



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104161776 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201410235117. 8

(22) 申请日 2014. 05. 29

(71) 申请人 浙江大学宁波理工学院

地址 315100 浙江省宁波市鄞州区钱湖南路
1 号

(72) 发明人 王进波 齐莉莉 费明明 梅乐和

(74) 专利代理机构 宁波市鄞州甬致专利代理事
务所(普通合伙) 33228

代理人 代忠炯

(51) Int. Cl.

A61K 35/74(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

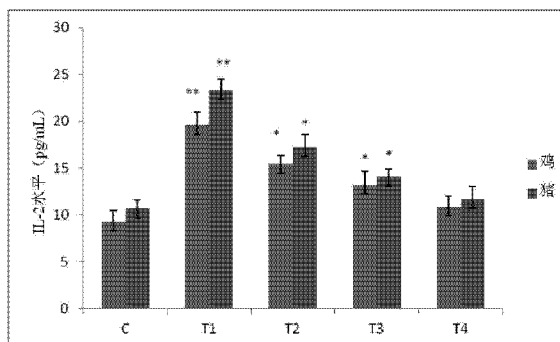
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

来自丁酸梭菌的脂磷壁酸及其调节畜禽免疫
应答的用途

(57) 摘要

本发明公开一种来自丁酸梭菌的脂磷壁酸及其调节畜禽免疫应答的用途,先配制成质量百分比为 1.5-2.5% 的 TX-114 溶液备用;然后取 8-16mL 经 45-50h 培养的丁酸梭菌液离心分层得到菌体湿重;加入 TX-114 溶液离心得到脂磷壁酸的粗提取物;然后在 DEAE-纤维素层析柱上过柱得到脂磷壁酸。本发明具有能够改善畜禽的肠道免疫功能,抑制病原菌在肠粘膜细胞表面的粘附定植,降低肠道传染病发病率,提高畜禽养殖业经济效益的优点。



1. 一种来自丁酸梭菌的脂磷壁酸,其特征在于:该脂磷壁酸为由如下制备步骤制备而成的脂磷壁酸:

(1) 向 40-60mmol/L、pH6-7 的 Tris-HCl 缓冲液中加 TritonX-114,配制成质量百分比为 1.5-2.5% 的 TX-114 溶液,置于 4℃ 冰箱保存,备用;

(2) 取 8-16mL 经 45-50h 培养的丁酸梭菌液于若干支质量已知的塑料离心管中,常温、4500-5000rpm 离心 25-40min,除去上层培养液后再称各管质量,计算得到菌体湿重;

(3) 按照步骤 (2) 制得的每 1g 湿菌添加 8-12mL 步骤 (1) 的 1.5-2.5% TX-114 溶液的比例混合,磁力搅拌器搅拌裂解菌体 25-40min,4℃ 静置过夜;然后 4℃、4500-5000rpm 离心 25-40min,去除细菌碎片,收集上层提取物;提取物置于 45-50℃ 水浴中 25-30min,然后常温 4500-5000rpm 离心 25-40min,收集上层水相,即为脂磷壁酸的粗提取物;

(4) 先用 0.1mol/LpH4.7 的醋酸铵缓冲液预平衡 DEAE-纤维素层析柱,然后向脂磷壁酸粗提取物中加入 5 倍其体积的 0.1MpH4.7 的醋酸铵缓冲液,稀释后过柱;用同一缓冲液洗脱,直到洗脱液 275nm 吸光度 A275 低于 0.01,然后用 1.0mol/LpH4.7 醋酸铵缓冲液洗脱结合于柱上的脂磷壁酸,整个过程用试管收集洗脱液,A275 监测脂磷壁酸洗脱峰;得到脂磷壁酸。

2. 根据权利要求 1 所述的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸,其特征在于:该脂磷壁酸与其他革兰氏阳性菌的细胞壁脂磷壁酸结构存在差异,该脂磷壁酸不会引起肠粘膜上皮细胞释放炎症因子,所述的炎症因子为 IL-2 和 TNF- α 。

3. 根据权利要求 1 所述的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸,其特征在于:步骤 (1) 的 Tris-HCl 缓冲液为 50mmol/L、pH6.5, TX-114 溶液质量百分比浓度为 2%。

4. 根据权利要求 1 所述的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸,其特征在于:步骤 (3) 中每 1g 湿菌添加 10mL 的 2% TX-114 溶液。

5. 根据权利要求 1 所述的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸,其特征在于:步骤 (2) 的丁酸梭菌液培养条件为:37℃ 厌氧培养,其培养基为 MRS 培养基,MRS 培养基配方:酪蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、酵母粉 5g、葡萄糖 20g、乙酸钠 5g、吐温-80 1g、磷酸氢二钾 2g、七水硫酸锰 0.2g、七水硫酸锰 0.05g、碳酸钙 20g、蒸馏水 1000mL, pH7.0。

6. 一种权利要求 1 所述的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸在畜禽养殖中的应用,该脂磷壁酸在畜禽饲料中的添加量以丁酸梭菌的量计,为 108cfu/g-1010cfu/g。

7. 一种权利要求 1 所述的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸在调节畜禽免疫应答中的应用,所述的免疫应答由致病性革兰氏阳性菌和阴性菌或它们的衍生物所诱导。

