

# 猪肠道微生物的体外培养与功能研究

## *In vitro* Incubation and Functional Study of the Pig Intestinal Microbiota

伍师哲<sup>1</sup>, 刘沫言<sup>1</sup>, 宋庆庆<sup>1</sup>, 张连华<sup>1</sup>, 成艳芬<sup>2</sup>, 朱伟云<sup>2</sup>, 戴兆来<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 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; <sup>2</sup> 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](mailto:daizhaolai@cau.edu.cn)

**摘要:** 猪作为重要的肉用畜种和模式动物, 对维持人类的生长与健康至关重要。研究猪肠道微生物的组成与功能对维持猪的生长与健康十分关键, 研究结果同时可为人类的营养与健康研究提供参考。本文结合实验室的研究概括整理了猪肠道微生物体外培养与功能研究的一些常用方法。着重介绍了肠道微生物样品的采集与处理、微生物批次培养与连续培养的常用方法。同时结合不同的实验目的讨论了培养过程中采样的设计以及用于后继代谢物分析的样品处理方法。本文所述方法参考了部分人上的研究结果, 结合猪相关实验的特点进行了阐述。所介绍的方法可用于研究猪肠道微生物对特定日粮成分的代谢以及相关的微生物及微生物代谢物。同时可为肠道微生物来源的功能化合物的机制研究与功能开发提供基础。

**关键词:** 肠道微生物, 猪, 体外培养, 微生物区系

## 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. 枪头: 10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L
6. 移液管: 5 mL、10 mL
7. 离心管: 1.5 mL、2 mL、15 mL、50 mL
8. 无菌注射器: 1 mL、5 mL
9. 0.22  $\mu$ m针式滤器 (上海生工, 目录号: F513163)
10. Hungate 厌氧管

- 31 11. 150 mL 血清瓶
- 32 12. 蓝盖试剂瓶：250 mL
- 33 13. 玻璃珠：3-4 mm
- 34 14. 铅珠：0.1 mm 直径（Biospec，目录号：11079101z）
- 35 15. CO<sub>2</sub>气体
- 36 16. 微生物总 DNA 提取试剂盒：QIAamp Fast DNA Stool Mini（QIAGEN，目录号：
- 37 51604）
- 38 17. 微生物 RNA 保护试剂：RNAprotect Bacteria Reagent（QIAGEN，目录号：76506）
- 39 18. 微生物总 RNA 提取试剂盒：RNeasy Mini Kit（QIAGEN，目录号：74104）
- 40 19. 第一链反转录试剂盒：SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit
- 41 （Thermo Fisher，目录号：18080400）
- 42 20. 厌氧磷酸盐缓冲溶液（PBS；pH 7.4，见溶液配方）
- 43 21. 0.1%吐温80生理盐水溶液
- 44 22. 刃天青溶液（见溶液配方）
- 45 23. 微量元素溶液（见溶液配方）
- 46 24. 碳酸氢钠溶液（见溶液配方）
- 47 25. 脂肪酸溶液（见溶液配方）
- 48 26. 微量元素溶液（见溶液配方）
- 49 27. 血红素溶液（见溶液配方）
- 50 28. 还原剂溶液（见溶液配方）
- 51 29. 维生素母液（见溶液配方）
- 52 30. 氨基酸母液（见溶液配方）
- 53 31. 40%厌氧甘油（见溶液配方）
- 54 32. 灭菌厌氧生理盐水（见溶液配方）

55

## 56 仪器设备

- 57 1. 移液器（Eppendorf，型号：2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）
- 58 2. 电动助吸器（Eppendorf，型号：5-50 mL）
- 59 3. 高压蒸汽灭菌锅（Sanyo，型号：MLS-3750）

- 60 4. 离心机 (Eppendorf, 型号: 5810 R)
- 61 5. 超纯水系统 (Sartoris, 型号: Arium Pro VF)
- 62 6. PCR 仪 (Bio-rad, 型号: DNAEngine)
- 63 7. 涡旋混匀仪 (Scientific Industries, 型号: SI Vortex Genie 2)
- 64 8. 冷藏冷冻冰箱 (西门子, 型号: BCD-610W)
- 65 9. 超低温冰箱 (Thermo, 型号: MLT)
- 66 10. 恒温培养箱 (上海恒字, 型号: PYX-DHS.500BS)

