

采用实时荧光定量 PCR 法分析小熊猫胃肠道菌群

曾燕¹, 邓家波², 牛李丽², 蒲阳², 李杨¹, 勾堃¹, 曾东¹, 倪学勤^{1*}

(1.四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2.成都动物园, 四川 成都 610081)

摘要: 运用实时荧光定量 PCR 技术, 分析 1 只临床死亡小熊猫胃肠道 13 种菌群的差异性。结果显示: 检测的 13 种菌群在小熊猫不同肠段的数量有差异, 肠杆菌科(Enterobacteriaceae)在各肠段的菌群丰度差异显著($P<0.05$), 其菌群丰度在空肠高达 9.35; 白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)和黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)的数量在直肠最多, 菌群丰度分别达 5.29 和 3.91; 其他菌群的数量均在结肠最多, 其中溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、埃氏巨球形菌(*Megasphaera elsdenii*)和梭菌类群 IV(*Clostridium* cluster IV)的数量在结肠中较高, 菌群丰度分别为 9.03、6.06 和 9.13; 与胃相比, 菌群丰度在小熊猫空肠、结肠和直肠差异显著($P<0.05$)。综合分析, 小熊猫的空肠、结肠和直肠对其健康生长可能起着重要的作用, 肠杆菌科的细菌数量最多且在不同肠段差异显著, 是今后小熊猫胃肠道菌群研究值得关注的菌群之一。

关键词: 小熊猫; 胃; 肠; 菌群; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S858.99

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)06-0638-07

Analysis of the bacteria communities along the gastrointestinal tract of a red panda using real-time fluorescence quantitative PCR

ZENG Yan¹, DENG Jiabo², NIU Lili², PU Yang², LI Yang¹, GOU Kun¹, ZENG Dong¹, NI Xueqin^{1*}

(1.College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2.Chengdu Zoo, Chengdu, Sichuan 610081, China)

Abstract: In this study, real-time fluorescence quantitative PCR was used to investigate the variance of 13 bacteria communities in the different section of gastrointestinal tract (GIT) in a clinical death red panda. The investigated 13 bacteria showed variance in amount in the GIT. Enterobacteriaceae accounts for the major bacteria with its logarithm of bacterial DNA copies is 9.35. The mount of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens* was higher in the rectum, with the logarithmic values of bacterial DNA copies, 5.29 and 3.91, respectively. However, other detected bacteria remained higher number in the colon, and the logarithmic values of bacterial DNA copies of *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii*, and *Clostridium* cluster IV were 9.03, 6.06, and 9.13, respectively. Compared with the stomach, the bacteria communities were significantly different in the jejunum, colon and rectum of the red panda ($P<0.05$). In conclusion, the jejunum, colon and rectum may play an important role in the growth of red panda. Enterobacteriaceae is the most abundant bacteria in the GIT and is worthy of further study.

Keywords: red panda; stomach; intestine; bacteria; real-time fluorescence quantitative PCR

小熊猫(*Ailurus fulgens*)又叫红熊猫, 是一种珍稀野生动物。2015 年, 小熊猫被国际自然保护联盟(IUCN)列为濒危物种, 其种群多分布于中国、印度、尼泊尔、缅甸和不丹等地^[1]。近年来,

小熊猫数量呈逐渐下降趋势。小熊猫是食肉目中以纤维饮食为主的哺乳动物, 与大熊猫一样都喜食箭竹的竹笋、嫩枝和竹叶等。近年来, 研究者应用比较基因组技术比较了小熊猫和大熊猫的全

收稿日期: 2018-09-18

修回日期: 2018-10-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672318); 成都大熊猫繁育研究基金会项目(CPF2017-04)

作者简介: 曾燕(1987—), 女, 四川内江人, 博士研究生, 主要从事动物微生物生态研究, zengyanA@foxmail.com; *通信作者, 倪学勤, 教授, 主要从事动物微生物生态研究, xueqinni@foxmail.com

