

猪胃肠道内容物和黏膜样品采集与微生物组成分析

The collection of gastrointestinal content and mucosa from pigs for the analysis of microbial community

李佳彦^{1, 2, 3, 4, 5 #}, 李华^{1, 2, 3, 4, 5 #}, 罗玉衡^{1, 2, 3, 4, 5 *}

¹ 农业部动物抗病营养与饲料重点实验室, 成都, 四川省; ² 动物抗病营养教育部重点实验室, 成都, 四川省; ³ 动物抗病营养四川省重点实验室, 成都, 四川省; ⁴ 动物营养与饲料工程四川省高校重点实验室, 成都, 四川省; ⁵ 动物营养研究所, 四川农业大学, 成都, 四川省

*通讯作者邮箱: luoluo212@126.com

#共同第一作者/同等贡献

摘要: 猪不仅是重要的家畜, 也是一种经典的模式动物, 因其与人类具有较为相似的解剖生理结构。对猪胃肠道微生物组成和功能分析, 有助于深入研究单胃动物消化道微生物在宿主营养代谢、肠道健康、免疫防御、疾病发生等过程中的作用。胃肠道微生物的种类和丰度根据其空间分布而存在较大差异, 除内容物 (食糜) 外, 胃肠道黏膜中也存在大量特殊的微生物群体, 因而在实际采样过程中, 食糜和黏膜是两种重要的样本类型。由于微生物广泛存在于各种环境, 样品的采集流程和操作方式对肠道微生物相关的实验结果有直接影响, 这一问题在环境条件极为复杂的养殖场更为突出。因此, 标准化的样本采集流程和分析程序是保证实验的可靠性和重复性的必要条件。本文针对猪的胃肠道内容物和黏膜样本, 介绍了其无菌采集和基因组 DNA 提取的详细方法, 同时简要描述了微生物组成的分析方法。

关键词: 猪, 食糜, 黏膜, DNA 提取, 微生物组成分析

材料与试剂

1. 各种型号 (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L) 移液枪头
2. 离心管 (EP 管, 1.5 mL/2 mL)
3. 一次性无菌手套
4. 灭菌药勺
5. 75% 酒精棉球

- 31 6. 灭菌载玻片
- 32 7. 灭菌吸水滤纸
- 33 8. Tris-HCl
- 34 9. 95%和 70%乙醇
- 35 10. RNA 酶 (天根生化科技有限公司)
- 36 11. 苯酚-氯仿-异戊醇溶液 (体积比: 25:24:1)
- 37 12. PCR 用 8 联管
- 38 13. 细菌、古菌、真菌通用 PCR 引物
- 39 14. Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific 公司)
- 40 15. 琼脂糖 (西班牙 Biowest 公司)
- 41 16. GeneJET 胶回收试剂盒 (Thermo Scientific 公司)
- 42 17. Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒 (Thermofisher 公司)
- 43 18. CATB buffer (溶液配方)
- 44 19. TE buffer (见溶液配方)
- 45 20. 3 M 醋酸钠 (NaAc) 溶液 (见溶液配方)
- 46 21. TAE 缓冲液 (见溶液配方)

47

48 仪器设备

- 49 1. 涡旋仪
- 50 2. 离心机 (Thermo Scientific Sorvall Legend Micro 21R 微量离心机)
- 51 3. PCR 仪 (Bio-rad T 100 梯度 PCR 仪)
- 52 4. 恒温水浴锅
- 53 5. 移液枪
- 54 6. MP 研磨仪 (美国 MP Biomedicals FastPrep-24 5G)
- 55 7. NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Scientific)
- 56 8. Bio-rad ChemiDoc XRS 凝胶成像系统
- 57 9. Dark reader 荧光投射切胶仪
- 58 10. 制胶槽
- 59 11. Thermofisher IonS5TMXL 测序平台

实验步骤

1. 猪胃肠道内容物采集

1.1 在动物试验结束时,通过前腿肩胛骨以上的位置或者耳根后 3cm 的位置注射戊巴比妥钠 (59 mg/kg 体重) 麻醉并处死试验猪。

1.2 固定:所有手术器械提前用 75%酒精浸泡消毒。猪处死后,首先切断肩胛骨内侧和髋关节周围肌肉,将四肢向外侧摊开,仅以皮肤将四肢与躯干相连,以固定尸体为仰卧位。

1.3 开腹:从剑状软骨后方沿腹壁正中线由前向后至耻骨联合处切开腹壁,再从剑状软骨沿左右两侧肋骨后缘切开至腰椎横突,使腹壁被分为大小相等的两楔形,将其向两侧分开。

