

# 基于 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内优势细菌组成分析

李志勇 何丽明 吴 杰 陈集杰

(上海交通大学生命科学技术学院海洋生物技术研究室 上海 200240)

**摘要:** 采用不依赖分离培养的 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹技术对刀额新对虾与中国对虾的鳃部与肠道优势细菌种群组成进行比较分析。研究发现: 对虾鳃部与肠道存在着丰富多样的细菌; 根据 DGGE 指纹图的聚类分析发现不同对虾及同一种对虾的鳃部与肠道内的细菌组成差异性非常大; 同时也发现不同对虾体内有相同的细菌存在。首次尝试建立基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内细菌组成揭示方法, 对于今后建立对虾与养殖水体微生物和相关疾病的关系具有重要意义。

**关键词:** 对虾, 细菌, 16S rDNA, DGGE 指纹, 聚类分析

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0082-05

## Study on the Predominant Bacterial Community in Prawn Based on 16S rDNA PCR-DGGE Fingerprint

Li Zhi-Yong HE Li-Ming WU Jie CHEN Ji-Jie

(Marine Biotechnology Laboratory, School of Life Science and Biotechnology Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240)

**Abstract:** In this paper, the bacterial community structure in the gills and intestines of *Penaeus chinensis* and *Metapenaeus ensis* were investigated using a culture-independent method of 16S rDNA PCR-DGGE fingerprinting. It was proved that there are abundant and various bacteria in the gills and intestines of these prawns. The bacterial community in the gills and intestines of the same prawn or different kinds of prawns were obviously different based on the clustering analysis of DGGE fingerprints. On the other hand, the same bacteria were found in different kinds of prawns. This was the first time to aim to set up a method to reveal the bacterial community in prawn based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprinting which is of great value for the studies of the relationship between prawn and environmental microorganism as well as the related diseases.

**Key words:** Prawn, Bacterial community, 16S rDNA, DGGE fingerprinting, Clustering analysis

对虾是我国水产养殖的主要对象, 对虾疾病已经成为制约该产业发展的重要障碍。细菌性疾病是与病毒性疾病并列的两大对虾疾病之一, 以细菌性引起的疾病多达 11 种以上, 细菌性疾病历来都是发病率最高、危害最大的疾病, 一般从发病到幼体死亡只需 10 多个小时, 严重时在 1~2d 内发病池幼体累积死亡率达 90% 以上<sup>[1,2]</sup>。

在对虾养殖相关的细菌疾病预防与防治研究方面, 相关基础研究是非常重要的前提。其中对虾体内细菌组成多样性与养殖环境以及相关疾病的关系是非常重要的科学问题。

我国传统的与对虾养殖、疾病有关的细菌研究大多是基于传统的分离培养基础上的<sup>[3]</sup>。由于自然环境中的微生物 90%~99% 以上是目前不能分离培养得到的, 因此对

通讯作者 Tel: 021-27974893, E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-09-06, 修回日期: 2004-09-29

于对虾体内细菌多样性的研究必须借助于先进的分子技术手段。同时,借助于分子技术还可以及早发现不容易分离培养的病原微生物从而达到及时预警、防治的目的。基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹技术是一种可以避免分离培养途径的不足、原位研究微生物结构组成的有效方法<sup>[4]</sup>,可以快速地对某一环境样品中的微生物组成和动态变化进行揭示。目前国际上针对对虾采用 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹技术研究体内细菌组成的多样性的报道还没有见到。

本研究以我国常见的中国对虾、刀额新对虾为对象,采用 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹技术对其鳃部与肠道内优势细菌种群组成进行揭示和比较,目的在于最终建立一种不依赖于分离培养的原位揭示对虾体内细菌种群组成的分子诊断技术,为今后相关病原菌的分子检测技术的建立,以及从体内优势菌种群方面对对虾健康进行评价、研究对虾与养殖水体微生物的关系、相关微生态制剂的开发奠定技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 和刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 均购自上海水产市场,置于-20℃冰箱中保存备用。