基因组,发现二者虽然亲缘关系较远,但都有一种能帮助它们进食的伪拇指和具有与竹子进化相似的相关基因 *PCNT* 和 *DYNC2H*^[2-3]。与大熊猫相似,小熊猫无盲肠,其胃肠道具有对食物进行简单发酵的作用;但它的代谢率却与其体型相近的哺乳动物相似,可以满足自身健康生长需要^[4-5]。胃肠道是哺乳动物消化吸收营养物质的重要部位,其中的微生物在宿主对食物的消化吸收方面起着重要的作用。

近年来,已有研究者对小熊猫的粪便微生物进行了相关报道^[6-8]。对小熊猫肠道微生物的研究也已成为科研人员研究的重点^[9],但目前仍鲜见对小熊猫整个胃肠道微生物的研究报道。本课题组已分别应用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术和基于 16S rRNA 的 Illumina HiSeq 高通量测序技术,分析了 1 只临床死亡小熊猫的胃肠道微生物^[10-11],结果发现其胃肠道中栖息着数量巨大且种类不同的微生物,以变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)细菌为主,且来自变形菌门的肠杆菌科(Enterobacteriaceae)菌群的丰度较高。尽管 DGGE 技术能直观地展示小熊猫胃肠道菌群的多样性,且能在一定程度上对亮度较高的条带进行克隆测序及获得该菌种的名称信息;而基于 16S rRNA 的 Illumina HiSeq 高通量测序技术可获得大量的菌群注释和丰度信息,但这 2 种技术均不是有针对性地对胃肠道特定菌群进行定量和分析。基于 PCR 扩增的实时荧光定量 PCR(Q-PCR)技术则具有高灵敏性、高特异性和高准确度等优点而被广泛应用于动物肠道特定菌群的检测。鉴于此,本研究拟采用 Q-PCR 技术,分析 1 只临床死亡小熊猫胃、小肠、大肠和粪便中的优势菌科、纤维降解菌和肠道益生菌等 13 种菌群,旨在为小熊猫的饲养管理与保护提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 小熊猫胃肠道样品

2016 年 7 月,四川省成都动物园 1 只小熊猫因打架导致断尾,临床外敷治疗无效后死亡。于小熊猫死亡当天即行剖检,收集其胃肠道样品。采样部位包括胃、小肠(十二指肠、空肠和回肠)和

大肠(结肠、直肠)。同时,收集 3 只同圈舍小熊猫粪便样品,混合均匀后作为小熊猫的粪便样品。所有样品分别收集至无菌离心管,并立即放置液氮速冻,−80 °C 保存,备用。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂:QIAamp® DNA Stool Mini Kit 购自德国 Qiagen;琼脂糖胶回收试剂盒、pMD®19-T 载体和大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均购自天根生化科技(北京)有限公司;13 对 Q-PCR 细菌引物合成自深圳华大基因有限公司;荧光定量成套试剂和材料购自美国 Bio-Rad。

主要仪器:核酸浓度检测仪(NanoDrop® ND-1000)购自美国 Wilmington;琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像仪和 CFX96 荧光定量 PCR 仪均购自美国 Bio-Rad;大容量高速台式冷冻离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 的提取

分别称取 0.20 g 样品至 2 mL 灭菌 EP 管中,参照 QIAamp®DNA Stool Mini Kit 的说明书步骤进行细菌 DNA 提取。为提高革兰氏阳性细菌的提取率,在水浴步骤将温度提高至 95 °C,同时在最后一步加入 DNA 洗脱液后,将室温孵育的时间由 1 min 延长至 3 min。DNA 浓度和纯度用核酸蛋白检测仪(NanoDrop®ND-1000)进行检测,最后将所有 DNA 置于−20 °C 冰箱保存。

1.3.2 细菌的实时荧光定量 PCR 检测

使用 CFX96 荧光定量 PCR 仪分析小熊猫胃肠道的 13 种菌群,引物见表 1。对所有引物的特异性及熔解温度(T_m 值)进行检测。PCR 反应体系包括 1 μ L 样品 DNA、1 μ L 上游引物、1 μ L 下游引物、12.5 μ L SYBR Premix Ex Taq™ II 和 9.5 μ L ddH₂O,并设置阴性对照。PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s,55~95 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环;所有 PCR 循环结束后 72 °C 延伸 5 min。最后在上述 PCR 反应体系和程序条件下,用确定的 T_m 值建立标准曲线,并对样品进行实时荧光定量检测。每个样品做 3 个重复。根据对应的 C_t 值及标准曲线计算胃肠道样品

