

文章编号: 1004-7271(2006)03-0257-07

利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方鲀的 弧菌菌落组成

杨桂梅¹, 唐文乔¹, 李会荣², 黄路标³, 任大明³, 鲍宝龙¹

1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;
2. 中国极地研究中心国家海洋局极地科学重点实验室, 上海 200136;
3. 复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要 采用 16S rDNA 特征序列 PCR-DGGE 法, 分析了不同饵料饲养的暗纹东方鲀的表皮、性腺和肠道中, 以弧菌为主的细菌群落的组成。结果表明 (1) 共鉴定出暗纹东方鲀体内 18 种微生物, 均归属于变形细菌的 gamma 亚群, 其中 13 种为弧菌科细菌, 3 种为肠杆菌科细菌, 2 种为气单胞菌属细菌 (2) 投喂鲜活鱼虾的与投喂人工配合饲料的暗纹东方鲀肠道和性腺中的细菌组成是不同的, 在性腺中分离到的所有 12 种细菌中, 只有 2 种细菌是相同的, 约占 17%; 在肠道中分离到的所有 13 种细菌中, 有 4 种是相同的, 约占 31%。而在表皮上所分离到的 11 种细菌中, 有 7 种细菌是相同的, 约占 64% (3) DGGE 特征条带 V1、V13、V18、V14 和 V17 所代表的细菌只在表皮组织被分离到, V6 所代表的细菌仅出现在以鲜活鱼虾作为饵料的暗纹东方鲀性腺中, V5 所代表的细菌仅出现在以鲜活鱼虾作为饵料的暗纹东方鲀肠道中 (4) DGGE 特征条带 V5、V8、V13、V18、V6、V14 和 V17 所代表的细菌不能在 TCBS 培养基上培养, 占 18 种被鉴定的细菌总数的 39%。

关键词 暗纹东方鲀, 弧菌, 16S rDNA, 变性梯度凝胶电泳, 细菌群落

中图分类号 S 917 文献标识码: A

Analysis on *Vibrio* bacterial flora in *Takifugu obscurus* by PCR-DGGE

YANG Gui-mei¹, TANG Wen-qiao¹, LI Hui-rong², HUANG Lu-biao³, REN Da-ming³, BAO Bao-long¹

1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. SOA Key Laboratory for Polar Science, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China;
3. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The bacterial flora in different tissues of puffer fish *Fugu obscurus*, which were fed with two different of kinds of food, were under research using PCR-DGGE technology. Total 18 species were identified as γ -Proteobacteria, including 13 kinds of Vibrionaceae, three kinds of Enterobacteriac and two kinds of Aeromonas. There existed difference in bacteria flora of intestine and gonad between two groups of puffer fish, which were fed

收稿日期 2006-02-26

基金项目: 上海市教委重点学科项目(Y1101), 农业部 948 项目(2004-Z44)

作者简介: 杨桂梅(1979-), 女, 江苏高邮人, 硕士研究生, 专业方向为分子生物学和发育生物学, E-mail: gmyang@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shfu.edu.cn

with two different kinds of food, one (N group) consisted of fresh fish and shrimp, another (C group) is artificial fodder. In gonads, only two same kinds of bacteria, 17 percent of total 12 species, were found in the two groups. Four kinds of bacteria, 31 percent of total 11 species in intestine, were determined as same distribution between two groups of fish. However, the members of bacteria flora on different skins were most same, sharing same as 64 percent of total 11 species. Specific bacteria represented by specific DGGE bands V1, V13, V18, V14 and V17, only appeared on the fish skin. The bacteria of V6 band only emerged in the fish gonad tissue of N group, which were fed with fresh fish and shrimp. Likewise, only in the fish intestine of N group, the bacteria of V5 band were found. 39 percent of total identified bacteria in this research could not be cultured on TCBS plate.

