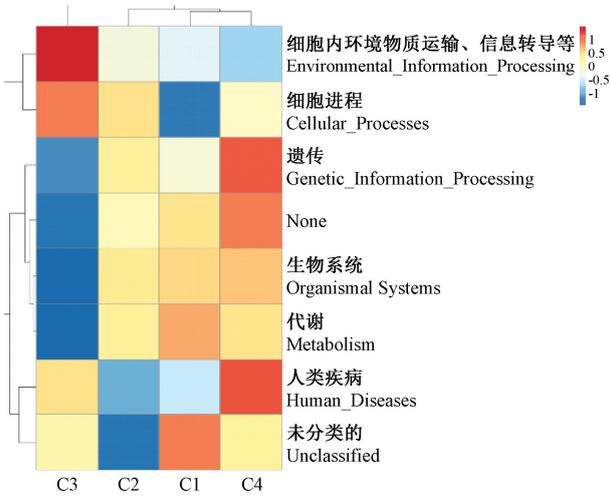


图 8 功能丰度聚类分析图

Figure 8 Functional cluster heatmap

### 3 讨论

目前,有关普通棉耳狢猴肠道菌群的研究报道甚少。基本上都是基于传统分离培养和分子鉴定法。有研究表明,采用宏基因组学测序能检测到 $>10^6$  每克粪便的细菌,PCR $>10^4$  每克粪便的细菌,培养组学 $>10^2$  每克粪便的细菌<sup>[8-10]</sup>。高通量测序技术与传统分离培养方法和分子鉴定方法相比具有检测阈值更低,能全面检测样品,数据量大、测序快速等优点。本实验通过高通量测序技术,研究普通棉耳狢猴粪便微生物在不同分类水平上的组成及有益菌群分析。本试验采用的是基于半导体芯片技术的 IonS5TMXL 测序平台,通过半导体芯片直接将化学信号转换为数字信号,不需要激光、照相机或标记,相比 HiSeq2500 读长更长,更简单、更快速、更灵活,为微生物多样性研究提供更多的选择<sup>[11]</sup>。本试验的 shannon 稀释曲线趋近平缓及本试验的覆盖度(Good's coverage)达到 99.99%,说明了对所取样本微生物群落的检测比率接近饱和。目前的测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种。根据距离绘制的 Heatmap 图分析表明 4 个样本间的菌群组成有差异。4 只健康普通棉耳狢猴粪便微生物的种类和数量不完全相同可能由个体身体状况、饮食量等试验样品本身差异造成。本研究共鉴定出普通棉耳狢猴粪便菌群的有 9 个门、14 个纲、26 个目、50 个科、82 个属和 64 个种和 226 个 OTU。

通过 OTU 聚类分析和物种组成分析,其中拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为优势菌门,平均含量 54.52% 和 25.39%。伊丽娜等<sup>[12]</sup>文献综述报道其中拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为非人灵长类肠道菌群的优势菌门,与本次研究结果一致。另外,朱乃军等<sup>[13]</sup>通过对 40 只普通棉耳型狢猴粪便菌群进行研究分析,通过培养法筛选出变形菌门的大肠杆菌、厚壁菌门的粪肠球菌在所有样本中的分离率高达 90 以上,与我们所检测到的主要菌门一样,但在种属层面上差异很大。在属的水平上,析发现有益细菌双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的丰度相对较高,平均含量 11.33%,在 4 个样本中都含有。科学研究表明双歧杆菌是存在于人和动物体内重要的益生菌,具有调节肠道微生态平衡、促进氨基酸代谢,改善脂质代谢等对宿主的营养作用,增强机体免疫,降解体内有毒物质抑制肿瘤生长等生理功能<sup>[14-15]</sup>。总之,双歧杆菌在动物疾病预防、营养等方面具有重要的作用。近年来,双歧杆菌制剂已被广泛的应用到猪、鸡、兔等养殖方面,并证实在提高动物生长性能方面具有良好的作用<sup>[16]</sup>。目前,双歧杆菌制剂在非人灵长类(普通棉耳狢猴)上还没应用,这也是将来开发的一个方向。

