

## 应用变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA 序列分析对 山羊瘤胃细菌多样性的研究

姚文<sup>1,2,3</sup>, 朱伟云<sup>1</sup>, 韩正康<sup>1</sup>, Antoon D L Akkermans<sup>2</sup>, Barbara Williams<sup>3</sup>, Seerp Tamminga<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学消化道微生物研究室, 南京 210095; <sup>2</sup>瓦赫宁根农业大学微生物系; <sup>3</sup>瓦赫宁根农业大学动物系动物营养研究室, 荷兰)

**摘要:** 以取自 3 头安装有永久性瘤胃瘘管的土种山羊的瘤胃内容物为材料, 经过 DNA 抽提和 PCR 扩增, 扩增产物利用变性梯度凝胶电泳技术 (DGGE, 一种 DNA 指纹技术) 分析瘤胃细菌在两种日粮条件下的多样性。同时利用基因序列分析技术, 分析了 16 个在 DGGE 胶上有匹配带的克隆的 16S rDNA 序列, 并与现有的数据库进行了比较。结果表明, 饲喂基础日粮时 3 头山羊瘤胃内容物的 DGGE 图谱有一定的相似性 (43%~55%); 饲料中添加大豆黄酮一定程度上影响了瘤胃细菌的组成, DGGE 谱带变化程度分别为 1 号 36%、2 号 46%、3 号 30%。基因序列分析表明, DGGE 图谱中优势条带的 16S rDNA 基因序列中有 5 个基因序列与基因数据库登录的相关序列的相似性大于 97%, 8 个基因序列的相似性在 90%~96%, 余下的低于 90%。相似性大于 97% 的 5 个克隆中, 只有 1 个被鉴定为 *Prevotella* sp., 其余 4 个都属于未被鉴定的瘤胃细菌。

**关键词:** 山羊瘤胃细菌; 遗传多样性; PCR; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 16S rDNA

## Analysis of Rumen Bacterial Diversity of Goat by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and 16S rDNA Sequencing

YAO Wen<sup>1,2,3</sup>, ZHU Wei-yun<sup>1</sup>, HAN Zheng-kang<sup>1</sup>, Antoon D L Akkermans<sup>2</sup>,  
Barbara Williams<sup>3</sup>, Seerp Tamminga<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

<sup>2</sup>VLG-Laboratory of Microbiology, <sup>3</sup>WIAS-Animal Nutrition Group, Wageningen University, The Netherlands)

**Abstract:** Diversity of rumen bacteria of the rumen content of Chinese white goats was analyzed by PCR amplification, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing of 16S rDNA clone libraries. DNA was extracted from rumen contents of goats fed two diets with and without the addition of daidzein. The V6-V8 region of 16S rDNA of bacteria was amplified and the amplicons were then separated based on a linear gradient of denaturants in DGGE, a fingerprinting technique. A clone library was created from complete 16S rDNA. From the library, 16 clones had their V6-V8 regions matched predominant bands on the DGGE gel and their 16S rDNAs were then sequenced and subjected to an online similarity search. Five clones showed their similarities with database sequences over 97%, with one sequence similar to *Prevotella* sp., the rest were similar to those unidentified rumen bacteria. From the library, eight clones with similarities in the range of 90%~96% and the remaining three clones were less than 90%.

**Key words:** Goat rumen bacteria; Bacterial diversity; PCR; Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rDNA

收稿日期: 2003-05-20

基金项目: 自然科学基金资助项目 (39870578) 和国家杰出青年科学基金资助项目 (30025034)

作者简介: 姚文 (1967-), 女, 江苏常熟人, 副教授, 博士研究生, 主要从事动物消化道微生物学的研究。朱伟云为通讯作者, Tel: 025-84395380;  
E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com

随着分子生物学的迅速发展,无需进行细菌培养的 16S rDNA 序列分析技术被率先引入瘤胃细菌多样性的研究<sup>[1-4]</sup>。20 世纪 90 年代以来,基于 16S rDNA 的 DNA 指纹技术日臻完善,其中的变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)由于能有效分析复杂微生物群落及其多样性,而越来越受到重视。DGGE 的基本原理是长度相同而碱基组成不同的 DNA 序列在变性梯度凝胶上有各自特定的变性行为,因而在凝胶的特定位置形成泳带<sup>[5]</sup>。该技术自 1993 年被 Muyzer 等首次用于分析土壤环境的微生物区系以来<sup>[6]</sup>,已迅速被用于研究其它的环境微生物生态。Simpson 等和朱伟云等应用 DGGE 指纹技术研究了仔猪肠道的细菌区系<sup>[7-9]</sup>以及饲料成分对仔猪肠道微生物区系的影响<sup>[10]</sup>。Kocherginskaya 等则率先将 DGGE 技术应用于瘤胃细菌群体结构的研究<sup>[11]</sup>。本研究旨在通过 PCR/DGGE 以及 16S rDNA 序列分析,研究土种山羊瘤胃细菌的多样性,及饲喂大豆黄酮所引起的瘤胃细菌组成的变化,探讨 PCR/DGGE 和 16S rDNA 序列分析相结合的技术途径在研究瘤胃细菌多样性方面的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物、饲料组成和样品收集

