

应用 *rpoB* 和 16S rDNA 基因的变性梯度凝胶电泳技术 对山羊瘤胃细菌多样性的研究

石鹏君¹ 柏映国¹ 袁铁铮¹ 姚 斌^{1*} 范云六²

(中国农业科学院¹ 饲料研究所² 生物技术研究所 北京 100081)

摘 要 采用免培养的 *rpoB* 和 16S rDNA 基因的变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)对 3 种山羊(波尔山羊、内蒙古绒山羊、四川南江黄羊)瘤胃细菌优势菌群结构进行了比较分析。研究结果显示 *rpoB* DGGE 图谱中条带数目少于 16S rDNA 图谱,并且条带分离效果明显,更有利于分析瘤胃细菌群落组成。从两种 DGGE 图谱中均可以发现 3 种山羊瘤胃细菌具有一定的相似性,种内个体间相似性明显高于种间相似性,这说明寄主品种是影响瘤胃细菌种群构成的一个重要因素。同时进行了部分优势细菌 16S rDNA 基因 V6-V8 区序列的系统发育分析。基因序列分析表明,DGGE 图谱中优势条带的 16S rDNA 基因序列中有 4 条克隆的序列与基因库最相似菌的相似性大于 97%,余下的克隆序列相似性在 89%~96%之间,其中 13 条序列的与之相似性最高的序列均来自于未被鉴定的瘤胃细菌。

关键词: DGGE; 16S rDNA 基因; 编码 RNA 聚合酶 β 亚基(*rpoB*)基因; 瘤胃细菌; 遗传多样性

中图分类号: Q938 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2007)02-0285-05

瘤胃是一个复杂的生态系统,是被公认的作为研究胃肠道系统最好的材料之一^[1,2]。从 1843 年首次在反刍动物的瘤胃内发现微生物时起,人们对其的研究已有 160 多年。瘤胃微生物种类繁多,包括古细菌、细菌、真菌和原生动物。其中瘤胃细菌种类最多,同种细菌在瘤胃中又有多种功能,因此对瘤胃细菌的研究一直是研究瘤胃微生物的热点^[3]。

早期对瘤胃细菌的研究基于人工培养的方法,存在一定的局限性。近年发展起来的免培养结合 16S rDNA 的变性梯度凝胶电泳方法逐步克服了常规培养方法的不足^[4]。通过 DGGE 基因指纹图谱条带数可以反应出环境微生物群落中优势类群的数量,即微生物种类的多样性。但基于 16S rDNA 的 DGGE 方法也存在一定的缺陷,如同一种细菌可能在 DGGE 指纹图谱中占有几条带等^[5]。为避免这一缺陷,选择基于 RNA 聚合酶 β 亚基的编码基因 *rpoB* 的 DGGE 方法可以使 DGGE 指纹图谱中一条带代表一种菌,能更准确的研究瘤胃细菌的遗传多样性^[6~8]。

本研究以北京波尔山羊、内蒙古绒山羊、四川南江黄羊为研究对象,同时采用 16S rDNA 的 V6-V8 区基因和 *rpoB* 基因的 PCR-DGGE 基因指纹技术对不

同品种山羊瘤胃优势细菌种群的组成进行揭示和比较,描述瘤胃细菌种类的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和样品收集: 北京波尔山羊、内蒙古绒山羊、四川南江黄羊各三头,饲喂单一牧草。饲喂后 16h 屠宰取样, -70℃ 保存备用。

1.1.2 主要仪器和试剂: Mini-Beadbeater 为 Biospec 公司产品; DGGE 所用仪器 The Dcode™ Universal Mutation Detection System 为 Bio-Rad 公司产品; QIAamp® DNA Stool Mini Kit 为 Qiagen 公司产品; Cycle-Pure Kit 为 Omega 公司产品; Platinum® Taq DNA Polymerase 为 Invitrogen 公司产品; BSA 为 NEB 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 PCR 扩增

总 DNA 的提取参照文献[9]的方法。根据文献[6,10]报道的 16S rDNA 的 V6-V8 可变区基因和 *rpoB* 基因序列,合成二对引物,然后进行 PCR 反应。

