**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](mailto: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. Na2HPO4·12H2O
6. KH2PO4
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
13. 电子秤
14. PBS (见溶液配方)

**仪器设备**

1. 高压灭菌锅
2. 离心机
3. -80 °C冰箱
4. 涡旋振荡器
5. 水浴锅
6. 移液器
7. pH计
8. 血球计数板

**实验步骤**

1. 供体鸭的选择
2. 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存) 。
3. 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) 按照1:5的比例混合稀释，匀浆5 min。
4. 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。
5. 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。
6. 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，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，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 -42.5℃，鹅40.0-41.3℃）。复苏菌液后，将粪菌液混匀，吸取少量样本用无菌PBS稀释，用酶标仪于600nm波长读数，OD值1对应浓度为2 x 109 CFU，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108 CFU。
7. 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。
8. 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333862) *Gut Microbes* *4*, 125-135.
2. Hu, J., Chen, L., Tang, Y., Xie, C., Xu, B., Shi, M., Zheng, W., Zhou, S., Wang, X., and Liu, L. (2018) [Standardized Preparation for Fecal Microbiota Transplantation in Pigs](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29971061). *FRONT MICROBIOL* *9*, 1328.
3. Li X, Li X, Shang Q, Gao Z, Hao F, Guo H, Guo C. Fecal microbiota transplantation (FMT) could reverse the severity of experimental necrotizing enterocolitis (NEC) via oxidative stress modulation. Free Radic Biol Med. 2017 Jul;108:32-43.
4. Willing, B. P., Anjalee, V., Matthew, C., Teerawat, T., Brett, F. B., and Stefan, B. (2011) [Altering Host Resistance to Infections through Microbial Transplantation.](https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026988) *PLOS ONE* *6*, e26988.