

# 不同预处理对小鼠粪样菌群高通量测序分析结果的影响

刘昕<sup>1</sup>, 胡会玲<sup>1</sup>, 张敏爱<sup>2</sup>, 薛帼珍<sup>1</sup>, 闫晓睿<sup>1</sup>, 张希春<sup>1\*</sup>, 刘计权<sup>1\*</sup>

1.山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030600;

2.太原海关技术中心, 太原 030021

**摘要:** 应用高通量测序技术比较不同预处理对小鼠粪样菌群结构的影响, 以为后续相关研究提供参考依据。采集昆明小鼠新鲜粪样, 分为原始粪样组、生理盐水处理组和 PBS 处理组, 提取粪样 DNA, 采用 Illumina MiSeq 平台进行测序对 3 组样本的 16S rRNA V3~V4 区基因文库进行生物信息学分析。结果显示, 3 组样本拥有共同的 OTUs 188 个, 不同预处理对粪样微生物多样性和丰度产生影响, 生理盐水处理组、PBS 处理组和原始粪样组分别检出 14、11、12 个门, 3 组样本共有门 11 个; 分别检出 24、21、21 个纲, 3 组样本共有纲 20 个; 分别检出 62、55、59 个科, 3 组样本共有科 26 个; 分别检出 147、126、137 个属, 3 组样本共有属 117 个。总体来看, 生理盐水处理组微生物多样性和丰度相对最高, 原始粪样组次之, PBS 处理组最低。粪样经生理盐水处理后, 能在一定程度上提高肠道菌群检测的准确性。

**关键词:** 高通量测序; 生理盐水; PBS 缓冲液; 粪样菌群

DOI:10.19586/j.2095-2341.2022.0158

中图分类号: R965

文献标志码: A

## Effect of Different Pretreatment on the Results of High-throughput Sequencing of Microbial Community in Mouse Feces

LIU Xin<sup>1</sup>, HU Huiling<sup>1</sup>, ZHANG Minai<sup>2</sup>, XUE Guozhen<sup>1</sup>, YAN Xiaorui<sup>1</sup>, ZHANG Xichun<sup>1\*</sup>, LIU Jiquan<sup>1\*</sup>

1.School of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030600, China;

2.Customs Technical Center of Taiyuan, Taiyuan 030021, China

**Abstract:** High-throughput sequencing was used to compare the effect of different pretreatments on faecal flora structure in mice, so as to provide reference for further research. Fresh fecal samples of Kunming mice were collected and divided into three groups: original fecal sample group, saline treatment group and PBS treatment group. Fecal DNA was extracted, sequenced using the Illumina MiSeq platform, and 16S rRNA V3~V4 region gene libraries of three sets of samples were analyzed by bioinformatics analysis. The results showed that there were 188 common OTUs in the three groups, and different pretreatments had an effect on faecal microbial diversity and abundance. In saline treatment group, PBS treatment group and original fecal sample group, 14, 11 and 12 phyla were detected and there were 11 common phyla in all three groups; 24, 21 and 21 classes were detected and there were 20 common classes in all three groups; 62, 55 and 59 families were detected, there were 26 common families in all three groups; 147, 126 and 137 genus were detected, there were 117 common genus in all three groups. Overall, the saline treatment group had the highest relative microbial diversity and abundance, followed by the original fecal sample group, and the PBS treatment group had the lowest. Saline treatment can improve the accuracy of intestinal flora detection to a certain extent.

**Key words:** high-throughput sequencing; saline solution; PBS buffer; fecal microbial community treatment

肠道菌群是一个庞大的微生态系统, 其所含细菌种类繁多, 可分为有益菌、有害菌和中性菌

3 大类<sup>[1]</sup>。肠道菌群的生态平衡对于维持人体代谢、发育、免疫、感染预防及治疗等正常生理功能

收稿日期: 2020-09-08; 接受日期: 2020-11-30

**基金项目:** 山西省自然科学基金面上项目(20210302123233); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金(2021-11); 山西中医药大学科技创新科学团队项目(2018TD-009); 山西中医药大学科技创新培育计划项目(2022PY-TH-30)。

**联系方式:** 刘昕 E-mail: 1113984315@qq.com; \* 通信作者 张希春 E-mail: zxcxpy@126.com; 刘计权 E-mail: liujiquan2008@163.com

发挥着极其重要的作用,而这种正常的生态平衡一旦被打破,则会引起肥胖、糖尿病、肝病、免疫性疾病、精神疾病、慢性肾病等多种疾病的发生<sup>[2]</sup>。肠道菌群与人类的健康密切相关,目前已成为医学领域的研究热点。新鲜粪样经肠道排出体外,因其具有取样方便、无损伤性等特点,常被作为肠道菌群研究的取样来源<sup>[3]</sup>。

