

患兔流行性腹胀病家兔肠道菌群结构的 ERIC-PCR 指纹图谱分析

胡波 范志宇 王芳* 魏后军 宋艳华 仇汝龙 刘星 徐为中 薛家宾

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要 [目的]建立患兔流行性腹胀病家兔肠道细菌的 DNA 指纹图谱,并分析其肠道菌群结构特征的整体差异。[方法]提取流行性腹胀病兔及健康兔肠道内容物细菌总 DNA,应用肠杆菌基因间重复共有序列基因扩增技术(ERIC-PCR)建立肠道菌群的 DNA 指纹图谱,并分析其整体差异。[结果]病兔大肠样本 DNA 条带明显少于健康兔对照,而小肠样本在二者间无明显差异,说明病兔与健康兔大肠肠道菌群存在整体差异。病兔大肠样本 DNA 在约 350 bp 处出现 1 条主带,同时伴有若干较弱的带,而健康兔对照大肠样本 DNA 条带均无明显规律。病兔大肠肠道的微生物群落多样性指数为(2.03±0.49),健康兔大肠肠道的微生物群落多样性指数为(3.30±0.31),差异极显著($P < 0.01$)。[结论]兔流行性腹胀病发病兔大肠中肠道菌群结构多样性降低,可能存在单一或几种特定的肠道优势菌群。

关键词 兔流行性腹胀病;ERIC-PCR;肠道菌群;多样性指数

中图分类号 S858.291 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)01-083-03

DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2016.01.028

ERIC-PCR Fingerprint of Intestinal Microflora of Epidemic Abdominal Distention Disease in Domestic Rabbit

HU Bo, FAN Zhi-yu, WANG Fang* et al (Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract [Objective] To establish the DNA fingerprint of intestinal microflora of epidemic abdominal distention disease in domestic rabbit, and to analyze the overall structural differences of intestinal microflora. [Method] The total DNAs were extracted from the intestinal samples of rabbits, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) was used to set up the DNA fingerprint of intestinal microflora. The overall differences existed among the fingerprints of intestinal microflora were compared. [Result] The number of DNA bands about large intestinal samples was obviously less in diseased rabbits than in healthy subjects, while the small intestinal samples showed similar DNA bands, indicating that significant differences existed in large intestine between diseased rabbits and healthy ones. The principal band of DNA fingerprint of READ samples appeared at about 350 bp, while no principal band was found in healthy samples. The corresponding Shannon's diversity indexes of diseased rabbits and healthy rabbits were (2.03±0.49) and (3.30±0.31), respectively, showing significant differences ($P < 0.01$). [Conclusion] The diversity of large intestine microflora significantly reduces compared with healthy rabbits. It is likely that one or more principal microflora exist in the intestinal tissue of READ rabbits.

Key words Rabbit epidemic abdominal distention disease; ERIC-PCR; Intestinal microflora; Diversity index

兔流行性腹胀病是 2004 年春以来我国发生的由特定病原菌引起的家兔传染性疾病,具有一定的传染性和区域流行性,但其病原未知^[1]。目前在我国江苏、山东等省份仍有该病的发生和流行。病兔主要表现为腹部膨胀、有胶冻样黏液排泄物及盲肠阻塞。从患病兔消化道中分离出的单一细菌不能复制该疾病的典型病理特征^[1-2]。该病的临床症状及病理变化与法国 Licois 等^[3]报道的兔流行性肠病十分相似,有学者认为其可能为同一种病^[4]。断奶仔兔至 4 月龄兔的发病率为 50%~70%,死亡率可达 90% 以上^[1-2]。研究表明,大多数抗生素药物和抗球虫药物对该病没有明显疗效^[2-5],而在饲料或饮水中添加复方新诺明^[1]、恩拉霉素^[2]、微生态制剂^[4-6]等对治疗该病有一定效果。除偶有发现轮状病毒外,其他病毒(如杯状病毒、圆环病毒等)的检测均呈阴性。因此,认为该病是一种肠道细菌性传染病^[7]。

