



乳清粉对断奶实验兔肠道微生物区系和 益生菌的影响

吕建敏¹, 刘月环²

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

【摘要】 目的 利用分子生物学技术研究饲料中添加乳清粉对断奶早期实验兔肠道微生物区系和益生菌的影响。方法 采用单因子实验设计, 选择40日龄断奶实验兔, 随机分为4组(每组12只), 分别饲以乳清粉添加水平为0%、2%、5%和10%的饲料。饲喂30 d后, 每组随机取8只兔, 麻醉处死, 取盲肠内容物提取细菌总DNA, 首先利用PCR-DGGE技术分析兔盲肠微生物区系多样性, 进而应用实时荧光定量PCR(SYBR Green I)法定量检测盲肠细菌中双歧杆菌和乳酸杆菌含量。结果 (1) 实验兔盲肠细菌DGGE各分析参数随乳清粉添加量的提高逐渐上升, 添加不同水平乳清粉均可显著增加DGGE条带数($P < 0.05$, $P < 0.01$)。2%和5%乳清粉添加水平组的DGGE条带数和香农指数均极显著($P < 0.01$)高于未添加组, 但以上2项指标在乳清粉各添加水平间差异无显著性($P > 0.05$)。DGGE均匀度指数在各实验组间均无差异显著性($P > 0.05$)。(2) 饲料中添加乳清粉可提高实验兔盲肠内容物中乳酸杆菌和双歧杆菌数量, 其中各乳清粉处理组(2%、5%和10%)的乳酸杆菌数量均显著高于0%添加组($P < 0.05$), 10%乳清粉添加组的双歧杆菌数量显著高于未添加组($P < 0.05$), 但与其他2个乳清粉添加组无差异显著性($P > 0.05$)。结论 (1) 饲料中添加乳清粉可显著提高实验兔盲肠细菌菌群的多样性。(2) 在实验兔饲料中添加乳清粉可有效增加肠道益生菌数量。

【关键词】 实验兔; 乳清粉; PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE); 实时荧光定量PCR; 双歧杆菌; 乳酸杆菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 08-0012-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.008.003

Effects of dried whey on the intestinal bacterial community and probiotics in weaned laboratory rabbits

LV Jian-min¹, LIU Yue-huan²

(1. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of dried whey on the intestinal bacterial community and probiotics in weaned laboratory rabbits. **Methods** A single factor design was employed to investigate the effects of dried whey supplemented at levels of 0%, 2%, 5% and 10%, respectively, on 48 weaned (40-day-old) laboratory rabbits. At the day 30, eight rabbits in each group were taken and sacrificed after anesthesia. The total bacterial DNA from the ceecal content of each selected rabbit was drawn to analyze the bacterial community and intestinal probiotics (*Bifidobacterium* and

[基金项目] 浙江省科技厅资助项目基金(编号:2008F0003); 浙江中医药大学比较医学创新团队基金(编号:XTD201301)。

[作者简介] 吕建敏(1971-), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物营养与免疫。E-mail: ljm6666@163.com。

[通讯作者] 刘月环(1974-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 生物技术与实验动物育种。Email: yuehuanliu@163.com。

Lactobacillus) population by PCR-DGGE and real-time fluorescence quantitative PCR, respectively. **Results** 1) The DGGE parameters of ceecal bacterial community were increased with the increasing dried whey supplemental levels. The number of DGGE band in 2%, 5% and 10% dried whey supplement groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the Shannon index in 5% and 10% supplement groups ($P < 0.01$) were significantly higher than that in the 0% supplement group, but the indices of DGGE band and Shannon index had no significant differences among the 2%, 5% and 10% dried whey supplement groups ($P > 0.05$). Supplying dried whey has no significant effects on the homogeneity index ($P > 0.05$). 2) The population of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in ceecal content had a trend of increase with the rising dried whey supplement levels. Compared with the 0% supplement group, the *Lactobacillus* population in the 2%, 5% and 10% supplement groups ($P < 0.05$), the *Bifidobacterium* population in the 10% supplement group ($P < 0.05$) were significantly increased. **Conclusions** The results of our study indicate that: 1) Supplying dried whey in the feed of laboratory rabbit can effectively increase the diversity of ceecal bacterial community. 2) Dried whey may effectively improve the intestinal probiotics population.

