



转 IGF-1 基因超细毛羊与非转基因羊肠道粪便菌群多样性及组成差异分析

王新华*, 张星星, 王立民, 黄新, 韩猛立, 张译元,

郭延华, 唐红, 何延华, 钟发刚*, 周平*

(新疆农垦科学院畜牧兽医研究所 农业部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 石河子 832000)

摘要: 旨在探究超细毛羊转入 IGF-1 基因后是否会引起超细毛羊肠道微生物菌群群落改变而导致转基因羊生物安全存在隐患的问题。本研究在同一羊场随机选取临床健康羊 3 组, 其中转 IGF-1 基因阳性组(GP 组)41 只(24 母(GDF), 17 公(GPM)), 转基因阴性羊(GN 组)43 只(25 母(GNF), 18 公(GNM)), 非转基因超细毛羊(NG 组)29 只(18 母(NGF), 11 公(NGM))。取直肠粪样, 应用 Illumina HiSeq 高通量测序技术测定粪便样本中细菌的 16S rRNA V3-V4 区序列, 分析转基因超细毛羊与非转基因羊间肠道粪样细菌群落组成。结果表明, 共计得到 17 个门, 32 个纲, 56 个目, 94 个科, 228 个属及 185 个种; LEfSe 分析显示, GPF 组有 10 个生物标记物; GPM 组有 5 个, 均是反刍动物肠道菌群的常见定植菌; NGF 组的生物标记物为拟杆菌 BS11 科; NGM 组为厚壁菌门。均为反刍动物肠道菌群的主要优势菌。3 组肠道菌群的共享菌分析显示, 在门纲目科属种 6 个分类水平拥有共享菌比例高达 91%~94%。本研究证实, 转入 IGF-1 基因并未改变超细毛羊肠道菌群的整体结构分布, 转基因羊具有生物安全及环境安全性。

关键词: IGF-1 基因; 超细毛羊; 肠道菌群结构; 细菌多样性; 高通量测序; 转基因生物安全

中图分类号: S852.6; S826

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)10-2387-16

Differences of the Intestinal Microbial Flora Diversity and Composition in IGF-1 Transgenic Superfine Wool Sheep and Non-transgenic Sheep

WANG Xinhua*, ZHANG Xingxing, WANG Limin, HUANG Xin, HAN Mengli, ZHANG Yiyuan, GUO Yanhua, TANG Hong, HE Yanhua, ZHONG Fagang*, ZHOU Ping*

(State Key Laboratory for Sheep Genetic Improvement and Healthy Production, Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: The study aimed to explore the intestinal microbial community changes after transferring the IGF-1 gene into the superfine wool sheep, which would lead to potential problems in the biosafety of transgenic sheep. Forty one individuals in IGF-1 transgene positive group (GP group, female(GPF) 24 and male(GPM) 17), 43 individuals in genetically modified negative

收稿日期: 2020-05-19

基金项目: 国家转基因生物技术育种重大专项(2016ZX08008001)

作者简介: 王新华(1957-), 男, 陕西临潼人, 大学本科, 研究员, 博士生导师, 主要从事兽医生物技术研究, E-mail: wangxinhua5751@163.com; 张星星(1990-), 男, 甘肃天水人, 硕士, 助理研究员, 主要从事兽医微生物学研究, E-mail: shzuzx@163.com。王新华和张星星为同等贡献作者

* 通信作者: 王新华, 主要从事兽医生物技术研究, E-mail: wangxinhua5751@163.com; 钟发刚, 主要从事动物传染病诊断与防治研究, E-mail: zfg125@sohu.com; 周平, 主要从事绵羊转基因与体细胞克隆研究, E-mail: zhpqxqf@163.com

group (GN group, female(GNF) 25 and male(GNM) 18) and 29 individuals in non-genetically modified group(NG group, female(NGF) 18 and male(NGM) 11) from clinical healthy sheep in the same field were randomly selected. The rectal fecal samples were collected. The Illumina HiSeq high-throughput sequencing technology was used to determine bacterial 16S rRNA V3-V4 area sequence, and the bacteria community composition in fecal samples of transgenic superfine wool sheep and non-transgenic sheep was analyzed. There were 17 phyla, 32 classes, 56 orders, 94 families, 228 genera and 185 species. LEfSe analysis showed that there were 10 biomarkers in the GPF group, there were 5 biomarkers in GPM group, all of which were common colonization bacteria of ruminant intestinal flora. The biomarkers in NGF group was Bacteroides BS11 family, the biomarkers in NGM group was Firmicutes. They were the main dominant bacteria of ruminant intestinal flora. Analysis of shared bacteria of intestinal flora in 3 groups showed that the proportion of shared bacteria was as high as 91%-94% in 6 taxa of genus and family. It was confirmed that the introduction of *IGF-1* gene did not change the overall distribution of intestinal flora in superfine wool sheep, and the transgenic sheep were biosafety and environmental safety.

Key words: *IGF-1* gene; superfine wool sheep; gut microbiota structure; bacterial diversity; high-throughput sequencing; genetically modified organisms(GMO) safety

* **Corresponding authors:** WANG Xinhua, E-mail: wangxinhua5751@163.com; ZHONG Fagang, E-mail: zfg125@sohu.com; ZHOU Ping, E-mail: zhpxqf@163.com

肠道作为大量微生物存在的栖息地,不仅形成了复杂的肠道微生态系统^[1],而且作为宿主生命活动的有机组成部分,对宿主的生长发育具有重要的影响^[2-3]。大量研究表明,哺乳动物肠道内微生物结构和组成与宿主、群落种间以及种内相互作用,形成具有一定稳定性的微生物菌群落^[4-5]。16S rRNA 基因是目前识别肠道微生物群落的重要依据,采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术对 16S rRNA 基因进行测序,可了解肠道微生物的多样性及其丰度,并对整个细菌属的功能作用进行评价^[6]。

随着转基因生物技术育种的迅速发展,转基因安全问题备受社会与业内关注^[7]。在地理环境、饲草料种类和季节气候等同质状况下,测定转基因与非转基因超细毛羊的肠道微生物群落结构及分布^[8],可揭示 *IGF-1* 转基因超细毛羊种群与非转基因羊之间的系统进化上与其肠道微生物的系统多样性结果是否有差异^[9]。

目前暂未见关于转基因羊和非转基因羊肠道菌群多样性及结构差异的研究^[10]。本研究在同一羊场随机选取转基因阳性羊组(GP组)、转基因阴性羊组(GN组)与非转基因超细毛羊组(NG组)共 113 只供试羊,取直肠粪样,应用 Illumina HiSeq 高通量测序技术测定 113 份羊肠道粪便样本中细菌的 16S rRNA V3+V4 变异区序列,比较分析转基因

超细毛羊与非转基因羊肠道粪样细菌群落组成^[6]。旨在通过转基因羊与非转基因羊肠道菌群组成结构和多样性分析,探索转 *IGF-1* 基因羊生物安全及环境安全性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试羊分组 依 *IGF-1* 基因检测验证结果^[11],对新疆农垦科学院实验羊场经体细胞克隆技术获得并扩繁的包括原代、F1 代和 F2 代转基因阳性组(GP组)41 只(其中转基因阳性母羊组(GPF)24 只,转基因阳性公羊组(GPM)17 只),扩繁的 F1 代、F2 代经检测转 *IGF-1* 基因呈阴性的半同胞后代组成转基因阴性组(GN组)43 只(其中转基因阴性母羊组(GNF)25 只,转基因阴性公羊组(GNM)18 只),同场饲养的超细毛非转基因组(NG组)29 只(其中非转基因母羊组(GNF)18 只,非转基因公羊组(NGM)11 只),见表 1。

1.1.2 日粮组成 参照 Nutrient Requirement of Small Ruminants(2007)设计配制基础饲粮(表 2),TMR 混合搅拌后每日 10:00 和 18:00 各饲喂 1 次,悬挂舔食砖,自由采食,自由饮水。

1.1.3 直肠粪样采集 在新疆农垦科学院实验羊场,于 2017 年 11 月 29 日采集 113 只供试羊直肠

粪便样本,装入无菌聚乙烯管并做好标记,置于液氮中带回实验室,于-80℃冰箱冷冻保存。

1.2 粪便样本 DNA 提取与检测

使用粪便基因组提取试剂盒(TIANamp Stool

DNA Kit,天根 DP328,中国)按照试剂盒说明书提取羊粪便样品中基因组 DNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 完整性,使用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(ThermoScientific)检

表 1 供试羊样品分组

Table 1 Grouping of sheep samples

组别 Group	性别组 Gender	试验羊分组 Detailed group	试验羊数/只 Number of sheep
转 IGF-1 基因阳性羊(GP 组) IGF-1 gene positive sheep of GMO(GP group)	GPF	转基因超细毛母羊(IGF-1 阳性)F1	16
		转基因超细毛母羊(IGF-1 阳性)F2	8
	GPM	转基因超细毛公羊(IGF-1 阳性)原代	5
		转基因超细毛公羊(IGF-1 阳性)F1	6
		转基因超细毛公羊(IGF-1 阳性)F2	6
		转基因超细毛母羊(IGF-1 阴性)	25
转 IGF-1 基因阴性羊(GN 组) IGF-1 gene negative sheep of GMO(GN group)	GNF	转基因超细毛母羊(IGF-1 阴性)	25
	GNM	转基因超细毛公羊(IGF-1 阴性)	18
非转基因羊(NG 组) Sheep of non-GMO(NG group)	NGF	非转基因对照超细毛母羊	18
	NGM	非转基因对照超细毛公羊	11
总计 Total			113