土种公山羊 3 头,于试验开始前 2 周手术安装永久性瘤胃瘘管并饲喂基础日粮。基础日粮精粗比为 30:70,其中精饲料组成为 15%麸皮、15%棉籽饼和 70%的玉米,粗饲料为青干草。试验分两期,对照期(control, C)和试验期(daidzein, D)。对照期饲喂基础日粮,试验期添加大豆黄酮(10 mg·kg<sup>-1</sup>体重),每期开始前为 2 周预试期。瘤胃内混合样品采集均于上午 9 点(饲喂后 1 h)经瘘管收集,-20℃保存待测。

### 1.2 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

参照文献[12]的方法。

### 1.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和图谱的分析

参照文献[6]的方法,变性物(甲酰胺和尿素)梯度:30%~60%;电泳条件:60℃、85V 16 h 以上(Bio-Rad, USA);用 Molecular Analyst 2.15 (Bio-Rad, USA)对 DGGE 图谱进行相似性分析。

### 1.4 16S rDNA 全序列的克隆和分析

1 对细菌通用引物 8f[5' CAC GGA TCC AGA GTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG]和 1510r[5' GTG AAG CTT AGG G(C/T)T ACC TTG TTA CGA

CTT]作为 PCR 引物用于引导瘤胃细菌 16S rDNA 全序列的扩增。扩增产物经 Qiaquick PCR 产物纯化试剂盒(Westburg, the Netherlands)纯化后,插入 pGEM-T 载体(Promega, USA)并转入 *E. coli* JM109。以 T7 (5' ATT ACG CAC ACT TAT AGG)和 SP6 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG)为引物进行 PCR 反应以检测插入子的大小。插入子正确的克隆扩增其 16S rDNA 的 V6-V8 区域并与原样品在 DGGE 胶上进行比较,寻找匹配的条带。与原样品有匹配条带的克隆的质粒经纯化后利用 Amersham 的序列分析试剂盒进行测序 PCR 反应(Amersham, U K)和产物的电泳分析,利用 LI-COR DNA sequencer 4000L (LiCor, USA)进行序列的自动分析并在此基础上进行人工校正。序列的同源性通过互联网与 GenBank 进行比较(网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

### 1.5 核苷酸序列的基因库登录号(accession number)

本试验所测山羊瘤胃细菌的 16S rDNA 半序列均已被 GenBank 收录,登录号分别为:GC5 (AY207432), GD37 (AY207433), GD38 (AY207434), GC15 (AY207435), GC22 (AY207436), GC23 (AY207437), GD51 (AY207438), GC2 (AY207439), GD20 (AY207440), GD10 (AY207441), GC57 (AY207442)。

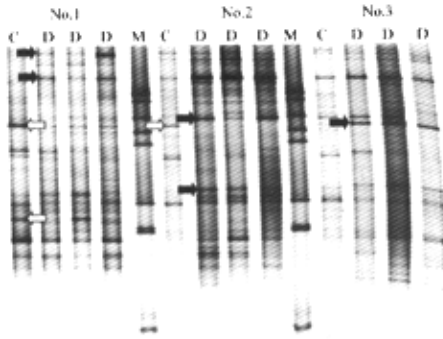
## 2 结果与分析

### 2.1 山羊个体间瘤胃细菌多样性的差异

如图 1C 泳道所示,对照期 1 号、2 号山羊的 DGGE 图谱中至少有 15 条可分辨条带,3 号山羊的 DGGE 图谱中则至少有 12 条,3 头山羊的 DGGE 图谱间有一定的相似性,经 Molecular Analyst 2.15 分析,2 号和 3 号山羊的 DGGE 图谱之间的相似性(55%)比它们与 1 号山羊之间的大(43%),但个体间差异也很明显。因此,在研究大豆黄酮的作用时,笔者采用了自身比较的方法。

