

研究报告

猪源大肠杆菌 Nissle 1917 菌株的分离鉴定

杨颖^{1,2Δ} 张伟^{1,2,3Δ} 区炳明^{1,2} 夏芃芃^{1,2} 石宝兰^{1,2,3} 张建军^{1,2,3} 朱国强^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009)

(2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心 江苏 扬州 225009)

(3. 国药集团扬州威克生物工程有限公司 江苏 扬州 225009)

摘要:【目的】证实大肠杆菌 Nissle 1917 作为自然菌株存在于动物猪体内,并能从猪粪便中分离。建立大肠杆菌 Nissle 1917 的原位杂交鉴定方法。【方法】采集 135 份健康断奶仔猪的新鲜粪便制备 DNA 模板,以人源大肠杆菌 Nissle 1917 为阳性对照菌株,分别针对 Nissle 1917 的 I 型菌毛亚单位 FimA、F1C 菌毛亚单位 FocA 及两个质粒 pMUT1 和 pMUT2 的相关基因序列设计 5 对特异性引物进行 PCR 扩增;并将其中 427 bp 大小的质粒片段 pMUT2(a)作为目的片段回收纯化,用地高辛随机引物标记法制成 DNA 探针。【结果】从其中的 2 份 DNA 模板中扩增出上述 5 对特异性引物 PCR 预期大小相符的片段,初步认为大肠杆菌 Nissle 1917 可能存在于猪体内。应用制备的探针通过菌落原位杂交的方法从 2 份阳性粪便样品中筛选出 2 株阳性菌落,通过血清学检验、PCR 扩增和测序进一步鉴定为阳性 Nissle 1917 菌株。【结论】动物源益生菌 Nissle 1917 的分离鉴定,为优良动物源益生菌研究和应用奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌 Nissle 1917, 分离鉴定, 地高辛标记探针, 菌落原位杂交

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31672579, 30571374, 30771603, 31072136, 31270171); Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions; The Genetically Modified Organisms Technology Major Project of China (No. 2014ZX08006-001B)

***Corresponding author:** Tel: 86-514-87972590; E-mail: yzgzhu@yzu.edu.cn

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: April 12, 2016; **Accepted:** October 27, 2016; **Published online** (www.cnki.net): November 08, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31672579, 30571374, 30771603, 31072136, 31270171); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 科技部转基因生物新品种培育重大专项(No. 2014ZX08006-001B)

***通讯作者:** Tel: 86-514-87972590; E-mail: yzgzhu@yzu.edu.cn

^Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2016-04-12; **接受日期:** 2016-10-27; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-11-08

Isolation and identification of porcine-originated *Escherichia coli* Nissle 1917

YANG Ying^{1,2Δ} ZHANG Wei^{1,2,3Δ} OU Bing-Ming^{1,2} XIA Peng-Peng^{1,2}

SHI Bao-Lan^{1,2,3} ZHANG Jian-Jun^{1,2,3} ZHU Guo-Qiang^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(2. Jiangsu Co-Innovation Center for Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(3. Yangzhou Vachio Bio-engineering Co., Ltd, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: [Objective] To verify that *Escherichia coli* Nissle 1917 also exists in swine as a natural isolate and could be isolated from swine faeces. The method for identifying the *Escherichia coli* Nissle 1917 using *in situ* hybridization was established. **[Methods]** All 135 pieces of fresh faeces from healthy weaned piglets were collected to prepare DNA template samples. And the DNA template samples were screened and tested by PCR with five pairs of specific primers targeting the chromosomal genes encoding the major fimbrial subunit FimA (type 1 fimbriae) and FocA (F1C fimbriae), and the two cryptic plasmids pMUT1 and pMUT2, and mean while the human *E. coli* Nissle 1917 was chosen as the positive control. The 427 bp-long plasmid fragment named pMUT2(a) was purified from the gel and made into DNA probe using digoxigenin random primer labeling. **[Results]** The PCR result showed that the expected fragments of the five specific primers target were amplified from the two of 135 DNA template samples and the potential presence of Nissle 1917 in pigs was initially confirmed. Using the method of *in situ* hybridization with prepared pMUT2(a) probe, two positive strains were screened from the two positive faecal samples. Two positive clones were finally confirmed as positive strains of Nissle 1917 through further experiments of serological test, PCR and sequencing. **[Conclusion]** The isolation and identification of swine-originated probiotics Nissle 1917 laid a foundation for further study and application of excellent animal originated probiotic.