67

## 68 实验步骤

### 69 1. 培养基的制备

#### 70 1.1 完全合成培养基<sup>[1][2]</sup>

71 1) 完全合成培养基即化学成分确定培养基, 每升培养基包含: 葡萄糖10 g、乳  
72 酸钠2.7 g、氯化钾0.6 g、氯化钠0.6 g、磷酸氢二钾1 g、磷酸二氢钾5 g、  
73 氯化钙0.15 g、七水合硫酸镁0.5 g、乙酸钠1 g、柠檬酸铵0.6 g、抗坏血酸  
74 0.5 g、腺嘌呤0.01 g、鸟嘌呤0.01 g、肌苷0.005 g、乳清酸0.005 g、胸苷  
75 0.005 g、尿嘧啶0.01 g、黄嘌呤0.01 g、10 mL 血红素溶液 (0.01%, w/v)  
76 、10 mL 脂肪酸溶液、10 mL 微量元素溶液、50 mL 碳酸氢钠溶液及1 mL  
77 刃天青溶液 (1%, w/v); 氨基酸组分参考Dai等<sup>[3][4]</sup>, 详见溶液配方“氨基酸  
78 组分含量”。其中天冬酰胺和谷氨酰胺受热易分解, 应单独配制 (详见溶液配  
79 方“氨基酸母液”), 经0.22 μm滤器过滤除菌后加入经高压灭菌的培养基中  
80 。

81 2) 培养基配制过程中, 应持续向装有培养基的容器中持续通入 CO<sub>2</sub>, 直至培养  
82 基呈淡粉色至淡黄色。之后将完全合成培养基分装于通入 CO<sub>2</sub> 的 Hungate  
83 厌氧管 (9 mL/管), 及血清瓶 (92 mL/瓶) 中。加塞旋紧螺口盖后 115 °  
84 C 高压灭菌 15 min, 灭菌冷却后的培养基均呈淡黄色, 表明培养基体系处  
85 于厌氧状态。

86 3) 考虑到部分溶液受热易分解的特性, 在培养基使用前, 还需向培养体系内加  
87 入已过滤灭菌的氨基酸母液 (1:100, v/v)、维生素母液以及还原剂溶液  
88 (1:100, v/v)。

## 1.2 半合成培养基

半合成培养基与完全合成培养基组成类似，可以根据实验需要将氨基酸替换为不同的复杂蛋白质（如，蛋白胨、酵母提取物，等）或将葡萄糖替换为复杂的多糖（如，可溶性淀粉、寡糖、多糖，等）。

*注：培养基的配方可根据实验目的进行调整，可结合使用稳定同位素标记的碳源（如， $^{13}\text{C}$ -标记的葡萄糖、 $^{13}\text{C}$ -标记的短链脂肪酸等）和氮源（ $^{15}\text{N}$ -标记的氨、 $^{15}\text{N}$ -标记的氨基酸等）对感兴趣的代谢通路及相关的微生物进行深入分析。*

## 2. 猪肠道接种物的制备

### 2.1 猪肠道微生物样品的采集

*注：为了保证样品具有代表性，无论是采集粪便样品还是肠道内容物样品，猪需要采食实验日粮 5-7 天，采样一般在猪进食后 1-2 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。*

#### 2.1.1. 粪便样品采集

1) 分别采集同一实验处理的不少于四头猪的新鲜粪便 15 g 左右于预先充满  $\text{CO}_2$  气体的 50 mL 无菌离心管中，冰上保存，并在最短时间内带回实验室进行培养前处理。

