

水产动物营养与饲料团队

读书报告

报告人：曹慧

时间：2019年12月29日

Article | [Open Access](#) | Published: 21 March 2019

Assessing the viability of transplanted gut microbiota by sequential tagging with D-amino acid-based metabolic probes

Wei Wang, Liyuan Lin, Yahui Du, Yanling Song, [Xiaoman Peng](#), Xing Chen  & Chaoyong James Yang 

Nature Communications **10**, Article number: 1317 (2019) | [Cite this article](#)

3751 Accesses | **1** Citations | **15** Altmetric | [Metrics](#)

Impact Factor:11.878

目录

01



研究背景



02



材料与方法

03



结果与讨论



04



总结

05



学习的地方

第

1

部分

研究背景

01 研究背景

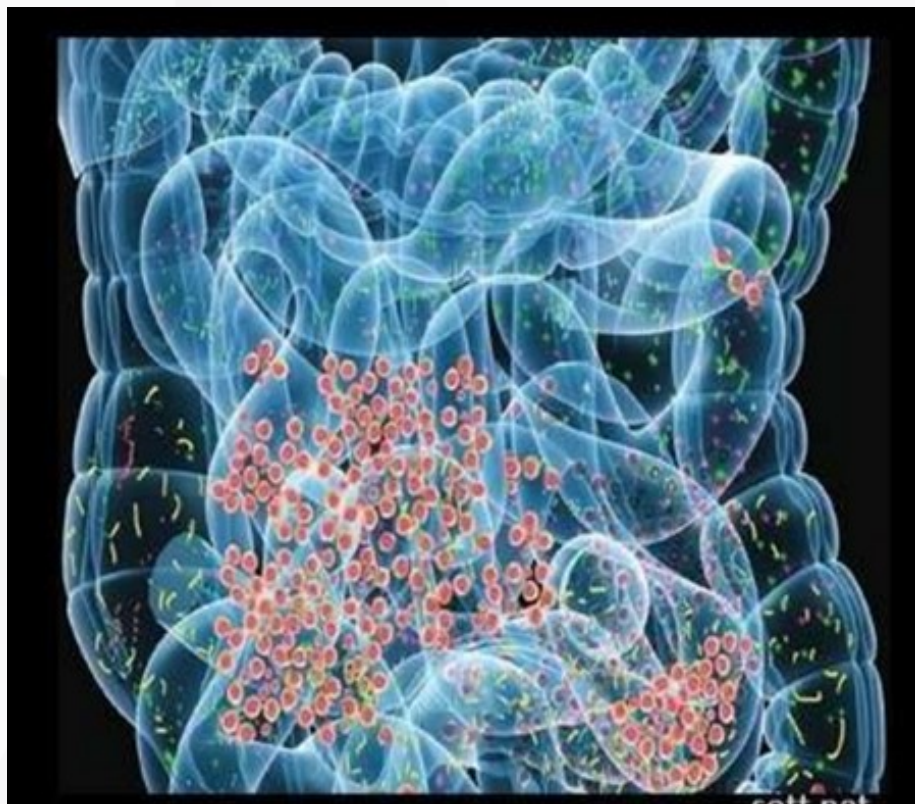
300-500种细菌

与人类自身细胞数量相当

大约1000万个基因

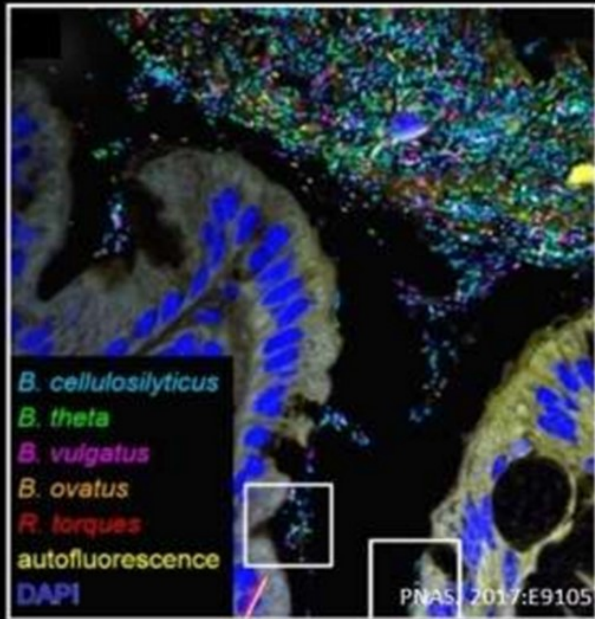
复杂和多样的生化反应

血液中大约有1000种小分子化合物来自肠道菌群

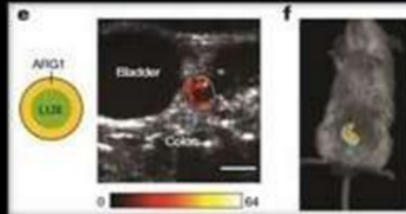
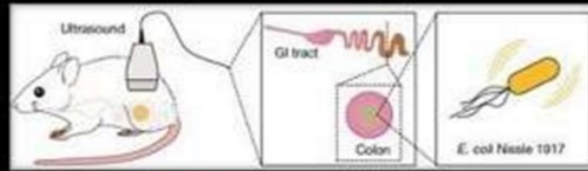


