

川纹笛鲷消化道优势菌群 PCR-DGGE 指纹图谱比较分析

周志刚^{1,2}, 石鹏君¹, 姚 斌¹, 何夙旭¹, 苏永全³

(1. 中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100081; 2. 汕头大学 海洋生物研究所, 广东 汕头 515063; 3. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用免培养的 16S rDNA 梯度凝胶电泳技术 (DGGE) 对集约化海水网箱养殖川纹笛鲷 (*Lutjanus sebae*) 的消化道胃壁、胃内容物、肠壁、肠内容物优势菌群结构进行了比较分析。研究结果显示, 川纹笛鲷消化道存在着丰富多样的细菌群落, 对 DGGE 指纹图谱聚类分析表明菌群组成相似度高于 55%, 其中胃内容物及胃壁细菌组成相似度最高 (90%), 这可能与摄食饵料在消化道推移有关; 而胃壁与肠壁相似度相对最差, 可能反应了由于生理环境不同引起的宿主差异性。通过建立川纹笛鲷消化道 16S rDNA-DGGE 指纹图谱及比较分析, 为澄清川纹笛鲷消化道微生物区系奠定了基础。

关键词: 川纹笛鲷 (*Lutjanus sebae*); 16S rDNA; 梯度凝胶电泳; 指纹图谱

中图分类号: Q48

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)11-0009-04

益生菌作为生态养殖的重要手段^[1], 在海水鱼网箱养殖很难施加, 原因在借鉴畜禽模式开发的益生菌存在着在消化道难以定植的缺点, 容易造成新的生态问题, 因此针对海水鱼养殖开发具有可定植性的益生菌具有实际应用意义。消化道粘膜层多为消化道菌群的吸附定植位点^[2,3], 解析海水鱼消化道优势菌群结构成为海水鱼养殖可定植益生菌开发的前提, Gate 等^[4] 1998 年认为健康动物中正常的优势菌或次优势菌可以作为益生菌的来源。

由于以往消化道细菌研究均依据常规人工培养法, 存在着诸多局限性^[5]: (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; (4) 操作过程繁冗^[6]。采用分子生态的手段开展消化道微生物区系研究显得必要^[7,8]。川纹笛鲷 (*Lutjanus sebae*) 是我国重要海水养殖经济品种, 也面临着海水鱼养殖的一些共性问题, 如苗种培育成活率低下、疾病频发、抗生素类药物滥用等^[9]。作者拟用 PCR-DGGE 指纹图谱比较分析集约化网箱养殖健康川纹笛鲷消化道不同部位优势菌群结构, 探讨其菌群组成上的差异, 为澄清川纹笛鲷消化道微生物区系及开发可定植益生菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品准备

健康川纹笛鲷 (241.9 g $\pm$ 48.7 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%DM 及粗脂肪 8.5%DM), 每天投喂 3~4 次, 在取样当日 13:00~14:00 投喂后在 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, 保存在冰块中, 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% 酒精体表消毒、解剖剪消毒, 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% 酒精棉球擦拭消化管外壁, 并用无菌冲洗液 (灭菌人工

收稿日期: 2005-12-06; 修回日期: 2008-09-12

基金项目: 国际科技合作重点项目 (2004DF100229); 中国博士后科学基金项目 (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项目 (05300945)

作者简介: 周志刚 (1974-), 男, 湖北仙桃人, 副研究员, 博士, 主要从事水产微生物工程及水产动物营养与饲料研究, 电话: 010-62136896,

E-mail: zhouzhigang@caas.net.cn

配制海水,盐度 33) 冲洗数遍^[10]。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^[10],置入 1 mL 离心管中 - 20 °C 保存。

1.2 总 DNA 提取、细胞裂解、DNA 沉淀、DNA 纯化及试剂盒纯化

选择消化道充塞度好的 1 尾川纹笛鲷样品进行后续实验操作。细胞裂解、DNA 沉淀、DNA 纯化及试剂盒纯化严格同参考文献[7,8]。

1.3 PCR 扩增

扩增程序、所用引物、反应体系及回收纯化严格同参考文献[7,8]。

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 凝胶成像扫描及分析

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半定量分析。

2 结果

2.1 消化道菌群 16S rDNA-DGGE 指纹图谱建立及聚类分析

按材料与方法 1.2 成功提取样本总 DNA(图略),以所提取川纹笛鲷胃内容物、胃壁、肠内容物、肠壁菌群总 DNA 为模板我们成功地扩增出相应 16S rDNA V3 区片段(约 200 bp),阴性对照组 CK 没有条带(图略)。

川纹笛鲷胃壁、胃内容物、肠壁、肠内容物细菌 16S rDNA V3 区片段的 DGGE 指纹图谱及聚类分析结果如图 1 和图 2 所示。各组样品所在泳道均可观察到明显的条带(图 1),表明川纹笛鲷胃壁、胃内容物、肠壁及肠内容物均存在着大量细菌,其中胃内容物有 11 条明显的带,肠内容物只有 6 条明显的带,而胃壁 8 条带多于肠壁 7 条带。从胃内容物与胃壁条带来看,处于泳道同一位置的带有 8 条,胃内容物特异性带有 3 条;肠内容物与肠壁处于同一位置条带有 4 条,特异性条带分别有 2 条与 3 条。