1.4 分离肠道:将小肠移向左侧,以暴露直肠,在骨盆腔中单结扎。切断直肠,左手握住直肠断端,右手持刀,从前往膈部方向割断肠系膜根部等各种联系,至膈时,在胃贲门前端单结扎并剪断食管,取出全部胃肠道。再按胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠等不同肠段分别进行两端结扎并分离各段消化道。

1.5 将分离好的各段消化道置于灭菌锡箔纸上,用灭菌医用剪刀将胃和各肠段中部剪开一个小口,再用灭菌药勺挖取大约 2 g 内容物分装到已灭菌的 2 mL 冻存管中,旋紧螺盖后迅速放入液氮或-80 °C 超低温冰箱中保存待用。

2. 猪胃肠道黏膜采集

2.1-2.4 同上述 1.1-1.4 步骤

2.5 将分离好的各段消化道置于灭菌锡箔纸上,用灭菌医用剪刀将胃壁裁剪约 8 cm²,十二指肠截取约 10 cm,其他各肠段截取约 20 cm,用无菌生理盐水将上述组织内壁轻轻冲洗干净,至内壁没有肉眼可见的粘附内容物为止。之后,将除胃以外的各肠段沿中线纵向剪开,再用灭菌载玻片轻柔刮取胃/肠内壁,载玻片与组织的角度约为 45°,将刮下的黏膜分装到灭菌后的 2mL EP 管中,迅速放入液氮或-80 °C 超低温冰箱中保存待用。

3. 食糜和黏膜基因组 DNA 的提取

3.1 取出样品后,放置在冰上解冻。

3.2 在灭菌后的 2 mL 螺口离心管中加入 300 mg 铅珠，称取约 0.3 g 内容物/黏膜加入管中，再加入 900 μ L 70 °C 预热的 CTAB buffer，旋紧螺口，置于 MP 研磨仪，选择 faeces/Mucosa 程序 (程序包含: beats 1min，室温静置 1 min；上述步骤重复 3 次)

3.3 将研磨后的螺口离心管置于恒温水浴锅中 70 °C 孵育 20 min，后取出，以 9,300 $\times g$ 离心 10 min。

3.4 吸取上清 700-850 μ L，加入 3-5 μ L RNA 酶 (10 mg/mL)，37 °C 水浴孵育 15-30 min。

3.5 加入 700 μ L 配制好的酚-氯仿-异戊醇溶液，使用涡旋仪震荡 40 s 以充分混匀。

3.6 充分混匀后离心 (15,700 $\times g$ ，10 min, 4 °C)，取上清 600-750 μ L 至新的 1.5 mL EP 管中。

3.7 加入 600 μ L 酚-氯仿-异戊醇，震荡 40 s，充分混匀后离心 (15,700 $\times g$ ，10 min, 4 °C)，取上清 500-600 μ L 至新的 1.5 mL EP 管中。

3.8 加入 800 μ L 95%的冰乙醇和 3 M 的醋酸钠溶液 40 μ L，放-20 °C 冰箱中过夜。

3.9 过夜后，取出离心 (15,700 $\times g$ ，20 min, 4 °C)，再弃上清，后加入 500 μ L 70%的冰乙醇，轻轻弹起沉淀。

3.10 离心 (15700 $\times g$ ，5 min，4 °C)，再弃上清，后倒置于干净吸水纸上自然干燥 2 h 左右，直至管内壁没有肉眼可见的水珠为止。

3.11 加入 50-100 μ L TE buffer，涡旋混匀 30 s，之后 70 °C 水浴孵育 5 min。

3.12 用 NanoDrop 2000 测定 DNA 的浓度和纯度，并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性，将制备好的 DNA 溶液保存于 -80 °C 备用。

4. 扩增子文库构建和序列分析

4.1 模板 DNA 的制备：取适量 DNA 样品于离心管中，使用灭菌双蒸水稀释样品至 1 ng/ μ L，作为模板。

4.2 引物：使用带 Barcode 的通用引物扩增得到相应的 PCR 产物。其中，细菌的扩增可采用针对 16S rRNA V3-V4 区的通用引物 343F-806R (5'-TACGGRA GGCAGCAG-3'和 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Itoh *et al.*, 2014)；古菌的扩增可采用通用引物 341F-806R (5'-CCTAYGGGRBGCASCA G-3'和 5'-GGACTACHVGGGTWTCAAT-3')[†] (FRANK *et al.*, 2013)；真菌的扩增可采

用 ITS rDNA 通用引物 ITS1-ITS4(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 5'-TCTCCGCTTATTGATATGC -3') (White *et al.*, 1990) 。