肠道菌群是一个以专性厌氧菌为主的微生态系统。由于不能对肠道中所有细菌种类进行分离培养,因而肠道菌群的定性和定量研究比较困难^[8],而分子生态学的发展为解决该问题提供了可能^[9]。肠杆菌基因间重复共有序列基因扩增技术(Enterobacteria repetitive intergenic consensus-PCR,

ERIC-PCR)是一种用于分析不同生态系统结构差异及同一生态系统中微生物群落结构变化的方法,近年来已应用于肠道菌群结构特征的分析^[8,10-11]。笔者采用 ERIC-PCR 技术建立了流行性腹胀病兔和正常对照兔的肠道菌群 DNA 指纹图谱,并对各组肠道菌群结构的整体差异进行了比较,以探讨兔流行性腹胀病发病机制中家兔肠道微生物的变化及其影响。

1 材料与与方法

1.1 样品采集 兔流行性腹胀病肠道样品采自江苏涟水、邳州等地,健康兔肠道样品采自江苏南京某兔场。所有样品采集后立即于 -20℃ 下冷冻保存,备用。

1.2 试剂与仪器 DNA Marker DL 2000 购自 TaKaRa 公司;柱式粪便 DNAout 提取试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司;Pfu DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 兔肠道细菌总 DNA 的提取。取发病兔及健康对照兔肠道内容物,分为小肠和大肠内容物标本,按照柱式粪便 DNAout 试剂盒说明书提取细菌总 DNA,紫外分光光度计定量后,-20℃ 下冻存备用。

1.3.2 ERIC-PCR 反应。引物序列参照文献^[12]由 Invitrogen 公司合成:上游引物 ERIC-F,5'-ATGTAAGCTCTGGGGAT-TCAC-3';下游引物 ERIC-R,5'-AAGTAAGTACTGGGGT-GAGCG-3'。PCR 扩增体系为:10×Pfu Buffer 5.0 μL、2.5

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-44)。

作者简介 胡波(1982-),男,江苏南京人,助理研究员,硕士,从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究。* 通讯作者,研究员,从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究。

