

川南山地黄牛瘤胃微生物多样性分析方法

易宗容 李雪梅 李成贤

宜宾职业技术学院,四川宜宾 644003

摘要 川南山地黄牛是本地品种,瘤胃微生物种类多,相互间关系复杂,与宿主之间不但存在共生关系,彼此间也有拮抗作用。要养好川南山地黄牛,必须先养好瘤胃微生物,对瘤胃微生物多样性分析显得尤为重要,可以充分发挥其生长性能。为此,本文简述了瘤胃微生物多样性分析的方法:传统研究法(亨氏滚管法、最大或然数计数法)和分子生物学研究法(变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳、宏基因组技术、荧光原位杂交、末端限制性片段长度多态性、基因芯片技术),生产中可以根据需要选择瘤胃微生物的传统研究法和瘤胃微生物的分子生物学研究法。

关键词 川南山地黄牛;瘤胃微生物;分析方法

川南山地黄牛产于四川盆地南部边缘山区,性情温顺,役力强,其体躯较小,体质紧凑结实,前驱开阔,胸深,肩峰较高,背腰较宽。四肢较高,毛色以黄色居多。放牧以天然牧草为主,补饲以当地主产的玉米等青粗饲料为主,舍饲以当地皇竹草、象草、黑麦草、农作物秸秆或其调制的青贮饲料、氨化饲料为主。反刍动物瘤胃是一个复杂的生态系统,包含了多种未知的微生物,按照 Woese 等^[1-2]的现代分类方法瘤胃微生物分属细菌、古生菌(产甲烷菌)和真核生物(真菌和原虫)3 个域。瘤胃内的微生物数量巨大、种类繁多,主要包括原虫(超过 25 属,其数量为 $10^4 \sim 10^6$ 个/mL)、真菌($10^3 \sim 10^5$ 个真菌孢子/mL, 6 个属)、细菌(200 种,活菌数高达 1 011 个/mL)、古生菌(5 个属,7 个种)和噬菌体(颗粒数可达

$10^7 \sim 10^9$ 个/mL)等,它们的共同作用是降解植物的细胞壁。川南山地黄牛瘤胃内的微生物通过相互协同作用,将饲料快速降解转化成动物所需的营养和能源物质,瘤胃功能的健康与否直接决定本身的健康,微生物对瘤胃的消化代谢十分重要。近年来,微生物多样性的研究方法是一个相对热门的话题,准确地分析测定微生物群体的类型和数量,对瘤胃消化代谢体系作用机理相当重要。本文就川南山地黄牛反刍动物瘤胃微生物多样性分析方法进行简述。

1 瘤胃微生物的传统研究法

1.1 亨氏滚管法

亨氏滚管法是最常用的厌氧培养方法,该技术是应用于洋酒瘤胃厌氧微生物的一种厌氧培养技

收稿日期:2020-05-06

易宗容,女,1976 年生,硕士,副教授。

[12] 夏红,黄良美,冯文武,等.深部输精技术对母猪产仔性能的影响研究[J].黑龙江畜牧兽医,2015(9):89-91.

[13] 蒋家霞,林昌华.深部输精技术对经产母猪繁殖性能的影响[J].广西畜牧兽医,2016(1):28-30.

[14] 杨玲,刘宁,杨景晔,等.深部输精技术对大约克夏母猪繁殖性能的影响[J].山东畜牧兽医,2016(7):3-5.

[15] SBARDELLA P E,ULGUIM R R,FONTANA D L,etal.The

post-cervical insemination does not impair the reproductive performance of primiparous sows[J].Reproduction in domestic animals,2013,49(1):59-64.

[16] 宋忠旭,孙华,彭先文,等.深部输精在大白后备猪的应用初探[J].养猪,2016(5):33-35.