表 2 基础饲料组成和营养水平

Table 2 Composition and nutrient levels of basic diets

项目 Item	公羊 Male	母羊 Female	育成羔羊 Lamb
原料 Ingredient			%
玉米 Corn	10.0	10.0	27.0
棉籽饼 Cotton seed meal	5.0	5.2	2.3
预混料 Premix*	3.5	3.0	3.2
骨粉 Bone meal	1.0	1.0	1.0
玉米青贮 Corn silage	26.5	26.3	15.0
番茄皮渣 Tomato pomace	5.0	5.0	5.0
苜蓿干草 Alfalfa hay	45.0	45.0	45.0**
棉籽壳 Cottonseed hull	4.0	4.5	1.5
合计 Total	100.0	100.0	100.0
营养水平 Nutrient level			
干物质 DM	88.57	88.55	88.48
粗蛋白 CP	12.35	12.34	12.77
代谢能/(MJ·kg ⁻¹ DM) ME	7.23	7.23	7.45
中性洗涤纤维 NDF	34.87	35.13	33.16
酸性洗涤纤维 ADF	17.52	17.39	16.41
钙 Ca	0.75	0.76	0.81
磷 P	0.44	0.44	0.45

*. 预混料为每千克饲料提供:维生素 A 300 IU,维生素 D₃ 420 IU,维生素 E 5 IU,生物素 0.16 mg,泛酸 4.2 mg,烟酸 3.6 mg,铜 2 mg,铁 22 mg,锰 20 mg,锌 16 mg,碘 0.4 mg,硒 0.13 mg,钴 0.13 mg.**. 育成羔羊为苜蓿草粉。营养水平中除了代谢能、钙、磷 3 种营养水平为理论值外,其余均为实测值

*. The premix provided the following per kg of diets: Vitamin A 300 IU, Vitamin D₃ 420 IU, Vitamin E 5 IU, biotin 0.16 mg, pantothenic acid 4.2 mg, nicotinic acid 3.6 mg, Cu 2 mg, Fe 22 mg, Mn 20 mg, Zn 16 mg, I 0.4 mg, Se 0.13 mg, Co 0.13 mg.

** . Alfalfa hay powder for lambs. ME, calcium and phosphorus are calculated values, the others are measured values in nutrient levels

测 DNA 样品的浓度与纯度。

1.3 16S rRNA 基因 V3+V4 区 PCR 扩增与产物纯化

将提取的粪便总 DNA 送北京百迈客生物科技有限公司,应用 Illumina HiSeq 平台对细菌 16S rRNA 基因的 V3+V4 区域(338F~806R)进行扩增^[12],引物序列为 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3' 两种引物进行 PCR 扩增^[10],同时设计真菌 ITS1 区域引物:5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3';及内部 ITS1F: 5'-AACCTGCGGAAGGATCATT, ITS1R-3': 5'-GARCCAAGAGATCCR-TTG-3'作为参比。高效和高保真酶进行 PCR 扩增,反应体系参照说明书,反应体系为 20 μ L: PCR Mixture(2 \times) 10 μ L, 上游引物和下游引物各 0.8 μ L, 模板 DNA 0.8 μ L (约 100 ng), BSA (5 mg \cdot mL⁻¹)0.4 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 9 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。每个样品 PCR 扩增做 3 个平行。

扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳, TEA Ngel Midi Purification Kit 试剂盒回收,用超微量紫外分光光度计精确定量,按物质的量比例混合后在 HiSeq 测序平台进行测序。

1.4 数据分析处理

对 Illumina 测序的结果根据 Barcode 确定对应样品,并去除 Barcode 和引物序列,得到有效数据 (Clean data)。统计 GC 含量, Q20 和 Q30 质量值, Effective 等参数对数据进行评估^[13]。将具 97% 相似度的数据聚类为用于物种分类的操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 依 OTUs 聚

类对每个 OTU 的代表序列做物种注释^[14]; 利用 QIIME 软件计算样品 Chao1 指数、Shannon 指数、谱系多样性 α 多样性值, 经过 UniFrac 算法分析样品物种群落差异 (β 多样性)^[15]。用 LEfSe 和 MetaStat 统计分析方法对分组样品的物种组成和群落结构进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

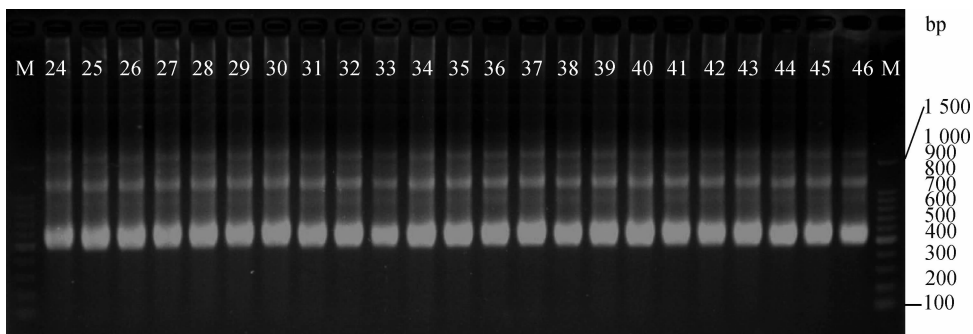
2.1 粪便样品总 DNA 质检与 PCR 扩增产物凝胶电泳检测

粪便样品总 DNA 经检测质量满足建库要求, 总量满足 3 次及以上建库要求。PCR 扩增产物凝胶电泳检测结果 (1.8% 凝胶; TaKaRa 100 bp Ladder) 显示, PCR 扩增产物全部合格^[16], 部分 PCR 扩增产物凝胶电泳结果如图 1 所示。

2.2 样品测序结果及序列深度验证

每个样品至少产生 57 973 条 Clean tags, 平均产生 72 353 条 Clean tags。其中 GP 组 Clean Tags 为 72 591, GN 组为 71 973, NG 组 72 587。平均测序读长 414~418 kb, 样品的序列信息如表 3 所示。3 组样品有效序列数比率均达 90.6% 以上, 测序质量值 Q20 bases rate (%), Q30 bases rate (%) 分别达 97% 和 94% 以上, 测序结果能够反映微生物整体的真实信息。

所有样本均一化处理后 3 组样本的 Venn 图显示 (图 2), 3 个组共有 OTUs 为 2 455 个, GP、GN 和 NG 组独有的 OTUs 分别有 5、1、8 个。3 组共享 OTUs 数占全部 OTUs 总数的 98.55% (2 455/2 491), 各组特有的 OTUs 数仅占 OTUs 总数的 0.562% (14/2 491)。各组间粪样中 OTUs 组成相



M. DNA 相对分子质量标准; 24~46. 部分样品 PCR 扩增结果

M. DNA marker DL-1500; 24-46. The PCR amplification results of partial samples

图 1 部分 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of partial PCR amplification products

似度极高,说明超细毛羊肠道微生态系统相对稳定,受转基因影响的个体差异很微弱。肠道菌群多样性

由高到底顺序为 NG 组>GP 组>GN 组,但差异不显著。

表 3 样品测序有效数据统计

Table 3 Statistics of effective data for sequencing of samples

样本分组 Group	测序 序列数 PE_read	原始 序列数 Raw tag	高质量 序列标签 Clean tag	有效 序列数 Effective tag	平均测序 读长/bp Average length	GC 含量/% GC	Q20/%	Q30/%	有效序列 数比率/% Effective
GP($n=41$)	79 222	76 831	72 591	71 846	415	52.55	97.10	94.55	90.689 5
GN($n=43$)	78 537	76 169	71 973	71 160	415	52.67	97.12	94.58	90.607 0
NG($n=29$)	79 059	76 757	72 587	71 739	415	52.60	97.13	94.609	90.738 6
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	0.842 1	0.764 7	0.797 3	0.865 7	—	—	0.935 2	0.961 6	0.926 8

Q30. 碱基质量值大于 30(测序错配率小于 0.1%); Q20. 碱基质量值大于 20(测序错配率小于 1%)

Q30 means base mass value is greater than 30(sequencing mismatch rate is less than 0.1%); Q20 means base mass value is greater than 20(sequencing mismatch rate is less than 1%)

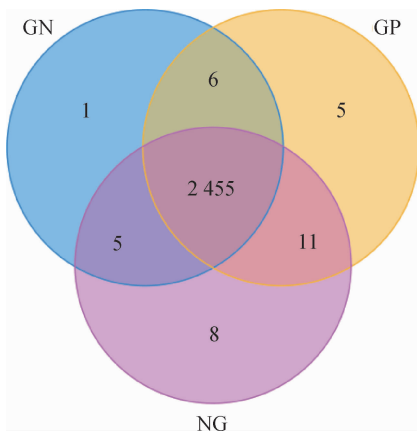


图 2 样品中细菌群落共享和独有 OTUs 的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram representation of shared and exclusive OTUs from bacterial community in different samples

表 4 各组样品粪便菌群的 OTU 数量及 Alpha 多样性

Table 4 OTU number and Alpha diversity of fecal microfloraina groups

组别 Group	GP	GN	NG	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
操作分类单元 OTU	2 477	2 467	2 479	0.783 2
群落丰富度指数 ACE	1 799.075±28.751	1 808.345±29.124	1 827.934±29.286	0.751 3
群落共有水平指数 Chao1	1 820.312±34.743	1 829.277±36.132	1 850.522±34.574	0.801 7
群落多样性指数 Shannon	5.778±0.203	5.77519±0.2381	5.7844±0.2485	0.680 5
群落多样性指数 Simpson	0.009±0.004	0.009±0.004	0.009±0.004	0.496 8
覆盖率 Coverage	0.995±0.004	0.995±0.004	0.995±0.004	0.582 7