Keywords: *Escherichia coli* Nissle 1917, Isolation and identification, Digoxigenin-labeled nucleic acid probe, Colony *in situ* hybridization

益生菌(Probiotics)又称微生态调节剂,能够改善肠道内菌群的生态平衡,是对宿主有益的活性微生物制剂^[1]。其具有抗感染、抗肿瘤、抗衰老、免疫赋活、促营养消化等多种功效,在牛奶中添加益生菌可改善消化功能,促进胃肠蠕动,减轻人体乳糖不耐受症,防止婴幼儿的腹泻和消化不良,有益于婴幼儿的健康^[2-5]。在医学临床上,益生菌治疗急性慢性肠炎、痢疾及结肠炎,已取得良好的预防和治疗效果^[6-7]。由于益生菌剂无毒性、无残留、无污染,能克服使用抗生素引起的菌群失调和二重感染,避免滥用抗生素产生的不良后果^[8]。

大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, EcN)是由德国科学家 Alfred Nissle 于 1917 年发现的一种益生菌,其血清型为 O6:K5:H1。实

验证明 EcN 可以改善肠道菌群结构,抑制病原菌的生长,提高机体免疫力^[9-10]。国外应用该 EcN 制剂治疗肠炎患者取得良好的治疗效果^[11-12],并且临床上也应用于治疗新生犊牛腹泻^[13],但其对猪的益生作用和安全性尚无相关研究。Blum-Oehler 等依据人源性 EcN 的 I 型菌毛亚单位 FimA、F1C 菌毛亚单位 FocA 及两个质粒 pMUT1 和 pMUT2 的基因序列,分别设计出 5 对特异性的 PCR 引物用于检测人源性 EcN,应用这 5 对引物对大肠杆菌 K-12、粪便和环境中的大肠杆菌、大肠杆菌 O6:K5 血清型、肠道内(致病性大肠杆菌、肠出血性大肠杆菌、侵袭性大肠杆菌、肠聚集性大肠杆菌)和肠道外(尿道致病性大肠杆菌、脑膜炎大肠杆菌、败血性大肠杆菌)菌株进行检测,结果显示,依据质粒序列设计的

3 对引物,在上述大肠杆菌中,通过 PCR 扩增出目的条带的比率低,所以这 3 对引物更适合用来特异性地鉴别 EcN 菌株^[14]。Kleta 等^[15]曾用上述特异性 PCR 引物从猪肠道粪便制备的 DNA 样品中 PCR 扩增检测到 EcN。国内尚无 EcN 存在于猪体的相关报道。本实验利用 PCR 扩增检测到仔猪粪便内 EcN 的存在,采用菌落原位杂交从仔猪粪便内筛选到猪源 EcN 菌株,为优良动物源 EcN 菌株应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人源大肠杆菌 EcN (O6:K5:H1)和大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨 (Tryptone)、酵母提取物 (Yeast extract), Oxoid 公司; *Taq* DNA 聚合酶、氨苄青霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; pMD18-T simple vector、DNA 凝胶回收试剂盒、DL2000 DNA marker, 宝生物工程(大连)有限公司; 限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I, New England Biolabs (NEB)公司; 地高辛杂交标记检测试剂盒、Expand Long Template PCR System, Roche 公司; T4 DNA 连接酶, Promega 公司。恒温摇床, 太仓实验设备厂; 电热干燥培养箱, 南京实验仪器厂; DYY605 稳压稳流电泳仪, 南京新校园生物技术研究; DNA 凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 PCR 引物