#### 2.1.2. 屠宰动物用于肠道食糜样品采集

1) 根据实验目的与设计，每个实验组随机选取不少于四头猪，颈静脉放血处死，迅速打开腹腔，分离各肠段，用无菌棉线结扎需要采样的肠段进行后继处理。

2) 肠道内容物的采样方法与粪样类似，选取采样肠段的中部前后约 10 cm 剪开肠管后迅速收集肠道内容物于预先充满  $\text{CO}_2$  气体的 50 mL 无菌离心管内，冰上保存，并在最短时间内带回实验室进行培养前处理。

#### 2.1.3. 回肠瘘管食糜样品的采样

1) 拧开回肠瘘管盖，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) 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充满  $\text{CO}_2$  气体的 50 mL 灭菌离心管中，冰上保存，并在最短时间内运回实验室处理。

#### 2.1.4. 肠黏膜微生物样品的采集

- 1) 选取肠段中段，用厌氧灭菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗出肠道内容物后，两端结扎后放入充满 CO<sub>2</sub> 气体的 50 mL 无菌离心管或蓝盖试剂瓶中，置于冰上，并在最短时间内运回实验室处理。

## 2.2 粪样和肠道内容物样品接种物的制备

- 1) 将各管中粪样或食糜样品均匀混合并转移至不断通入 CO<sub>2</sub> 气体的 250 mL 蓝盖玻璃瓶 (含有 50 粒灭菌的玻璃珠)，根据实验目的不同，加入 1~9 倍体积的灭菌厌氧生理盐水，迅速拧紧瓶盖，剧烈摇动 1 min。
- 2) 将混合物转移入通有 CO<sub>2</sub> 的无菌离心管中，200 g 离心 5 min，将所有上清经四层灭菌纱布过滤至通有 CO<sub>2</sub> 气体的灭菌血清瓶中待用。

## 2.3 肠黏膜微生物样品的处理<sup>[5][6]</sup>

- 1) 选取不同猪胃肠的固定部位和固定长度进行处理，用手术剪刀迅速打开肠管，并剪成 2-3 块并迅速放入充满 CO<sub>2</sub> 气体和装有厌氧 PBS 缓冲液的 50 mL 离心管或 250 mL 蓝盖试剂瓶中，拧紧离心管或试剂瓶盖。
- 2) 上下颠倒容器数次，迅速将组织块转移至新的含有厌氧 PBS 缓冲液的容器中重复以上操作两次。
- 3) 迅速将肠道组织块转移至含有灭菌玻璃珠和 0.1%吐温 80 生理盐水溶液的容器中，剧烈振荡 1 min。
- 4) 取出肠道组织，转移润洗液于灭菌并充满 CO<sub>2</sub> 气体的血清瓶中待用。

注：根据采集的肠道微生物样品形状的不同和培养目的与方式的不同，选择合适的样品稀释倍数和处理方法。

## 3. 微生物的体外培养

### 3.1 批次培养

注：使用完全合成培养基进行肠道微生物培养时，于接种前，用无菌注射器抽取过滤灭菌的“维生素母液”、“还原剂溶液”、“氨基酸母液”按终培养体系的 1% (v/v) 接种至血清瓶或 Hungate 管中，混匀后 37 °C 预热 30 min 用于实验。本方法同样适用于单菌的用于功能研究的培养 (所述“原代培养”，对单菌而言，为继代培养实验的首次批次培养步骤)。

#### 1) 原代培养

将 5 mL 处理后的接种物接种于预热的培养基中，接种后的血清瓶于 37 °C 培

养箱培养 24 h。分别于培养的 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h，抽取 3 mL 培养物，分别用于测定 OD<sub>600</sub> 值（仅适用于单菌培养实验）、微生物区系分析（适用于混合菌培养）以及代谢物测定。

## 2) 继代培养

以原代培养 24 h 的发酵液作为接种物，将 1 mL 发酵液接种于预热的培养基中，37 °C 培养 24 h，并将其作为继代培养的第一代。之后可按此接种量和培养时间，依据试验需要连续传代培养。