4.3 反应体系和扩增程序：使用 New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer。使用高效和高保真的酶进行 PCR，确保扩增效率和准确性。PCR 反应体系 (30 µL) 包括：Phusion Master Mix (2x) 15 µL、上下游引物 (2 µM) 各 3 µL、基因组 DNA (1 ng/µL) 10 µL、灭菌双蒸水 (2 µL)

1) 细菌序列扩增反应程序 (Itoh *et al.*, 2014) : 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s、56 °C 30 s、68 °C 45 s 共 35 个循环; 68 °C 延伸 5 min。

2) 古菌序列扩增反应程序(FRANK *et al.*, 2013) : 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s、50 °C 30 s、72 °C 30s 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

3) 真菌序列扩增反应程序 (White *et al.*, 1990) : 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min、55 °C 1 min、72 °C 1.5 min 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

使用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测上述 PCR 产物，采用 NanoDrop 2000 测定产物浓度。

4.4 PCR 产物的混合、纯化：根据 PCR 产物浓度进行等质量混样，充分混匀后使用 2%琼脂糖凝胶电泳 (1x TAE buffer) 对 PCR 产物进行浓缩，割胶回收目标条带，采用 GeneJET 胶回收试剂盒 (Thermo Scientific) 对 PCR 产物进行纯化。

4.5 文库构建和测序：使用 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库构建，构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后，使用 IonS5TMXL 测序平台单端测序 (Single-End) 法进行上机测序。

4.6 信息分析流程：采用 Cutadapt 软件 (V1.9.1, <http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>) (Bolger *et al.*, 2014) 去除低质量、Barcode 和引物序列后得到原始数据 (Raw reads) 。原始数据再进行质控过滤，得到有效数据 (Clean Data) 。以序列相似度 97%为标准，使用 UPARSE (Edgar and Robert C, 2013) 软件对所有有效序列进行可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU) 聚类分析。采用 UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) 检测并去除 PCR 扩增过程产生的嵌合体，采用 Usearch_global 方法分析各 OTU 丰度。之后，与参考数据库

(细菌和古菌可参考 Greengenes 或 SLIVA 数据库, 真菌可参考 UNITE 数据库) 进行比对, 采用 QIIME 软件 (http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html) 及 RDP Classifier 贝叶斯算法 (Version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 对每个 OTU 中的所有序列进行分析和注释, 在各分类水平统计样品的微生物群落组成。最后, 在以上分析的基础上, 可以进行基于 OTUs 和物种组成的聚类分析。用 QIIME 软件计算样品的 α -多样性指数 (Shannon 指数、覆盖率、OTU 数和 Chao1 指数), 并基于 UniFrac 距离分析样品的 β -多样性。用 R 软件 (Version 4.0.1) ade4、vegan、WGCNA、ggplot2 等软件包进行 PCA, PCoA、NMDS、CCA 和 RAD 分析, 挖掘物种的组间差异, 并结合环境因素 (如日粮结构、营养素、生产表型、健康表型、微生物代谢产物浓度等) 进行关联分析, 并对结果进行可视化。

注意事项

1. 在采集胃肠道内容物和黏膜的过程中, 分离各段消化道时, 锡箔纸下方须垫冰袋, 以保证采样过程的低温。
2. 采集各肠段内容物或黏膜时, 每头猪须尽量在同一位点进行取样, 以最大程度降低取样部位不同带来的误差, 可用标尺对取样位点进行准确定位。
3. 刮取肠道黏膜时力道尽量轻柔、均匀, 不能刮破胃肠壁; 一般对每头猪而言, 肠黏膜样品装至一支 2 mL 冻存管的 3/4 满即可, 视具体情况酌量增、减。
4. 无论采集内容物或黏膜样本, 一次性手套、采集勺或载玻片均应“一猪一换”和“一部位一换”, 切不可混用造成样品污染。
5. 采样过程注意无菌操作, 采样人员需严格佩戴口罩; 采样房间应提前用紫外灯照射 1 h; 操作台应事先采用 75%酒精喷洒消毒。
6. 在 DNA 提取过程中, 如果样品研磨后非常黏稠, 可吸取部分糊状物到新的锆珠管中, 再加入 700 μ L CTAB buffer, 混匀后 70 $^{\circ}$ C 孵育, 再重复之前的步骤。
7. 用于 PCR 扩增的所有试剂均应事先置于冰上融化, 用完后及时放回 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
8. 进行 PCR 扩增时为了保证数据的可靠性, 需要设置阴性对照 (不加 DNA 模板, 以同体积的灭菌双蒸水替代) 和阳性对照 (如单一菌株的 DNA)。