Shannon 多样性指数稀释曲线(图 3)显示,当样本测序数为 5 000 时曲线趋向平缓,本试验样本测序数均在 78 000 以上,Shannon 指数曲线已达到平台期^[19]。OTUs 种类不再随测序量增加而增长,

2.3 各组样品粪便菌群 α 多样性和组间差异分析

由表 4 可知,各组 OTUs 均达 2 445 个以上,表明转基因阳性组(GP 组)、阴性组(GN 组)及非转基因组(NG 组)各组间肠道菌群组成高度相似。OTUs、ACE 指数和 Chao1 指数显示,3 组间群落的丰富度无显著差异($P > 0.75$)。Shannon 及 Simpson 指数显示,3 组间样品群落中物种丰富度和物种均匀度也无显著差异。覆盖率均在 99% 以上,说明 3 组样本的测序都达到了很高的测序覆盖率^[17]。分析显示,GP、GN 和 NG 组间在肠道菌群结构、菌群丰富度、菌群多样性指数均无显著差异^[18]。

表明样品序列基本覆盖样本中绝大部分微生物种类。

2.4 各组粪便菌群样本 β 多样性分析

基于 UniFrac 的加权主坐标分析其第 1、第 2

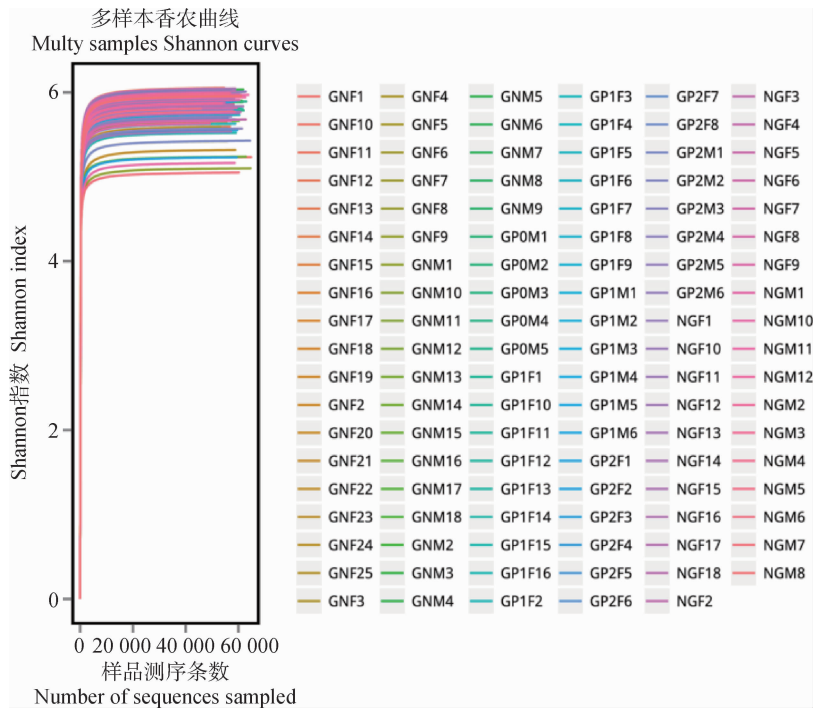


图3 Shannon多样性指数稀释曲线

Fig. 3 Rarefaction curves of Shannon index

和第3主成分的贡献率分别为20.54%、12.52%和8.73%(图4),转基因阳性/阴性组和非转基因组总共113个样本呈现不同程度的混杂,PC1-PC2、PC1-PC3和PC2-PC3坐标系均无法完全分开,包括母羊/公羊3组的样本都具有不同程度的重叠,说明转基因超细毛羊粪样与非转基因超细毛羊粪样菌群组成较为相似。

如图4A所示,GNF、GPF和NGF组分布趋势比较接近,GNM、GPM和NGM组分布趋势比较接近;如图4B所示,GNF、GPF和GPM组分布趋势比较接近,GNM、NGM和NGF组分布趋势比较接近;如图4C所示,GNF、GNM和GPM组分布趋势比较接近,GPM、NGF和NGM组分布趋势比较接近。

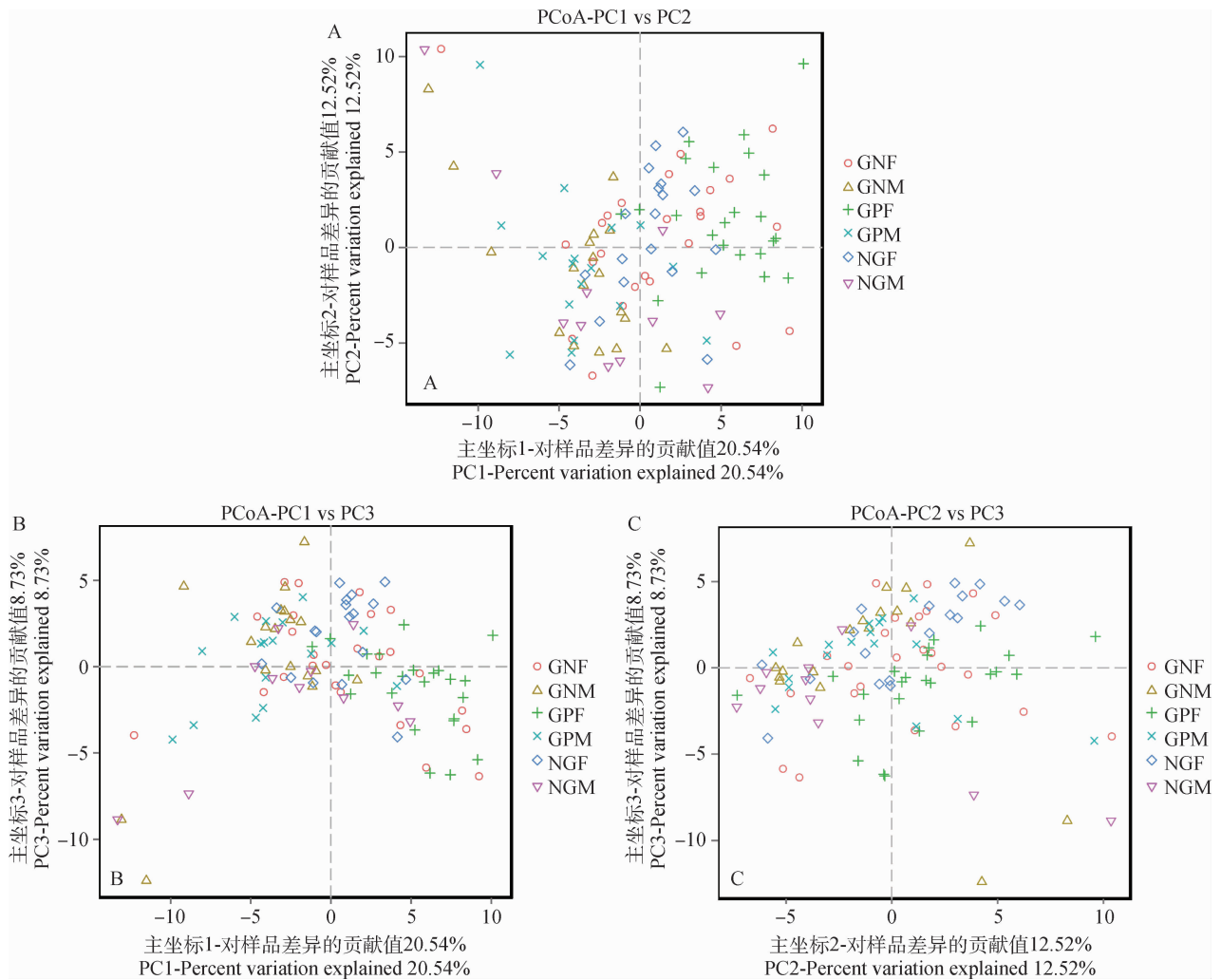
由图5大致可知各组组内样本相似性的中位数、离散程度、最大值、最小值、异常值等,利用双尾Student's t-test统计方法检验两两组间物种 β 多样性差异显示^[20],3组间 β 多样性组间均无显著差异。

2.5 各组肠道宏基因组菌群结构分析

2.5.1 物种注释分析 对OTU进行物种注释得到肠道微生物在门纲目科属种6个层面上的组成信息^[21]。在门分类水平上,GP组17个门,其中GPF组16个门,GPM组16个门;GN组17个门,其中GNF组16个门,GNM组17个门;NG组17个门,

其中NGF组和NGM组均17个门。在纲分类水平上,GP组32个纲,其中GPF组31个纲,GPM组31个纲;GN组32个纲,GNM组32个纲;NG组32个纲,其中NGF组和NGM均32个纲。在目分类水平上,GP组56个目,其中GPF组,GPM组53个目;GN组56个目,其中GNF组56个目,GNM组54个目;NG组57个目,其中NGF组57个目,NGM组54个目。在科水平上,GP组94个科,其中GPF组94个科,GPM组90个科;GN组94个科,其中GNF组94个科,GNM组91个科;NG组95个科,其中NGF组95个科,NGM组90个科。在属水平上,GP组226个属,其中GPF组226个属,GPM组221个属;GN组228个属,GNF组228个属;NG组225个属,NGF组226个属。在种水平上,GP组184个种,GPF组184个种;GN组183个种,GNF组183个种;NG组184个种,其中NGF组184个种,NGM组180个种。