细菌 DNA 的拷贝数^[12]。菌群丰度以每克内容物中细菌 DNA 拷贝数的对数值表示。

表1 实时荧光定量PCR引物

Table 1 Primer sequences for Q-PCR analysis in this study				
目标菌群	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	产物大小/bp	文献来源
总细菌	F-CGGCAACGAGCGCAACCC	64	130	[13]
	R-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC			
肠杆菌科	F-CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	57	195	[14]
	R-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC			
瘤胃球菌属	F-GAGTGAAGTAGAGTAAGCGGAATTC	58	75	[15]
	R-GCCGTACTCCCCAGGTGG			
乳酸杆菌属	F-AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	341	[16]
	R-CACCGCTACACATGGAG			
双歧杆菌属	F-TCGCGTCYGGTGTGAAAG	56	243	[17]
	R-CCACATCCAGCRTCCAC			
肠球菌属	F-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	52	144	[17]
	R-ACTCGTTGACTTCCCATTGT			
	R-GTTAGCCGTCCCTTTCTGG			
白色瘤胃球菌	F-CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTTCG	52	175	[18]
	R-CCTCCTTGCGGTTAGAACA			
黄色瘤胃球菌	F-TCTGGAACGGATGGTA	58	295	[18]
	R-CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA			
溶纤维丁酸弧菌	F-CGCATGATGCAGTGTGAAAAGCTC	58	625	[19]
	R-CCTCCCGACCTATTATTCATCG			
埃氏巨球形菌	F-AAGGAGGGGCTTGCCTCT	59	110	[20]
	R-GCCGTGTCTCAGTCCCAATG			
普拉氏梭杆菌	F-CCCTTCAGTGCCGCAGT	57	158	[17]
	R-GTCGCAGGATGTCAAGAC			
	R-TATGCGGTATTAATCTYCCCTTT			
梭菌类群 IV	F-GCACAAGCAGTGGAGT	55	239	[21]
	R-CTTCCTCCGTTTTGTCAA			
梭菌类群 XIVa	F-AAATGACGGTACCTGACTAA	60	440	[22]
	R-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA			

1. 3. 3 数据处理

试验结果用 Excel 2013 进行统计和计算；采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析；采用 GraphPad Prism 5 绘制菌群的柱状图。

2 结果与分析

2.1 小熊猫胃肠道菌群的实时荧光定量 PCR 分析

供试小熊猫胃肠道中 13 种菌群丰度的单因素方差分析结果(表 2)显示，肠杆菌科、乳酸杆菌属(*Lactobacillus* spp.)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium* spp.)、白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*)、黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)、埃氏巨球形菌

(*Megasphaera elsdenii*)和梭菌类群 IV(*Clostridium* cluster IV)的丰度差异显著($P<0.05$)；总细菌、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、普拉氏梭杆菌(*Fusobacterium prausnitzii*)和梭菌类群 XIVa(*Clostridium* cluster XIVa)的丰度差异不显著($P>0.05$)。各肠段丰度差异不显著的菌群在结肠中数量最多，其中瘤胃球菌属的丰度达 9.30，肠球菌属的丰度为 9.23，普拉氏梭杆菌的丰度为 7.02，梭菌类群 XIVa 的丰度为 9.50；而丰度差异显著菌群的丰度最高值出现在不同的肠段。对于大多数肠道菌群而言，结肠是宿主吸收营养物质最重要的部位，大多数菌群在结肠的数量较多；而有些菌群需要在宿主其他的肠段发挥特定的作用，因而其数量在相应的肠段较高。

