

鱼类肠道微生物总 DNA 的提取

汪明, 刘军, 陈爱敬, 赵胜军, 黄峰, 刘立鹤

(动物营养与饲料科学湖北省重点实验室, 武汉工业学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 尝试提取鲫 (*Carassius auratus*) 肠道菌群总 DNA, 为研究鱼类肠道菌群结构提供依据。以鲫肠道内容物为样本, 用 PBS 多次洗涤, 离心样品, 沉淀菌体。使用试剂盒法提取肠道菌群总 DNA, 电泳结果显示, 样品 DNA 条带明亮, 无降解现象, 可用于后续分子生物学试验研究; 通过设计的细菌通用引物, 对其 16S rDNA 基因进行 PCR 扩增, 得到较清晰的图谱, 条带整齐; 表明采用该方法提取鱼类肠道微生物群落的 DNA 较为简单、准确、可行。

关键词: 鲫; 肠道细菌; DNA 提取

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2010)03-0118-04

鱼类肠道正常菌群是肠道微生物与宿主以及所处水生环境形成的相互依赖、相互制约的生态系统, 对营养物质的消化吸收、免疫反应以及器官的发育等方面具有其他因素不可替代的作用, 并且影响到鱼类的生长、发育、生理和病理(宋增福和吴天星, 2007)。这些菌群的分离和鉴定对于研究肠道菌群功能及与机体的相互关系非常重要, 传统的方法都局限于从培养基中分离得到微生物, 然后通过生理生化性状、特定的表型进行分析; 这样所得到的检测结果非常容易受到操作方法的影响, 而且还会常常低估肠道菌群的数量和多样性, 不能全面反映肠道微生物之间及微生物与宿主间的真实相互关系(Aann et al, 1995)。

随着现代科技的快速发展, 大量分子生物学技术应用于肠道微生物生态学的研究中(Ward et al, 1990; Weidner et al, 1996; Rondon et al, 2000)。这种新的分析方法, 只需从混合的微生物样品中提取总 DNA, 得到若干个基因组的混合物, 然后通过 DNA 指纹图法、分子杂交法、克隆建库法等分子标记技术, 分析混合物中不同基因组的多样性来反映样品微生物种类组成。但多数研究还是沿用传统的 DNA 制备方法即酚/氯仿抽提法提取肠道微生物总 DNA; 并且利用分子生物学技术研究水产动物肠道微生物多样性的报道尚不多见。有鉴于此, 本文以鲫 (*Carassius auratus*) 为研究对象, 尝试探讨一种

较为简单易行的鱼类肠道微生物群落 DNA 提取方法, 为其分子生态学的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品准备

4 尾健康鲫 (11.7 ± 2.0) g 于 2008 年 10 月随机挑选自武汉工业学院水产实验室水族箱, 取样时测定水温为 26℃。实验鱼全程投喂自制日粮, 每天投喂 2 次, 在取样当日 9:00 投喂后, 于 15:10 进行取样。取样时用纱网迅速将鱼从水族箱中捞出, 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。75% 酒精擦拭消化道外壁, 无菌冲洗液 (0.9% 灭菌生理盐水) 冲洗数遍 (MacDonald, 1986)。用剪刀分离出消化道, 分别用 4 个 2 mL 离心管收集消化道内容物, 标记为 1、2、3、4, 于 -20℃ 保存。

1.2 试剂

DNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A. Bacterial DNA Kit) 购自美国 Omega 生物技术公司, Taq 酶、DNA Mark 购自广东东盛生物科技生物技术有限公司, 琼脂糖购自上海生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理 将采集的 4 组样品分别用 1.5 mL PBS (pH 7.4, 浓度 0.2 mol/L) 悬浮, 剧烈震荡 5 min 后, 1 000 r/min 离心 3 次, 每次 5 min, 收集上清, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀, 用 1 mL PBS 悬浮沉淀, 重复离心, 直到上清液基本清澈为止; 最后再用 1 mL PBS 悬浮收集到的沉淀, 置于 2 mL Eppendorf 管中 -20℃ 保存备用。

收稿日期: 2009-11-09

基金项目: 湖北省教育厅重点项目 (D200618007)。

通讯作者: 刘军, 1976 年生, 男, 副教授, 博士, 研究生导师, 研究方向为水产养殖。E-mail: liujunihb@yahoo.com.cn

作者简介: 汪明, 1985 年生, 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料科学。

1.3.2 肠道微生物总 DNA 的提取 将上述处理的样品, 12 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液。参考 Yu & Morrison(2004)的方法略加修改, 增加 DNA 试剂盒纯化步骤, 按试剂盒(Omega, USA)操作步骤, 所得产物存放于 -20°C 备用。具体操作步骤如下:

(1) 在上述处理的样品中各加入 180 μL TE 缓冲液, 再加入 50 mg/mL 的溶菌酶 20 μL , 混匀后置 30°C 温育最少 15 min。

(2) 12 000 r/min 离心 5 min, 收集已消化细胞壁的细菌。

(3) 加入 200 μL Buffer BTL 重悬细胞, 加 25 μL 蛋白酶 K(15 mg/mL), 加入玻璃珠, 涡旋混匀, 置于 55°C 恒温水浴, 每 20 ~ 30 min 涡旋振荡样品 1 次。裂解时间随细菌的种类及用量的不同而不同, 但一般在 1 h 之内就能消化完全。