肠道菌群成像观察的化学新工具

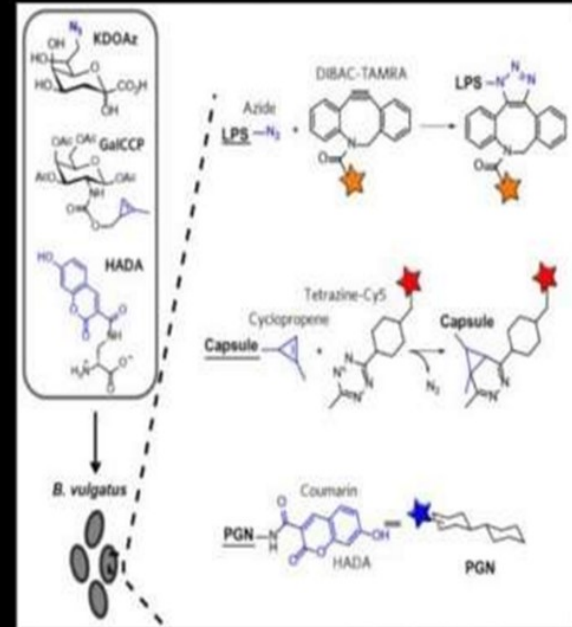
组合免疫荧光原位杂交技术



超声成像



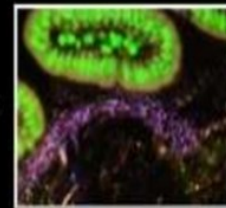
代谢标记荧光成像



Gary Borisy



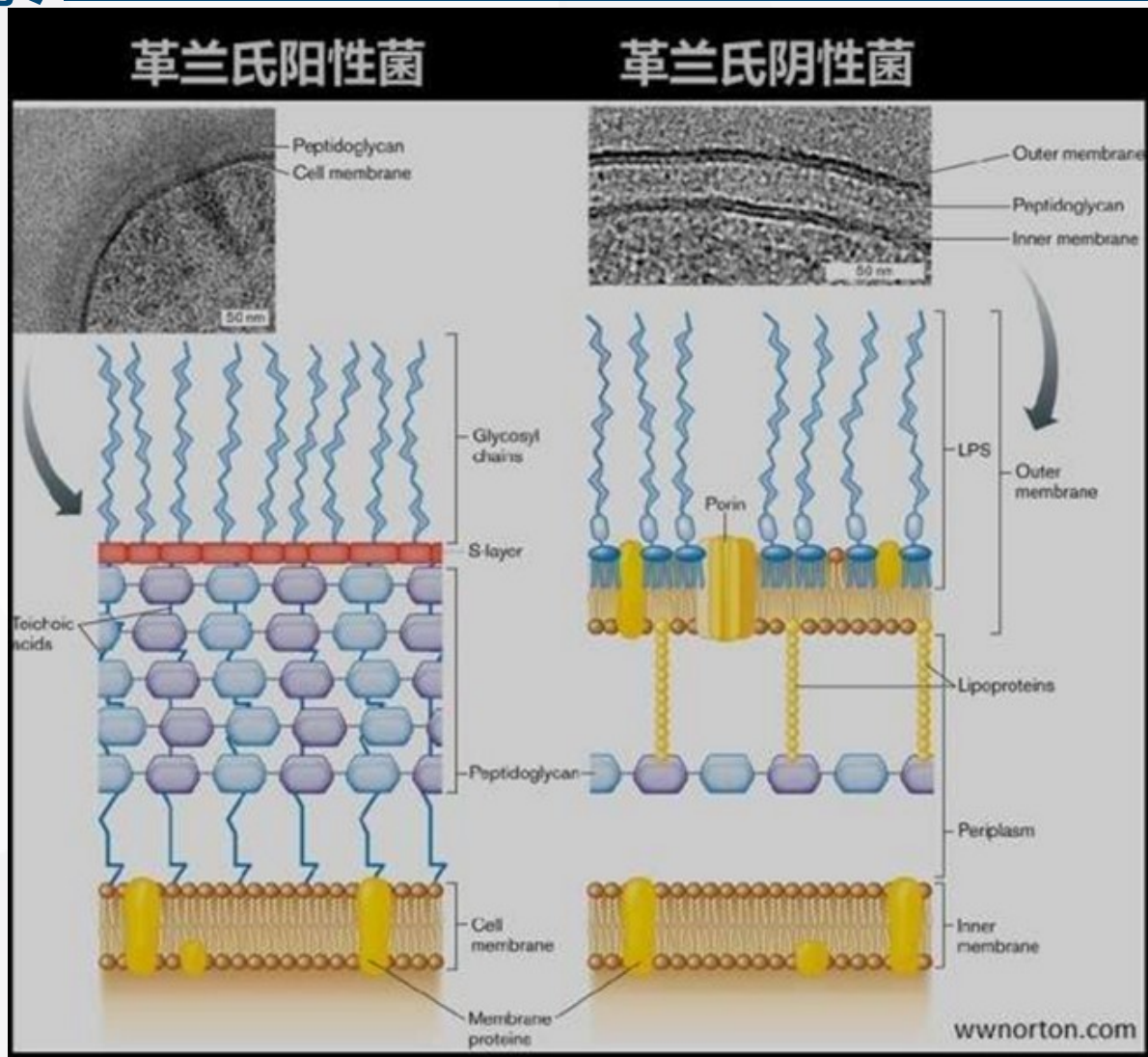
Mikhail Shapiro



Dennis Kasper

01 研究背景

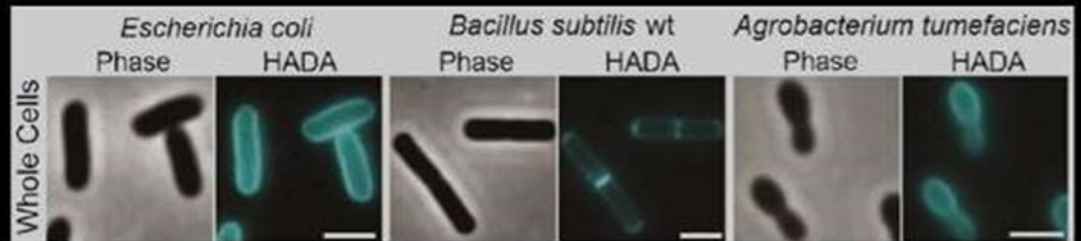
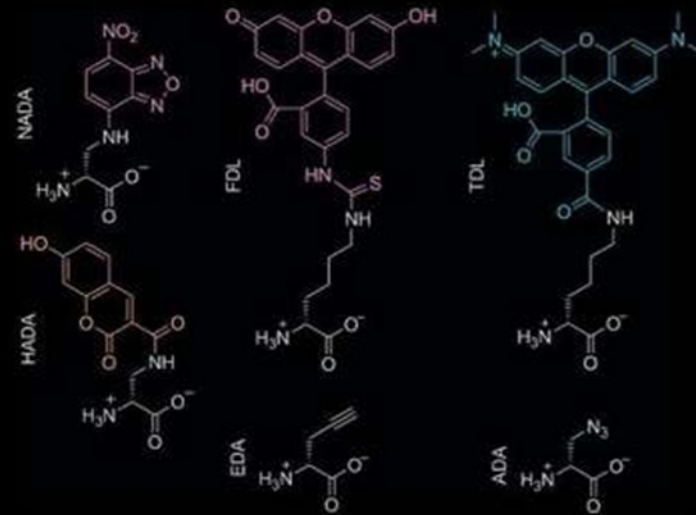
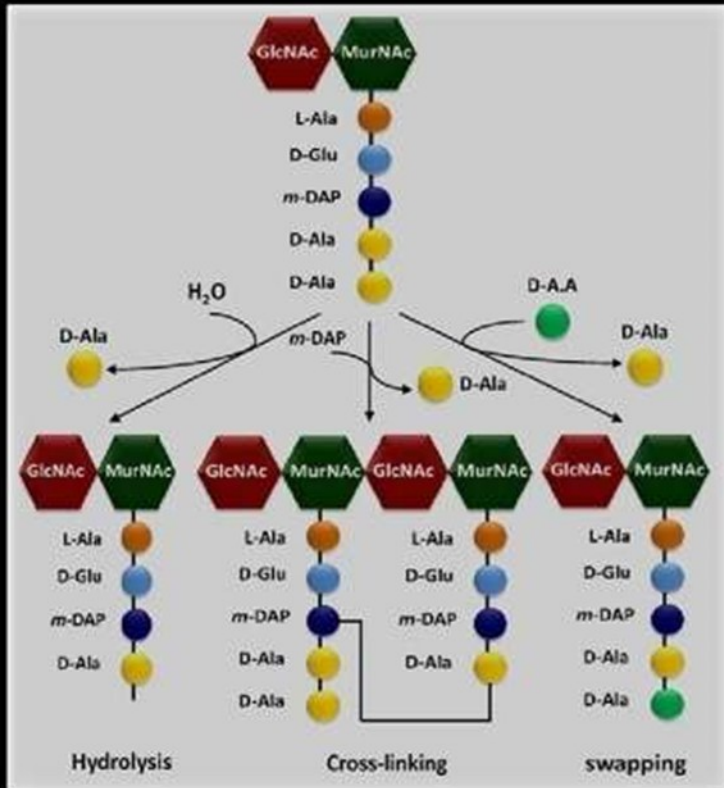
细菌的肽聚糖结构非常保守，它在革兰氏阳性菌、阴性菌中都有分布。



本文用的代谢标记探针是一种基于D-型氨基酸的非天然小分子，它的标记的靶标是细菌肽聚糖结构中的D-型丙氨酸的位置。

STAMP (Sequential Tagging with D-Amino acid-based Metabolic Probes)

