

猪肠道微生物样品的采集与核酸提取

Preparation and Nucleotide Extraction of Samples from the Pig Digestive Tract

伍师哲¹, 刘沫言¹, 宋庆庆¹, 成艳芬², 朱伟云², 戴兆来^{1,2,*}

¹ 动物营养国家重点实验室, 中国农业大学动物科技学院, 北京; ² 动物消化道营养国际联合研究中心, 南京农业大学动物科技学院, 南京, 江苏省

*通讯作者邮箱: daizhaolai@cau.edu.cn

摘要:猪是中国消费量最大的肉用经济动物也是消化生理和人类最接近的模式动物。研究猪消化道微生物区系的结构与功能对人类的健康有重要意义。本文介绍了来源于猪肠道不同部位的微生物样品（包括肠道内容物、肠黏膜微生物以及粪样）的采集处理方法以及核酸提取方法。同时对实验操作过程中的注意事项及方法的应用做了讨论。本文所介绍方法同时适用于具有相似消化道结构与生理的单胃动物。

关键词: 肠道微生物, 猪, 样品采集, 核酸提取

材料与试剂

1. 试验动物: 商品猪或土种猪（根据实验目的确定性别、日龄、日粮）
2. 灭菌棉拭子
3. 一次性无菌橡胶手套
4. 灭菌纱布
5. 灭菌手术剪和手术刀
6. 灭菌手术缝合线
7. 枪头: 10 μ L、200 μ L、1000 μ L
8. 移液管: 5 mL、10 mL
9. 离心管: 1.5 mL、2 mL、50 mL
10. 玻璃珠: 3-4 mm
11. 铅珠: 0.1 mm 直径 (Biospec, 目录号: 11079101z)
12. 微生物总 DNA 提取试剂盒: QIAamp Fast DNA Stool Mini (QIAGEN, 目录号: 51604)
13. 微生物 RNA 保护试剂: RNeasy Protect Bacteria Reagent (QIAGEN, 目录号: 76506)

- 31 14. 微生物总 RNA 提取试剂盒: RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 目录号: 74104)
- 32 15. 第一链反转录试剂盒: SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Thermo
- 33 Fisher, 目录号: 18080400)
- 34 16. 0.2%吐温 80 生理盐水 (见溶液配方)
- 35 17. DEPC 水 (无 RNase 水; 见溶液配方)
- 36 18. 75%乙醇
- 37 19. TE 缓冲液 (上海生工生物工程, 目录号: B548106)
- 38 20. Tris 饱和酚溶液 (pH 7.9±0.2; 上海生工生物工程, 目录号: A504193)
- 39 21. 氯仿-异戊醇 (24:1, v/v)
- 40 22. 水饱和酚溶液 (上海生工生物工程, 目录号: A504195)
- 41 23. 95%乙醇 (见溶液配方)
- 42 24. 70%乙醇 (见溶液配方)
- 43 25. 3 M 乙酸钠溶液 (见溶液配方)
- 44 26. 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4; 见溶液配方)

45

46 仪器设备

- 47 1. 移液器 (Eppendorf, 型号: 2.5 µL、10 µL、100 µL、200 µL、1000 µL)
- 48 2. 电动助吸器 (Eppendorf, 型号: 5-50 mL)
- 49 3. 高压蒸汽灭菌锅 (Sanyo, 型号: MLS-3750)
- 50 4. 离心机 (Eppendorf, 型号: 5810 R)
- 51 5. 超纯水系统 (Sartoris, 型号: Arium Pro VF)
- 52 6. 生物样品均质器 (OMINI, 型号: Bead Ruptor 12)
- 53 7. 涡旋混匀仪 (Scientific Industries, 型号: SI Vortex Genie 2)
- 54 8. 冷藏冷冻冰箱 (西门子, 型号: BCD-610W)
- 55 9. 超低温冰箱 (Thermo, 型号: MLT)
- 56 10. PCR 仪 (Bio-rad, 型号: DNAengine)

