

陆宏达,赵 欢,张小俊,等. 正常和低品质中华绒螯蟹肠道菌群结构的比较分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):170-178.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.032

正常和低品质中华绒螯蟹肠道菌群结构的比较分析

陆宏达^{1,2,3}, 赵 欢^{1,2,3}, 张小俊^{1,2,3}, 贾相相^{1,2,3}, 吴铭轩^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心/上海市协同创新中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306;

3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要:为探讨正常与低品质中华绒螯蟹的肠道菌群结构差异,采用高通量测序技术,测定细菌 16S rDNA V3 V5 区基因序列,通过生物信息学方法,分析比较肠道菌群结构和多样性以及可培养菌群结构的特点。结果表明,中华绒螯蟹正常组(NG)肠道中绝对优势菌群为厚壁菌门(93.54%),而其他门的丰度均很低(2.81%以下),其中以厚壁菌门的乳球菌属丰度最高(86.00%);低品质组(LG)以厚壁菌门(62.60%)、变形菌门(22.42%)、拟杆菌门(5.74%)和软壁菌门(5.69%)为主,其中以厚壁菌门的尚无属名的 ZOR0006(46.20%)和变形菌门的 Caedibacteraceae uncultured(21.33%)丰度最为优势,厚壁菌门的乳卵属(5.81%)和乳球菌属(4.63%)以及软壁菌门的 *Candidatus Bacilloplasma* 属(5.26%)丰度较高。低品质组肠道中与营养代谢和生长相关的厚壁菌门显著降低和拟杆菌门显著增加,通过提高肠道中厚壁菌门和减少拟杆菌门丰度从而降低两门间的丰度比,有望减少低品质河蟹的出现。可培养菌群的分析,正常培养组(NCG)绝对优势菌群为变形菌门(95.86%),其中以变形菌门的柠檬酸杆菌属(61.40%)和气单胞菌属(31.67%)为主,同样低品质培养组(LCG)类似于正常培养组,绝对优势菌群也为变形菌门(99.91%),以柠檬酸杆菌属(50.02%)和气单胞菌属(36.16%)为主,但这 2 属在正常组和低品质组肠道中丰度很低,分别在 0.01%~0.19% 范围内,表明这 2 属在培养基上极易培养,生长繁殖快,但在肠道中生长繁殖可能受到高丰度其他菌群的抑制作用,而处于低丰度状态。研究结果可为调节低品质中华绒螯蟹肠道菌群结构和制定减少低品质中华绒螯蟹措施提供理论依据。

关键词:中华绒螯蟹;低品质;肠道;菌群结构;高通量测序

中图分类号: S917;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)20-0170-08

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,20 世纪 90 年代规模化人工繁殖成功,为河蟹大规模养殖奠定了基础,经过 20 多年的发展,养殖技术、河蟹规格、产量和品质不断提高,病害不断减少,但在河蟹养成过程中,还经常出现一些非病原引起的低品质河蟹,不同的年份低品质河蟹出现率不一样,最高年份有些养殖区出现低品质河蟹的池塘可达 20% 左右,一般养殖区出现低品质河蟹的池塘在 5% 左右。这些河蟹主要表现为蟹体消瘦、肉质鲜美度差、特有风味减弱、肥满度和肝胰腺指数显著降低以及几乎无死亡现象等特征,直接影响河蟹的商品价值和经济效益。患生物性疾病河蟹特征,除活力低和死亡率高外,很少全面地涉及到类似于低品质

河蟹的肉质鲜美度差、肥满度和肝胰腺指数低等特征,患细菌性等生物性疾病的河蟹,通常属于急性型或亚急性型疾病,一般死亡率 50% 左右,严重时短期内死亡率可高达 80% 以上^[1-3],与低品质河蟹几乎无死亡现象具有本质的区别。造成低品质河蟹的相关因素鲜有报道,只有影响河蟹风味方面的研究,如养蟹塘中种植伊乐藻组的河蟹肌肉鲜味氨基酸含量和几种肝胰腺脂肪酸含量等均显著高于无伊乐藻组,但肝胰腺指数差异不显著^[4],河蟹在 8‰ 低盐度海水暂养 1~2 周可以提高河蟹肌肉鲜味和甜味 2 个主要滋味^[5]。已有研究表明生物肠道内菌群结构对机体的营养代谢、吸收和生长等有重要影响^[6-8],河蟹肠道菌群结构与出现低品质河蟹是否存在一定关系未见研究报道,本研究通过正常和低品质河蟹肠道菌群结构以及它们的可培育菌群结构的比较分析,探讨肠道菌群的差异性,有助于掌握低品质河蟹肠道菌群结构的特点,为改变河蟹肠道菌群结构,从而减少低品质河蟹的产生提供理论依据,对提高河蟹品质、商品价

收稿日期:2020-03-17

基金项目:上海市中华绒螯蟹产业技术体系建设项目[编号:沪农科(字)产(2018)第 4 号];水产动物遗传育种上海市协同创新中心项目(编号:ZF1206)。

作者简介:陆宏达(1960—),男,江苏启东人,硕士,教授,研究方向为水生动物医学。E-mail:hdlu@shou.edu.cn。

值、经济效益和河蟹养殖业健康持续发展等方面都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验蟹和肠道菌群的采集

1.1.1 试验蟹 河蟹采用地笼的方式于 2018 年 9 月下旬采于江苏省兴化市安丰镇的成蟹养殖塘,用地笼方法获得的低品质河蟹采自面积约为 0.52 hm^2 且几乎没有发现正常河蟹的蟹塘,用相同方法获得的正常河蟹采自面积约为 0.50 hm^2 且没有发现低品质河蟹的蟹塘,这 2 个蟹塘的水深、水草种类和覆盖率、水质清澈度、透明度等养殖环境和养殖方法相似,蟹种来源于同一个蟹种养殖场。正常河蟹和低品质河蟹各取 20 只,河蟹洗净晾干后分别进行体质量和壳长测定,再置于解剖盘中用 70% 的乙醇棉球擦拭河蟹体表进行消毒,无菌操作打开河蟹甲壳,取出肝胰腺称质量。正常河蟹和低品质河蟹的体质量、壳长、肥满度和肝胰腺指数采用 SPSS 19.0 统计软件作方差分析,数据用“平均值 \pm 标准差”表示,并用 t 检验法作差异性分析。