## 3.2 连续培养

参考 Ziemer<sup>[7]</sup>的实验方法，具体方法如下：

- 1) 向发酵罐中加入 350 mL 厌氧培养基，再加入 300 mL 匀浆样品。在无培养基流入的情况下进行 18 h 的批次培养。
- 2) 以 0.03 h<sup>-1</sup> 的稀释率添加培养基，2.3 h 后使发酵罐达到 700 mL 的工作体积。
- 3) 保持发酵罐内连续搅拌混匀，并通入 N<sub>2</sub> 维持厌氧条件，通过蠕动泵抽取发酵液以补充培养体系的营养并维持罐内的工作体积。在整个发酵期间维持温度 37 °C，pH 维持在 6.5 左右。
- 4) 抽取的发酵液可用于细菌测序和代谢物分析。

*注：根据实验目的选择合适的培养方法进行实验。接种物的比例，培养时间的选择根据实验目的和不同肠段及部位差异很大，需要根据实际情况确定。特别强调的是，可以结合多种体外培养方法开展实验。如，可对原代接种物进行梯度稀释后培养，并对各稀释梯度的培养物分别进行批次继代培养，用于研究肠道中不同丰度的微生物在物质代谢中的作用。*

## 4. 培养物样品的核酸提取

### 4.1 DNA 提取

- 1) 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌 DNA。
- 2) 取 1 μL 提取的总 DNA 样品测定浓度和纯度，用于后继微生物测序和定量分析。

### 4.2 RNA 提取与反转录

- 1) 用 500 μL 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。

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 RNAp  
rotect Bacteria Reagent, 涡旋混匀 5 s, 室温孵育 5 min。

3) 5000 x g 离心 10 min, 弃去上清, 沉淀用于后续的消化和 RNA 提取。

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

5) 从提取的总 RNA 样品中取 1 µL 测定浓度和纯度。

6) 检测 RNA 的完整性: 取 2 µL 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。

7) 用第一链反转录试剂盒 (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMi  
x kit) 对提取的 RNA 进行反转录。所得反转录产物可用于组学分析和功能  
基因研究。

## 5. 代谢物的提取

5.1 将培养上清与 -80 °C 预冷的 HPLC 级甲醇 1:1 (v/v) 混合, 涡旋 1 min。

5.2 混合均匀后置于 -80 °C 冰箱中静置 30 min, 取出后 21000 x g, -20 °C 离心  
10 min, 取 200 µL 上清液于冰上预冷的 1.5 mL 离心管中, 保存于 -80 °C,  
用于胞外代谢物的色谱与质谱的检测分析。

## 溶液配方

### 1. 0.1% 吐温 80 生理盐水溶液

将 1 g 吐温 80、0.21 g NaS·9H<sub>2</sub>O 溶解于 1 L 生理盐水中, 通入 CO<sub>2</sub> 气体 1 h, 121 °C  
高压灭菌 20 min, 冷却至室温备用。

### 2. 厌氧磷酸盐缓冲溶液 (PBS; pH 7.4)

称取 0.2 g KCl、8 g NaCl、0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.21 g NaS·9H<sub>2</sub>O,  
加入至 900 mL 超纯水溶解, 将 pH 调节 7.4 左右并定容至 1 L, 通入 CO<sub>2</sub> 气体 1 h, 12  
1 °C 高压灭菌 20 min, 冷却至室温备用。

### 3. 刃天青溶液

称取 50 mg 刃天青完全溶解于 50 mL 超纯水中, 4 °C 保存。

### 4. 微量元素溶液<sup>[3]</sup>

准确称量 25 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、25 mg ZnCl<sub>2</sub>、20 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、

205 25 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、50 mg  $\text{SeO}_2$ 、50mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、250 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、  
206 250 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、31.4 mg  $\text{NaVO}_3$  和 250 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ，溶解于 20 mL 20 mM  
207 盐酸溶液中，使用煮沸的去离子水定容至 1 L，4 °C 保存。

#### 208 5. 碳酸氢钠溶液<sup>[3]</sup>

209 称取8.2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 于100 mL煮沸的去离子水中，并持续通入 $\text{CO}_2$ 气体20 min。