D-型氨基酸 (DAA) 探针的代谢标记原理

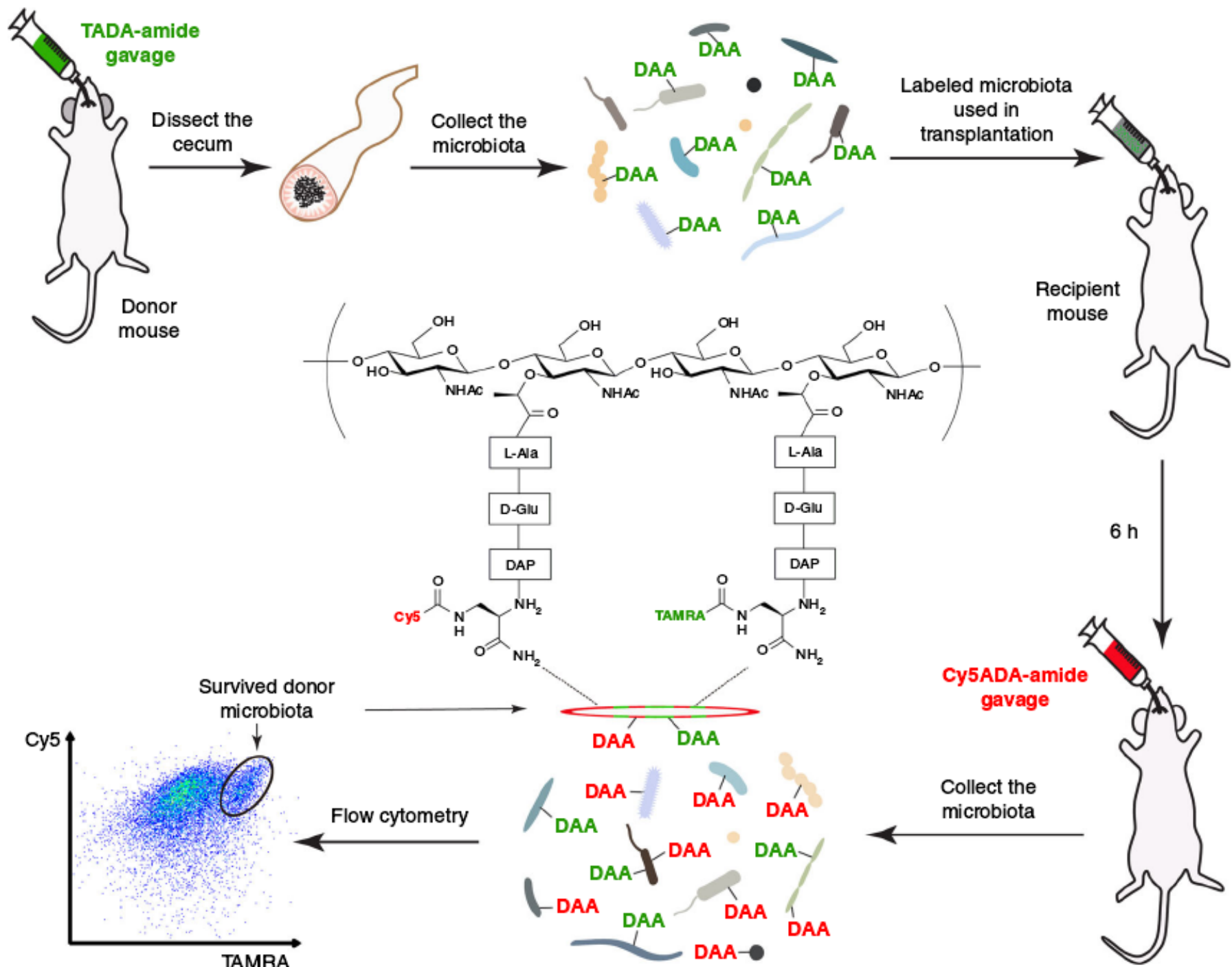


第

2

部分

材料与amp;方法

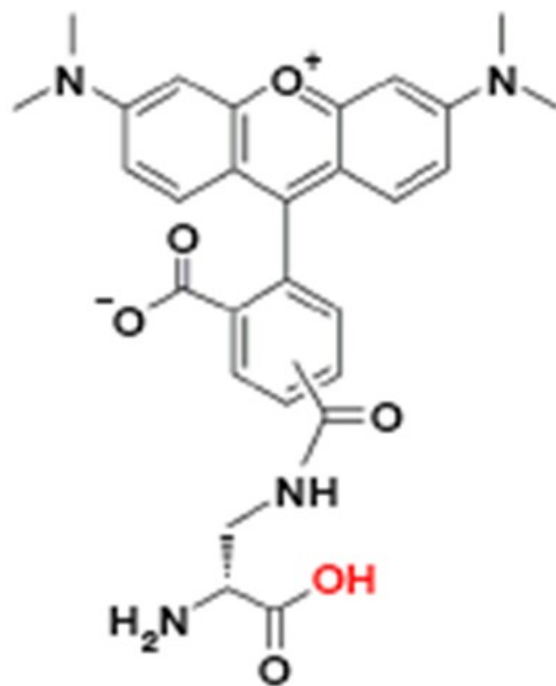


第

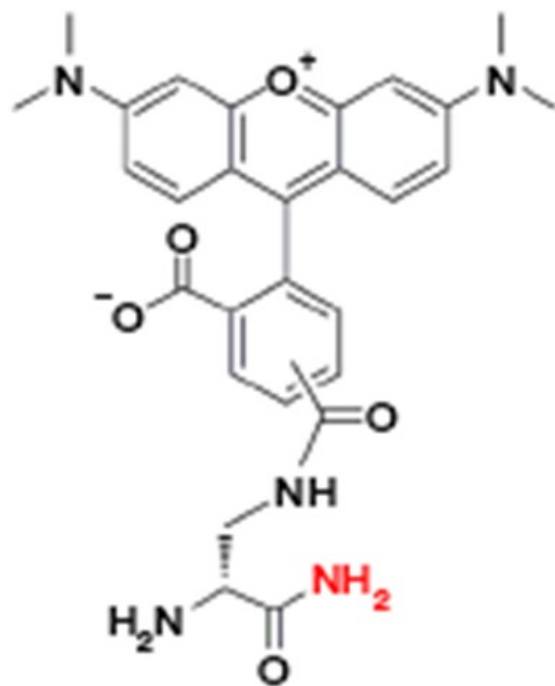
3

部分

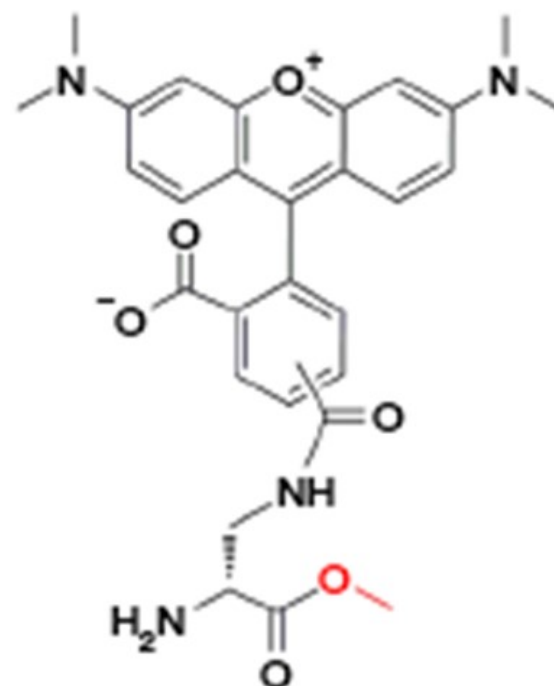
结果与讨论



TADA



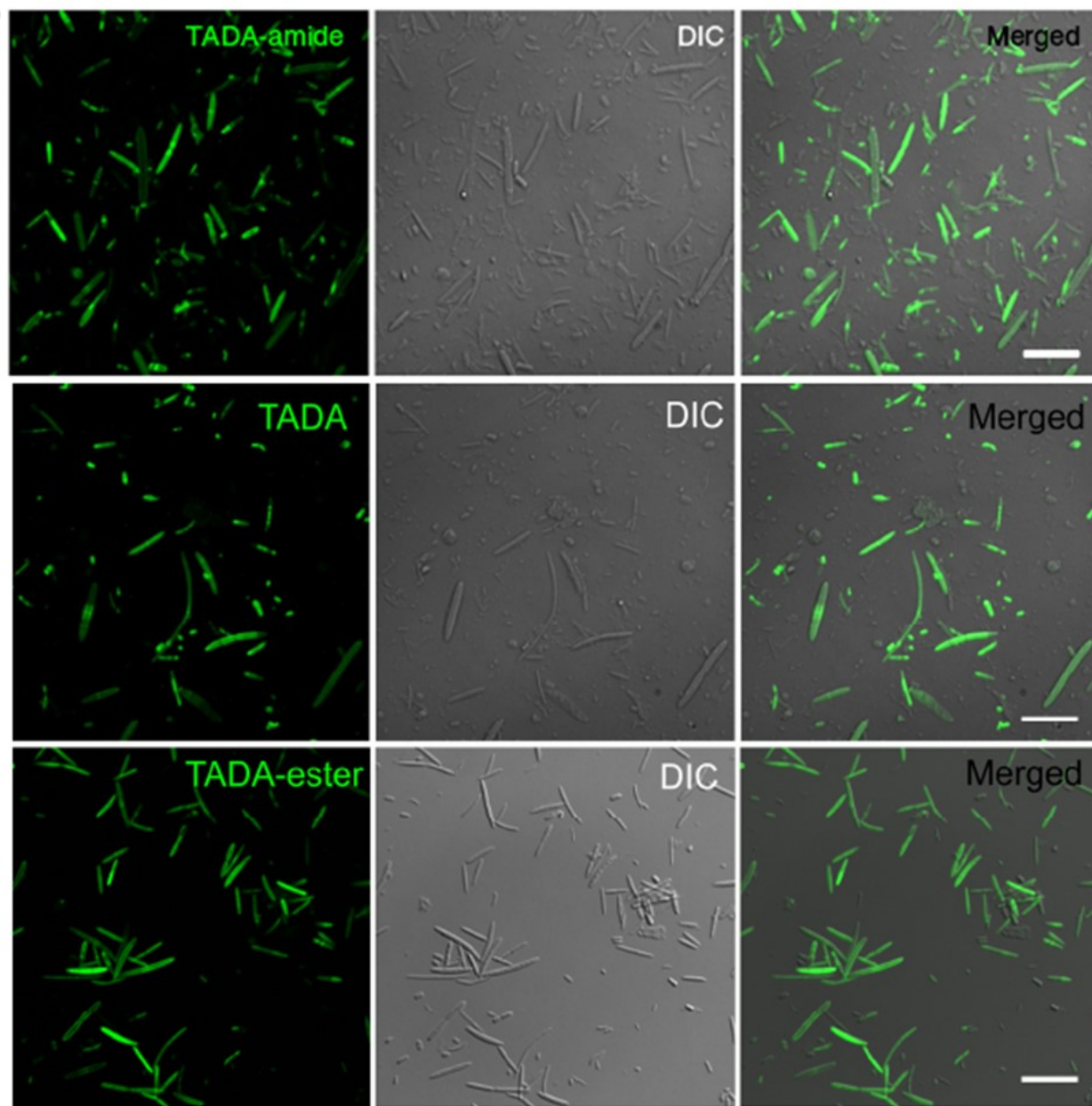
TADA-amide



TADA-ester

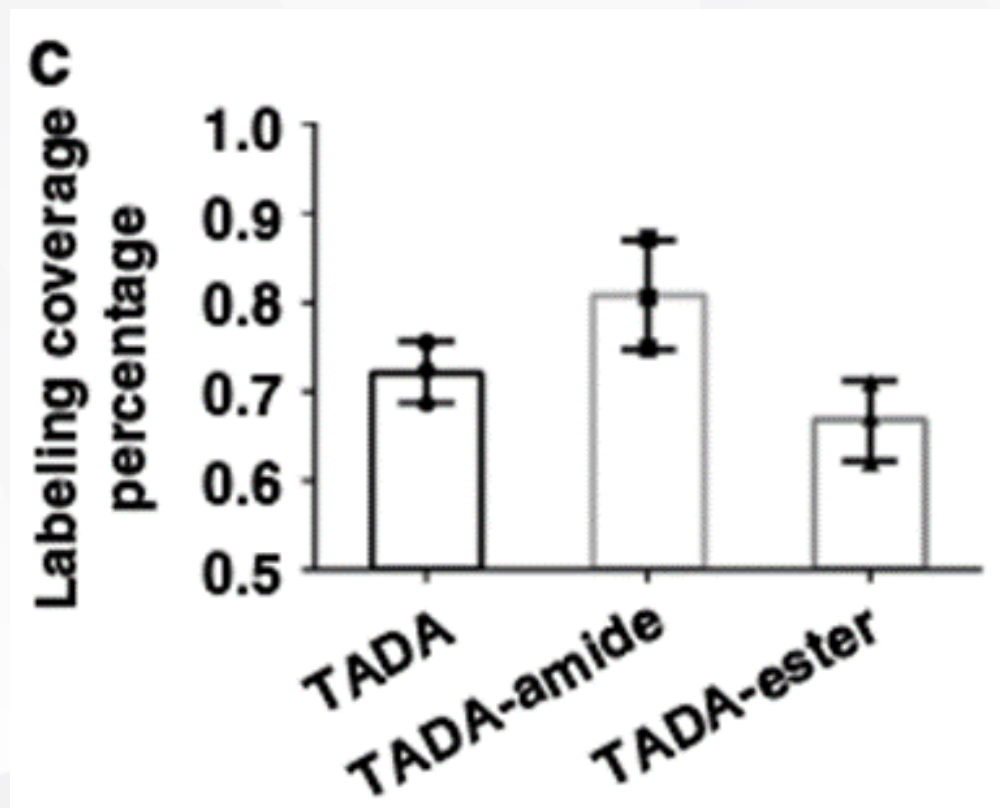
三种 TAMRA（四甲基罗丹明）结合 FDAA：TADA，TADA-酰胺和 TADA-酯。

03 结果与讨论 — 供体小鼠肠道菌群的体内标记



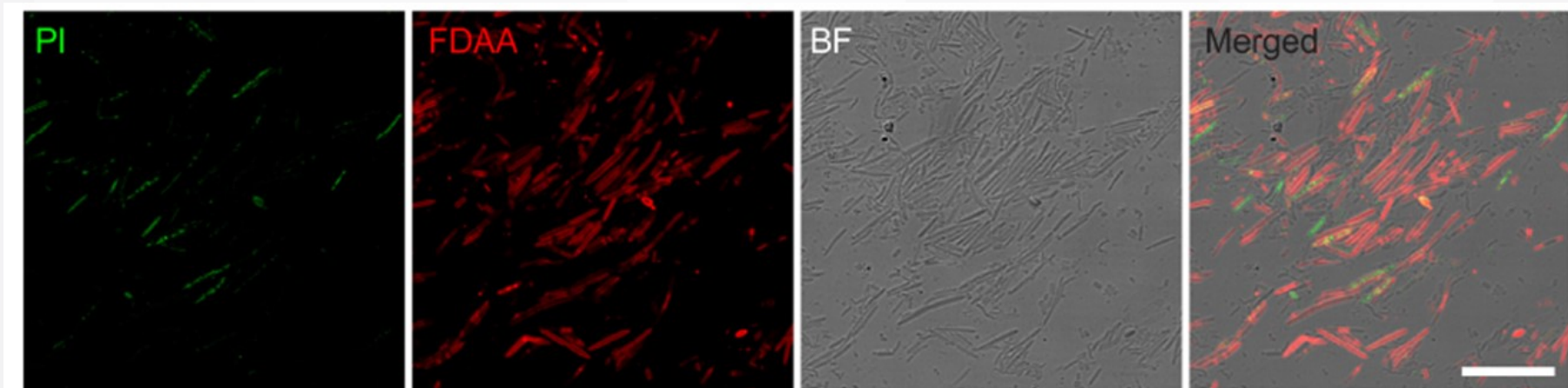
三种探针均显示强烈的肠道微生物标记。

03 结果与讨论 — 供体小鼠肠道菌群的体内标记



TADA-酰胺显示出最高的标记覆盖率。

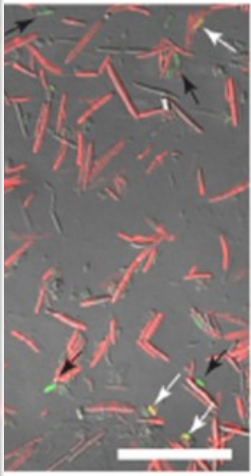
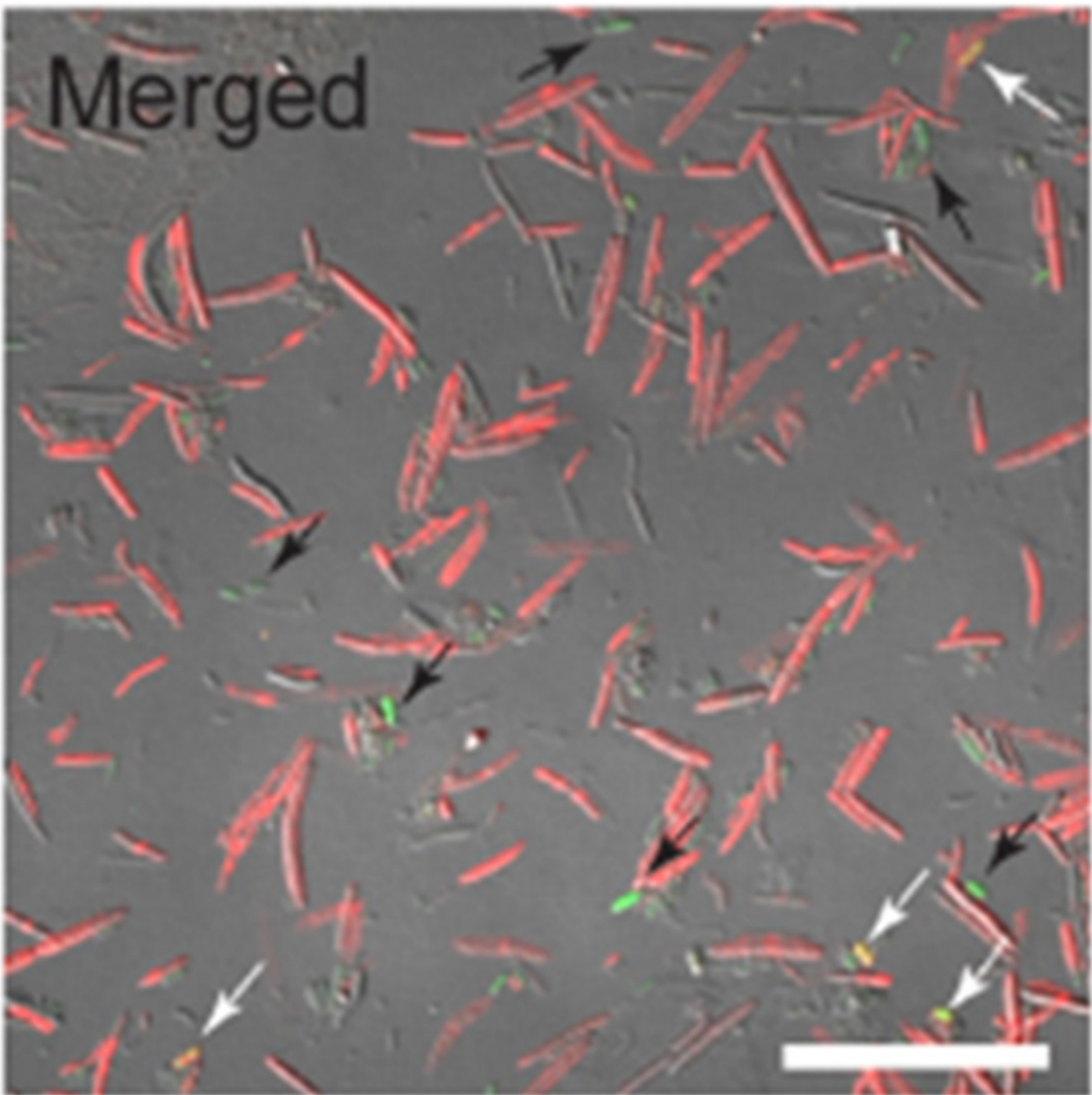
03 结果与讨论 — 供体小鼠肠道菌群的体内标记