参考 Blum-Oehler 等^[14]针对人源性大肠杆菌 EcN 的 I 型菌毛亚单位 *FimA*、F1C 菌毛亚单位 *FocA* 及两个质粒 pMUT1 和 pMUT2 的基因序列共合成 5 对 PCR 引物(表 1), 由上海基康生物工程有限公司合成。

1.4 粪便样品的处理

粪便样品采集于扬州市瘦肉型猪繁殖场, 选定 1-3 月龄健康猪 135 头(该猪场未饲喂大肠杆菌 EcN), 用灭菌竹签刮取刚排出的新鲜粪便, 置于灭菌的玻璃瓶中。将采集的仔猪粪便分别取 1 g 置于盛有 10 mL 灭菌生理盐水的试管中, 200 r/min 振荡

表 1 PCR 扩增所用引物		
Table 1 Primers used for PCR amplification		
引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	长度 Sizes (bp)
<i>fimA</i> +	ATACTACGACGGTAAATGGT	20
<i>fimA</i> -	TACATCAGTATCGGTAGCAT	20
<i>focA</i> +	CCACGGTTAGGTGTGGTACA	20
<i>focA</i> -	CGTCGGCGTTGGCAATACCA	20
pMUT1+	AACTGTGAAGCGATGAACCC	20
pMUT1-	GGACTGTTTCAGAGAGCTATC	20
pMUT2(a)+	GACCAAGCGATAACCGGATG	20
pMUT2(a)-	GTGAGATGATGGCCACGATT	20
pMUT2(b)+	GCGAGGTAACCTCGAACATG	20
pMUT2(b)-	CGGCGTATCGATAATTCACG	20

注: +: 正向引物; -: 反向引物。
Note: +: Forward primer; -: Reverse primer.

10 min 充分混匀, 然后静置 1 h, 取上清 10 倍梯度稀释(10^{-1} - 10^{-3}), 分别从中取 100 μL 涂布 LB^[16]平板, 37 °C 恒温培养 16 h。

粪便样品的 PCR 模板制备选择含有 500-5 000 个菌落的 LB 平板, 用 10 mL PBS 冲洗平板上的全部菌落, 混匀后从中吸取 1 mL 菌液, 用无菌超纯水洗涤 2 次。最后悬浮于 100 μL 灭菌超纯水中, 100 °C 煮沸 5 min, 冷却至室温后 4 700×g 离心 10 min, 取上清作为待检样品模板, -20 °C 保存。

1.5 PCR 扩增 5 条靶向目的片段

用上述表 1 中 5 对引物对样品模板进行扩增, 50 μL PCR 反应体系: 超纯水 38.4 μL, 10×PCR buffer 5 μL, dNTP mix (2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, 待检样品模板 2 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.6 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 40 s, 72 °C 30 s, 25 个循环; 72 °C 8 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 探针的纯化及标记

回收 PCR 扩增出的 pMUT2(a)片段后, 与 pMD18-T 载体连接 转入大肠杆菌 DH5α 感受态中, 提取重组质粒酶切鉴定并测序验证, 将阳性重组菌株命名为 DH5α/pM-MUT2(a)。大量提取质粒 pM-MUT2(a), *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切, 回收 pMUT2(a)片段并定量, 按地高辛杂交标记检测试剂

盒说明进行标记。具体方法如下：取 10–3 000 ng 回收的 pMUT2(a)片段溶于装有 15 μ L 双蒸水的反应管中，沸水中加热 10 min 使 DNA 变性，然后迅速在冰水中冷却；加入 dNTP 标记混合底物 2 μ L、随机引物混合物 2 μ L、Klenow 酶 1 μ L 于上述变性 DNA 中，混匀并瞬时离心将反应液收集到管底，37 $^{\circ}$ C 反应 12 h，65 $^{\circ}$ C 加热 10 min 终止反应。