#### 210 6. 脂肪酸溶液<sup>[3]</sup>

211 准确量取6.85 mL乙酸、3.00 mL丙酸、1.84 mL丁酸及0.55 mL戊酸溶解于0.2 M  
212  $\text{NaOH}$ 溶液中，并定容至1 L，4 °C保存。

#### 213 7. 血红素溶液

214 称取0.1 g氯化血红素溶解于少量0.05 M  $\text{NaOH}$ 溶液，用灭菌水定容至1 L，4 °C保  
215 存。

#### 216 8. 还原剂溶液<sup>[2]</sup>

217 称取20.5 g  $\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶于1 L去离子水中，通入 $\text{CO}_2$ 气体1 h，使用前需用0.22  
218  $\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌，4 °C保存。

#### 219 9. 维生素母液<sup>[2]</sup>

220 称取泛酸钙160 mg、生物素250 mg、烟酸160 mg、对氨基苯甲酸20 mg、盐酸吡  
221 哆胺500 mg、盐酸吡哆醇20 mg、核黄素160 mg以及盐酸硫胺素160 mg，定容于  
222 1 L去离子水中混合均匀，经0.22  $\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌后4 °C保存。

#### 223 10. 氨基酸母液

224 称取92.5 mg天冬酰胺和219.3 mg谷氨酰胺，加入10 mL去离子水溶解，经0.22  
225  $\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌，现配现用。

#### 226 11. 40%厌氧甘油

227 量取80 mL丙三醇、称取40 mg  $\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶解于120 mL煮沸的去离子水中，通入  
228  $\text{CO}_2$ 气体1 h以上，120 °C高压灭菌20 min，4 °C保存。

#### 229 12. 灭菌厌氧生理盐水

230 称取9 g  $\text{NaCl}$ 、40 mg  $\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶于1 L去离子水中，通入 $\text{CO}_2$ 气体1 h，121 °C高  
231 压灭菌20 min，冷却至室温备用。

#### 232 13. 完全合成培养基中氨基酸和胺盐的含量<sup>[3][4]</sup>

233



234

表1 完全合成培养基中氨基酸和胺盐的含量

成分	含量 (mmol/L)
天冬氨酸 (Asp)	1.5
谷氨酸 (Glu)	2.6
丝氨酸 (Ser)	1.4
组氨酸 (His)	0.5
甘氨酸 (Gly)	1.8
苏氨酸 (Thr)	0.8
瓜氨酸 (Cit)	0.1
精氨酸 (Arg)	1.0
牛磺酸 (Tau)	0.1
丙氨酸 (Ala)	1.8
酪氨酸 (Tyr)	0.9
色氨酸 (Trp)	0.2
蛋氨酸 (Met)	0.4
缬氨酸 (Val)	1.0
苯丙氨酸 (Phe)	0.8
异亮氨酸 (Ile)	0.9
亮氨酸 (Leu)	1.7
鸟氨酸 (Orn)	0.5
赖氨酸 (Lys)	1.0
脯氨酸 (Pro)	1.7
半胱氨酸 (Cys)	0.3
天冬酰胺 (Asn)	0.7
谷氨酰胺 (Gln)	1.5
氯化铵 (NH <sub>4</sub> Cl)	0.4

235

## 236 致谢

237 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

1. Teusink, B., van Enckevort, F. H., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E. J. and Siezen, R. J. (2005). In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl Environ Microbiol.*, 71(11), 7253–7262.
2. Williams, B. A., Bosch, M. W., Boer, H., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim Feed Sci Technol.*, 123(part-P1), 445-462.
3. Dai, Z. L., Zhang, J., Wu, G. and Zhu, W. Y. (2010). Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine. *Amino acids*, 39(5), 1201–1215.
4. Dai, Z. L., Li, X. L., Xi, P. B., Zhang, J., Wu, G. and Zhu, W. Y. (2012). Metabolism of select amino acids in bacteria from the pig small intestine. *Amino acids*, 42(5), 1597–1608.
5. 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.
6. 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.
7. Ziemer C. J. (2014). Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eight-week continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides. *Appl Environ Microbiol.*, 80(2), 574–585.