

文章编号: 1004 - 7271(2008)02 - 0140 - 05

圆白鲟消化道菌群 PCR-DGGE 基因 指纹图谱构建

周志刚, 石鹏君, 姚 斌, 何凤旭

(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘 要:采取免培养的 16S rDNA 梯度凝胶电泳(DGGE)技术对集约化海水网箱养殖圆白鲟 *Ephippus orbis* (体重 17.7 ± 3.0 g) 包括胃壁、胃内容物、肠壁及肠内容物在内的消化道菌群结构进行了初步分析。DGGE 指纹图谱显示圆白鲟胃内容物、胃壁及肠壁有 7 条明显条带, 肠内容物有 6 条明显条带, 提示圆白鲟消化道可能存在着较丰富细菌群落; 针对指纹图谱的聚类分析表明胃内容物及肠内容物细菌组成相似度最高达 90.0%, 而胃壁与肠壁的相似度相对较差达 80%。半定量分析表明圆白鲟消化道菌群相对丰度的变异系数均大于 47.4%, 暗示圆白鲟消化道趋向于以一种或极少数种细菌占统治地位。

关键词:圆白鲟; 16S rDNA; DGGE 指纹图谱

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Construction of PCR-DGGE gene fingerprint for the gastrointestinal bacterial community in *Ephippus orbis*

ZHOU Zhi-gang, SHI Peng-jun, YAO Bing, HE Su-xu

(Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The preliminary analysis of the bacterial community structure in the gastro-intestine of *Ephippus orbis* based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint using a culture-independent approach was conducted in present study. The DGGE fingerprint showed that 7 obvious bands were found in the samples of stomach content, stomach wall, and gut wall of *Ephippus orbis*, and 6 bands in the sample of gut content, which might reflect the existence of rich bacteria species in the digestive tract of *Ephippus orbis*. The clustering analysis to the DGGE fingerprint displayed that the similarity of the microflora structures in the stomach content and gut content was highest (90%) and that in the stomach wall and gut wall was lower (80%). The self-quantity analysis showed that the coefficient variances of the relative abundances in the bacteria composition of the gastro-intestine in *Ephippus orbis* were larger than 47.4%, which suggested that one or few kind of bacterium predominated the digestive tract of *Ephippus orbis*.

Key words: *Ephippus orbis*; 16S rDNA; DGGE fingerprint

海水鱼消化道存在着大量微生物群落, 是海水鱼微生态环境的重要成分。然而, 一方面, 目前研究

收稿日期: 2007-07-16

基金项目: 国际科技合作重点项目计划(2004DF100229); 中国博士后科学基金(2005037625); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(2005FB05); 广东省自然科学基金(05300945)

作者简介: 周志刚(1974-), 男, 副研究员, 主要从事水产微生物工程方面的研究。E-mail: zhouzhigang@caas.net.cn

大多以肠道内容物或包含食糜的肠管为研究对象,而较少单独关注肠壁菌群,有研究表明肠壁菌群结构显著区别于肠道内容物菌群,并且非常稳定,是真正意义上与宿主共附生菌群^[1],有关海水鱼胃部的细菌组成也较少见报道;另一方面,这些研究均依据常规的人工培养法,存在着一定的局限性^[2]:(1)自然界很多微生物不能人工培养;(2)绝大多数严格厌氧微生物尚未得到鉴定和描述;(3)人为培养的微生物与其自然界菌体在形态和特征上差异显著。例如:水环境中可培养菌比例低于1%^[3],鱼体表可培养微生物更不足0.01%^[4],淡水鱼半数肠道细菌即使通过不同培养基及不同培养条件仍然无法培养^[5]。由此不难推断,常规培养法无法获取海水鱼消化道菌群的全面信息。

近年来发展起来的免培养结合 16S rDNA 的梯度凝胶电泳(DGGE)方法逐步克服了常规培养法的不足: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;同时通过测量某一特定条带着色深浅程度可以半定量地计算出该条带所代表的特定种类微生物在整个区系中所占的比例(即相对丰度)^[6]。有关运用 16S rDNA-DGGE 方法研究鱼类消化道菌群的报道国内外均较少^[7-8],而这些消化道菌群在鱼体消化及疾病控制方面起着重要作用^[9-11],亟待澄清。本文拟通过 PCR-DGGE 技术建立我国重要海水养殖品种-圆白鲳(*Ephippus orbis*)消化道菌群基因指纹图谱,在此基础上探讨圆白鲳包括胃壁、肠壁及其内容物在内的消化道菌群结构的差异,为澄清圆白鲳消化道微生物区系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品准备