肥满度和肝胰腺指数计算公式为

$$\text{肥满度} = (m/L^3) \times 100; \text{肝胰腺指数} = m_h/m。$$

式中: m 为河蟹体质量, g ; L 为河蟹壳长, cm ; m_h 为河蟹肝胰腺质量, g 。

采集的河蟹均抽样进行寄生虫显微镜观察、致病菌分离和病毒电镜观察等后检查。

1.1.2 肠道菌群 每个河蟹甲壳打开后,无菌条件下取出河蟹整个肠道置于无菌培养皿中,用无菌眼科剪剪开肠道,挑去粪便,将剖开的肠道在存有无菌生理盐水(4°C 冰箱预冷)的 3 只离心管中分别进行刮洗后,菌液合并,离心浓缩,正常河蟹肠道洗下的所有菌群液合并于灭菌离心管中作为正常组(normal quality group,简称 NG),低品质河蟹采用相同方法得到的菌群液作为低品质组(low quality group,简称 LG)。取少量浓缩菌群液用作肠道的可培养菌群分析,其他保存于 -80°C 冰箱备用。

1.1.3 肠道可培养菌群 分别取正常组和低品质组的少量浓缩菌群液,进行 10 倍倍比稀释后,稀释 10^5 以上的各稀释度分别设 3 个平行,在胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar,简称 TSA)平板培养基和血琼脂平板培养基上 28°C 培养 120 h,将 2 种培养基所有生长的菌落用灭菌牙签逐个挑出,洗入灭菌的生理盐水中,离心浓缩后的菌群液分别作为正常

培养组(normal quality culturable group,简称 NCG)和低品质培养组(low quality culturable group,简称 LCG),保存于 -80°C 冰箱备用。

1.2 细菌 DNA 提取和 PCR 扩增

分别将正常组、低品质组、正常培养组和低品质培养组的浓缩菌群液进行 DNA 提取, $300 \mu\text{L}$ 菌群液中分别加入 $250 \mu\text{L}$ Buffer ATL 和 $5 \mu\text{L}$ 蛋白酶 K,涡旋振荡 1 min 至彻底混匀, 55°C 水浴 30 min, 95°C 水浴 20 min,加入 $250 \mu\text{L}$ Buffer DL 和 $250 \mu\text{L}$ 无水乙醇,涡旋混匀 15 s;混合液转入吸附柱 HiPure gDNA Micro Column 中, $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 1 min,倒弃收集管中的滤液,吸附柱装回收集管中,加入 $500 \mu\text{L}$ Buffer GW2, $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 1 min,倒弃滤液,再重复上一步骤 1 次,吸附柱装回收集管中, $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 2 min;吸附柱装在新的 1.5 mL 离心管中,加入 $300 \mu\text{L}$ Buffer AE 于吸附柱中央,放置 3 min, $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 1 min,得到白色絮状物质,晾干 15 min,滴加 $100 \mu\text{L}$ dd H_2O ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA,并将各组细菌 DNA 提取液分别保存于 -80°C 冰箱备用。

采用上游引物 341F: $5' - \text{CCTAYGGGRBGCASCAG} - 3'$ 和改进的下游引物 806R: $5' - \text{GGACTACNNGGGTATCTAAT} - 3'$,对提取的各组细菌 DNA 进行 16S rDNA 序列的 V3 V5 可变区 PCR 扩增(PCR 仪: ABI GeneAmp[®] 9700 型)。反应体系为 10 ng Template DNA, $5 \mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 $0.8 \mu\text{L}$, $4 \mu\text{L}$ $5 \times \text{FastPfu Buffer}$, $2 \mu\text{L}$ 2.5 mmol/L dNTPs, $0.4 \mu\text{L}$ FastPfu DNA Polymerase,补 dd H_2O 至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s,共 27 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。将每组 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒[爱思进生物技术(杭州)有限公司]切胶回收 PCR 产物,Tris - HCl 洗脱,2% 琼脂糖电泳检测后,用 QuantiFluor[™] - ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量。之后进行文库构建,连接“Y”形接头,用磁珠筛选去除接头自连片段,按照每个样本测 10 000 条序列加入 1 ng PCR 产物的标准富集 PCR 产物,然后用 NaOH 溶液变性,获得单链 DNA 片段,测序工作由上海德培生物科技有限公司完成。

1.3 16S rDNA 高通量测序及数据分析处理

用 Illumina MiSeq 高通量测序技术进行测序,原始数据通过质控过滤、拼接和去除嵌合体,得到有

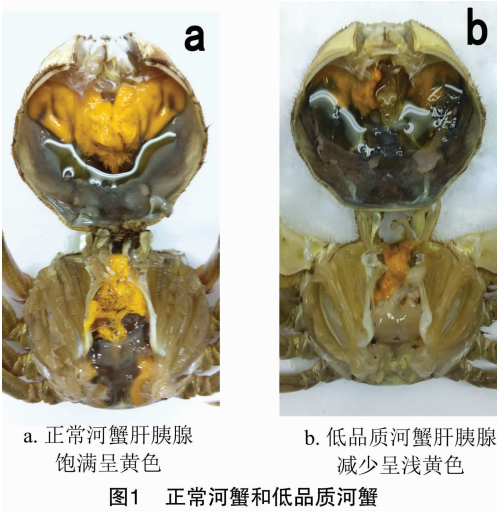
效数据。利用 Usearch 7. 1 (<http://drive5. com/uparse/>) 软件平台对有效数据进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, 简称 OTU) 聚类, 作为分类和计算的依据, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并在各分类水平上统计每组样品的菌群组成, 覆盖率 (coverage)、物种丰富度 (Chao) 指数、香农 (Shannon) 指数和辛普森 (Simpson) 指数公式计算细菌多样性指数, 利用 Excel、Venny 2. 1、Canoco 5. 0 软件分别分析制作稀释性曲线和属水平的相对丰度图、韦恩 (Venn) 图和主成分分析 (principal component analysis, 简称 PCA)。