高通量测序技术因其测序快速、数据量大、能够较为全面地反应微生物群落结构等优点,已被广泛应用于肠道菌群的研究<sup>[4]</sup>。同时,DNA样品浓度、纯度和污染也是影响高通量测序结果准确度的重要因素。新鲜粪样来源于宿主肠道,除了携带宿主的肠道微生物群,同时还包含有大量的食物残渣、蛋白质、糖类、脂肪、消化酶等多种杂质,这些杂质可能会引起肠道菌群DNA发生降解、增加DNA被污染的风险、干扰PCR扩增和检测结果等问题,所以对粪样进行预处理操作,除去杂质,进而提高肠道菌群DNA的浓度和纯度,是保证高通量测序结果的有效手段<sup>[5]</sup>。已有研究报道可通过PBS缓冲液<sup>[6-7]</sup>、生理盐水<sup>[8-9]</sup>、滤器过滤<sup>[10]</sup>、均质化<sup>[11]</sup>等预处理方法达到除杂提纯的目的,其中PBS缓冲液、生理盐水预处理是常用方法,然而关于不同预处理对肠道菌群测定结果的影响少有报道。本文采用试剂盒提取DNA,通过高通量测序对原始粪样、PBS处理粪样和生理盐水处理粪样进行比较分析,以期后续相关研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF级8周龄昆明种小鼠10只,体质量22~25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。适应性饲养1周,饲养期间自由采光,给予充足的食物和水。

**1.1.2 试剂** 胃蛋白酶购自Sigma化工有限公司;PBS缓冲液和生理盐水购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DNA提取试剂盒和QIAamp 96 PowerFecal QIAcube HT kit(5)购自德国QIAGEN公司;Qubit DNA检测试剂盒购自Life Technologies;Ex Taq高保真酶购自日本Takara公司。

**1.1.3 仪器** 涡旋混合器购自上海第一医学仪器厂;台式高速离心机购自德国Eppendorf公司;净

化工作台和立式压力蒸汽灭菌锅购自上海博讯实业有限公司;厌氧培养箱购自上海容威仪器设备有限公司;PCR仪购自美国Bio-Rad公司;电泳仪和凝胶成像仪购自Tanon公司;-80℃超低温冰箱购自美国Thermo Fisher Revco公司;高通量核酸纯化仪购自QIAGEN公司;高通量测序仪购自美国Illumina公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 粪样采集及预处理** 将实验小鼠分别单独放入灭菌的鼠笼中,用一次性无菌镊子,收集每个小鼠新鲜粪样2~3粒置于同一无菌离心管中,混匀。提取DNA之前,将粪样分为3组,在厌氧培养箱内迅速进行如下处理。①原始粪样组(Y):取新鲜粪样1 g,装入15 mL无菌离心管中,保存于-80℃冰箱。②生理盐水处理组(S):参照Garcia等<sup>[8]</sup>方法,向装有1 g新鲜粪样的50 mL离心管中加入20 mL生理盐水,用涡旋混匀仪摇动3 min后,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心3次,每次3 min,取上清液保存于-80℃冰箱。③PBS处理组(P):处理液为PBS缓冲液,其余操作同生理盐水处理组。每组试验重复3次。

**1.2.2 样本DNA提取、PCR扩增和16S rDNA测序** DNA提取、PCR扩增和测序均由上海欧易生物医学科技有限公司完成。根据提取试剂盒所述方法提取DNA,针对V3~V4区域设计带Barcode的特异引物343F(5'-TACGGRAGGCAGCAG-3')和798R(5'-AGGGTATCTAATCCT-3')进行PCR扩增<sup>[12]</sup>,通过Illumina MiSeq平台进行测序。

**1.2.3 数据分析方法** 使用Trimmomatic(version 0.35)<sup>[13]</sup>软件、Flash(version 1.2.11)<sup>[14]</sup>软件、QIIME中的split-libraries(version 1.8.0)<sup>[15]</sup>软件、UCHIME(version 2.4.2)<sup>[16]</sup>软件进行微生物组学数据分析,使用QIIME2软件进行多样性分析,使用SPSS(version 26.0)进行显著性分析,使用Metabo Analyst进行PCA分析,QIIME2软件在门、纲、科、属水平下绘制柱状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据的质控

**2.1.1 测序数据的统计** 表1为3组9个样本16S rDNA V3~V4区的测序结果。由表1可知,质控之后的Clean tags数据量分布在69 909~77 752之间,

Clean tags 去除嵌合体后得到的 Valid tags 数据量分布在 56 015~65 796 之间, Valid tags 平均长度分

布在 412.34~421.21 bp, 各样本 OTUs 分布在 351~670 之间。

表 1 3组9个样本的 OTUs 分析

Table 1 OTUs analysis of 9 samples in 3 groups

| 样本编号 | Clean-tags | Valid-tags | Valid-tags mean length/bp | OTUs |
|------|------------|------------|---------------------------|------|
| S1   | 76 432     | 63 910     | 412.69                    | 656  |
| S2   | 77 145     | 65 163     | 412.34                    | 661  |
| S3   | 77 400     | 65 576     | 412.63                    | 670  |
| P1   | 72 165     | 61 166     | 419.79                    | 351  |
| P2   | 75 419     | 65 217     | 420.02                    | 373  |
| P3   | 75 107     | 65 796     | 421.21                    | 368  |
| Y1   | 75 933     | 64 761     | 419.98                    | 442  |
| Y2   | 69 909     | 56 015     | 420.04                    | 424  |
| Y3   | 77 752     | 65 465     | 419.02                    | 436  |