来自丁酸梭菌的脂磷壁酸及其调节畜禽免疫应答的用途

技术领域：

[0001] 本发明涉及调节畜禽免疫应答的丁酸梭菌细胞壁脂磷壁酸，所述免疫应答是由致病菌或其菌体成分诱导。

背景技术：

[0002] 肠道传染病是集约化畜禽养殖中最常见的传染病之一，主要由致病性大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、霍乱弧菌等病原引起。这类疾病的传染性强，死亡率高，对畜禽养殖业的危害十分严重。这些肠道传染病病原还可能从动物传播到人，引发人体肠道疾病，对消费者的身体健康造成潜在威胁。目前，饲料中添加抗菌药物仍是防治畜禽肠道传染病的主要手段。但这一防治手段带来的系列问题已成为社会关注的焦点：(1) 长期使用抗菌药物导致病原菌产生耐药性，这给动物甚至人类传染性疾病预防带来了更大的困难；(2) 会在畜禽肉蛋奶类产品产生抗菌药物残留，危害消费者的健康；(3) 未被畜禽消化、吸收和降解的抗生素随动物粪便排出体外，对土壤、水体造成污染，间接危害消费者的健康。在传统的畜禽养殖过程中，畜禽肠道传染病的发生率则很低。这是因为正常动物肠道中生存者大量共生菌，这些共生菌能够通过群体效应，抑制病原菌在肠道中的粘附、定植与侵染，调控动物肠道免疫应答反应，防止肠道传染病的发生。基于这一背景，人们开发了多种微生态制剂，通过调节动物肠道菌群结构来防治动物肠道传染病。微生态制剂具有不导致细菌产生耐药性、无残留、环境友好等优点，但微生态制剂的作用效果受动物种类、年龄、养殖环境、饲料加工方式和投喂方式等多种因素影响，不易于实施。

发明内容

[0003] 本发明针对现有技术的上述不足，提供一种能够改善畜禽的肠道免疫功能，抑制病原菌在肠粘膜细胞表面的粘附定植，降低肠道传染病发病率，提高畜禽养殖业经济效益的来自丁酸梭菌的脂磷壁酸。

[0004] 本发明运用 TritonX-114 破碎丁酸梭菌细胞，再用离子交换树脂分离纯化脂磷壁酸，进而利用截留分子量为 3500 的半透膜进行透析，除去其中的杂质，获得纯的脂磷壁酸；具体制备步骤包括：

[0005] (1) 向 40-60mmol/L、pH6-7 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 TritonX-114 (TRITONX-114 CAS:9036-19-5)，配制成质量百分比为 1.5-2.5% 的 TX-114 溶液（即 TRITONX-114 质量百分比为 1.5-2.5% 的 TRITONX-114 溶液），置于 4℃ 冰箱保存，备用；

[0006] (2) 取 8-16mL 经 45-50h 培养的丁酸梭菌液于若干支质量已知的塑料离心管中，常温、4500-5000rpm 离心 25-40min，除去上层培养液后再称各管质量，计算得到菌体湿重；

[0007] (3) 按照每 1g 湿菌（步骤 2 的菌体）添加 8-12mL 步骤 (1) 的 1.5-2.5% TX-114 溶液的比例混合，磁力搅拌器搅拌裂解菌体 25-40min，4℃ 静置过夜；然后 4℃、4500-5000rpm 离心 25-40min，去除细菌碎片，收集上层提取物；提取物置于 45-50℃ 水浴中 25-30min，然后常温 4500-5000rpm 离心 25-40min，收集上层水相，即为脂磷壁酸的粗提取

物；

[0008] (4) 先用 0.1M(mol/L)pH4.7 的醋酸铵缓冲液预平衡 DEAE-纤维素层析柱(2×20cm 即直径×长度),然后向脂磷壁酸粗提取物中加入 5 倍其体积的 0.1MpH4.7 的醋酸铵缓冲液,稀释后过柱;用同一缓冲液(0.1MpH4.7 的醋酸铵缓冲液)洗脱,直到洗脱液 275nm 吸光度 A₂₇₅ 低于 0.01,然后用 1.0mol/LpH4.7 醋酸铵缓冲液洗脱结合于柱上的脂磷壁酸,整个过程用试管收集洗脱液,A₂₇₅ 监测脂磷壁酸洗脱峰;得到脂磷壁酸。

[0009] 作为优选,本发明步骤(1)的 Tris-HCl 缓冲液为 50mmol/L、pH6.5, TX-114 溶液质量百分比浓度为 2%。

[0010] 作为优选,步骤(3)每 1g 湿菌添加 10mL 的 2% TX-114 溶液。

[0011] 本发明步骤(2)的丁酸梭菌液培养条件为:37℃ 厌氧培养,其培养基为 MRS 培养基, MRS 培养基配方:酪蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、酵母粉 5g、葡萄糖 20g、乙酸钠 5g、吐温-801g、磷酸氢二钾 2g、七水硫酸锰 0.2g、七水硫酸锰 0.05g、碳酸钙 20g、蒸馏水 1000mL, pH7.0。

[0012] 本发明将丁酸梭菌脂磷壁酸用于畜禽养殖中进行应用即来自丁酸梭菌的脂磷壁酸在畜禽养殖中的应用,该脂磷壁酸在畜禽饲料中的添加量以丁酸梭菌的量计,为 10⁸cfu/g-10¹⁰cfu/g(是“10⁸cfu/g-10¹⁰cfu 丁酸梭菌菌体中的磷壁酸成分”的意思;也就是说,原来是直接添加菌体的,现在改为添加同样数量菌体中的磷壁酸成分)。

[0013] 本发明上述丁酸梭菌脂磷壁酸在调节畜禽免疫应答中的应用,所述的免疫应答由致病性革兰氏阳性菌和阴性菌或它们的衍生物所诱导。

[0014] 本发明所述的脂磷壁酸与其他革兰氏阳性菌的细胞壁脂磷壁酸结构存在差异,该脂磷壁酸不会引起肠粘膜上皮细胞释放炎症因子,所述的炎症因子为 IL-2 和 TNF-α。

[0015] 本发明的丁酸梭菌为日本米雅利桑株式会社的 MIYAIRI II 588 菌株。

[0016] 本发明的优点和有益效果:

