

李陇平,白彩霞,朱海鲸,等. 转 *VEGF* 和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊粪便中菌群分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):162-164.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.041

转 *VEGF* 和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊粪便中菌群分析

李陇平,白彩霞,朱海鲸,黄 帅,刘锦旺,屈 雷

(榆林学院/陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心,陕西榆林 719000)

摘要:以转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊与野生型陕北白绒山羊为研究对象,采集其新鲜粪便样品,用灭菌生理盐水进行梯度稀释后,分别接种 LB 固体培养基、TPY 琼脂、胆硫乳琼脂、肠球菌琼脂、伊红美蓝琼脂和甘露醇盐琼脂培养基,37 °C 恒温过夜培养,再分别对平板上生长的所有需氧菌、双歧杆菌、沙门氏菌、肠球菌、大肠菌群和金黄色葡萄球菌进行菌落计数,并做显著性检验分析。结果表明,转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊与野生型陕北白绒山羊粪便中的需氧菌菌群结构之间不存在显著性差异。研究结果为转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊安全性评价研究提供了试验数据和研究基础。

关键词:*VEGF* 基因;*Tβ4* 基因;转基因陕北白绒山羊;粪便菌群结构;生物安全

中图分类号:S852.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)02-0162-03

与动物育种的常规方法相比,转基因技术具有加速育种进程、缩短育种年限、增强种畜性状稳定性、提高育种效率等优点。目前,广泛地应用于新品种培育和动物品种改良方面。但是,转基因技术从开始到现在一直受到很多争议,转基因动物的安全性受到人们的质疑,而且其涉及面广、影响深远。因此,开展对转基因动物安全性评估方面的研究就显得至关重要^[1-2]。陕北白绒山羊是经过国家审定的一个绒肉兼用型的绒山羊新品种,在榆林和延安以及陕西等陕北周边地区大量饲养,在地方经济发展和农牧民增收方面起着非常重要的作用。绒山羊的绒和毛分别是其皮肤的次级毛囊和初级毛囊生成,特别是绒的价格斐然,素有“软黄金”之誉。毛囊具有高度自我更新能力,它的 1 个重要特征就是周期性生长,一般经历生长期、退行期和休止期 3 个阶段。毛囊的周期性生长和发育是多基因参与、紧密联系且相互制约的复杂生理生化过程,需要多种生长信号的精细调控。毛囊的周期性更新生长和血管的新生密切相关,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*) 在血管新生和退化的变化过程中发挥着重要的调控作用,具有促进血管形成^[3],从而促进毛囊发育^[4-5],并且研究证实 *VEGF* 在毛囊生长期表达量最高^[6]。胸腺素 $\beta 4$ (*Tβ4*) 属于胸腺素(thymosins) β 家族,是重要的一类淋巴细胞因子,作用于毛囊干细胞并激活其分化和迁移,还可以通过促进基质金属蛋白酶的合成分泌影响毛囊发育生长^[7]。在国家转基因重大专项的支持下,2015 年笔者所在实验室利用 PiggyBac 转座子介导转 *VEGF* 和 *Tβ4* 基因并制备绒山羊胎儿成纤维细胞,最终通过核移植方法分别获得了转 *VEGF* 基因陕北白绒山羊 2 只(F_0 代,公羊、母羊各 1 只)和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊 5 只(F_0 代,公羊 4 只、母羊 1

只)。随后,通过本交叉获得了转 *VEGF* 基因阳性陕北白绒山羊 F_1 代 4 只(公羊 1 只、母羊 3 只)和转 *Tβ4* 基因阳性陕北白绒山羊 F_1 代 2 只(全部为公羊)。这些转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊的产绒量明显高于野生型绒山羊,为绒山羊新品种的培育提供了新的育种材料。