表2 小熊猫胃肠道菌群丰度

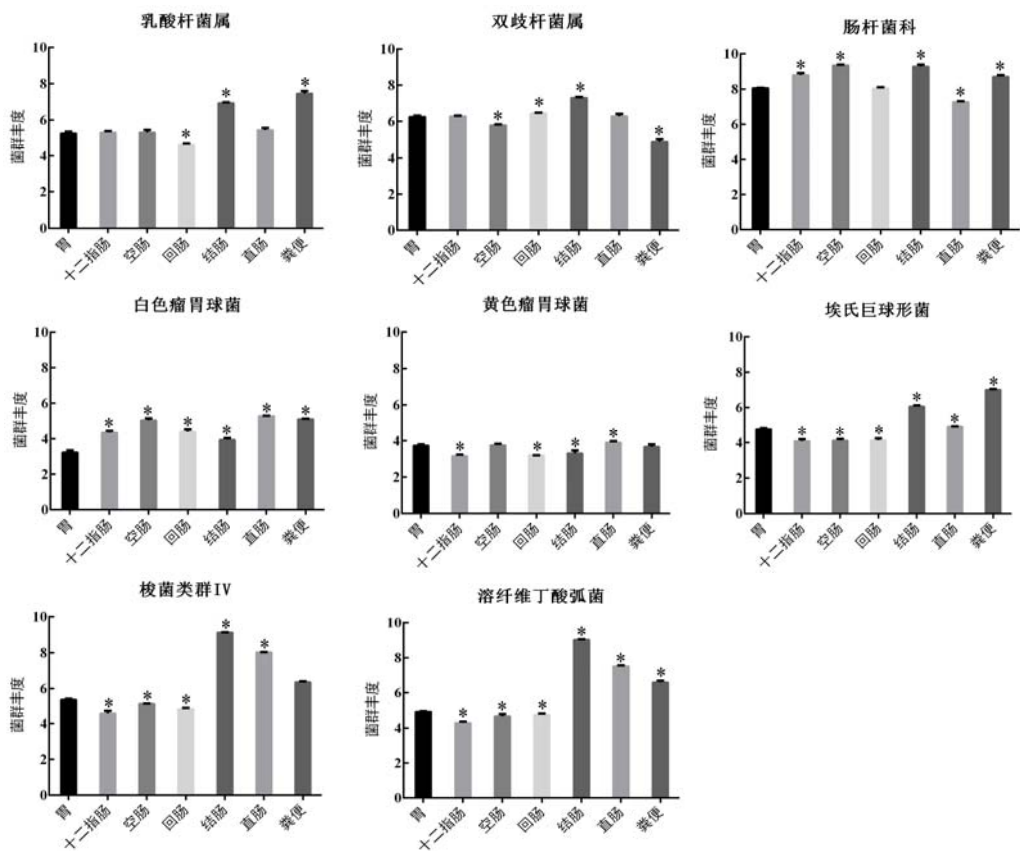
目标菌群	菌群丰度						
	胃	十二指肠	空肠	回肠	结肠	直肠	粪便
总细菌	8.73±0.02	9.59±0.03	9.97±0.10	9.05±0.08	10.40±0.04	8.62±0.01	9.68±0.02
肠杆菌科	(8.06±0.02)b	(8.81±0.10)c	(9.35±0.05)d	(8.05±0.06)b	(9.29±0.10)d	(7.26±0.45)a	(8.71±0.08)c
瘤胃球菌属	6.68±0.07	5.73±0.06	5.72±0.08	5.82±0.10	9.30±0.01	8.16±0.04	7.62±0.02
乳酸杆菌属	(5.28±0.09)b	(5.32±0.07)b	(5.33±0.14)b	(4.64±0.08)a	(6.94±0.05)c	(5.46±0.12)b	(7.47±0.13)d
肠球菌属	7.40±0.02	6.31±0.06	8.29±0.01	6.89±0.07	9.23±0.03	7.34±0.08	8.32±0.25
双歧杆菌属	(6.27±0.06)c	(6.29±0.03)c	(5.79±0.04)b	(6.46±0.03)d	(7.31±0.03)e	(6.30±0.12)c	(4.88±0.13)a
白色瘤胃球菌	(3.24±0.11)a	(4.36±0.10)c	(5.04±0.11)d	(4.41±0.13)c	(3.95±0.10)b	(5.29±0.01)f	(5.11±0.03)e
黄色瘤胃球菌	(3.74±0.05)b	(3.16±0.08)a	(3.76±0.07)bc	(3.20±0.01)a	(3.31±0.16)a	(3.91±0.08)c	(3.67±0.13)b
溶纤维丁酸弧菌	(4.92±0.15)c	(4.31±0.07)a	(4.65±0.11)b	(4.73±0.07)b	(9.03±0.03)f	(7.51±0.04)e	(6.59±0.10)d
埃氏巨球形菌	(4.78±0.60)b	(4.08±0.12)a	(4.12±0.08)a	(4.13±0.11)a	(6.06±0.05)c	(4.92±0.02)c	(7.01±0.04)e
普拉氏梭杆菌	4.31±0.13	3.63±0.01	3.59±0.24	3.82±0.03	7.02±0.04	5.57±0.02	5.55±0.04
梭菌类群 IV	(5.38±0.04)d	(4.61±0.15)a	(5.15±0.15)c	(4.86±0.07)b	(9.13±0.02)f	(8.02±0.02)e	(6.36±0.04)d
梭菌类群 XIVa	5.31±0.14	5.16±0.05	4.79±0.08	5.50±0.08	9.50±0.04	7.76±0.10	6.81±0.10