1.7 菌落原位杂交及检测程序

按照地高辛杂交标记检测试剂盒操作手册流程进行杂交及显影：将硝酸纤维素膜(NC 膜)小心放置于含有阳性菌落的琼脂平板表面 1 min，并对应菌落位置一一做好标记。随后用钝头小镊子小心把 NC 膜从琼脂平板上轻轻剥离，菌落面朝上，将 NC 膜置于变性液(0.5 mol/L NaOH，1.5 mol/L NaCl)中 15 min；经空气干燥后，再置于中和液(1.5 mol/L NaCl，1.0 mol/L pH 7.4 Tris-HCl)中孵育 15 min；空气干燥后，把 NC 膜转入 2 \times SSC 中洗膜 10 min，80 $^{\circ}$ C 干烤 30 min；再将 NC 膜在 37 $^{\circ}$ C 的蛋白酶 K 溶液(将 14–22 g/L 蛋白酶 K 用 2 \times SSC 以 1:10 的比例稀释)中孵育 1 h 以除去细菌碎片；将 NC 膜放入 62 $^{\circ}$ C 的杂交缓冲液中预杂交，温和搅拌 30 min；再转入杂交液(含地高辛标记探针的预杂交液)中温和搅拌过夜；随后用 2 \times SSC 和 0.1% SDS 在室温下洗膜 2 次，15 min/次且不断搅拌；再用 0.1 \times SSC 和 0.1% SDS 在 65–68 $^{\circ}$ C 洗膜 2 次，15 min/次且不断搅拌，随后将膜依次置于洗涤缓冲液冲洗 5 min，阻断液孵育 30 min，抗体溶液孵育 30 min，洗涤缓冲液洗涤 30 min，检测缓冲液平衡 5 min 处理；最后，在暗室中，将膜转入 10 mL 新制的显色液中反应 5 min，显色完成后用 TE 缓冲液洗涤 5 min，照相记录结果。

1.8 特异性检测

阴性对照菌为大肠杆菌 EPEC、K88ac 和 K88ab，阳性对照菌为人源性大肠杆菌 EcN，将细菌固定于 NC 膜后按 1.7 方法进行杂交显色。

1.9 敏感性检测

紫外分光光度计测定回收目的片段的浓度，进行 5 倍梯度稀释，各稀释度每 1 μ L 终浓度分别为

2 000、400、80、16、3.2 和 0.64 pg。将各稀释度 DNA 变性后取 1 μ L 点样于 NC 膜，按 1.7 方法进行杂交显色，判定结果。

1.10 筛选阳性菌落

将两块含阳性菌落平板上的细菌按顺序转接入新的 LB 平板，培养过夜后，转移到 NC 膜，按建立的方法进行原位杂交筛选阳性菌落。

1.11 阳性菌落进一步验证

血清学验证参考陆承平^[17]的方法。将筛选出的阳性菌株与标准的大肠杆菌 O、K、H 诊断血清进行玻片凝集实验，验证其血清型。

PCR 方法扩增目的片段并测序鉴定。对筛选出的阳性菌株按照 1.5 的方法扩增特异性片段，并把目的片段回收纯化后连接 pMD18-T 载体，送上海生工生物工程技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增检测仔猪粪便样品中的 EcN

从采集的仔猪粪便样品中检测出 2 份含有 EcN，其模板 DNA 中皆扩增出 5 条靶向目的片段，产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，长度大小与预期结果相一致(图 1)。

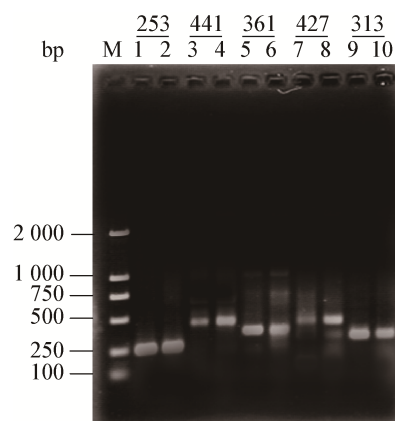


图 1 阳性仔猪粪便样品模板 DNA 经 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products from positive porcine faeces samples

注：M：DL2000 分子量标准；1、3、5、7、9：人源性 EcN；2、4、6、8、10：阳性粪便样品。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1, 3, 5, 7, 9: Human-originated EcN; 2, 4, 6, 8, 10: Positive faeces samples.