V6-V8 区特异引物序列: V968f(5'-CGCCCGCC GCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGAACGC GAAGAACCTTAC-3'); V1406r(5'-ACGGGCGGTGTGTA

基金项目: 国际科技合作重点项目计划(2004DFA06800); 中央级科研院所社会公益研究专项资助(2005DIB4J038)

* 通讯作者。Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

作者简介: 石鹏君(1979-),男,山东人,博士研究生,研究方向为酶的分子生物学与基因工程。E-mail: pengjunshi321@yahoo.com.cn

其他作者: 周志刚¹, 孟 昆¹, 伍宁丰², 刁其玉¹

收稿日期: 2006-08-18; 接受日期: 2006-10-24; 修回日期: 2006-10-10

C-3') ;*rpoB* 特异引物序列 :*rpoB*1698(5'-CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCAACATCGGTTTGATCAAC-3') ;*rpoB*2041(5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3')

PCR 反应实验设置不添加模板的阴性对照组,模板体积由 dd H₂O 补充。PCR 反应程序采用降落 PCR 策略,16S rDNA 的 V6-V8 区基因 PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,61~56℃ 30s,72℃ 1 min(其中每个循环后复性温度下降 0.5℃);10 个循环后进入第二个循环程序:94℃ 1 min,56℃ 30s,72℃ 1 min,25 个循环后;72℃ 7 min。*rpoB* 基因 PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,57~52℃ 30s,72℃ 1 min(其中每个循环后复性温度下降 0.5℃);10 个循环后进入第二个循环程序:94℃ 1 min,56℃ 30s,72℃ 1 min,25 个循环后;72℃ 7 min。反应结束后取 5 μL 反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

DGGE 指纹图谱构建采用 DCODE™ 系统(Bio-Rad)。V6-V8 区扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中分离,变性梯度为 40%~65%。其运行条件:0.5×TAE 电泳缓冲液,60℃,82V,15h,每个样品点样量约 200ng PCR 产物,电泳结束后用 EB 进行染色。*rpoB* 扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中分离,变性梯度为 35%~60%。其运行条件:0.5×TAE 电泳缓冲液,60℃,75V,16h,每个样品点样量约 200ng PCR 产物。按快速银染法染色:固定液(10%无水乙醇,0.5%冰乙酸)固定 15min,0.2%硝酸银染色 15min;显色液(3.0%氢氧化钠,0.5%甲醛)显色 5min;固定液终止反应,每一步均用去离子水冲洗胶面。在 Vilber 凝胶成像扫描系统中照像,Bio-1D++ 软件对 DGGE 指纹图谱进行分析。

1.4 DGGE 图谱中部分优势条带的序列分析和系统发育分析

用无菌手术刀将 V6-V8 DGGE 图谱中部分分离明显、条带清晰且亮度高的优势性条带从凝胶上切下,用灭菌的 TE 缓冲液 4℃ 下浸泡过夜,然后取 1μL 作模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物用纯化试剂盒进行纯化,产物经 pGEM-T Easy 载体连接,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,在含有 X-gal 和氨苄青霉素的 LB 固体培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子,并用碱裂解法提取质粒,通过电泳进一步检测外源片段的插入。将阳性克隆送三博远志生物公司测序。测序获得的 16S rDNA 序列上网进行 BLAST 序列比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

BLAST/),每条序列与 BLAST 获得 2 条相似性较高的序列应用 CLUSTAL X 进行匹配比对,然后用 MEGA3.1 软件构建系统发育树。

2 结果

2.1 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

将提取的瘤胃微生物总 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳,样品总 DNA 中 90% 的条带大于 1.6kb(16S rRNA 的全长),适合进行下游反应。以所提取的瘤胃微生物总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,发现成功地扩增出 16S rDNA V6-V8 区片段和 *rpoB* 基因片段。

2.2 DGGE 指纹图谱建立及分析

应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V6-V8 区和 *rpoB* 基因片段 PCR 产物,均可以看到其分离为若干条带,但不同样品的 PCR 产物出现的带型有一定差别。从 16S rDNA V6-V8 片段和 *rpoB* 基因片段 PCR 产物的 DGGE 图谱发现(图 1,图 2):DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在一定程度的差异,充分显示了瘤胃细菌种群的多样性。各样品中 *rpoB* DGGE 图谱的条带数明显少于 V6-V8 DGGE 图谱的条带数,而且 *rpoB* DGGE 图谱条带分离的效果

