

海绵中可培养与原位微生物组成的 DGGE 指纹分析*

何丽明 李志勇** 蒋 群 黄艳琴

(上海交通大学生命科学技术学院 海洋生物技术实验室 上海 200240)

摘要: 采用不依赖于分离培养的 PCR-DGGE 基因指纹技术对我国南海 4 种海绵体内的原位微生物种群组成以及混合培养的海绵微生物组成进行分析, 通过比较不同指纹图间的差异与相似性, 揭示可培养微生物与海绵原位存在的微生物的关系。由实验可以看出, 来自同一海域的不同海绵体内的微生物存在宿主特异性, 不同的培养条件是影响微生物可培养的重要因素, 目前所能培养的海绵微生物还仅占自然环境下海绵微生物总量的很少一部分。

关键词: 海绵, 微生物种群组成, 混合培养, 16S rDNA, DGGE 基因指纹图

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0051-06

Analysis of Sponge-associated Culturable and Natural Microbial Community Structure Based on DGGE Fingerprinting*

HE Li-Ming LI Zhi-Yong** JIANG Qun HUANG Yan-Qin

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

Abstract: The microbial community structure of 4 kinds of sponges in South China Sea were revealed using culture-independent PCR- DGGE gene fingerprint technique as well as the mixed culturable microorganism. The relationship between the culturable and un-culturable microorganism was studied based on the different fingerprint profile. It was found that there is host specificity for microorganism in different sponges from the same marine area. Culture condition such as medium is an important factor for sponge-associated microbial cultivation and the culturable microorganism amount to only a little part of the total sponge-associated microorganisms.

Key words: Sponge, Microbial community structure, Mixed culture, 16S rDNA, DGGE fingerprinting

海绵是海洋中营固着生活的一类最原始的多细胞动物, 其独特的布满全身的腔状结构使其成为许多微生物良好的宿主, 体内微生物的总体积可达总体积的 40% 以上, 以共生、寄生或暂时留驻等形式存在于海绵表面、体内的细胞间、细胞内部甚至海绵细胞的细胞核内^[1,2]。

越来越多证据表明一些海绵活性化合物是由海绵体内的微生物产生或相关的。因此研究海绵活性化合物及其应用的主流已经转向对海绵共附生微生物种群及其功能的研究。海绵活性物质的开发和利用, 其关键在于利用现代分子生物学和传统的微生物学方法, 正确认识海绵共附生微生物群落的组成, 最终实现活性物质的微生物发酵生产。其中最基础的问题是海绵共附生微生物多样性的揭示, 尤其是海绵共附生微生物的原位揭示及可培养微生物相关信息。传统观念认为海绵共附生微生物是非常难培养的, 目前仅就某一些来自于海绵的单个微生物的分离培养进行了一些研究, 但是对于

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA628080, 2004AA628060)

** 通讯作者 Tel: 021-54743351, E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-08-16, 修回日期: 2004-09-02

这部分可培养的微生物种群组成与原位的海绵微生物总体种群组成尤其是那些目前还不能培养的微生物间的关系还没有研究报道,同时对于海绵微生物的混合培养及其种群组成情况也没有任何报道,因此急需开展这方面的研究。DGGE(变性梯度凝胶电泳)技术自从 1993 年被成功应用于土壤复杂微生物区系结构的揭示以来^[3],目前已经成为微生物分子生态学研究的重要技术,非常适合对于复杂的微生物种群结构进行比较分析。目前国内还没有采用 PCR-DGGE 基因指纹技术研究海绵共附生微生物的报道。

本文采用先进的不依赖于分离培养的 PCR-DGGE 基因指纹技术对于我国南海 4 种海绵体内的优势微生物种群组成进行揭示,同时对于每一种海绵的微生物进行混合培养并对其组成进行 PCR-DGGE 基因指纹分析,通过比较不同指纹图间的差异与相似性,了解可培养微生物与不可培养微生物间的关系,这对于揭示海绵共附生微生物的原位种群结构以及部分可培养的海绵微生物组成信息具有很重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 海绵

4 种海绵均采自我国南海三亚周边海域,由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定为海绵 A: 细薄星芒海绵 [*Stelletta tenui* (Lindgren, 1897)]; 海绵 B: 皱皮软海绵 [*Halichondria* (Ridley & Dendy)]; 海绵 C: 贪婪掘海绵 [*Dysidea avara* (Schmidt)]; 海绵 D: 澳大利亚厚皮海绵 [*Craniella australiensis* (Carter)]。