Key words: *Fugu obscurus*; *Vibrio* genus; 16S rDNA; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); bacterial flora

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)，俗称河鲀，是一种经济价值较高的洄游性底层鱼类，不仅因其味鲜美而具养殖价值，更重要的是富含极具医药价值的河鲀毒素(Tetrodotoxin TTX)。河鲀体内的河鲀毒素来源于寄生其体内的细菌^[1]。Noguchi 等^[2]从河鲀(*Takifugu vermicularis vermicularis*)体内分离出能产河鲀毒素的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。弧菌也是河鲀人工养殖中危害比较严重的病原菌，方苹等^[3]通过筛选鉴定，从暗纹东方鲀中分离到了霍乱弧菌、海鱼弧菌、副溶血弧菌、梅氏弧菌以及一些气单胞菌。PCR 结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis DGGE)技术是当前研究环境微生物菌落组成的主要技术手段^[4-6]。目前，国内筛选动物体内的细菌，多数仍采用通过生化特性鉴定所筛选的单菌的方法^[7]。本研究利用弧菌特异引物扩增 16S rDNA 部分特征序列结合 DGGE 分离技术，对不同饵料投喂的暗纹东方鲀的肠道、性腺和表皮的弧菌菌落组成的差异进行了比较分析。

1 材料和方法

1.1 样品采集

经两种不同饵料喂养的暗纹东方鲀均采集于江苏启东养殖场。一组是以天然饵料鲜活鱼虾饲养的暗纹东方鲀(N组);另一组是完全人工饵料饲养的暗纹东方鲀(C组)。每组各取三尾,分别打包包装,运回实验室,立即在无菌条件下分离表皮、肠道、性腺组织。将同组样品的三个个体的相同组织混合在一起,以 10 体积的无菌生理盐水洗涤各组织,收集菌体洗涤液,一部分直接用作总 DNA 抽提,一部分作菌体培养之用。

1.2 菌体培养

取 100 μ L 菌体洗涤液涂布于弧菌选择性培养基 TCBS(杭州天和公司)平板上,23 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h,收集平板上所有菌体,提取混合菌的总 DNA。

1.3 总 DNA 提取

取 1 mL 组织洗涤液或适量培养后的菌体收集液,离心(6 000 r/min, 10 min)收集细胞,加 500 μ L 裂解缓冲液(50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA, 50 mM Sucrose)重悬细胞,加入溶菌酶至终浓度 10 mg/mL, 37 $^{\circ}$ C 处理 10 min,加入 SDS 至 1%(M/V),蛋白酶 K 至 100 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 继续处理 30 min,酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,最后用不含 DNase 的 RNase A 除去 RNA。DNA 样品可直接进行 PCR 扩增。

1.4 细菌 16S rDNA 全长序列的扩增

参照 Bosshard 等^[8]的方法进行。细菌通用引物序列如下 8f :5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 和 1492r :5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3',产生相应于大肠杆菌(*Escherichia coli*)16S rDNA 序列核苷酸位置 8 到 1510 的 PCR 产物。25 μ L PCR 反应体系中,包括 2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液,

1 μL 2.5 mM dNTP, 1 U Taq 酶, 各 1 μL 6.25 mM 的上下引物, DNA 模板为 50 ng。PCR 反应经 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 进行 30 个循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用, 作为扩增弧菌 16S rDNA 片断的模板。

1.5 弧菌 16S rDNA 序列片断的扩增

弧菌 16S rDNA 特异性引物参考文献 [9] 设计。上游引物 567f 的序列: 5'-GCC GCC TGC AGC CCG CGC CCC CCG TGC CCC CGC CCC GCC GGC CCG GGC GCC GGC GTA AAG CGC ATG CAG GT-3', 下游引物 680r 序列 5'-GAA ATT CTA CCC CCC TCT ACA G-3', PCR 产物大小预计在 110 bp 左右。50 μL 反应体系包括 5 μL 10 \times PCR 反应缓冲液, 2 μL 2.5 dNTP, 2 U Taq 酶, 弧菌特异性引物各 2 μL (6.25 mM), 1 μL 细菌 16S rDNA 扩增产物作为模板。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 30 个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。3 次 PCR 反应共获得 150 μL 体积的 PCR 产物, 经 2.5 倍体积冰乙醇沉淀浓缩后, 溶解于 40 μL 无菌水, 备用作 DGGE 分离。

1.6 DGGE 分离

取 20 μL PCR 浓缩产物, 在 D-code System 电泳仪上 (Bio-Rad 公司) 进行 DGGE 电泳分离。变性梯度凝胶的浓度为 8%, 变性梯度 25% ~ 55% (7 M 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 变性)。电泳缓冲液为 1 \times TAE。在电泳温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 电压 150V 下电泳 4 h。然后, 置胶于溴乙锭染液中染色 15 min, 在紫外光下拍照记录。

