

· 研究简报 ·

## 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析

王轶南 朱世伟 常亚青\*

(大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点实验室, 116023)

**摘 要** 采用基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱技术对黄海北部刺参养殖池塘(底泥、海水)及刺参肠道的菌群组成进行了初步分析。结果显示,从刺参肠道、底泥及海水样品分别获得 41、31 及 41 条扩增条带,其中优势条带分别为 12、9 及 10 条;三者具 20 条共有条带,其中 4 条为各样品的优势条带,共有条带在各样品中的丰度不同;三者分别具 5、2 及 13 条特异条带,其中肠道中的第 34、42 条带以及海水中的第 25、46 条带丰度均较高;肠道与底泥的菌群组成相似性系数(戴斯系数)为 77.8%,二者与海水菌群组成的相似性系数分别为 65.9%和 55.6%。

**关键词** 刺参 *Apostichopus japonicus* 肠道 养殖池塘 菌群 PCR-DGGE 指纹图谱  
中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2010)03-0119-04

### PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Apostichopus japonicus*

WANG Yi-nan ZHU Shi-wei CHANG Ya-qing\*

(Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, 116023)

**ABSTRACT** The bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Apostichopus japonicus* cultured at Zhuanghe, Dalian was primarily analyzed with 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint. The results showed that 41, 31 and 41 bands were observed in the PCR-DGGE fingerprint of intestine, sediment and seawater, with 12, 9 and 10 dominant bands respectively. 20 bands different in abundance were shared by intestine, sediments and seawater, and 4 of them were dominant bands in each sample. 5, 2 and 13 special bands appeared in each sample, in which band 34, 42 from intestine and band 25, 26 from water were with higher amount than the others. Similarity between the intestine and sediment was 77.8%, while 65.9% was defined between the intestine and seawater and 55.6% between the sediment and seawater.

**KEY WORDS** Sea cucumber *Apostichopus japonicus* Intestine Aquaculture pond  
Bacterial community PCR-DGGE fingerprint

刺参 *Apostichopus japonicus* 又称仿刺参,是我国北方辽宁、山东、河北等地主要的养殖品种之一。目前

国家科技支撑计划(2006BAD09A01)、国家高技术研究发展计划(2006AA10A411)、辽宁省重大科技攻关项目(2006203003)和大连水产学院博士启动资金(SYYJ2008024)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: yqchang@dlfu.edu.cn, Tel: (0411)84762695

收稿日期: 2009-09-06; 接受日期: 2009-11-20

作者简介: 王轶南(1980-), 女, 博士, 主要从事水产动物病害与免疫学研究。E-mail: wangyinan@dlfu.edu.cn, Tel: (0411)84762871

刺参养殖环境恶化,病害频发等问题已逐渐引起养殖户和研究学者的广泛关注。良好的环境条件是刺参健康生长的必备条件,而作为养殖池塘生物群落的重要组成部分,水体及沉积物中的微生物可以作为衡量环境优劣的指标(Hans *et al.* 2003)。同时,因刺参底栖并以沉积物为食的生活习性,细菌在刺参的食物中占据相当大的比例(常亚青等 2004),了解刺参的肠道与养殖环境中海水、底泥的菌群结构组成及其相互作用关系具有重要意义。另一方面,现有研究显示细菌是刺参疾病的主要病原,并且同一病症往往存在多种病原(马悦欣等 2006;孟庆国等 2006;杨嘉龙等 2007;王友涛等 2008),由于传统研究方法的局限性,不同学者对同一病症的研究结论差异也较大,针对个别病原菌的相关研究对刺参病害的实际防控作用甚微,刺参发病原因的复杂性与研究手段的局限性严重制约了刺参的病害及防控研究。为推动刺参养殖环境和疾病防控的相关研究,亟待开展系统的微生物基础研究工作。

有关刺参及养殖环境微生物方面的研究较少,并且多采用传统的分离培养方法(孙奕等 1989;向怡卉等 2006),由于生态环境中仅有1%的可培养菌,有必要辅助不依赖分离培养的分子技术手段(李志勇等 2005)。因此,作者采用基于16S rDNA的PCR-DGGE指纹图谱技术研究刺参肠道及养殖池塘(底泥、海水)菌群的基本组成。目前,研究已成功构建刺参肠道与养殖池塘菌群16S rDNA的PCR-DGGE指纹图谱,并初步探讨了刺参肠道与养殖池塘菌群的相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