【Key words】 Laboratory rabbits; Dried whey; PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE); Real-time fluorescence quantitative PCR; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*

乳清粉是乳品在加工乳酪过程中产生的副产品,具有丰富的营养成分,不仅含有大量的乳糖、乳清蛋白,而且还有 B 族维生素和钙、磷等多种矿物质。许多研究显示,乳清粉具有促进幼年动物肠道发育、控制腹泻以及增强免疫功能和抗氧化等作用^[1-5]。目前,断奶幼兔由腹泻导致死亡问题是困扰实验兔产业化发展的瓶颈之一,幼兔腹泻的主要原因是其肠道消化机能不完善,极易受饲料和环境的影响产生肠道菌群失衡^[6]。用抗生素治疗腹泻效果不胜理想,且国家标准明确规定^[7],实验动物饲料中禁止添加抗生素,因此,迫切需要寻找一种安全、天然、可防治幼兔腹泻饲料原料。我们前期研究发现,在日粮中添加 5% 乳清粉可使断奶实验兔的腹泻率由 2.38% 降至 0%,死亡率由 20% 降至 0%,说明乳清粉对降低实验兔的腹泻率和死亡率效果显著^[8]。据此我们推测乳清粉对幼年动物腹泻的防治作用可能是通过改善肠道内微生态环境来实现的,而维持肠道的健康,不仅需要正常的肠道微生物区系结构,还要求肠道益生菌需占优势地位^[9],其中双歧杆菌和乳酸杆菌是人和动物体内的重要益生菌^[10]。为进一步验证上述假设,有必要对断奶实验兔肠道微生物区系相关特征和的益生菌数量进行研究。在研究方法上,近年一种用于分析肠道细菌 16S rRNA 的分子指纹技术——变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术已广泛用于微生物的区系结构和分类的研究,它的优点是避免了传统微生物方法学在研究过程中容易产生的种群丢失、种群结构不清、获得菌群数量不足等局限性,可以直接、可靠地反映

微生物的多样性情况^[11,12]。而与传统菌群培养鉴定、计数方法相比,目前广泛应用的实时荧光定量 PCR 方法具有操作简便,灵敏性、特异性高,污染小,计数精确等优点^[9,13,14]。本实验采用 PCR-DGGE 和实时荧光定量等分子生物学技术,对幼兔盲肠内容物标本进行微生物区系分析和双歧杆菌与乳酸杆菌计数,以期较深入阐明乳清粉对实验兔肠道微生态的作用机制,为合理开发乳清粉特色产品提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

普通级日本大耳白兔 48 只,雌雄各半,40 日龄(刚断奶),体质量为 1.0 ~ 1.2 kg,按所采食饲料中乳清粉含量不同随机分为 A、B、C、D 共 4 组(即 A ~ D 组试兔分别采食乳清粉添加水平为 0%, 2%, 5% 和 10% 的 4 种饲料)。实验兔由浙江省新昌县大市聚镇兴达兔场提供【SCXK(浙)2010-0042】(实验动物质量合格证号:0010993),实验在浙江中医药大学动物实验研究中普通级兔饲养室【SYXK(浙)2008-0116】中进行,环境温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 50% ~ 70%,氨浓度 $\leq 14 \text{ mg/m}^3$,光照:150 ~ 200 Lx,12 h/12 h 明暗交替,噪音 $< 50 \text{ dB}$ 。所有实验兔单笼饲养,早、中、晚各喂 1 次全价营养饲料(饲料配方和营养水平参见文献 8),自由饮水,按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。试兔经 7 d 预试期适应后进行为期 30 d 的正式实验。

1.2 仪器与试剂

紫外分光光度计 (Thermo Scientific NanoDrop

2000,由 Thermo 公司制造),用于所提取 DNA 的浓度和纯度测定。东胜龙 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司生产),用于普通 PCR。DGGE 琼脂糖凝胶电泳系统(美国 Bio-Rad 公司生产),用于变性梯度凝胶电泳。Real-time PCR 检测系统(FX96 Real-Time PCR System,美国 Bio-Rad 公司生产),用于荧光定量 PCR。

饲料级乳清粉(粗蛋白含量为 12%,乳糖含量为(65~70)% ,购自美国 Saputo 公司。双歧杆菌(植物双歧杆菌)和乳酸杆菌(冻干乳酸菌原料菌粉)标准品分别购自拜弗德生物科技有限公司及中科嘉亿生物工程公司。PCR 试剂由上海华津生物技术公司生产。DGGE 试剂由 Sigma 公司生产。细菌荧光定量 PCR 试剂来自于杭州欣越生物技术公司,为标记为 SYBR Green I 荧光染料的整套试剂。