57

58 实验步骤

- 59 1.猪粪便样品的采集

注：无论猪的日龄大小，保定与采样过程均需考虑到猪只的舒适。对体重小于 15 kg 的仔猪而言，可采取人工保定，一人抱住仔猪，一人采样的方式。对生长猪和育肥猪而言，可采用限位栏固定猪只进行采样，成年种公猪和种母猪采用类似采样方法。采样一般在进食后的 1 h-3 h 进行。涉及的动物实验需要在所属的实验动物机构的指导下规范开展。

1.1 仔猪粪样的采集

1.1.1. 采样前，用灭菌纱布分别蘸取生理盐水和 75%乙醇对保定好的仔猪的肛周进行清洗，重复交替三次。

1.1.2. 用灭菌的棉拭子蘸取灭菌的 PBS 对肛门进行清洗，用新的蘸取 PBS 的棉拭子刺激肛门排便，并准备无菌 50 mL 离心管收集排出的粪便。

1.1.3. 如无粪便排出，可用蘸取 PBS 的灭菌棉拭子缓慢伸入肛门内轻柔搅动，使棉拭子沾染上存留在直肠中的粪便。

1.1.4. 用灭菌棉拭子挑取少量收集于 50 mL 离心管中的粪样转移至带有螺口盖的 2 mL 灭菌离心管中，并用灭菌剪刀剪断棉拭子连同棉球保存。对 1.1.3 步骤中的棉拭子，直接用灭菌剪刀截取带有粪样的棉球保存至带有螺口盖的 2 mL 灭菌离心管中。采集的样品应在干冰或液氮中暂存，并保存于-80 °C 冰箱中，用于核酸提取。

1.2 生长猪和育肥猪粪便样品的采集

1.2.1. 采样前，用灭菌纱布分别蘸取生理盐水和 75%乙醇对保定好的猪只的肛周和肛门进行清洗，重复交替三次。

1.2.2. 采样者戴无菌橡胶手套用灭菌 PBS 润湿，用食指和中指缓慢伸入肛门内刺激直肠排便或直接收集粪便，将粪便样品暂存于无菌 50 mL 离心管中。

1.2.3. 用灭菌棉拭子挑取少量收集于 50 mL 离心管中的粪样转移至带有螺口盖的 2 mL 灭菌离心管中，并用灭菌剪刀剪断棉拭子连同棉球保存。采集的样品应在干冰或液氮中暂存，并保存于-80 °C 冰箱，用于核酸提取。

2. 猪肠道内容物样品及肠黏膜微生物样品的采集

注：为了获得足够多的肠道内容物用于实验，可在进食后的 1 h-3 h 采集肠道内容物及肠黏膜微生物样品。

2.1 屠宰采样

2.1.1. 猪只的处死：猪只颈部注射戊巴比妥钠（20 mg/kg）麻醉后，采取颈静脉放血致死。

2.1.2. 迅速打开腹腔，分离各肠段。为了防止肠道内容物在肠道内的流动，用灭菌手术缝合线对各肠段进行结扎。

2.1.3. 前肠内容物样品的采集

1) 胃内容物的采集：结扎贲门部和幽门部，取出胃，打开幽门部，轻柔挤出适量（> 30 mL）胃内容物于 50 mL 无菌离心管中，冰中保存并在最短时间内处理。

2) 小肠食糜的收集：十二指肠相对较短，大多数实验收集空肠和回肠食糜用于研究。定位空肠中段和回肠中段，用手术缝合线分别结扎两肠段 30 cm，分离肠系膜后，将其从腹腔取出。打开一端收集适量（> 10 mL）食糜于 50 mL 无菌离心管中，冰中保存并在最短时间内处理。

3) 前肠内容物样品中微生物的富集（此部为可选步骤）：对胃内容物及水分含量较高的小肠食糜可进行此操作。将等体积的样品和灭菌的 0.2%吐温 80 生理盐水溶液在 50 mL 离心管中（含有 20 粒灭菌玻璃珠）剧烈振荡 1 min，100 xg 离心 5 min，转移全部上清至新的离心管中 4 °C 13 000 xg 离心 10 min，收集沉淀于 1.5 mL 无菌离心管中，于-80 °C 保存，用于核酸提取。