收稿日期 2015-12-07

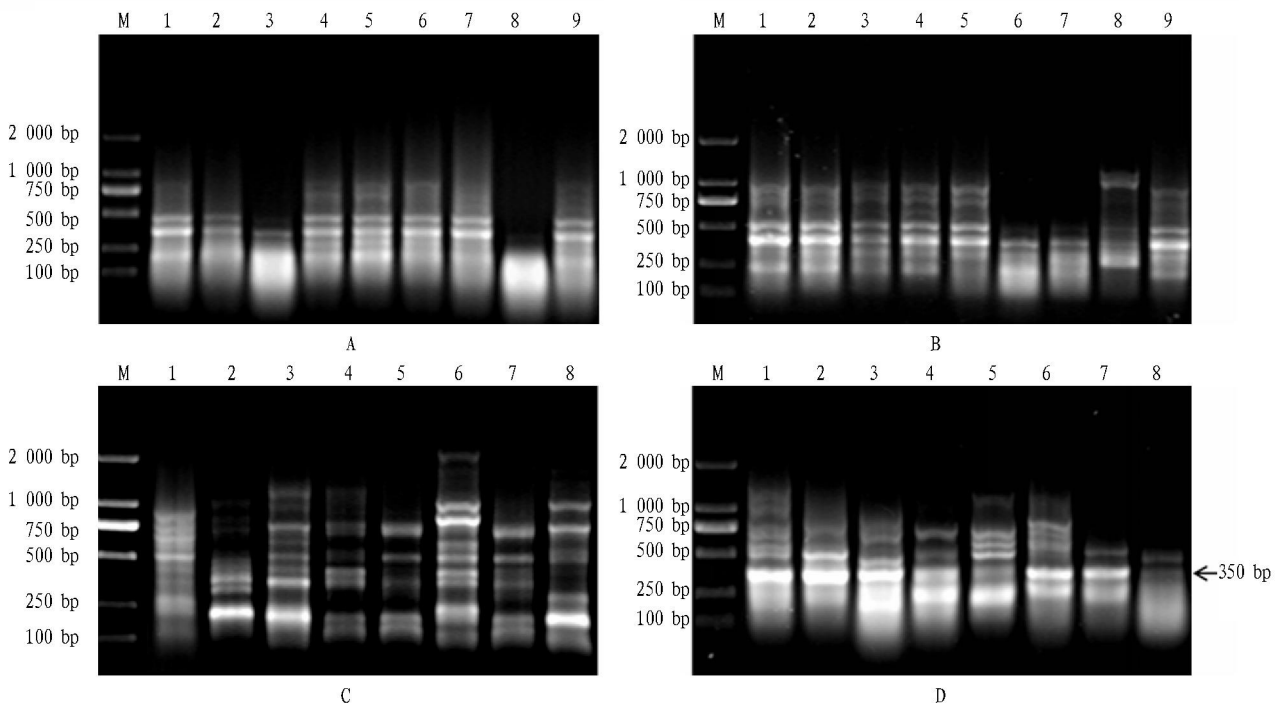
mmol/L dNTP 4.0 μL、50 mmol/L MgSO₄ 2.0 μL、10 mmol/L 上下游引物各 1.0 μL、*Pfu* DNA 聚合酶 0.4 μL、DNA 模板 100 ng，加无菌水至 50 μL。PCR 反应程序：94 °C 预变性 7 min；94 °C 变性 30 s 52 °C 退火 1 min 68 °C 延伸 8 min 30 个循环；68 °C 延伸 16 min 结束反应。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物 经过凝胶成像分析系统观察 DNA 条带并记录结果。

1.3.3 ERIC-PCR 图谱分析。假设每条泳道的每个条带代表 1 个细菌类群 通过电泳图谱统计样本中独特的 ERIC 条带的数量 并制成累积曲线 以分析样本中 ERIC 条带数量增加的趋势。使用 SensiAnsys 分析软件 将电泳图谱转化为波峰图，每个波峰下面积代表 1 个 ERIC 条带的亮度 即代表该细菌类

群的数量 通过 Shannon - Wiener 指数^[13] 进行多样性分析。

2 结果与分析

2.1 样品 DNA 指纹图谱的整体差异 从图 1 可以看出 所采集的 9 份兔流行性腹胀病小肠样品 DNA 条带(图 1B) 与正常小肠样品(图 1A) 相比无明显差异 条带主要分布于 100 ~ 1 000 bp,说明小肠中菌群的结构较为相似 小肠可能不是流行性腹胀病病原主要定居的部位。采集 8 份兔流行性腹胀病大肠样品(图 1D) 整体条带数目减少 与正常大肠样品(图 1C) 相比疾病组大肠样品在约 350 bp 处有 1 个明显突出的条带 该条带代表的菌群所占比例较高说明腹胀病兔大肠样品可能存在某一类肠道优势细菌。



注: A. 正常小肠样品; B. 兔流行性腹胀病小肠样品; C. 正常大肠样品; D. 兔流行性腹胀病大肠样品。M. DNA Marker DL2000; 1 ~ 9 为样品。
Note: A. Normal sample of small intestine; B. Small intestinal sample of rabbits with epidemic abdominal distension disease; C. Normal sample of large intestine; D. Large intestinal sample of rabbits with epidemic abdominal distension disease. M. DNA Marker DL2000; 1 - 9. Samples.