1.7 弧菌 16S rDNA 的克隆和序列测定

从变性梯度凝胶上小心切下 DGGE 条带 (当不同样品的条带处于凝胶上同一位置时, 代表序列一致, 故只切割其中的一条条带), 置于 20 μL 无菌水中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 经 12 000 r/min 离心 1 min, 收集上清, 然后以此作为再次利用弧菌特异引物进行 PCR 扩增的模板。具体的 PCR 扩增体系和条件同 1.5。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 切胶纯化, 然后连接到 pMD18-T 载体上 (Takara 公司), 经转化感受态大肠杆菌菌株 Top10 后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。阳性克隆经过鉴定以后, 送上海生物工程有限公司测序。

1.8 构建系统发育树

所获得的 16S rDNA 序列经 BLAST N 在 Genbank 比对后, 挑选序列匹配最高的两种生物物的序列, 作为系统树的参考序列。用 MEGA 3 生物软件中的 NJ 法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树, 其中, bootstrap 为 1000 次重复。

2 结果

2.1 弧菌特异引物扩增 16S rDNA 特征片段 DGGE 指纹图谱

经两种不同饵料饲养的河鲀鱼组织的弧菌 16S rDNA DGGE 电泳条带分布见图 1, 不同样品所获得的可分辨条带的数目差别较大。通过对表 1 的进一步分析, 可以发现, 在以鲜活鱼虾作为饵料的河鲀肠道中未培养的混合细菌中所扩增的条带数目最多, 共计 8 条, 编号分别为 V3, V4, V5, V9, V10, V11, V15 和 V16。在以完全人工饵料饲养的河鲀性腺中,

其未培养的混合细菌中所扩增的条带数目最少, 仅为 2 条, 分别为 V10 和 V11。在以鲜活鱼虾作为饵料的河鲀三种组织中共扩增出 15 条, 包括条带 V1, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V13, V14, V15, V16

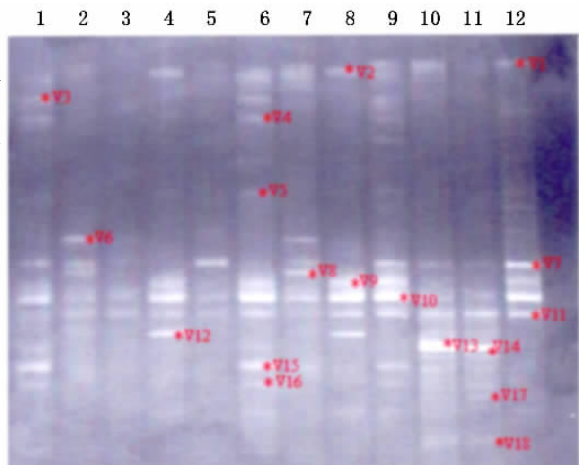


图 1 暗纹东方鲀体内细菌 16S rDNA 特征片段的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of PCR amplified with 16S rDNA specific primers from *Fugu obscurus*

未经培养: 2, 3, 6, 7, 10, 11; TCBS 培养: 1, 4, 5, 8, 9, 12; N 组: 1, 2, 5, 6, 9, 10; C 组: 3, 4, 7, 8, 11, 12; 性腺: 1, 2, 3, 4; 肠道: 5, 6, 7, 8; 表皮: 9, 10, 11, 12。

和 V18。在以完全人工饵料饲养的河鲀三种组织中共扩增出 12 条,其中包括条带 V1、V2、V6、V7、V8、V9、V10、V11、V12、V14、V17 和 V18。表皮、肠道和生殖腺中所检测到的条带数目没有大的差别,但各组织有其特异的条带,如 V1、V13、V14、V17 和 V18 为表皮组织的特异性条带,V6 为性腺组织的特异性条带,V5 为肠道组织的特异性条带。在鲜活鱼虾作为饵料的河鲀性腺组织中共有 9 条条带,在人工饵料饲养的河鲀性腺只有 5 条条带,V9 和 V10 是共有条带,在鲜活鱼虾作为饵料的河鲀肠道组织中共分离到 9 条条带,在人工饵料饲养的河鲀肠道组织中分离到 8 条条带,V7、V9、V10 和 V11 是共有条带,在鲜活鱼虾作为饵料的河鲀表皮组织中共分离到 10 条条带,在人工饵料饲养的河鲀表皮组织中分离到 8 条条带,共有的条带多达 7 条分别为 V1、V7、V9、V10、V11、V14、V17 和 V18。所有组织中未经培养的细菌分离到的条带共计 16 条,其中特异性条带为 V5、V6、V8、V13、V14、V17、V18,经 TCBS 弧菌选择性培养基选择的细菌所分离到的条带共计 10 条,其中 V2 为特异性条带。