物种注释分析显示,大部分OTUs都可以注释到属水平上。在门纲目科属种6个层面上注释到各组母羊肠道菌群的丰富性呈现高于公羊肠道菌群的丰富性。此外GP、GN和NG组内还有无法确定分类地位的细菌分别占丰度总量的0.185%、0.174%和0.217%。



GNF. 转基因阴性母羊; GNM. 转基因阴性公羊; GPF. 转基因阳性母羊; GPM. 转基因阳性公羊; NGF. 非转基因母羊; NGM. 非转基因公羊

GNF. Transgenic negative ewe; GNM. Transgenic negative ram; GPF. Transgenic positive ewe; GPM. Transgenic positive ram; NGF. Non-transgenic ewe; NGM. Non-transgenic ram

图 4 基于 OTU 水平的肠道微生物 PCoA(加权主坐标)分析

Fig. 4 UniFrac weighted principal coordinate analysis (PCoA) of the intestinal microbes at OTU level

2.5.2 肠道菌群的门水平分布 在门水平上, GP、GN 和 NG 组均以厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)为主,其次是螺旋菌门(Spirochaetace)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、软壁菌门(Tenericutes)、纤维杆菌门(Fibrabacteres)、变形菌门(Proteobacteria),此7个门的相对丰度占丰度总量的98.8%以上,其中厚壁菌门与拟杆菌门相对丰度就占到86.568%~88.506%;GP、GN 和 NG 组内厚壁菌门(Firmicutes)与拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度比值^[22]分别为 1.56 ± 0.101 、 1.571 ± 0.121 和 1.616 ± 0.122 ,3组间无显著差异($P > 0.05$)。按照细菌相对丰度排序前10个

菌门的累积相对丰度占门水平累积相对总丰度的99%以上。门分类水平下的组间主要物种丰度统计见表5和图6。

2.5.3 肠道菌群的属水平分布 在属水平上, GP、GN 和 NG 组均以理研菌科 RC9 粪肠属(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、瘤球菌科 UCG-005 属(*Ruminococcaceae_UCG-005*)、瘤球菌科 UCG-010 属(*Ruminococcaceae_UCG-010*)、Christensenellaceae_R-7_group、拟杆菌属(*Bacteroides*)、毛螺菌科 NK4A136 属(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、密螺旋体属2(*Treponema_2*)、[真细菌]粪甾烷类属(*Eubacterium*)]

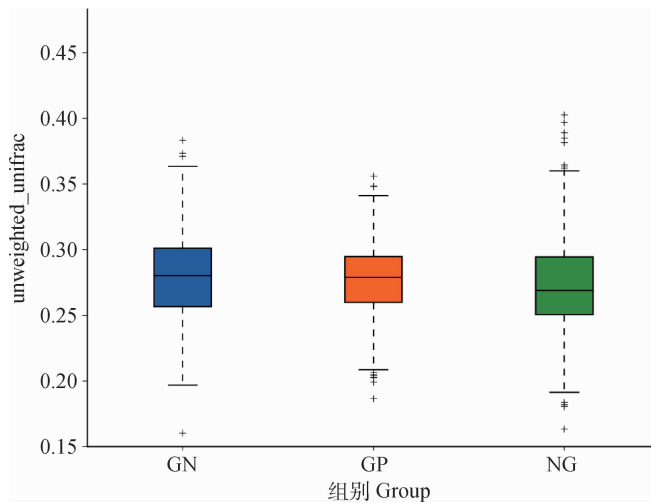


图 5 组间 β 多样性差异分析的箱形图

Fig. 5 Box diagram of difference analysis of β diversity among groups

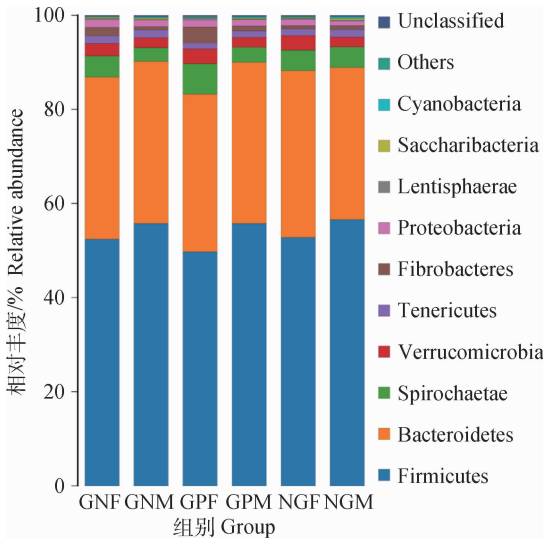


图 6 GPF、GPM、GNF、GNM、NGF 及 NGM 组细菌门分类水平的比较

Fig. 6 Comparison of bacteria classification at phylum level for GPF, GPM, GNF, GNM, NGF and NGM groups

coprostanoligenes_group)、瘤胃球菌属 1 (*Ruminococcus_1*)、*Alistipes*、未培养瘤胃细菌属 (*uncultured_rumen_bacterium*)、瘤球菌科 UCG-013 属 (*Ruminococcaceae_UCG-013*) 前 12 位菌属为主(相对丰度占到 54.334%~55.636%);其次是拟杆菌 BS11 肠属 (*uncultured_bacterium_f_Bacteroidales_BS11_gut_group*)、未培养瘤球菌属 (*uncultured_bacterium_f_Ruminococcaceae*)、瘤球菌科 UCG-014 属 (*Ruminococcaceae_UCG-014*)、未培养毛螺菌属 (*uncultured_bacterium_f*

Lachnospiraceae)、普雷沃氏菌 UCG003 属 (*Prevotellaceae_UCG-003*)、相弧细菌 (*Phascolarctobacterium*)、腓尼基克拉菌 (*Phocaicola*)、普雷沃氏菌 UCG-004 属 (*Prevotellaceae_UCG-004*) 等,相对丰度 >1% 的 20 个菌属的相对丰度累积占相对总丰度的 75.0% 以上。属分类水平下的组间主要物种丰度统计见表 6 和图 7。

2.6 各组肠道菌群的相关微生物标志物分析

LEfSe 分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 可在不同组间寻找具有统计学差异的生物标记物。本研究将 LDA (linear discriminant analysis) 判别分析 Effect size 阈值设定为 4, $LDA \geq 4$ 的物种其相对丰度为极显著高丰度的优势物种^[23]。由图 8 可知, GP 组的优势菌种主要为 GPF 组的 10 个生物标记物 (biomarker) (LDA 值 > 4), 分别为螺旋体门 (p_Spirochaetae)、螺旋体纲 (c_Spirochaetes)、螺旋体目 (o_Spirochaetales)、螺旋体科 (f_Spirochaetaceae)、密螺旋体属 2 (*g_Terponema_2*)、纤维杆菌属 (*g_Fibrobacter*)、纤维杆菌目 (o_Fibrobactales)、纤维杆菌门 (p_Fibrobacteres)、纤维杆菌纲 (c_Fibrobacteria)、纤维杆菌科 (f_Fibrobacteraceae); GPM 组有 5 个生物标记物的 LDA 值 ≥ 4 , 分别为梭菌纲 (c_Clostridia)、梭菌目 (o_Clostridiales)、瘤胃球菌科 (f_Ruminococcaceae)、瘤胃球菌 UCG-005 属 (*g_Ruminococcaceae_UCG-005*)、未培养瘤胃球菌 UCG-005 种 (*uncultured_bacterium_g_Ruminococcaceae_UCG-005*)。NG 组的

表 5 转基因超细毛羊与非转基因羊门水平菌群分类及分类菌名称

Table 5 Flora classification and names of microflora at the phylum level of superfine transgenic sheep and non-transgenic sheep