经碘化丙啶(PI, 绿色)染色, 许多未被FDAA标记的细菌为死亡细菌, 表明代谢活性对于FDAA很重要。

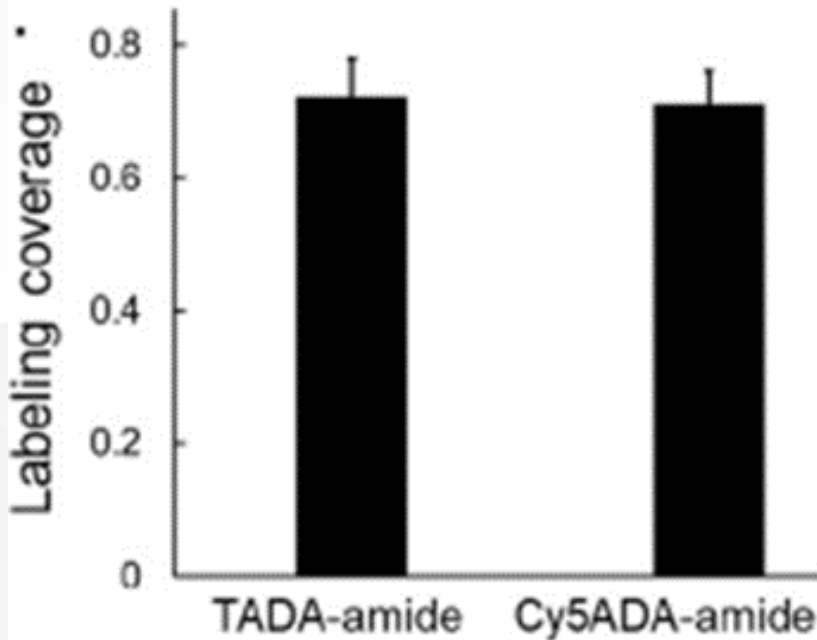
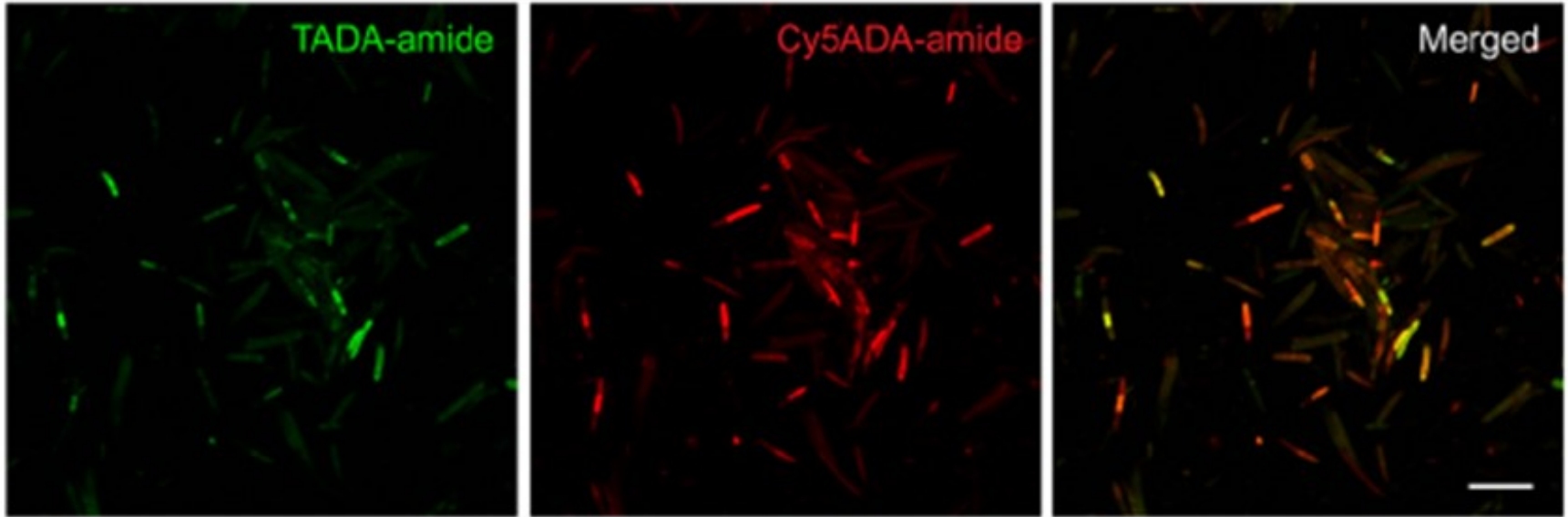
Merged

FISH



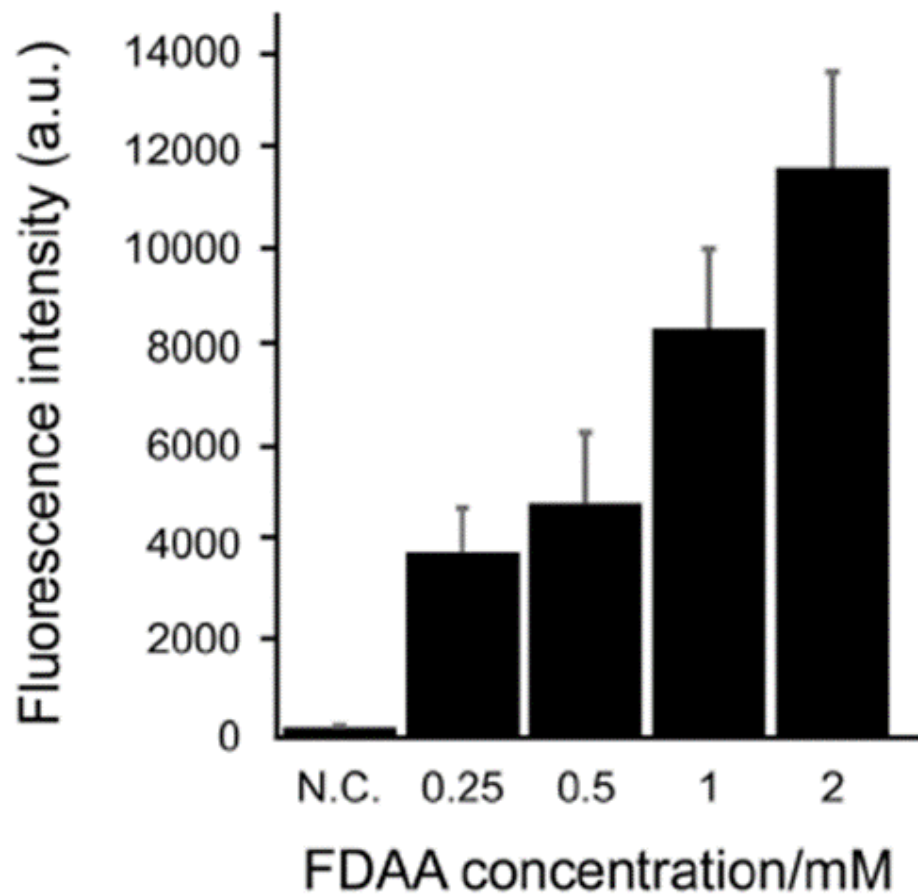
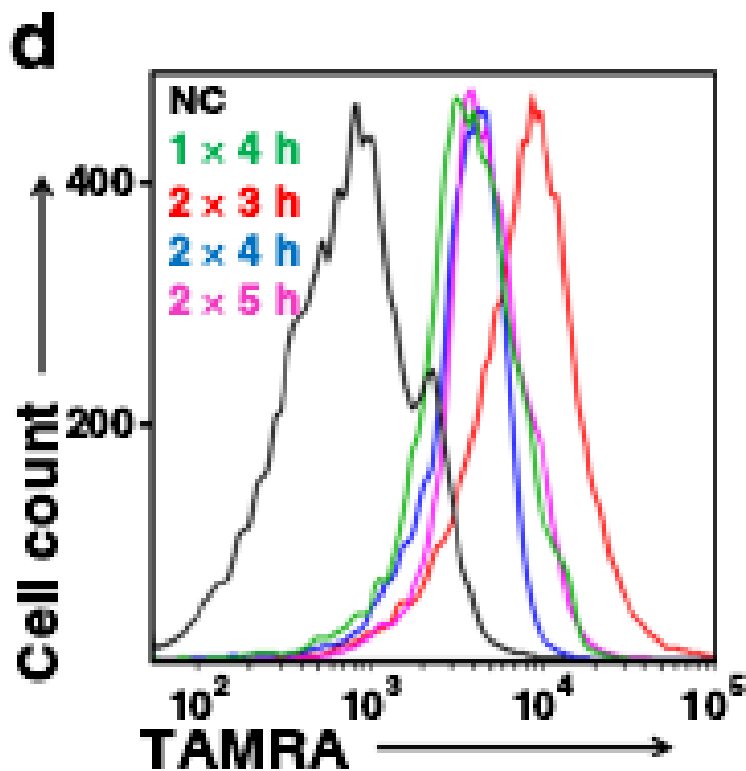
通
 门——
 系(红色
 门的一
 amide
 有部分

