

西北高海拔地区放养偶蹄类动物肠道微生物多样性的宏基因组比较研究

尚立强¹, 薛世魁², 王惜婧², 张小丽^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070; 2. 甘肃省兰州市城关区动物卫生监督所, 甘肃兰州 730030)

摘要 [目的]分析西北高海拔地区偶蹄类动物肠道的微生物多样性。[方法]从动物粪便样品中提取全部微生物的DNA,利用宏基因组学方法,通过高通量测序及生物信息学分析对肠道微生物多样性及群落功能进行比较。[结果]在相似的地理环境下,不同物种偶蹄类动物的肠道微生物多样性存在高度的相似性,暗示着生存环境对动物肠道微生物的多样性发挥着重要影响。[结论]该研究初步阐明了西北地区高海拔环境下不同种类动物的肠道微生物多样性,为进一步了解高原环境中微生物的构成提供了重要参考。

关键词 宏基因组测序;双峰驼;白牦牛;绵羊;肠道微生物

中图分类号 S852.6 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)07-0098-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.07.031

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Metagenomic Comparative Study on the the Intestinal Microbial Diversity of Stocked Cloven-hoofed Animals in High Elevation Area of Northwest China

SHANG Li-qiang¹, XUE Shi-kui², WANG Xi-jing² et al (1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070; 2. Animal Health Supervision Institute of Chengguan District in Lanzhou City of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730030)

Abstract [Objective] To analyze the intestinal microbial diversity of cloven-hoofed animals in high elevation area of northwest China. [Method] The total DNA were extracted from feces samples of test animals, and the intestinal microbial diversity and community function were analyzed by using metagenomic analysis with high throughput sequencing and bioinformatics analysis. [Result] Different species of cloven-hoofed animals had high similarity in a similar geographical environment, which suggested the environment played an important role in the microbial diversity of animal intestines. [Conclusion] The intestinal microbial diversity of Chinese cloven-hoofed animals from the high altitude areas of northwest China were preliminary illuminated, which provided important references for further understanding the composition of microorganisms in the plateau environment.

Key words Metagenomic sequencing; Bactrian camel; White yak; Sheep; Intestinal microbe

宏基因组学(metagenomics)是一种以新一代高通量测序技术为基础,以特定环境下微生物群体基因组为研究对象,分析微生物群体的多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及其与环境的关系,发掘潜在的生物学意义。与传统微生物研究方法相比,宏基因组测序技术规避了绝大部分微生物不能培养、痕量菌无法检测的缺点,可从基因层面对整个微生物群落进行分析,并可使序列结果分析的速度与准确性都大大提高^[1]。目前,该技术已被成功应用于研究污水、植物、动物及人体等多种环境中微生物的多样性^[2-5]。通过宏基因组测序分析技术不仅可以明确宿主与微生物之间的相互关系,提高宿主的健康状态和营养水平,而且可以增加对宿主胃肠道微生物代谢通路的了解。近年来,关于动物肠道微生态的研究受到人们广泛关注,研究动物肠道微生物不仅可以描述动物肠道微生物的系统发育,分析其肠道菌群功能,了解其胃肠道微生物区系的变化规律、信号通路及其响应机制,而且可以通过改变肠道微生物组成、增加优势菌群数量等有效措施预防和治疗某些肠道疾病,进而为动物健康、可持续的繁殖和生存做出贡献,同时也为研究动物生存环境的微生物多样性提供了相关数据^[6-7]。

武威市地处我国西北地区,位于101°49'~104°16'E, 36°29'~39°27'N,拥有南部祁连山山地、中部走廊平原和北部荒漠3个地貌单元,海拔介于1020~4874 m。双峰骆驼、