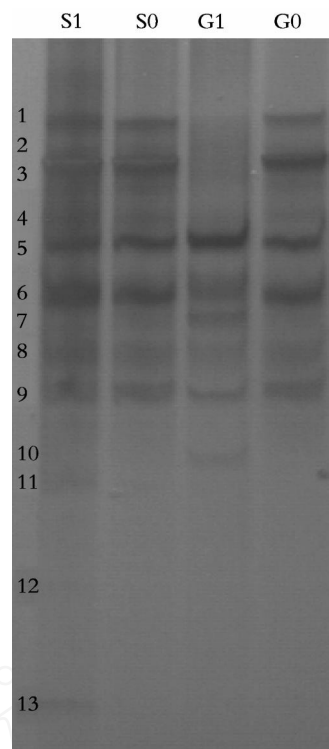


图 1 川纹笛鲷消化道细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱
Fig. 1 The PCR-DGGE fingerprint of the V3 region of 16SrDNA of the bacteria from the gastro-intestine of *Lutjanus sebae*

S1. 川纹笛鲷胃内容物样品;S0. 川纹笛鲷胃壁样品;G1. 川纹笛鲷肠内容物样品;G0. 川纹笛鲷肠壁样品;1~13. 条带位置

S1. the stomach content sample of *Lutjanus sebae*;S0. the stomach wall sample of *Lutjanus sebae*;G1. the intestinal content sample of *Lutjanus sebae*;G0. the intestinal wall sample of *Lutjanus sebae*; 1~13. the band position

聚类分析结果表明(图 2),川纹笛鲷胃内容物、胃壁、肠内容物肠壁及细菌结构相似度在 55 %以上,其中胃内容物与胃壁具有最高的相似度(90 %),而肠内容物与肠壁相似度为 66 %。

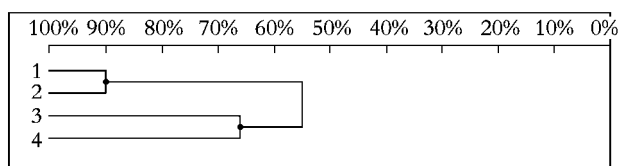


图 2 川纹笛鲷消化道细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig. 2 The dendrogram of the PCR-DGGE fingerprint of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastrointestinal of *Lutjanus sebae*

1. 川纹笛鲷胃内容物样品;2. 川纹笛鲷胃壁样品;3. 川纹笛鲷肠内容物样品;4. 川纹笛鲷肠壁样品

1. the stomach content sample of *Lutjanus sebae*;2. the stomach wall sample of *Lutjanus sebae*;3. the intestinal content sample of *Lutjanus sebae*;4. the intestinal wall sample of *Lutjanus sebae*

2.2 消化道菌群 16S rDNA-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,川纹笛鲷消化道样品泳道优势条带相对丰度见表 1。由表 1 可知,各泳道中均存在明显的主带与次带之分(变异系数 ≥ 35.4),其中胃内容物及肠内容物指纹条带光密度变异系数均在 50 % 以上,表明其主带与次带之分最为显著,而胃壁及肠壁变异系数相对较弱。处于位置 6 的条带为各组共有的最大优势带。

表 1 PCR-DGGE 指纹图谱中川纹笛鲷消化道细菌优势条带相对丰度

Tab.1 The relative abundance of predominant band in the PCR-DGGE fingerprint of the bacteria from the gastro-intestine of *Lutjanus sebae*

条带位置	条带相对丰度(%)			
	S1	S0	G1	G0
1	11.1	10.9	-	8.1
2	6.1	7.0	-	-
3	9.6	13.9	-	20.5
4	8.4	7.7	-	9.6
5	15.4	17.5	27.7	17.6
6	20.6	21.2	27.4	21.5
7	-	-	17.2	-
8	11.6	12.7	12.3	11.1
9	9.2	9.1	9.2	11.6
10	-	-	6.2	-
11	3.2	-	-	-
12	0.9	-	-	-
13	3.7	-	-	-
变异系数	59.7	36.9	50.3	35.4

注:S1. 川纹笛鲷胃内容物样品;S0. 川纹笛鲷胃壁样品;G1. 川纹笛鲷肠内容物样品;G0. 川纹笛鲷肠壁样品;1~13. 图 1 中条带标号

3 讨论

作者采用结合 DNA 纯化柱的珠磨法对川纹笛鲷消化道菌群总 DNA 进行提取,所获得 DNA 针对 V3 区 PCR 成功。由于有关菌群总 DNA 提取方法多样^[11],有必要开展比较研究,并进行优化。作者所在实验室已进行珠磨法、溶菌酶法及 CTAB 法的比较研究。

由 PCR-DGGE 指纹图谱(图 1)可知,川纹笛鲷包括胃内容物、胃壁、肠内容物及肠壁在内的消化道各部位均存在丰富多样的细菌,由于消化道壁上细菌属真正意义上可定植菌、而且相对稳定^[1],一方面否定了较早前关于鱼类消化道无稳定菌落的报道^[12],另一方面提示解析消化道壁菌群结构对筛选