S组3个样本有 194 649 条序列及 1 987 个 OTUs; P组3个样本有 192 179 条序列及 1 092 个 OTUs; Y组3个样本有 186 241 条序列及 1 302 个 OTUs。

**2.1.2 Specaccum 物种累积曲线** 图 1 结果显示, 随着样本量由小变大, 曲线逐渐趋于平缓; 当样本量达到 8 时, 此时群落中的 OTUs 总数不再增加, 表明测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种, 测序数据量合理, 测序深度足够大, 可以反映绝大多数的微生物多样性信息。

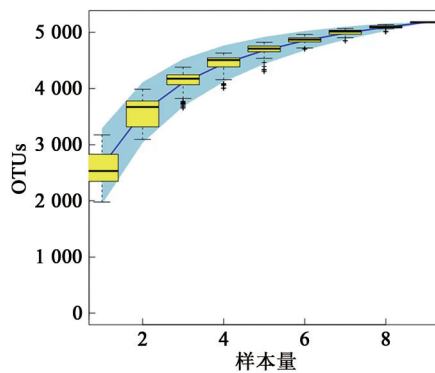
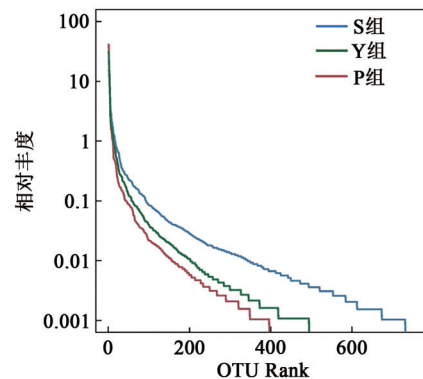


图 1 物种累积曲线图

Fig. 1 Species accumulation plot

**2.1.3 Rank abundance 分析** 曲线越宽表明物种的组成越丰富, 曲线趋势越平缓表明物种组成的均匀程度越高。图 2 中 Rank-abundance 分析结果表明, S 组曲线宽度最大, 说明 S 组小鼠粪样微生物丰度最高, 而 Y 组和 P 组都有所降低; 随着 OTU 等级增加, S 组、Y 组和 P 组曲线最终均趋于平缓, 表明 3 组粪样菌群物种分布都较均匀, 以 S 组物种分布的均匀度最高。



注: Y—原始粪样组; S—生理盐水处理组; P—PBS 处理组; 横坐标代表物种排序的数量, 纵坐标代表观测得到的相对丰度。

图 2 等级分度曲线

Fig. 2 Grade classification curve

**2.1.4 韦恩图** 图 3 中心数字代表所有样本共有

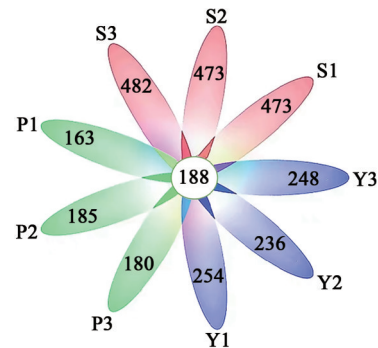


图 3 Core-Pan 图

Fig. 3 Core-Pan diagram

的 OTUs, 花瓣上的数字代表各个样本总 OTUs 减去共有 OTUs 的数目。由图 3 可知, 9 个样本共有 188 个 OTUs, S 组 3 个特异性的 OTUs 数目均高于

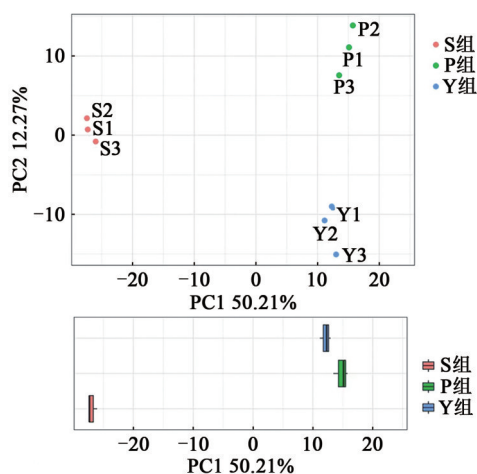


图4 PCA(2D)分析

Fig. 4 PCA(2D) analysis

表2 不同预处理组粪样菌群的多样性指数

Table 2 Diversity index of faecal flora in different pretreatment groups

| 组别 | Chao 1           | Observed-species | Simpson       | Shannon       | Goods coverage |
|----|------------------|------------------|---------------|---------------|----------------|
| S组 | 707.32 ± 14.090a | 650.17 ± 5.500a  | 0.94 ± 0.001a | 5.59 ± 0.030a | 0.998 379a     |
| P组 | 418.67 ± 10.430c | 353.07 ± 8.110c  | 0.78 ± 0.010c | 3.42 ± 0.050c | 0.998 581a     |
| Y组 | 496.76 ± 12.680b | 424.83 ± 3.820b  | 0.85 ± 0.020b | 4.12 ± 0.050b | 0.998 225a     |