门水平 Phylum	组别 Group	GP 组丰度/% The relative abundance in GP	组别 Group	GN 组丰度/% The relative abundance in GN	组别 Group	NG 组丰度/% The relative abundance in NG
厚壁菌门 Firmicutes	GPF	49.702 9±3.801 2	GNF	52.447 1±3.723 9	NGF	52.772 5±3.804 6
	GPM	55.769 3±3.189 7	GNM	55.713 5±3.159 8	NGM	56.496 7±2.585 6 ^A
	平均	52.736 1±3.494 6		54.080 3±3.441 9		54.635 1±3.215 8
拟杆菌门 Bacteroidetes	GPF	33.471 9±2.760 5	GNF	34.384 6±3.208 9	NGF	35.410 2±3.393 5
	GPM	34.191 7±2.315 9	GNM	34.466 7±3.021 8	NGM	32.227 3±2.839 4
	平均	33.831 8±2.538 2		34.425 7±3.115 4		33.818 8±3.116 5
螺旋体门 Spirochaetae	GPF	6.547 3±2.800 4	GNF	4.481 0±2.058 0	NGF	4.392 1±1.265 2
	GPM	3.226 1±1.981 5	GNM	2.886 5±1.412 3	NGM	4.495 9±2.599 9
	平均	4.886 7±2.391 0		3.683 8±1.735 2		4.444 0±1.932 6
疣微菌门 Verrucomicrobia	GPF	3.137 4±1.345 5	GNF	2.659 2±0.797 0	NGF	3.019 8±0.798 6
	GPM	2.089 7±0.830 1	GNM	2.178 0±0.936 8	NGM	2.169 1±1.051 6
	平均	2.613 6±1.087 8		2.418 6±0.866 9		2.594 5±0.925 1
软壁菌门 Tenericutes	GPF	1.265 6±0.478 8	GNF	1.683 4±0.585 3	NGF	1.461 0±0.519 2
	GPM	1.393 8±0.401 8	GNM	1.635 9±0.572 8	NGM	1.571 4±0.508 5
	平均	1.329 7±0.440 3		1.659 7±0.579 1		1.516 2±0.513 9
纤维杆菌门 Fibrobacteres	GPF	3.374 5±2.325 6	GNF	1.817 4±1.820 4	NGF	0.712 4±0.378 5 ^A
	GPM	1.110 1±0.934 2	GNM	0.704 2±0.499 4	NGM	0.818 5±0.749 8 ^A
	平均	2.242 3±1.629 9		1.260 8±1.159 9		0.765 5±0.564 2
变形菌门 Proteobacteria	GPF	1.477 0±0.602 2	GNF	1.588 1±0.915 3	NGF	1.316 8±0.511 4
	GPM	1.236 2±1.077 2	GNM	1.385 0±0.991 3	NGM	0.965 4±0.281 5
	平均	1.356 6±0.839 7		1.486 6±0.953 3		1.141 1±0.396 5
黏胶球形菌门 Lentisphaerae	GPF	0.472 0±0.309 0	GNF	0.323 0±0.224 4	NGF	0.287 2±0.230 1
	GPM	0.143 2±0.091 0	GNM	0.153 7±0.095 4	NGM	0.260 7±0.195 2
	平均	0.307 6±0.200 0		0.238 4±0.159 9		0.274 0±0.212 7
糖菌门 Saccharibacteria	GPF	0.092 6±0.090 4	GNF	0.180 2±0.157 4	NGF	0.147 4±0.094 4
	GPM	0.247 1±0.146 8	GNM	0.239 1±0.108 7	NGM	0.311 6±0.269 2
	平均	0.169 9±0.118 6		0.209 7±0.133 1		0.229 5±0.181 8
蓝菌门 Cyanobacteria	GPF	0.163 4±0.128 4	GNF	0.144 3±0.100 5 ^A	NGF	0.153 2±0.143 0 ^A
	GPM	0.181 1±0.105 6	GNM	0.206 6±0.158 0 ^A	NGM	0.278 3±0.327 9 ^A
	平均	0.172 3±0.117 0		0.175 5±0.129 3		0.215 8±0.235 5
累加总和 Accumulative total	GPF	99.704 6	GNF	99.708 3	NGF	99.672 6
	GPM	99.588 3	GNM	99.569 2	NGM	99.594 9
	平均	99.646 6		99.639 1		99.634 5

优势菌种主要在 NGF 组, 只有 1 个生物标记物的 LDA 值 ≥ 4 , 即为拟杆菌 BS11 科(f_Bacteroidales_

BS11_gut_group); NGM 组只有 1 个生物标记物的 LDA 值 > 4.5 , 即为厚壁菌门(p_Firmicutes)。

表 6 超细毛转基因羊与非转基因羊属水平菌群分类及分类菌名称

Table 6 Flora classification and names of microflora at the genus level of superfine transgenic sheep and non-transgenic sheep

属水平 Genus level	组别 Group	GP 组丰度/% The relative abundance in GP	组别 Group	GN 组丰度/% The relative abundance in GN	组别 Group	NG 组丰度/% The relative abundance in NG
理研菌科 RC9 粪肠属 <i>Rikenellaceae_</i> <i>RC9_gut_group</i>	GPF	10.142 8±2.134 0	GNF	10.282 1±2.694 6	NGF	9.733 7±2.211 8
	GPM	9.652 4±2.180 4	GNM	10.652 7±4.121 0	NGM	10.895 1±5.975 1
	平均	9.897 6±2.157 2		10.467 4±3.407 8		10.314 4±4.093 5
瘤球菌科 UCG-005 属 <i>Ruminococcaceae_</i> <i>UCG-005</i>	GPF	7.113 2±1.062 1	GNF	8.133 5±1.325 0	NGF	7.892 7±0.991 2
	GPM	9.173 5±1.507 6	GNM	8.926 0±1.935 8	NGM	9.129 9±2.052 6
	平均	8.143 4±1.284 9		8.529 8±1.630 4		8.511 3±1.521 9
瘤球菌科 UCG-010 属 <i>Ruminococcaceae_</i> <i>UCG-010</i>	GPF	6.613 1±1.479 6	GNF	5.751 7±1.438 2	NGF	5.506 6±0.901 0
	GPM	5.867 8±1.188 5	GNM	5.430 2±1.423 8	NGM	4.679 8±1.790 8
	平均	6.240 5±1.334 1		5.590 9±1.431 0		5.093 2±1.345 9
<i>Christensenellaceae_</i> <i>R-7_group</i>	GPF	4.151 6±0.921 8	GNF	4.538 9±1.155 8	NGF	4.928 4±0.840 1
	GPM	5.488 1±1.083 5	GNM	5.382 1±1.570 5	NGM	6.267 3±1.742 4
	平均	4.819 9±1.002 7		4.960 5±1.363 2		5.597 9±1.291 3
拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	GPF	3.698 5±1.065 0	GNF	4.244 2±1.052 5	NGF	3.900 0±0.895 7
	GPM	5.386 3±1.489 0	GNM	5.185 1±1.021 6	NGM	5.251 9±1.952 8
	平均	4.542 4±1.277 0		4.714 7±1.037 1		4.575 9±1.424 3
毛螺菌科 NK4A136 属 <i>Lachnospiraceae_</i> <i>NK4A136_group</i>	GPF	4.230 9±1.166 7	GNF	4.242 8±1.198 0	NGF	4.486 4±1.411 1
	GPM	3.880 8±1.214 7	GNM	4.255 1±1.617 8	NGM	4.060 5±0.915 4
	平均	4.055 9±1.190 7		4.248 9±1.407 9		4.273 5±1.163 3
密螺旋体属 2 <i>Treponema_2</i>	GPF	6.342 0±2.751 9	GNF	4.334 3±2.084 1	NGF	4.249 5±1.228 6
	GPM	3.156 4±1.957 0	GNM	2.834 8±1.403 7	NGM	4.448 3±2.600 0
	平均	4.749 2±2.354 5		3.584 6±1.743 9		4.348 9±1.934 3
[真细菌]粪甾烷类属 [<i>Eubacterium_</i> <i>coprostanoligenes_group</i>	GPF	2.229 5±0.667 7	GNF	2.434 1±0.639 8	NGF	2.690 9±0.760 6
	GPM	3.106 3±0.705 0	GNM	2.896 7±0.829 5	NGM	2.946 3±1.122 4
	平均	2.667 9±0.686 4		2.665 4±0.734 7		2.818 6±0.941 5
瘤胃球菌属 1 <i>Ruminococcus_1</i>	GPF	2.387 0±1.072 3	GNF	2.782 7±1.243 9	NGF	2.855 5±1.165 1
	GPM	2.513 9±1.173 0	GNM	2.434 1±1.089 0	NGM	2.492 3±1.287 1
	平均	2.450 5±1.122 7		2.608 4±1.166 5		2.673 9±1.226 1
<i>Alistipes</i>	GPF	2.782 9±0.882 4	GNF	2.571 6±0.700 6	NGF	2.831 3±0.863 7
	GPM	2.567 7±0.603 9	GNM	2.515 3±0.615 3	NGM	2.137 9±0.659 5
	平均	2.675 3±0.743 2		2.543 5±0.657 9		2.484 6±0.761 6
未培养瘤胃细菌 uncultured_rumen_ bacterium	GPF	3.853 4±2.223 7	GNF	2.591 2±1.334 6	NGF	3.726 0±2.193 6
	GPM	1.296 8±0.577 6	GNM	1.051 5±0.530 9	NGM	1.155 1±0.571 8
	平均	2.575 3±1.400 7		1.821 4±0.932 8		2.440 6±1.382 7
瘤球菌科 UCG-013 属 <i>Ruminococcaceae_</i> <i>UCG-013</i>	GPF	2.082 2±0.720 9	GNF	2.411 3±0.849 1	NGF	2.544 7±0.795 7
	GPM	2.654 0±1.051 2	GNM	2.785 8±0.994 9	NGM	2.461 4±1.066 5
	平均	2.368 1±0.886 1		2.598 6±0.922 0		2.503 1±0.931 1
拟杆菌 BS11 肠属 uncultured_bacterium_f_ <i>Bacteroidales_BS11_</i> <i>gut_group</i>	GPF	1.851 1±0.605 9	GNF	2.354 7±3.155 6	NGF	2.340 8±1.403 9
	GPM	2.147 5±1.408 5	GNM	2.155 2±1.784 1	NGM	1.912 8±1.288 0
	平均	1.999 3±1.007 2		2.254 9±2.469 8		2.126 8±1.345 9

(转下页 Carried forward)

(续表 6 Continued)