1.3 方法

1.3.1 盲肠内容物标本收集与保存:在正试期第 30 天,分别从每个实验组取试兔 8 只,麻醉处死,解剖,取盲肠内容物立即置入无菌离心管, -80℃ 冻存,备用。

1.3.2 细菌总 DNA 抽提:用酚-氯仿方法提取。取 0.1 g 盲肠内容物,抽提细菌基因组 DNA:将样品悬浮于 900 μ L PBS 溶液,洗涤、离心 2 次弃上清液,加入 400 μ L 裂解液(100 mg/L 蛋白酶 K,10 mmol/L Tris-HCl,15 mmol/L NaCl,10 mmol/L EDTA,4 g/L SDS pH 8.0)重悬细胞,37℃ 保温(12~24) h 后再加 450 μ L 平衡酚,混匀,5 000 r/min 离心 10 min,转移上层水相重复酚抽提 1 次。再转移上层水相,加入 450 μ L 氯仿:戊醇(24:1),混匀,5 000 r/min 离心 10 min。再转移上层水相,加入 3 mol/L 乙酸钠(pH 5.2)1/10 体积和无水乙醇 2.5 倍体积,混匀,置 -20℃ 1 h 后,10 000 r/min 离心 15 min。以 700 mL/L 乙醇洗涤 2 次,晾干后,加入 50 μ L TE,用紫外分光光度计测定,计算浓度和比值,判断所提取 DNA 的浓度和纯度,应用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果,产物置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 盲肠微生物区系 PCR-DGGE 分析:利用 1.3.2 从盲肠内容物中提取的细菌总 DNA,进行盲肠微生物区系 PCR-DGGE 分析,方法如下:

1.3.3.1 细菌 16S rDNA V6-V8 区扩增:参照文献[15]进行细菌 16S rDNA V6-V8 区扩增,所采用一对细菌通用引物序列为:上游引物为 5'-CGC CCG

GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC,下游引物为 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC,PCR 产物片段大小为 470 bp,由上海华津生物技术公司合成。PCR 反应体系和条件为同文献[15]。PCR 反应结束按文献[15]方法鉴定 PCR 产物。

1.3.3.2 变性梯度凝胶电泳(DGGE):参照文献[15]配制浓缩胶和高低浓度变性胶,用梯度混合仪制备变性梯度凝胶,点样后进行电泳,电泳条件同文献[15]。

1.3.3.3 银染及凝胶成像:电泳结束后,参照文献[15]进行硝酸银染色,用凝胶成像系统拍照。

1.3.3.4 DGGE 图像分析:采用 Gel-pro4.5 软件和 Past 软件对电泳图像进行处理,分析 DGGE 条带数、香农指数、均匀度指数等指标。

1.3.4 盲肠中益生菌数量荧光定量 PCR 检测:

1.3.4.1 益生菌特异性引物设计:根据 GenBank 中提供的 16S rRNA 基因序列设计 2 种益生菌(双歧杆菌和乳酸杆菌属)特异性引物(genus-specific primers),双歧杆菌的上游引物为 gaaagccaattacggacggaag,下游引物为 tgggttataccgccttgac,PCR 产物片段大小为 180 bp;乳酸杆菌的上游引物为 accagtgtgggatgttcgaac,下游引物为 taaccaaccgttagtggcgc,PCR 产物片段大小为 144 bp。以上 2 组引物对由上海华津生物技术公司合成。

1.3.4.2 标准菌株基因组 DNA 抽提及引物对特异性检测:本实验选择由拜弗德生物科技有限公司生产的植物双歧杆菌(*Bifido-bacterium adolescentis*)和由中科嘉亿生物工程公司生产的冻干乳酸菌原料菌粉(*Lactobacillus plantarum*)作为标准菌株。分别称取上述菌粉各 0.1g 按 1.3.2 步骤进行细菌基因组 DNA 抽提,DNA 样品置 -20℃ 保存备用。

分别取以上 2 种菌株基因组 DNA 抽提液进行常规 PCR 反应,反应体系和条件同文献[9]。应用 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物片段大小与预先设计的是否一致,以确定引物的特异性。