注:同一列不同组别标不同字母表示存在统计学差异( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 PCA 分析** 图4结果表明,第一、第二主坐标分别解释了菌群结构总变异的 50.21%、12.27%;聚类现象表明,各组内的菌群结构相似,P组与Y组距离较近,说明P组与Y组菌群结构相近;与P组相比,Y组距离S组更近,说明Y组与S组菌群结构更相近。

**2.2.3 树状图聚类分析** 采取随机重复抽样算法,对UPGMA的可靠性进行分析,构建了样本聚类树状图。由图5可以看出,3组9个样本共聚为2大类,S组3个样本单独为一类,Y组合P组的6个样本聚为一类。S组与Y组的分支距离和

P组和Y组,Y组3个特异性的OTUs数目均高于P组,表明S组的微生物多样性和丰富度最高,Y组次之,P组最低。

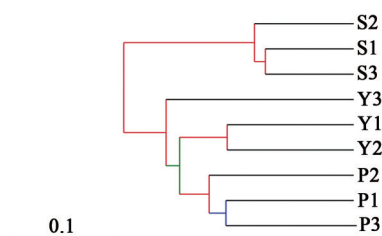
## 2.2 不同预处理对粪样菌群多样性的影响

**2.2.1 Alpha 菌群多样性指数分析** 由表2可知,3组样本的 Goods coverage 均达到了 0.99 以上,且3组之间无显著差异,表明本次测序的结果能真实反映样本的微生物分布情况。S组的 Chao 1、Observed-species、Shannon、Simpson 指数均显著高于P组和Y组,Y组的 Chao 1、Observed-species、Shannon、Simpson 多样性指数均显著高于P组,表明S组样本微生物群落的丰度和多样性最高,Y组次之,P组最低。

可靠性比S组与P组分支距离近且可靠性高;Y组部分样本与P组聚为另一类,但可靠性较低,P组与Y组部分样本中的菌群相似,但相似程度较低。

## 2.3 不同预处理对粪样菌群结构的影响

**2.3.1 在门分类水平上的差异分析** 在门水平上,S组、P组和Y组分别检出 14、11、12 个门,3组共有的门为 11 个,图6和表3列出了3组粪样丰度排在前5的共有门。拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、和变形菌门(Proteobacteria)为3个优势菌门,放线菌门(Actinobacteria)和脱铁杆菌门(Deferribacteres)含量较少。



注:红色部分代表可靠性为 75%~100%;绿色为 25%~50%;蓝色为低于 25%。

图5 Jackknifed-UPGMA 样本相似性聚类图

Fig.5 Jackknifed-UPGMA sample similarity cluster graph

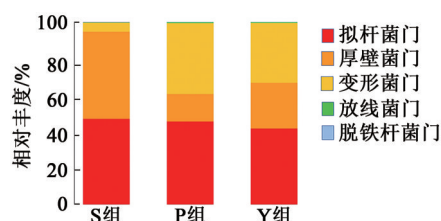


图6 在门水平上不同粪样处理组的群落组成分布

Fig. 6 Community composition distribution in different fecal treatment groups at phylum level

表3 在门水平上不同粪样处理组的相对丰度( $\bar{X} \pm S$ )Table 3 Relative abundance of fecal samples in different treatment groups at phylum level ( $\bar{X} \pm S$ )

| 组别    | S组             | P组             | Y组              |
|-------|----------------|----------------|-----------------|
| 拟杆菌门  | 0.469 ± 0.003a | 0.455 ± 0.013a | 0.415 ± 0.056a  |
| 厚壁菌门  | 0.478 ± 0.007a | 0.151 ± 0.031c | 0.251 ± 0.035b  |
| 变形菌门  | 0.049 ± 0.005b | 0.388 ± 0.046a | 0.330 ± 0.025a  |
| 放线菌门  | 0.001 ± 0.000b | 0.004 ± 0.002a | 0.003 ± 0.000ab |
| 脱铁杆菌门 | 0.001 ± 0.000a | 0.001 ± 0.000a | 0.001 ± 0.000a  |

注:同一行不同组别标不同字母表示具有统计学差异( $P < 0.05$ )。

拟杆菌门(Bacteroidetes)和脱铁杆菌门(Deferribacteres)的相对丰度在3组粪样之间均无显著差异( $P > 0.05$ );厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度在3组粪样之间差异显著( $P < 0.05$ ),以S组最高,其次为Y组、P组;P组和Y组中变形菌门(Proteobacteria)的相对丰度高于S组( $P < 0.05$ ),但P组、Y组之间无显著差异( $P > 0.05$ );P组中放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度显著高于S组( $P < 0.05$ ),S组与Y组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