2 结果与分析

2.1 正常河蟹与低品质河蟹的特征

正常河蟹与低品质河蟹经显微镜检查只发现极少量钟形虫寄生, 肌肉和血淋巴液中的致病菌分离培养和回感试验结果均未发现致病菌, 电镜观察检查未见病毒和螺原体等细胞内病原生物, 表明低品质河蟹不是由生物性病原引起。河蟹的特征见图 1, 正常河蟹蟹壳坚硬, 肝胰腺呈黄色或橘黄色, 煮熟后具独特的蟹腥香味口感, 肝胰腺丰满, 低品质河蟹消瘦, 蟹壳软, 肝胰腺呈浅黄色或浅橘红色, 甚至有些河蟹肝胰腺呈乳白色, 口感滋味和蟹腥香味差, 肝胰腺明显减少。正常河蟹与低品质河蟹的壳长分别为 (5. 612 5 ± 0. 172 0) cm、(5. 602 3 ± 0. 333 9) cm, 2 组河蟹壳长无显著差异 ($P > 0. 05$), 它们的体质量分别为 (103. 94 ± 8. 63) g 和 (87. 09 ± 10. 22) g, 体质量有显著差异 ($P < 0. 05$), 肥满度分别为 59. 05 ± 3. 25 和 48. 29 ± 3. 26, 呈现极显著差异 ($P < 0. 01$),

肝胰腺指数分别为 0. 102 5 ± 0. 012 6 和 0. 053 2 ± 0. 007 3, 呈现极显著差异 ($P < 0. 01$)。



2.2 OTU 聚类、分类学分析、多样性指数分析

高通量扩增分析生成的原始数据, 根据序列末端的 box 序列校正序列方向, 然后按照 barcode 标签序列识别并区分样本得到正常组和低品质组的有效序列分别为 40 468 条和 43 352 条, 正常培养组和低品质培养组的有效序列分别为 39 828 条和 28 527 条。细菌序列平均片段长度无明显差异, 99. 92% 的序列长度聚集在 420 ~ 430 bp 之间, 少数小于 400 bp 或者大于 450 bp, 以 97% 相似性水平为标准划分可操作分类单元 (OTU), 正常组和低品质组河蟹肠道中菌群 OTU 数量分别为 113、87 个, 而相对应的正常培养组和低品质培养组菌群 OTU 数量分别为 18、22 个, 分别低于它们相对应的正常组和低品质组菌群 OTU 数量 (表 1)。

表 1 相关序列信息和多样性指数

样品	有效序列数 (条)	平均片段长度 (bp)	可操作分类单元 (个)	覆盖率	菌群丰富度指数	香农指数	辛普森指数
正常组	40 468	427. 32	113	0. 999 6	129	0. 76	0. 74
低品质组	43 352	421. 19	87	0. 999 7	96	2. 00	0. 26
正常培养组	39 828	428. 97	18	0. 999 9	21	1. 73	0. 22
低品质培养组	28 527	428. 97	22	0. 999 9	24	1. 96	0. 20

基于随机选取一定数量的测序序列及其对应的 OTU 种类得到的稀释性曲线 (图 2), 随着测序深度的增加, 各组曲线逐步趋于平坦, 说明细菌序列和测序数据量合理并达到饱和, 所进行的菌群多样性分析结果可信, 测序结果能够真实地完整反映样

本中优势菌群的数量关系和菌群种类。在相同序列数时, 正常组菌群 OTU 数量最多, 说明其菌群丰富度最高, 其次是低品质组, 再次是低品质培养组, 正常培养组最低。

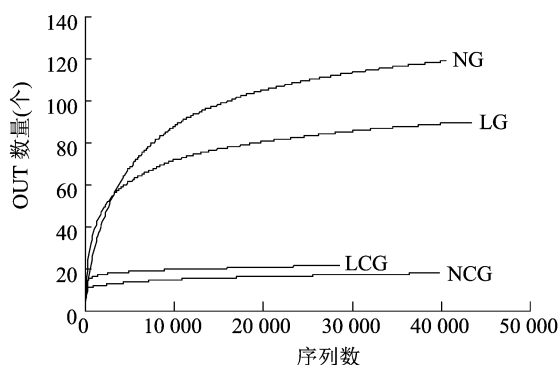


图2 稀释性曲线

由表 1 可见,无论是河蟹正常组和低品质组菌群的序列,还是正常培养组和低品质培养组菌群的序列,被测出的覆盖率均达到了 0.999 6 以上,被测出的概率极高,反映本次测序结果代表了样本中菌群真实情况。Chao 指数通常用于估计 OTU 数目指数,正常组菌群的 Chao 指数高于低品质组,表明正常河蟹菌群丰富度高于低品质河蟹,但正常培养组菌群的 Chao 指数低于低品质培养组,表明其菌群丰富度低于低品质培养组。Shannon 指数、Simpson 指数则用于估计微生物多样性,Shannon 值越大而 Simpson 指数越小反映了样品中微生物多样性越丰富。正常组菌群的 Shannon 指数为 0.76,小于低品质组的 Shannon 指数 2.0,而 Simpson 指数相反,正常组菌群的 Simpson 指数 0.74,高于低品质组的 Simpson 指数 0.26,说明低品质组菌群多样性高于正常组,低品质河蟹微生物多样性更为丰富,其肠道内有更多的细菌种类,菌群结构更为复杂。

正常培养组菌群的 Chao、Shannon、Simpson 指数与低品质培养组菌群的指数比较接近,反映了正常河蟹肠道中培养出的菌群结构类似于低品质河蟹肠道中培养出的菌群结构。