1.3.4.3 扩增曲线与灵敏度检测:将标准品按梯度稀释法做 10 倍系列稀释,使其形成 $10^7 \sim 10^2$ 拷贝/ μ L,经 Real-time PCR 反应后得到模板循环数与荧光强度关系图。

1.3.4.4 标准曲线和溶解曲线制作:将双歧杆菌和

乳酸杆菌的 DNA 提取物经紫外分光光度计测定浓度,换算成双歧杆菌和乳酸杆菌的拷贝数,按文献[9]方法制作标准曲线,real-time PCR 反应体系和条件同文献[9]。反应结束按仪器操作说明选择熔解曲线分析,自动采集荧光,制作熔解曲线。

1.3.4.5 幼兔盲肠内容物双歧杆菌和乳酸杆菌含量检测:按制备标准曲线的反应体系和条件分别对各组待测样品的 DNA 抽提液进行实时荧光定量 PCR 反应,实验设阴性对照和标准品对照,每个样品做 2 个重复。

1.4 统计学方法

实验结果用平均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行差异分析和多重比较。

2 结果

2.1 盲肠微生物菌群 DGGE 分析结果

2.1.1 盲肠细菌 16S rDNA V6-V8 区 PCR 扩增产物鉴定:由图 1 (PCR 产物的电泳图谱)可见,每个样品均出现一条特异性的 PCR 产物片段,与 marker 对比,该片段大小在 500 bp 左右,与设计所预期的一致。

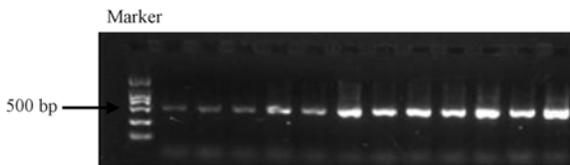


图 1 盲肠细菌 V6-V8 区 PCR 扩增产物电泳图谱
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of bacterial V6-V8 PCR products from ceecal microbes

各实验组盲肠微生物菌群 DGGE 图谱及 DGGE 参数分析结果见图 2 和表 1,由表 1 可见,随着乳清粉添加水平提高,DGGE 各分析参数都呈上升趋势。添加乳清粉可显著提高实验兔盲肠菌群的 DGGE 条带数和香农指数;添加乳清粉各组(B、C、D 组)的 DGGE 条带数均显著高于未添乳清粉的 A 组($P < 0.05$),且 C、D 组的 DGGE 条带数和香农指数与 A 组差异极显著($P < 0.01$)。添加乳清粉对盲肠菌群的 DGGE 均匀度指数无显著影响($P > 0.05$)。以上结果说明在实验兔饲料中添加乳清粉可显著提高盲肠微生物菌群的多样性。

2.2 盲肠中双歧杆菌和乳酸杆菌 Real-time PCR 检测结果

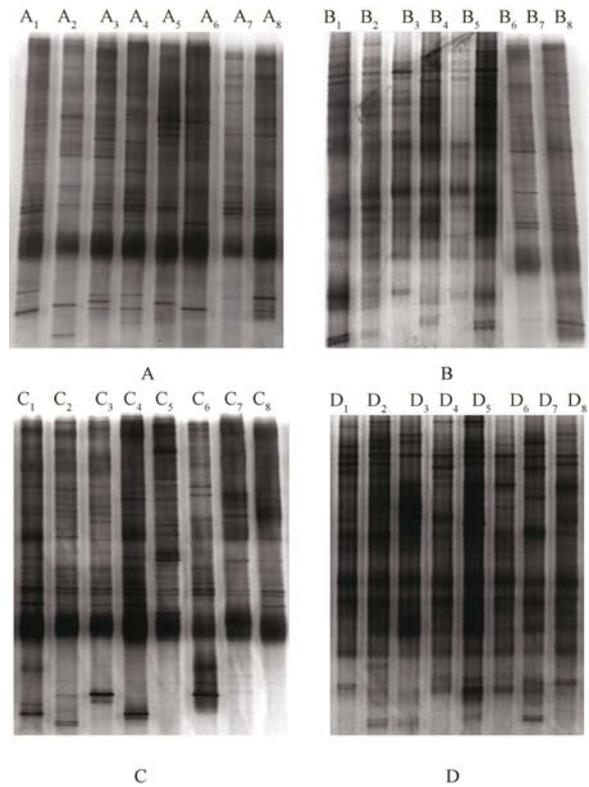


图 2 A、B、C、D 组盲肠细菌区系 DGGE 图谱
Fig.2 DGGE profile of ceecal bacterial community in the groups A, B, C and D