为保障人类健康和生态安全、促进生物技术的可持续发展,我国对于转基因动物的研究、开发和审批过程严格遵守法制化管理,并制定了一系列法律法规。其中,转基因动物自身健康和福利、环境安全、人类健康和食品安全是对转基因动物生物安全评价研究关注的核心问题。对于转基因动物的自身安全性,除了须要关注转基因动物生长、发育、生理活动、主要器官等各个方面,对于转基因动物的胃肠道微生物菌群结构变化也是重点研究的方面。越来越多的研究发现,胃肠道微生态平衡对于维持动物良好的生理代谢、疾病预防、免疫和营养代谢等诸多方面都起着重要作用^[8-10]。然而,目前关于转基因动物胃肠道微生物区系变化的研究鲜见报道,只见对转 *sFat-1* 基因猪的胃肠道及粪便样品中微生物菌群变化研究的报道^[11]。本试验通过分析转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因及野生型陕北白绒山羊 F_1 、 F_0 代粪便在 LB 固体培养基及 TPY 琼脂、胆硫乳琼脂、肠球菌琼脂、伊红美蓝琼脂和甘露醇盐琼脂不同培养基中的细菌菌落生长情况并计数,通过统计分析讨论转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊粪便中微生物是否存在显著性差异,为转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊生物安全评价研究提供试验数据和研究基础。

1 材料与方法

试验于 2016 年 7—12 月,在陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心进行。

1.1 试验动物

榆林学院西区试验羊场转 *VEGF* 基因陕北白绒山羊 F_0 代公羊和母羊各 1 只,转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊 F_0 代公羊 3 只、母羊 1 只;转 *VEGF* 基因陕北白绒山羊 F_1 代公羊 1 只、母羊 3 只,转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊 F_1 代公羊 2 只;野生型陕

收稿日期:2017-09-03

基金项目:榆林学院高层次人才科研启动基金(编号:16GK21);陕西省高校科协青年人才托举计划(编号:20160236)。

作者简介:李陇平(1985—),男,陕西陇县人,博士,讲师,主要从事畜牧微生物研究。E-mail:llp_315@163.com。

北白绒山羊公羊、母羊各 3 只。

1.2 试验试剂

TPY 琼脂 (HB0397)、EMB 伊红美蓝琼脂 (HB0107)、BEA 肠球菌琼脂 (HB0133)、DHL 胆硫乳琼脂 (HB4087) 和 MSA 甘露醇盐琼脂 (HB4128-2), 购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集与预处理 选取健康、状况良好的转 *VEGF* 基因和转 *Tp4* 基因陕北白绒山羊和野生陕北白绒山羊 F_0 与 F_1 的新鲜粪样样品, 做好标记, 低温保存, 立即送回实验室进行后续试验。

1.3.2 微生物培养与计数 分别称取 1 g 粪便样品, 加入到装有 9 mL 灭菌水的离心管, 并做好标记, 轻轻振荡混合均匀之后并对其进行梯度稀释。选择 2~3 个合适的稀释度, 注入已做好标记的灭菌培养皿中, 然后迅速倒入 20 mL 灭菌后平衡至 50 ℃ 的不同类型的琼脂培养基, 轻轻转动培养皿使其中的培养基与菌液混合均匀, 待培养基凝固 (每个稀释度做 3 个, 过程中注意无菌操作) 后, 37 ℃ 恒温倒置培养 48 h, 观察在不同琼脂培养基上生长的菌落形态并计数。

1.3.3 菌落计数 菌落计数方法: 肉眼观察菌落并计数。试验结果报告方法如下: (1) 首先选取各稀释度的平均菌落数在 30~300 个之间的平板, 当只有 1 个稀释度的平均菌落数在 30~300 个之间时, 以其稀释倍数乘以其菌落数报告。(2) 当其中有 2 个稀释度的平均菌落数都在 30~300 个之间, 就按照这 2 个稀释度的菌落总数的比值来判定 (当比值 < 2 时, 报告这 2 个平均菌落数的平均值; 当比值 > 2 时, 报告这 2 个平均菌落数当中比较小的菌落总数)。(3) 当每个稀释度的平均菌落数都 > 300 个时, 按照稀释倍数乘以其中稀释度最高的平均菌落数来报告。(4) 当每个稀释度的平均菌落数都 < 30 个时, 按照稀释倍数乘以其中稀释度最低的平均菌落数来报告。(5) 当每个稀释度的平均菌落数都不在 30~300 个时, 应按照其中最接近 30 个或 300 个的平均菌落数乘以其稀释倍数来报告。(6) 当报告的菌落数在 100 个以内时, 应按照其实际数据报告; > 100 个时, 采用 2 位有效数字来表示; 在 2 位有效数字后面的数值, 按照四舍五入的方法计算。