2.3 菌群结构组成及相对丰度

对各组的肠道菌群全部有效序列进行归类操作分析,统计不同 OTU 所对应的细菌门类及相对丰度,优势菌门类和相对丰度见表 2。正常组和低品质组河蟹肠道中前 9 个优势菌门类分别为厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、软壁菌门 (Tenericutes)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、Patescibacteria group、放线菌门 (Actinobacteria)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes)。正常组和低品质组河蟹肠道菌群结构都以厚壁菌门优势度最高,相对丰度分别为 93.54% 和 62.60%,前者丰度显著高于后者;其

次是变形菌门,分别为 2.65% 和 22.42%,前者丰度显著低于后者,2 组的这 2 个门合计丰度分别占各自组总丰度的 93.07%、86.18%;正常组拟杆菌门和软壁菌门丰度分别为 0.01%、0.13%,分别低于低品质组 5.74%、5.68% 的丰度;2 组在放线菌门、蓝藻菌门和 Patescibacteria group 均只有极低的丰度;正常组的梭杆菌门和低品质组的浮霉菌门均没有丰度。2 组的菌群结构在门水平上具有较大的差异。

正常培养组和低品质培养组河蟹肠道中培养菌群的优势菌群均是变形菌门,分别为 95.86% 和 99.91%。前者的厚壁菌门丰度仅为 4.14%,而其他 7 个门类均没有丰度,无可培养菌群,后者的厚壁菌门、拟杆菌门和梭杆菌门丰度极低,有极少量的可培养菌群,软壁菌门等其他 5 个门类均没有丰度,无可培养菌群,2 组的可培养菌群结构在门水平上具有相似性。

表 2 各组主要菌群门类及相对丰度

细菌菌门类	相对丰度 (%)			
	正常组	低品质组	正常培养组	低品质培养组
厚壁菌门	93.54	62.60	4.14	0.01
变形菌门	2.65	22.42	95.86	99.91
拟杆菌门	0.01	5.74	0.00	0.07
软壁菌门	0.13	5.69	0.00	0.00
梭杆菌门	0.00	1.78	0.00	0.01
Patescibacteria group	2.81	1.37	0.00	0.00
放线菌门	0.19	0.04	0.00	0.00
蓝藻菌门	0.54	0.01	0.00	0.00
浮霉菌门	0.04	0.00	0.00	0.00
其他	0.09	0.35	0.00	0.00

筛选出每组丰度最高的前 14 种 OTU 所对应的菌属,在属水平上对每组肠道菌群结构及分布进行统计分析 (图 3)。正常组肠道中乳球菌属 (*Lactococcus*) 丰度最高,达到 86.00%,低品质组肠道中乳球菌属丰度较低,为 4.63%,后者丰度最高的菌属是尚无属名的 ZOR0006,相对丰度达 46.20%,归属于厚壁菌门的韦荣球菌科 (*Erysipelotrichaceae*),前者的 ZOR0006 相对丰度只有 3.64%。低品质组的 *Caedibacteraceae uncultured*、乳卵属 (*Lactovum*)、*Candidatus Bacilloplasma*、*Roseimarinus* 的丰度分别为 21.33%、5.81%、5.26% 和 3.95%,均分别高于正常组只有 0.01%、0.01%、0.12%、0.01% 的丰度。除乳杆菌属 (*Lactobacillus*)

在正常组丰度外,梭杆菌属等其他 8 个属在属水平上均有一定的丰度,但均低于 3.0%,2 组的菌群结构在属水平上具有较大的差异。

正常培养组与低品质培养组可培养菌群的优势菌群均为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*),丰度分别为 61.40%、50.02%,其次是气单胞菌属(*Aeromonas*),丰度分别为 31.67%、36.16%,2 组这 2 个属合计丰度分别为 93.07%、86.18%。正常培养组乳球菌属

有 4.14% 的可培养菌群丰度,优势度较低,正常培养组假单胞菌属(*Pseudomonas*)和低品质培养组梭杆菌属(*Fusobacterium*)、假单胞菌属和肠球菌属(*Enterococcus*)丰度均为 0.01%,可培养菌群很少。2 组的 ZOR0006 和乳卵属等其他 8 个属均没有丰度,无可培养菌群。2 组的可培养菌群结构在属水平上具有相似性。

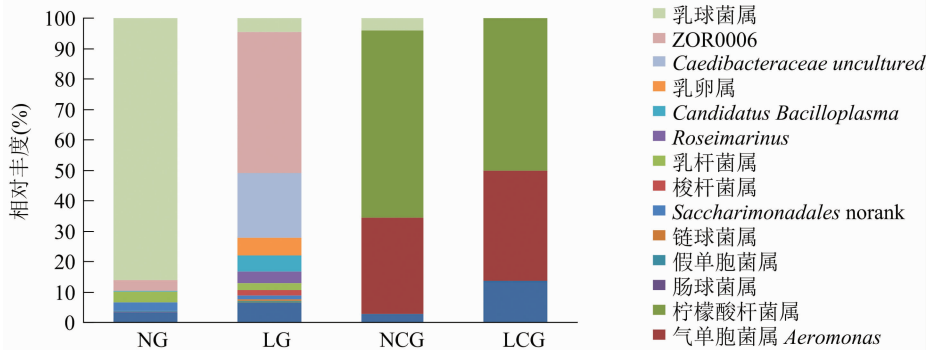


图3 各组在属水平上主要菌群结构及分布

2.4 河蟹肠道中菌群相关性分析

基于各组全部的 OTU,通过构建文恩(Venn)图进一步比较和分析正常河蟹和低品质河蟹肠道中细菌物种间差异性的相互关系。正常组和低品质组河蟹肠道菌群共鉴定出 OTU 数量分别为 113 个和 87 个,其中前者特有的 OTU 数量为 62 个,占全部 OTU 数量的 41.6%,后者特有的 OTU 数量为 36 个,占全部 OTU 数量的 24.2%,二者共有的 OTU 数量为 51 个,占全部 OTU 数量的 34.2% (图 4)。正常培养组和低品质培养组河蟹肠道中培养菌群鉴定出 OTU 数量分别为 18 个和 22 个,前者特有的 OTU 数量为 6 个,占全部 OTU 数量的 21.4%,后者特有的 OTU 数量为 10 个,占全部 OTU 数量的 35.7%,二者培养菌群共有的 OTU 数量为 12,占全部 OTU 数量的 42.9% (图 5),以上数据表明正常河蟹和低品质河蟹肠道中菌群结构和种类有较大差别,正常培养组和低品质培养组的培养菌群结构和种类也有一些差别。