2.2.1 Real-time PCR 可靠性分析:双歧杆菌和乳酸杆菌荧光曲线、标准曲线和熔解曲线见图 3、图 4 和图 5。由图 3 (双歧杆菌和乳酸杆菌荧光曲线)可见不同拷贝数的模板荧光曲线均呈“S”型,且实验所用的双歧杆菌和乳酸杆菌引物对的扩增灵敏度均小于 100 CFU/mL。图 4 显示双歧杆菌和乳酸杆菌标准曲线的扩增线性范围为 $10^2 \sim 10^7$,线性相关系数为 0.989 ~ 0.999。图 5 为阳性模板的熔解曲线,可见 2 种细菌的熔解曲线呈单峰,双歧杆菌的 T_m 为 86.9,乳酸杆菌的 T_m 值为 83.5。

以上结果表明本实验所建立的荧光定量 PCR 反应体系扩增灵敏度好,扩增产物单一,标准曲线线性相关程度高,因此具有很好的可靠性。

2.2.2 样品双歧杆菌和乳酸杆菌含量测定结果:各实验组幼兔盲肠内双歧杆菌和乳酸杆菌数量见表 2;随着实验兔饲料中乳清粉添加量的提高,幼兔盲肠中双歧杆菌和乳酸杆菌的含量都呈上升趋势,其中,B、C、D 组(2%、5% 和 10% 乳清粉添加组)的乳酸杆菌的含量均显著($P < 0.05$)高于 A(0%)组;D 组的双歧杆菌含量显著高于 A 和 B 组($P < 0.05$),与 C 组无差异显著性($P > 0.05$)。

表 1 盲肠微生物菌群 DGGE 参数分析结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 DGGE parameters of the ceecal bacterial community ($\bar{x} \pm s$)

项目 Items	乳清粉添加水平 Dried whey supplement levels/%			
	0 (A)	2 (B)	5 (C)	10 (D)
DGGE 条带数, Number of DGGE bands	18.63 ± 4.00 ^{Bb}	23.13 ± 3.23 ^{ABa}	24.13 ± 3.00 ^{Aa}	25.38 ± 3.07 ^{Aa}
香农指数, Shannon index	2.67 ± 0.24 ^{Bb}	2.89 ± 0.19 ^{ABab}	3.06 ± 0.34 ^{Aa}	3.13 ± 0.25 ^{Aa}
均匀度指数, Homogeneity index	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.05	0.96 ± 0.09	0.97 ± 0.05

注:同行无字母或数据肩标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

Note. In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean very significant difference ($P < 0.01$). The same as in table 2.

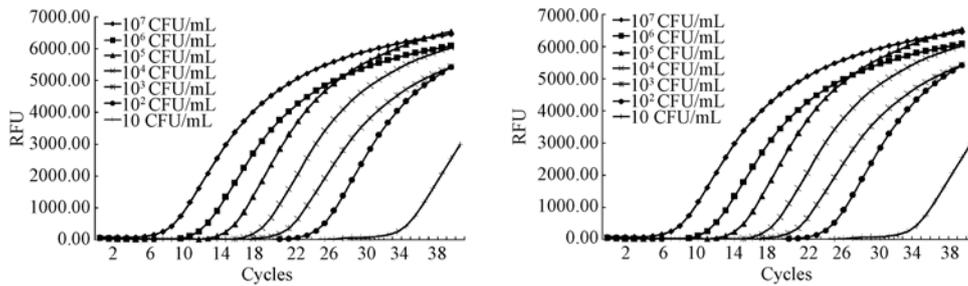


图 3 双歧杆菌与乳酸杆菌荧光曲线

Fig.3 Fluorescence curves of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*