1.4 统计分析

试验数据用“平均值 ± 标准差”形式来表示。采用 *t* 检验对试验结果进行显著性分析: $P < 0.05$, 差异显著; $P > 0.05$, 差异不显著。

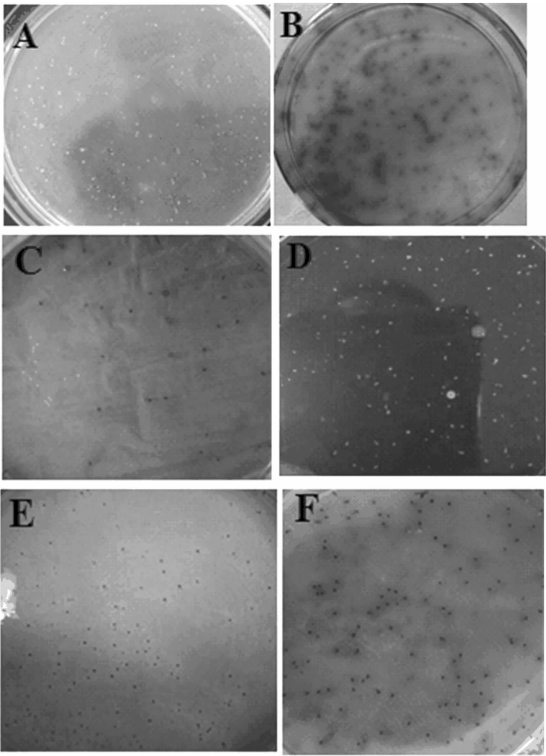
2 结果与分析

2.1 菌落形态特征

转基因与野生型陕北白绒山羊的粪便样品在不同选择性培养基上的菌落生长情况见图 1。

2.2 粪样中需氧微生物菌落

转 *VEGF* 基因与转 *Tp4* 基因陕北白绒山羊和野生型陕北白绒山羊 F_0 代、 F_1 代公羊和母羊粪便中所有需氧菌、双歧杆菌、肠球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠菌群的试验数据见表 1 至表 4。*t* 检验结果表明, 转 *FGF5s* 基因与转 *Tp4* 基因陕北白绒山羊和野生型陕北白绒山羊粪便微生物菌群之间



A—LB 固体培养基; B—肠球菌琼脂; C—胆硫乳琼脂; D—甘露醇盐琼脂; E—伊红美蓝琼脂; F—TPY 琼脂
图1 不同培养基上的菌落生长情况

表 1 转 *VEGF* 基因和野生型陕北白绒山羊 F_0 代
粪便微生物试验数据

培养基类型 (菌群类别)	lg[粪便样品所含菌落数 (CFU/g)]			
	公羊		母羊	
	试验组	对照组	试验组	对照组
LB 固体培养基	6.16 ± 0.25	5.89 ± 0.25	6.27 ± 0.07	6.64 ± 0.31
EMB 伊红美蓝琼脂	5.55 ± 0.14	5.22 ± 0.64	5.21 ± 0.14	4.60 ± 0.30
TPY 琼脂	6.31 ± 0.20	6.71 ± 0.35	6.47 ± 0.15	6.81 ± 0.55
DHL 胆硫乳琼脂	5.62 ± 0.19	5.32 ± 0.14	4.73 ± 0.05	4.72 ± 0.62
BEA 肠球菌琼脂	4.92 ± 0.13	4.15 ± 0.21	5.04 ± 0.15	5.33 ± 0.86
MSA 甘露醇盐琼脂	5.48 ± 0.06	5.25 ± 0.25	5.06 ± 0.08	5.24 ± 0.21