绵羊及白牦牛是这一地区主要放养的经济动物。其中,天祝白牦牛是我国稀有而珍贵的地方牦牛类群,是经过长期自然选育和人工选育而成的特有畜种,已被列入国家级畜禽保护品种,其肠道微生物的多样性具有很强的地域代表性。通过研究这些动物肠道微生物的多样性,可为进一步了解我国西北高海拔地区特有的环境微生物多样性提供参考依据。笔者采集了这3种动物的粪便样品并提取其总DNA,通过宏基因组 *de novo* 测序和生物信息学分析,阐明并比较了这些动物肠道微生物的多样性,并对其群落功能进行了分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 琼脂糖、PBS、抗生素、Taq Master Mix、DNA Marker 2000,均购自上海生工生物工程技术有限公司;NanoDrop2000购自Thermo Scientific公司。

1.2 粪便样品采集 从甘肃省武威市采集新鲜的双峰骆驼、绵羊及白牦牛粪便样品各15份。样品采集时避开外部杂菌污染区对中部的粪便样品进行无菌采集后储存于冰盒中,立即送至实验室进行处理。

1.3 DNA提取及检测 利用QIAamp DNA Stool Mini Kit对样品总DNA进行提取,所有操作按照试剂盒提供的操作说明书进行。DNA提取完毕后,利用1%琼脂糖凝胶电泳对抽提的基因组DNA完整性进行了检测。同时,利用NanoDrop2000超微量分光光度计(Thermo Scientific, USA)和TBS-380微型荧光计(Promega, USA)对抽提DNA样品的纯度和浓度分别进行了测定。条带单一或稍有弥散,无色素、RNA、蛋白等杂质污染,总量满足2次建库需求的DNA样品方可进行后续测序分析。

作者简介 尚立强(1985—),男,陕西西安人,硕士,从事预防兽医学研究。*通信作者,副教授,博士,从事兽医微生物及免疫学研究。

收稿日期 2018-10-08; **修回日期** 2018-10-21

1.4 上机文库构建及测序 检测合格的 DNA 样品由美吉生物公司进行文库构建及测序。利用 Covaris M220 超声发生器将合格的 DNA 样品打断成 300 bp 左右的片段,然后使用 TruSeq Nano DNA Sample Preparation Kits 选择性回收目的片段并在两端连接接头,以构建测序文库。文库建好后,使用 Illumina Hiseq2500 平台进行双末端测序,测序得到的下机数据(也称为原始数据 RawData)用于后续的生物信息分析。

1.5 序列处理及生物信息学分析 为了提高后续分析质量和可靠性,首先对原始序列进行了拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理。使用软件 Seqprep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>) 去除含 N 碱基的 reads,对序列 3' 端和 5' 端进行质量剪切,然后使用软件 Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>) 去除剪切后长度小于 50 bp 及平均质量值低于 20 的 reads,保留高质量的 pair-end reads 和 single-end reads,最后通过 BWA 软件 (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) 将 reads 比对宿主 DNA 序列,去除与宿主基因组相似性高的污染 reads。将优化处理后的序列使用拼接软件 SOAPdenovo (<http://soap.genomics.org.cn/>, Version 1.06) 进行拼接组装。拼接主要参数 k-mer 值设范围为 39~47。在 scaffolds 内部 gap 处,将 scaffolds 打断成新的 contigs,并对大于等于 500 bp 的 contigs 进行统计,从中选择最优组装结果。使用 MetaGene (<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/>) 对拼接结果中的 contig 进行基因预测。

然后,对获得的基因序列进行物种相对丰度和功能上的分类及注释。使用 BLASTP 程序 (BLAST Version 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将基因集序列分别

与 eggNOG 数据库 (<http://eggnog.embl.de/>) 和 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 进行比对(e 值为 $1e-5$),进而获得详细的物种注释。此外,在上述分析的基础上,进行了相似聚类,分组排序、差异比较等多方向的统计分析和探索,并对结果进行了可视化展示,挖掘数据中的有效信息。