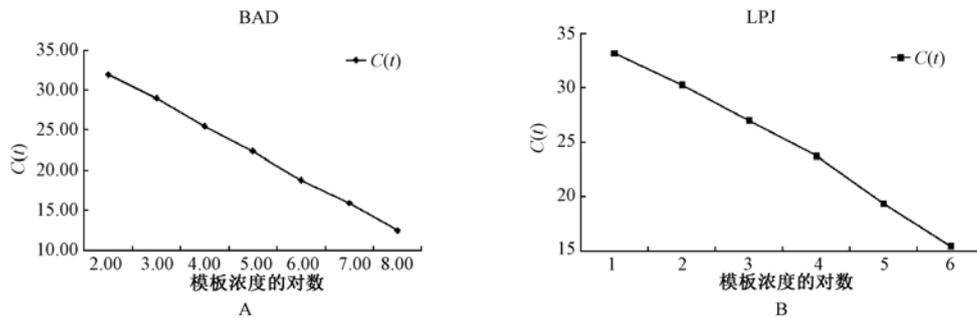


图 4 双歧杆菌(A)与乳酸杆菌(B)的标准曲线(扩增线性范围 $10^2 \sim 10^7$, 标准曲线相关系数为 0.989 ~ 0.999)

Fig.4 Standard curves of the real-time fluorescence quantitative PCR of *Bifidobacteria* (A) and *Lactobacilli* (B). The linear range of amplification varied between $10^2 - 10^7$ genomes, depending on the genome size of the target species. Standard curves had correlation coefficient values between 0.989 - 0.999)

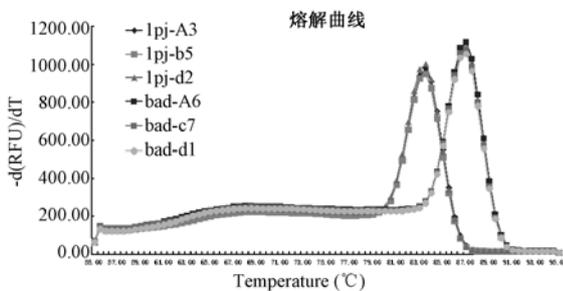


图 5 双歧杆菌和乳酸杆菌的熔解曲线

Fig.5 Dissociation curves of amplification products of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*

3 讨论

肠道微生态环境对动物肠道甚至整个机体的健康起着重要作用,因此如何选择一种快速、准确、简便的肠道微生物研究方法对深入研究肠道生态就显得尤为必要。传统细菌培养、计数方法费时费力,还存在容易引起种群丢失、种群结构不清等弊病,并且由于个别菌种难以培养,不能准确地反映肠道菌群结构和细菌数量,大大阻碍了肠道生态研究发展。分子生物学技术的发展,为深入研究肠道菌群结构特征及细菌定量提供了便利。目前

表 2 双歧杆菌和乳酸杆菌的实时定量结果 (log₁₀ N /0.05 g 盲肠内容物, $\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Population of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the ceecal content samples (log₁₀ N /0.05 g wet ceecal content, $\bar{x} \pm s$)

项目 Items	乳清粉添加水平 Dried whey supplement levels/%			
	0 (A)	2 (B)	5 (C)	10 (D)
双歧杆菌 <i>Bifidobacteria</i>	4.05 ± 0.61 ^b	4.17 ± 0.97 ^b	4.51 ± 0.51 ^{ab}	4.98 ± 0.36 ^a
乳酸杆菌 <i>Lactobacilli</i>	4.33 ± 0.79 ^b	4.74 ± 0.67 ^a	5.74 ± 1.65 ^a	5.24 ± 0.91 ^a

应用最广泛的就是用于肠道微生物遗传特性和分类研究的变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术和用于细菌定量的实时荧光定量 PCR^[11-14]。本实验利用 PCR-DGGE 和实时荧光定量 PCR 等分子生物学技术研究实验兔盲肠微生物区系的多样性和相关益生菌数量,结果显示:本实验所建立的 PCR-DGGE 体系可准确获得细菌 16S rDNA 的 V6-V8 区 PCR 产物特异性片段,并获得了较清晰的 DGGE 图谱,可顺利进行各项参数的分析;实验建立的实时荧光定量 PCR 反应体系也具有较高的灵敏度 (扩增灵敏度小于 100 CFU/mL),可靠性 (溶解曲线显示为单峰,扩增产物单一) 和准确性 (利用标准菌株制备的标准曲线呈强线性相关),类似于相关文献报道^[9,14,15]。以上结果表明本实验所建立 DGGE-PCR 和实时荧光定量 PCR 反应体系是可行的,值得在实验兔肠道微生物研究中推广应用。