阴性菌
 生物区
 以杆菌
 菌门中

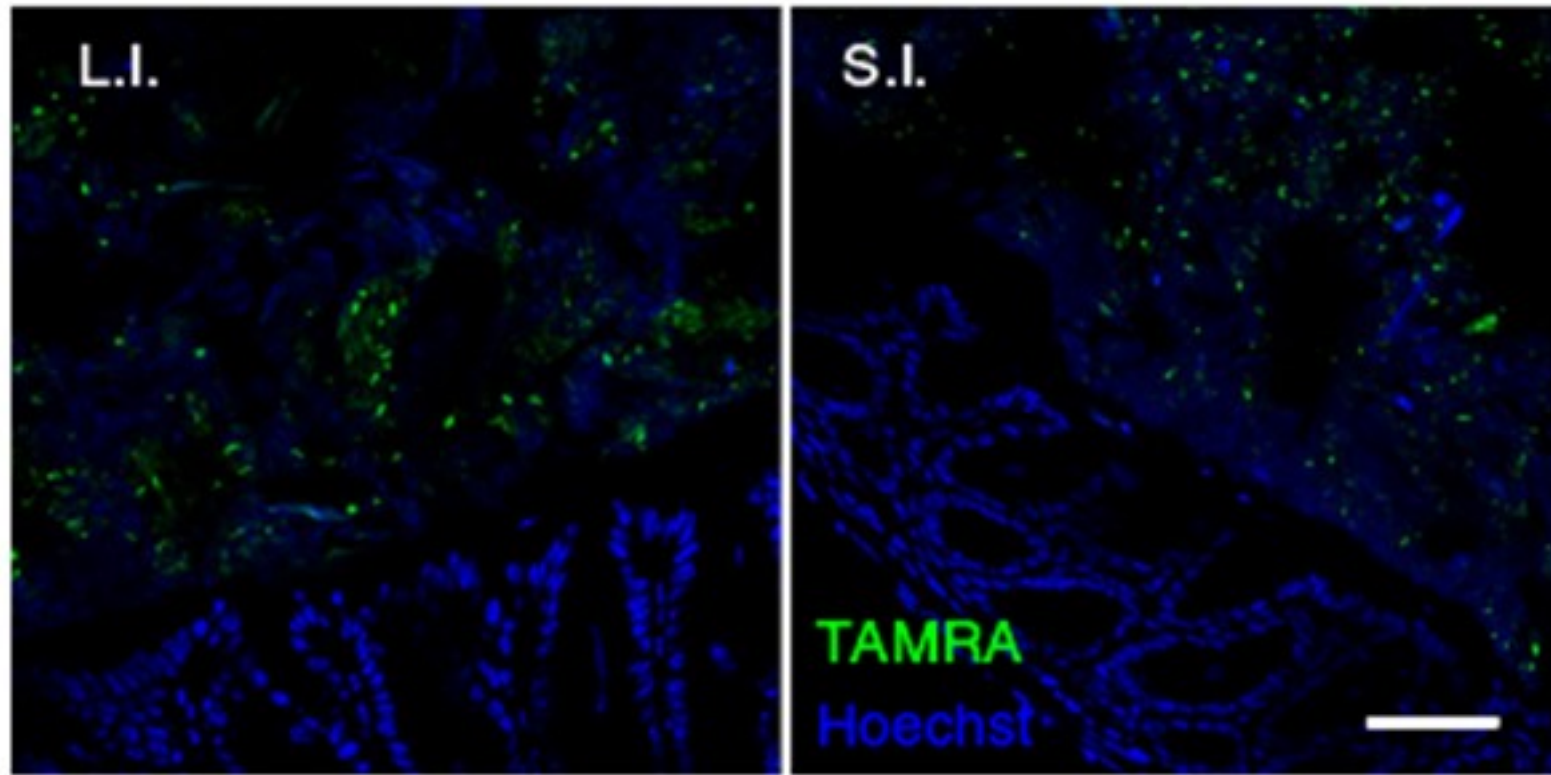


为了进行标记，研究者合成了具有酰胺保护作用的Cyanine 5偶联的DAA (Cy5ADA-amide)作为第二种FDAA。

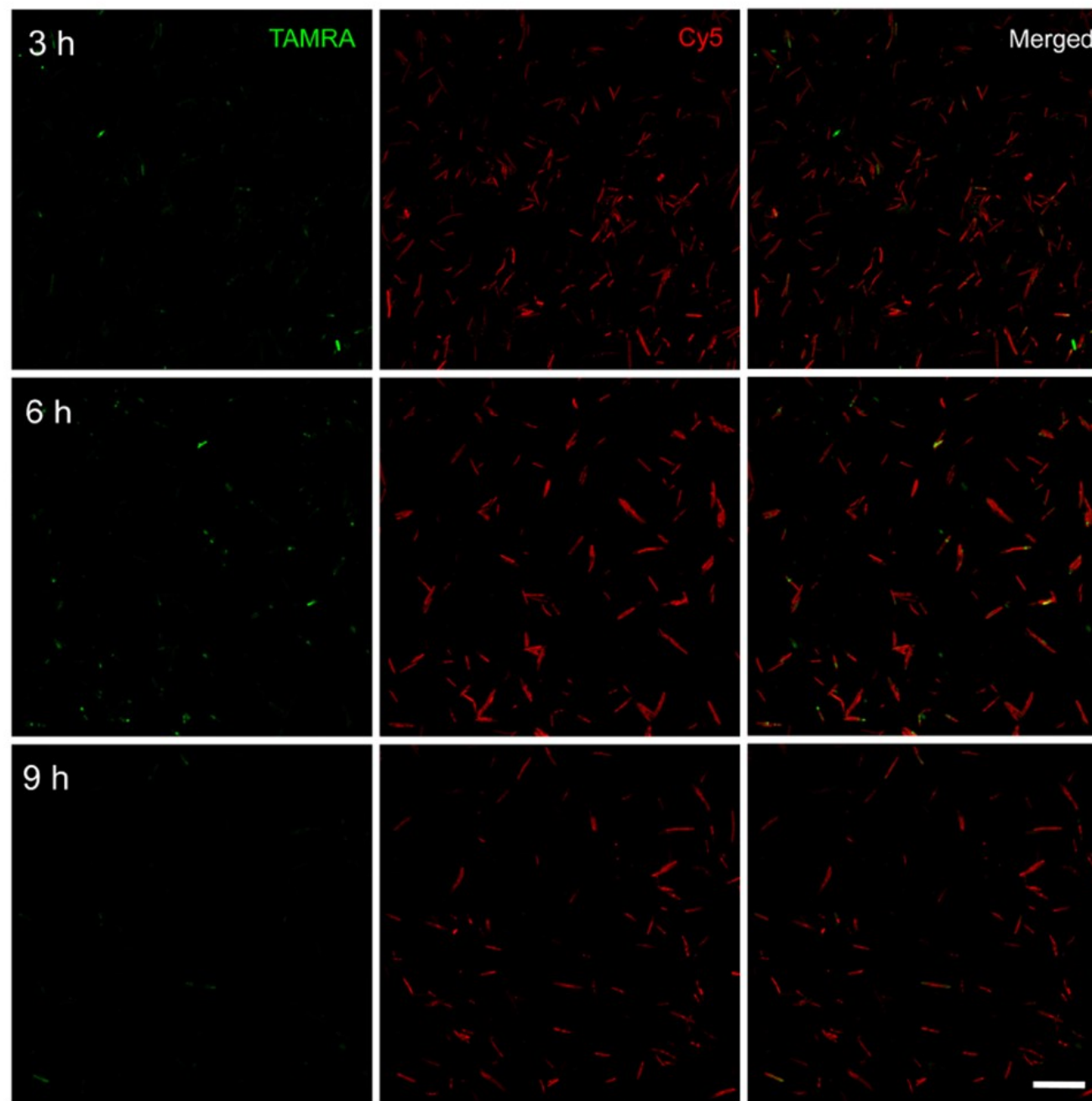
通过比较，**决定在以下研究中使用TADA-amide和Cy5ADA-amide探针进行标记。**



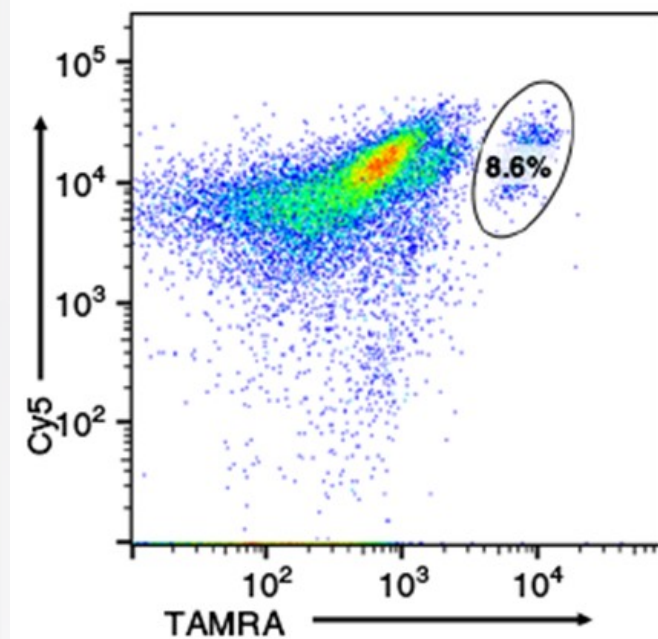
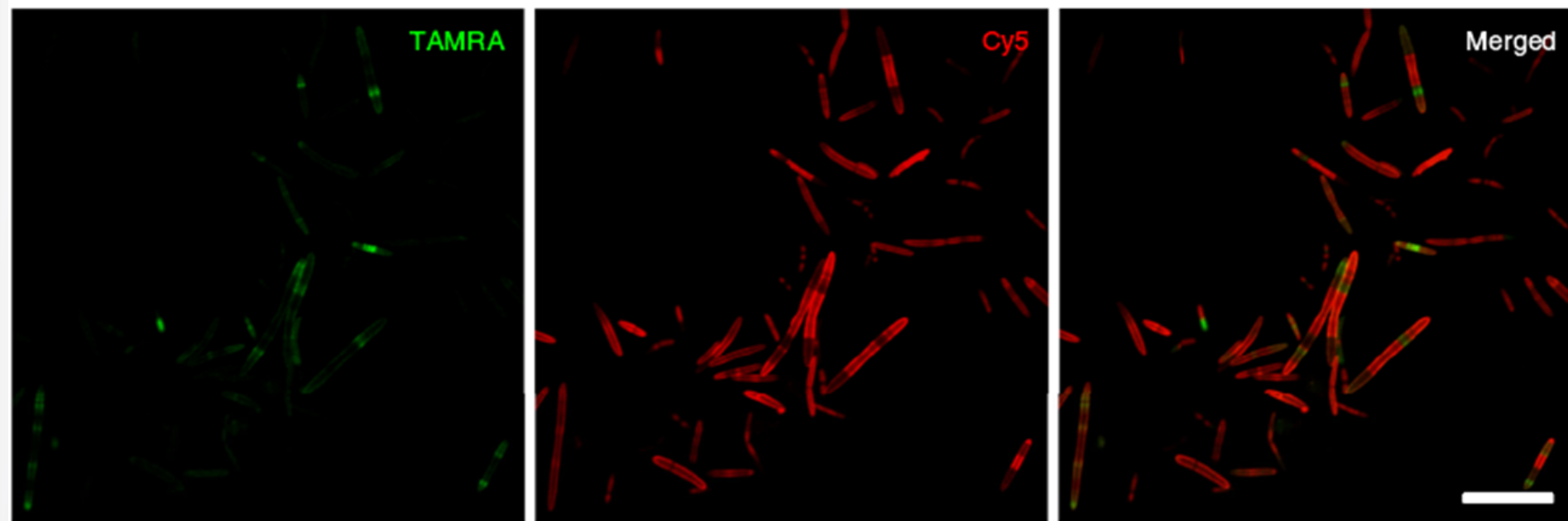
在筛选探针的过程，借机优化了管饲小鼠的步骤：在间隔 3 h 的两次管饲中显示了最高的标记信号，以及 FDAA 浓度在 1 mM 仍能实现强荧光标记。