2 结果与分析

2.1 门水平上不同动物肠道微生物的比较 该研究对双峰骆驼、绵羊和白牦牛的粪便样品进行了宏基因组学分析,每个样本平均产生 15 Gbp 的测序数据。分类学分析结果显示,在门水平上双峰骆驼、绵羊和白牦牛的肠道微生物群落主要分布于以下 7 个优势菌门(占比大于 1%),包括拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和广古菌门(Euryarchaeota)。其中 Bacteroidetes 在 3 种动物肠道中相对丰度都是最高的(骆驼 64.61%,绵羊 63.95%,白牦牛 77.09%),其次是 Firmicutes(骆驼 21.53%,绵羊 7.54%,白牦牛 12.48%)。这表明草食动物在肠道微生物多样性上存在一致性。其余 5 个优势门类在 3 种动物中的相对丰度各不相同(图 1a)。Fibrobacteres 在骆驼、绵羊和白牦牛中的占比分别为 3.41%、7.54%和 0.08%;Proteobacteria 在骆驼、绵羊和白牦牛中的占比分别为 2.48%、4.71%和 4.15%;Spirochaetes 在骆驼、绵羊和白牦牛中的占比分别为 0.68%、5.03%和 0.68%;Verrucomicrobia 在骆驼、绵羊和白牦牛中的占比分别为 1.96%、1.41%和 2.41%;Euryarchaeota 在骆驼、绵羊和白牦牛中的占比分别为 0.15%、1.60%和 1.60%。

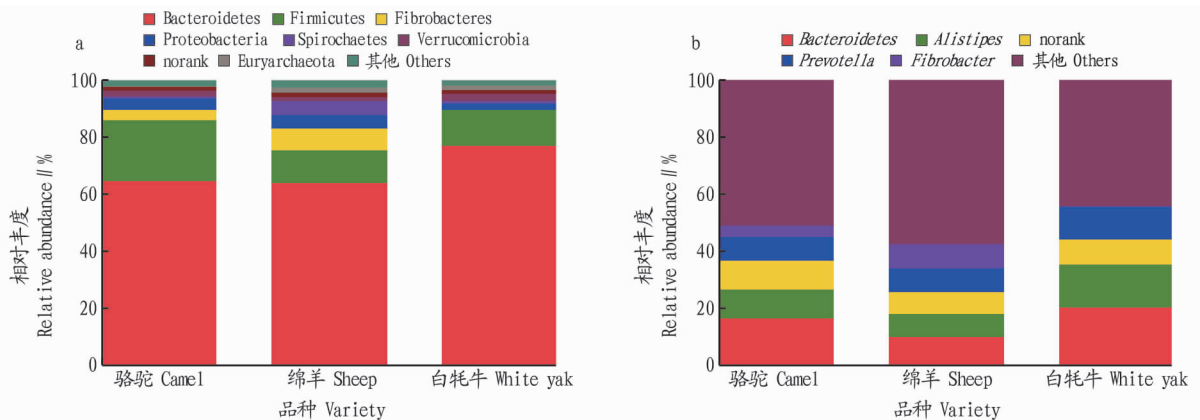


图 1 门(a)和属(b)水平上不同动物肠道微生物的比较

Fig. 1 Comparison of intestinal microbe among different animals at phylum (a) and genus (b) levels

2.2 属水平上不同动物肠道微生物的比较 在属水平上,3 种动物的肠道微生物群落主要分布于以下 4 个优势属(占比大于 10%),包括拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Alistipes*、普氏菌属(*Prevotella*)和纤维杆菌属(*Fibrobacter*),其中 *Bacteroides* 在 3 种动物肠道中的相对丰度都是最高的(骆驼 28.09%,绵羊 22.62,白牦牛 31.43%)(图 1b)。利用韦恩图展示 3 种动物各自特有和共有细菌物种数目,结果显示这 3 种动物的肠道微生物种类在分类学水平属上存在高度的相似性(图 2)。骆驼、绵羊和白牦牛肠道中所鉴定到的总的属数目分别为