**2.3.2 在纲分类水平上的差异分析** 在纲水平上,S组、P组和Y组分别检出24、21、21个纲,3组共有的纲为20个,图7和表4列出了3组粪样丰度排在前5的共有纲,包括拟杆菌纲(Bacteroidia)、

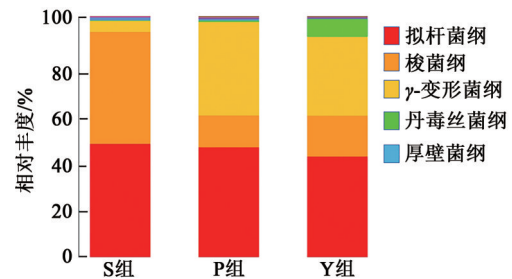


图7 在纲水平上不同粪样处理组的群落组成分布

Fig. 7 Community composition distribution in different fecal treatment groups at class level

梭菌纲(Clostridia)、γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)、丹毒丝菌纲(Erysipelotrichia)、厚壁菌纲(Negativicutes)。

表4 在纲水平上不同粪样处理组的相对丰度( $\bar{X} \pm S$ )Table 4 Relative abundance of fecal samples in different treatment groups at class level ( $\bar{X} \pm S$ )

| 组别     | S组             | P组             | Y组             |
|--------|----------------|----------------|----------------|
| 拟杆菌纲   | 0.469 ± 0.003a | 0.455 ± 0.013a | 0.415 ± 0.056a |
| 梭菌纲    | 0.464 ± 0.007a | 0.133 ± 0.027b | 0.169 ± 0.016b |
| γ-变形菌纲 | 0.046 ± 0.005a | 0.387 ± 0.046b | 0.329 ± 0.025b |
| 丹毒丝菌纲  | 0.001 ± 0.001b | 0.006 ± 0.001b | 0.074 ± 0.056a |
| 厚壁菌纲   | 0.012 ± 0.000a | 0.007 ± 0.002b | 0.002 ± 0.001c |

注:同一行不同组别标不同字母表示具有统计学差异( $P < 0.05$ )。

拟杆菌纲(Bacteroidia)的相对丰度在3组之间无显著差异( $P > 0.05$ );S组中梭菌纲(Clostridia)、γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)的相对丰度显著高于P组和Y组( $P < 0.05$ ),但P组和Y组之间无显著差异( $P > 0.05$ );Y组中丹毒丝菌纲(Erysipelotrichia)的相对丰度显著高于S组和P组( $P < 0.05$ ),S组和P组之间无显著差异( $P > 0.05$ );厚壁菌纲(Negativicutes)的相对丰度在3组之间差异

显著( $P < 0.05$ ),以S组最高,其次为P组、Y组。

**2.3.3 在科分类水平上的差异分析** 在科水平上,S组、P组和Y组分别检出62、55、59个科,3组共有26个科,图8和表5列出了3组粪样丰度排在前7的共有科,包括普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、伯克霍尔德科(Burkholderiaceae)、拟杆菌科(Bacteroidi-

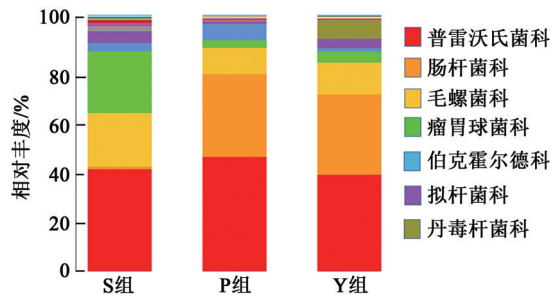


图8 在科水平上不同粪样处理组的群落组成分布

Fig. 8 Community composition distribution in different fecal treatment groups at family level

aceae)、丹毒杆菌科(Erysipelotrichaceae)。

普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)的相对丰度在3组之间无显著差异( $P>0.05$ );瘤胃菌科(Ruminococcaceae)和拟杆菌科(Bacteroidiaceae)的相对丰度在3组之间差异显著( $P<0.05$ ),以S组最高;伯克霍尔德科(Burkholderiaceae)和丹毒杆菌科(Erysipelotrichaceae)的相对丰度在S组和Y组之间

无显著差异( $P>0.05$ ),但均显著高于P组( $P<0.05$ );肠杆菌科(Enterobacteriaceae)在P、Y两组的相对丰度显著高于S组( $P<0.05$ );毛螺菌科(Lachnospiraceae)在S组的相对丰度显著高于P、Y组( $P<0.05$ )。

**2.3.4 在属分类水平上的差异分析** 在属水平上,S组、P组和Y组分别检出147、126、137个属,3组共有117个属,图9和表6列出了3组粪样丰

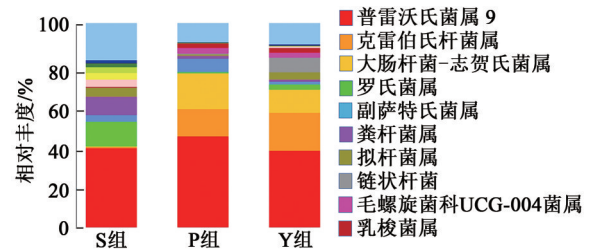


图9 在属水平上不同粪样处理组的群落组成分布

Fig. 9 Community composition distribution in different fecal treatment groups at genus level