2.5 肠道中菌群差异性分析

各组间的关系主成分分析见图 6,PC1 轴对样品的贡献率为 67.04%,PC2 轴对样品的贡献率为 32.96%。正常组与低品质组之间在 PC1 轴上和 PC2 轴上均相距较远,它们间具有明显的差异性。正常培养组和低品质培养组之间距离很近,差异性不明显,具有较高的相似性,它们在 PC1 轴上与正

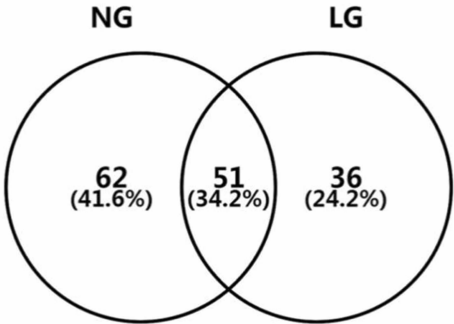


图4 正常组和低品质组河蟹肠道中菌群多样性的相关性

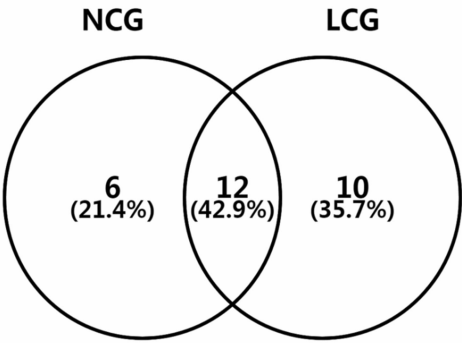


图5 正常培养组和低品质培养组河蟹肠道中菌群多样性的相关性

常组距离较远,而在 PC2 轴上与低品质组距离较远,具有明显的差异性。

3 讨论

3.1 肠道菌群的分析方法

水生动物肠道内细菌种类繁多,包括可培养细

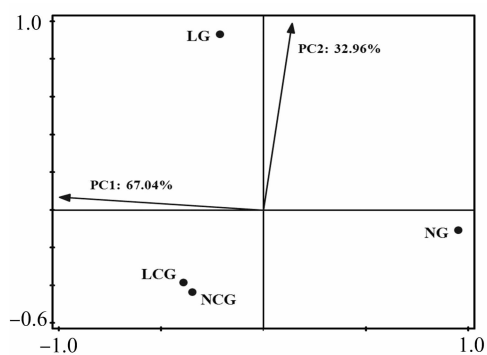


图6 河蟹肠道菌群结构的主成分分析

菌和目前尚不为人知的大量不可培养细菌。对菌群的分析,从最初主要为了确定细菌性疾病的致病菌分析,采用传统的分离培养技术,再通过回感实验和生理生化实验鉴定致病菌的种类,例如王德铭等对草鱼和青鱼肠炎致病菌的分析^[9];API20E 系统鉴定^[10]等技术,使细菌鉴定更为方便,但离不开细菌分离培养;酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay,简称 ELISA)^[11-12]等免疫酶技术在细菌检测上得到了广泛的应用,但也必须首先通过细菌分离培养得到被检测的细菌,通过制备对应的抗体才能建立免疫酶检测技术,因此这些技术都无法对不能培养的菌群进行检测。PCR-DGGE 分子生物学技术^[13-14],对可培养和不可培养菌群都可检测,但还存在一定的局限性,如不能分析痕量微生物,电泳条带强弱判断微生物的丰度也不是非常准确,条带中会包含 1 种以上 16S rDNA 序列,要获悉具体的菌种信息,还需克隆和测序等繁琐操作。随着分子生物学的进一步发展,高通量测序技术的出现,以其高的检测性、准确性和测序深度等特点,目前已在水生动物肠道菌群结构的分析研究中得到应用,对包括痕量的可培养菌群和不能培养的未知菌群都能检测,并可精确确定它们的丰度等信息^[15]。采用高通量测序技术对河蟹肠道菌群分析,具有明显的分析优势,能更准确地反映河蟹肠道微生物菌群结构的特点。

3.2 肠道菌群的影响因素

已有报道的养殖鱼类肠道菌群影响因素的研究主要采用 PCR-DGGE 的方法,研究表明,不同月份^[16]、食物^[17-18]、养殖方式^[19]等都会影响肠道菌群结构的组成。河蟹肠道菌群影响因素鲜有研究报道,由于河蟹养殖类似于鱼类养殖,河蟹肠道菌群同样会受到所处的养殖水环境、饵料和养殖方式等因素的影响,河蟹经过育苗、蟹种培育和成蟹养

殖各个阶段,生活周期长达 2 年左右,自蚤状幼体从外界摄食起,肠道菌群开始定殖和微生态便开始逐步建立,蟹种肠道中的菌群主要受到蟹种培育池中的因素影响,在成蟹养殖过程中,成蟹肠道会在成蟹养殖池中重新建立菌群结构,不同的养殖方法和养殖场条件,会使得成蟹肠道菌群产生差异,各自形成一个比较稳定的菌群微生态系统。为了客观地反映低品质河蟹肠道菌群结构的特点,作为对照的正常河蟹采自于塘大小、水深、种植水草的种类和覆盖率、水质清澈、高透明度等养殖环境和养殖方法等措施与低品质河蟹的养殖条件和方法类似的池塘。