2.2 EcN 原位杂交检测方法的建立

2.2.1 pMUT2(a)片段的扩增: 由于引物 pMUT2(a)在多种大肠杆菌中均未扩增出目的条带^[14], 因此选择该对引物的 PCR 产物作为鉴定 EcN 的探针序列。PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 427 bp 的目的条带(图 2)。

2.2.2 重组质粒 pM-MUT2(a)的构建与鉴定: 将回收的 PCR 产物经过 *Sal* I 和 *Bam* H I 进行双酶切后, 与同样经过双酶切的 pMD18-T 质粒连接。将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中。通过 PCR 和双酶切两种方法对阳性克隆进行鉴定。经 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切重组质粒, 酶切产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 分别得到与预期大小一致的 2.7 kb 和 427 bp 目的条带(图 3)。

2.2.3 pMUT2(a)核酸探针的制备与特异性检测: 提取 pM-pMUT2(a)重组质粒, 将重组质粒的双酶切产物回收后进行定量。根据地高辛杂交标记检测试剂盒说明书对 DNA 片段进行地高辛标记。为了检测探针的特异性, 用地高辛标记探针分别与 EPEC、K88ac、K88ab 和人源大肠杆菌 EcN 核酸进行杂交反应, 图 4 结果显示, 该探针只与人源 EcN 的核酸出现阳性杂交信号, 而与 EPEC、K88ac、K88ab 的核酸杂交结果均为阴性。

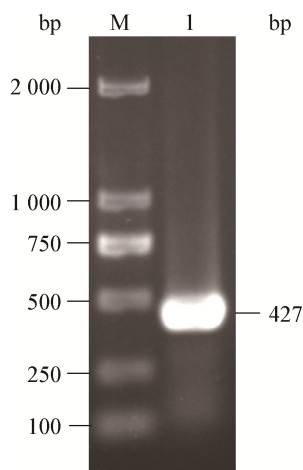


图 2 pMUT2(a)片段电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of pMUT2(a) fragment
注: M: DL2000 分子量标准; 1: pMUT2(a)片段。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: pMUT2(a) fragment.

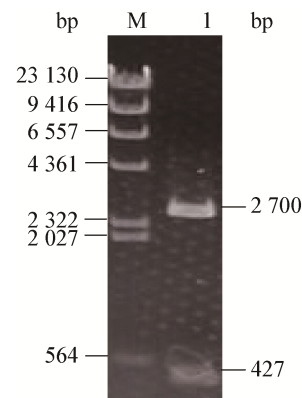


图 3 重组质粒 pM-MUT2(a)的酶切鉴定

Figure 3 Identification of recombinant pM-MUT2(a) by restriction enzymes digestion

注: M: λ DNA/*Hind* III marker; 1: 重组质粒 pM-MUT2 经 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切产物。

Note: M: λ DNA/*Hind* III marker; 1: The product of recombinant pM-MUT2(a) double-digested with *Sal* I and *Bam* H I.

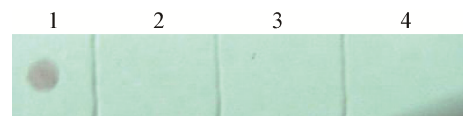


图 4 地高辛标记探针特异性试验结果

Figure 4 The result of specificity assay of digoxigenin-labeled nucleic acid probe

注: 1: 人源性 EcN; 2: EPEC; 3: K88ac; 4: K88ab.