### 1.2 总 DNA 提取

无菌条件下将对虾的外壳剥去,获得鳃部和肠道,置于研钵中研碎,取适量放入 Eppendorf 管中加入 TE 缓冲液制成悬液备用。采用经典的酚-氯仿抽提方法提取鳃部和肠道细菌的总 DNA<sup>[5]</sup>。以 0.6% 琼脂糖凝胶、100V 电泳检测提取的总 DNA,结果经紫外成像仪 (Tanon-Gis1000) 分析。

### 1.3 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹图谱构建与分析

**1.3.1** 800bp16S rDNA 片段的 PCR 扩增: 50μL 的 PCR 反应体系: Primer 1 (8f: 5' - GGA GAG TTT GAT CA/CT GGC T-3') 0.5 μL, Primer 2 (798r: 5' -CCA GGG TAT CTA ATC CTC TT-3') 0.5 μL, dNTPs 2.0 μL, 10 × Buffer I (18mmol/L Mg<sup>2+</sup>) 9.0 μL; 模板 DNA 2.0 μL, TaqDNA 聚合酶 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 35.5 μL。PCR 扩增过程如下: 94℃ 变性 5min 后降至 80℃ 并保持 80℃, 其间向每管加入 0.5 μL TaqDNA 聚合酶 (5U/μL)。进入 PCR 循环: 94℃, 1 min; 57℃, 1 min; 72℃, 2 min; 循环 30 次; 72℃ 延伸 2 min。PCR 产物经 0.6% 的琼脂糖电泳检测, 电压为 90V。

**1.3.2** 16S rDNA V3 区片段的 PCR 扩增: 50μL 反应体系中引物采用 1.25μL 的 Primer 3 (5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG -3') 与 1.25μL 的 Primer 4 (5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') 外, 其它同 1.3.1。PCR 反应: 94℃ 变性 5min 后降至 80℃ 并保持 80℃, 期间向每管加入 0.5 μL Taq 酶 (5U/μL)。然后 65℃, 1 min, 再进入以下循环 94℃, 30 s; 65℃, 30 s; 72℃, 1 min; 循环 21 次; 94℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 1 min; 循环 5 次; 72℃ 延伸 3 min。反应结束后采用同 1.2 的方法在 85V 电压下经琼脂糖电泳检测。产物置于 4℃ 冰箱保存。

**1.3.3** DGGE 基因指纹图谱建立与分析: DGGE 指纹图构建采用 D Code<sup>TM</sup> System (Bio-

RAD), 点样量为  $15\mu\text{L}$ , 按照 Mulyzer 等的方法在  $60^\circ\text{C}$ , 电压  $150\text{V}$ , 聚丙烯酰胺凝胶的浓度为  $8\%$  条件下进行电泳  $4.5\text{h}^{[4]}$ 。银染显色, 数码相机拍照。采用 GIS 软件对指纹图进行聚类分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 对虾体内细菌总 DNA 的提取

采用 1.2 方法得到总 DNA 的电泳图如图 1 所示, 大小在  $21, 100\text{bp}$  左右。

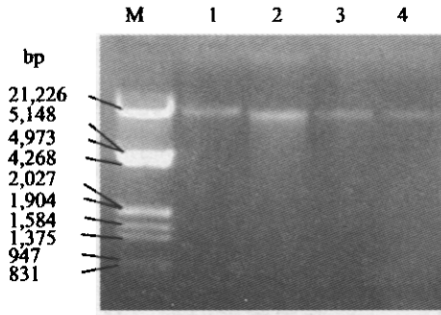


图 1 总 DNA 的电泳图

1 刀额新对虾鳃部样品, 2 刀额新对虾肠道样品

3 中国对虾鳃部样品, 4 中国对虾肠道样品

### 2.2 细菌 16S rDNA-V3 区片段的 PCR 扩增

以提取的对虾鳃部与肠道微生物的总 DNA 为模板 PCR 扩增出相应的 16S rDNA 片段, 结果见图 2。图 2 中左图为采用引物 P1、P2 扩增出的约  $800\text{bp}$  的 16S rDNA 片段, 右图为以此片段为模板, 以引物 P3、P4 进行第 2 次 PCR 扩增得到的 16S rDNA 的 V3 区片段。采用两次 PCR 操作我们成功地得到了适合 DGGE 指纹分析的 16S rDNA-V3 区片段的样品。