图 1 兔肠道菌群 DNA 指纹图谱

Fig.1 DNA fingerprint of intestinal microflora in rabbits

2.2 大肠样品 ERIC-PCR 条带分析 为反映大肠样品中细菌种类的数量变化 对 ERIC-PCR 图谱中随着样本个体 (X_n) 的增加 新的 ERIC 条带的累加数量 (Y_n) 进行统计, $Y_n = Y_{n-1} +$ 第 n 个体与前 $n-1$ 个个均不相同的 ERIC 条带数目。对疾病组样品和对照组进行统计后 得到 2 组关于 (X, Y) 的数据 并制成累积曲线(图 2)。从图 2 可以看出 疾病组的 ERIC 条带总数和累积曲线的斜率均明显小于对照组。

2.3 多样性指数分析 将代表细菌种类的泳道中各条带的强弱通过波峰图转化为细菌数量后 以 Shannon - Wiener 公式分别计算 2 组大肠样本 ERIC 条带多样性指数分布。经计算 疾病组个体多样性指数为 (2.03 ± 0.49) 对照组个体多样性指数为 (3.30 ± 0.31) 疾病组个体多样性指数比正常对照组减少。经 t 检验发现 2 组间多样性指数存在极显著差

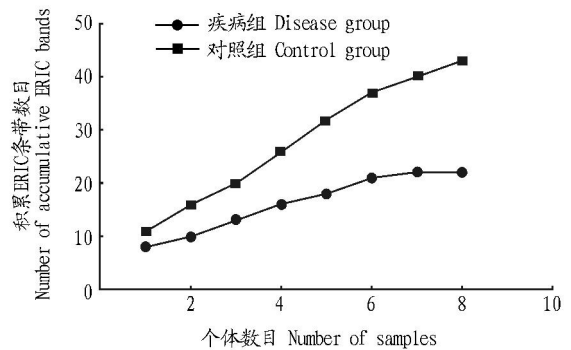


图 2 ERIC 条带积累曲线

Fig.2 Accumulation curve of ERIC bands

异 ($P < 0.01$)。因此 大肠菌群多样性减少、结构趋于简单是流行性腹胀病个体的主要特征之一。

3 讨论与结论

目前,国内外研究均未确定兔流行性腹胀病的病原^[1-2,14],但普遍认为兔流行性腹胀病由细菌性感染引起而非病毒性和寄生虫性感染引起^[14-15]。在肠道疾病的发生过程中,肠道菌群的变化是一个重要的因素^[16]。以前对细菌性肠道疾病的研究主要通过细菌纯培养的方法,该方法有一定的局限性。由于肠道中多数未知菌无法进行分离培养,因此进行细菌的纯培养不能完全准确反映肠道菌群的结构情况,有时难以发现与肠道疾病相关的特异病原菌。

在 ERIC-PCR 图谱中,泳带亮度反映了肠道中的优势菌群,而泳带数目和位置反映了肠道菌群的多样性^[17]。笔者通过肠道菌群 DNA 图谱分析,发现病兔与正常对照在小肠肠道菌群无明显差异,而在大肠肠道菌群存在整体差异。病兔大肠肠道样本 DNA 指纹图谱条带明显少于正常对照,且在约 350 bp 处有高光主带。该试验结果与临床症状中盲肠阻塞及含有胶冻样黏液排泄物相互印证。同时,该试验借用了生态学上 Shannon-Wiener 公式计算大肠样本 ERIC 条带的多样性指数分布情况,结果表明与对照组相比疾病组大肠菌群多样性指数的分布减少。这些结果反映出流行性腹胀病兔个体肠道菌群结构存在明显的改变,疾病组存在某一类或以某类为主的肠道优势细菌。

笔者用 DNA 指纹图谱技术首次在分子水平上对流行性腹胀病兔与正常健康兔之间的肠道菌群结构差异和自身的特点做了初步研究,随着研究的深入可为主要病原的分布和分离鉴定提供一定的依据。

参考文献

[1] 薛家宾,尹秀凤,周勇岐,等.兔流行性腹胀病[J].中国养兔杂志,2008(1):26-28.

