

反刍动物瘤胃原虫与细菌微循环测定方法

Determination of Ruminal Protozoa and Bacteria Recycling

王梦芝*, 甄永康, 高健, 王洪荣

动物科学与技术学院, 扬州大学, 扬州, 江苏

*通讯作者邮箱: mengzhiwangyz@126.com

摘要: 反刍动物瘤胃微生态中存在有原虫对细菌的吞噬, 形成了原虫和细菌之间蛋白质的循环, 如果吞噬循环量过大则会导致微生物蛋白合成量的减少以及合成效率的降低。鉴此, 本实验建立一种适合于反刍动物瘤胃原虫与细菌微循环的测定方法。采用荧光染色标记瘤胃细菌技术(Fluorescence-Labeled Rumen Bacteria, FLRB), 分离的瘤胃原虫与荧光标记瘤胃细菌共培养, 通过荧光显微镜对原虫吞噬荧光标记瘤胃细菌数量计数, 并计算原虫对细菌的吞噬速率。以期为反刍动物瘤胃微生物蛋白周转与宿主氨基酸营养构建提供基础资料。

关键词: 瘤胃原虫, 瘤胃细菌, 吞噬速率, 微循环

材料与试剂

1. 2 μm 滤膜
2. 80 目纱布
3. 载玻片
4. 盖玻片
5. 无菌生理盐水
6. 5(6)-(4,6-二氯三嗪基)氨基荧光素 (DTAF)
7. 无菌瘤胃液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 高速离心机
2. 水浴摇床
3. 荧光显微镜(Eclipse 80i, Nikon, Japan)

实验步骤

1. 采集瘤胃液，经过 2 μ m 滤膜过滤，使用高速离心机于 22,000 \times g 离心 15 min (25 $^{\circ}$ C)，收集沉淀。
2. 收集的沉淀用灭菌生理盐水清洗，使用高速离心机于 22,000 \times g 离心 15 min (25 $^{\circ}$ C)，重复两次，将沉淀物悬浸于灭菌生理盐水中，沉淀物为瘤胃细菌。
3. 将 2 mg DTAF 加入样品中，荧光染色 10 min 后，于 60 $^{\circ}$ C 水浴培养 2 h，然后使用高速离心机于 22,000 \times g 离心 15 min (25 $^{\circ}$ C)，弃上清，沉淀物使用灭菌生理盐水清洗离心重复三次，将沉淀物悬浸于灭菌生理盐水中，-20 $^{\circ}$ C 保存。
4. 用时解冻荧光标记细菌，使用高速离心机于 22,000 \times g 离心 15 min (25 $^{\circ}$ C)，收集沉淀，使用无菌瘤胃液悬浸制成 2 倍浓度的荧光标记瘤胃细菌 (FLRB) 悬液，置水浴锅(39 $^{\circ}$ C)备用。
5. 按 Menke 法^[1]进行体外培养。在体外培养进行至 10 h 时，取与 FLRB 悬液同体积的培养液，80 目纱布过滤，于 150 \times g 离心 10 min (25 $^{\circ}$ C)，并用无菌生理盐水洗涤离心 2 次，用样品一半体积的无菌瘤胃液悬浸，此为原虫悬液。
6. 原虫悬液于水浴摇床振荡培养 (39 $^{\circ}$ C，厌氧，50 r/min) 30 min 重新复苏原虫。
7. 合并原虫悬液和 FLRB 悬液于水浴摇床振荡培养 (39 $^{\circ}$ C，厌氧，50 r/min) 进行吞噬实验，于 5、10、15、20、25 min 取少量混合培养液滴加到载玻片上，加等体积甲醛固定，盖上盖玻片马上镜检。
8. 使用荧光显微镜先在普通光 100~400 倍观察原虫形态，然后在 1,000 倍油镜下转置荧光背景，检测原虫体内 FLRB 数量，每个样品 3 个重复，每片以 12 个原虫的平均值计算细菌的吞噬数量。检测原虫体内 FLRB 数量的荧光图如下图 1 所示。