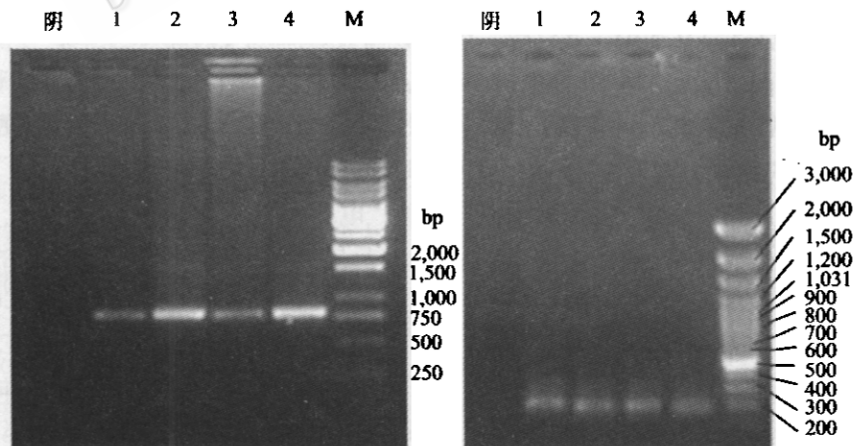


图 2 16S rDNA PCR 扩增图谱

A 第 1 次 16S rDNA 的 PCR 结果, B 16S rDNA V3 区的 PCR 结果

1 刀额新对虾鳃部样品, 2 刀额新对虾肠道样品, 3 中国对虾鳃部样品, 4 中国对虾肠道样品

2.3 DGGE 图谱建立与对虾体内细菌组成分析

对虾鳃部与肠道细菌的 16S rDNA-V3 片段的 DGGE 基因指纹图及聚类分析如图 3 所示。A 图中每一条泳道代表 1 种来源的对虾细菌样品的 DGGE 指纹图，不同位置的条带代表不同的优势细菌，亮度反映出细菌相对量的多少。可见，4 条泳道都有大量条带存在，这说明在对虾鳃部与肠道中存在大量的细菌。而且每个泳道中条带数目、位置和亮度都有不同，这说明两种对虾体内细菌都有着丰富的多样性，优势菌也不尽相同。有些代表细菌种类的条带是某一个样品所特有的，例如指纹图泳道 1 中的条带 6，泳道 3 中的条带 7，泳道 4 中的条带 11、12、13、14。泳道 3 中的条带 8、9、10 为中国对虾鳃部样品有而虾肠道样品没有出现。但是也有些共同的条带存在于不同的样品中，例如条带 1~5 为 4 种样品共有。可见 DGGE 指纹图带型的差别可以很好地反映出刀额新对虾鳃部与肠道中的细菌种群组成的差异与相同之处。同时，B 图的聚类分析结果更进一步证明了 4 种样品 DGGE 指纹图的异同。刀额新对虾鳃部与肠道中的细菌种群的 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图的相似性是 4 种样品中最大的，但也仅达到 15%；其次是刀额新对虾鳃部细菌与中国对虾鳃部细菌，差异性最大的是刀额新对虾鳃部细菌与中国对虾肠道细菌。