5 尾健康圆白鲳(17.7 ± 3.0 g)于 2005 年 7 月随机挑选自海南省陵水新村港海水养殖网箱,取样时经测定水温 30 °C、海水盐度 33,实验鱼全程投喂单一膨化饲料(水分 8.2%、粗蛋白 45.0% 干物质及粗脂肪 8.5% 干物质),每天投喂 3~4 次,在取样当日 13:00-14:00 投喂后于 15:10 进行取样。取样时用抄网迅速将鱼从网箱中捞出,剪刀敲击头部致死,随后将鱼置于灭菌塑料密封袋内,冰浴,3 h 内转移到实验室,12 h 内处理鱼样。

在无菌操作台上进行鱼样处理,先用 75% 酒精擦拭鱼体表,用解剖剪沿肛门向上朝前呈弧形剪开,用无菌棉线分别结扎胃部与肠段,75% 酒精擦拭消化道外壁,无菌冲洗液(灭菌人工配制海水,盐度 33)冲洗数遍^[12]。用剪刀分离出消化道各段,用 1 mL 离心管收集消化道内容物,-20 °C 保存;剖开消化道各段,在无菌冲洗液中轻轻漂洗 2 min^[12],置入 1 mL 离心管中 -20 °C 保存。

1.2 总 DNA 提取

总 DNA 提取方法根据 Yu 和 Morrison 略加修改^[13],增加 DNA 试剂盒纯化步骤,按 Cycle-Pure DNA 纯化试剂盒(Omega, USA)。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 针对 16S rDNA v3 区片段的 PCR 扩增

按 50 μL PCR 反应体系:5.0 μL 10 × buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4); 200 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 15 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTPs 4.0 μL, 1.5 mM MgCl₂ 8.0 μL, 0.1% BSA 0.5 μL, 2.5 U/μL TaqE 0.5 μL, 30-50 ng 模板 DNA, 10 μM 引物 BV3F 1.0 μL (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3'),其中 5' 包含 40 对 GC 夹子^[6], 10 μM 引物 BV3R 1.0 μL (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3')^[6],然后用 dd H₂O 调整至 50 μL。实验设置不添加模板的阴性对照组,模板由等体积 dd H₂O 补充。

1.3.2 PCR 扩增程序

采用降落式 PCR 反应程序:94 °C 变性 5 min;进入降落程序,94 °C、30 s, 65~56 °C、30 s, 72 °C、1 min;再进入以下循环 94 °C、30 s; 55 °C、30 s; 72 °C、1 min; 25 个循环; 72 °C 延伸 8 min。反应结束后取 3 μL 反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 PCR产物纯化

取全部样品在1.5%琼脂糖凝胶上电泳(100 V, 30 min),紫外灯下切胶回收。

按Cycle-Pure DNA纯化试剂盒操作。反应结束后取3 μL反应产物1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

DGGE指纹图谱构建采用DCODE™系统(BIO-RAD)。v3区扩增纯化产物(约200 bp)在10%聚丙烯变性胶中分离(丙烯酰胺浓度40%~60%),200 V,4.5 h,每个样品点样量约250 ng DNA。

按快速银染法对聚丙烯变性胶染色:固定液(10%无水乙醇,0.5%冰乙酸)固定15 min;0.2%硝酸银染色15 min;显色液(3.0% NaOH,0.5%甲醛)显色5 min;固定液终止反应。每一步均用去离子水冲洗胶面。

1.5 图谱分析

在Vilber凝胶成像扫描系统中照像,Bio-1D++软件对DGGE指纹图谱进行聚类及相对丰度分析^[6]。

相对丰度 $P_i(\%) = 100 \times OD_i / OD$

其中 OD_i 为选定条带的光密度, OD 为全部条带的光密度。

2 结果

2.1 总DNA提取

圆白鲟消化道不同部位提取总DNA电泳图见图1。如图1所示S1、S0、G1、G0样品(S1:胃内容物;S0:胃壁;G1:肠内容物;G0:肠壁)总DNA抽提物中条带大于1.0 kb(16S rDNA的V3区为200 bp左右)清晰可见,适合进行下游反应。

2.2 消化道菌群16S rDNA-V3区片段PCR扩增

以总DNA为模板所扩增出v3区片段见图2。如图2所示,经PCR扩增后获得的样品微生物的16S rDNA基因片段大小约为200 bp,是16S rDNA V3区特异性片段。

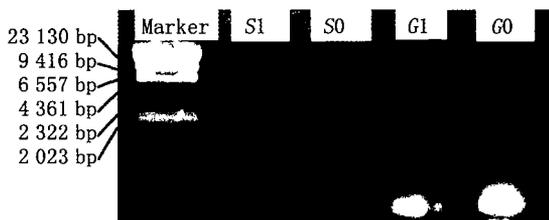


图1 圆白鲟消化道样品总DNA电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the community DNA extracted from the gastro-intestine of *Ehippus orbis*