属水平 Genus level	组别 Group	GP 组丰度/% The relative abundance in GP	组别 Group	GN 组丰度/% The relative abundance in GN	组别 Group	NG 组丰度/% The relative abundance in NG
未培养瘤球菌属 <i>uncultured_bacterium_f</i>	GPF	1.970 3±0.368 0	GNF	2.321 7±0.447 2	NGF	2.455 9±0.527 7
<i>Ruminococcaceae</i>	GPM	2.705 6±0.447 5	GNM	2.604 4±0.353 5	NGM	2.380 9±0.507 4
瘤球菌科 UCG-014 属 <i>Ruminococcaceae_UCG-014</i>	平均	2.337 9±0.407 8		2.463 1±0.400 4		2.418 4±0.517 6
未培养毛螺菌属 <i>uncultured_bacterium_f</i>	GPF	1.787 2±0.537 5	GNF	2.234 7±0.772 4	NGF	2.014 7±0.767 7
<i>Lachnospiraceae</i>	GPM	1.959 0±0.757 9	GNM	2.323 3±1.061 1	NGM	2.264 7±0.620 1
普雷沃氏菌 UCG003 属 <i>Prevotellaceae_UCG-003</i>	平均	1.873 1±0.647 7		2.279 0±0.916 8		2.139 7±0.693 9
未培养毛螺菌属 <i>uncultured_bacterium_f</i>	GPF	2.120 6±0.532 8	GNF	2.219 1±0.593 4	NGF	1.961 2±0.363 4
<i>Lachnospiraceae</i>	GPM	2.254 3±0.560 5	GNM	2.178 5±0.514 8	NGM	2.225 8±0.607 5
普雷沃氏菌 UCG003 属 <i>Prevotellaceae_UCG-003</i>	平均	2.187 5±0.546 7		2.198 8±0.554 1		2.093 5±0.485 5
相弧细菌 <i>Phascolarctobacterium</i>	GPF	1.640 2±0.395 0	GNF	1.530 6±0.395 6	NGF	1.665 6±0.376 1
相弧细菌 <i>Phascolarctobacterium</i>	GPM	1.293 2±0.399 4	GNM	1.265 8±0.475 4	NGM	1.068 4±0.205 0
相弧细菌 <i>Phascolarctobacterium</i>	平均	1.466 7±0.397 2		1.398 2±0.435 5		1.367 0±0.290 6
腓尼基克拉菌 <i>Phocaeicola</i>	GPF	1.630 2±0.804 7	GNF	1.575 9±0.632 3	NGF	1.466 5±0.496 4
腓尼基克拉菌 <i>Phocaeicola</i>	GPM	1.374 2±0.487 9	GNM	1.545 9±0.893 5	NGM	1.017 6±0.535 8
腓尼基克拉菌 <i>Phocaeicola</i>	平均	1.502 2±0.646 3		1.560 9±0.762 9		1.242 1±0.516 1
普雷沃氏菌 UCG-004 属 <i>Prevotellaceae_UCG-004</i>	GPF	1.093 5±0.448 3	GNF	1.402 9±0.550 4	NGF	1.367 3±0.376 2
普雷沃氏菌 UCG-004 属 <i>Prevotellaceae_UCG-004</i>	GPM	1.535 4±0.349 7	GNM	1.552 4±0.582 3	NGM	1.216 6±0.347 3
普雷沃氏菌 UCG-004 属 <i>Prevotellaceae_UCG-004</i>	平均	1.314 5±0.399 0		1.477 7±0.566 4		1.291 9±0.361 8
累加总和 Accumulative total	GPF	75.203 7	GNF	76.288 5	NGF	77.558 6
累加总和 Accumulative total	GPM	75.635 2	GNM	76.040 4	NGM	75.534 5
累加总和 Accumulative total	平均	75.419 5		76.144 5		76.546 6

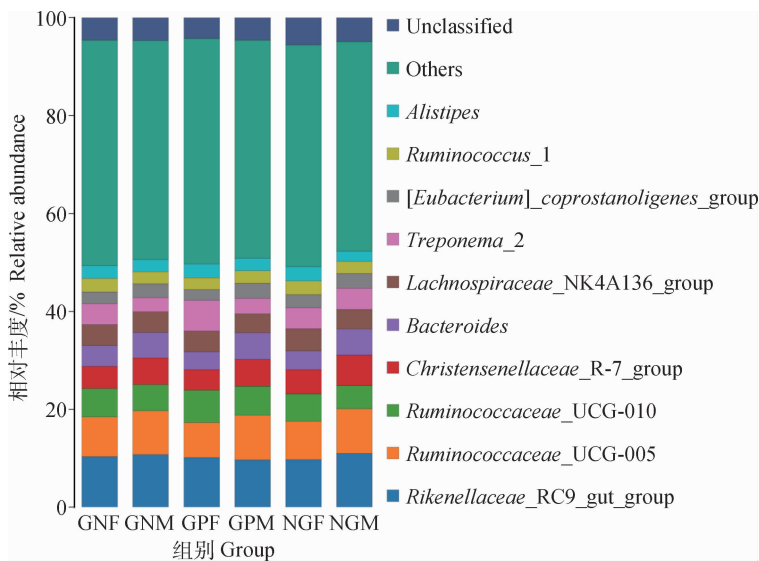


图 7 GPF、GPM、GNF、GNM、NGF 及 NGM 组细菌属分类水平的比较

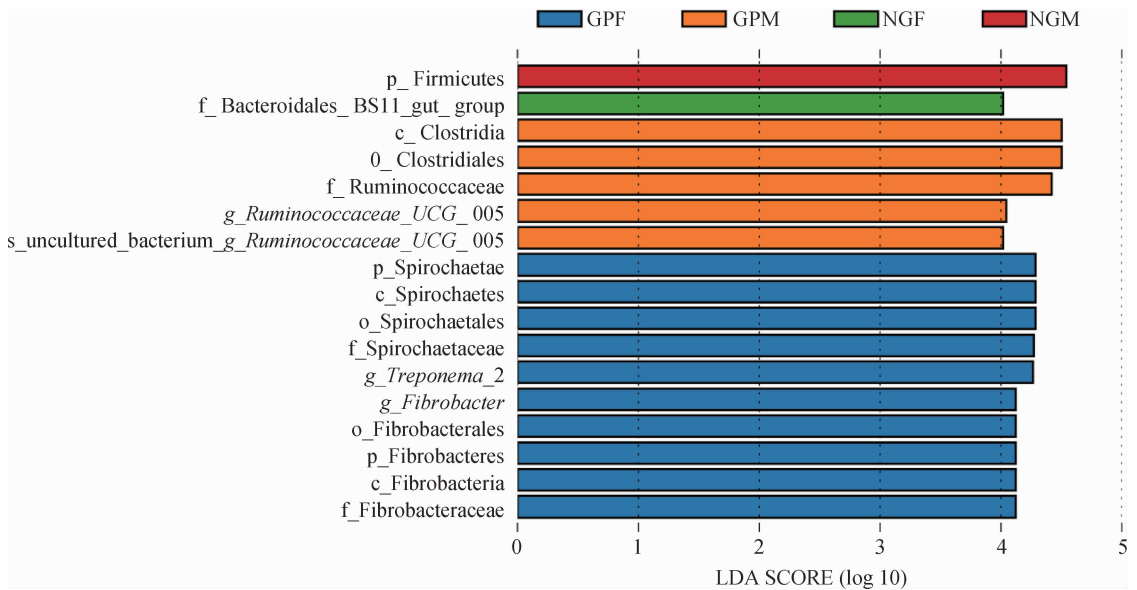
Fig. 7 Comparison of bacteria classification at genus level for GPF, GPM, GNF, GNM, NGF and NGM groups

GP 和 NG 组相关优势菌种的进化分支图中(图 9),GPF 组中螺旋体目(Spirochaetales)、螺旋体科(Spirochaetaceae)、密螺旋体 2 属(*Terponema* 2)和纤维杆菌目(Fibrobacterales)、纤维杆菌科(Fibrobacteraceae)及纤维杆菌属(*Fibrobacter*)显著高于其他组($P < 0.05$);GPM 组中梭菌目(Clostridiales)、瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、瘤胃球菌属 UCG-005 种(*Ruminococcaceae* _ UCG-005)、未培养瘤胃球菌 UCG-005 属(*uncultured bacterium* _g_ *Ruminococcaceae* UCG-005)显著高于其他组($P < 0.05$);NG 组中厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌科 BS11(*Bacteroidales* *Bsll* gut group)显著高于 GP 组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 IGF-1 转基因对超细毛羊肠道细菌区系的影响

本研究在相同环境和饲养管理模式下探究转入外源 IGF-1 基因的转基因阳性/阴性超细毛羊与非转基因羊肠道微生物的群落结构差异。已有研究表明,肠道微生物群落结构主要由宿主遗传、性别、年龄及外界环境因素等决定^[24-26]。本研究结果表明,3 组羊肠道微生物的群落结构整体相近,并均表现为母羊肠道菌群丰富性高于公羊肠道菌群。转 IGF-1 基因对超细毛羊肠道微生物细菌群落结构组成影响微弱。



图中展示了 LDA 值(LDA score)大于设定值(默认设置为 4.0)的物种,柱状图的长度代表差异物种的影响大小。The figure shows the species whose LDA score is greater than the set value (default setting is 4.0), the length of the bar chart represent the impact of different species