Note: 1: Human-originated EcN; 2: EPEC; 3: K88ac; 4: K88ab.

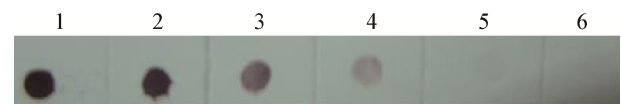


图 5 地高辛标记探针敏感性试验结果

Figure 5 The result of sensitivity assay of digoxigenin-labeled nucleic acid probe

Note: 1: 2 000 pg; 2: 400 pg; 3: 80 pg; 4: 16 pg; 5: 3.2 pg; 6: 0.64 pg.

2.2.4 pMUT2(a)核酸探针敏感性检测: 将胶回收的 PCR 扩增产物定量后进行梯度稀释, 点样于膜上, 用地高辛标记的核酸探针进行杂交, 该探针对于核酸的最低检出量约 16 pg (图 5)。

2.3 菌落原位杂交筛选阳性菌落

粪便样品上清经稀释涂板, 对 PCR 检测含有阳性菌平板上的菌落进行原位杂交, 设置人源 EcN 作为阳性对照。结果表明, 有两个菌落位点显色(图 6)。



图6 地高辛标记探针菌落原位杂交结果

Figure 6 The result of colony *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled nucleic acid probe

注: 1: 人源性 EcN; 2, 3: 猪源性 EcN.

Note: 1: Human-originated EcN; 2, 3: Porcine-originated EcN.

2.4 阳性菌株进一步验证结果

为了进一步确证阳性菌落为 EcN, 分别采用血清学和 PCR 方法进行验证。血清学鉴定结果表明, 菌落原位杂交筛选出的两株阳性菌株 O 抗原、K 抗原和 H 抗原分别为 O6、K5 和 H1, 与 EcN 血清型报道结果一致。5 条特异性引物 PCR 扩增的目的条带与预期大小一致(图 7), 扩增片段经测序, 与 GenBank 中 EcN 对应基因序列 100% 符合。证明筛选的菌株为猪源性 EcN。

3 讨论

生物化学、表型和基因型鉴定方法可用于鉴别 EcN 菌株^[18-19], 但耗时较长。PCR 方法简便、敏感、快速并且对标本的纯度要求不高^[20], 大大减轻样品

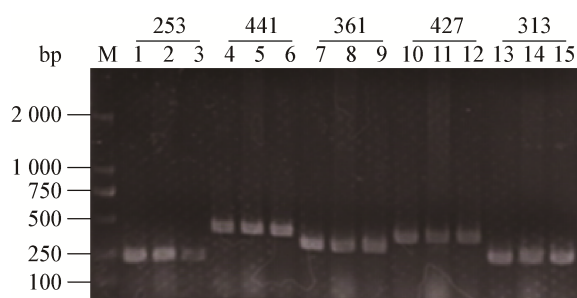


图7 两株猪源 EcN 菌株的 PCR 扩增电泳图

Figure 7 Agarose gel electrophoresis of PCR products from two porcine-originated EcN samples

注: M: DL2000 分子量标准; 1、4、7、10、13: 人源性 EcN; 2、5、8、11、14: 猪源性 EcN1; 3、6、9、12、15: 猪源性 EcN2.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1, 4, 7, 10, 13: Human-originated EcN; 2, 5, 8, 11, 14: Porcine-originated EcN1; 3, 6, 9, 12, 15: Porcine-originated EcN2.

