

张 璠,李德茂,周雨霞. 虾夷马粪海胆不同肠道中菌群组成及其 PCR - DGGE 图谱分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):43-45.

# 虾夷马粪海胆不同肠道中菌群组成及其 PCR - DGGE 图谱分析

张 璠<sup>1,2</sup>, 李德茂<sup>2</sup>, 周雨霞<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 内蒙古呼和浩特 0100182;

2. 中国科学院天津工业生物技术研究所工业系统与过程工程重点实验室, 天津 300308)

**摘要:**利用细菌 16S rDNA PCR - DGGE 指纹图谱技术,对虾夷马粪海胆不同肠道的微生物菌群组成进行分析,结果表明:海胆小肠与大肠样品分别得到 14 条与 13 条条带,其中,共有条带为 10 条,优势条带分别为 7 条与 5 条,特异性条带分别为 4 条与 3 条;经后续条带比较分析和 DGGE 图谱割胶测序后发现,小肠与大肠样品中微生物主要来源于外界海水环境,其菌群构成存在差异与虾夷马粪海胆消化巨藻存在不同有关。

**关键词:**虾夷马粪海胆;肠道;16S rDNA;PCR - DGGE 指纹图谱

**中图分类号:** S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302(2014)09 - 0043 - 02

近年来,随着化石燃料资源日趋减少及空气污染问题逐渐加重,可再生能源已成为世界研究热点。藻类具有资源丰富、生长迅速等优势,是一种重要的潜在生物质能源资源<sup>[1]</sup>;但是,藻类细胞壁结构复杂且难以降解<sup>[2]</sup>,大大阻碍了藻类胞内生物能向化学能的转变<sup>[3]</sup>,因此生产中迫切需要一种成本低廉且高效降解巨藻的方法。虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)喜食藻类,可利用肠道微生物水解酶来水解结构致密且多层的藻类细胞壁,达到释放藻类细胞内容物并吸收营养物质的目的<sup>[4]</sup>,这类生物降解一般需要多种微生物协同完成,绝非一个简单过程。虾夷马粪海胆肠道结构复杂,紧贴于体腔壁难以剥离,因此关于其肠道中微生物构成及功能的研究甚少<sup>[5]</sup>。本试验采用 PCR - DGGE 技术,以 16S rDNA 作为分子标记,对海胆不同肠道的微生物菌群组成进行分析,探究不同海胆肠道微生物在巨藻(*Macrocystis pyrifera*)消化过程中的关系,为海胆肠道菌群动态研究,以及体外模拟海胆肠道微生物降解巨藻以提高其胞内物质的化学能利用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 原料 虾夷马粪海胆购买于大连太平洋海珍品有限公司;巨藻采购于青岛明月海藻集团有限公司。

1.1.2 主要试剂 TIANamp Stool DNA Kit,由天根生化科技有限公司生产;UNI-Q-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒,由上海生工生物工程有限公司生产;大量 DNA 产物纯化试剂盒,由天根生化科技有限公司生产。

### 1.2 样品的处理

取形态大小正常且均一的健康海胆 10 只,在超净工作台

上用 70% 乙醇清洗海胆表面 3 次;使用无菌剪刀由海胆排泄孔方向环形剪开,用手术刀轻轻剥离海胆性腺与内脏,将肠道完全剥离到无菌的工作盘中并清楚分段;取小肠液与大肠中的食物残渣,装入 2 mL 无菌离心管中备用。

### 1.3 肠道 DNA 的提取

使用 TIANamp Stool DNA Kit 提取海胆大肠微生物 DNA。

### 1.4 16S rDNA V3 区的扩增

以提取的海胆大肠微生物 DNA 为模版,进行 16S rDNA V3 区的扩增,PCR 体系:引物 357F - GC - clamp (5' - CGC - CGCGCCGCCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCTAC GGGAGGCAGCAG - 3')、518R(5' - ATTACCGCGCTGCTGG - 3')各 1  $\mu$ L,依次加入浓度为 25  $\mu$ mol/ $\mu$ L 的 dNTP 5  $\mu$ L、5  $\times$  buffer 10  $\mu$ L、1 mmol/ $\mu$ L 的  $Mg^{2+}$  3  $\mu$ L、Taq 酶 0.5  $\mu$ L,并加入 28.5  $\mu$ L 无菌水至 50  $\mu$ L。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,50  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min;72  $^{\circ}$ C 3 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳检验。