图 8 LDA 值分布柱状图

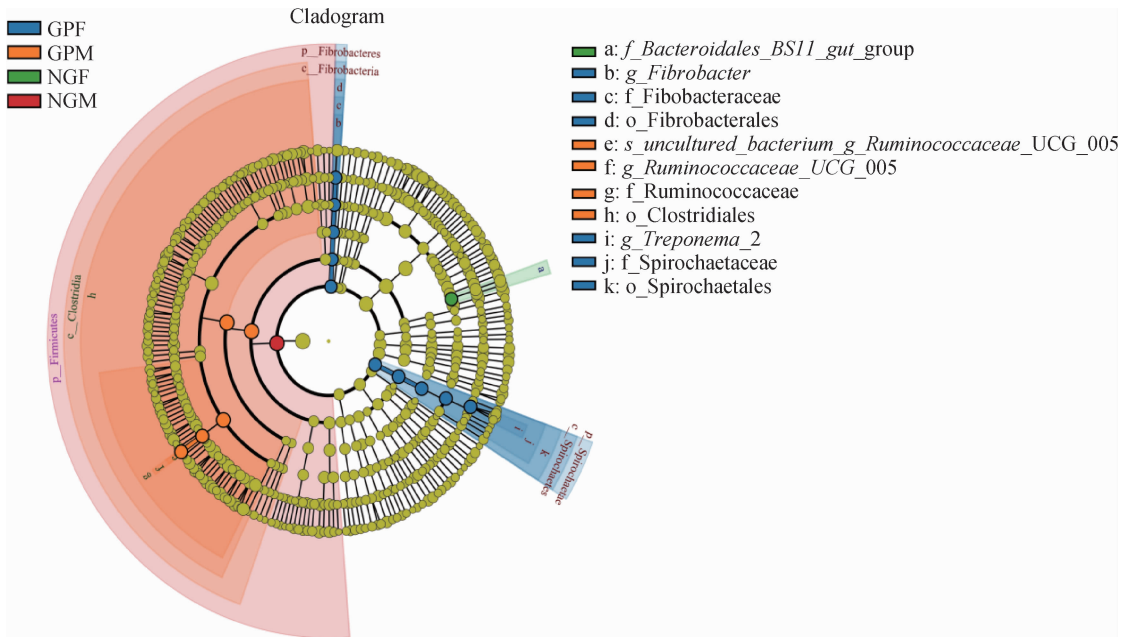
Fig. 8 Histogram of LDA value distribution

3.2 3 组样本肠道菌群种群多样性分析

Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 及 Chao1 指数对比提示,3 组菌群多样性无明显差异;α 多样性分析表明,3 组间的肠道菌群结构和多样性无明显差异($P > 0.05$),3 组样本肠道菌群的丰富度 NG 组 > GN 组 > GP 组,但无显著差异($P > 0.05$)。两两组间物种 β 多样性差异分析显示,3 组间 β 多样性均无显著差异。无量纲多维标定法(NMDS)分析结果显示,3 组的样本都具有不同程度的重叠,说明 GP、GN 和 NG 组的微生物组成比较相似。

3.3 3 组样本肠道菌群在门水平上的构成

绝大部分 reads 分属 17 个门(表 5)。厚壁菌门(Firmicutes)在 3 组中丰度均为最高,与王悦^[27]的试验结果相似。GP、GN 和 NG 组分别为 52.736%,54.080%,54.635%,在 113 份样品中平均为 53.735%。拟杆菌门(Bacteroidetes)在 3 组中丰度次之^[27],分别占到 33.832%,34.426%,33.819%(表 5),在 113 份样品中所占比例为 34.054%;门类水平上在细菌相对丰度 > 0.1% 的前 10 个菌门的累积相对丰度占门水平累积相对总丰



进化分支图由内至外不同的圆环代表了由门至种的分类级别;在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类,小圆圈直径大小与相对丰度大小成正比;将无显著差异的物种统一着色为黄色

The different circles from inside to outside represent the classification level from phylum to species; Each small circle at different classification levels represents a classification at that level; The diameter of the small circle is proportional to the relative abundance; Species without significant difference were uniformly colored yellow

图9 GP和NG组肠道菌群LefSe分析进化分枝图

Fig.9 Evolutionary branch diagram of LefSe analysis of intestinal microbial groups in GP and NG groups

度的99%以上。但GNF组、GPF组未检出SR1-[Absconditabacteria]门,GPM组未检出Chlorobi(绿菌门),只有16个门,而GNM组、NGF组和NGM组具有17个门。

3.4 3组样本肠道菌群在属水平上的构成

在属水平上共获得228个属,GP组226个属,其中GPF组226个属,GPM组221个属;GN组228个属,其中GNF组228个属;NG组225个属,其中NGF组226个属。GP、GN和NG组3组间无显著差异($P>0.05$);按照细菌相对丰度排序前33个属的累积相对丰度占累积相对总丰度的79%以上(表6)。

3.5 3组样本肠道菌群的相关微生物标志物

GP组(LDA值 >4)的生物标记物有15个。其中GPF组有10个,分别为源于螺旋体门、螺旋体纲、螺旋体目、螺旋体科及密螺旋体属2和源于纤维杆菌门、纤维杆菌纲、纤维杆菌目、纤维杆菌科、纤维杆菌属;GPM组5个生物标记物,分别为梭菌纲、梭菌目、瘤胃球菌科、瘤胃球菌UCG-005属、未培养瘤胃球菌UCG-005种。研究表明,反刍动物消化道中

纤维杆菌门、纲、目、科、属到种的主要作用就是分解纤维素,而螺旋体门、纲、目、科、属则通常是与纤维素降解细菌互作参与降解消化秸秆纤维素的有效降解菌^[28],尤其是密螺旋体2属较为多见^[29]。在粗饲料为主的瘤胃环境中,纤维杆菌属、密螺旋体属、瘤胃球菌属是参与纤维降解代谢的高丰度主导细菌^[30]。

NG组的优势菌种主要为:NGF组只有1个生物标记物的LDA值 ≥ 4 ,即为拟杆菌BS11科;NGM组只有1个生物标记物的LDA值 >4.5 ,即为厚壁菌门。厚壁菌门广泛存在于哺乳动物肠道内^[31],尤其通常是在草食动物粪便中为优势菌门^[32]。它与脂肪、蛋白质消化密切相关^[33]。拟杆菌门是反刍动物肠道内的主要菌群,是饲粮多糖类的重要降解菌^[34]。但拟杆菌被归属于中性菌,也称为条件致病菌^[35]。当其正常的微生态平衡被打破时可引发内源性感染^[36]。

由进化分枝图可看出,NGM组的生物标记物是整个厚壁菌门(包括4个纲、7个目、21个科、105个属及119个菌种),GPM组的生物标记物则

是在厚壁菌门范围内的梭菌纲(包括 84 个属、99 个菌种)和瘤胃球菌科(包括 30 个属、36 个菌种),尤其是未培养瘤胃球菌 UCG-005 种呈现显著性差异物种。NGF 组的生物标记物是拟杆菌 BS11 科,为显著性差异物种;GPF 组的生物标记物分别为纤维杆菌门、纲、目、科、属和螺旋体门、纲、目、科、属及 3 个菌种,呈现显著性差异物种^[32]。总之,本试验发现的上述呈极显著高丰度的优势菌种都是反刍动物肠道内常见的优势菌群^[37-38]。

3.6 3 组样本肠道菌群的共享菌分析

超细毛羊在整体遗传背景、季节、饲养管理环境及饲料都一致的情况下,对转基因羊与非转基因羊肠道共享菌的分析可以说明转 *IGF-1* 基因对其肠道菌群结构分布的影响^[39]。对 113 个粪样品的门水平共享菌分析显示,所有检出的 17 个门中,有 16 个门为共享菌。其中,GPM 组未检出绿菌门(Chlorobi),GNF 和 GPF 组未检出 SR1_[Absconditabacteria]门。前者检出相对丰度为 0.000 1%~0.002 8%,后者检出相对丰度为 0.000 3%~0.006 8%,均为极低丰度分布。门水平拥有共享菌比例 94.12%。

对 113 个粪样品属水平共享菌分析显示,所有检出的 228 个属中,有 214 个属为共享菌。其中 6 个属在 GPM、GNM、NGM 组均未检出,2 个属在 NGM 组未检出,1 个属在 GPF、GNF 组均未检出,1 个属在 GPM、NGM 组均未检出,1 个属在 GPF 组未检出,1 个属在 NGF 组未检出,1 个属在 GPF、NGF 组未检出。属水平拥有共享菌比例 93.86%。对 113 个粪样品菌种水平共享菌分析显示,所有检出的 185 个菌种中,有 174 个菌种为共享菌。其中 3 个菌种在 GPM、GNM、NGM 组均未检出,3 个菌种在 GPF 组未检出,2 个菌种在 NGF 组未检出,1 个菌种在 GNF、NGM 组均未检出,1 个菌种在 GNF 组未检出,1 个菌种在 NGM 组未检出。菌种水平拥有共享菌比例 94.05%。

对所有粪样品门纲目科属种 6 个分类水平共享菌分析结果表明,其各分类水平上共享菌所占比例分别为门水平 94.12%(16/17),纲水平 93.75%(30/32),目水平 91.07%(51/56),科水平 92.55%(87/94),属水平 93.86%(214/228),种水平 94.05%(174/185)。说明转入 *IGF-1* 基因未改变超细毛羊肠道菌群的总体结构分布。

4 结 论

转基因阳性羊、阴性羊及非转基因羊肠道菌群

组成 α 多样性和组间差异分析显示,3 组间肠道菌群结构、丰度及多样性指数无显著差异,表明转基因超细毛羊粪样与非转基因超细毛羊粪样菌群组成较为相似。在门水平上,3 组样本均以厚壁菌门、拟杆菌门为优势菌门;在属水平上,3 组均以理研菌科 RC9 粪肠属、瘤球菌科 UCG-005 属、瘤球菌科 UCG-010 属、*Christensenellaceae_R-7_group*、拟杆菌属、毛螺菌科 NK4A136 属、密螺旋体属 2 为优势菌属。转基因阳性羊(GP)组中,GPF 组有 10 个生物标记物,GPM 组有 5 个,均是反刍动物肠道菌群的常见定植菌;非转基因羊(NG)组中,NGF 组的生物标记物为拟杆菌 BS11 科,NGM 组为厚壁菌门,均为反刍动物肠道菌群的主要优势菌。对所有样品门纲目科属种 6 个分类水平共享菌分析结果显示,3 组拥有共享菌比例高达 91%~94%,表明转入 *IGF-1* 基因并未改变其肠道菌群的整体结构分布,转基因超细毛羊仍然保持着超细毛羊肠道微生物群组成结构的稳定定植^[39]。

