

利用定量杂交法检测绵羊瘤胃纤维细菌的研究*

王海荣 侯先志** 高爱武 吕莉华 郭媛

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院 呼和浩特 010018)

摘要: 实验利用通用细菌探针和3株纤维分解菌的特异性探针,初步建立起对瘤胃细菌进行检测的16S rRNA定量杂交的方法。试验将提取的总RNA按浓度系列稀释后与通用细菌探针进行杂交,检测结果所做的回归分析表明,杂交信号与尼龙膜上的所点RNA的量具有明显线性关系。同时对几份瘤胃样品进行3种纤维分解菌的初步定量检测,结果显示3种纤维分解菌的相对丰度与前人报道相似,表明该方法能够对瘤胃细菌进行定量分析,可在后续相关研究中使用。

关键词: 16S rRNA, 寡核苷酸探针, 定量杂交, 瘤胃细菌

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0007-04

Use of 16S-rRNA Hybridization Probes to Detect the Cellulolytic Bacteria in Rumen*

WANG Hai-Rong HOU Xian-Zhi** GAO Ai-Wu LV Li-Hua GUO Yuan

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018)

Abstract: In this study, the general bacterial probe and specific cellulolytic bacterial probes were used to quantify the bacteria in rumen. The total RNA were extracted and then hybridized with general bacterial probe after a dilution of concentration. The result showed that there was a high correlation between the hybridization signal and the dilution of total bacterial RNA. Based on the result above, the quantities of three cellulolytic bacteria in rumen sample were detected. The comparative RNA percentage of three cellulolytic bacteria to total bacterial RNA were similar to the previous reports. It can be concluded that the quantification of bacteria in rumen could be conducted by this approach, and which could be used in future research.

Key words: 16S rRNA, Oligonucleotide probe, Quantified hybridization, Ruminant bacteria

瘤胃微生物在反刍动物消化的过程中起着至关重要的作用,但由于长期进化,使得瘤胃微生物的生长需要特殊的营养因子和严格的厌氧环境,因此通过纯培养的方法了解复杂的瘤胃微生态是不可能的,通过显微镜检和分离培养的结果表明,体外培养成活的细菌仅占瘤胃细菌总数的10%^[1]。近年来,以核糖体RNA为主的分子生物学技术发展迅速,加快了环境生态下微生物区系结构的研究,一些不能被培养的未知微生物被发现^[2],大量的细菌16S rRNA基因序列被公共数据库收录,广泛用于系统发育分析和亲缘关系鉴定^[2,3],这为环境样品中微生物的研究提供了一条重要的途径。Stahl等^[4]首次利用16S rRNA定量杂交技术检测胃肠道内特定微生物种群的变化,利用同位素标记寡核苷酸探针与样品中提取的核酸杂交,有关微生物的相对丰度和绝对丰度即可通过杂交信号的强度来度量。应用定量杂交技术能够直接定量检测复杂环境中的生物类群,在一定程度上克服了纯培养的缺点。鉴于国内至今仍未有该技术应用于瘤胃

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30460095)

** 通讯作者 Tel: 0471-4317654, E-mail: houxx@public.tl.nm.cn

收稿日期: 2005-08-15, 修回日期: 2005-10-21

微生物的报道, 本文在瘤胃细菌 RNA 的提取和定量杂交方法上做了初步研究, 以为后续实验研究提供一定的参考。

1 材料

1.1 实验动物

3 只装有永久性瘤胃瘘管的绵羊, 饲喂精粗比为 2:8 的日粮, 每天喂 2 次, 饲喂时间为早 7 点, 晚 7 点; 自由饮水。

1.2 样品采集与处理

在早 7 点饲喂前, 从试验羊瘤胃内采集瘤胃液各 20mL 装入经灭酶处理的玻璃杯中, 盖严, 并立即带回实验室处理。

取新鲜瘤胃液用匀浆机匀浆 15s, 然后取 50g 处理样至于无菌塑料袋中, 然后加入 5mL 磷酸缓冲液, 拍打 5min, 用 2 层纱布过滤, 滤液在 4℃ 条件下 1,000g 离心 15min; 取上清液 10,000g、4℃、离心 25min; 弃上清, 沉淀加 2.5mL 磷酸缓冲液悬浮, 分装, -70℃ 冷冻保存备用。