### 1.5 DGGE 指纹图谱的构建

使用 D Code 2000 System (Bio - Rad) 进行 PCR - DGGE 电泳。变性凝胶制备电泳条件为:10% 聚丙烯酰胺,浓度范围在 30% ~ 55%;上样量为 20  $\mu$ L,电压 65 V,温度 60  $^{\circ}$ C,电泳时间 16 h。染色方法为银染。

## 2 结果与分析

### 2.1 海胆肠道中细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

将从海胆大肠、小肠中提取的微生物总 DNA 进行 16S rDNA V3 区 PCR 扩增,在 230 bp 左右处可见清晰且单一的条带(图 1)。这表明经扩增后的 16S rDNA V3 区片段纯度符合 PCR - DGGE 要求,可以利用 16S rDNA V3 区片段作为分子标记构建 DGGE 图谱。

### 2.2 16S rDNA V3 区 DGGE 指纹图谱的构建与海胆肠内细菌组成分析

由图 2、表 1 可见,海胆小肠与大肠样品细菌总 DNA 由 16S rDNA V3 区扩增后经 PCR - DGGE 电泳,分别得到 14 条

收稿日期:2013 - 11 - 22

基金项目:国家“863”计划(编号:2012AA052103);天津市科技支撑计划(编号:12ZCZDSFO2000、12ZCZDSY12300)。

作者简介:张 璠(1989—),女,天津人,硕士,从事兽医微生物研究。

E - mail:532637158@qq.com。

通信作者:李德茂。E - mail:zhangfan89@163.com。

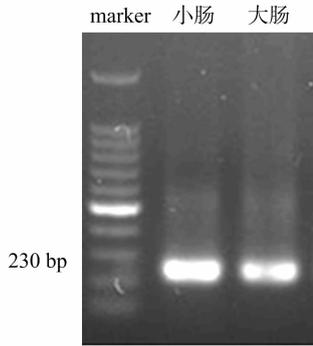


图1 海胆大肠、小肠16S rDNA PCR扩增产物琼脂糖电泳图

与13条条带,两者条带总数较为单一;海胆小肠样品优势条带为7条,分别为X1~X4、X7、X10和X14,其中,5种为海洋嗜冷单胞菌属(*Psychromonas* sp.)细菌,2种为希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)细菌;大肠样品优势条带为5条,分别为D1~D4、D12,其中,4种属于嗜冷单胞菌属细菌,1种为希瓦氏菌属细菌;海胆小肠与大肠中特异性条带分别为X5~X7、X9和D5、D6、D9,其中,小肠中3条条带为海洋嗜冷单胞菌属,1个为希瓦氏菌属,而大肠中特异条带均为希瓦氏菌

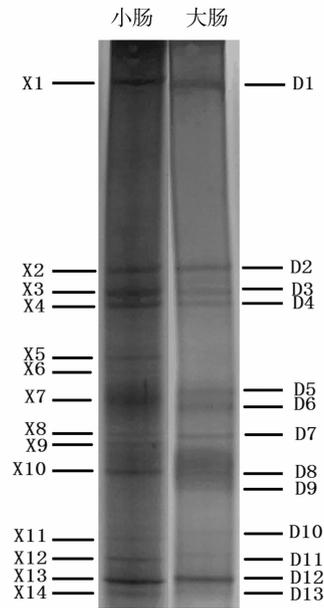


图2 海胆小肠与大肠中微生物的PCR-DGGE图谱

属菌。这说明海胆不同肠道中微生物类群组成存在差异。

表1 小肠 DGGE 条带聚类分析结果

部位	条带号	细菌种类	相似度(%)	登录号
小肠	X1~X5、X8、X9、X14	海洋嗜冷单胞菌属( <i>Psychromonas</i> sp.)	94~97	NC_020802.1
	X6	非培养细菌( <i>Uncultured bacterium</i> )	—	—
	X7、X10~X13	希瓦氏菌属( <i>Shewanella</i> sp.)	100	NC_008577.1
大肠	D1~D4、D7、D13	海洋嗜冷单胞菌属( <i>Psychromonas</i> sp.)	94~98	NC_020802.1
	D5、D6、D8~D12	希瓦氏菌属( <i>Shewanella</i> sp.)	99	NC_008577.1