采集过程的负担。本实验参考 Blum-Oehler 等^[14]针对人源性大肠杆菌 EcN 基因序列设计的 5 对 PCR 引物, 但对 PCR 反应程序进行了优化, 降低了退火温度以及减少变性、退火、复性时间和循环数, 确保 PCR 在较好的特异性和产物量的基础上缩短了反应时间。然而用 PCR 方法从复杂样本, 比如粪便样品中筛选特定菌株较耗时且工作量大, 而菌落原位杂交法更适用于复杂样本中特定菌种的筛选^[21]。

因此本实验选用 pMUT2(a) 特异性引物 PCR 扩增、纯化回收的片段制备地高辛标记探针, 采用菌落原位杂交法筛选 EcN 菌株。菌落原位杂交将平板上单个菌落转移到 NC 膜上, 通过碱裂解使细菌释放出 DNA 并经干烤固定于膜上, 其再与标记探针特异结合, 完成对靶序列 DNA 的测定^[22]。实验中杂交时间过短会造成杂交不完全, 而过长则会增加非特异性, 因此优化杂交条件显得尤为重要, 作者在预实验中对杂交的温度和时间进行了调节, 选定 62 °C 预杂交 30 min, 然后杂交过夜, 同时选用蛋白酶 K 去掉除细菌核酸外其他物质的干扰以得到清晰的杂交信号。刘方娜等制备的地高辛标记探针, 对猪圆环病毒 2 型 DNA 的最低检测量为 10 pg^[23], 陈清等制备的地高辛探针对产不耐热肠毒素大肠杆菌 DNA 的最低检出量为 5 pg^[24], 本文所用的地高辛探针对人源 EcN 核酸的最低检出量约 16 pg, 相比以上结果敏感性较低, 这将在后续实验中进行条件优化以待进一步提高。该探针与 EPEC、K88ac、K88ab 核酸杂交均呈现阴性, 具有较强特异性。

EcN 在国外仅获准用于人及牛的医疗应用^[11-13,25], 已发表的文献显示国内畜牧业暂无在临床使用商品化大肠杆菌 EcN, 国内唐志如实验团队仅于 2014 年报道了 EcN 菌株作为口服益生菌对仔猪空肠黏膜屏障功能的相关调控^[26-27]的实验室试验, 此研究表明 EcN 能提高断奶仔猪生长性能和降低断奶仔猪腹泻率, 为益生菌 EcN 应用于养猪生产提供了相关实验论证。到目前为止, 国内仍没有 EcN 在养猪生产实际应用的相关报道。Kleta 等对 EcN 在德国境内 7 个不同猪群的存在情况进行调查, 从 7 个猪群中共抽取 35 只个体, 采集其粪便进行检测,

在其中的 1 个个体养殖户(仅饲喂 15 只猪只)抽取的 5 只猪中有 3 只粪便呈现 EcN 特异性 PCR 结果阳性, 但其他 6 个猪群均未检测到 EcN。这可能是由于 EcN 呈现地方性存在, 或者由于人类的偶然传播而进入猪只体内^[15]。为了调查 EcN 是否也存在于国内猪只中, 作者在开展实验前对实验样品来源猪场中 EcN 菌株的使用情况进行过调研, 该猪场无饲喂大肠杆菌 EcN 的记录, 本研究从猪粪便中分离到的 EcN 菌株是自然条件下存在于猪只体内的, 因此将其称为“自然菌株”。分离的两株猪源 EcN 与人源 EcN 的遗传亲缘关系以及益生功能有待验证, 并将进一步探索该猪源 EcN 作为猪体内靶向投递外源抗原和药物的载体菌以及调节猪肠道微生物生态菌群的益生菌。