【责任编辑:刘少雷】

术,可用于微生物的分离和鉴定,也可用于活菌培养计数。可以获得瘤胃微生物的特定生长因素、代谢产物等信息,掌握瘤胃细菌及真菌的数量。通过此培养技术可以研究瘤胃微生物的多样性,但是还是存在局限性,反刍动物瘤胃微生物大多是厌氧菌,在试验时保持绝对厌氧环境不容易做到,能纯培养出的瘤胃微生物是有限的,而且工作量大,测定结果与实际存在偏差。

1.2 最大或然数计数法

根据菌种特点采取最大或然数法(MPN法)用于一些特殊功能菌的计数,将待测样品进行稀释,稀释到少量的稀释液接种到新鲜培养基中没有或极少出现生长繁殖^[9]。MPN法对液相和固相中的真菌均能可靠记数,对产生游动孢子少的厌氧真菌的记数更适用,但不能对微生物进行分离研究,导致结果过高地估计瘤胃菌群的数量。

2 瘤胃微生物的分子生物学研究法

2.1 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

变性梯度凝胶电泳技术是不需要进行体外瘤胃微生物培养,直接利用微生物样品中的DNA或RNA对微生物群体加以区别,快速、准确地鉴定微生物种群的核酸变异检测的电泳技术^[10]。容易鉴定出传统方式难以培养的微生物种类,极少量微生物样品经PCR扩增后,也可检测分离得出,结果稳定、重复性好。可以利用DGGE技术以川南山地黄牛与国外肉牛品种的瘤胃微生物群体的基因组DNA为研究对象,来了解其瘤胃中各种微生物的多样性。应用DGGE技术检测碱基突变时,需依赖于测序技术。

2.2 温度梯度凝胶电泳(TGGE)

TGGE是一种DNA指纹图谱技术,常与PCR聚合酶链式反应的DNA扩增技术结合,基于DNA基因信息的现代分子生物学方法,利用不同分子在温度改变下构象差别进行分离^[9]。利用DNA及RNA对微生物遗传特性进行表征,避免传统的菌种分离,还可鉴定出无法利用传统方法分离出来的菌种。TGGE可用于研究瘤胃微生物细菌群落或特殊种群的遗传多样性,而无需作进一步的细菌个体特征分析。当GC含量不同的碱基序列DNA双链解链时需要不同的溶解温值,DNA双链一旦解链,其在凝胶中的电泳速度将会急剧下降,其迁移行为决

定于其分子大小和电荷。不同长度的DNA片段能够被区分,但同样长度的DNA片段在胶中的迁移行为一样,因此不能被区分。当然,TGGE在用分子生物学方法分析微生物群落结构组成时,有很多偏差。不同细菌的基因组大小和核糖体RNA拷贝数不同;提取基因组总DNA时细胞的裂解效率不同;DNA提取和纯化时有偏差;PCR扩增过程中有偏差。

2.3 宏基因组技术

采取16SrDNA测序技术用来研究胃肠道细菌的生态和进化问题,此分析法是将PCR扩增的环境微生物样品总DNA的rRNA片段(或其他标记基因)克隆进合适的载体,构建克隆文库以分离不同的序列,然后对分离的序列采用测序技术或PCR/RFLP进行定性分析。建立了一种可同时分析细菌、古菌16SrRNA基因及原虫18SrRNA基因、真菌核糖体间隔区基因的方法,避免对非目标DNA测序,分辨率较高。但因成本高,工作量大,分析时间长,不适合对微生物群落结构变化进行动态跟踪研究。

2.4 荧光原位杂交(FISH)