表 2 转 *Tp4* 基因和野生型陕北白绒山羊 F_0 代
粪便微生物试验数据

培养基类型 (菌群类别)	lg[粪便样品所含菌落数 (CFU/g)]			
	公羊		母羊	
	试验组	对照组	试验组	对照组
LB 固体培养基	5.83 ± 0.27	5.89 ± 0.25	5.92 ± 0.42	6.64 ± 0.31
EMB 伊红美蓝琼脂	4.82 ± 1.16	5.22 ± 0.64	5.10 ± 0.24	4.60 ± 0.30
TPY 琼脂	6.11 ± 0.43	6.71 ± 0.35	6.11 ± 0.14	6.81 ± 0.55
DHL 胆硫乳琼脂	5.22 ± 0.20	5.32 ± 0.14	4.36 ± 0.10	4.72 ± 0.62
BEA 肠球菌琼脂	4.25 ± 0.32	4.15 ± 0.21	4.32 ± 0.68	4.33 ± 0.86
MSA 甘露醇盐琼脂	5.40 ± 0.05	5.25 ± 0.25	5.29 ± 0.10	6.24 ± 0.21

没有显著性差异。

3 讨论

细菌菌群通过排泄物从转 *VEGF* 基因和转 *Tp4* 基因绒山羊释放到环境中, 因此, 粪便是用来研究转基因绒山羊体内各

表 3 转 *VEGF* 基因和野生型陕北白绒山羊 F_1 代
粪便微生物试验数据

培养基类型 (菌群类别)	lg[粪便样品所含菌落数(CFU/g)]			
	公羊		母羊	
	试验组	对照组	试验组	对照组
LB 固体培养基	6.93±0.12	7.08±0.04	7.13±0.28	6.90±0.19
EMB 伊红美蓝琼脂	4.09±0.74	3.99±0.41	4.25±0.18	4.23±0.34
TPY 琼脂	6.52±0.15	6.45±0.35	6.65±0.35	6.76±0.45
DHL 胆硫乳琼脂	5.00±0.28	5.06±0.15	5.04±0.30	4.87±0.03
BEA 肠球菌琼脂	3.16±0.50	3.78±1.07	4.14±0.96	3.76±0.57
MSA 甘露醇盐琼脂	4.16±0.50	3.98±0.46	4.20±0.26	3.15±0.35

表 4 转 *Tβ4* 基因和野生型陕北白绒山羊 F_1 代
粪便微生物试验数据

培养基类型 (菌群类别)	lg[粪便样品所含菌落数(CFU/g)]			
	公羊		母羊	
	试验组	对照组	试验组	对照组
LB 固体培养基	5.80±0.30	5.75±0.25	6.40±0.40	6.65±0.30
EMB 伊红美蓝琼脂	5.25±0.50	5.20±0.40	4.90±0.20	4.85±0.30
TPY 琼脂	6.20±0.40	6.35±0.30	6.60±0.10	6.80±0.50
DHL 胆硫乳琼脂	5.30±0.20	5.35±0.45	4.50±0.10	4.75±0.60
BEA 肠球菌琼脂	4.30±0.32	4.05±0.21	4.46±0.68	4.58±0.46
MSA 甘露醇盐琼脂	5.00±0.28	5.06±0.15	5.04±0.30	4.87±0.03

种微生物变化和转基因动物自身健康状况的有效载体,能够准确反映肠道微生物的变化情况,同时也避免了在转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因数量不多的情况下对其进行宰杀。肠道内微生物菌群平衡是动物机体健康状态的重要标志,越来越多的研究发现,胃肠道微生态平衡对于维持动物良好的生理代谢、疾病预防、免疫和营养代谢等诸多方面都起着重要作用^[8-10]。当转入外源 *VEGF* 和 *Tβ4* 基因后,在增加绒山羊绒毛品质和产量的同时,绒山羊胃肠道菌群的种类、数量和比例可能会受到一定程度的影响。所以,转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因绒山羊安全性评价研究中,有必要对粪便中微生物菌群结构及其变化进行分析。本试验选用 6 种不同培养基分别对转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因绒山羊和野生型陕北白绒山羊粪便中微生物进行培养、计数及统计分析,在以小鼠为模型研究转基因小鼠安全性的试验中,也是以这 6 种指示菌作为目标菌进行分析^[12-13]。在这些微生物中,大肠菌群和沙门氏菌与动物的生理代谢相关,而双歧杆菌、大肠杆菌群和肠球菌是动物消化道中的主要优势菌群^[14]。所以,研究这些菌群在转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因绒山羊体内的变化是非常有意义的。