[0017] 1. 本发明从水产动物的免疫机能调节机制出发,研究了丁酸梭菌脂磷壁酸对病原菌脂多糖诱导的肠粘膜上皮细胞 IL-2、TNF-α 等炎症因子分泌的影响,分析了丁酸梭菌脂磷壁酸对仔猪、肉鸡攻毒试验的保护作用,证明该脂磷壁酸能够抑制病原技能脂多糖诱导的肠粘膜上皮细胞炎症因子的释放,显著降低致病菌导致的仔猪、肉鸡发病率 and 死亡率,具有成为新型畜禽免疫调节剂的潜力,市场前景十分看好。

[0018] 2. 本发明基于益生菌的益生作用机制,分离纯化丁酸梭菌的细胞壁脂磷壁酸,用以调节畜禽肠道免疫机能,防治畜禽肠道传染病。脂磷壁酸是革兰氏阳性菌细胞壁的主要组成成分之一,是一类由多聚磷酸甘油酯或多聚磷酸核糖醇构成的阴离子聚合物,其链上羟基往往被丙氨酸或 N-乙酰葡萄糖胺修饰,因此通常还带有正电荷,形成正、负电荷交替出现的链状聚合物结构。磷壁酸对革兰氏阳性菌的生理功能主要包括:(1) 维持细菌细胞壁中阳离子的浓度平衡;(2) 保护细菌免受抗生素、表面活性剂、溶菌酶和热应激等的损伤;(3) 参与细菌细胞分裂,并在参与细菌自溶过程;(4) 在革兰氏阳性菌与宿主细胞的互动及免疫调节过程中发挥着十分重要的作用。不同细菌来源的脂磷壁酸结构与性质呈现很大差异。金黄色葡萄球菌脂磷壁酸能够人全血细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 等因子的分泌(Morath 等,2001, The Journal of Experimental Medicine,193(3):393-398; Hermann 等,2002, European Journal of Immunology,32(2):541-551)。肺炎链球菌脂磷

壁酸刺激机体细胞产生 TNF- α 的能力比金黄色葡萄球菌脂磷壁酸弱,这可能是二者结构不同的缘故 (HAN 等,2003, Infection and Immunity, 71(10):5541-5548)。植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 脂磷壁酸则能够抑制金黄色葡萄球菌磷壁酸诱导的 TNF- α 产生 (Kim 等,2008, Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(6):1191-1196)。也有研究发现,植物乳杆菌磷壁酸能够刺激巨噬细胞一氧化氮 (NO) 的产生,从而发挥抗炎作用 (Kang 等,2011, Molecular Immunology, 48:2170-2177)。

[0019] 3. 本发明分离纯化肠道共生菌丁酸梭菌的脂磷壁酸,该脂磷壁酸能够改善畜禽的肠道免疫功能,抑制病原菌在肠粘膜细胞表面的粘附定植,降低肠道传染病发病率,提高畜禽养殖业经济效益。

附图说明

[0020] 图 1、丁酸梭菌脂磷壁酸对大肠杆菌脂多糖诱导的肠粘膜上皮组织 IL-2 分泌的影响。

[0021] 图 2、丁酸梭菌脂磷壁酸对大肠杆菌脂多糖诱导的肠粘膜上皮组织 TNF- α 分泌的影响。

[0022] 图 3 丁酸梭菌脂磷壁酸对沙门氏菌感染肉仔鸡回肠组织抗体水平的影响。

[0023] 图 4 丁酸梭菌脂磷壁酸对 EPEC 诱导仔猪肠粘膜组织 IL-1 β mRNA 表达量的影响。

[0024] 图 5 丁酸梭菌脂磷壁酸对 EPEC 诱导仔猪肠粘膜组织 TNF- α mRNA 表达量的影响。

[0025] 图 6 丁酸梭菌脂磷壁酸对 EPEC 所致仔猪腹泻率的影响。

[0026] 图 7 丁酸梭菌脂磷壁酸的红外光谱图。

[0027] 图 8 丁酸梭菌脂磷壁酸的 ¹H NMR 谱图。

具体实施方式

[0028] 下面通过实施例进一步详细描述本发明,但本发明不仅仅局限于以下实施例。

[0029] 1、丁酸梭菌脂磷壁酸的提取制备方法

[0030] 以 50mmol/L、pH6.5 Tris-HCL 缓冲液加 TritonX-114 配制成 2% TX-114 溶液,4℃ 冰箱保存,备用。取 10mL 经 48h 培养的丁酸梭菌液 (37℃ 厌氧培养,其培养基为 MRS 培养基, MRS 培养基配方:酪蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、酵母粉 5g、葡萄糖 20g、乙酸钠 5g、吐温 -801g、磷酸氢二钾 2g、七水硫酸锰 0.2g、七水硫酸锰 0.05g、碳酸钙 20g、蒸馏水 1000mL, pH7.0) 于若干支质量已知的塑料离心管中,常温、5000rpm 离心 30min,除去上层培养液后再称各管质量,计算得到菌体湿重。按照每 1g 湿菌添加 10mL 2% TX-114 溶液的比例,磁力搅拌器搅拌裂解菌体 30min,4℃ 静置过夜。4℃、5000rpm 离心 30min,去除细菌碎片,收集上层提取物。提取物 50℃ 水浴 30min,常温 5000rpm 离心 30min,轻轻收集上层水相,即为磷壁酸的粗提取物。用 0.1M pH4.7 的醋酸铵缓冲液预平衡 DEAE-纤维素层析柱 (2×20cm),磷壁酸粗提取物中加入 5 倍体积的醋酸铵缓冲液,稀释后过柱。用同一缓冲液洗脱,直到洗脱液 275nm 吸光度 A_{275} 低于 0.01,用 1.0mol/L pH4.7 醋酸铵缓冲液洗脱结合于柱上的磷壁酸,整个过程用试管收集洗脱液, A_{275} 监测磷壁酸洗脱峰。通过红外和核磁检测,如图 7 和 8 所示,得出本发明上述方法获得了丁酸梭菌脂磷壁酸。