荧光原位杂交在微生物系统发育、微生物诊断和环境微生物生态学研究中的应用较多,生产中可用于未克隆基因或遗传标记、染色体变异、基因突变、基因拷贝数变化的检测。

FISH是将细胞原位杂交技术和荧光技术有机结合而形成的新技术,基本原理用已知的标记单链核酸为探针,按照碱基互补的原则,与待检材料中未知的单链核酸进行异性结合,形成可被检测的杂交双链核酸可用于已知基因或序列的染色体定位。FISH技术关键是核酸探针的制备,微生物样品必须先经过打碎、离心、清洗等处理步骤,使微生物细胞与杂质分离、除去杂质、收集细胞^[11],然后对收集的样品进行固定和预处理,保证探针顺利进入与DNA或RNA杂交。测定过程中能保持细胞形态完整,细胞不被破坏,能真实反映反刍动物瘤胃环境下微生物的形态结构及分布状态。此技术必须依赖寡聚核苷酸探针的特异性,易出现假阳性和假阴性结果,灵敏度低于PCR技术,只能针对某一已知的特定菌种,不适用于未知微生物菌种的鉴定。

2.5 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)

末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)是以

荧光标记引物 PCR 为基础,根据末端限制性片段长度区分出微生物群体组成的一种微生物群体图谱法,可以定性与定量分析微生物群落。T-RFLP 技术以分子系统学原理为基础,综合运用了 PCR、限制性酶切、荧光标记和 DNA 序列分析等技术,通过对特定核酸片段长度多态性的测定来分析微生物群落结构和功能^[4]。T-RFLP 技术不需要培养的微生物群落,恰好弥补了绝大多数瘤胃微生物不可培养缺点,具有分析面广、分辨率高、重复性好、快速简便等优点。T-RFLP 技术是将不同的细菌种群经一个特定引物—酶组合处理后,可产生相同的末端限制性长度片段,依赖于使用限制性内切酶来检测 16S rRNA 基因的序列多态性,可能不只对应一个菌种,造成对群落多样性的低估和对复杂群落多样性的低估。

2.6 基因芯片技术

基因芯片又称生物芯片,基因芯片技术是基于核酸互补杂交原理研制的新一代的核酸杂交技术,根据杂交信号进行定性与定量分析,具有高密度、平行分析、双色测定和低背景值等特点,广泛应用于复杂的微生物群落全面的和定量的研究。在微生物群落与多样性研究中,多采用寡核苷酸芯片、群落基因组芯片及宏基因组芯片,可以了解微生物在环境中的功能活动和对群落的特定功能进行定性。因为基因芯片能够同时平行分析数万个基因,进行高通量筛选与检测分析,解决了传统核酸印迹杂交技术操作复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少等不足。

3 结 语

川南山地黄牛是典型的地方牛品种,对四川、

重庆偏南部山区的气候条件和较粗放的饲养管理,有良好的适应能力。在改善饲养管理的条件下,可向役肉兼用型发展。要养好川南山地黄牛,必须先养好瘤胃微生物,对瘤胃微生物多样性分析显得尤为重要,可以充分发挥其生长性能,生产中可以根据需要选择瘤胃微生物的传统研究法、瘤胃微生物的分子生物学研究法。

参 考 文 献

- [1] WOESE C R, KANDLER O, WHEELIS M L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [2] KLIEVE A V, SWAIN R A. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by Pulsed-Field gel electrophoresis and laser densitometry[J]. Appl environ microbiol, 1993, 59(7): 2299-303.
- [3] 祁茹, 林英庭. 瘤胃微生物的传统定量方法在反刍动物中的应用[J]. 中国奶牛, 2011(10): 21-23.
- [4] 李启琳, 李燕鹏, 王士长. DGGE 技术在瘤胃微生物多态性研究中的应用[J]. 家畜生态学报, 2008, 29(3): 12-14.
- [5] KE S H, WARTEL R M. Influence of neighboring base pairs on the stability of single base bulges and base pairs in a DNA fragment[J]. Biochemistry, 1995, 34(14): 4593-4600.
- [6] AMANN R, FUCHS B M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques[J]. Nature reviews microbiology, 2008, 6(5): 339-348.
- [7] AVGUSTIN G, WRIGHT F, FLINT H J. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of prevotella (bacteroides) ruminicola from the rumen[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(2): 246-255.

【责任编辑:刘少雷】