1.3 寡核苷酸探针的合成

探针序列见表 1^[1,5]。实验所用探针由上海生物工程公司合成, 5'-末端用地高辛标记。

表 1 本研究中的寡核苷酸探针

目标生物	探针名称	序列 (5'-3')
<i>Bacteria</i>	S-D-Bact-0338-a-a-18	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
<i>Rumincoccus albus</i>	S-S-R. alb-0196-a-A-18	CTCATGCCGCTTCGTTAT
<i>Rumincoccus flavefaciens</i>	S-S-R. fla-1296-a-A-20	TTCCTCTTTGTTAATTGCCAT
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	S-S-F. suc-0650-g-A-20	TGCCCTGAACTATCCAAGA

1.4 主要试剂

TRzol (上海生物工程有限公司); 地高辛标记核酸检测试剂盒 (Cat. NO. 1175041) 购自 Roche 公司。

2 方法

2.1 RNA 的提取

瘤胃细菌种类较多, 菌体细胞的裂解程度不一, 裂解方法尤其重要, 本次实验采用微珠振荡法进行细胞裂解^[5], 并做一定修改。提取方法为: 依次在 1.5mLEP 管中加入 0.2g 玻璃珠、200μL 处理后瘤胃样品、1mL TRzol, 然后在漩涡混合器上剧烈振荡 3min, 静置 5min 后离心 (4℃; 10,000g; 10min), 取上清加入 200μL 氯仿, 剧烈振荡 30s, 静置 5min 后离心 (4℃, 12,000r/min; 5min), 移取上清重复用氯仿抽提一次, 移取上清加入等体积异丙醇, 轻微混匀, 静置 5min, 离心 (4℃, 12,000r/min, 10min), 去上清。在有沉淀的管中加入 1mL 75% 的乙醇洗涤沉淀; 离心 (4℃, 12,000r/min; 5min), 弃去上清。在 RNA 管中加入 1mL 乙醇, 于 -20℃ 保存用于杂交。

在杂交之前, 弃去乙醇, 将沉淀在室温下凉干, 加 20μL 无酶水充分溶解。取 3μL 测 OD 值, 其余用于杂交。

2.2 杂交方法^[5]

2.2.1 RNA 变性与稀释: RNA 样品中加入 3 倍体积的 2% 的戊二醛, 在 25℃ 培养

10min; 用含有溴酚兰和 poly (A) 的溶液稀释 (1mL 含 0.02 μ L 2% 溴酚兰, Poly (A) 1 μ g/mL)。使稀释后 RNA 的终浓度为 2 μ g/mL。

2.2.2 点样: 每个样品做 3 个重复, 每个重复 5 μ L。取大小合适的尼龙膜在 20 $\times$ SSC 中浸泡 1h, 然后将膜铺在滤纸上凉干, 点样, 每个斑点点 5 μ L 变性的 RNA, 点完样后凉干, 将凉干的尼龙膜在 120 $^{\circ}$ C 下烘烤 30min, 然后进行杂交。

2.2.3 预杂交: 将烘好的尼龙膜放入灭菌袋中, 按 200 μ L/cm² 加入杂交液封口, 然后在 40 $^{\circ}$ C 预杂交 1h。

2.2.4 杂交: 将地高辛标记的探针加入到杂交液中, 使其浓度为 100ng/mL, 室温下杂交 12 ~ 16h。

2.3 检测方法

用洗膜液在各自的洗涤温度下冲洗 30 min, 冲洗 2 次; 然后依次在冲洗缓冲液中简单漂洗膜; 在 1% 的 Blocking 溶液中培养 30min; 在抗体溶液中培养 30min; 用冲洗缓冲液冲洗 15min, 冲洗 2 次; 在检测缓冲液中平衡 3 min; 将膜在 10mL 底物溶液中进行培养; 染色 5 ~ 6h, 取出尼龙膜用 TE 缓冲液终止反应, 然后取出凉干备检测。

将已染色好的滤膜用 CS-930 双波长薄层色谱扫描仪进行扫描, 得出不同样品的峰高值, 根据实验结果进行回归分析, 确定检测方法的准确性。

2.4 统计方法

利用 Excel 软件进行数据统计。

3 结果与分析

3.1 通用细菌探针杂交信号回归分析

为了检测本方法的可靠性, 我们将提取的总 RNA 按浓度系列稀释后进行杂交, 结果见表 2 和图 1。

表 2 瘤胃细菌 RNA 系列杂交信号

稀释倍数	4	8	12	16	20
杂交信号值	148694 $\pm$	112043.3 $\pm$	78641.39 $\pm$	50568.27 $\pm$	33674.29 $\pm$
	20903.42	27831.43	29410.74	1945.542	23521.23