1.2 海绵共附生微生物 DNA 的提取

1.2.1 海绵共附生微生物总 DNA 的提取: 无菌条件下切取 0.5g 海绵样品用无菌小刀切成 2mm³ 小块,研磨后取 0.5mL 提取总 DNA^[4,5]。

1.2.2 海绵共附生微生物的混合培养与总 DNA 提取: 将 5g 左右的海绵切成 1mm³ 的小块,置于 50mL 无菌海水中振荡释放体内微生物,过滤得种子液。同时采用乙醇抽提、减压浓缩、添加蒸馏水制备海绵浸出汁。将种子液 5mL/份接种至两份 185mL/份的 1 号和两份 185mL/份的 2 号培养基中,其中 1 份 1 号培养基和 1 份 2 号培养基加入 10mL 海绵浸出汁,另外 1 份 1 号培养基和 2 号培养基加入 10mL 无菌海水,28℃、200r/min 摇床培养。以 A 海绵为例进行样品标记: A1、A1'、A2、A2' 分别表示: 采用添加海绵浸出汁的 1 号培养基培养样品、未添加海绵浸出汁的 1 号培养基培养样品、添加海绵浸出汁的 2 号培养基培养样品、未添加海绵浸出汁的 2 号培养基培养样品,其余类推。1L 人工海水按以下配方配制: 26.518g/L NaCl, 0.725g/L KCl, 2.447g/L MgCl₂, 0.202g/L NaHCO₃, 3.305g/L MgSO₄, 0.083g/L NaBr, 1.141g/L CaCl₂。1 号和 2 号培养基分别采用 Olson 的 FL 与 C-mix 培养基^[6]。海绵混合菌总 DNA 的提取根据文献[3]的方法进行适当修正提取总 DNA。

1.3 16S rDNA 扩增

以总 DNA 为模板,采用引物 8f (5' -GGA GAG TTT GAT CA/CT GGC T-3') 与 798r (5' -CCA GCG TAT CTA ATC CTC TT-3') 扩增海绵细菌 DNA 的 16S rDNA 片段。体系及反应条件如下: 9μL 10 × PCR 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl (pH8.2), 18mmol/L MgCl₂, 500mmol/L KCl, 0.1% 甘油, 1% 的 TritonX-100), 10pmol 的引物 8f

及 10pmol 的引物 798r, 2 μ L 10mmol/L (每种碱基浓度) dNTP, 1 μ L 纯的基因组 DNA 及 2.5U Super Taq 酶, 用无菌去离子水补充体积至 50 μ L。PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 80 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 加入 Super Taq 酶。接着按 (94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min) 25 次循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 完成扩增。以获得的 PCR 产物为模板, 采用引物 P2 (5' - att acc gcg gct gct gg -3') 与 P3 (5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA CGG GGG Gcc tac ggg agg cag cag -3') 进行 16S rDNA-V3 扩增。扩增体系及反应条件如下: 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl (pH8.2), 18mmol/L MgCl₂, 500mmol/L KCl, 0.1% 甘油, 1% 的 TritonX-100), 25pmol 的 P3 及 25pmol 的 P2, 1.75 μ L 10mmol/L dNTP, 2 μ L 纯的 16S rDNA 及 2.5U Super Taq 酶, 用无菌去离子水补充体积至 50 μ L。PCR 反应程序如下^[3]: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 80 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 加入 Super Taq 酶。65 $^{\circ}$ C 退火 1 min, (94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 65 $^{\circ}$ C (65 $^{\circ}$ C \sim 0.5 $^{\circ}$ C/循环) 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 21 次循环, (94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 5 次循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 最后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色观察。

1.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析

采用 Bio-Rad 的 DGGE 分析系统, 实验条件如下: 8% (wt/vol) 聚丙烯酰胺 (37.5:1), 60 $^{\circ}$ C、1 倍 TAE 电泳缓冲液下电泳^[7,8]。变性剂尿素与去离子甲酰胺的线性梯度为 30% \sim 50%, 电压 150V, 电泳时间 4.5h。进样量: 5 μ L 进样缓冲液 + 10 μ L PCR 产品。银染, 数码相机拍照, 采用 UVIBandMap V.99 (UVItec, Cambridge, UK) 聚类分析软件分析。