### 2.2 饲料中添加大豆黄酮对瘤胃细菌组成的影响

图 1 显示 3 头山羊添加大豆黄酮时连续 3 d 的 3 个平行样品间有着很高的相似性,均在 70%以上,尤其是 2 号和 3 号山羊均接近 80%。同时也显示大豆黄酮在一定程度上影响了瘤胃细菌的组成,图中的空心箭头指示处直观地反映了 1 号和 2 号山羊在添加大豆黄酮后该细菌的减少,而实心箭头指示处则反映了相反的变化趋势。相似性分析(molecular analyst 2.15)表明,添加大



1, 2, 3 为 3 头山羊的标号; M. 由 9 个迁移率不同的克隆组成的标准品; C. 饲喂基础日粮的瘤胃样品; D. 饲喂大豆黄酮的瘤胃样品  
1,2,3. goat number; M. marker; C. diet without daidzein; D. diet with daidzein

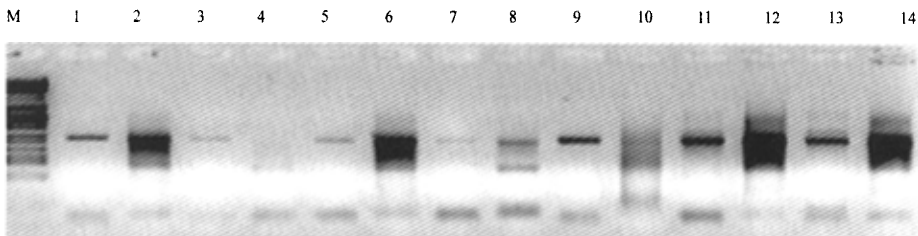
图 1 饲喂大豆黄酮前后瘤胃细菌的 DGGE 图谱

Fig.1 Silver stained DGGE gel showing rumen bacterial profiles of V6-V8 region amplicons of 16S rDNA with and without the addition of Daidzein

豆黄酮前后山羊瘤胃细菌区系 DGGE 图谱的相似性, 分别为 1 号羊 64%、2 号羊 54%、3 号羊 70%。为进一步阐明这种变化, 笔者分析了优势条带的基因序列。

2.3 DGGE 图谱中优势条带的序列分析

在本研究中笔者采用了 2 个 PCR 循环扩增瘤胃细菌的 16S rDNA。①94℃ 3 min、35 个循环 (94℃ 45 s 和 68℃ 1.5 min)、68℃ 7 min; ②94℃ 3 min、35 个循环 (94℃ 45 s、58℃ 45 s 和 68℃ 1 min)、68℃ 7 min。循环②是 Zoetendal 等<sup>[12]</sup> 和 Heilig 等<sup>[13]</sup> 用于人消化道微生物 16S rDNA 扩增的已经成熟的方法, 但在用于扩增瘤胃细菌时却不太理想, 产物的专一性不够。因此笔者调整了循环反应的温度和时间以提高产物的专一性 (循环①)。从图 2 可以看出通过循环①得到了很专一的 PCR 产物, 并对图 2 中的 1、9、11、13 号样品进行了克隆, 其中 1 和 9 号样品分别来自 1 号和 3 号山羊的对照期, 11 和 13 号样品分别来自 1 号和 3 号山羊的试验期。同时对 16 个与原始样品在 DGGE 图谱上有匹配带的克隆进行了 16S rDNA 半序列分析, 并与现有的基因库进行了比较。其中 5 个克隆的序列与基因库最相似菌的相似性大于 97%, 8 个



奇数为循环一的产物, 偶数为循环二的产物

M. marker; odd numbers. products of PCR reaction I; even numbers. products of PCR reaction II

图 2 瘤胃细菌 16S rDNA 的 PCR 产物

Fig.2 EB-stained agarose gel of PCR products' profiles of 16S rDNA

克隆与基因库最相似菌的相似性在 90%~96%之间, 余下的低于 90%。

笔者以 3 号山羊为例比较了最相似菌与同源 16SrDNA 的 V6~V8 的对应关系, 结果直观地显示于图 3 中。饲喂大豆黄酮后呈减少趋势的为克隆 GC15、GC57、GC2 和 GC5, 它们分别与基因库登录的

unidentified rumen bacterium JW34、unidentified rumen bacterium RF38、uncultured bacterium clone P-211-o5、uncultured bacterium clone P-1082-a5 最相似, 而呈增加趋势的为克隆 GD51、GD38 和 GD37, 它们分别与基因库登录的 unidentified rumen bacterium RFN24、unidentified rumen bacterium RFN8、uncultured rumen