(上接第 80 页)

植后的分蘖和收获时的产量有提高作用。因此,笔者认为等离子补光灯适合用作水稻育秧补光的光源,该试验结果为新型等离子补光灯在东北地区水稻育苗期的应用提供了理论依据。

该试验只研究了移动补光方式对水稻幼苗生长发育的影响,有关光照时间、光照强度及光质等对水稻育苗的影响有待进一步探讨,同时可考虑结合栽培技术来提高水稻育苗的质量。

参考文献

[1] 杜华平.水稻机械化生产技术手册[M].上海:上海科学技术出版社,

- [2] 林毅,罗宜熟,谢晶,等.家兔“流行性腹胀病”的病因和防治研究初报[J].中国养兔杂志,2008(11):27-30.
- [3] LICOIS D,WYERS M,COUDERT P. Epizootic rabbit enteropathy: Experimental transmission and clinical characterization [J]. Vet Res,2005,36(4):601-613.
- [4] 坤清芳,耿毅,邓钊宾,等.家兔流行性腹胀病病因及其防治措施[J].黑龙江畜牧兽医,2015(14):142-144.
- [5] 李术海.怎样防治家兔流行性腹胀病[J].吉林畜牧兽医,2009,30(11):45-46.
- [6] 王晓梅.家兔流行性腹胀病病因、分析及防控措施[J].养殖技术顾问,2010(9):113.
- [7] LICOIS D,COUDERT P,MARLIER D. Epizootic rabbit enteropathy [M]// MAERTENS L,COUDERT P. Recent advances in rabbit sciences. Melle, Belgium: ILVO,2006:164-165.
- [8] 林朝洪,倪学勤,曾东,等.重复序列 ERIC(IRU)研究进展[J].微生物学报,2007,47(2):370-373.
- [9] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev,1995,59(1):143-169.
- [10] 侯翔宇,王维林,李勇.慢传输便秘大鼠肠道菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J].中国医科大学学报,2013,42(4):348-354.
- [11] 鲁海峰,魏桂芳,李仲远,等.ERIC-PCR 分子杂交技术分析大熊猫菌群结构[J].中国微生态学杂志,2005,17(2):81-84.
- [12] VERSALOVIC J,KOEUTH T,LUPSKI J R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acid Res,1991,19(24):6823-6831.
- [13] SHANNON C E,WEAVER W. The mathematical theory of communication [M]. Urbana: University of Illinois Press,1963:78-90.
- [14] HUYBENS N,HOUEIX J,LICOIS D,et al. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples [J]. Vet J,2013,196(1):109-110.
- [15] SZALO I M,LASSENCÉ C,LICOIS D,et al. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions [J]. Vet J,2007,173(3):652-657.
- [16] 王志红,韩英,王继恒,等.几种肠道疾病患者肠道菌群结构特征的 DNA 指纹图谱分析[J].解放军医学杂志,2009,34(11):1326-1332.
- [17] 潘莉,杜慧敏,黄海东,等.腹泻儿童肠道菌群结构特征的 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J].中国微生态学杂志,2003,15(3):141-143.

2008.

- [2] 陈恩谦.不同类型水稻品种营养生长期的温光效应研究[J].中国农学通报,2005,21(5):242-244.
- [3] 马旭,林超辉,齐龙,等.不同光质与光照度对水稻温室立体秧苗素质的影响[J].农业工程学报,2015,31(11):228-235.
- [4] 王洪安.北方温室人工补光光源特性及优化配置研究[J].吉林农业,2011(1):33-34.
- [5] 徐继祥,才洪艳.水稻大棚育苗宽窄行超稀植栽培技术要点[J].农民致富之友,2008(5):8.
- [6] 张林青,蔡小铭.光强对水稻秧苗素质的影响[J].江苏农业科学,2007(3):31-33.
- [7] 付传明,黄宁珍,赵志国,等.光质与补光对水稻幼苗生长及光合速率的影响[J].广西植物,2007,27(2):255-259.