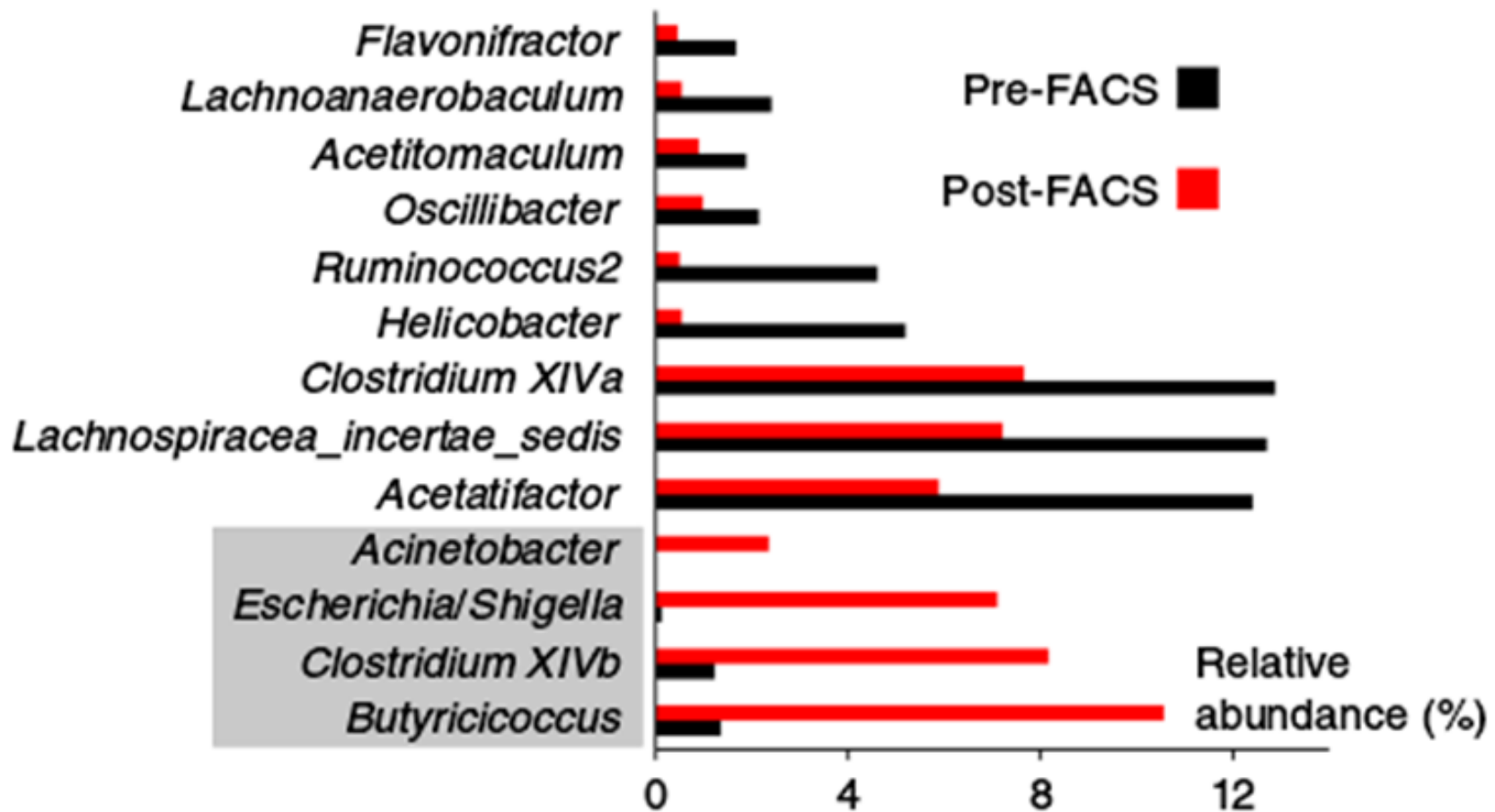
受体小鼠大肠、小肠组织切片：表明菌群成功移植到受体小鼠肠道中。



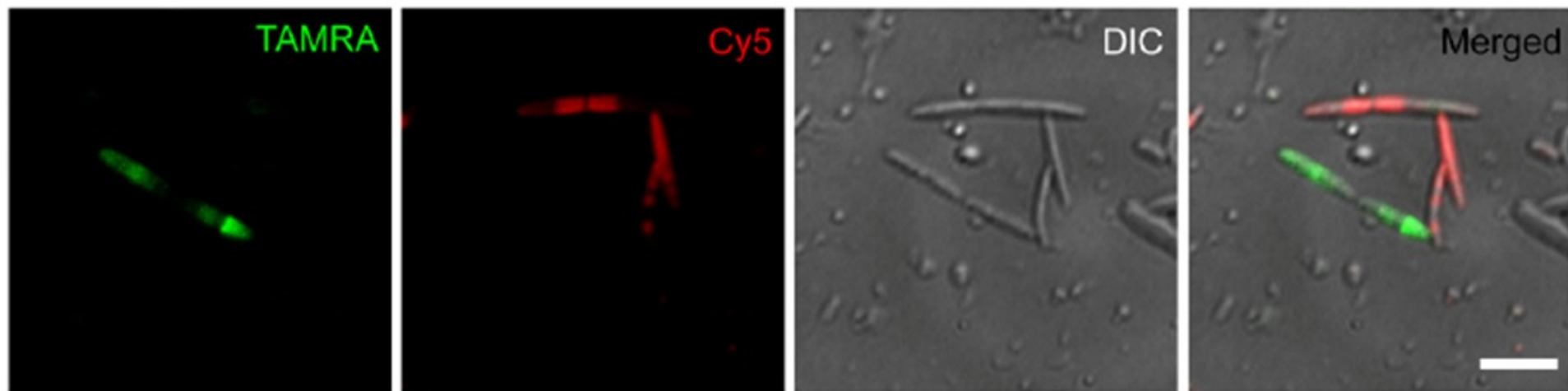
6 h的等待
时间由供
体微生物
的荧光衰
减时间确
定。



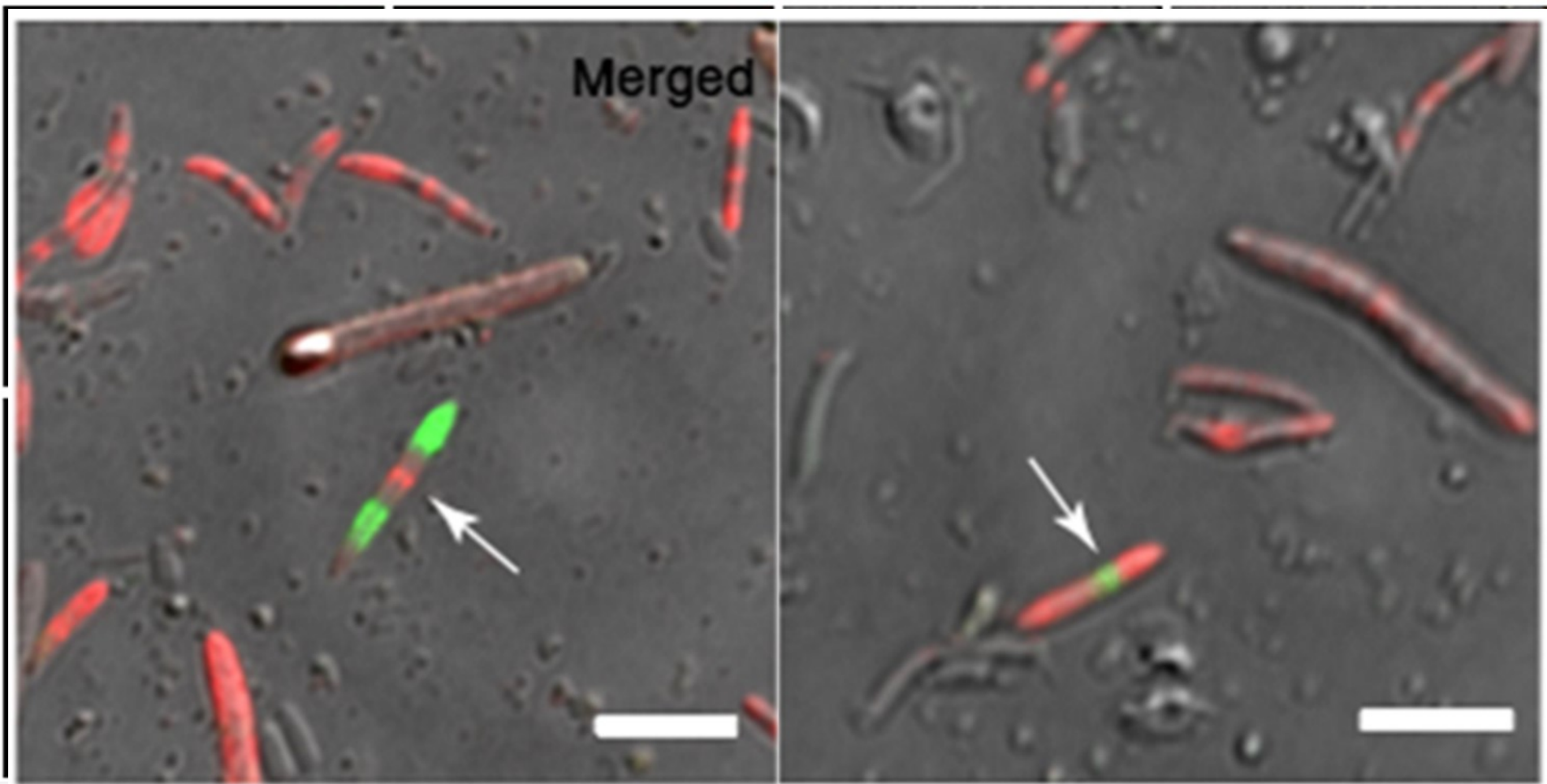
Cy5ADA-amide 饲喂后，清晰的观察到，两种颜色在肠道菌群上的分布，且双重标记的细菌占小鼠肠道菌群的8.6%。



γ pro-teobacteria (*Acinetobacter* and *Escherichia/Shigella*),
Clostridium XIVb and *Butyricicoccus*

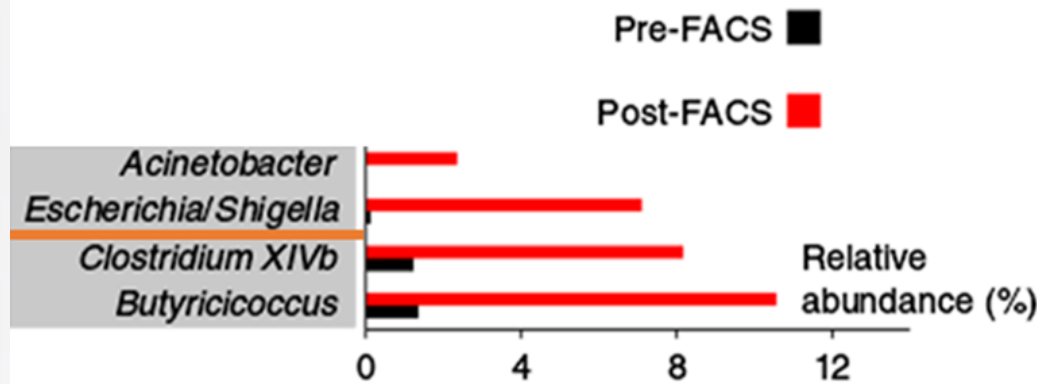
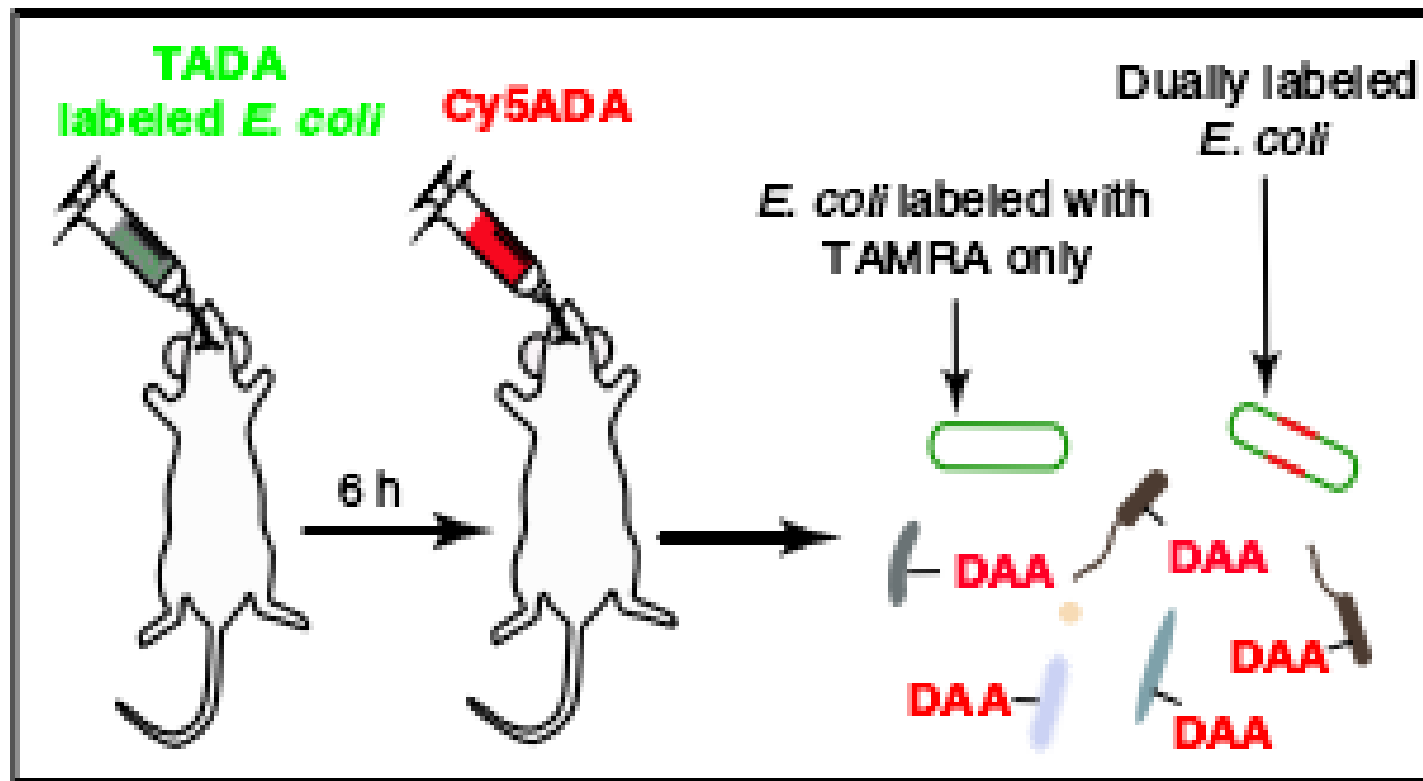