3.3 肠道菌群结构特点和减少低品质河蟹的途径

正常河蟹和低品质河蟹肠道的主要优势菌门为厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和软壁菌门,与人工感染白斑综合征病毒(white spot syndrome virus)的河蟹^[20]和太湖河蟹^[21]肠道的主要优势菌门为厚壁菌门、变形菌门、软壁菌门和拟杆菌门以及与饵料中添加果糖等成分的河蟹肠道主要优势菌门为厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和梭杆菌门^[22]相似;与上海崇明养殖河蟹肠道中只有变形菌门和拟杆菌门菌群^[23]以及养殖河蟹肠道中只发现属于变形菌门 γ -变形菌纲 Gammaproteobacteria 的菌群^[24]有很大差异。不同报道中出现的这些差异,可能与试验方法、试验样本数量、河蟹来源等不同存在一定的关系。正常河蟹与低品质河蟹肠道菌群相对丰度比例上具有明显差异性,主要表现在厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、软壁菌门和梭杆菌门等菌门,其中厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度的差异是最值得注意的。报道的肥胖小鼠与瘦小鼠肠道菌群的比较研究中,肥胖小鼠厚壁菌门菌群丰度较大但拟杆菌门菌群丰度非常小,而瘦小鼠相反,认为厚壁菌门与拟杆菌门的比例与能量吸收有很大关系,比例的降低影响小鼠能量吸收和生长^[6],猪肠道菌群研究的报道中,与瘦猪比较,肥胖猪的体质量增加与厚壁菌门菌群丰度存在正相关关系,而与拟杆菌门菌群丰度存在负相关关系^[7]。在正常组和低品质组河蟹肠道中这 2 个门的菌群丰度情况与肥胖小鼠和瘦小鼠以及肥胖猪和瘦猪肠道中的情况有着相似性,河蟹正常组厚壁菌门丰度达 93.54%,拟杆菌门菌群丰度只有 0.01%,二者的丰度比达 9 000 倍,而低品质组厚壁菌门丰度为 62.60%,拟杆菌门菌群丰度为 5.74%,二者的丰度比只有 10 多倍,丰

度比降低类似于肥胖小鼠和瘦小鼠以及肥胖猪和瘦猪的厚壁菌门与拟杆菌门丰度比降低的趋势。厚壁菌门丰度减少,拟杆菌门丰度增加,推测对河蟹营养吸收和生长具有类似的负面影响,会引起河蟹养殖生产中出现肥满度和肝胰腺指数低为主要特征的低品质河蟹。通过调节这 2 个门的属级菌群结构,增加低品质河蟹肠道中的厚壁菌门丰度,降低拟杆菌门的丰度,提高厚壁菌门与拟杆菌门丰度比,有望成为减少低品质河蟹发生和发展的途径之一。河蟹肠道中厚壁菌门由乳球菌属、尚无属名的 ZOR0006、乳卵属、乳杆菌属和链球菌属构成,其中正常组最优势的菌属为乳球菌属,占 86.00% 的相对丰度,而低品质组最优势的菌属为尚无属名的 ZOR0006,占 46.20% 的相对丰度,除乳球菌属在正常培养组中出现 4.14% 的可培养菌群丰度外,厚壁菌门的其他菌属在正常培养组和低品质培养组均为不可培养的菌群。拟杆菌门的优势菌属主要是 *Roseimarinus* 属,在正常组和低品质组分别占 0.01% 和 3.95%,为不可培养的菌群。现有的细菌种名一般是以往通过分离培养后确定的,这些不可培养的菌群因无或缺乏相对应的菌种名和核酸等数据资料,目前无法通过比对的方法确定它们的种名。厚壁菌门和拟杆菌门中绝大多数菌群的不可培养性和目前缺乏不可培养菌群的种级分类资料,无法通过培养方法得到大量菌群,使得采用口喂等人方法提高厚壁菌门丰度从而改善低品质河蟹肠道菌群结构变得困难,而降低拟杆菌门丰度相对容易,可通过深入研究使用药物等方法得以实现。

益生菌具有提高食物消化吸收、促进生长和肥满度,调节改善肠道菌群的结构和平衡,提高机体免疫力、抗病率和抑制致病菌等作用。益生菌种类繁多,作用较为复杂和多样,不同的益生菌种类作用有很大差异。在促进生长和提高肥满度方面,可选择提高食物消化吸收促进生长的那些益生菌,能够将不能或不易降解消化吸收的大分子物质转化成小分子,便于机体的吸收和利用,提高饲料转化率,其次益生菌本身富含营养物质,添加到饲料中可作为营养物质被摄取吸收利用,同时益生菌在肠道内生长繁殖能够产生如维生素、氨基酸以及促生长因子等营养物质参与机体的新陈代谢和生长。如已有报道在饲料中添加属于乳杆菌属的嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)^[25]和属于芽孢杆菌属的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和枯草芽

孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[26],可增加凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道中的蛋白酶和淀粉酶等酶的活性,提高生长率。厚壁菌门的乳杆菌属在正常组河蟹肠道中相对丰度为 3.69%,是低品质组河蟹肠道中相对丰度(2.15%)的 1.7 倍,尽管不知其对消化吸收和生长有多大程度的影响,但通过饲料中添加乳杆菌和芽孢杆菌等提高食物消化吸收促进生长的益生菌,是减少低品质河蟹值得探索的途径之一。

变形菌门丰度在正常组只有 2.65%,远低于低品质组的 22.42% 丰度,变形菌门主要由 *Caedibacteraceae uncultured*、假单胞菌属、气单胞菌属、柠檬酸杆菌属构成,低品质组河蟹肠道中 *Caedibacteraceae uncultured* 相对丰度最高,达 21.33%。软壁菌门在正常组只有 0.13%,同样远低于低品质组的 5.69% 丰度,目前有关变形菌门和软壁菌门与机体生长和肥瘦的关系未见报道。