2.1.4. 后肠内容物样品的采集

1) 根据实验目的不同，选取盲肠中段和结肠中段，无菌采集内容物于 2 mL 灭菌离心管中，并迅速保存于液氮或干冰中，运回实验室，于-80 °C 保存，用于核酸提取。

2.1.5. 肠黏膜微生物样品的采集^{[1][2]}

1) 选取不同猪个体的胃肠的相对固定部位（如，胃底腺部、十二指肠全长、其他肠段中间部位前后 5 cm）进行采样，用手术剪刀打开肠管，用尺测量取样组织的长度和宽度并记录数据。

2) 在培养皿中用冷的无菌 PBS 充分冲洗肠段的黏膜侧和浆膜侧，剪成小块至于含有灭菌玻璃珠和 0.1%吐温 80 生理盐水溶液（0.2%吐温 80 生理盐水溶液和等体积生理盐水混合）的容器中，剧烈振荡 1 min。

- 3) 取出肠道组织，转移润洗液于灭菌离心管中，4 °C 13 000 x g 离心 10 min，收集沉淀于 1.5 mL 无菌离心管中，于-80 °C 保存，用于核酸提取。

2.2 经肠道瘘管采集肠道内容物样品

2.2.1.采样前，用 75%乙醇浸湿的灭菌纱布对裸露体表的瘘管及瘘管周围皮肤进行擦拭消毒，重复三次。

2.2.2.采样者佩戴一次性无菌橡胶手套，拧开瘘管盖，取出内塞，将无菌样品收集袋固定在瘘管上，观察食糜流出的量和状态。

2.2.3.当袋内收集的食糜超过约 50 mL 时，更换收集袋，收集新的食糜，将收集袋中的食糜转移至 50 mL 灭菌离心管中，保存至干冰中并在最短时间内运回实验室处理。

注：屠宰采样和肠瘘管采样各有利弊。屠宰采样可以同时研究不同肠段和不同部位的微生物变化，但不能考察同一猪只的肠道微生物的时间变化规律；肠瘘管采样可研究特定肠段微生物的组成与代谢的时间变化规律，但无法研究不同肠段和部位的微生物的变化规律。

3. 猪粪样和肠道微生物样品的核酸提取

注：收集的粪样和肠道微生物样品应在最短时间内进行核酸的提取。

3.1.DNA 的提取^{[3][4][5]}

3.1.1.使用酚-氯仿-异戊醇法提取猪肠道内容物 DNA

- 1) 在 1.5 mL 离心管中无菌称取内容物样品或离心获得的微生物沉淀(0.3 g 左右)，记录重量。
- 2) 加入 1 mL TE 缓冲液吹打混匀转移至含 0.5 g 灭菌铅珠的 2 mL 灭菌螺口离心管中，加入 150 μ L Tris 饱和酚。
- 3) 在生物样品均质器中涡旋震荡 20 s/次，连续 5 次，每次冰上冷却间隔 1 min，加入 150 μ L 氯仿-异戊醇 (24:1)，震荡混匀 20 s，13 000 x g 离心 5 min。
- 4) 取上清于 1.5 mL 离心管中，加入 150 μ L 氯仿-异戊醇和 150 μ L 水饱和酚，震荡混匀 1 min，13 000 x g 离心 5min，重复此步骤 3 到 4 次至蛋白层消失为止。

5) 取上清于 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μ L 氯仿-异戊醇, 1 000 \times g 离心 1 min, 取上清于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 95%冷乙醇 (-20 $^{\circ}$ C 预冷过夜) 和 50 μ L 3 M 乙酸钠溶液 (pH = 5.2), -20 $^{\circ}$ C 过夜沉淀 DNA。

6) 21 000 \times g 离心 20 min, 吸除上清后, 加入 1 mL 70%冷乙醇 (-20 $^{\circ}$ C) 溶解沉淀, 21 000 \times g 离心 5 min。吸除上清, 风干沉淀, 加入 50 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 于-20 $^{\circ}$ C 保存。