可定植益生菌具有实际意义。从肠壁及肠道内容物细菌基因指纹图谱来看,二者具有相近的条带数,甚至肠道内容物条带数少于肠壁的,显示二者细菌多样性相似,亦表明肠道壁菌群绝大部分来源于其内容物,即海水与摄食饵料的混合物,由于实验鱼均投喂膨化饲料,在膨化料在制作过程中经过高温高压过程,含菌量相对低,因此肠道细菌更多成分应该来源于海水;另外由于肠壁也具有区别于肠道内容物的特异带(G0 条带位置 1,3,4;图 1),暗示影响肠壁菌群的因子较为复杂。普遍的观点认为消化道内容物细菌较消化道壁丰富^[13],从表 1 来看,胃内容物细菌 DGGE 指纹条带数多于胃壁的,并且变异系数也明显高于胃壁变异系数,证实了这一点;但研究结果显示川纹笛鲷肠内容物条带数少于肠壁条带数,尽管其相对丰度变异系数明显高于肠壁变异系数,显示川纹笛鲷肠道内容物菌群更趋向于以极少数细菌占绝对统治地位,与上述观点并不一致,有待于进一步细菌定性研究。

从基因指纹图谱聚类分析结果来看,各组之间条带组成相似度非常高,均在 55 % 之上,这与鱼体摄食饵料后其内容物由消化道从前向后推移相关;但反观胃壁与肠壁菌群结构也存在明显差异,可能反应了胃与肠道生理环境不同所致的宿主差异性相关。

由于健康动物中正常的优势菌或次优势菌可以作为益生菌的来源,在探讨了川纹笛鲷消化道壁与其内容物菌群基因指纹图谱后,我们可以发现其消化道壁亦定植有丰富的细菌,并且区别于内容物,因此在筛选川纹笛鲷高效可定植益生菌时有必要从消化道壁菌群入手。

参考文献:

- [1] 周志刚,石鹏君,姚斌,等. 海水鱼消化道菌群结构研究进展[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5):123-131.
- [2] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial interactions in early life stage of marine cold water fish [J]. *Microbial Ecology*, 1999, 38:1-16.
- [3] Gromez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms [J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 259-270.
- [4] Gatesoupe F J, Lesel R. An environmental approach to intestinal microflora in fish [J]. *Cahiers Agricultures*, 1998, 7(1):29-35.
- [5] 冯仰廉. 反刍动物营养学 [M]. 北京:科学出版社, 2004. 114-130.
- [6] 黄光祥,周志刚,何凤旭,等. 南海底层鱼突额鹦嘴鱼

- Scarus ovifrons* Temminck et Schlegel, 1846 肠道产酶微生物研究 [J]. 中国农业科技导报, 2007, 9 (5): 95-100.
- [7] 刘玉春, 周志刚, 石鹏君, 等. 网箱养殖青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群的 PCR-DGGE 比较分析 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10 (1): 76-81.
- [8] Liu Y, Zhou Z, Yao B, *et al.* The effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) [J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39: 635-646.
- [9] Zhou Z, Wang Z. Marine fish aquaculture in China [J]. *Asia-Pacific Marine Finfish Aquaculture Magazine*, 2004, 2: 18-20.
- [10] 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.
- [11] 李志勇, 何丽明, 吴杰, 等. 基于 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内优势细菌的组成分析 [J]. 微生物通报, 2005, 32 (3): 82-86.
- [12] Hansen G, Fujia K. Effect of different holding regiments on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1992, 58 (2): 461-470.
- [13] 周志刚, 石鹏君, 姚斌, 等. 圆白鲷 *Ephippus orbis* 消化道菌群 PCR-DGGE 基因指纹图谱构建 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17 (2): 140-144.

Comparison of the PCR-DGGE fingerprints in the gastrointestinal predominant bacterial community in *Lutjanus sebae*

ZHOU Zhi-gang^{1,2}, SHI Peng-Jun¹, YAO Bin¹, HE Su-xu¹, SU Yong-quan²

(1. Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Marine Biology Institute of Shantou University, Shantou 515063, China; 3. Marine & Environment College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Dec. ,6 ,2005

Key words: *Lutjanus sebae*; 16S rDNA; DGGE; fingerprint

Abstract: The comparison of the predominant bacterial community structure in the gastro-intestine in *Lutjanus sebae* based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint using a culture-independent method was conducted in present research. The results showed that abundant bacterium existed in the gastro-intestine of *Lutjanus sebae*, the similarity was above 55 % in the community structures in the gastro-intestine with the highest similarity of 90 % in the bacteria ingredients between the stomach wall and the stomach content, which might reflect the diet feed processed from the stomach to the intestine. However, the difference of the relative abundance between the stomach wall and the intestinal wall in the bacterium might be due to their different physical environments. The establishment and comparison of the 16S rDNA-DGGE fingerprint in the gastro-intestine of the finfish in present research do help to elucidate the microflora structure in the gastro-intestine in *Lutjanus sebae*.

(本文编辑:刘珊珊)