除了存活下来的移植细菌以外，大多数细菌种群都是单色的。仅显示绿色的可能是移植过程中死亡的细菌，仅显示红色的最有可能是受体的原始肠道菌群。



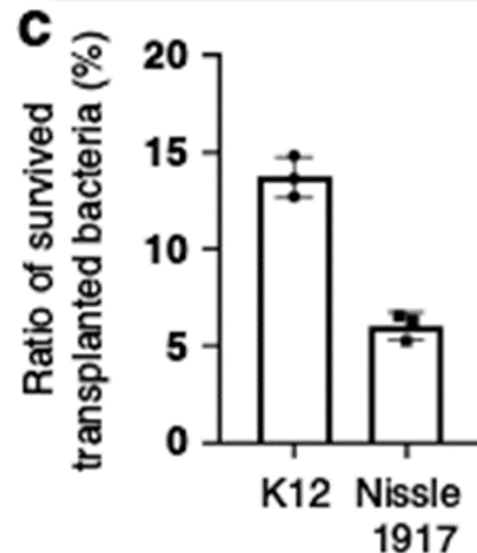
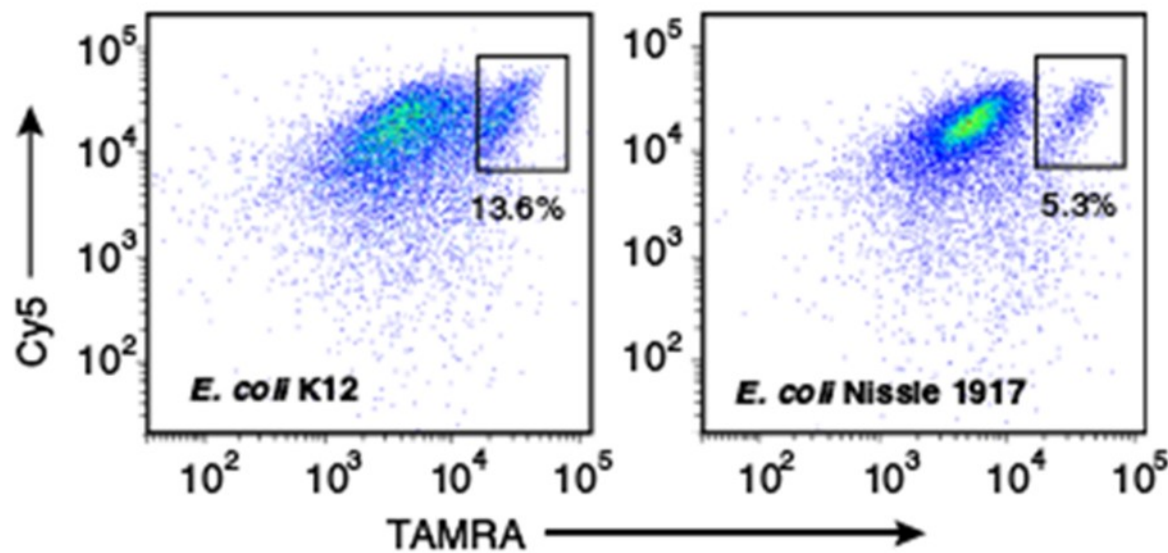
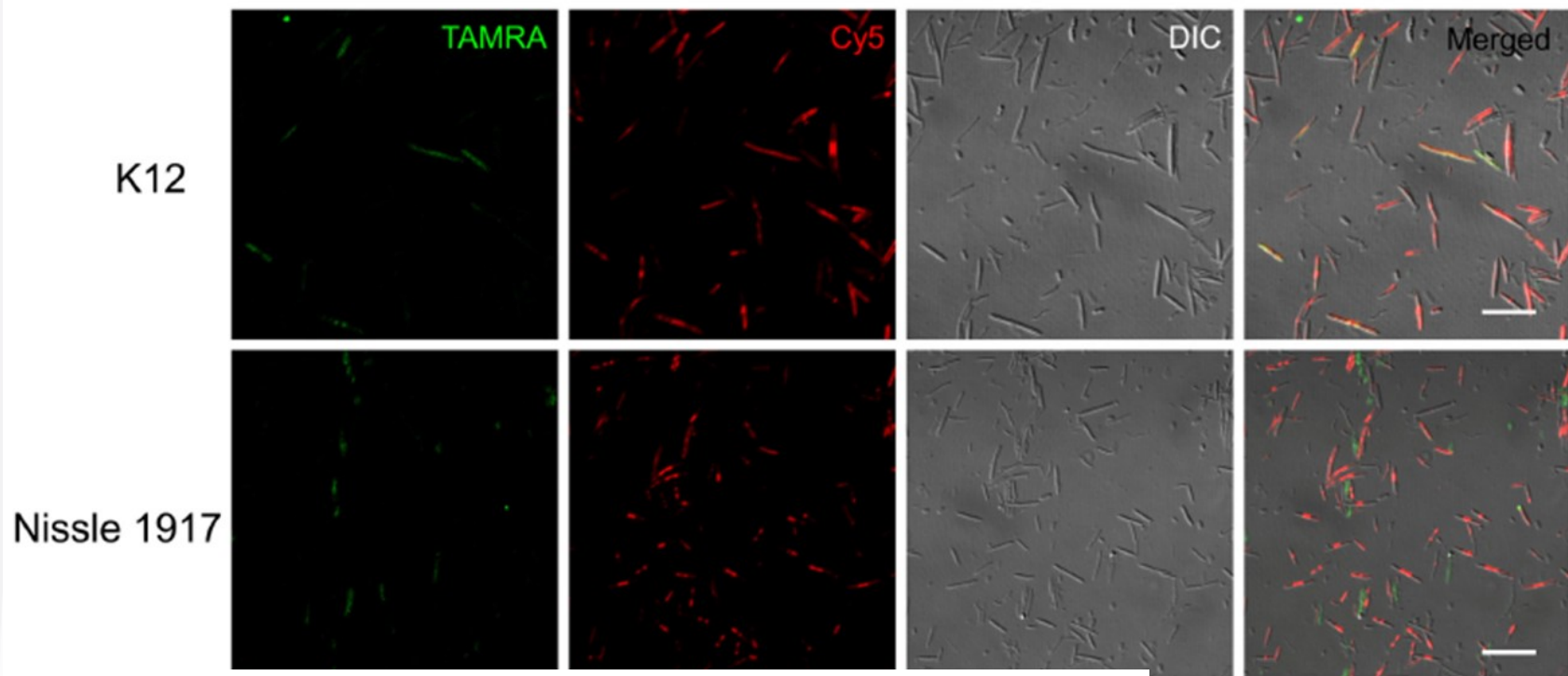
上（左）：红色标记在中间，绿色标记在两边，有可能是通过二分裂的方式繁殖的；下（右）：红色标记在两边，绿色标记在中间，很可能以新合成的细胞壁位于极点的方式复制。