同行数据后相同字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$)；不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 小熊猫胃肠道差异菌群分析

与胃相比，肠杆菌科、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、溶纤维丁

酸弧菌、埃氏巨球形菌和梭菌类群 IV 的丰度在各肠段显示出一定的差异(图 1)。其中，白色瘤胃球菌、埃氏巨球形菌和溶纤维丁酸弧菌的丰度在小



与胃中的细菌相比，“*”示差异显著($P<0.05$)。

图1 小熊猫胃肠道差异显著菌群的丰度

Fig. 1 Distinct bacteria communities in GIT of the red panda

熊猫的小肠、大肠和粪便中差异显著($P<0.05$)；梭菌类群 IV 的丰度在小肠和大肠中差异显著($P<0.05$)；黄色瘤胃球菌的丰度在十二指肠和大肠中差异显著($P<0.05$)；乳酸杆菌属的丰度在回肠、结肠和粪便中差异显著($P<0.05$)；双歧杆菌属的丰度在空肠、回肠、结肠和粪便中差异显著($P<0.05$)；而肠杆菌科的丰度在十二指肠、空肠、结肠、直肠和粪便中差异显著($P<0.05$)。乳酸杆菌属和双歧杆菌属是哺乳动物肠道常见的益生菌，其丰度在小熊猫结肠较高；而与纤维饮食降解过程有着密切关系的菌群，如白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌的丰度在直肠较高，溶纤维丁酸弧菌、埃氏巨球形菌和梭菌类群 IV 的丰度则在结肠中较高；肠杆菌科的菌群丰度在空肠中最高。这说明空肠、结肠和直肠的菌群对小熊猫的健康生长可能起着重要作用。

3 结论与讨论

本研究采用 Q-PCR 技术检测了 1 只临床死亡小熊猫胃肠道 13 种菌群，其中，除白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌的丰度在直肠最高、肠杆菌科的丰度在空肠最高外，其他菌群的丰度均在小熊猫的结肠最高。白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌是反刍动物胃肠道(特别是瘤胃)主要的纤维降解菌，能将宿主难以直接消化的纤维物质在初次到达消化道时就被逐一降解，并产生乙酸、丙酸和丁酸等营养物质被宿主吸收和利用^[23]。小熊猫虽然以箭竹等纤维类为主要食物，但其在动物食性分类上仍旧归为肉食动物^[24]，并且与其他哺乳动物相比，小熊猫是无盲肠的动物，食物在其消化道中滞留的时间较短^[25]。小熊猫具有较长的小肠和较短的大肠等消化道结构特征^[4]，这使得其进食的纤维类食物在消化道中被快速地通过，因而使其后肠段中也分布着较多的纤维降解菌。如本研究中的白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌、溶纤维丁酸弧菌、梭菌类群 XIVa 和梭菌类群 IV 等在小熊猫的后肠段中被大量检测出。本研究中大多数菌属(乳酸杆菌属、双歧杆菌属和肠球菌属等)的丰度在小熊猫结肠最高，这可能与其结肠的消化功能密切相关。这个结果与本课题组前期对小熊猫胃肠道菌群的 DGGE 分析和高通量测序分析结果^[10-11]—