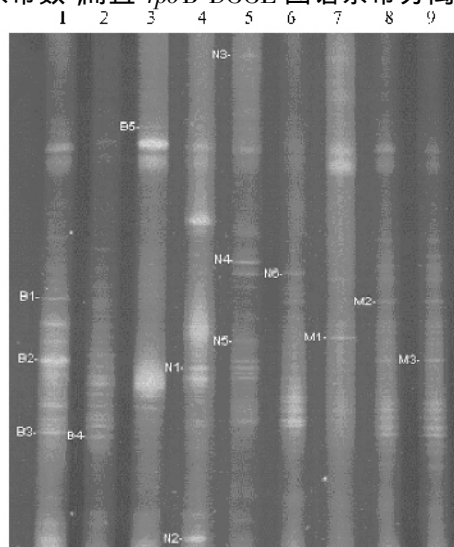


图1 3种山羊瘤胃细菌 16S rDNA V6-V8 区基因的 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.1 The PCR-DGGE fingerprint and its pattern of the V6-V8 region gene of 16S rDNA of the bacteria from the rumen of three species goat. 1~3: The rumen samples of No. 1~3 boer goats in Beijing respectively; 4~6: The rumen samples of No. 1~3. Nanjiang yellow goats in Sichuan respectively; 7~9: The rumen samples of No. 1~3 Inner Mongolia cashmere goats respectively.

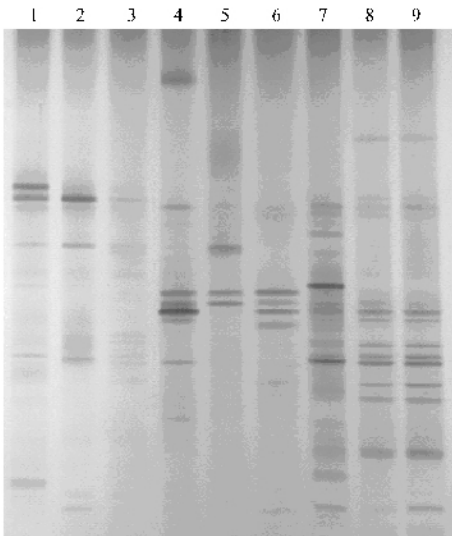


图2 3种山羊瘤胃细菌 *rpoB* 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.2 The PCR-DGGE fingerprint and its pattern of the *rpoB* gene of the bacteria from the rumen of three species goat. 1 ~ 3 : The rumen samples of No. 1 ~ 3 boer goats in Beijing respectively ; 4 ~ 6 : The rumen samples of No. 1 ~ 3 Nanjiang yellow goats in Sichuan respectively ; 7 ~ 9 : The rumen samples of No. 1 ~ 3 Inner Mongolia cashmere goats respectively .

也相对明显。相同品种间相对具有更多共同的条带,说明这些供试样品之间可能存在一些共有的细菌类型。而且某些公共条带的强度也不相同,表明同一微生物物种在不同样品的丰度上也存在一定的差异。从 *rpoB* DGGE 图谱可清晰地看出,不同山羊品种的 DGGE 图谱有较大的差异性,内蒙古绒山羊的条带丰富性最高,菌群更丰富。南江黄羊和内蒙古绒山羊有一些独有的条带,说明可能某些瘤胃细菌具有寄主特异性。

所得图像通过 Bio-1D + 软件进行处理,用戴斯系数计算出的各泳道样品相似性的矩阵(图略),用它分别对 V6-V8、*rpoB* DGGE 图谱中各泳道样品之间的相似性进行比较,并进行 UPGMA 聚类分析(图3,图4)。戴斯系数(V6-V8 DGGE 图谱)的范围在 0.50 ~ 0.71,而在 *rpoB* DGGE 图谱上戴斯系数则更低一些。其中二头内蒙古绒山羊瘤胃细菌在 V6-V8、*rpoB* DGGE 图谱的条带相似性为 100%。不同品种间则表现出更高的差异性,两个样品之间最低的相似性在 V6-V8 和 *rpoB* DGGE 图谱上分别为 0.25%和 0.22%。V6-V8DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析结果可以看出 3 种山羊瘤胃细菌具有一定的相似性,种内个体间相似性明显高于种间相似性,其中波尔山羊相对于其他两种山羊具有较高的种间相似