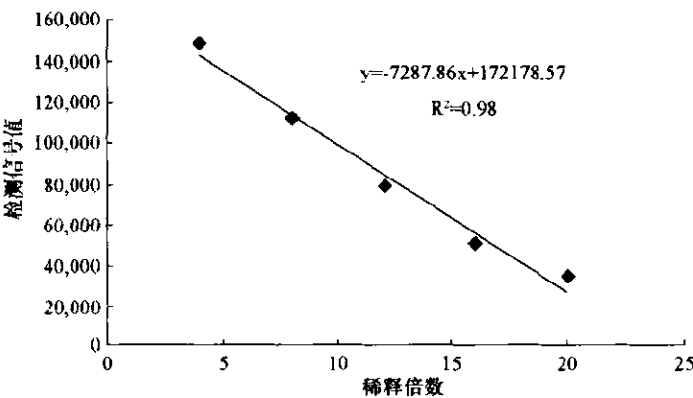


图 1 细菌 RNA 系列稀释倍数与杂交信号的相关关系图

检测结果所做的回归分析表明, 杂交信号与尼龙膜上 RNA 的量具有明显的线性关系, 表明本杂交方法可以应用与瘤胃细菌的定量检测。

3.2 3 种纤维分解菌的定量杂交

在上述实验的基础上,对瘤胃样品中几种纤维分解菌进行检测,结果见表 3,检测结果与国外已报道的相同纤维菌的实验结果呈现出一致性。

表 3 纤维分解菌 *R. albus*、*R. flavefaciens*、*F. succinogenes* 的相对数量

目 标 菌	本次研究目标菌 相对数量	Krause ^[6]	Michalet-Doreau ^[7]	Weimer ^[8]
<i>Ruminococcus albus</i> (%)	1.66 ± 0.20	2.2 ~ 5.0	0.7 ~ 1.1	0.59 ~ 1.59
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (%)	2.74 ± 0.29		1.4 ~ 2.7	0.06 ~ 0.21
<i>Fibrobacter succinogenes</i> (%)	3.76 ± 0.26	1.8 ~ 4.0	2.1 ~ 6.3	0.09 ~ 0.40

4 讨论

瘤胃微生物是一个特殊而复杂的群体,对它的研究要远比一些兼性微生物区系困难得多。另外鉴于传统培养方法的局限性,至今仍然很难对瘤胃微生物进行定量研究,因此也无法建立起瘤胃微生物群落与瘤胃发酵功能之间的关系。随着的 16S rRNA 基因序列被公共数据库的大量收录,可通过序列比对得到一些特异性的寡核苷酸探针,进而使得 16S rRNA 定量杂交法成为分析复杂环境微生物群落的一种有力工具。

RNA 的提取是对瘤胃样品中微生物进行检测的重要研究基础,因此它的浓度至关重要,在 RNA 提取的过程中我们对前人的研究方法进行一定的修改,增加了微生物的前处理过程,这使获取的 RNA 浓度较高,对后续的杂交提供了更有益的帮助。

另外,杂交方法应用于其它领域微生物定量检测时往往是将已知的菌种进行人为混合后杂交检测来验证实验方法的可靠性,而对于瘤胃微生物来讲,目前国内很难得到纯的纤维分解菌的标准菌株,而且考虑到在检测单一菌株的相对含量时均要与总细菌 RNA 进行比较,所以在检验本方法的可行性时采用了对总 RNA 系列稀释后与通用细菌探针进行杂交的检测方式,结果显示出较好的相关性。在此基础上我们对几份瘤胃样品进行 3 种纤维分解菌的检测,得出的试验结果符合前人的描述,(Krause, 1999; Michalet-Doreau, 2001) 因此认为本研究方法可在后续相关的研究中使用。

参 考 文 献

[1] Anann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 59: 143 ~ 169.
[2] Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, et al. FEMS Microbiology and Ecology, 1999, 29: 159 ~ 169.
[3] Marc F W, Robert J F, Cheryl E B, et al. Anaerobe, 1998, 4: 153 ~ 163.
[4] Sahl D A, Flesher B, Mansfield H R, et al. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54: 1079 ~ 1084.
[5] Krause D O, Russell J B. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 815 ~ 821.
[6] Krause D O, Dalrymple B P, Smith W J, et al. Microbiology, 1999, 145: 1797 ~ 1807.
[7] Michalet-Doreau B, Fernandez I, Fonty G. Journal of Animal Science, 2002, 80: 790 ~ 796.
[8] Weimer P J, Waghorn G C, Odt C L, et al. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 122 ~ 134.