3.1.2.使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (QIAamp Fast DNA Stool Mini) 提取猪肠道样品总 DNA。该方法中需用到钨珠和溶菌酶对细菌细胞壁进行破碎。

3.2.RNA提取与反转录

3.2.1.用 500 μ L DEPC 水重悬离心获得的微生物沉淀或称取的肠道内容物样品/粪样。

3.2.2.转移所有样品于灭菌的不含 RNase 的 2 mL 离心管中, 加入 1 mL RNAprotect Bacteria Reagent, 涡旋混匀 5 s, 室温孵育 5 min。

3.2.3.5 000 \times g 离心 10 min, 弃去上清, 沉淀用于后续的消化和 RNA 提取。

3.2.4.用细菌 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit) 提取样品中的 RNA。

3.2.5.从提取的总 RNA 样品中取 1 μ L 测定浓度和纯度。

3.2.6.检测 RNA 的完整性: 取 2 μ L 总 RNA 用于 1%琼脂糖凝胶电泳 (电压 120 V 的条件下电泳 30 min), 之后利用凝胶成像系统成像, 检测电泳条带。

3.2.7.用第一链反转录试剂盒 (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit) 对提取的 RNA 进行反转录和后续操作。

溶液配方

1. 0.2%吐温80生理盐水溶液

将2 g吐温80溶解于1 L生理盐水中, 121 $^{\circ}$ C高压灭菌20 min, 冷却至室温备用。

2. DEPC水 (无RNase水)

将1 mL DEPC溶于1 L去离子水中充分混合均匀, 室温放置过夜后, 121 $^{\circ}$ C高压灭菌 20 min使DEPC分解, 冷却至室温备用。

3. 95%乙醇

将950 mL无水乙醇与50 mL去离子水充分混匀, 置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

4. 70%冷乙醇

将700 mL无水乙醇与300 mL去离子水充分混匀，置于-20 °C保存备用。

5. 3 M乙酸钠溶液

称取40.8 g 三水合乙酸钠 (NaAc·3H₂O) 溶于约40 mL去离子水中搅拌均匀，用冰醋酸调节pH值至5.2，加去离子水定容至100 mL，121 °C高压灭菌20 min，室温保存备用。

6. 磷酸盐缓冲溶液 (PBS; pH 7.4)

称取 0.2 g KCl、8 g NaCl、0.2 g KH₂PO₄、1.44 g Na₂HPO₄，加入 900 mL超纯水溶解，将pH调节至7.2，定容至1 L，121 °C高压灭菌20 min后室温保存。

致谢

本实验室的研究工作得到了国家“十三五”重点研发计划 (2017YFD0500501)、国家自然科学基金面上项目 (32072689)、国家重点基础研究计划 (2013CB127303)、国家自然科学基金青年基金 (31301979) 以及动物消化道营养国际联合研究中心开放课题的资助。

参考文献

- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Sabour, P. M., Wheatcroft, R. and Chen, S. (2002). [Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen](#). *FEMS Microbiol Lett*, 208(1), 1–7.
- Yang, Y. X., Dai, Z. L. and Zhu, W. Y. (2014). [Important impacts of intestinal bacteria on utilization of dietary amino acids in pigs](#). *Amino acids*, 46(11), 2489–2501.
- Zoetendal, E. G., Heilig, H. G., Klaassens, E. S., Boonjink, C. C., Kleerebezem, M., Smidt, H. and de Vos, W. M. (2006). [Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract](#). *Nat. Protoc.*, 1(2), 870–873.
- Su, Y., Yao, W., Perez-Gutierrez, O. N., Smidt, H. and Zhu, W. Y. (2008). [Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning](#). *FEMS Microbiol Ecol*, 66(3), 546–555.
- Dai, Z. L., Zhang, J., Wu, G. and Zhu, W. Y. (2010). [Utilization of amino acids by](#)

205 [bacteria from the pig small intestine.](#) *Amino acids*, 39(5), 1201–1215.

206

207