3.4 肠道中可培养菌群结构

本研究的肠道可培养菌群和不可培养菌群是在最常用的胰蛋白胨大豆琼脂平板培养基和血琼脂平板培养基上 28 ℃ 培养 120 h 条件下的结果,培养条件的改变,可能从不可培养菌群中还能培养出一些可以生长的菌群。可培养菌群首先主要取决于使用培养基的种类,培养基按其特殊用途可分为基础培养基、加富培养基、选择性培养基和鉴别培养基,由于添加不同营养成分或相同营养成分不同比例等就成为一种新的培养基,导致培养基种类繁多,目前还没有对所有可培养细菌都能培养出来的培养基;其次取决于培养时间,有些细菌在某些培养基上可以被培养,但需要数周甚至更长时间;另外培养时生长快的菌群对其他菌群能产生一定程度的抑制作用;这些因素会导致可培养菌群相对偏少的结果。河蟹肠道菌群中可培养菌群会存在类似的情况。为减少这些方面的影响,本研究采用胰蛋白胨大豆琼脂和血琼脂 2 种平板培养基联合应用的方法,培养基联合应用可以提高菌群的检测阳性率^[27-28]。胰蛋白胨大豆琼脂培养基用于培养营养要求较高的动植物机体内的好氧菌、厌氧菌和真菌,如用于猪^[29]、鸟^[30]、鱼^[31]和虾^[32-33]致病菌的分离和培养,也用于医院污水^[34]和水环境^[33,35]中的细菌分离培养,该培养基是最常用的培养基之一。血琼脂平板培养基为营养要求苛刻的菌群提供一些特殊的生长因子,属于加富培养基,在菌群分离培养中得到广泛的应用^[28,36]。种类繁多的其

他培养基中,哪些培养基还能培养出在胰蛋白胨大豆琼脂培养基和血琼脂培养基上无法培养的其他可培养菌群,须要进一步实验验证。

河蟹肠道菌群中,除厚壁菌门有少量可培养菌群外,可培养菌群都分布在变形菌门,其他门的菌群都是不可培养菌群。属于变形菌门的柠檬酸杆菌属和气单胞菌属,这 2 个属可培养菌群相对丰度在正常培养组分别为 61.40%、31.67%,合计 93.07%,在低品质培养组分别为 50.02%、36.16%,合计 86.18%,呈现极高的丰度,但在正常组这 2 个属相对丰度分别只有 0.19%、0.04%,在低品质组分别只有 0.04% 和 0.01%,均在 0.19% 以下,表明尽管在胰蛋白胨大豆琼脂培养基和血琼脂培养基上极易培养,生长繁殖快,但在河蟹肠道中可能受到高丰度不可培养菌群的抑制作用,它们的生长繁殖受到抑制,而处于低丰度状态。

参考文献:

- [1]李文宽,于翔,闻秀荣,等. 辽宁地区河蟹暴发性流行病原研究[J]. 水产科学,1999,18(4):10-13.
- [2]沈锦玉,尹文林,钱冬,等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病病原的研究[J]. 中国水产科学,2000,7(3):89-92.
- [3]王文. 虾蟹新型病原螺原体的发现和研究[J]. 南京师大学报(自然科学版),2016,39(1):1-13.
- [4]刘庆华,黄姝,岳武成,等. 伊乐藻对中华绒螯蟹生长和营养品质的影响[J]. 中国水产科学,2017,24(1):91-99.
- [5]王丹青,张龙,吴旭干,等. 8‰低盐度海水暂养对中华绒螯蟹雌蟹肌肉滋味品质的影响[J]. 食品工业科技,2018,39(5):1-6,12.
- [6]Ley R E, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(31):11070-11075.
- [7]Pedersen R, Andersen A D, Mølbak L, et al. Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: gut microbiota during development of obesity in cloned pigs[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1):30.
- [8]Ruokolainen L, Ikonen S, Makkonen H, et al. Larval growth rate is associated with the composition of the gut microbiota in the *Glanville fritillary* butterfly[J]. Oecologia, 2016, 181(3):895-903.
- [9]王德铭. 皖, 青鱼传染性肠炎病的研究 I. 肠炎致病菌的研究[J]. 水生生物学集刊, 1959(3):241-255.
- [10]倪纯治. API20E 用于弧菌的鉴定[J]. 海洋环境科学, 1990, 9(4):46-49.
- [11]钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 应用酶联免疫吸附法检测暴发病病原——嗜水气单胞菌的研究[J]. 水产养殖, 1993(4):14-17.
- [12]王斌, 范薇, 李艳, 等. 用两种 ELISA 方法快速检测大菱鲶细菌性出血性败血症的病原菌[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(4):252-257.
- [13]李可俊, 管卫兵, 徐晋麟, 等. PCR-DGGE 对长江河口八种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(3):268-269, 272.
- [14]郝耀彤, 吴山功, 王桂堂, 等. 草鱼肠道微生物对食物改变适应性变化的研究[J]. 淡水渔业, 2015, 45(3):46-51, 101.
- [15]李小义, 张效平, 赵凤, 等. 鲟鱼肠道微生物多样性的研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(24):164-167.
- [16]倪加加, 余育和. 不同月份养殖草鱼幼鱼消化道微生物群落动态变化研究[J]. 水产学报, 2013, 37(10):1558-1563.
- [17]郁二蒙, 张振男, 夏耘, 等. 摄食不同饵料的大口黑鲈肠道菌群分析[J]. 水产学报, 2015, 39(1):118-126.
- [18]钟蕾, 向建国, 曾丹, 等. 饵料对鲢肠道微生物多样性的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4):830-835.
- [19]夏耘, 余德光, 谢骏, 等. 不同养殖方式对鲮肠道细菌群落结构的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(5):907-912.
- [20]Ding Z F, Cao M J, Zhu X S, et al. Changes in the gut microbiome of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(11):1561-1571.
- [21]Chen X, Di P P, Wang H M, et al. Bacterial community associated with the intestinal tract of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) farmed in Lake Tai, China[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0123990.
- [22]吴韬, 张振龙, 蔡春芳, 等. 果胶和木聚糖对中华绒螯蟹肠道菌群结构的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(4):745-753.
- [23]Li K, Guan W, Wei G, et al. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(3):675-682.
- [24]狄盼盼, 陈小兵, 孙国伟, 等. 养殖中华绒螯蟹肠道内优势细菌群落成分分析[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(1):58-61.
- [25]王国霞, 黄燕华, 周晔, 等. 乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾生长性能、消化酶活性和非特异性免疫的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1):228-234.
- [26]胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2):244-251.
- [27]周沛辉. S·S 培养基和血琼脂培养基联合应用的意义[J]. 现代中西医结合杂志, 1998, 7(2):3-5.
- [28]苏加云. 腹泻患者粪便病原微生物培养方法的探讨[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(8):924-925, 327.
- [29]田佳琪, 董文龙, 王巍, 等. 猪源解鸟氨酸拉乌尔菌分离鉴定与大环内酯耐药基因检测[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(1):1-4.
- [30]Reneerkens J, Versteegh M A, Schneider A M, et al. Seasonally changing preen-wax composition: red knots' (*Calidris Canutus*) flexible defense against feather-degrading bacteria[J]. Auk, 2008, 125(2):285-290.
- [31]林伟, 彭新亮, 杨治国. 招财鱼红斑病病原——诺卡氏菌的分离与鉴定[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2012, 22(2):99-101.