(4) 加入 25 mg/mL 的 RNA 酶 A 5 μL , 并在室温下放置 5 min。

(5) 加入 220 μL Buffer BDL, 涡旋混匀, 并在 65°C 下水浴 10 min。在加入 Buffer BDL 后可能会形成小团的沉淀, 并不会影响 DNA 的提取。

(6) 加入 220 μL 无水乙醇并充分地涡旋振荡。

(7) 把 Hibind[®] 自旋柱装在 1 个 2 mL 收集管上, 把第 6 步得到的样品(包括可能形成的所有沉淀)全部转移到柱子内, 10 000 \times g 离心 1 min 以结合 DNA, 弃去流出液和收集管。

(8) 把柱子装到 1 个新的 2 mL 收集管上, 加入 500 μL HB, 加入 700 μL DNA Wash Buffer(已用无水乙醇稀释)于柱子中, 10 000 \times g 离心 1 min 以洗涤柱子, 弃去流出液, 收集管再继续下一步使用; 柱子重新套回 2 mL 收集管, 加入 700 μL DNA Wash Buffer, 10 000 \times g 离心 1 min 以洗涤柱子, 弃去流出液。

(9) 柱子重新套回 2 mL 收集管, $\geq 10\ 000 \times$ g 离心空柱 2 min 以甩干柱子; 这一步对确保下步中得到最理想的洗脱条件是至关重要的。

(10) 把柱子套在 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 65°C 预热的 TE(pH 8.5) 至柱子的膜中央, 室温下放置 5 min。

(11) 室温下, 10 000 \times g 离心 1 min 从柱子上洗脱出 DNA。

1.3.3 肠道微生物总 DNA 的电泳检测 以水作为空白对照, 取水和产物各 5 μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像仪(Tanon 4100, 上海天能仪器厂)检测照相。

1.3.4 肠道微生物总 DNA 的 16S rDNA PCR 扩增参照 Huws 等(2007)的方法, 引物序列分别为:

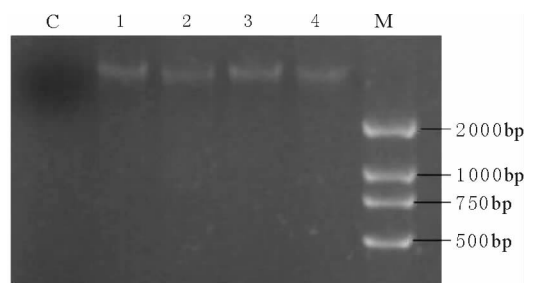
上游引物: U968 - GC: CGCCCGGGGCGCGC-CCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAA-GAACCTTAC; 下游引物: R1401: CGGTGTGTA-CAAGACCC; 委托上海生物工程公司合成。PCR 扩增体系 25 μL , 引物各 0.5 μL , 缓冲液 2.5 μL , 模板 0.5 μL , dNTP 0.5 μL , Taq 酶 0.5 μL 以灭菌超纯水补足 25 μL 。反应条件: 95°C 预变性 5 min, 35 个循环(94°C 、20s; 56°C 、20s; 68°C 、40s), 最后 68°C 延伸 7 min。

1.3.5 扩增产物检测 取 PCR 产物 5 μL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像仪检测。

2 结果

2.1 肠道细菌总 DNA 检测结果

4 组样品的 DNA 提取物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 显示。空白对照组无条带, 各组样品总 DNA 在 25 kp 左右, 每组样品条带明亮、清晰、整齐、无降解现象, 提取效果较好。表明所提取 DNA 样品溶液清亮, 可用于后续试验研究。



C: 空白对照; M: 引物; 1~4: 样品

图 1 鲫肠道微生物总 DNA 琼脂糖电泳结果

C: Control; M: Marker; 1~4: Sample

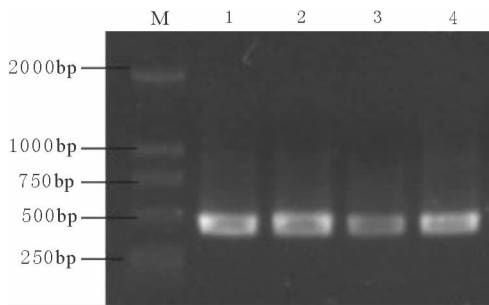
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA from *C. auratus* intestinal tract bacteria

2.2 PCR 扩增产物检测结果

以提取得到的细菌总 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 如图 2 所示。由细菌通用引物扩增出的各组 DNA 样品 16S rDNA 特异性较好, 大小在 450 bp 左右, 显示图谱清晰, 扩增效果较好。