### 3 结论与讨论

海胆体腔为一个相对密闭的空间,正常海胆体内微生物数量远少于外界环境<sup>[6]</sup>,同时,PCR-DGGE过程存在技术限制,不同微生物DNA可能会发生条带共迁移,低丰度的菌群较难检测出来<sup>[7]</sup>,造成DGGE图谱条带数量较少。这一现象与虾夷马粪海胆体腔中微生物研究结果较为相似。

海洋嗜冷单胞菌属微生物在海水中普遍存在,可分泌嗜冷酶<sup>[8]</sup>,这类酶最适反应温度较低,可长时间维持稳定的活性且作用广泛。目前,已从海水中分离出具纤维素酶与脂肪酶活性的嗜冷酶<sup>[9]</sup>,而纤维素与脂肪同样也是巨藻的主要营养成分<sup>[10]</sup>。虾夷马粪海胆中海洋嗜冷单胞菌属微生物的出现,在一定程度上也说明海洋嗜冷单胞菌属微生物在海胆消化巨藻过程中起到不可忽略的作用。希瓦氏菌属微生物常在皱纹鲍及海虾等海洋生物中被发现<sup>[11-12]</sup>,该菌属中某些细菌可分泌多糖类与多不饱和脂肪酸等物质,为海洋生物提供营养<sup>[13]</sup>,并在海洋动物生长过程中与肠道内的有害微生物形成拮抗关系<sup>[14]</sup>,起到抑制病原菌生长、提高机体免疫力的作用。因此,从试验结论看,海胆肠道菌中的海洋嗜冷单胞菌属和希瓦氏菌属有可能来源于海洋环境,并在海胆消化巨藻及生长发育过程中起到重要作用。

海胆肠道中,小肠优势菌群数量比大肠丰富,这可能是由于在海胆消化过程中,食物首先经过小肠,造成大部分附着在

食物上的微生物随之进入小肠所致。在试验过程中,某些小肠样品DGGE图谱条带在大肠样品中观测不到,这一结果与海参肠道的研究<sup>[15]</sup>相似,这也说明了海胆肠道对微生物具有一定的选择调节作用。另外,小肠中的海洋嗜冷单胞菌属菌相对大肠来说,为主要的特异菌群,其对巨藻的降解能力较强,可能对巨藻前期消化起到一定作用;大肠中的特异菌群为希瓦氏菌属菌,可有效帮助海胆体进一步吸收营养物质,并抑制大肠中有害微生物的产生。

总之,海胆肠道微生物是在进食过程获得,通过机体自身作用对肠道微生物进行选择与调节达到菌群的动态平衡,并利用相对密闭的体腔空间来维持肠道内微生物数量的稳定。在海胆消化过程中,不同肠道中的微生物消化分工有所不同,小肠中海洋嗜冷单胞菌属菌对巨藻进行前期消化,大肠希瓦氏菌属菌对巨藻营养进行吸收调节。海胆肠道中微生物群类差异与海胆肠道功能密切相关,其优势微生物差异性将是了解海胆摄食、揭示肠道微生物协同降解巨藻机理的关键所在。

#### 参考文献:

- [1]肖波,周英彪,李建芬. 生物质能循环经济技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [2] Drews G, Weckesser J. Function, structure and composition of cell walls and external layers [Algae, cyanobacteria][J]. Botanical monographs, 1982, 19(1): 28-29.

李晓君,王绍梅,谢艳兰,等. 农杆菌渗透法转化烟草条件的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):45-47.

# 农杆菌渗透法转化烟草条件的优化

李晓君,王绍梅,谢艳兰,和 敏

(临沧师范高等专科学校农学系,云南临沧 677000)

**摘要:**植物瞬时表达系统常用于研究基因表达产物的亚细胞定位和蛋白间的互作,将 GFP-GUS 融合蛋白植物表达载体导入农杆菌 EHA105,获得工程菌,制备不同浓度的农杆菌浸染液,用注射法对烟草叶片进行转化,荧光显微镜检测烟草叶片原生质体和下表皮中 GFP 的表达情况。结果表明,浸染注射液的  $D_{600\text{nm}}$  在 0.3~0.7 之间均具有较高的转化效率,注射后第 4 天至第 6 天为较佳观察时间。