2 结果与讨论

2.1 总 DNA 提取

图 1 是 4 种海绵及其采用相应培养基培养的混合菌的总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱。可以看出提取到的细菌基因组 DNA 纯度很好, 适合作为下一步 16S rDNA 扩增的模板。

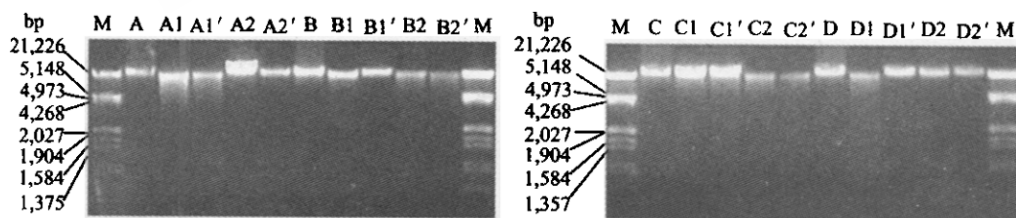


图 1 海绵微生物总 DNA 的凝胶图

M λ DNA/EcoRI + HindIII ladder, A、B、C、D 直接从海绵提取的总 DNA, A1、B1、C1、D1 采用 1 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的总 DNA, A1'、B1'、C1'、D1' 采用 1 号培养基培养的混合菌的总 DNA, A2、B2、C2、D2 采用 2 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的总 DNA, A2'、B2'、C2'、D2' 采用 2 号培养基培养的混合菌的总 DNA

2.2 16S rDNA 及 16S rDNA-V3 的扩增

图 2 是采用引物 8f 和 798r 的 16S rDNA 扩增的琼脂糖电泳图。图 3 是采用引物 P3 与 P2 以图 2 中扩增的 16S rDNA 片段为模板扩增的 16S rDNA-V3 片段的琼脂糖电泳检

测图谱, 目的片段在 200bp 附近, 扩增特异性很好, 几乎没有杂带出现。

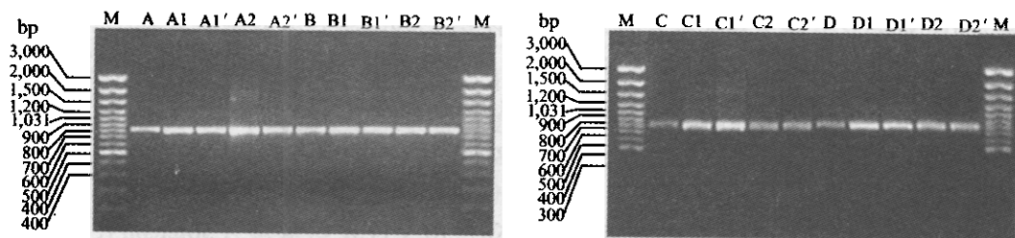


图2 16S rDNA 的扩增结果

M 100bp DNA ladder, A、B、C、D 对应于直接从海绵提取的总 DNA 的扩增结果, A1、B1、C1、D1 对应于采用 1 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果, A1'、B1'、C1'、D1' 对应于采用 1 号培养基培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果, A2、B2、C2、D2 对应于采用 2 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果, A2'、B2'、C2'、D2' 对应于采用 2 号培养基培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果

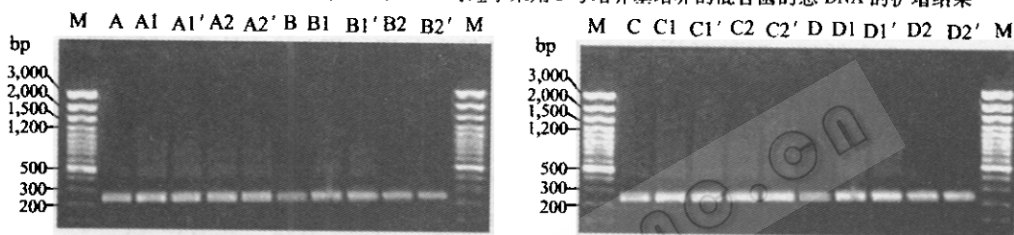


图3 16S rDNA-V3 片段的扩增结果

M 100bp DNA ladder, A、B、C、D 对应于直接从海绵提取的总 DNA 的扩增结果, A1、B1、C1、D1 对应于采用 1 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果, A1'、B1'、C1'、D1' 对应于采用 1 号培养基培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果, A2、B2、C2、D2 对应于采用 2 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果, A2'、B2'、C2'、D2' 对应于采用 2 号培养基培养的混合菌的总 DNA 的扩增结果