表5 在科水平上不同粪样处理组的相对丰度( $\bar{X}\pm S$ )Table 5 Relative abundance of fecal samples in different treatment groups at family level ( $\bar{X}\pm S$ )

| 组别     | S组             | P组             | Y组             |
|--------|----------------|----------------|----------------|
| 普雷沃氏菌科 | 0.397 ± 0.004a | 0.446 ± 0.014a | 0.373 ± 0.061a |
| 肠杆菌科   | 0.010 ± 0.001b | 0.322 ± 0.026a | 0.314 ± 0.038a |
| 毛螺菌科   | 0.210 ± 0.006a | 0.104 ± 0.026b | 0.125 ± 0.02b  |
| 瘤胃菌科   | 0.240 ± 0.010a | 0.028 ± 0.002b | 0.042 ± 0.004c |
| 伯克霍尔德科 | 0.034 ± 0.004a | 0.065 ± 0.019b | 0.014 ± 0.014a |
| 拟杆菌科   | 0.046 ± 0.001a | 0.007 ± 0.001c | 0.037 ± 0.008b |
| 丹毒杆菌科  | 0.010 ± 0.000a | 0.006 ± 0.001b | 0.074 ± 0.055a |

注:同一行不同组别标不同字母表示具有统计学差异( $P<0.05$ )。

表6 在属水平上不同粪样处理组的相对丰度( $\bar{X}\pm S$ )Table 6 Relative abundance of fecal samples in different treatment groups at genus level ( $\bar{X}\pm S$ )

| 组别               | S组             | P组             | Y组             |
|------------------|----------------|----------------|----------------|
| 普雷沃氏菌属9          | 0.387 ± 0.004a | 0.445 ± 0.014a | 0.372 ± 0.061a |
| 克雷伯氏杆菌属          | 0.007 ± 0.000b | 0.133 ± 0.045a | 0.188 ± 0.038a |
| 大肠杆菌-志贺氏菌属       | 0.003 ± 0.001c | 0.176 ± 0.019a | 0.113 ± 0.008b |
| 罗氏菌属             | 0.120 ± 0.007a | 0.006 ± 0.001b | 0.024 ± 0.018b |
| 粪杆菌属             | 0.089 ± 0.006a | 0.013 ± 0.003b | 0.010 ± 0.004b |
| 副萨特氏菌属           | 0.033 ± 0.005b | 0.065 ± 0.019a | 0.014 ± 0.014b |
| 拟杆菌属             | 0.044 ± 0.002a | 0.007 ± 0.001b | 0.037 ± 0.008a |
| 链状杆菌属            | 0.000 ± 0.000b | 0.005 ± 0.001b | 0.074 ± 0.056a |
| 毛螺旋菌科 UCG-004 菌属 | 0.000 ± 0.000b | 0.027 ± 0.008a | 0.023 ± 0.004a |
| 乳梭菌属             | 0.003 ± 0.000b | 0.022 ± 0.003a | 0.022 ± 0.003a |

注:同一行不同组别标不同字母表示具有统计学差异( $P<0.05$ )。

度排在前10的共有属,包括普雷沃氏菌属9(*Prevotella\_9*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、大肠杆菌-志贺氏菌属(*Escherichia\_Shigella*)、罗氏菌属(*Roseburia*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、副萨特氏菌属(*Parasutterella*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、链状杆菌属(*Catenibacterium*)、毛螺旋菌科 UCG-004 菌属(*Lachnospiraceae\_UCG-004*)、乳梭菌属(*Lachnoclostridium*)。

雷沃氏菌属9(*Prevotella\_9*)的相对丰度在3组之间无显著差异( $P>0.05$ );P组和Y组的克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、毛螺旋菌科 UCG-004 菌属(*Lachnospiraceae\_UCG-004*)、乳梭菌属(*Lachnoclostridium*)的相对丰度无显著差异( $P>0.05$ ),但均显著高于S组( $P<0.05$ );S组罗氏菌属(*Roseburia*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)的相对丰度显著高于P组和Y组( $P<0.05$ ),但P组和Y组之间差异不显著( $P>0.05$ );大肠杆菌-志贺氏菌(*Escherichia\_Shigella*)的相对丰度在3组之间差异显著( $P<0.05$ ),以P组最高,其次为Y组、S组。