[0031] 2、肠粘膜组织的分离培养

[0032] 新生仔猪心脏采血致死,肉仔鸡则取 19 日鸡胚。无菌操作取出回肠、结肠组织,以置于含 2ug/mL 抑肽酶 (aprotinin) 的 pH7.4 的 PBS 中保存,用 4℃ pH7.4 的 PBS 洗涤数次,小心地将组织切成 1cm² 的小块。将组织块置于细胞培养板中培养,使其贴壁生长,用于后续研究。

[0033] 3、按照相当于丁酸梭菌 10⁸cfu/mL 到 10¹⁰cfu/mL 的量,添加丁酸梭菌脂磷壁酸溶液到仔猪及肉鸡肠粘膜组织培养板中,37℃ 孵育 30min 后,添加 100ng/mL 大肠杆菌脂多糖 (LPS),37℃ 孵育 24 小时后,分析其 IL-2、IL-8、TNF- α 等炎症因子的水平。本试验中,未经任何处理的肠粘膜上皮组织为对照组 (C)、大肠杆菌 LPS 处理组 (T0)、相当于 10⁸cfu/mL 丁酸梭菌的脂磷壁酸 +LPS 组 (T1)、相当于 10⁹cfu/mL 丁酸梭菌的脂磷壁酸 +LPS 组 (T2)、相当于 10¹⁰cfu/mL 丁酸梭菌的脂磷壁酸 +LPS 组 (T3)。

[0034] IL-2 水平的分析采用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法 (ELISA)。将标准品、待测样本加入到预先包被鸡 (猪) 白细胞介素 2(IL-2) 单克隆抗体透明酶标包被板中,温育足够时间后,洗涤除去未结合的成分,再加入酶标工作液,温育足够时间后,洗涤除去未结合的成分。依次加入底物 A、B,底物 (TMB) 在辣根过氧化物酶 (HRP) 催化下转化为蓝色产物,在酸的作用下变成黄色,颜色的深浅与样品中鸡 (猪) 白细胞介素 2(IL-2) 浓度呈正相关,450nm 波长下测定 OD 值,根据标准品和样品的 OD 值,计算样本中鸡 (猪) 白细胞介素 2(IL-2) 含量。结果如图 1。

[0035] 白细胞介素 2(IL-2) 是由多种细胞受到刺激后产生的一种前炎症因子,能够刺激机体发生炎症反应。由图 1 可知,添加丁酸梭菌脂磷壁酸能够显著降低大肠杆菌 LPS 刺激的鸡、猪肠粘膜上皮细胞炎症因子 IL-2 的分泌,调节动物机体免疫应激反应,从而保护动物机体健康。

[0036] 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一种重要的前炎性因子,能够导致机体发生炎症反应,致病菌脂多糖能够通过刺激多种细胞分泌 TNF- α ,从而诱导机体发生炎症。由图 2 可知,丁酸梭菌脂磷壁酸能够显著抑制由大肠杆菌 LPS 导致的 TNF- α 的分泌,这说明丁酸梭菌的脂磷壁酸成分能够通过抑制肠粘膜组织炎症因子 TNF- α 的分泌,发挥抗炎症作用。

[0037] 4、按照相当于 10⁸cfu/g 到 10¹⁰cfu/g 的菌量,在畜禽饲料中添加丁酸梭菌脂磷壁酸,7 日龄 AA 肉鸡每只每天灌服 5.0 \times 10⁴cfu 沙门氏菌进行攻毒试验,试验期为 14 天,分析肉仔鸡发病率、死亡率和肠道粘膜免疫应答水平变化,确定丁酸梭菌脂磷壁酸对 AA 肉鸡的保护作用。

[0038] 表 1 丁酸梭菌脂磷壁酸对 AA 肉鸡病死率的影响 (%)

[0039]

		对照组	感染对照组	T1 组	T2 组	T3 组
14 日 龄	白痢发生率	4.23± 0.19 ^A	86.65± 2.64 ^{Ba}	78.46± 3.11 ^{Bb}	72.99± 1.91 ^{Bc}	67.23± 2.03 ^C
	死亡率	2.36±0.65 A	41.32± 1.02 ^{Ba}	35.22± 2.31 ^{BCb}	31.67± 2.97 ^{Cc}	30.07± 2.46 ^{Cc}
21 日 龄	白痢发生率	5.29±0.91 A	92.33± 3.36 ^B	84.27± 2.64 ^{Ca}	73.16± 0.97 ^{Cb}	69.12± 1.21 ^D
	死亡率	3.12±0.98 A	51.22± 2.51 ^{Ba}	44.21± 2.59 ^{Bb}	35.24± 2.14 ^C	34.04± 1.11 ^C

[0040] 在攻毒试验中, T1 组添加相当于 10^8 cfu/g 丁酸梭菌的脂磷壁酸, T2 组添加相当于 10^9 cfu/g 丁酸梭菌的脂磷壁酸, T3 组添加相当于 10^{10} cfu/g 丁酸梭菌的脂磷壁酸。

[0041] 由表 1 可知, 丁酸梭菌脂磷壁酸能够显著降低沙门氏菌导致的 AA 肉鸡死亡率和白痢发生率, 这可能是由于该磷壁酸成分能够抑制沙门氏菌在肉鸡肠道中的定植, 并能够调节其肠道免疫应答反应, 提高机体免疫机能。