性。*rpoB* DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析结果中波尔山羊、内蒙古绒山羊种内的相似性高于种间的相似性。由此可见寄主是影响瘤胃细菌群落构成的重要因素。

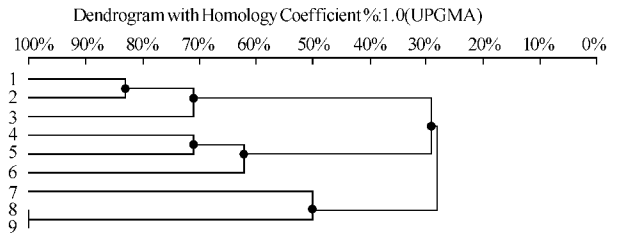


图3 16S rDNA V6-V8 区基因的 PCR-DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig.3 The dendrogram of the PCR-DGGE fingerprint of the V6-V8 region gene of 16S rDNA of the bacteria from the rumen. 1 ~ 3 : the rumen samples of No. 1 ~ 3 boer goats in Beijing respectively ; 4 ~ 6 : the rumen samples of No. 1 ~ 3. Nanjiang yellow goats in Sichuan respectively ; 7 ~ 9 : the rumen samples of No. 1 ~ 3 Inner Mongolia cashmere goats respectively .

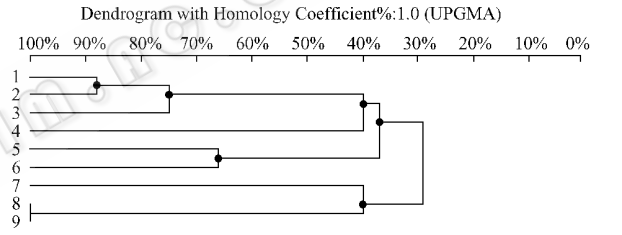


图4 *rpoB* 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig.4 The dendrogram of the PCR-DGGE fingerprint of the *rpoB* gene of the bacteria from the rumen 1 ~ 3 : the rumen samples of No. 1 ~ 3 boer goats in Beijing respectively ; 4 ~ 6 : the rumen samples of No. 1 ~ 3Nanjiang yellow goats in Sichuan respectively ; 7 ~ 9 : the rumen samples of No. 1 ~ 3 Inner Mongolia cashmere goats respectively .

2.3 部分优势条带的序列比对与系统发育树分析

细菌 16S rDNA V6-V8 区条带经 DGGE 分离,切割可分辨的部分优势条带进行序列测定,获得序列 14 条。将所测的序列以 BLAST 程序进行相似性比较分析(表 1)。所获得序列与数据库中的参考序列一起构建系统进化树(图略)。结果表明,所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 89% ~ 99% 之间,大部分相似性序列均来自胃肠道微生物,其中 4 条克隆的序列与基因库最相似菌的相似性大于 97%,余下的克隆在 89% ~ 96% 之间。N1 与 Selenomonas ruminantium isolate L6 相似性为 89%,M2 与 Anaerobic bacterium ED-Mt61/PYG-s6 相似性为 94%。剩余的 12 条序列和与之相似性最高的序列均来自于未培养细菌克隆。新的序列已向 GenBank 提交,序列号为 DQ887804-DQ887817。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表 1 16S rDNA V6-V8 区基因的 PCR-DGGE 优势条带的测序结果分析