本研究采用 16S RNA 测序技术在种水平上仅能鉴定出一部分,其中拟杆菌所占的比例最大。拟杆菌在人类消化道中占主要部分,健康状态下,拟杆菌是肠道菌群的重要组成部分,与其他菌共同行使肠道菌群的正常功能<sup>[17]</sup>。还有一大部分相对丰度较高的菌种需要进一步研究。由于本研究选择的 16S rRNA 测序一般研究深度到属水平,全基因组测序研究到种水平。因此,未来综合利用转录组、蛋白组或代谢组多种组学技术对生物样本进行系统研究,可进一步探究微生物的群体功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系,发掘潜在的生物学意义,为进一步了解普通棉耳狢猴这种新型实验动物奠定基础。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Huang G, Ye L, Du G, et al. Effects of curcumin plus Soy oligosaccharides on intestinal flora of rats with ulcerative colitis. [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(7): 20-25.
- [2] Zhang J, Chen SL, Li LB. Correlation between intestinal flora and serum inflammatory factors in patients with Crohn's disease [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(21): 4913-4917.
- [3] Zhu H, Zeng D, Wang N, et al. Microbial community and

- diversity in the feces of Sichuan takin (*Budorcas taxicolor tibetana*) as revealed by Illumina Miseq sequencing and quantitative real-time PCR [J]. *AMB Express*, 2018, 8 (1): 68.
- [ 4 ] Ramezani M, Hosseini SM, Fazeli SAS, et al. PCR-DGGE analysis of fungal community in manufacturing process of a traditional Iranian cheese [J]. *Iran J Microbiol*, 2018, 10(3): 180-186.
- [ 5 ] Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys [J]. *Dev Psychobiol*, 2015, 35(2): 146-155.
- [ 6 ] Jones CA, Duffy MK, Hoffman SA, et al. Vocalization development in common marmosets for neurodegenerative translational modeling [J]. *Neurol Res*, 2018, 40(4): 303-311.
- [ 7 ] Ash H, Smith TE, Knight S, et al. Measuring physiological stress in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): Validation of a salivary cortisol collection and assay technique [J]. *Physiol Behav*, 2018, 185(3): 14-22.
- [ 8 ] Guo Z, Zhang J, Wang Z, et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20602.
- [ 9 ] Tang R, Wei Y, Li Y, et al. Gut microbial profile is altered in primary biliary cholangitis and partially restored after UDCA therapy [J]. *Gut*, 2018, 67(3): 534-541.
- [ 10 ] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 463-467.
- [ 11 ] Perruzza L, Gargari G, Proietti M, et al. T Follicular helper cells promote a beneficial gut ecosystem for host metabolic homeostasis by sensing microbiota-derived extracellular ATP [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(11): 2566-2575.
- [ 12 ] 伊丽娜, 刘学聪, 蒋志刚. 非人灵长类肠道菌群组成及影响因素 [J]. *动物学杂志*, 2018(3). 53(3): 479 - 494.  
Yi LN, Liu XC, Jiang ZG. Gut bacterial composition and its influencing factors of non-human primates [J]. *Chin J Zool*, 2018(3). 53(3): 479-494.
- [ 13 ] 朱乃军, 项建梅, 陈祖培, 等. 棉耳型狨猴肠道菌群的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 1998(2):101-103.  
Zhu NJ, Xiang JM, Chen ZP, et al. Study on intestinal flora of Cotton-eared marmoset [J]. *Chin J Comp Med*, 1998(2):101-103.
- [ 14 ] Rintilä T, Kassinen A, Malinen E, et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 97(6): 1166-1177.
- [ 15 ] Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq illumina sequencing platform [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(17): 5112-5120.
- [ 16 ] Martin R, Nauta AJ, Ben AK, et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy [J]. *Benef Microbes*, 2010, 1(4): 367-382.
- [ 17 ] 潘勇. 肠道菌群与大肠癌发病风险的相关性研究 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2017, 9(2): 88-92.  
Pan Y. The study on the relationship between microbial community in intestine and colorectal cancer [J]. *Chin J Front Med Sci (Elect Ver)*, 2017, 9(2): 88-92.

[ 收稿日期 ] 2018-12-07