

水禽粪便微生物移植技术

Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Waterfowl

夏戴阳, 杨琳, 朱勇文, 王文策*

华南农业大学动物科学学院, 广东省动物营养调控重点实验室, 广州, 510642

*通讯作者邮箱: wangwence@scau.edu.cn

摘要: 粪便微生物移植 (FMT) 技术, 是指通过提取健康供体粪便中的微生物, 再定植到受体的肠道中, 重新建立受体肠道微生物平衡, 以达到治疗受体代谢疾病或肠道疾病的过程。水禽具有体型小、无哺乳期的特点, 相较于其他大中型动物, 水禽 FMT 技术具有易于操作、无生长阶段限制以及粪便菌液制作方便等优势。本文将借鉴人类医学及哺乳动物中现有的 FMT 技术手段与方法, 参考已有的对于禽类 FMT 技术的探索, 以鸭为范例阐述水禽 FMT 标准化技术流程。

关键词: 粪便微生物移植, 水禽, 肠道

材料与试剂

1. 一次性注射器
2. 灌胃塑胶软管
3. NaCl
4. KCl
5. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
6. KH_2PO_4
7. 各种型号枪头 (20 μl , 200 μl , 1 ml)
8. 甘油
9. 液氮
10. 纱布
11. Eppendorf 无菌离心管
12. 0.25 mm 孔径不锈钢网筛

30 13. 电子秤

31 14. PBS (见溶液配方)

32

33 仪器设备

34 1. 高压灭菌锅

35 2. 离心机

36 3. -80 °C 冰箱

37 4. 涡旋振荡器

38 5. 水浴锅

39 6. 移液器

40 7. pH 计

41 8. 血球计数板

42

43 实验步骤

44 1. 供体鸭的选择

45 1.1 收集供体鸭新鲜粪便。将收集到的粪便样品保存在无菌的 Eppendorf 管中，置
46 于冰上，快速转移到实验室 (如需长时间运输，需要置于干冰和液氮中冷冻保
47 存)。

48 1.2 将收集到的粪便样品转移到实验室后，将其与无菌、非抑菌磷酸盐缓冲液 (PBS)
49 按照 1:5 的比例混合稀释，匀浆 5 min。

50 1.3 将混匀后的悬浮液通过 0.25 mm 孔径的不锈钢网筛，重复过滤三次。

51 1.4 将滤液转移到无菌的离心管中，置入离心机中，于 1,00 xg 转速离心 5 分钟。

52 1.5 用移液枪小心吸取上清液，置入冻存管中。制作好的粪便菌液可即刻用于受体，
53 进行粪便微生物移植操作 (如需长期保存，则需要在菌液中加入 10% 无菌甘油，
54 混合完全后置于 -80 °C 环境保存，冷冻样品需在 6 个月内使用完毕)。使用冻
55 存菌液前，需要在水浴锅中复苏，根据宿主动物直肠温度决定水浴温度 (鸭 41.0
56 -42.5 °C，鹅 40.0-41.3 °C)。复苏菌液后，将粪菌液混匀，吸取少量样本用无菌
57 PBS 稀释，用酶标仪于 600nm 波长读数，OD 值 1 对应浓度为 2×10^9 CFU，
58 继续稀释菌液绘制标准曲线，每次复苏后测定细菌浓度，确保浓度大于 10^8 CFU。

1.6 取出受体鸭并称重。根据重量，按照 10 ml/kg 剂量吸取粪便菌液，反复吹打几次，排净灌胃管内气泡。

1.7 将受体鸭保定，沿着受体鸭食管向腹部左侧进管，注射粪便菌液（过程要迅速，防止受体鸭产生应激反应或呕吐反）。

注意事项

1. 供体鸭表观特征与行为应当符合如下条件：①生长发育良好；②无不良行为（如啄癖，异食癖）；③羽毛完整，身体表面无伤口或其他损伤；④体温维持在 40-42 °C 之间；⑤正常饮水采食；⑥粪便正常，未出现病变样粪便，或者便秘；⑦无使用抗生素或其他药物记录；⑧两周内不能接种弱毒疫苗，未接触其他有过疫病史的鸭。
2. 应及时收集新鲜粪便，并尽快转移至实验室制作粪便菌液。
3. 制作粪便菌液过程中使用的设备容器都应做灭菌处理。
4. 避免交叉污染，每次灌胃都需要替换洁净无菌的注射器和灌胃塑胶软管。

溶液配方

1. PBS

称取 NaCl: 8 g, KCl: 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O: 3.628 g, KH₂PO₄: 0.24 g，加入灭菌去离子水定容至 1 L，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.4

致谢

感谢国家自然科学基金面上项目 (32072751)，广东省现代农业产业技术体系创新团队 (2019KJ137)，十三五重点研发计划 (2016YFD0500509-07)，国家水禽产业技术项目 (CARS-42-15)，广东省基础与应用基础研究基金温氏联合基金项目 (2019B1515210012) 对本研究提供的资助。

参考文献

1. Hamilton, M. J., Weingarden, A. R., Unno, T., Khoruts, A., and Sadowsky, M. J. (2013) High-throughput DNA sequence analysis reveals stable engraftment of gut microbiota following transplantation of previously frozen fecal bacteria. *Gut*

- 88 *Microbes* 4, 125-135.
- 89 2. Hu, J., Chen, L., Tang, Y., Xie, C., Xu, B., Shi, M., Zheng, W., Zhou, S., Wang, X.,
90 and Liu, L. (2018) Standardized Preparation for Fecal Microbiota Transplantation
91 in Pigs. *FRONT MICROBIOL* 9, 1328.
- 92 3. Li X, Li X, Shang Q, Gao Z, Hao F, Guo H, Guo C. Fecal microbiota transplantation
93 (FMT) could reverse the severity of experimental necrotizing enterocolitis (NEC)
94 via oxidative stress modulation. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jul;108:32-43.
- 95 4. Willing, B. P., Anjalee, V., Matthew, C., Teerawat, T., Brett, F. B., and Stefan, B.
96 (2011) Altering Host Resistance to Infections through Microbial Transplantation.
97 *PLOS ONE* 6, e26988.