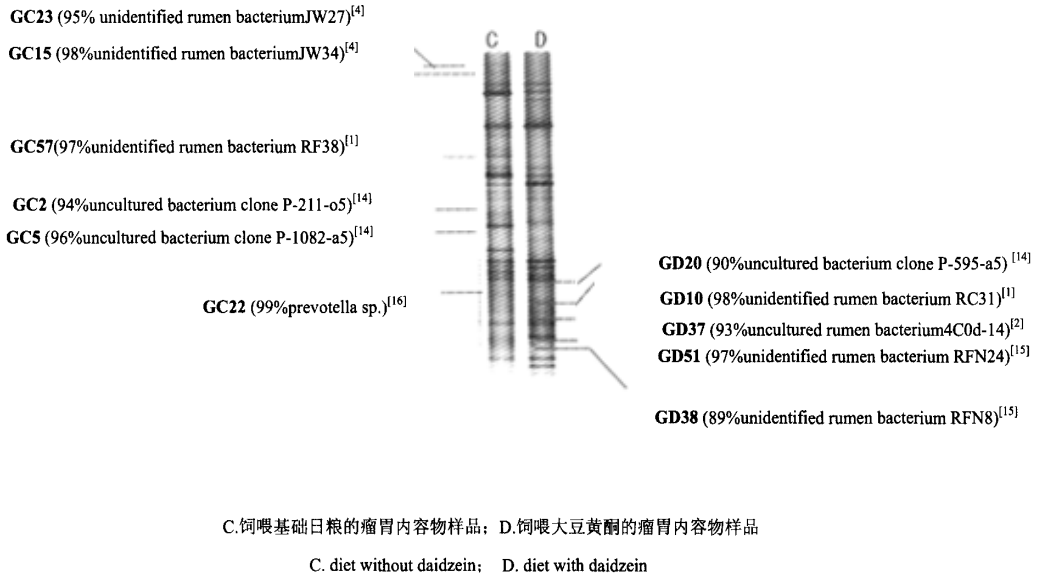


图 3 3 号山羊 16S rDNA 序列最相似菌与同源 16S rDNA 的 V6-V8 的对应关系

Fig.3 Identification of dominant bands in DGGE pattern of the V6-V8 regions of rumen samples from goat 3

bacterium4C0d-14 最为相似。由于瘤胃细菌多为厌氧细菌,体外培养鉴定非常困难,仅见报道 unidentified rumen bacterium JW34 与嗜淀粉瘤胃杆菌 (*Rumino-bacteramylophilus*) 有 80% 的相似性<sup>[4]</sup>, unidentified rumen bacterium RF38 和梭菌 *Clostridium celerecrescens* 有 90% 的相似性<sup>[1]</sup>。这些结果表明,山羊瘤胃中绝大多数细菌还是未知的。

### 3 讨论

瘤胃微生物对于宿主而言意义重大,行使着多种生理功能,如降解饲料营养物质、合成维生素、饲料脱毒等,因此各种反刍动物功能性添加剂实际上都是通过调节瘤胃微生物的功能而产生作用。而至今仍未见公认的高效反刍动物功能性添加剂报道的原因之一,也是由于瘤胃微生物数目巨大、种类繁多,以及受到多种生理因素、饲料组成、环境因素等的影响,使得这些添加剂的作用不稳定,因此如何准确全面地了解瘤胃微生物区系是调控瘤胃功能的前提。

DGGE 分析技术已被证明是一种快速有效的分析微生物生态的方法。Kocherginskaya 等曾经分析了饲喂两种不同日粮的阉公牛瘤胃液样品的 DGGE 图谱。4 头去势公牛的日粮为豆科和禾本科混合干草,另 4

头的日粮包括了 20% 的干草、52% 玉米、5% 玉米油、3% 矿物质和 20% 玉米副产品。图谱显示了至少 16 条可分辨的条带,其中 5 条为明显的优势带。饲喂同种日粮的 4 头动物的 DGGE 图谱间有很好的相似性,也存在个体差异,饲喂两种不同日粮的动物的 DGGE 图谱间则存在显著差异<sup>[11]</sup>。但是,该报道只是对瘤胃液相细菌进行的研究结果。事实上,瘤胃中很多细菌附着在饲料片段上,处于固相部分,其降解饲料的作用可能比液相细菌更重要。Tajima 等通过 16S rRNA 基因全序列分析发现,荷斯坦牛瘤胃内容物的固相和液相中细菌群体结构存在较大差异,液相中低 GC 含量革兰氏阳性菌占 52.4%,而在固相中占了 71.4%<sup>[1]</sup>。本研究采用的瘤胃内容物包括液相和固相部分,研究结果表明,1 号、2 号山羊的 DGGE 图谱中至少有 15 条可分辨条带,3 号山羊的 DGGE 图谱中则至少有 12 条可分辨条带,不同动物饲喂同一日粮时, DGGE 图谱有相似性,但个体差异也非常明显。这提示我们在今后的研究中,试验设计时要考虑到遗传因素。DGGE 图谱还直观地描述了瘤胃细菌的组成和由于添加大豆黄酮引起的变化。虽然由于固体内容物的颗粒在不同时间差异很大,可能影响样品的一致性,但是同一动物的平行样品之间的相似性仍在 70% 以上。结合 16S