**关键词:**植物瞬时表达系统;渗透法;转化;农杆菌渗透注射;烟草;绿色荧光蛋白(GFP)

**中图分类号:** S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0045-03

植物瞬时表达系统常用于基因产物的亚细胞定位、蛋白间互作、转录因子与启动子之间的互作、启动子分析等方面的研究<sup>[1-2]</sup>。植物瞬时表达系统中外源基因的导入方法有植物病毒介导法、PEG 法、电击法、基因枪法和农杆菌渗透法<sup>[2]</sup>。农杆菌渗透法是一种比较简便的方法,通过将植物表达载体导入农杆菌,用真空法或注射法将农杆菌导入植物细胞,使得农杆菌 Ti 质粒上的 T-DNA 区整合到植物基因组中,T-DNA 区的目标基因培养几天后即可得到表达<sup>[3]</sup>。较其他方法而言,农杆菌渗透法具有转化效率高、基因表达在完整活体内进行、可携带较大片段的目的基因等优点<sup>[2]</sup>。原生质体是观察基因瞬时表达情况的优选材料,传统的原生质体转化方法首先要制备高浓度、高质量的质粒,经过从植物活体材料中分离纯化原生质体,在 PEG 的介导下将质粒 DNA 导入原

生质体,进行原生质体培养后再检测目标基因的表达情况<sup>[4]</sup>。用该方法转化后的原生质体敏感、易破裂,使得阳性细胞检出率低,不利于观察。以农杆菌渗透法转化材料提取原生质体,可缩短从原生质体提取到观察的时间,原生质体完整,镜检阳性率高。本研究在 Sparke 等的研究基础<sup>[5]</sup>上简化了农杆菌注射液的制备和注射过程,通过荧光显微镜观察注射区域下表皮和原生质体中绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况,检测不同注射浓度下和注射后不同时间的转化效率,总结出一种高效简易的农杆菌渗透注射转化烟草的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 植物材料 将普通烟草(*Nicotiana tabacum*)种子播撒在育苗盘中,2周后移至小花盆,5~6周后即可作为转化受体。

1.1.2 菌种和质粒 农杆菌 EHA105 为临沧师范高等专科学校农学系植物生理实验室保存,植物表达载体 pCAM-BIA1304 图谱如图 1(空载体表达 GFP-GUS 基因,亚细胞定位特点:胞质<sup>[6]</sup>)所示。

收稿日期:2013-11-25

基金项目:临沧师范高等专科学校高层次人才引进科研启动项目(编号: LXJ2012); 临沧师范高等专科学校校级课题(编号: LCSZL2013001)。

作者简介:李晓君(1985—),女,云南临沧人,博士,讲师,主要从事植物生物技术与种质创新研究。E-mail: lxj-148@163.com。

[3] Ke J, Laskar D D, Singh D, et al. In situ lignocellulosic unlocking mechanism for carbohydrate hydrolysis in termites: crucial lignin modification[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 1-12.

[4] Ziegler A, Mooi R, Rolet G, et al. Origin and evolutionary plasticity of the gastric caecum in sea urchins (Echinodermata: Echinoidea)[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(6): 313.

[5] 李伟,张付云,孙秋颖,等. 海胆及其共附微生物的活性物质研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(9): 202-206.

[6] 王轶南,刘艳萍,常亚青. 患病与健康虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体腔液菌群的 PCR-DGGE 分析比较[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(1): 111-116.

[7] 刘丹,凌云. PCR-DGGE 实验过程中常见问题的分析与改进[J]. *湖南农业科学*, 2010, 24(24): 26-27.

[8] 王玢,汪天虹,张刚,等. 产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究[J]. *海洋科学*, 2003, 27(5): 42-45.

[9] 郝建华,孙谧,王跃军,等. 产脂肪酶海洋嗜冷菌的鉴定及酶学性质研究[J]. *高技术通讯*, 2008, 18(7): 748-753.

[10] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京:科学出版社,1997.

[11] 罗璋. 斑点叉尾鮰肠道益生菌的筛选与特性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

[12] 冷晓飞,姜海峰,刘小林,等. 皱纹盘鲍肠道菌群组成及 PCR-DGGE 指纹图谱分析[J]. *海洋科学*, 2013, 37(5): 10-14.

[13] Weiner R M, Walch M, Labare M P, et al. Effect of biofilms of the marine bacterium *Aeromonas colwelliana* (LST) on set of the oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *C. virginica* (Gmelin, 1791)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 1989, 8(1): 117-123.

[14] Vinderola G, Matar C, Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: Involvement of Toll-like receptors[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12(9): 1075-1084.

[15] 孙奕,陈驊. 刺参体内微生物组成及其生理特性的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1989, 20(4): 300-307.