1 393、1 223 和 1 404 个,而其中 3 种动物所共有的属数目多达 1 067 个,说明这一地区的环境微生物群落具有一定的稳定性。

2.3 COG 功能分析 为了调查 3 种不同动物之间的肠道微生物基因功能差异,将基因集序列与 eggNOG 数据库进行比对(e 值为 $1e-5$)获得基因对应的 COG(Clusters of orthologous groups of proteins),然后使用 COG 对应的基因丰度总和计算该 COG 的丰度。结果显示,3 种动物都有 20 个 functional COG categories 被检测到,而且它们之间的丰度存在高

度的相似性(图3)。

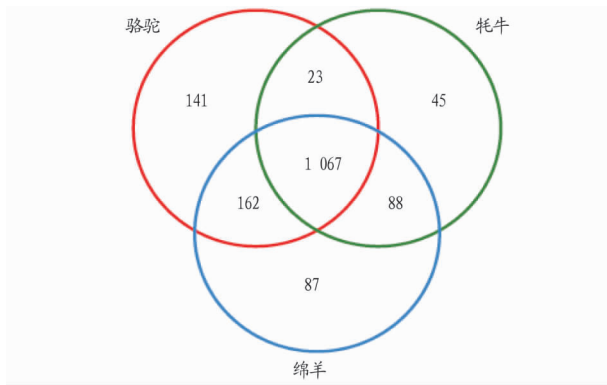


图2 不同动物肠道微生物种类的比较

Fig. 2 Comparison of intestinal microbe populations in different animals

3种基因组中存在大量的高质量序列并未匹配到以上任何属中,这些序列没有与任何生物类群匹配,意味着这些序

列与当前生物信息数据库中任何已知生物的序列没有相关性或者这些序列与它们的亲缘关系非常远。因此,这3种动物肠道中蕴藏着惊人的生物多样性。

为进一步了解不同动物之间的差异,根据COG之间的相似度关系,得到聚类后的菌群相对丰度比较热图。从图4可以看出,3种动物间COG具有较高的相似性。

2.4 KEGG 功能注释 利用BLAST将基因集序列与KEGG的基因数据库(GENES)进行比对,将比对结果使用KOBAS 2.0软件进行功能注释。使用KO、Pathway、EC、Module对应的基因丰度总和计算该功能类别的丰度。结果发现,骆驼、绵羊及白牦牛这3种动物肠道菌群可能参与的代谢通路分别为311、199及305个,涉及到各个方面,包括脂肪酸的代谢、多糖的代谢、蛋白酶以及肽酶的产生等。同时,3种动物共同所涉及的代谢通路有188条,因此3种动物肠道菌群所涉及的功能具有较高的相似性。