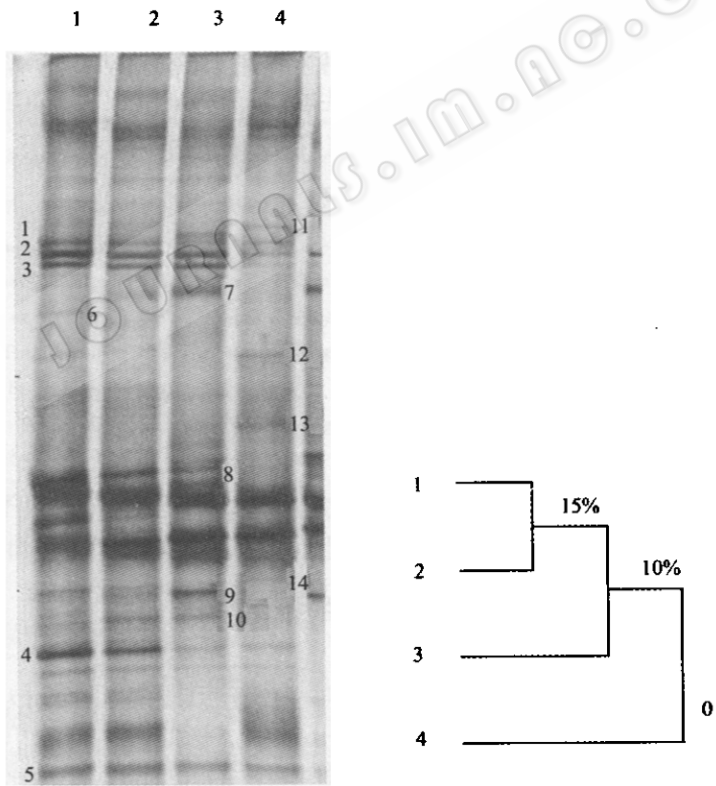


图 3 对虾样品 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图与聚类分析

A 指纹图, B 聚类分析

1 刀额新对虾鳃部样品, 2 刀额新对虾肠道样品, 3 中国对虾鳃部样品, 4 中国对虾肠道样品

对于不同对虾体内优势细菌组成差异性产生的原因，一方面可能是因为养殖环境不同造成的，另外一个原因可能是对虾宿主不同的缘故。养殖水体中的细菌一般是伴

随着对虾的食物摄取与呼吸进入体内的,鳃部过滤使一部分微生物在鳃部积聚,一部分排除体外,一部分进入肠道。进入体内的细菌一部分可能经过与宿主的相互适应而存活下来。来源不同、品种不同的对虾体内存在着相同的细菌提示我们在对虾体内可能存在着对虾特异性的优势细菌。

本文仅是采用 16S rDNA PCR-DGGE 基因指纹分析技术针对不同来源的两种对虾体内两个不同位置的优势细菌组成进行初步的揭示,至于指纹图上相同的和独有的条带代表的细菌的种属鉴定可经过割胶回收、克隆测序、同源性与系统发育树分析等手段实现,这将在我们的后续研究中予以报道。

本文的研究结果将有助于建立一种不依赖于分离培养的原位揭示对虾体内细菌种群组成的分子诊断技术。通过对虾体内特异性细菌组成的揭示将利于开发出相关的微生物制剂,通过对比健康与患病对虾体内微生物组成的差异可以快速找出相关病原菌,同时该技术也为研究对虾与养殖水体微生物的关系奠定了技术基础。

### 3 结论

16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因图谱可以直观地反映出不同对虾间、同一对虾体内不同部位内优势细菌的组成情况。刀额新对虾和中国对虾的鳃部与肠道内的优势细菌是非常丰富和多样的。不同对虾体内及同一种对虾的鳃部与肠道内的细菌组成差异性非常大,这可能与养殖环境及宿主有很大关系。根据 16S rDNA 和 PCR-DGGE 基因图谱可以发现不同对虾体内及同一种对虾的鳃部与肠道内有相同的细菌存在。

### 参 考 文 献

- [1] 樊海平,张继彤.福建水产,1993,1: 33~35.
- [2] 徐晓津,王 军.河北渔业,2001,3: 22~25.
- [3] 李秋芬,陈碧鹃,曲克明.应用生态学报,2002,13(6): 731~734.
- [4] Muyzer G, Ellen C, Waal D E. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 5: 695~700.
- [5] 奥斯特伯 F,布伦特 R.精编分子生物学实验指南(第一版).北京:科学出版社,1998.