03 结果与讨论 — 应用 评估移植过程中特定细菌的存活

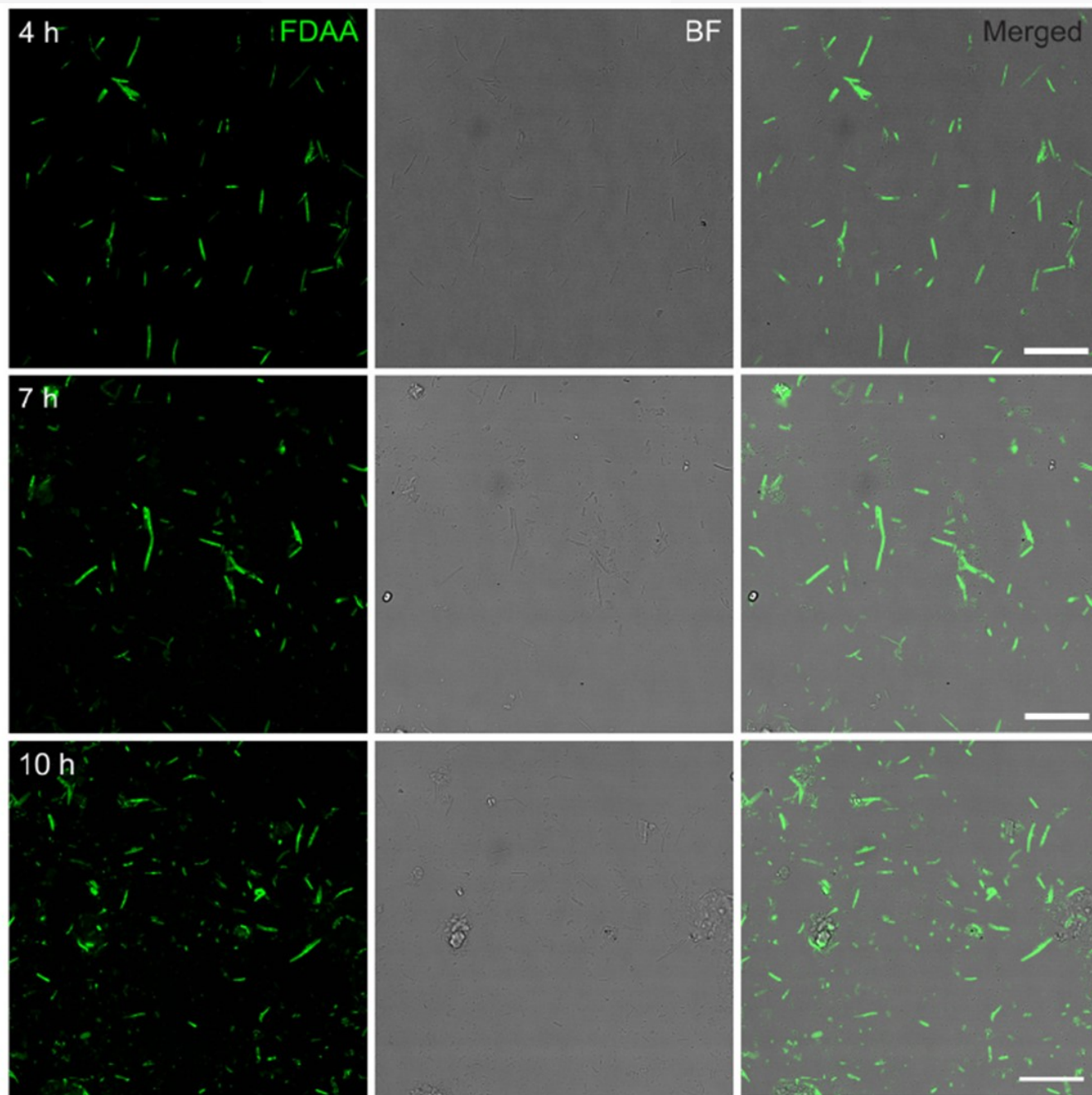


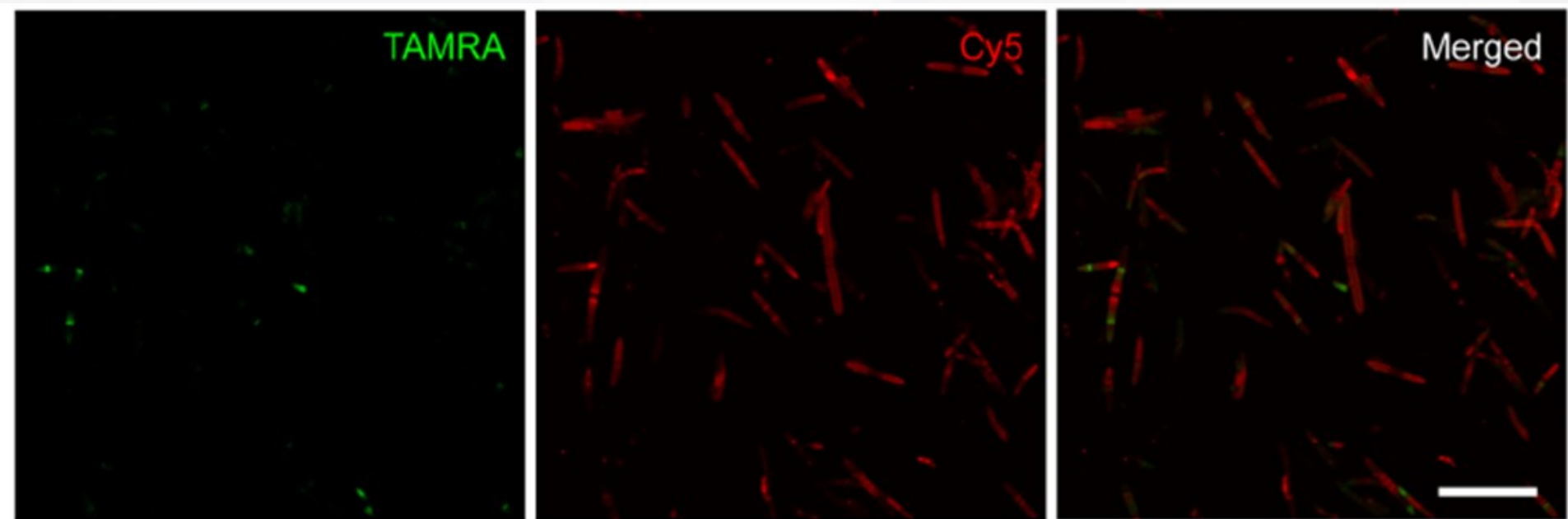
选择 *Escherichia* 为例，测试了两种 *Escherichia coli* 菌株 *K12* 和 *Nissle 1917*。

03 结果与讨论 — 应用 评估移植过程中特定细菌的存活



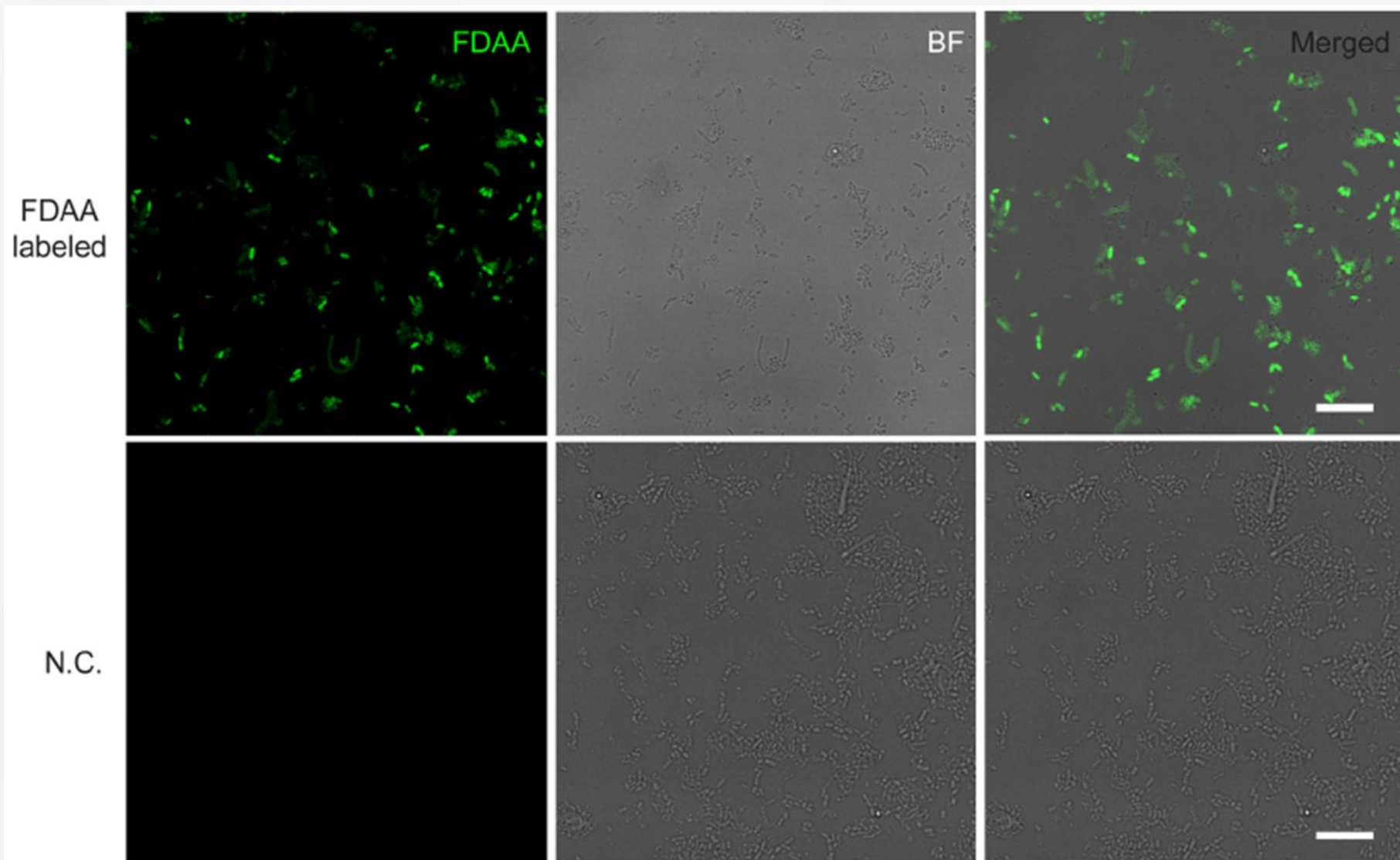
03 结果与讨论 — 应用 跟踪小鼠和人类粪菌





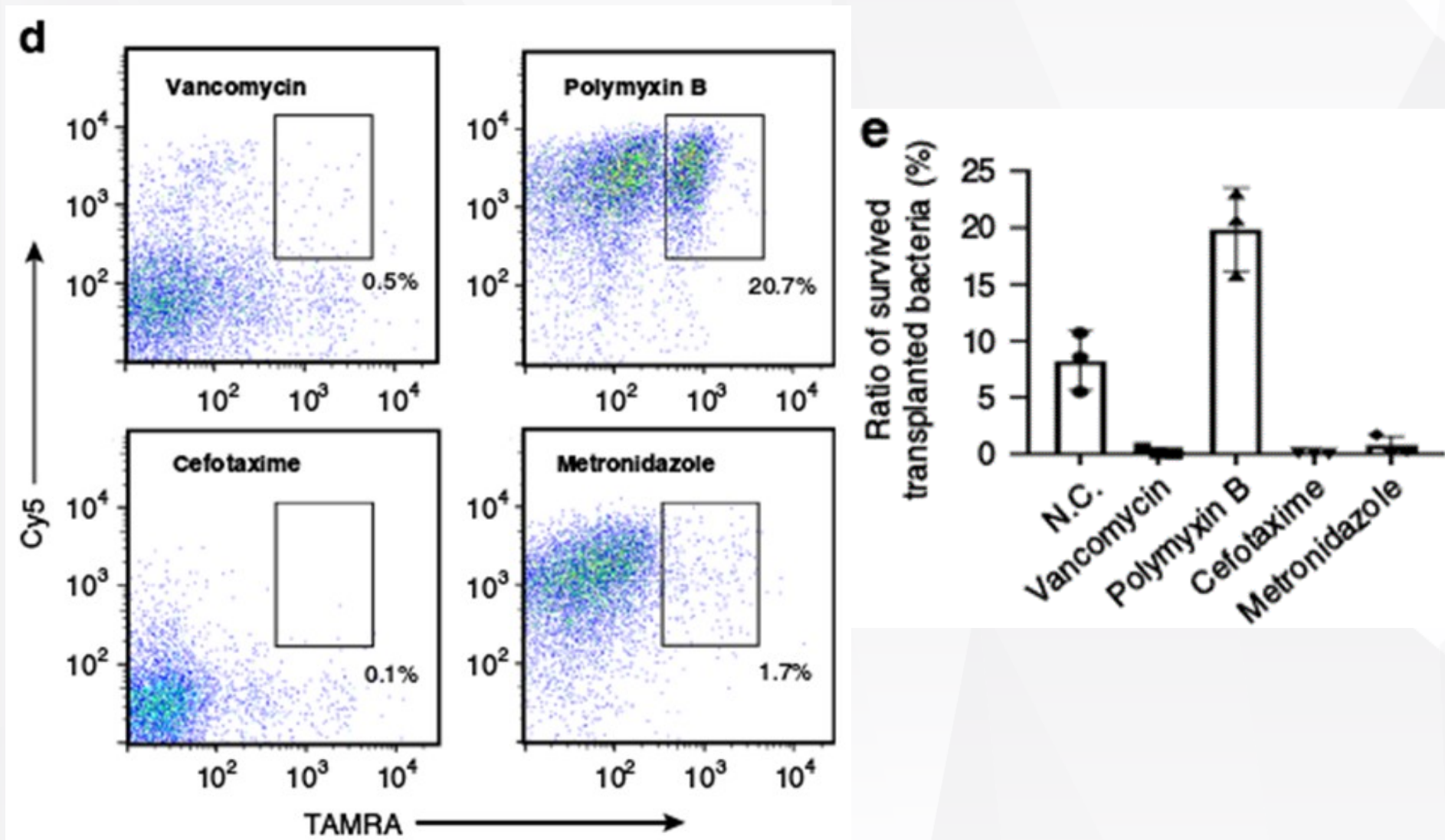
小鼠粪便移植

03 结果与讨论 — 应用 跟踪小鼠和人类粪菌



人类肠道菌群体外培养系统，人类粪便中的细菌也可被标记。

03 结果与讨论 — 应用 评估抗生素的预处理效果



只有多粘菌素B处理小鼠的肠道中的双重标记菌比例高。相比之下，万古霉素、头孢噻肟、甲硝唑菌导致移植效果下降。

第 4

部分

总结

- (1) 研究者开发了一种使用基于 D-氨基酸的代谢探针进行顺序标记 (STAMP) 的策略, 以评估所移植微生物群的生存能力。
- (2) 首先向供体小鼠施用荧光 D-氨基酸 (FDAA), 以在体内代谢性标记肠道菌群。标记的微生物群被移植到受体小鼠中, 其后该小鼠接受另一种颜色不同的 FDAA。尚存的移植物应同时包含两个 FDAA, 并且可以通过同时呈现两种颜色来区分。分离存活细菌和16S rDNA 测序确定了几个富集的属, 表明特定细菌在 FMT 中的重要性。
- (3) 使用 STAMP评估移植细菌的存活率和不同抗生素对预处理受体的移植存活率的影响。

第

5

部分

学习的地方

- (1) 思维：生物和化学的结合，代谢探针的妙用。
- (2) 后续，代谢探针+红外II区荧光 ([视频](#))。

感谢您的观看与聆听

报告人：曹慧

时间：2019年12月29日