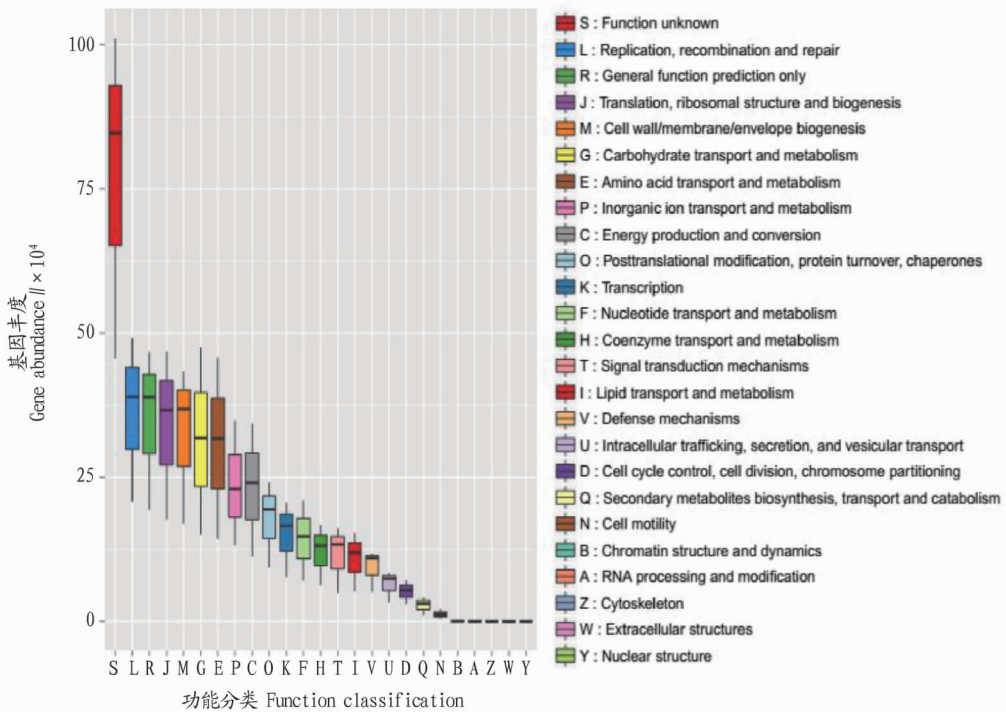


图3 不同动物肠道微生物种类的比较

Fig. 3 Comparison of intestinal microbe species in different animals

3 讨论

已有的动物肠道微生物研究显示不同动物之间在肠道微生物多样性方面有明显差异。此外,环境在很大程度上影响动物肠道微生物多样性^[8]。该研究结果也表明,骆驼、绵羊及白牦牛这3种动物肠道菌群是不同的,但由于其生存环境的一致性导致其肠道段微生物的种类和分布具有高度的相似性,这与以前的研究报道相一致。

不同动物的肠道段微生物的种类和分布特点和规律不同,在门水平上,拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和

广古菌门(Euryarchaeota)等菌门为优势菌门,而在在属水平上拟杆菌属(*Bacaeroides*)、*Alistipes*、普氏菌属(*Prevotella*)和纤维杆菌属(*Fibrobacter*)等菌属为优势菌属,具有明显的差异。此外,差异微生物所富集的代谢通路在不同动物中是不同的,主要差异在物质代谢和传染性相关通路,但仍具有高度的相似性。