### 3 讨论

高通量测序技术因其独特的优势,目前已被广泛应用于肠道菌群多样性、丰度及菌群组成的研究中。樊英等<sup>[17]</sup>利用高通量测序分析了大泷六线鱼表皮粘液及肠道内容物微生物多样性;刘铭等<sup>[18]</sup>应用高通量测序技术对我国东海带鱼肠道菌群进行了研究;申进增<sup>[19]</sup>研究了当归挥发油对自发性高血压大鼠肠道菌群的影响。肠道菌群的状态可以通过粪样菌群的变化反映出来<sup>[20]</sup>,但粪样并不能真实代表肠道菌群的组成,由于受限于目前没有更好的采样方式,所以在肠道菌群的研究中,一般以新鲜粪样作为取样来源。粪样中除携带肠道细菌外,还含有大量的腐殖质、肠道内壁脱落细胞及碎片、各种有机物和无机物等<sup>[21]</sup>,所以对粪样进行预处理具有必要性。董鹏飞等<sup>[9]</sup>研究发现,用生理盐水处理可以有效增加肠道菌群DNA的纯度和浓度,提高肠道微生物DNA的提取质量。张雪雁等<sup>[22]</sup>采用PBS缓冲液处理粪样,可以在一定程度上去除粪样中的杂质和抑制物。曹冉冉等<sup>[23]</sup>发现生理盐水和PBS缓冲液预处理是目前提取粪样核酸常用的方法。

本文采用Illumina Miseq 高通量测序技术,对

比分析原始粪样、生理盐水预处理粪样和PBS缓冲液预处理粪样中菌群的差异性,发现粪样经过生理盐水处理后,不仅可以去除杂质,同时有利于保持粪样微生物的多样性和丰富度;PBS缓冲液虽然可以去除粪样杂质,但在一定程度上降低了粪样微生物的多样性和丰度。高通量测序中,采用生理盐水对粪样进行预处理,能够在一定程度上提高粪样中菌群检测的准确性。原始粪样由于带有大量杂质可能会影响某些菌群的检出,不同溶液预处理可能会造成某些菌群的损失,不同处理方式对不同菌群的影响也不完全一样,其具体影响原因有待于进一步研究。

研究还发现,拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门均为原始粪样组、生理盐水处理组和PBS缓冲液处理组排在前3位的优势菌门,这与文献<sup>[24-25]</sup>报道的研究结果相一致,3组粪样均能最大程度上保留优势菌门。厚壁菌门是肠道内最为优势的一大类细菌,这一类细菌属于革兰阳性厌氧菌<sup>[19]</sup>,很多厚壁菌可以产生芽孢,用以抵抗脱水和极端环境,动物肠道中的厚壁菌属于化能营养型细菌,能帮助动物从食物中获取更多的能量<sup>[26]</sup>。放线菌是革兰阳性厌氧菌,可增加肠道内抗生素的产量,进而破坏肠道菌群的稳态,加剧相关疾病的进展<sup>[27]</sup>,3组粪样均检出了放线菌门。

瘤胃球菌科属于厚壁菌门,是胃肠道中分解纤维素和发酵抗性淀粉的主要菌属<sup>[28]</sup>,瘤胃球菌具有碳水化合物降解活性,可通过分泌纤维素酶、半纤维素酶等降解纤维物质,并有助于细胞吸收糖分,为宿主提供所需营养物质<sup>[29]</sup>;拟杆菌能够参与碳水化合物发酵、多糖代谢、胆汁酸和类固醇代谢、抑制机体炎性反应、影响宿主免疫系统、维持肠道正常生理等诸多功能,对宿主健康具有重要影响<sup>[30]</sup>;伯克霍尔德菌科涵盖生态上极其多样化的微生物,包括真正的环境腐生生物、植物病原体、条件致病菌,多数为人类和动物的主要致病菌<sup>[31]</sup>。本次研究中,瘤胃球菌科、拟杆菌科和伯克霍尔德科作为排在前7的共有科在3组粪样均被检出。

普雷沃氏菌属能促进肠道消化碳水化合物和膳食纤维,从而有利于维持肠道菌群稳定,增强免疫功能<sup>[32]</sup>;粪杆菌属、毛螺旋菌科 UCG-004 菌属是肠道中的有益菌属,与短链脂肪酸产生相关<sup>[33]</sup>;罗氏菌属为肠道中产生丁酸的优势菌<sup>[34]</sup>;拟杆菌

属菌群可在人体肠道内产生乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸,而短链脂肪酸对维持机体功能具有重要作用;乳梭菌属在肠道中多数为非致病菌,少数为致病菌;此外,克雷伯氏菌、大肠杆菌-志贺氏菌均来自肠杆菌科,属于条件致病菌<sup>[35]</sup>。以上菌属作为3组粪样丰度排在前10的共有属均被检出。

肠道菌群是一个极其复杂的微生态系统,包括许多生物因子和非生物因子,不同的取样方法、预处理方式、DNA提取方式、测序方式等均会对肠道菌群的研究结果产生影响,同一处理方式对不同肠道微生物的影响也可能不同。此外,小鼠物种、个体、周龄等差异均会对肠道菌群研究结果产生影响,今后应对影响肠道菌群结构的可能因素进行系统分析。