2.3 DGGE 指纹图谱构建与聚类分析

图4 是对应于 4 种海绵及采用相关培养基培养的混合菌的 DGGE 指纹图。从图上我们可以看出每条泳道都包含 10~20 条优势菌条带, 这说明海绵细菌种群结构丰富、种类较多。A、B、C、D 泳道的带型有着明显的差异说明 4 种海绵体内的微生物组成有着明显的不同。由于这 4 种海绵采集自同一海域, 微生物组成结构差别如此大说明海绵共附生微生物存在着宿主特异性。虽然如此, 也发现共同的条带存在于 4 种海绵的 DGGE 指纹图中, 例如 A 指纹条带中的条带 1 在 B、C 指纹中可以发现与之对应的条带, 这可能与海绵所处的海洋环境相关。

对于每一种海绵及其相应混合菌培养的 DGGE 指纹进行聚类分析结果如图 5。可以看出不同的培养基条件对于所能培养得到的微生物的种类的影响是非常大的, 这主要体现在以下几个方面: (1) 相同的培养基 (添加或者不添加海绵浸出液) 所得到的微生物组成相似性高于不同的培养基, 例如: 对于海绵 A 来说, A1 与 A1' 指纹图的相似性高达 86%, 海绵 B、C、D 的情况与 A 很相似。这说明采用相同培养基培养的混合菌的组成是比较相似和稳定的。(2) 所采用的 1 号与 2 号培养基及其添加海绵浸出液的综合培养基所能培养的微生物均只占海绵体内微生物的一小部分, 这可以从基因指纹的相似性仅在 9%~32% 之间得到反映。一些微生物是 1 号和 2 号培养基及其添加海绵浸出液的综合培养基也不能培养得到的, 例如 C 的 1、2、3、4、5 5 条带代表的微生物

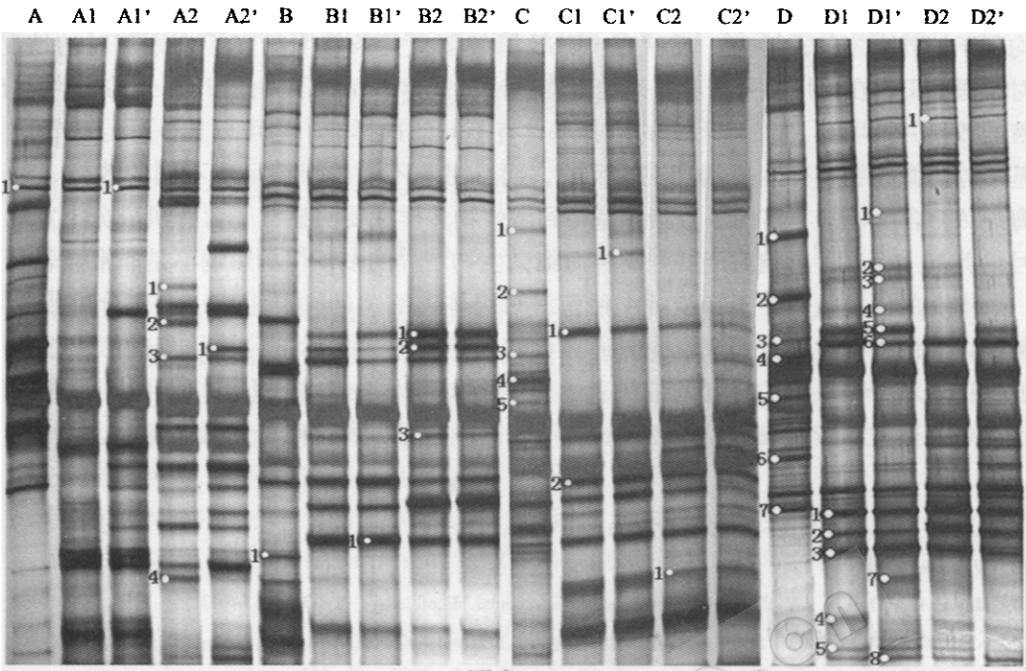


图 4 海绵微生物的 DGGE 指纹图谱

A、B、C、D 为 4 种海绵的原位微生物 DGGE 指纹图，A1、B1、C1、D1 采用 1 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的 DGGE 指纹图，A1'、B1'、C1'、D1' 采用 1 号培养基培养的混合菌的 DGGE 指纹图，A2、B2、C2、D2 采用 2 号培养基和海绵浸出汁培养的混合菌的 DGGE 指纹图，A2'、B2'、C2'、D2' 采用 2 号培养基培养的混合菌的 DGGE 指纹图