S1: 胃内容物; S0: 胃壁; G1: 肠内容物; G0: 肠壁;
Marker: 3 μL Hind III

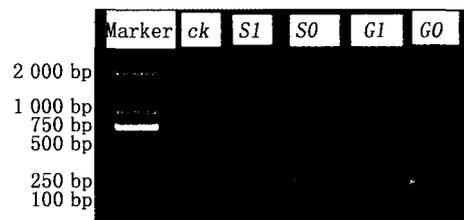


图2 圆白鲟消化道菌群16S rDNA-v3区片段PCR扩增图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR for the v3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastro-intestine of *Ehippus orbis*

S1: 胃内容物; S0: 胃壁; G1: 肠内容物; G0: 肠壁;
Marker: 3 μL D2000; ck: 阴性对照(双蒸水)

2.3 DGGE指纹图谱建立及分析

从圆白鲟胃壁(S0)、胃内容物(S1)、肠壁(G0)及肠内容物菌群(G1)16S rDNA v3区片段的DGGE指纹图谱可观察到明显的条带(图3),其中S1、S0及G0有7条明显的带,肠内容物有6条明显的带,暗示圆白鲟S0、S1、G0及G1均存在着较丰富细菌群落。从S1与S0条带来看,处于泳道同一位置的带有6条,特异性带分别有1条(S1-5及S0-8);G1全部条带均与G0条带处于相同位置,G0则具有1条特异性带(G0-1)。

聚类分析结果表明(图4),圆白鲟 S0、S1、G0 及 G1 菌群结构相似度在 80% 以上,其中 S1 与 G1 的相似度达 90%。

2.4 DGGE 指纹图谱半定量分析

通过 Bio-1D + + 软件对 16S rDNA-DGGE 指纹图谱各条带光密度进行分析,圆白鲟消化道样品中各泳道均存在明显的主带与次带之分(变异系数 $c. v. \geq 47.4\%$),其中 S1 及 G1 指纹条带光密度变异系数均在 75% 以上(分别为 75.8% 及 76.8%),表明其主带与次带之分最为显著,而 S0 及 G0 变异系数相对较小(表1)。

3 讨论

有关运用 16S rDNA-DGGE 方法研究鱼类消化道菌群的报道国内外均较少^[7-8],本研究为国内较早开展应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术探讨海水鱼消化道分子微生态的工作之一,为海水鱼消化道微生物区系的澄清奠定了基础。

本研究所提取圆白鲟消化道各部位样品总 DNA 电泳图显示其大于 1.6kb 部分清晰度及亮度均可(图1),表明采用结合 DNA 纯化柱的珠磨法进行圆白鲟消化道菌群总 DNA 提取是成功的^[13],针对 v3 区 PCR 的成功扩增亦证实了这一点(图2)。

一般认为消化道壁附着菌群属真正意义上的可定植菌,相对稳定^[1],本研究 DGGE 指纹图谱显示圆白鲟胃壁及肠壁均存在着较丰富菌群,为海水鱼可定植益生菌的筛选奠定了基础^[14],但其稳定性如何,还有待于对不同养殖环境、不同饲养条件及不同发育阶段的圆白鲟消化道样本进行大量分析。

从肠壁及肠道内容物样品的 DGGE 基因指纹图谱来看,二者具有相近的条带数、条带位置及相对丰度,显示二者菌群结构多样性相似,提示肠壁菌群大多源于其内容物,同时肠壁特异性带(G0-1;图3)暗示影响肠壁菌群因子的复杂性。

由表1可知,所有样本的相对丰度变异系数均高于 47.4%,表明消化道各部位菌群结构趋向于以一种或极少种细菌占绝对统治地位,由于胃内容物及肠内容物细菌相对丰度变异系数均高于胃壁及肠道壁的,提示消化道内容物微生物区系更趋向于这一点。

DGGE 基因指纹图谱聚类分析结果显示,各样本之间条带组成相似度较高($\geq 80\%$),这可能与鱼体摄食饵料后其内容物由消化道从前向后推移相关;胃壁与肠壁菌群结构差异度最大,可能反映了宿主胃壁与肠壁的生理差异性^[1]。