[0042] 从图 3 可以看出, 沙门氏菌感染后, 回肠组织 IgG 水平显著升高, SIgA 的水平则没有显著变化。日粮添加丁酸梭菌脂磷壁酸则可以显著提高各感染组的抗体水平, 这说明丁酸梭菌脂磷壁酸能够刺激机体免疫机能, 产生相关抗体, 以抑制病原菌对机体的侵染。

[0043] 5、选取 120 头 28 日龄断乳仔猪, 按照 10^9 cfu/ 头的剂量灌服致病性大肠杆菌 (EPEC), 进行攻毒试验。C 组为未攻毒的空白对照组, T0 感染对照组, T1 组添加相当于 10^8 cfu/g 丁酸梭菌的脂磷壁酸, T2 组添加相当于 10^9 cfu/g 丁酸梭菌的脂磷壁酸, T3 组添加相当于 10^{10} cfu/g 丁酸梭菌的脂磷壁酸, 进行为期 21 天的饲养试验。饲养试验结束后, 取仔猪回肠粘膜组织、血清, 分别测定其 IL-1 β 、TNF- α 及免疫球蛋白的表达水平, 并统计仔猪腹泻发生率。

[0044] 表 2 丁酸梭菌脂磷壁酸对仔猪血清免疫球蛋白水平的影响 (mg/mL)

[0045]

指标	攻毒天数	组别				
		C	T0	T1	T2	T3
IgG	7	2.43±	2.67±	2.89±	3.21±	3.89±
		0.17 ^{Aa}	0.23 ^{Ab}	0.19 ^{Ab}	0.22 ^{ABc}	0.28 ^{Bd}
	14	2.56±	2.97±	3.24±	3.88±	4.12±
		0.24 ^{Aa}	0.15 ^{ABb}	0.26 ^B	0.30 ^{Cc}	0.21 ^{Cd}
	21	3.01±	3.45±	3.69±	4.01±	4.44±
		0.14 ^{Aa}	0.31 ^{ABb}	0.30 ^{Bc}	0.27 ^B	0.30 ^C
IgM	7	0.56±	0.61±	0.69±	0.76±	0.88±
		0.09 ^{Aa}	0.08 ^{Ab}	0.11 ^{Bc}	0.10 ^{Bd}	0.14 ^C
	14	0.61±	0.65±	0.72±	0.78±	0.91±
		0.04 ^{Aa}	0.05 ^{Aa}	0.07 ^{Ab}	0.10 ^B	0.15 ^C
	21	0.66±	0.71±	0.76±	0.81±	0.97±
		0.11 ^{Aa}	0.09 ^{Aa}	0.10 ^{Ab}	0.11 ^B	0.13 ^C
IgA	7	0.21±	0.24±	0.27±	0.31±	0.37±
		0.03 ^{Aa}	0.02 ^{Ab}	0.04 ^{Ab}	0.05 ^{Bc}	0.04 ^{Bd}
	14	0.28±	0.35±	0.41±	0.47±	0.55±
		0.02 ^{Aa}	0.05 ^{ABb}	0.04 ^{Bc}	0.05 ^{BCd}	0.06 ^C
	21	0.32±	0.37±	0.45±	0.51±	0.61±
		0.05 ^{Aa}	0.06 ^{Ab}	0.05 ^{Bc}	0.04 ^{Bd}	0.07 ^C

[0046] 由表 2 可见,添加丁酸梭菌脂磷壁酸的 T1、T2、T3 组攻毒仔猪血清中 IgG、IgA、IgM 等抗体的水平显著上升,这说明该脂磷壁酸能够刺激仔猪机体的免疫机能,促进抗体的合成和分泌,从而提升仔猪对抗病原的能力。

[0047] 本研究运用荧光定量 PCR 技术,研究了丁酸梭菌脂磷壁酸对致病性大肠杆菌诱导的仔猪肠粘膜组织 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达的影响,结果如图 4、5。

[0048] 从图 4、图 5 可以看出,攻毒对照组 (T0) 仔猪肠粘膜组织 IL-1 β 、TNF- α 等 2 种炎症因子 mRNA 的水平显著升高 ($P < 0.01$),丁酸梭菌脂磷壁酸能够显著抑制由致病性大肠杆菌因子的肠粘膜组织炎症因子的升高,当日粮中脂磷壁酸添加量相当于 10^{10} cfu/g 丁酸梭菌时,其 TNF- α 的表达水平已接近未攻毒的空白对照组,作用效果显著。这些结果表明,丁酸梭菌脂磷壁酸可以通过调节肠粘膜组织炎症因子的表达,发挥免疫调节作用,抑制致病菌引起的炎症反应。

[0049] 从图 6 可以看出,每头每天灌服 10^9 cfuEPEC 可以引起断乳仔猪腹泻 ($P < 0.01$),而日粮添加丁酸梭菌脂磷壁酸可以显著降低 EPEC 引起的仔猪腹泻发生率 ($P < 0.01$),这说明丁酸梭菌脂磷壁酸具有很好的防治仔猪腹泻的效果,具有开发成为一种新型安全添加剂的潜力。