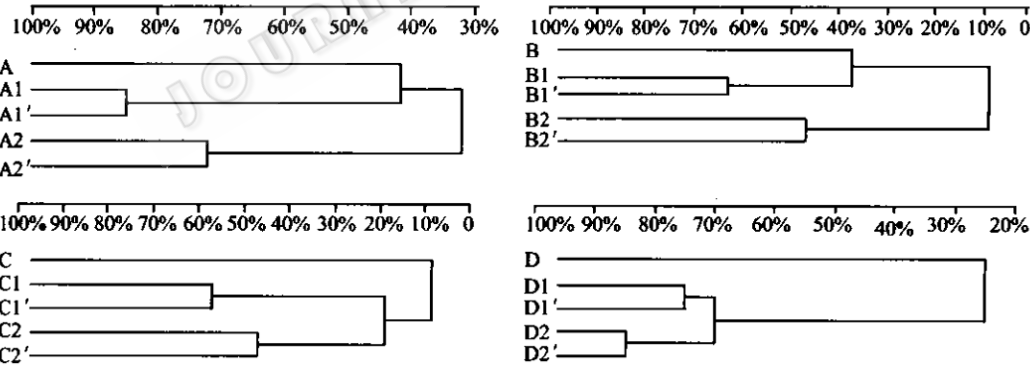


图 5 海绵及其相应混合菌的 DGGE 指纹图的聚类分析

物，同样情况还有 B 中的 1，D 中的 1、2、3、4、6。可见对培养基进行选择和优化，争取培养出更多的海绵微生物是今后海绵微生物分离培养的重点。(3) 与以上不能培养的微生物不同，一些海绵微生物经培养后数量明显增多，条带明显变亮，达到了富集的结果，例如对应于 A2 中的 1、2、3、4 4 条带的微生物，A2' 中的 1，B1' 中的 1，B2 中的 1、2、3，C1 中的 1、2，C1' 中的 1，C2 中的 1，D1 中的 1、2、3、4、5。(4) 添加海绵浸出液的可以使培养条件进一步与自然条件接近，因此应该利于海绵微生物的分离培养。但是从我们的实验结果看，对于不同海绵具有不同的结果。根据图 4

中条带的多少可以看出, 对于海绵 A, 无论采用 1 号还是 2 号培养基, 添加海绵浸出液均利于培养更多的微生物, 反映在 DGGE 指纹图上是条带明显多于未添加时的情况。对于海绵 D, 在采用 1 号培养基时也存在这样的规律。而对于其他情况, 添加海绵浸出液的效果并不明显。(5) 不同的培养基具有不同的选择性, 这可以从 1 号与 2 号培养基培养的微生物多样性得到直观的反映, 而且对于不同的海绵呈现不同的效果。对于海绵 A, 含无机盐丰富的 1 号培养基得到微生物多样性要明显低于含有机成分丰富的 2 号培养基。而这种影响对于其他 3 种海绵微生物培养的多样性的影响不是非常显著。

本文的研究重点在于初步对 4 种南海海绵体内细菌的种群组成以及部分可培养细菌的组成的多样性进行研究, 同时通过比较指纹图差异揭示部分可培养的海绵细菌组成情况。对于图 4 中的特征条带代表的微生物(可以培养的、不可培养的)种类的确定, 可以通过割胶回收、克隆测序、对照基因库进行序列比对与分析来实现。

参 考 文 献

- [1] Vacelet J, Danadey C. *Biol Ecol*, 1977, **30**: 301 ~ 314.
- [2] Wilkinson C R. *Mar Biol*, 1978, **49**: 177 ~ 185.
- [3] Muyzer G, Ellen C, Waal D E. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 695 ~ 700.
- [4] Ksek M, Wellington E M H. *Microbiol Methods*, 1999, **39**: 1 ~ 16.
- [5] Niemi M R, Heiskanen, Wallenius K, *et al.* *Microbiol Methods*, 2001, **45**: 155 ~ 165.
- [6] Olson J B, Lord C C, McCarthy P J. *Microb Ecol*, 2000, **40**: 139 ~ 147.
- [7] Erik J, Hannen V, Gabriel Z, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 795 ~ 801.
- [8] Luca C, Marisa M, Carlo C, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 5113 ~ 5121.