### 参 考 文 献

- [1] 王艳丽. 紫甘薯酰化花色苷与肠道菌群的相互作用研究[D]. 天津:天津科技大学,2018.
- [2] 王丽凤. 益生菌 *L. plantarum* P-8 对肉鸡肠道菌群、肠道免疫和生长性能影响的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.
- [3] 刘嘉奕. 人体肠道菌群研究中粪便样品制备与保存研究进展[J]. 国际儿科学杂志,2019(7):482-485.
- [4] 张飞燕,金洁,刘超,等. 基于高通量测序技术测定普通棉耳猴粪微生物多样性[J]. 中国实验动物学报,2019,27(3):366-373.
- [5] 董鹏飞. 肠道菌群DNA提取与鉴别技术研究[D]. 天津:天津大学,2016.
- [6] 杨成聪,尤利军,吕瑞瑞,等. 粪便留取量对粪便中细菌结构和功能的影响[J]. 中国微生态学杂志,2022,34(6):651-656.
- [7] MESSER J W, RICE E W, JOHNSON C H. Spread plate technique[M]//ROBINSON R K, BATT C A, PATEL P D. Encyclopedia of food microbiology. London: Academic Press, 2000: 2159-2166.
- [8] GARCIA A, KAMARA J, HAKAN V, et al. Direct quantification of campylobacter jejuni in chicken fecal samples using real-time PCR: evaluation of six rapid DNA extraction methods[J]. Food Anal. Method., 2013(6): 1728-1738.
- [9] 董鹏飞,赵友全,房彦军. 最优肠道菌群DNA提取预处理方法的建立[J]. 中国医药导刊,2016,18(8):849-851.
- [10] BABAEI Z, ORMAZDI H, REZAIE S, et al. Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR result[J]. Exp. Parasitol., 2011(128): 159-162.
- [11] 吴帅帅,武云晖. 粪便样本中高纯度人源DNA富集提取方法[J]. 生物化工,2021,7(6):29-33.
- [12] GUPTA N, VERMA V K. Next-generation sequencing and its application: empowering in public health beyond reality[M]//ARORA P. Microbial technology for the welfare of society. Singapore: Springer, 2019: 313-341.
- [13] BOLGER A, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [14] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [15] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat. Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [16] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [17] 樊英,于晓清,李乐,等. 基于16S rRNA高通量测序分析大泷六线鱼表皮粘液及肠道内容物微生物多样性[J]. 生物技术进展,2021,11(1):79-90.
- [18] 刘铭,刘辉,李娜,等. 应用高通量测序技术对我国东海带鱼肠道菌群的研究[J]. 生物技术进展,2020,10(2):152-157.
- [19] 申进增. 基于16S rDNA测序技术分析当归挥发油对自发性高血压大鼠肠道菌群的影响[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2021.
- [20] NEPELSKA M, WOUTERS T, JACOUTON E, et al. Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPAR $\gamma$  transcriptional activity in human intestinal epithelial cells[J/OL]. Sci. Rep., 2017, 7: 43199[2022-08-18]. <https://doi.org/10.1038/srep43199>.
- [21] 王生,黄晓星,余鹏飞,等. 肠道菌群失调与结肠癌发生发展之间关系的研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(8):1045-1049.
- [22] 张雪雁,李琳琳. 一种提取肠道细菌总基因组DNA的方法[J]. 新疆医科大学学报,2007,30(7):722-724.
- [23] 曹冉冉,刘丽,廖虹瑜,等. 三种前处理方法对粪便中新型冠状病毒核酸检测结果的影响[J]. 现代预防医学,2020,47(20): 3777-3779.
- [24] 黄树武,闵凡贵,王静,等. 常见SPF级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究[J]. 中国实验动物学报,2019,27(2):229-235.
- [25] MANICHANH C, BORRUEL N, CASELLAS F, et al. The gut microbiota in IBD[J]. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., 2012, 9(10): 599-608.
- [26] 赵金香,张瑞十,赵义龙,等. 新疆驴盲肠细菌多样性分析[J]. 草食家畜,2016(4):20-25.
- [27] KATSUYAMA Y. Mining novel biosynthetic machineries of secondary metabolites from actinobacteria[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2019, 83(9): 1606-1615.
- [28] 李琪,孙悦,丁成华,等. 泄泻证患者肠道菌群特征分析[J]. 中国中医基础医学杂志,2022,28(1):108-113.
- [29] 孙晓霞,周雯,战丽彬. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠肠黏膜

- 屏障的调控作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(10): 1233-1240.
- [30] ZENG Q, LI D, HE Y, *et al.*. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities[J]. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1): 1-10.
- [31] COENYE T. The family burkholderiaceae[M]//ROSENBERG E, DELONG E F, LORY S, *et al.*. The prokaryotes: alphaproteobacteria and betaproteobacteria. Berlin, Heidelberg: Springer. 2014: 759-776.
- [32] 田博雅, 马亿珈, 奚梦瑶, 等. 保育期仔猪盲肠微生物菌群多样性分析[J]. 今日畜牧兽医, 2021, 37(12): 12-15.
- [33] QIN J, LI Y, CAI Z, *et al.*. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [34] CUI Q L, PAN Y N, XU X T. The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme in vitro employed UPLC-Q-TOF-MS[J]. *Fitoterapia*, 2016(109): 67-74.
- [35] KARLSSON F H, TREMAROLI V, NOOKAEW I, *et al.*. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 99-103.