致，3 种检测结果均表明小熊猫大肠菌群的丰度和多样性较高。结肠是哺乳动物胃肠道中参与吸收、分泌和细菌消化的活跃部位，前肠中未被分解的植物多糖在该肠段被其中的厌氧菌分解，且微生物的数量及多样性不易受外界物质影响^[26]。这可能也是本研究中检测的差异不显著菌群在小熊猫结肠的丰度仍然较高的原因。本研究未对其消化道代谢物质进行检测，因此，今后的研究有必要结合胃肠道代谢物进行分析。

2018 年，研究者运用高通量测序技术对不同食性哺乳动物(食肉动物、杂食食肉动物、草食食肉动物和草食动物)粪便的菌群进行了深入分析，与其他食性的动物相比，厚壁菌门、蓝藻菌门(Cyanobacteria)、蓝藻菌科(Cyanobacteraceae)、肠杆菌科、梭菌科和肠球菌属是小熊猫和大熊猫等的差异菌群^[27]。同样，本研究也检测了几种差异菌群，但小熊猫胃肠道的肠球菌属和梭菌类群 XIVa 丰度差异不显著，而肠杆菌科的丰度差异显著。肠球菌属和梭菌类群 XIVa 都是属于厚壁菌门的菌群，在本课题组前期对小熊猫胃肠道菌群的研究中，也发现厚壁菌门是仅次于变形菌门的优势菌门，且其属水平的优势菌为肠球菌属和梭菌属^[10]。测序研究发现，梭菌类群 XIVa 是大熊猫粪便菌群中消化纤维素的主要菌群之一^[28]。同样，研究者对野生和圈养小熊猫粪便微生物进行高通量测序发现，来自厚壁菌门的未鉴定 OTU001 是圈养小熊猫粪便优势菌，而来自变形菌门的假单胞菌科 OTU003 则是野生小熊猫粪便优势菌^[8]。然而，本研究仅对来自变形菌门的肠杆菌科进行了分析，结果表明该菌群是小熊猫胃肠道的差异菌群，且在空肠、结肠和粪便中的丰度较高。通常，肠杆菌科中大多数菌属是条件致病菌，但近年来也发现肠杆菌科中一些菌属对动物肠道的消化吸收是有益的。例如，来自肠杆菌科的埃希氏杆菌属志贺氏杆菌在以竹子嫩枝为主食的大熊猫肠道中是优势菌群，可能参与了氨基酸转运代谢过程^[29]。同时，埃希氏杆菌属志贺氏杆菌也是不同断奶阶段小熊猫粪便中的优势菌群^[6]。本课题组前期对小熊猫胃肠道菌群的高通量测序结果中发现，埃希氏杆菌属是其胃肠道的优势菌属^[10]，但未对该菌属具体的功能和作用进行分析；因此，

肠杆菌科(特别是埃希氏杆菌属志贺氏杆菌)的培养、分离鉴定及代谢相关研究可作为今后小熊猫菌群研究的方向之一。

研究表明,梭菌属、乳酸杆菌属和拟杆菌属在动物死亡后的第 6~9 天会分解利用尸体的有机物继续繁殖生长^[30],而本研究的小熊猫胃肠道样品采集自其死亡的当天,故胃肠道微生物不会受其死亡的影响。另外,本研究仅对 1 只临床死亡的小熊猫胃肠道微生物进行了研究,动物数量和样品有限,所以今后应关注更多小熊猫胃肠道菌群及与其他野生动物菌群的比较分析。

综上所述,小熊猫胃肠道不同肠段栖息着大量细菌且其丰度有差异,大多数菌群的丰度在结肠较高,而肠杆菌科菌群丰度在空肠最高且在各肠段差异显著,今后可作为小熊猫胃肠道菌群研究的主要方向之一。

参考文献:

- [1] 高耀亭,汪松,张曼丽,等.中国动物志:兽纲:第八卷[M].北京:科学出版社,1987.
- [2] HU Y B, WU Q, MA S, et al. Comparative genomics reveals convergent evolution between the bamboo eating giant and red pandas[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(5): 1081-1086.
- [3] SHAN L, WU Q, WANG L, et al. Lineage-specific evolution of bitter taste receptor genes in the giant and red pandas implies dietary adaptation[J]. Integrative Zoology, 2018, 13(2): 152-159.
- [4] 孙克显,吴天祺,谈克毅,等.小熊猫消化系统的解剖观察[J].西北民族学院学报,1980(2): 3-12.
- [5] FEI Y X, HOU R, SPOTILA J R, et al. Metabolic rate of the red panda, *Ailurus fulgens*, a dietary bamboo specialist [J]. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173274.
- [6] WILLIAMS C L, DILL-MCFARLAND K A, SPARKS D L, et al. Dietary changes during weaning shape the gut microbiota of red pandas (*Ailurus fulgens*)[J]. Conservation Physiology, 2018, 6(1): cox075.
- [7] LI Y, GUO W, HAN S S, et al. The evolution of the gut microbiota in the giant and the red pandas[J]. Scientific Reports, 2015, 5(2): 10185.
- [8] KONG F L, ZHAO J C, HAN S S, et al. Characterization of the gut microbiota in the red panda (*Ailurus fulgens*)[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e87885.
- [9] THAPA A, HU Y B, WEI F W. The endangered red panda(*Ailurus fulgens*): ecology and conservation approaches across the entire range[J]. Biological Conservation, 2018, 220: 112-121.
- [10] 李杨,邓家波,牛李丽,等.采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术分析小熊猫胃肠道菌群的多样性[J].动物营养学报,2017,29(9): 3167-3174.
- [11] ZENG Y, ZENG D, ZHOU Y, et al. Microbial biogeography along the gastrointestinal tract of a red panda[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1411.
- [12] WHELAN J A, RUSSELL N B, WHELAN M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 278(1): 261-269.
- [13] DENMAN S E, MCSWEENEY C S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 58(3): 572-582.
- [14] BARTOSCH S, FITE A, MACFARLANE G T, et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3575-3581.
- [15] WEIMER P J, STEVENSON D M, MERTENS D R, et al. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(1): 135-145.
- [16] WALTER J, HERTEL C, TANNOCK G W, et al. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2578-2585.
- [17] RINTTILÄ T, KASSINEN A, MALINEN E, et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(6): 1166-1177.
- [18] KOIKE S, KOBAYASHI Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 204(2): 361-366.
- [19] FERNANDO S C, PURVIS H T, NAJAR F Z, et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7482-7490.
- [20] LIU S J, BU D P, WANG J Q, et al. Effect of

- ruminal pulse dose of polyunsaturated fatty acids on ruminal microbial populations and duodenal flow and milk profiles of fatty acids[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(6): 2977–2985.
- [21] MATSUKI T, WATANABE K, FUJIMOTO J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7220–7228.
- [22] MATSUKI T, WATANABE K, FUJIMOTO J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5445–5451.
- [23] WANG J, FAN H, HAN Y, et al. Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis [J]. *Asian-Australas Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(1): 100–110.
- [24] LIU J, WANG X P, CHO S, et al. Evolutionary and functional novelty of pancreatic ribonuclease: a study of *Musteloidea* (order *Carnivora*) [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5070.
- [25] 吴登虎, 谢幼新, 胡洪光, 等. 小熊猫的消化试验 [J]. *四川师范学院学报(自然科学版)*, 1995, 16(4): 336–342.
- [26] SASAKI D, SASAKI K, IKUTA N, et al. Low amounts of dietary fibre increase in vitro production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 435.
- [27] ZHU L, WU Q, DENG C, et al. Adaptive evolution to a high purine and fat diet of carnivorans revealed by gut microbiomes and host genomes[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(5): 1711–1722.
- [28] ZHU L, WU Q, DAI J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(43): 17714–17719.
- [29] WU Q, WANG X, DING Y, et al. Seasonal variation in nutrient utilization shapes gut microbiome structure and function in wild giant pandas[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017, 284(1862): 20170955.
- [30] HYDE E R, HAARMANN DP, LYNNE A M, et al. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77733.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 柳 正