9. 在进行 PCR 扩增前，模板必须进行纯化，以及引物序列必须进行优化，以保证 PCR 反应的专一性。

10. 实验过程中所使用的各类耗材必须经过灭菌处理。

溶液配方

1. CTAB buffer

CTAB (北京博奥拓达科技有限公司) 4 g, NaCl 16.364 g, 1 M 的 Tris-HCl 20 mL (pH 8.0), 0.5 M 的 EDTA 溶液 8 mL, 先用 70 mL 去离子水溶解, 再定容至 200 mL, 121 °C, 20 min 高压灭菌后, 待用。

2. TE buffer

首先用 900 mL 的去离子水溶解 1.576 g 的 Tris-HCl; 加 2 mL 0.5 M 的 EDTA (pH 8.0); 调整 pH 至 7.6; 用去离子水定容至 1.0 L, 121 °C, 20 min 高压灭菌后, 待用。

3. TAE buffer

3.1 50× TAE buffer 的配制

称取 242 g 的 Tris、37.2 g 的 Na₂EDTA·2H₂O 至 1 L 螺口 (广口) 玻璃瓶, 加入 800 mL 的去离子水, 充分搅拌溶解, 加入 57.1 mL 冰醋酸, 上下颠倒混匀。加去离子水定容至 1.0 L, 室温保存。

3.2 1× TAE buffer 的制备

使用时, 用双蒸水将提前配制好的 50× TAE buffer 稀释为 1× TAE buffer。例如, 使用 10 L 的带嘴塑料壶, 倒入 200 mL 50× TAE, 再用双蒸水定容至 10.0 L, 混匀备用。

4. 3 M 的醋酸钠溶液

将 408.1 g 的 NaAc·3H₂O 溶于 800 mL 去离子水中。用冰醋酸将 pH 调至 5.2 后。加入去离子水定容至总体积为 1.0 L。121 °C, 20min 高压灭菌后, 待用。

致谢

本工作受国家自然科学基金 (31872369、32072743) 和四川农业大学双支计划项目资助, 特致感谢! 目前已应用本实验方案发表文章 30 余篇, 部分如下:

1. 罗玉衡, 陈洪, 余冰, 等. [短期或长期饲喂高水平豌豆纤维对猪盲肠微生物群落结构和代谢产物的影响](#). 畜牧兽医学报, 2017, 48(8):1459-1467.
2. 张玲, 罗玉衡, 陈代文, 等. [饲粮中短期内单独及混合添加高水平燕麦 \$\beta\$ -葡聚糖和微晶纤维素对小鼠生长性能、器官指数和粪便细菌群落结构的影响](#). 动物营养学报, 2017, 29(007):2407-2415.
3. Jiayan Li, Daiwen Chen, Yuheng Luo *et al.* [The fungal community and its interaction with the concentration of short - chain fatty acids in the faeces of Chenghua, Yorkshire and Tibetan pigs](#). *Microbial biotechnology*, 2020, 13(2): 509-521.
4. Jiayan Li, Daiwen Chen, Yuheng Luo *et al.* [The fungal community and its interaction with the concentration of short - chain fatty acids in the caecum and colon of weaned piglets](#). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104(2): 616-628.
5. Yuheng, Luo, André Denis G Wright, Youlong Li, *et al.* [Diversity of methanogens in the hindgut of captive white rhinoceroses, *Ceratotherium simum*](#). *BMC Microbiology*, 2013.
6. Yuheng Luo, Can Yang, André Denis G Wright, *et al.* [Responses in ileal and cecal bacteria to low and high amylose/amylopectin ratio diets in growing pigs](#). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99:10627-10638.
7. Yuheng Luo, Ling Zhang, Hua Li, *et al.* [Different types of dietary fibers trigger specific alterations in composition and predicted functions of colonic bacterial communities in BALB/c mice](#). *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:966.

参考文献

1. Bolger A, Lohse M, Usadel B (2014) [Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data](#). *Bioinformatics*. 30: 2114–20.
2. Edgar, Robert C (2013) [UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads](#). *Nature methods*. 10.10: 996-998.
3. Edgar, Robert C., *et al.* (2011) [UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection](#). *Bioinformatics*. 27.16: 2194-2200.
4. Frank KL, Rogers DR, Olins HC, *et al.* (2013) [Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at middle valley hydrothermal vents](#). *The ISME*

- 236 *Journal*. 7(7):1391-1401.
- 237 5. Itoh H, Navarro R, Takeshita K, *et al.* (2014) [Bacterial population succession and](#)
238 [adaptation affected by insecticide application and soil spraying history](#). *Frontiers*
239 *in Microbiology*. 5: 457.
- 240 6. White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* (1990) [Amplification and direct sequencing of](#)
241 [fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics](#). *PCR protocols: a guide to methods*
242 *and applications*. 18(1): 315-322.