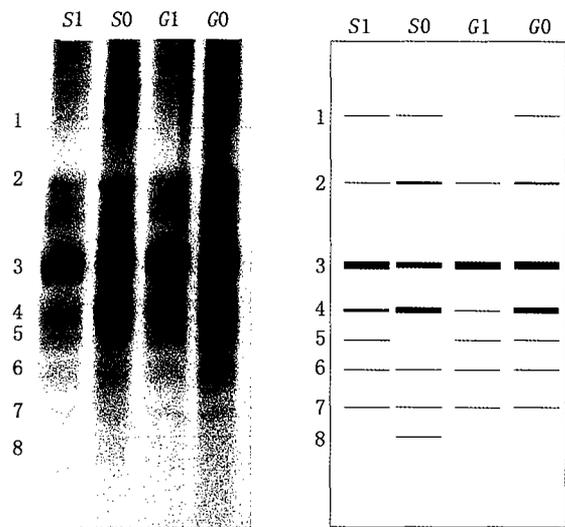


图3 圆白鲟消化道细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱及模式图

Fig. 3 The PCR-DGGE fingerprint and its pattern of the v3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastro-intestine of *Ehippus orbis*
S1:胃内容物;S0:胃壁;G1:肠内容物;G0:肠壁;1-8:条带位置

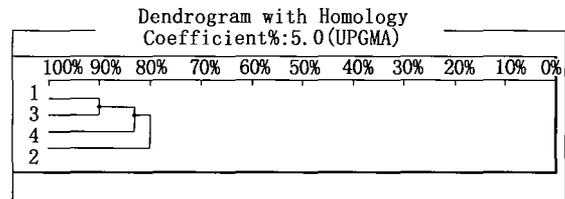


图4 圆白鲟消化道菌群 PCR-DGGE 指纹图谱聚类分析
Fig. 4 The clustering analysis of the PCR-DGGE fingerprint of the v3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastro-intestine of *Ehippus orbis*
1:胃内容物;2:胃壁;3:肠内容物;4:肠壁

表1 圆白鲟消化道菌群 PCR-DGGE 指纹图谱条带的相对丰度
 Tab.1 The relative abundance of the bands in the PCR-DGGE fingerprint
 of the bacteria from the gastro-intestine of *Ephippus orbis*

条带位置	S1	S0	G1	G0	%
1	7.4	11.9	-	8.8	
2	12.6	16.0	13.0	14.4	
3	38.8	22.6	41.5	29.2	
4	17.5	31.0	25.4	27.0	
5	12.2	-	9.7	18.1	
6	7.8	10.7	7.5	14.0	
7	3.7	5.2	3.9	6.4	
8	-	2.5	-	-	
变异系数 c. v.	75.8	64.4	76.8	47.4	

注: S1. 胃内容物; S0. 胃壁; G1. 肠内容物; G0. 肠壁; 条带位置按图3

由于 DGGE 技术目前仍在不断完善,例如 DGGE 仅能显示微生态环境中优势菌群(相对丰度 > 1% 部分),而对于弱势菌群无法显示^[2];不同细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增效率并非完全一致等致使半定量分析的误差^[6];同一种菌可能在 DGGE 指纹图谱中占有几条带等^[6]。因此结合 DGGE 指纹图谱中条带测序展开菌群的定性分析对于澄清海水鱼消化道微生物区系显得十分必要。

参考文献:

- [1] 尹军霞,张建龙,沈文英,等. 鱼食性与肠道菌群关系的初步研究[J]. 水产科学,2004,23(3):4-6.
- [2] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京:科学出版社,2004:114-130.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59:143-169.
- [4] Bernadsky G, Rosenber E. Drag-reducing properties of bacteria from the skin mucus of the cornetfish (*Fistularia commersonii*) [J]. Microbial Ecology, 1992, 24:63-74.
- [5] Sugita H, Tokuyama K, Deguchi Y. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Sarotherodon niloticus* [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1985, 51:1325-1329.
- [6] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:695-700.
- [7] 周志刚,石鹏君,姚斌,等. 基于 PCR-DGGE 指纹图谱川纹笛鲷及圆白鲟消化道壁优势菌群结构比较分析[J]. 水生生物学报, 2007, 31:682-688.
- [8] Huber I, Spanggaard B, Appel K F, et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96:117-132.
- [9] Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2005, 243:241-254.
- [10] 汤伏生,朱晓燕,张兴忠. 鲤鱼肠道细菌及其淀粉酶对宿主消化的影响[J]. 水产学报, 1994, 18(3):177-182.
- [11] Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 24(2):105-108.
- [12] MacDonald N L, Stark J R, Ausin B. Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host [J]. FEMS Microbiology Letters, 1986, 35:107-111.
- [13] Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples [J]. BioTechniques, 2004, 36:808-812.
- [14] Gatesoupe F J, Lesel R. An environmental approach to intestinal microflora in fish [J]. Cahiera Agricultures, 1998, 7(1):29-35.