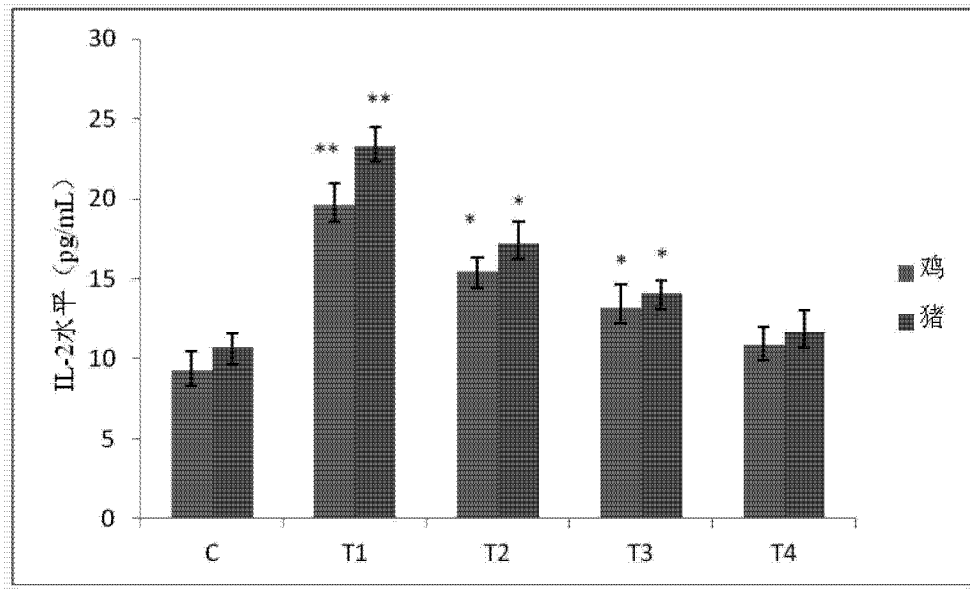


图 1

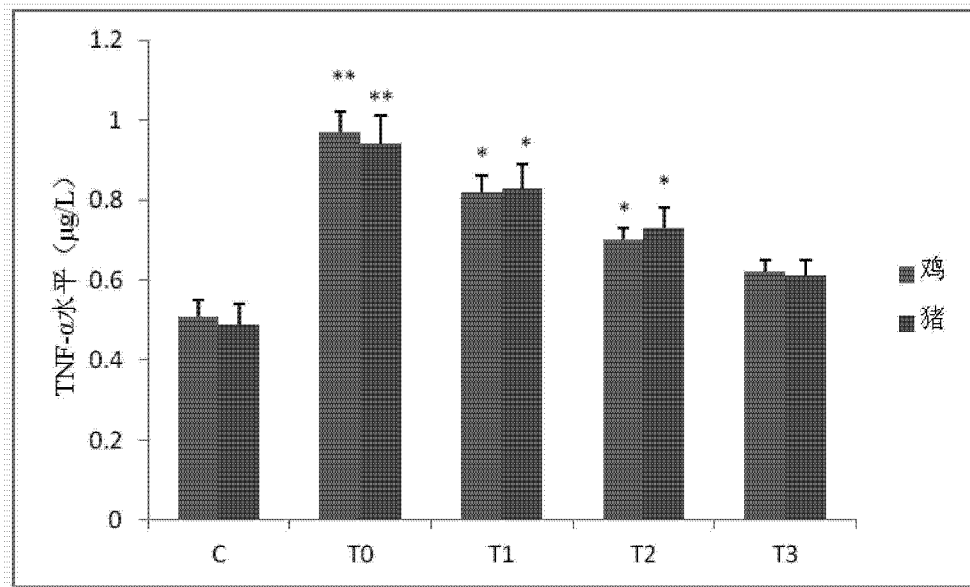


图 2

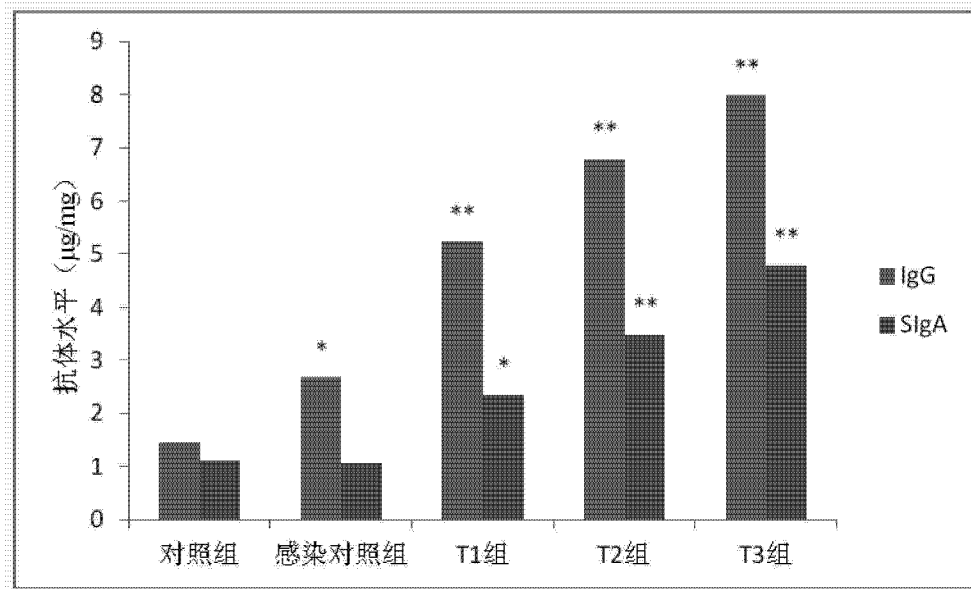