健康刺参采集于大连庄河某刺参养殖场,取健康刺参(2龄)10头,用无菌剪刀剪开体壁,70%乙醇清洗肠道表面后,用一次性针头划破肠道收集并混合内容物;用无菌瓶分别取刺参养殖池塘水面下40cm左右处海水1L、池底2~5cm处底泥100g。采集样品于冰盒中运送至实验室。

### 1.2 DNA提取

#### 1.2.1 水样预处理及总DNA的提取

海水在无菌操作台内经500目筛绢过滤及0.22 $\mu$ m聚碳酸酯薄膜(Millipore)真空抽滤,之后将滤膜剪碎并置于5ml离心管内,加入1ml SET缓冲液(20%蔗糖、50mmol/L EDTA、50mmol/L Tris-HCl, pH 7.6)后涡旋振荡。参考Rivera等(2003)粗提DNA并做适当修改:在上述离心管中加入90 $\mu$ l新鲜溶菌酶,恒温摇床温育1h(37 $^{\circ}$ C, 150 r/min),加入100 $\mu$ l SDS(10%)溶液及12.5 $\mu$ l蛋白酶K(20 mg/ml),继续振荡温育2h(37 $^{\circ}$ C, 150 r/min)后加入200 $\mu$ l NaCl(5 mol/L)并上下颠倒混匀,再加入100 $\mu$ l 65 $^{\circ}$ C预热CTAB, 65 $^{\circ}$ C温育20min。之后采用酚-氯仿抽提方法(罗鹏等 2006)进行DNA抽提。

#### 1.2.2 底泥及肠道内容物总DNA提取

在无菌操作台内充分混合底泥,参考Laura等(1995)、Zhou等(1996)、Miller等(1999)采用以下步骤进行DNA粗提:取底泥或肠道内容物1g加入3ml DNA抽提缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 1% PVPP, 1% CTAB)及0.6g玻璃珠(400 $\mu$ m),涡旋振荡3min后加入溶菌酶(终浓度20mg/ml),恒温摇床温育40min(37 $^{\circ}$ C, 225 r/min),加入蛋白酶K(20mg/ml)10 $\mu$ l及SDS(终浓度2%),温育1h(37 $^{\circ}$ C, 225r/min)后,离心(6 000 $\times$ g, 10min),收集上清。之后加入200 $\mu$ l NaCl(5 mol/L)并上下颠倒混匀,再加入100 $\mu$ l 65 $^{\circ}$ C预热CTAB, 65 $^{\circ}$ C温育20min。DNA抽提同1.2.1。

### 1.3 16S rDNA V3区扩增

以上述所得DNA为模板,采用细菌16S rDNA V3区特异引物F357(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG)和R518(5'-ATTACCGCGTCTGCTGG)分别进行扩增(Li *et al.* 2007),并在F357 5'端加入长为40bp的富含GC的片段(Holben *et al.* 2004; Li *et al.* 2007)。PCR体系:引物F357-GC和R518各20 pmol, DNA模板1 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ l, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25mmol/L dNTP, 1.5U Taq酶,加ddH<sub>2</sub>O补足至50 $\mu$ l。反

应条件:95℃预变性 2 min,然后 94℃变性 30s,52℃退火 30 s,72℃延伸 90s,进行 30 个循环且每一循环在延伸处增加 1s,最后 72℃延伸 5 min。扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

#### 1.4 DGGE 指纹图谱建立及分析

DGGE 指纹图谱构建采用 D Code System (Bio-Rad)按下列条件进行:8%的聚丙烯酰胺,变性剂浓度范围为 30%~60%,上样量为 15 $\mu$ l,电压 75V,温度 60℃,电泳时间 15h。银染,UVP 凝胶系统成像后采用软件 BandScan 5.0 分析。

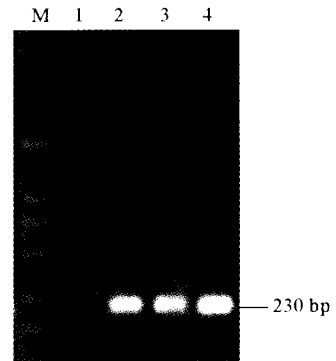
## 2 结果

### 2.1 细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

刺参肠道内容物、养殖池底泥及海水总 DNA 经细菌 16S rDNA V3 区特异性引物 PCR 扩增后,分别得到单一明显的扩增片断,大小约 230bp 左右(图 1),阴性对照无条带。