毕振威,徐立波,夏兴霞,等. 鉴别犬瘟热病毒强弱毒株中和单克隆抗体的制备[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):178-182.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.033

鉴别犬瘟热病毒强弱毒株中和单克隆抗体的制备

毕振威¹, 徐立波², 夏兴霞¹, 梁 霆³, 王永山¹

(1. 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;
2. 山东省招远市农业农村局, 山东招远 265400; 3. 江苏省农业农村厅, 江苏南京 210036)

摘要:为了制备鉴别犬瘟热病毒(CDV)流行强毒株和疫苗弱毒株的单克隆抗体,将 CDV 851 弱毒株浓缩后经蔗糖密度梯度离心纯化,免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 瘤细胞进行细胞融合,经 3~5 次克隆,间接 ELISA 筛选,获得稳定分泌抗 CDV 的杂交瘤细胞 2D12 株。该细胞株分泌的单克隆抗体亚类为 IgG1 κ ,与常见犬病毒不发生交叉反应。间接免疫荧光显示,单克隆抗体与 CDV 851 毒株发生特异性反应,与杆状病毒表达的 CDV 851 毒株 H 蛋白发生特异性反应。Western blot 检测发现,单克隆抗体与 2 株 CDV 强毒株 H 蛋白不发生反应,而与 2 株 CDV 弱毒株 H 蛋白有特异性反应。双抗体夹心 ELISA 显示,单克隆抗体能检测 CDV 疫苗弱毒株而不能检测 CDV 强毒株。病毒中和试验证实,单克隆抗体对 CDV 851 弱毒株具有中和能力。制备了区分 CDV 强毒株和疫苗弱毒株的单克隆抗体,为 CDV 的鉴别诊断技术研究奠定了基础。

关键词:犬瘟热病毒;单克隆抗体;流行毒株;疫苗毒株;鉴别检测

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)20-0178-05

犬瘟热(canine distemper,简称 CD)是由犬瘟热病毒(canine distemper virus,简称 CDV)引起的急性、高度接触性传染病。CDV 自然感染宿主范围广泛,除了食肉目所有 8 个科外,还扩展到偶蹄目猪科、灵长目的猕猴属和鳍足目海豹科等多种动物,给养犬行业、经济动物行业和野生动物保护业等造成了巨大的经济损失^[1]。CD 是由流行的 CDV 野毒

株感染引起的,而 CD 的免疫预防普遍使用活疫苗,如 CDV 疫苗弱毒株 Onderstepoort、CDV3 等。CDV 疫苗弱毒株的毒力减弱而不引起免疫犬 CD 发病,但能提供有效的免疫保护。在临床中,CD 疑似犬中检测和分离的 CDV 毒株并不一定是致病毒株,很多临床分离株与疫苗株具有很高的同源性和亲缘关系^[2-3],表明犬感染 CDV 弱毒株的情况可能比较普遍,也可能分离的毒株就是免疫接种的疫苗弱毒株。目前,鉴别和区分 CDV 野毒株和疫苗弱毒株的检测方法很少。通过对 CDV 的基因测序能确定毒株的基因型^[4],但费时、费力,无法实现快速准确诊断,对 CD 的诊断和治疗造成一定的困难。在检测 CDV 血清抗体时,也无法判断是 CDV 疫苗弱毒株还是 CDV 野毒株产生的抗体。因此,有效区分 CDV

收稿日期:2020-06-23

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0501000);国家自然科学基金(编号:31802168)。

作者简介:毕振威(1985—),男,山东文登人,博士,助理研究员,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:bizhenwei@126.com。

通信作者:王永山,博士,研究员,主要从事兽医微生物学与免疫学研究。E-mail:wangys63@126.com。

[32] Yano Y, Hamano K, Satomi M, et al. Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3): 713-722.

[33] Mirbakhsh M, Akhavansepahy A, Afsharnasab M, et al. Screening and evaluation of indigenous bacteria from the Persian Gulf as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae[J]. Iranian Journal of Fisheries

Sciences, 2013, 12(4): 873-886.

[34] Hwang S H, Kim Y J. Meropenem-resistant bacteria in hospital effluents in Seoul, Korea[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(11): 1-8.

[35] Mwirichia R, Muigai A W, Tindall B, et al. Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya[J]. Extremophiles, 2010, 14(4): 339-348.

[36] 陈 峰, 张丹丽, 宛宝山, 等. 不同培养基与前处理方法对副溶血弧菌 MALDI-TOFMS 鉴定结果的影响评估[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4): 264-267.