Table 1 Sequencing results of the bands cut from the 16S rDNA V6-V8 DGGE gels					
Goats and bands ^a		Accession No.	Closest relative	Identity/%	Source ^b
boer goat	B1	DQ887804	Uncultured bacterium clone YRCE39	95	AY311740
	B2	DQ887805	Uncultured rumen bacterium clone F24-F10	96	AB185631
	B3	DQ887806	Uncultured bacterium clone YRCE39	94	AY311740
	B4	DQ887807	Uncultured bacterium clone Z8	92	DQ353905
	B5	DQ887808	Uncultured rumen bacterium clone GRC95	95	DQ673560
yellow goat	N1	DQ887809	Selenomonas ruminantium isolate L6	89	AY685145
	N2	DQ887810	Uncultured rumen bacterium clone F23-G11	94	AB185563
	N3	DQ887811	Uncultured bacterium clone YRCB49	99	AY311633
	N4	DQ887812	Uncultured bacterium clone C-72	92	AB094163
	N5	DQ887813	Uncultured bacterium clone U28-A06	99	AB185661
Inner Mongolia cashmere goat	N6	DQ887814	Uncultured bacterium clone YRCC05	95	AY311643
	M1	DQ887815	Uncultured rumen bacterium clone F23-B07	98	AB185520
	M2	DQ887816	Anaerobic bacterium ED-Mt61/PYG-s6	94	DQ100449
	M3	DQ887817	Uncultured bacterium clone Ad-H2-79	98	AY816468

^a Bands are numbered as indicated on the DGGE gels shown in Fig. 1; ^b Accession number of the sequence of the closest relative found by BLAST search.

3 讨论

PCR-DGGE 技术已被广泛应用研究胃肠道微生物群落多样性,本研究根据前人的报道选取了 16S rDNA V6-V8 区基因片段作为靶标,用于分析的 DNA 长度接近 500bp,相对于 16S rDNA V3 区基因片段 (DNA 长度为 200bp 左右)能更好的提供细菌的分类信息。但由于单一细菌 16S rDNA 存在多拷贝或者异源双链,从而导致 DGGE 图谱上单一菌出现多个条带,从而使研究的微生物种群丰度复杂化。编码 RNA 聚合酶 β 亚基的基因(*rpoB*)也可以作为细菌鉴定的分类指标,更重要的是 *rpoB* 基因在单一细菌基因组中只有一个拷贝^[11,12],因此基于 *rpoB* PCR-DGGE 技术能更准确地反映环境微生物群落组成。从本研究的图谱结果也可以看出,V6-V8、*rpoB* DGGE 图谱上样品相似性具有一致性,都能反映出瘤胃细菌的遗传多样性。而且,*rpoB* DGGE 图谱条带数明显少于 V6-V8 DGGE 图谱的条带数,其条带的分离效果也相对明显。但是选取 *rpoB* 基因研究微生物多样性也存在一定缺陷性,由于 GenBank 中 *rpoB* 基因注册的序列信息远远低于 16S rDNA 基因序列,因此本研究中也未对 *rpoB* DGGE 图谱上的优势条带进行克隆测序。总之,*rpoB* 基因存在单一拷贝的优越性,在应用 PCR-DGGE 技术研究环境微生物群落多样性的分析上,应将其与 16S rDNA 基因相结合,对微生物群落组成进行更准确、全面的研究。

瘤胃微生物菌群的数量及整个微生物区系的组成受多种生理因素、饲料组成、环境因素等的影响^[13~15]。研究发现饲料是影响瘤胃微生物的最主要因素,而对于寄主与瘤胃微生物的相互作用缺乏认识。因此本研究选取 3 种以牧草为单一食物的全放牧山羊,应用 PCR-DGGE 技术研究不同品种间瘤

胃细菌群落组成的差异性。从 V6-V8、*rpoB* DGGE 图谱可以看出同一品种间具有更多共同的条带,其相似性也均比较高。其中南江黄羊个体差异性相对于另两种羊更高,不同品种间的差异性则较大。说明寄主品种是影响瘤胃细菌种群构成的一个重要因素。从以上结论可以看出瘤胃细菌组成所受到的影响不是单一因素决定的,而是多种因素相互作用的结果。其个体差异性更加说明了瘤胃微生物组成的复杂性。

通过对瘤胃细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较和系统发育分析表明,14 条 16S rDNA 序列中有 4 条克隆的序列与基因库最相似菌的相似性大于 97%。其中 13 条与未鉴定菌或未培养菌的序列相似性最高,说明瘤胃中存在着丰富的未鉴定或不可培养细菌种类。仅依靠传统培养对瘤胃的认识研究存在很大的局限性,很难真实的反映出瘤胃的细菌群落组成。

