

## 水禽肠道食糜微生物 LPS 含量的检测

### Analysis of Lipopolysaccharide Content in Chyme Microbiota of Waterfowl Cecum

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](mailto:wangwence@scau.edu.cn)

**摘要:** 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分, 由脂质和多糖构成。LPS 能诱发宿主细胞固有免疫反应, 在细菌的识别、黏附、转移、致病等过程中发挥重要作用。水禽主要指鸭和鹅, 测定盲肠食糜中的 LPS 含量能够有效反映宿主的肠道炎症及健康状况。本文主要介绍水禽盲肠食糜微生物样品采集、试剂盒的选择、微生物 LPS 的测定、数据分析等过程。同时对常见问题和解决方法进行总结, 方便同行更准确、高效地进行水禽食糜微生物 LPS 含量的检测。

**关键词:** 脂多糖, 水禽, 食糜, 酶联免疫吸附测定

#### 材料与试剂

1. 吸水纸
2. NaCl
3. KCl
4.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
5.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
6. 各种型号枪头 (20  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 1 ml)
7. 脂多糖酶联免疫吸附试剂盒 (南京建成, H255)
8. PBS (见溶液配方)

#### 仪器设备

1. 离心机

2. 移液器
3. 恒温培养箱
4. 涡旋仪
5. 分析天平
6. -80 °C 冰箱
7. 酶标仪

## 软件

1. ELISA Calc 回归拟合计算程序- v 0.1

## 试验原理

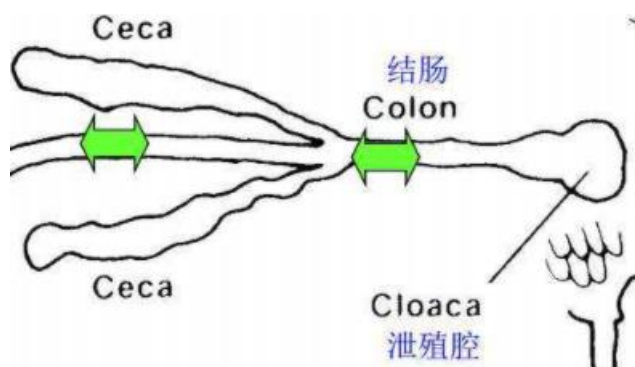
本实验利用酶联免疫吸附法测定食糜中 LPS 含量，将 LPS 抗原吸附在固相载体表面，使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行，最终通过荧光显色反应，利用呈色的深浅进行定量分析。

## 实验步骤

1. 样品采集

分离动物肠段，采集动物肠道，用冻存管小心收集盲肠食糜，置于液氮中保存，转移到实验室后，放入-80 °C 冰箱保存。所有使用的器具耗材均去除热原。

禽类肠段解剖图例：



2. 检测步骤

2.1 使用差量法在分析天平称取盲肠食糜。

2.2 按照 1 g : 19 ml 的比例，在食糜样品中加入 PBS 溶液。

2.3 在涡旋仪上振荡 5 min 混匀。

- 2.4 将离心管置入离心机中，25℃，900 × g 离心 10 min。
- 2.5 小心吸取上清液，置于离心管中备用。
- 2.6 将脂多糖酶联免疫吸附试剂盒放置于室温平衡 30 min。
- 2.7 在 5 支无菌离心管中加入样品稀释液，并标号 A、B、C、D 和 E，各加入 150 μl 样品稀释液。向 A 管中加入 150 μl 标准品，涡旋振荡 30 s 混匀后，从 A 管中吸取 150 μl 稀释液加入 B 管，以此类推。配制洗涤液备用。
- 2.8 取出酶标板，加入 50 μl 的标准品/样品，加入抗体一 50 μl，HRP 亲和素 50 μl，轻轻振荡混合均匀，覆膜，放入 37 °C 恒温培养箱，避光孵育 60 min。
- 2.9 弃去酶标板中液体，每孔加入 300 μl 洗涤液，轻轻摇晃振荡 30 s，弃去洗液，在吸水纸上拍干，重复 5 次。
- 2.10 加入 TMB 显色液，轻轻摇晃振荡混匀，在 37 °C 恒温培养箱中避光孵育 10 min。
- 2.11 轻轻摇晃酶标板，在波长 450 nm 读数。
- 2.12 根据标准孔数据绘制标准曲线，根据 OD 值计算 LPS 浓度。

## 结果与分析

利用 ELISA Calc 回归拟合计算程序—v 0.1，绘制标准曲线：

1. 根据标准曲线孔结果，输入与标准品浓度对应的 OD 值（图 1），扣除零孔背景值，进行回归拟合。
2. 点击“回归方程”，获得拟合曲线（图 2）。
3. 确定  $r^2$  值（与 1 越接近曲线越真实可靠，图 3）。
4. 点击由 Y (反应/OD 值) 计算 X (浓度/剂量)
5. 输入每孔对应 OD 值读数，获得 LPS 浓度 (EU/L)。