研究结果表明, F_0 代和 F_1 代转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因绒山羊与野生型陕北白绒山羊粪便中细菌菌群的组成和结构没有显著性差异($P>0.05$),主要有益菌和有害菌的组成和菌群结构与对照组相比都没有发生变化。这些研究结果与对转 *PEPCK-1* 基因猪^[15]和转 *eGFP* 基因小鼠^[16]的生物安全评价的研究结果一致。笔者的研究工作不仅积累了对转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因绒山羊安全性评价研究的数据,而且也为其转基因动物的安全性评价研究提供了思路。

4 结论

本试验使用 LB 固体培养基及 TPY 琼脂、胆硫乳琼脂、肠

球菌琼脂、伊红美蓝琼脂和甘露醇盐琼脂培养基,对转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊及野生型陕北白绒山羊 F_0 及 F_1 代粪样分别进行培养、计数、统计分析,结果表明两者并无显著性差异($P>0.05$),说明转 *VEGF* 基因和转 *Tβ4* 基因陕北白绒山羊粪便中需氧微生物与野生型陕北白绒山羊不存在显著性差异,研究结果为转基因陕北白绒山羊的安全性评价研究提供了试验数据和研究基础。

参考文献:

[1]王家雄,李 梅. 转基因食品医学角度的安全性评估[J]. 社区医学杂志,2015(21):83-86.

[2]吴惠仙,白素英,金 煜. 转基因动物的应用及问题安全[J]. 畜牧兽医科技信息,2008(2):4-6.

[3]张瑞鹏,郭平凡. 血管内皮生长因子最新研究进展[J]. 医学综述,2008,14(15):2258-2260.

[4]Mecklenburg L,Tobin D J,Müller-Röver S,et al. Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis[J]. Journal of Investigative Dermatology,2000,114(5):909-916.

[5]Yano K,Brown L F,Detmar M. Control of hair growth and follicle size by *VEGF*-mediated angiogenesis[J]. Journal of Clinical Investigation,2001,107(4):409-417.

[6]姚纪元,包红喜,栾维民,等. 辽宁绒山羊皮肤毛囊血管内皮生长因子基因的表达研究[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(12):139-141.

[7]Philp D,St-Surin S,Cha H J,et al. Thymosin beta 4 induces hair growth via stem cell migration and differentiation[J]. Annals of the New York Academy of Sciences,2007,1112:95-103.

[8]Laparra J M,Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals[J]. Pharmacological Research,2010,61(3):219-225.

[9]Ojetti V,Gigante G,Ainora M E,et al. Microflora imbalance and gastrointestinal diseases[J]. Digestive and Liver Disease,2009,3(2):35-39.

[10]Round J L,Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. Nature Reviews Immunology,2009,9(5):313-323.

[11]Tang M,Zheng X,Cheng W,et al. Safety assessment of sFat-1 transgenic pigs by detecting their co-habitant microbe in intestinal tract[J]. Transgenic Research,2011,20(4):749-758.

[12]Schröder M,Poulsen M,Wilcks A,et al. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats[J]. Food and Chemical Toxicology,2007,45(3):339-349.

[13]Poulsen M,Kroghsbo S,Schröder M,et al. A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin *Galanthus nivalis*(GNA)[J]. Food and Chemical Toxicology,2007,45(3):350-363.

[14]禹慧明,廖 玲,陈平洁,等. 断奶仔猪肠道菌群的研究[J]. 中国微生态学杂志,2000,4(2):23-24.

[15]高 辉. 转 *PEPCK-1* 基因猪的生物安全评价[D]. 合肥:安徽农业大学,2013:25-26.

[16]余 乾. 转 *eGFP* 基因小鼠环境释放安全性评价研究[D]. 重庆:西南大学,2014:30-37.