虽然 PCR-DGGE 技术被广泛应用于环境微生物多样性的研究,克服了常规平板培养细菌研究方法诸多缺点,在鉴定自然生境或人工生境中的微生物个体、分析复杂微生态演替规律、微生物种群动态性评估、重要基因定位、表达及调控评价存在巨大的应用空间。但其并不成熟,在引物设计、变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)、优势菌群半定量分析等关键环节尚待进一步完善。尤其对于胃肠道等复杂生态系统的研究,很难弄清楚其微生物的真实情况。因此,通过免培养技术对瘤胃微生物多样性进行初步分析,定性的描述瘤胃细菌种类的组成,寻求其优势菌,进而通过纯培养或共培养研究手段才能更好的揭示瘤胃微生物的功能。对于瘤胃微生物多样性的研究有利于开发和利用瘤胃微生物资源^[16],更好的开展反刍动物营养学的研究。

参 考 文 献

- [1] Hespell RB, Akin DE, Dehority BA. Bacteria, fungi and protozoa of the rumen. Chapman and Hall press, 1996.
- [2] Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, *et al.* Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J Nutr*, 2004, **134**: 465 – 472.
- [3] 冯仰廉. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**: 317 – 322.
- [5] Rochelle PA. Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications. Wymondham(UK): Horizon Scientific Press, 2001, 177 – 190.
- [6] Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S. *rpoB*-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3376 – 3380.
- [7] Da Mota FF, Gomes EA, Paiva E, *et al.* Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **39**: 34 – 40.
- [8] Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, *et al.* Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food microbial*, 2006, **23**: 136 – 145.
- [9] Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, 2004, **36**: 808 – 812.
- [10] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4800 – 4806.
- [11] Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol*, 1997, **26**: 1005 – 1011.
- [12] Peixoto RS, da Costa Coutinho HL, Rumjanek NG, *et al.* Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **35**: 316 – 310.
- [13] Kocherginskaya SA, Aminov RI, White BA. Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under two Different Diet Conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches. *Anaerobe*, 2001, **7**: 119 – 134.
- [14] 姚文, 朱伟云, 韩正康, 等. 应用变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA 序列分析对山羊瘤胃细菌多样性的研究. *中国农业科学*, 2004, **37**(9): 1374 – 1378.
- [15] McEwan NR, Abecia L, Regensbogenova M, *et al.* Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Lett Appl Microbiol*, 2005, **41**: 97 – 101.
- [16] Selinger LB, Forsberg CW, Cheng KJ. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. *Anaerobe*, 1996, **2**: 263 – 284.

Use of *rpoB* and 16S rDNA genes to analyze rumen bacterial diversity of goat using PCR and DGGE

SHI Peng-jun¹, BAI Ying-guo¹, YUAN Tie-zheng¹, YAO Bin^{1*}, FAN Yun-liu²

(¹ Feed Research Institute ² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural sciences, Beijing 100081, China)

Abstract :DNA extraction from the rumen of three species of goat (boer goat, Nanjiang yellow goat, Inner Mongolia cashmere goat) was followed by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the beta subunit of the RNA polymerase (*rpoB*) and 16S rDNA genes. PCR products were compared by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to compare the predominant bacterial community structure. The results showed the *rpoB* DGGE profiles comprised fewer bands than those of 16S rDNA profiles and were easier to analyze. The gene for *rpoB* is a single copy gene unlike 16S rDNA. So using the *rpoB* gene offers a better alternative to the commonly used 16S rRNA gene for microbial community analyses based on DGGE. The bacteria community structure of different goats were similar to each other. The similarities within species were noticeably higher than that between species. Goat species were found to influence the rumen microbe community. Phylogenetic and sequence similarity analyses of the resultant 14 clone sequences in 16S rDNA DGGE libraries revealed that 4 clone show similarity over 97% with that of database sequences, while the rest present similarity in a range of 89% ~ 96%, and 13 clone of all were similar to those unidentified rumen bacteria. These results suggest that DGGE followed by clone technique is a practicable protocol to research the complex community of rumen microbe.

Keywords : DGGE; 16S rDNA gene; *rpoB* gene; rumen bacteria; bacterial diversity