参考文献(References):

- [1] BJÖRKSTÉN B. The gut microbiota: a complex ecosystem[J]. *Clin Exp Allergy*, 2006, 36(10): 1215-1217.
- [2] LEY R E, LOZUPONE C A, HAMADY M, et al. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(10): 776-788.
- [3] SUEZ J, KOREM T, ZEEVI D, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota[J]. *Nature*, 2014, 514(7521): 181-186.
- [4] GARCIA-MAZCORRO J F, DOWD S E, POULSEN J, et al. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs[J]. *MicrobiologyOpen*, 2012, 1(3): 340-347.
- [5] FAITH J J, GURUGE J L, CHARBONNEAU M, et al. The long-term stability of the human gut microbiota[J]. *Science*, 2013, 341(6141): 1237-1239.
- [6] 曹晨霞, 韩 琬, 张和平. 第三代测序技术在微生物研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2269-2276.
CAO C X, HAN W, ZHANG H P. Application of third generation sequencing technology to microbial research[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2269-2276. (in Chinese)
- [7] 魏庆信, 郑新民. 转基因家畜安全性的解决方案[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(24): 5562-5566.

- WEI Q X, ZHENG X M. Solutions of transgenic livestock's safety[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2012, 51(24):5562-5566. (in Chinese)
- [8] ROTHSCHILD D, WEISSBROD O, BARKAN E, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota[J]. *Nature*, 2018, 555(7695):210-215.
- [9] ZHANG Z G, XU D M, WANG L, et al. Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals[J]. *Curr Biol*, 2016, 26(14):1873-1879.
- [10] 李陇平, 白彩霞, 朱海鲸, 等. 转 VEGF 和转 T β 4 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.
- LI L P, BAI C X, ZHU H J, et al. Analysis of transgenic VEGF and transgenic T β 4 genes in feces of White cashmere goats in northern Shaanxi [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(2):162-164. (in Chinese)
- [11] 赵 帅, 王立民, 王聪慧, 等. 实时定量 PCR 检测转基因绵羊拷贝数[J]. *新疆农业科学*, 2015, 52(8):1517-1521.
- ZHAO S, WANG L M, WANG C H, et al. Real-time quantitative PCR was used to detect transgenic sheep exogenous gene copy number [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2015, 52(8):1517-1521. (in Chinese)
- [12] 孙翠丽, 张 阁, 程汝佳, 等. 16S rRNA 高通量测序方法检测羊圈空气微生物群落结构及多样性[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(7):1314-1322.
- SUN C L, ZHANG G, CHENG R J, et al. Microbial community structure and diversity of sheepfold atmosphere by 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(7):1314-1322. (in Chinese)
- [13] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucl Acids Res*, 2012, 41(D1):D590-D596.
- [14] SINGH K M, JISHA T K, REDDY B, et al. Microbial profiles of liquid and solid fraction associated biomaterial in buffalo rumen fed green and dry roughage diets by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(1):95-103.
- [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] 李岚捷, 成述儒, 刁其玉, 等. 不同 NFC/NDF 水平饲料对犊牛瘤胃发酵参数和微生物区系多样性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(12):2347-2357.
- LI L J, CHENG S R, DIAO Q Y, et al. Effects of diets with different NFC/NDF levels on the rumen fermentation parameters and bacterial community in male calves [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(12):2347-2357. (in Chinese)
- [17] 郭 威, 郭晓军, 周 贤, 等. 复合菌剂发酵玉米秸秆对绵羊瘤胃液细菌多样性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(4):736-745.
- GUO W, GUO X J, ZHOU X, et al. Effect of corn stalk fermented by complex bacterial on rumen bacteria diversity in Sheep [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(4):736-745. (in Chinese)
- [18] WANG Y, SHENG H F, HE Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(23):8264-8271.
- [19] 范新浩, 王子帅, 梁国明, 等. 转 lncRNA-GTL2 对小鼠肠道微生物菌群组成的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(10):2621-2627.
- FAN X H, WANG Z S, LIANG G M, et al. Effects of lncRNA-GTL2 transgenesis on gut microbiota composition in mice[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(10):2621-2627. (in Chinese)
- [20] WHITE J R, NAGARAJAN N, POP M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples [J]. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(4):e1000352.
- [21] FRIEDMAN J, ALM E J. Inferring correlation networks from genomic survey data [J]. *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(9):e1002687.
- [22] 王柏辉, 杨 蕾, 罗玉龙, 等. 饲养方式对苏尼特羊肠道菌群与脂肪酸代谢的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(17):1-7.
- WANG B H, YANG L, LUO Y L, et al. Effect of feeding pattern on intestinal flora and fatty acid metabolism in Sunit sheep [J]. *Food Science*, 2018, 39(17):1-7. (in Chinese)
- [23] 王 悦, 苏 力, 陈兴永, 等. 基于 16S rRNA 测序的海南坡鹿肠道菌群结构分析[J]. *野生动物学报*, 2018, 39(4):761-768.
- WANG Y, SU L, CHEN X Y, et al. Analysis of gut microflora structure of Hainan eld's Deer based on 16S rRNA sequencing [J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2018, 39(4):761-768. (in Chinese)
- [24] GOODRICH J K, WATERS J L, POOLE A C, et al. Human genetics shape the gut microbiome [J]. *Cell*, 2014, 159(4):789-799.
- [25] 赵 芳, 王 根, 赵国栋, 等. 瘤胃保护性 5-羟基色氨

- 酸对绵羊肠道内容物褪黑素含量及菌群结构的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(3): 690-702.
- ZHAO F, WANG G, ZHAO G D, et al. Effect of supplemented with rumen-protected 5-hydroxytryptophan on melatonin content and microbial communities in intestinal tract digesta of Sheep [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(3): 690-702. (in Chinese)
- [26] 曾 燕. 成年健康绵羊胃肠道菌群的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- ZENG Y. Analysis of the diversity of bacteria communities along the gastrointestinal tract of adult healthy sheep [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [27] 王 悦. 海南坡鹿肠道菌群结构及益生芽孢杆菌的筛选[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- WANG Y. The gut microbiome structure and screening of the probiotic bacillus of Hainan Eld's deer [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018. (in Chinese)
- [28] 田发益, 武俊喜. 放牧与舍饲对彭波半细毛羊瘤胃细菌群落的生物学信息影响[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(11): 2252-2263.
- TIAN F Y, WU J X. Effects of grazing and barn feeding on biological information of rumen bacterial communities in Pengbo semi-fine wool sheep[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(11): 2252-2263. (in Chinese)
- [29] 谢 骁. 低质粗饲料日粮干预对湖羊瘤胃发酵和微生物菌群的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- XIE X. Effects of dietary intervention on rumen fermentation and microbiota in sheep fed low quality forage[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018. (in Chinese)
- [30] 白 娜. 内蒙古锡林郭勒牧区健康家畜肠道菌群多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- BAI N. Diversity of intestinal microbiota of healthy pastoral livestock in Inner Mongolia Xilin Gol[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [31] LI M J, ZHUU M, ADAMOWICZ E, et al. Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(1): 72-80.
- [32] DURSO L M, HARHAY G P, SMITH T P L, et al. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(14): 4858-4862.
- [33] ALZAHAL O, LI F Y, GUAN L L, et al. Factors influencing ruminal bacterial community diversity and composition and microbial fibrolytic enzyme abundance in lactating dairy cows with a focus on the role of active dry yeast[J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(6): 4377-4393.
- [34] 张梦玲. 荷斯坦奶牛胃肠道细菌菌群组成与功能的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- ZHANG M L. Characterising the bacterial community composition and function in the gastrointestinal tracts of Holstein dairy cattle [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [35] 贺美玲, 王纯洁, 贾知锋, 等. 高通量测序分析 Nisin 对腹泻小鼠肠道菌群的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(9): 2015-2024.
- HE M L, WANG C J, JIA Z F, et al. The effect of Nisin on intestinal flora in diarrheal mice analyzed by high-throughput sequencing [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(9): 2015-2024. (in Chinese)
- [36] 罗海霞, 杨 易, 谢秀兰. 腹泻羔羊与健康羔羊肠道微生物群落分析[J]. 动物医学进展, 2017, 38(12): 86-90.
- LUO H X, YANG Y, XIE X L. Analysis of intestinal microbial diversity in diarrhea and healthy lambs[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(12): 86-90. (in Chinese)
- [37] WU X Y, ZHANG H H, CHEN J, et al. Comparison of the fecal microbiota of dholes high-throughput illumina sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(8): 3577-3586.
- [38] 孙玉姣. 基于高通量测序的野外和圈养马麝冬季肠道菌群比较研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- SUN Y J. A comparative study on the intestinal flora of wild and captive musk Deer in winter based on high-throughput sequencing [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018. (in Chinese)
- [39] 唐惠儒, 王玉兰. 哺乳动物与肠道菌群的共代谢相互作用[J]. 生命科学, 2017, 29(7): 687-694.
- TANG H R, WANG Y L. Co-metabolism: vital interactions between mammals and symbiotic gut microbiota[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29(7): 687-694. (in Chinese)