### 2.2 细菌 16S rDNA V3 区特征片段 DGGE 指纹图谱分析

上述扩增产物经聚丙烯酰胺变性梯度凝胶电泳后得到清晰的 DGGE 电泳图(图 2-A)。软件分析电泳图并以模式图反映 DGGE 指纹图谱(图 2-B):刺参肠道、池塘底泥及海水共获得 57 个不同的扩增条带,分别具 41、31 和 41 条扩增条带以及 12、9 和 10 个优势条带;三者有 20 个共有条带,其中第 5、9、15、26 条带同时是各样品的优势条带;共有条带在各样品中的丰度大多不同,其中第 18、19、26、32 等的丰度差异较为显著;三者分别具 5、2 和 13 个特异条带,其中肠道中的第 34、42 以及海水中的第 25、46 条带丰度均较高。用戴斯系数  $C_s$  (Dice coefficient)计算各样品相似性(刘新春等 2005), $C_s=2j/(a+b)$ ( $j$  是样品 A 与 B 间相同的条带。 $a$  和  $b$  分别是各自的条带数),可知肠道与底泥的菌群组成相似性系数(戴斯系数)为 77.8%,二者与海水菌群组成的相似性系数分别为 65.9%和 55.6%(表 1)。



注:1: 阴性对照; 2、3、4: 分别为刺参肠道、池塘底泥、池塘海水  
细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物  
Note: 1. Negative control; 2. 3 and 4. PCR amplification of 16S rDNA V3 region of the bacteria from intestine of sea cucumber, sediments and seawater of the pond, respectively

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖电泳检测  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

表 1 刺参肠道及池塘底泥、海水菌群组成的相似性矩阵

Table 1 Dice coefficients by comparing the similarities of the bacterial community composition of intestine of sea cucumber, sediments and seawater

| Number | I     | S     | W     |
|--------|-------|-------|-------|
| I      | 100%  | 77.8% | 65.9% |
| S      | 77.8% | 100%  | 55.6% |
| W      | 65.9% | 55.6% | 100%  |

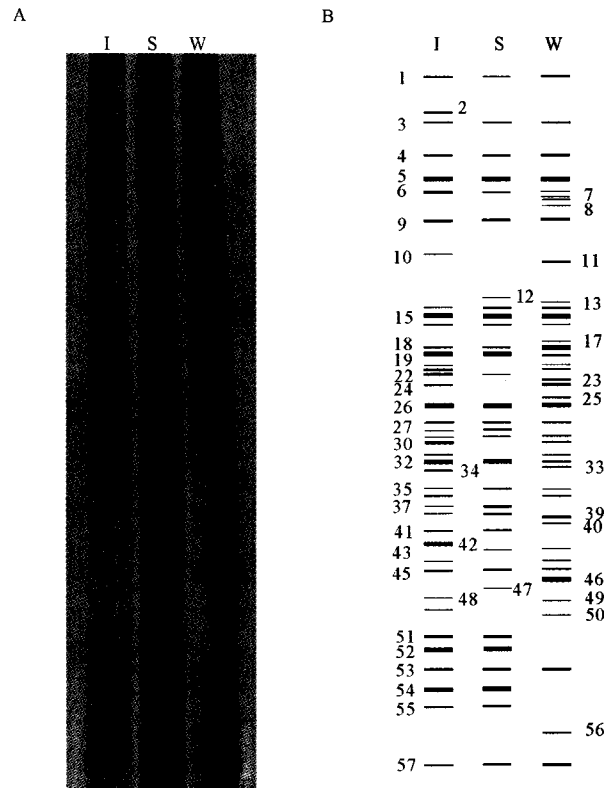
## 3 讨论

在细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱中,迁移到不同位置的条带表示不同的细菌,条带数量反映菌种的多样性,而条带亮度反映细菌的相对数量。本文结果显示,刺参肠道与养殖池塘的底泥、海水中均存在丰富菌群,并且优势菌种的数量较多。孙奕等(1989)通过细菌分离培养曾于刺参肠道及栖息地底泥中获得分属 13 个菌属的 200 余株细菌,多样性较高,但其中是否有相同的菌种以及共有多少菌种并未确定。