图 3

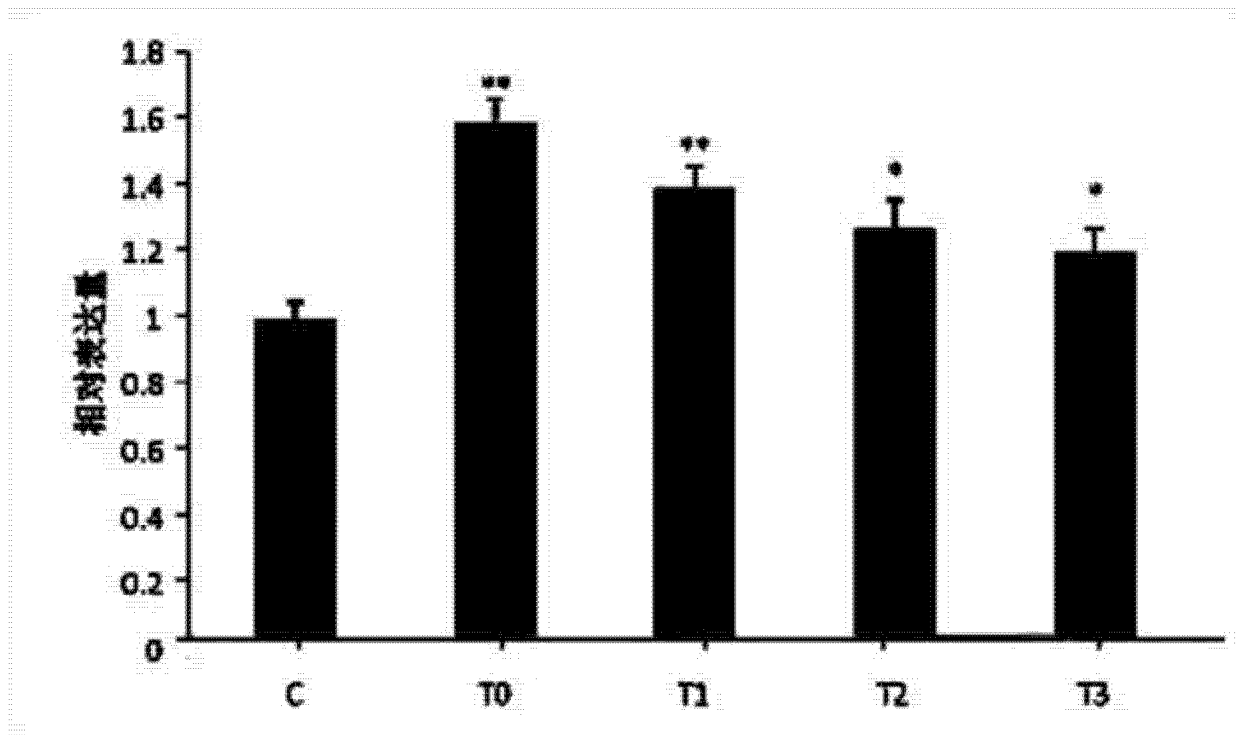


图 4

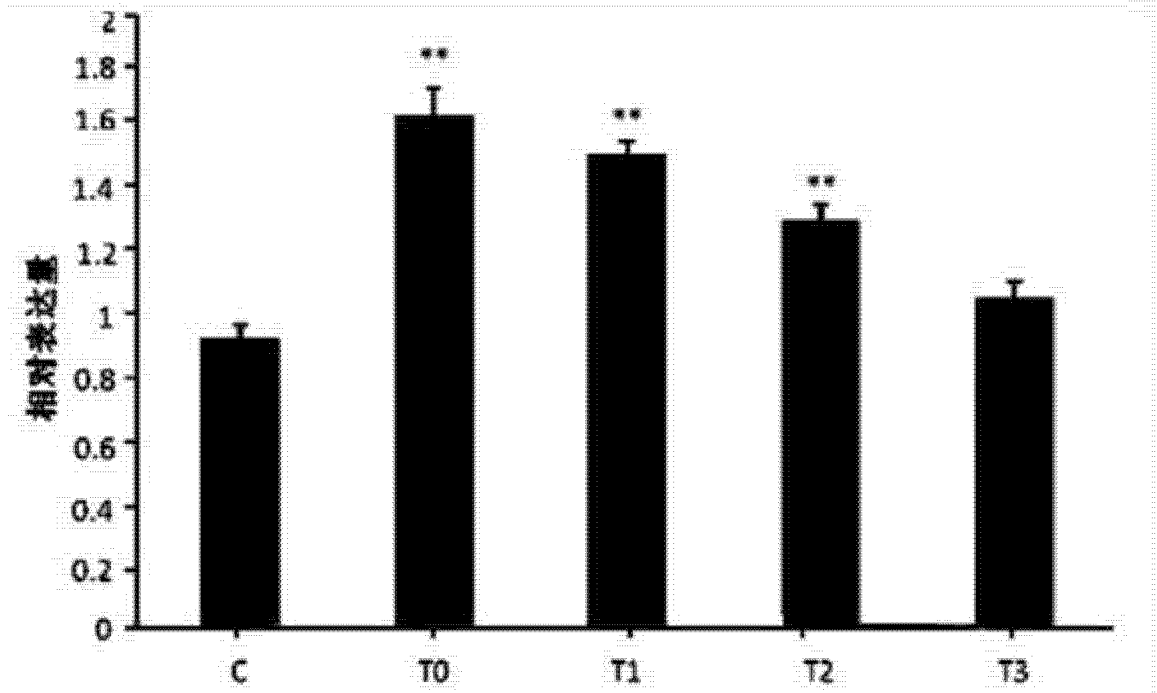


图 5