3 讨论

鱼类肠道微生物区系在其健康方面扮演非常重要的角色。因此, 调控鱼类消化道微生物区系对提高鱼类的生产性能和饲料利用率, 减少病原菌在肠道内的定植具有重要的意义。



M: 引物; 1~4: PCR 产物

图2 PCR产物琼脂糖电泳结果

M: Marker; 1~4: PCR product

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of PCR products

肠道正常菌群常用的研究方法是传统的细菌纯培养法,然后通过生理生化性状、特定的表型进行分析,但以上方法都局限于从培养基中分离得到微生物。随着分子生物学技术的发展,纯培养日益显出局限性:(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(冯仰廉,2004)。例如:水环境中的可培养菌低于1%,鱼体表的可培养微生物更不足0.01%,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(Sugita et al, 1985; Bernadsky & Rosenber, 1992; Amann et al, 1995)。由此不难推断,常规培养法无法获取鱼类消化道菌群的全面信息,并且在时间和金钱上消耗比较大。随着科技的发展,大量分子生物学技术应用于肠道微生物生态学的研究中,但多数研究还是沿用传统的DNA制备方法提取肠道微生物总DNA;该技术不仅步骤复杂,而且样品需要量大,难以快速处理大量标本。相对于人、反刍动物和一般的家畜而言,水产动物肠道短而结构简单,所能取得的肠道微生物DNA样品较少,因而传统的DNA制备方法不适用于水产动物肠道微生物多态性的研究。

在本实验过程中,采取多种方法去除杂质和抑制剂,如在细菌裂解前使用无菌PBS对样品进行反复清洗、差速离心,去除样品中较大的颗粒杂质;使用细菌DNA提取试剂盒独特的硅胶柱提取纯化,得到的肠道细菌总DNA样品纯度高,可满足操作要求。张雪艳和李琳琳(2007)在提取人体肠道菌群总DNA时,采取了多次提取DNA的方法,以保证结果的可靠性;杨德君等(2006)采用试剂盒法提取兔子肠道微生物总DNA,但增加了耐酸玻璃过滤漏斗处理样品的步骤,以保证DNA的纯度。在本实验中,样品进行必要的前处理后,可直接用试剂盒提取

肠道微生物总DNA。这可能是由于人和陆生动物肠道结构复杂,食性相对而言也比较复杂,采集样品所含杂质比较多,必须要经过多次提取和过滤来保证样品的纯度,才能确保后续试验的顺利进行。

参考文献:

- 冯仰廉. 2004. 反刍动物营养学[M]. 北京:科学出版社:114-130.
- 宋增福,吴天星. 2007. 鱼类正常菌群的研究进展[J]. 水产科学, 26(8):273-278.
- 杨德君,吴襟,刘毅,等. 2006. 一种快速提取肠道微生物总DNA的方法[J]. 中国微生态学杂志, 18(2):91-93.
- 张雪雁,李琳琳. 2007. 一种提取肠道细菌总基因组DNA的方法[J]. 新疆医科大学学报, 30(7):722-724.
- Aann R I, Ludwig W, Scheifer K H, et al. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 59(1):143-169.
- Bernadsky G, Rosenber E. 1992. Drag 2 reducing properties of bacteria from the skin mucus of the cornetfish (*Fistularia commersonii*) [J]. Microbial Ecology, 24: 63-74.
- MacDonald N L, Stark J R, Ausin B. 1986. 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, 35: 107-111.
- Rondon M R, August P R, Bettermann A D, et al. 2000. Cloning the soil Metagenome; a strategy for accessing the genetic and functional diversity of un cultured microorganisms [J]. Appl Environ Microbiol, 66: 2 541-2 547.
- S A Huws, J E Edwards, E J Kim, et al. 2007. Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems[J]. Journal of Microbiological Methods, 70(3): 565-569.
- Sugita H, Tokuyama K, Deguchi Y. 1985. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Sar other nodonniloticus* [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 51: 1 325-1 329.
- Ward D M, Weller R, Bateson M M, et al. 1990. 16S rDNA sequence reveal numerous uncultured microorganisms in a nature community[J]. Nature (London), 345: 63-65.
- Weidner S, Arnold W, Puhler A, et al. 1996. Diversity of uncultured microorganismss association fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes [J]. Appl Environ Microbiol, 62: 766-771.
- Yu Z, Morrison M. 2004. Improved extracti on of PCR2 quality community DNA from digesta and fecal samp les[J]. Bio-Techniques, 36: 808-812.

Genomic Total DNA Extraction from *Carassius auratus* Intestinal Microorganism

WANG Ming, LIU Jun, CHEN Ai-jin, ZHAO Sheng-jun, HUANG Feng, LIU Li-he

(Hubei key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science,
Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Total DNA of intestinal tract bacteria from *Carassius auratus* intestinal were extracted to investigate intestinal microflora. Taking the intestinal substance of fish as sample to precipitate bacteria through PBS cleaning and centrifuge. Using Bacterial DNA Kit to extraction intestinal tract bacteria total DNA, subsequently used as templates in PCR. The electrophoresis implied that the banding – patterns of different samples were bright and non-degeneration phenomenon. The 16S rDNA was amplified from these DNA samples through a set of bacteria – specific primers, obtained the clear atlas and neatly bands. It is indicated that using this method to extract intestinal tract microflora DNA of fish is simple, accurate and feasible.

Key words: *Carassius auratus*; Enterobacteria; DNA extraction