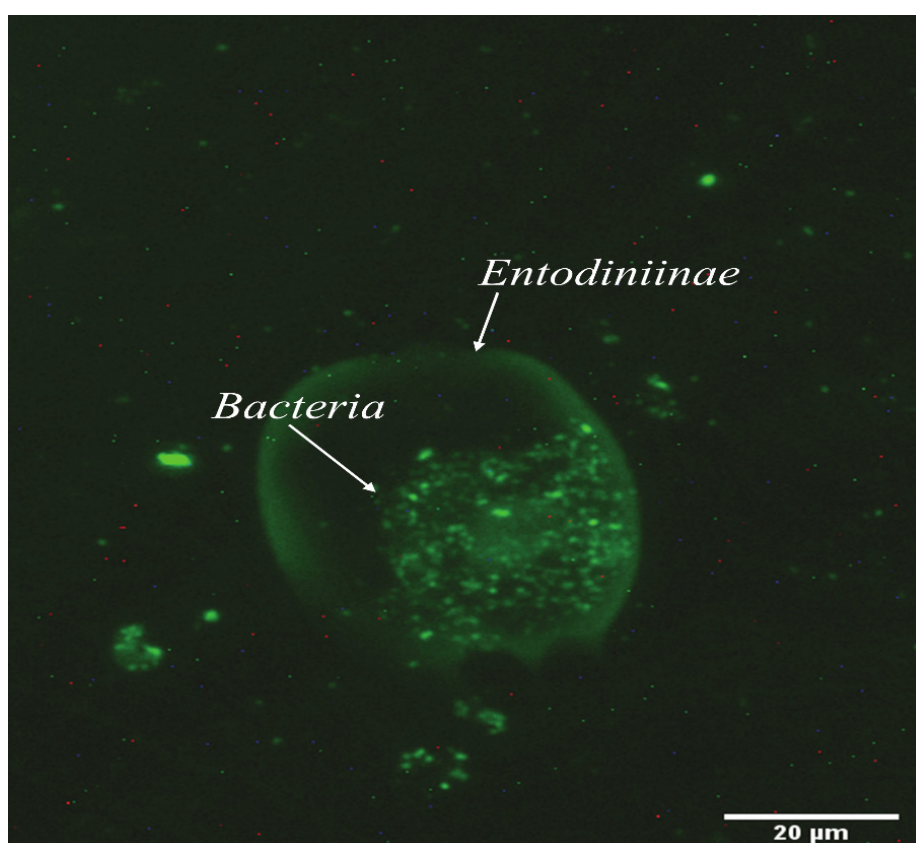


图 1 原虫吞噬细菌显微镜荧光图 (25 min, 400 ×, Bar = 20 μm)

9. 换算系数：如计算吞噬细菌氮和微生物蛋白含量，可按如下系数换算。荧光标记细菌细胞平均体积为 $0.10 \mu\text{m}^3$ ，氮为 $0.054 \text{ pg N}/\mu\text{m}^3$ 。以吞噬细菌氮量乘 6.25 的系数来估算微生物蛋白。

例：如表 1 所示，为 2 ~ 25 min 原虫吞噬细菌量，可依此计算吞噬速率、氮量和微生物蛋白量^[2]。

表 1 原虫吞噬细菌相关指标计算举例

时间/min	吞噬量 (cells/cell)	吞噬速率 (cells/(cell h))
2	18.00	480.00
5	53.00	636.00
10	107.00	642.00
15	137.00	548.00
20	146.00	438.00
25	178.00	427.00

对原虫的吞噬量与时间进行 25 min 内线性回归分析，回归方程为 $Y=21.27+6.64X$ ($R=0.971$)。式中，Y 为原虫吞噬细胞量(cells/cell)，X 为吞噬时间(min)。由回归直线方程可计算原虫的吞噬速率为 398.40 cells/(cell h)。

荧光标记细菌细胞平均体积为 $0.10 \mu\text{m}^3$ ，氮为 $0.054 \text{ pg N}/\mu\text{m}^3$ ，则换算氮量为：
 $398.40 \times 0.054 \times 0.10 = 2.15 \text{ pg N}/(\text{cell h})$ ，为原虫在内循环中对细菌氮的吞噬速率。若按照山羊瘤胃内容物为 4 L，瘤胃含 5×10^5 个/mL 原虫细胞来计算的话，
 每头山羊每天因原虫吞噬细菌氮量估计为 $2.15 \times 5 \times 10^5 \times 4 \times 1000 \times 24$
 $\times 10^{-9} = 103.2 \text{ mg N}/(\text{d 头})$ ，换算为微生物蛋白量为 $103.2 \times 6.25 \times 10^{-3} =$
 $0.645 \text{ g Pr}/(\text{d 头})$ 。

溶液配方

1. 无菌瘤胃液

采集瘤胃液，于 $29,000 \times g$ 离心 20 min (25°C)，取上清液，使用高压蒸汽灭菌器
 灭菌(121°C , 0.1 MPa 灭菌 20 min)， 4°C 保存，一周内使用。

致谢

1. 感谢国家自然科学基金 (30771567) 对本实验的支持。
2. 王梦芝，程欣，谢文文，张柏松，刘翔，王洪荣. (2010). 体外法研究不同油脂对瘤胃原虫吞噬细菌微循环的影响. 中国农业科学, 43(18): 3831-3837.
3. 王梦芝. 山羊瘤胃原虫与细菌吞噬关系和微生物 AA 变化机制的研究[D]. 扬州大学, 2008.
4. 感谢扬州大学动物科学与技术学院王梦芝所做的研究工作，对本实验提供了很大的帮助。

参考文献

1. Menke, K. H., and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 28: 7-55.
2. 王梦芝. 山羊瘤胃原虫与细菌吞噬关系和微生物 AA 变化机制的研究[D]. 扬州大学, 2008.