rDNA 序列分析技术, 笔者基本了解了发生变化菌的最相似菌, 为今后进一步研究大豆黄酮的作用机理提供了参考依据。

本研究在 PCR/DGGE 分析基础上, 对具有匹配 DGGE 条带的优势菌进行 16S rDNA 序列分析。Stackebrandt 和 Goebel 认为<sup>[17]</sup>, 2 个细菌的 16S rRNA 基因序列有 97% 以上的相似性可以认为是同一菌。本研究中具有匹配 DGGE 谱带的 16 个克隆中只有 5 个克隆与基因库相关序列的相似性在 97% 以上, 而其中的 4 种相似菌在基因库中登录为未鉴定菌或未培养菌。Tajima 等通过建立瘤胃细菌的 16S rRNA 基因克隆库以及克隆基因序列分析发现, 84 个克隆中只有 7 个克隆的 16S rRNA 基因序列与基因数据库中登录序列有 97% 以上的相似性<sup>[1]</sup>。

本研究结果表明, 将 DGGE 和 16S rDNA 序列分析技术结合, 用于研究瘤胃细菌的遗传多样性和组成的变化非常有效, 它能够定性描述瘤胃细菌种类的变化, 进一步将其与在体和体外的其它研究手段一起应用能更好地揭示瘤胃微生物的功能。

## References

- [1] Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16SrDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29:159-169.
- [2] Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Matsui H, Nagamura M, Aminov R I, Benno Y. Rumen bacterial community transition during adaptation to high grain diet. *Anaerobe*, 2000, 6: 273-284.
- [3] Ramsak A, Pterka M, Tajima K, Martin J, Wood J, Johnston M, Aminov R I, Flint H, Avgustin G. Unraveling the genetic diversity of ruminal bacteria belongs to the CFB phylum. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 33: 69-79.
- [4] Whitford M, Forster R, Beard C, Gong J, Teather R. Phylogenetic analysis of rumen bacteria comparative sequence analysis of cloned 16SrRNA genes. *Anaerobe*, 1998, 4: 153-163.
- [5] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in Microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73:127-141.
- [6] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59:695-700.
- [7] Simpson J M, McCracken V J, White B A, Gaskins H R, Mackie R I. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36:167-179.
- [8] 朱伟云, 姚文, 毛胜勇. 变性梯度凝胶电泳法研究断奶仔猪粪样细菌区系变化. *微生物学报*, 2003, 43(4): 503-508.  
Zhu W Y, Yao W, Mao S Y. Development of bacterial community in faeces of weaning piglets as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *ACTA Microbiologica Sinica*, 2003, 43(4):503-508.(in Chinese)
- [9] Zhu W Y, Williams B A, Akkermans A D L. Development of the microbial community in weaning piglets. *Reproduction Nutrition Development*, 2000, 40:180.
- [10] Konstantinov S R, Zhu W, Williams B A, Tamminga S, de Vos W M, Akkermans A D L. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43:225-235.
- [11] Kocherginskaya S A, Aminov R I, White B A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistically ecology approaches. *Anaerobe*, 2001, 7:119-134.
- [12] Zoetendal E G, Akkermans A D L, Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16SrRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64:3 854 -3 859.
- [13] Heilig H G H J, Zoetendal E G, Vaughan E E, Marteau P, Akkermans A D L, de Vos W M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68:114-123.
- [14] Leser T D, Amenuvor J Z, Jensen T K, Lindcra R H, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 673-690.
- [15] Tajima K. Predominant bacterial species of the rumen. Published only in database. (tajima@gene.staff.or.jp) 1997.
- [16] Tajima K, Benno Y. Phylogenetic diversity of eubacteria isolated from bovine rumen. Published only in database. (tajima@gene.staff.or.jp)
- [17] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44: 846-849.

(责任编辑 林鉴非)