刺参肠道与养殖池塘底泥、海水具有 20 种共有菌种,并分别具 5、2 及 13 种特异菌种,三者的菌种组成有较强的相关性和明显的特异性。其中海水中的特有菌种数量最多,而肠道及底泥仅具有少数的特有菌种,大部分菌种都来源于海水。刺参肠道与底泥的菌群组成较为相近,符合刺参底栖并以沉积物为食的习性,以往研究

也发现刺参肠道的优势菌群同样是海藻和海泥中的常见菌群(孙奕等 1989)。然而,底泥与刺参肠道中的菌群仍存在较大差异。海泥中的芽孢杆菌属细菌在刺参肠道中极少发现,而海泥中一些罕见的细菌类群如柄杆菌属可在后肠定居富集,反映了机体对微生物具有调节控制作用(孙奕等 1989)。凡纳滨对虾养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 图谱显示,凡纳滨对虾肠道样品中出现的条带绝大多数会在水样中出现,即在肠道中出现的细菌绝大多数可以从水环境中找到来源。同时,肠道与外界水环境存在差异,说明宿主本身对肠道细菌菌落组成具有一定的决定作用(罗鹏等 2006),与本文研究结果相同。

在刺参养殖系统菌群组成的研究中,共有菌种尤其是丰度存在明显差异的菌种以及各自的特异菌种可能是了解刺参养殖营养摄食、揭示刺参与环境菌群组成之间的相互联系的关键点。在下一步的工作中,我们将进一步通过分子克隆、菌种鉴定等步骤确定刺参肠道、池塘底泥、海水的菌群组成,进而为刺参养殖环境调控、病害防治、微生态制剂应用等提供资料。



A: 变性梯度凝胶电泳图谱; B: 模式图 (I: 刺参肠道, S: 底泥, W: 海水)

Note: A: Denaturing gradient gel electrophoresis; B: Schema chart,

I: Intestine of sea cucumber; S: Sediments; W: Seawater

图2 刺参肠道及池塘底泥、海水菌群 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 图谱  
Fig. 2 PCR-DGGE profiles of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from intestine of sea cucumber, sediments and seawater

## 参 考 文 献

- 马悦欣,徐高蓉,张恩鹏,王品虹,常亚青. 2006. 仿刺参幼参急性口围肿胀症的细菌性病原. 水产学报, 30(3): 377~342
- 王友涛,王印庚,张国兵,陈霞. 2008. 几种消毒剂对养殖刺参“腐皮综合征”主要致病菌杀灭试验的研究. 海洋水产研究, 29(6): 90~94
- 向怡卉,苏秀榕,董明敏,张聪,林叶. 2006. 海参细菌的分离鉴定和生长特性研究. 中国食品学报, 6(1): 25~29
- 孙奕,陈弼. 1989. 刺参体内外微生物组成及其生理特性的研究. 海洋与湖沼, 20(4): 300~307
- 李志勇,何丽明,吴杰,陈集杰. 2005. 基于 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内优势细菌组成分析. 微生物学通报, 32(3): 82~86
- 杨嘉龙,周丽,邢婧,战文斌. 2007. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析. 中国水产科学, 14(6): 981~990
- 孟庆国,吴刘记,吴信忠,杨建波. 2006. 养殖刺参溃疡病病原学研究. 水产科学, 25(12): 635~639
- 罗鹏,胡超群,谢珍玉,张吕平,任春华,许允厚. 2006. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析. 热带海洋学报, 25(2): 49~53
- 常亚青,丁君,宋坚,杨威. 2004. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 113~192
- Hans, W. P., Julianne, D., Pia, H. M., and Rachel, T. N. 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. FEMS Microbiol. Ecol. 46: 233~246
- Holben, W. E., Feris, K. P., Kettunen, A., and Apajalahti, J. H. A. 2004. GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 70(4): 2 263~2 270
- Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V., and Shimkets, L. J. 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. Appl. Environ. Microbiol. 61(3): 1 141~1 143
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. I., and Chiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol. 65(11): 4 715~4 724
- Rivera, I. N. G., Lipp, E. K., Gil, A., Choopun, N., Huq, A., and Colwell, R. R. 2003. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environ. Microbiol. 5(7): 599~606
- Zhou, J., Bruns, M. A., and Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62(2): 316~322