我国西部高海拔地区物种分布广泛、种类众多,该研究结果可为了解我国西部高海拔地区的微生物多样性,特别是我国所特有的白牦牛等动物的肠道微生物多样性提供重要信息。

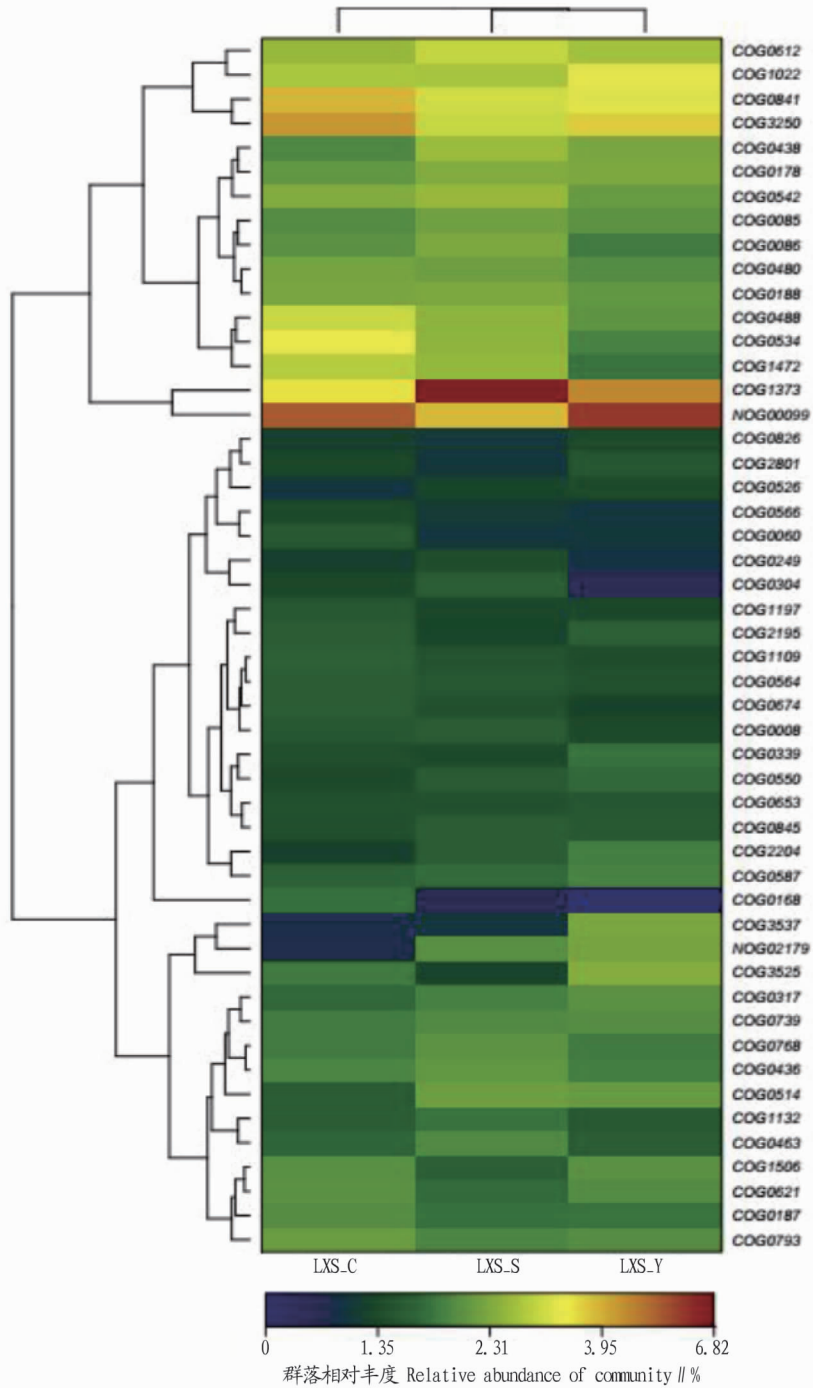


图 4 不同动物肠道段及粪便肠道微生物属比较热图

Fig. 4 Heatmap analysis of COGs of genes in the intestinal segments and fecal intestinal microflora of different animals

参考文献

- [1] 李浩, 刘阳, 李长安. 多杀性巴氏杆菌病研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(2): 31-33.
- [1] 樊程, 李双江, 李成磊, 等. 大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1113-1121.
- [2] WANG W, ZHENG S S, SHARSHOV K, et al. Metagenomic profiling of gut microbial communities in both wild and artificially reared Bar-headed goose (*Anser indicus*) [J]. Microbiology open, 2017, 6(2): 1-9.
- [3] 兰阿峰, 杨曼, 郭素芬, 等. 免培养法对大鲵肠道微生物多样性的研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1342-1349.
- [4] 刘莉, 王中康, 俞和韦, 等. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 616-622.
- [5] 杨曼, 兰阿峰, 郭素芬, 等. 免培养法研究野生川金丝猴肠道内生细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1605-1612.
- [6] 白秀娟, 刘诚刚, 杜智恒, 等. PCR-DGGE 技术分析断奶仔兔肠道微生物菌群结构及多样性[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(9): 64-69.
- [7] 许宇静, 张煜坤, 沈雪梅, 等. 采用 Illumina MiSeq 测序技术分析断奶幼兔肠道微生物群落的多样性[J]. 动物营养学报, 2015, 27(9): 2793-2802.
- [8] BHATT V D, DANDE S S, PATIL N V, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(4): 3363-3371.