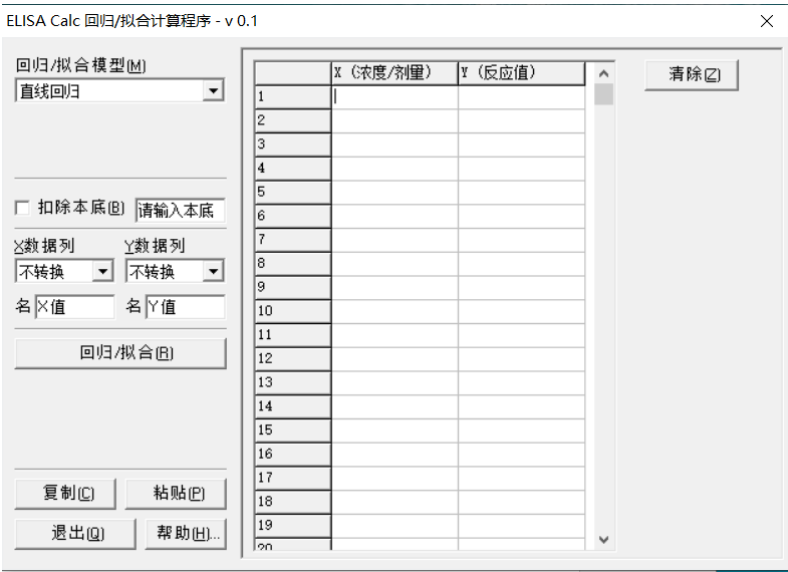


图 1. ELISA Calc 回归拟合计算程序——v 0.1 数据输入界面

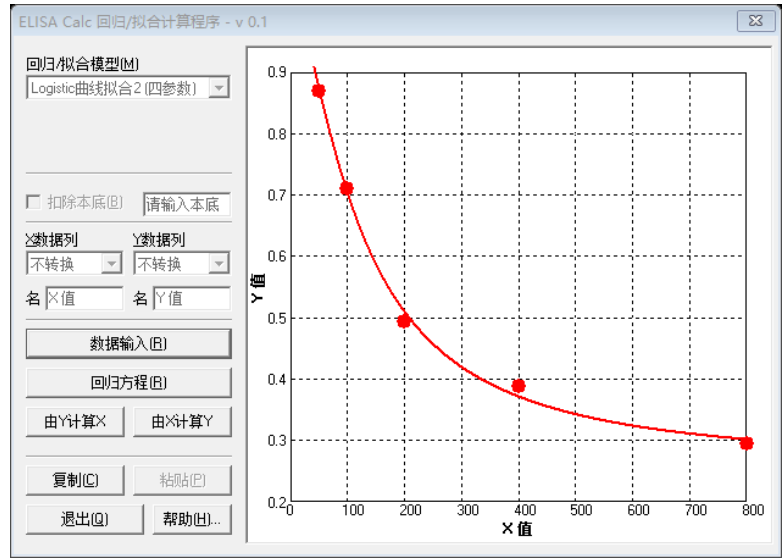


图 2. Logistic 曲线拟合（四参数）标准曲线

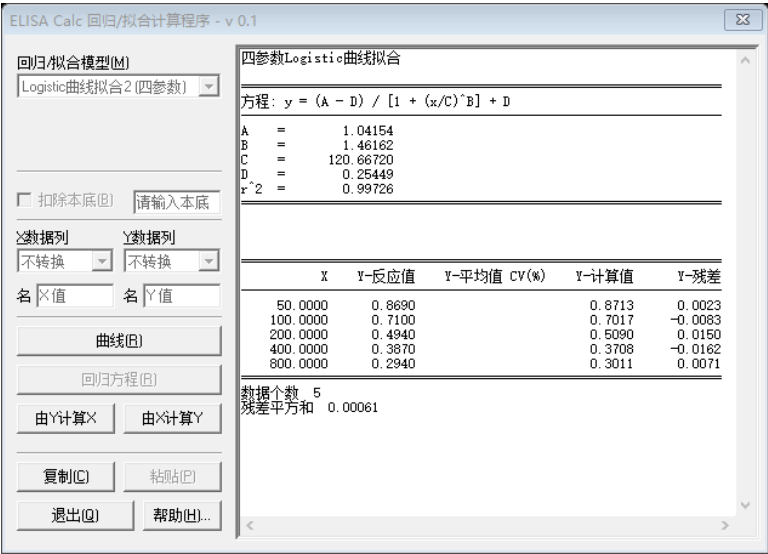


图 3. 回归方程及数据转换界面

注意事项

1. 食糜匀浆离心后需要小心吸取上清，避免杂质干扰试验结果。
2. 确保孵育时间和孵育温度正确，以保证抗原抗体结合充分。
3. 配置洗涤液时应轻轻摇匀，避免泡沫产生。
4. 洗板过程中不要让板处于干燥状态时间过长，以免影响显色结果。
5. 显色液应按顺序足量添加。
6. 确保酶标板底部干净，未受污染，以免影响读数结果。
7. 如有多余孔可进行复孔试验，增加试验稳定性以及数据可信性。
8. 根据实际情况确定最佳稀释倍数，有条件的情况下，可以进行预实验。
9. 所有试验中使用的器材均做去热原处理，避免干扰试验结果

失败经验

1. 未调节离心转速，导致 LPS 离心沉淀，无法检出。应注意离心转速数值和单位，以及离心时间。

溶液配方

1. PBS

使用分析天平分别称取 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.628 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 加入灭菌去离子水, 搅拌均匀, 使用容量瓶定容至 1 L, 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.4, 常温保存。

## 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. Lu, Y. C., Yeh, W. C., and Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *CYTOKINE* 42, 145-151.
2. Riedel, C. U., Schwiertz, A., and Egert, M. (2014). The human microbiota and microbiome. *CABI*.
3. Sridharan, G. V., Choi, K., Klemashevich, C., Wu, C., Prabakaran, D., Pan, L. B., Steinmeyer, S., Mueller, C., Yousofshahi, M., and Alaniz, R. C. (2014). Prediction and quantification of bioactive microbiota metabolites in the mouse gut. *NAT COMMUN* 5, 5492.