以往研究表明,乳清粉对防止幼年动物腹泻,促进动物生长起到重要作用^[1,2,8,16,17],但对乳清粉抗腹泻作用的机制研究还鲜有报道。本实验较深入研究了乳清粉对实验兔肠道微生物区系多样性和益生菌数量消长的影响,发现断奶实验兔采食含一定量乳清粉饲料 1 个月后,盲肠菌群的 DGGE 条带数和香农指数 (反映肠道微生物多样性的指标) 显著提高,盲肠中双歧杆菌和乳酸杆菌的数量也显著增加,且 DGGE 条带数、香农指数、双歧杆菌和乳酸杆菌数量均随乳清粉添加量的增加呈上升趋势。该结果充分验证了我们前期的推测,并可由此得出乳清粉抗腹泻作用的可能的机制为:一方面,乳清粉中所含有乳糖可为肠道中乳酸菌发酵提供大量底物,不仅可促进乳酸菌的继续增殖,而且乳酸菌发酵所产生的乳酸可促使肠道 pH 下降,能促进其他益生菌增殖,提高菌群结构的多样性,抑制有害菌生长;另一方面,乳清粉中含有多种乳蛋白 (乳铁蛋白、免疫球蛋白、支链氨基酸等),具有抗氧化、增强免疫等生物活性作用^[5],对于维持肠道正常菌群结构,提高菌群多样性起到积极作用。本研究充分验证了乳清粉具有改善肠道微生态环境,促进益生

菌增殖的作用,为乳清粉作为一种抗腹泻的天然饲料原料应用于实验兔饲养中提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 李军平. 添加乳清粉和添加高铜高锌日粮对断奶前后仔猪生产性能的影响 [J]. 中国养猪业, 2012, 9: 43-45.
- [2] Kobayashi Y, Itoh A, Miyawaki K, et al. Effect of liquid whey feeding on fecal microbiota of mature and growing pigs [J]. *Animal Sci J*, 2011, 82(4): 607-615.
- [3] Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats [J]. *Nutrition*, 2011, 27(5): 582-589.
- [4] Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health [J]. *Therapy*, 2006, 3(1): 69-78.
- [5] Bulut Solar B, Akin N. Functionality of whey protein [J]. *Int J Health Nutr*, 2012, 3(1): 1-7.
- [6] 王仲兵. 微生物制剂对幼兔腹泻治疗的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(6): 475-478.
- [7] 中华人民共和国质量技术监督检验检疫总局. GB 14924.1-2001 实验动物配合饲料通用质量标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [8] 吕建敏, 蔡兆伟, 蔡月琴, 等. 乳清粉对断奶实验兔生长性能、抗氧化及免疫功能的影响 [J]. *动物营养学报*. 2013, 25(13): 2951-2957.
- [9] 王翔, 陈津津, 洪莉, 等. 外源性双歧杆菌对肠外营养幼兔肠道益生菌的影响 [J]. *营养学报*, 2007, 29(6): 573-577.
- [10] 常维山, 牛钟相, 朱瑞良, 等. 兔肠道正常微生物群的研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 1996, 8: 14-16.
- [11] 付琳林, 李海星, 曹郁生. 利用变性梯度凝胶电泳分析微生物多样性 [J]. *生物技术通报*, 2004, 2: 39-40.
- [12] 徐博文, 张琦. PCR-DGGE 技术在动物胃肠道菌群多样性研究中的应用 [J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(10): 55-57.
- [13] 吴燕涛, 刘晓莉, 曹悦, 等. 实时荧光定量 PCR 法测定发酵乳中双歧杆菌 [J]. *食品科学*, 2013, 34(08): 172-175.
- [14] 宋美茹, 姚萍. 应用实时荧光定量 PCR 定量检测溃疡性结肠炎肠道大肠埃希菌、乳酸杆菌及双歧杆菌属的变化 [J]. *中国微生态学杂志*, 2012, 24(3): 239-243.
- [15] 吕建敏. 实验兔新品系 (WHBE 兔) 蛋白质需要特点及相关机理研究 [D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2009: 56-59.
- [16] 易永宏. 日粮乳清粉含量对乳猪生产性能的影响 [J]. *动物科学与动物医学*, 2005, 22(5): 50-51.
- [17] 穆晓峰, 雷华. 日粮中添加乳清粉和膨化豆粕对断奶仔猪生产性能影响 [J]. *畜牧与兽医*, 2007, 39(8): 30-31.

[修回日期] 2015-06-28