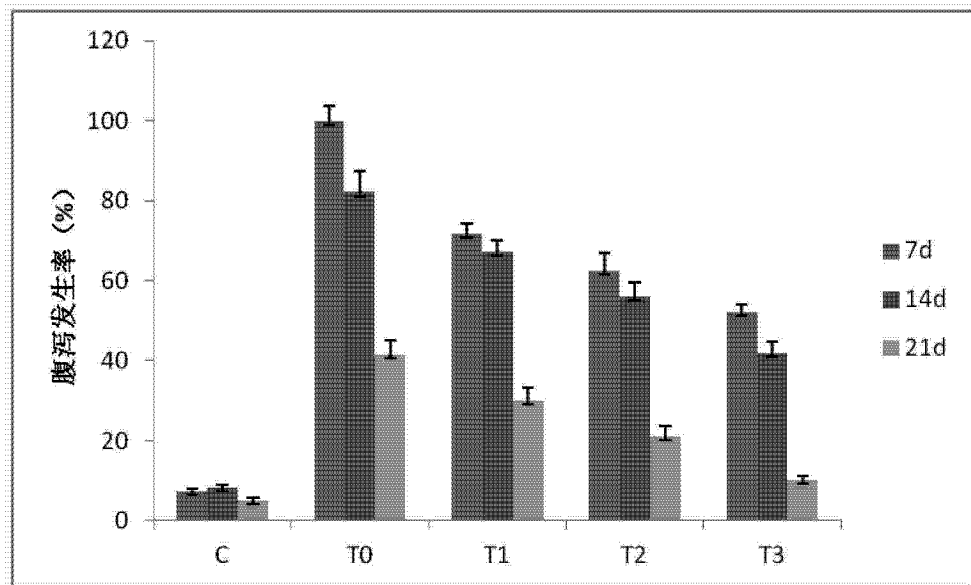


图 6

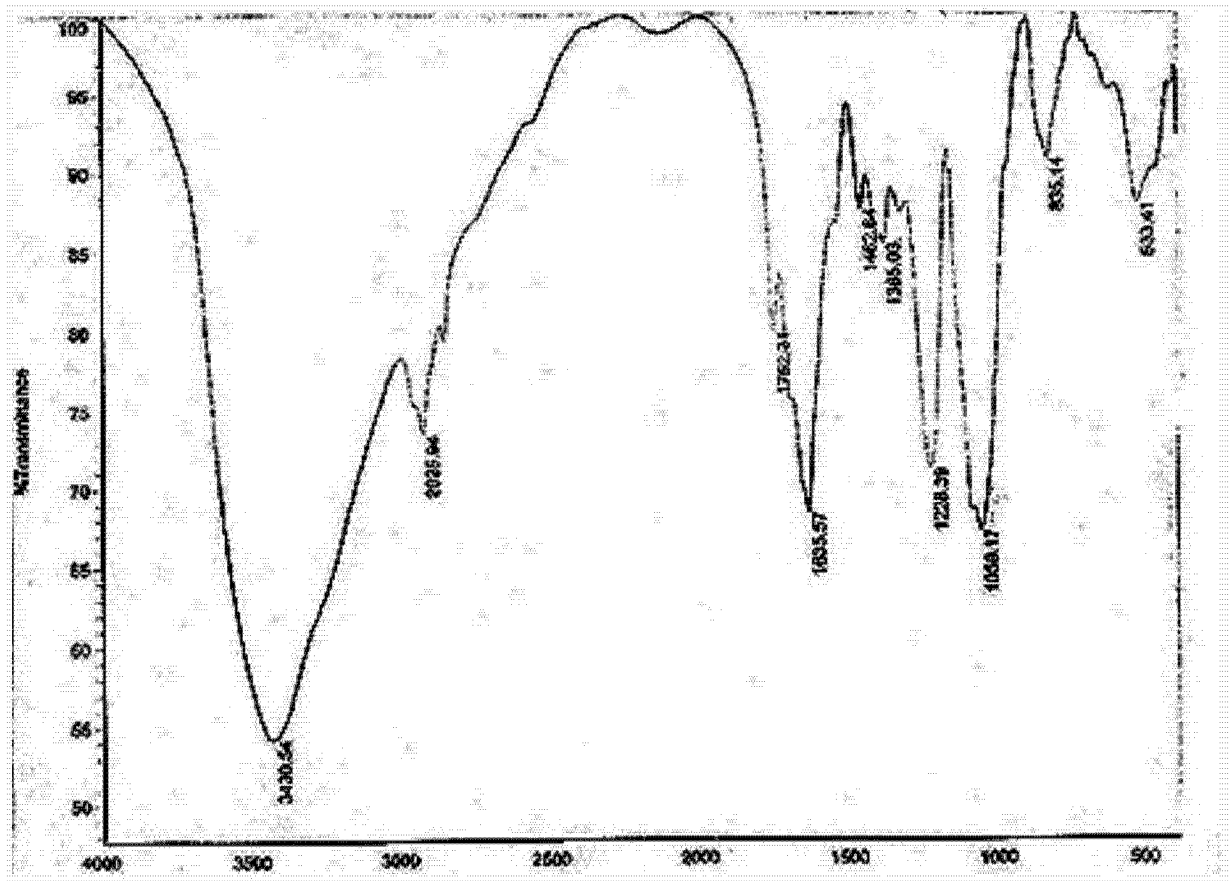


图 7

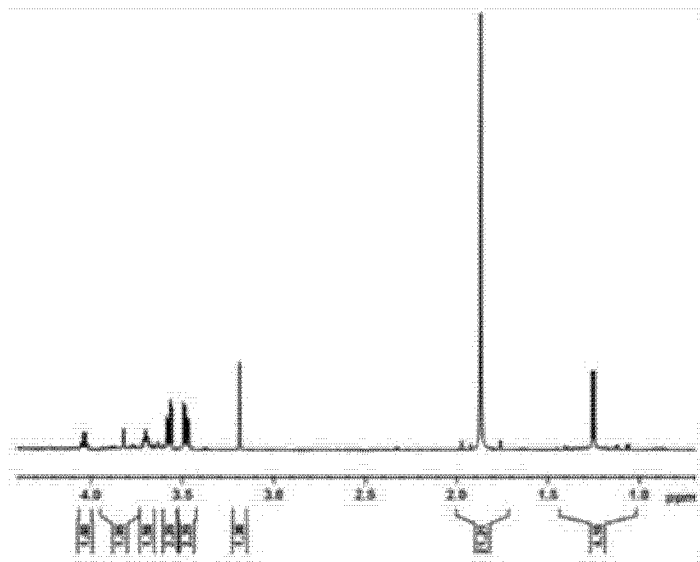


图 8