参 考 文 献

- [1] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11(8): 506-514
- [2] Barnes D, Yeh AM. Bugs and guts practical applications of probiotics for gastrointestinal disorders in children[J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2015, 30(6): 747-759
- [3] Caffarelli C, Cardinale F, Povesi-Dascola C, et al. Use of probiotics in pediatric infectious diseases[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2015, 13(12): 1517-1535
- [4] Khurshid M, Aslam B, Nisar MA, et al. Bacterial munch for infants: potential pediatric therapeutic interventions of probiotics[J]. *Future Microbiology*, 2015, 10(11): 1881-1895
- [5] Reid G. The growth potential for dairy probiotics[J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49: 16-22
- [6] Chibbar R, Dieleman LA. Probiotics in the management of ulcerative colitis[J]. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2015, 49: S50-S55
- [7] Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(12): 7577-7587
- [8] Kujawa-Szewieczek A, Adamczak M, Kwiecień K, et al. The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the incidence of *Clostridium difficile* infection in high risk patients treated with antibiotics[J]. *Nutrients*, 2015, 7(12): 10179-10188
- [9] Xia PP, Zhu J, Zhu GQ. *Escherichia coli* Nissle 1917 as safe vehicles for intestinal immune targeted therapy—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(6): 538-544 (in Chinese)
夏芃芃, 朱军, 朱国强. 肠道免疫的安全靶向载体: 大肠杆菌 Nissle 1917[J]. *微生物学报*, 2013, 53(6): 538-544
- [10] Hering NA, Richter JF, Fromm A, et al. TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC ζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells[J]. *Mucosal Immunology*, 2014, 7(2): 369-378
- [11] Różańska D, Regulska-Iłow B, Choroszy-Król I, et al. The role of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in the gastro-intestinal diseases[J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 2014, 68: 1251-1256
- [12] Kruis W, Chruabasik S, Boehm S, et al. A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome[J]. *International Journal of Colorectal Disease*, 2012, 27(4): 467-474
- [13] von Buerenau R, Jaekel L, Schubotz E, et al. *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(1): 317-323
- [14] Blum-Oehler G, Oswald S, Eiteljörge K, et al. Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154(1): 59-66
- [15] Kleta S, Steinrück H, Breves G, et al. Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(6): 1357-1366
- [16] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. Translated by Huang PT. Beijing: Science Press, 2002: 1595-1604 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 1595-1604
- [17] Lu CP. *Veterinary Microbiology*[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 222-223 (in Chinese)
陆承平. 兽医微生物学[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 222-223
- [18] Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(16): 5432-5441
- [19] Hacker J, Oelschlaeger T, Oswald S, et al. Plasmid-free clone of *E. coli* strain DSM 6601: Germany, WO/2004/113575[P]. 2004-12-29
- [20] Lauerma LH. Advances in PCR technology[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2004, 5(2): 247-248
- [21] Kurzrock R, Talpaz M, Beran M, et al. DNA *in situ* hybridization of individual colonies to determine lineage derivation in leukemia[J]. *Leukemia*, 1998, 12(2): 242-246
- [22] Nunan LM, Lightner DV. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Virological Methods*, 1997, 63(1/2): 193-201
- [23] Liu FN, Diao YX, Wang N, et al. Establishment and application of digoxigenin-labeled nucleic acid probe for PCV-2[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, 28(7): 771-774 (in Chinese)
刘方娜, 刁有祥, 王妮, 等. 猪圆环病毒 2 型地高辛标记探针检测方法的建立与应用[J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(7): 771-774
- [24] Chen Q, Yu SY, Chen YZ. A rapid identification of heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* by nonradioactive digoxigenin labeled DNA probe[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 1994, 13(2): 74-76 (in Chinese)
陈清, 俞守义, 陈义忠. 地高辛素标记的 DNA 探针快速鉴定产不耐热肠毒素大肠杆菌的研究[J]. *中国公共卫生学报*, 1994, 13(2): 74-76
- [25] Losurdo G, Iannone A, Contaldo A, et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD*, 2015, 24(4): 499-505
- [26] Deng H, Xu L, Tang ZR, et al. Effects of orally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 on growth performance and jejunal mucosal membrane integrity, morphology, immune parameters and antioxidant capacity in early weaned piglets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 198: 286-294
- [27] Tang ZR, Deng H, Sun WZ, et al. Study on the mechanism of orally administered probiotics *Escherichia coli* Nissle 1917 regulating intestine barrier in weaned piglets[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(1): 78-86 (in Chinese)
唐志如, 邓欢, 孙卫忠, 等. 口服益生菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 调控断奶仔猪空肠黏膜屏障功能的机理研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(1): 78-86