表 1 不同饵料饲养的暗纹东方鲀各组织的 PCR-DGGE 条带

Tab.1 Specific bands of PCR-DGGE from the tissues of two groups of puffer fish fed with different foods

暗纹东方鲀 <i>Fugu obocutus</i>		以鲜活鱼虾为饵料的鱼体样品	以人工饲料为饵料的鱼体样品
性腺	未培养的混合细菌	V6, V7, V8, V10, V11	V10, V11
	TCBS 培养的细菌	V3, V4, V7, V10, V15, V16	V2, V9, V10, V11, V12
	合计	V3, V4, V6, V7, V8, V10, V11, V15, V16	V2, V9, V10, V11, V12
表皮	未培养的混合细菌	V1, V7, V10, V11, V13, V14, V18	V7, V10, V11, V14, V17, V18
	TCBS 培养的细菌	V1, V7, V9, V10, V11, V15, V16	V1, V7, V9, V10, V11
	合计	V1, V7, V9, V10, V11, V13, V14, V15, V16, V18	V1, V7, V9, V10, V11, V14, V17, V18
肠道	未培养的混合细菌	V3, V4, V5, V9, V10, V11, V15, V16	V6, V7, V8, V10
	TCBS 培养的细菌	V7, V10, V11	V2, V9, V10, V11, V12
	合计	V3, V4, V5, V7, V9, V10, V11, V15, V16	V2, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12

2.2 细菌 16S rDNA 特征序列分析

利用弧菌特异引物所扩增的 16S rDNA 特征片段,经 DGGE 分离后,18 条可分辨的条带被切割后,经过序列测定和分析,所获得的序列大小在 69 ~ 114 bp 之间。从 Genbank 中所获得的参考序列的相似性达 94% ~ 100%(见表 2)。把所有获得的 16S rDNA 序列与参考序列一起构建系统发育树,聚类结果见图 2。本研究中,根据 16S rDNA 序列所推断的细菌均归属于变形细菌(*Proteobacteria*)的 gamma 亚群,其中 10 条(V3、V4、V5、V8、V9、V10、V11、V13、V15、V16)确定为弧菌属细菌(*Vibrio*),3 条(V2、V12、V18)基本定为弧菌科细菌(*Vibrionaceae*)3 条(V6、V14、V17)为肠杆菌科细菌(*Enterobacteriac*);另外 2 条(V1、V7)为气单胞菌属细菌(*Aeromonas*)。

参照表 1 可以发现,N 组河鲀三种组织中分布的细菌主要以弧菌为主,其中 11 种为弧菌科细菌,1 种为气单胞菌属细菌。C 组河鲀三种组织中分布的细菌相对分散,其中 7 种为弧菌科细菌,3 种为肠杆菌科细菌,2 种为气单胞菌属细菌。在 N 组河鲀性腺组织中共分离到 9 种细菌,N 组河鲀性腺只分离到 5 种细菌,而且只有 V9 和 V10 代表的弧菌属细菌是相同的,占河鲀性腺中所分离到的 12 种细菌的 17%;C 组河鲀肠道组织中共分离到 9 种细菌,N 组河鲀肠道组织中分离到 8 种细菌,只有 V9、V10 和 V11 代表的弧菌属细菌和 V7 代表的气单胞菌属细菌是相同的,占河鲀肠道中所分离的所有 13 种细菌的 31%;N 组河鲀表皮组织中共分离到 10 种细菌,C 组河鲀表皮组织中分离到 8 种细菌。在表皮中所分离的共 11 种细菌中,有 7 种细菌是相同的,约占 64%。

V1 代表的气单胞菌属细菌,V13 和 V18 代表的弧菌科细菌,以及 V14 和 V17 代表的肠杆菌科细菌为表皮组织所特有。其中 V13 代表的弧菌科细菌仅出现在 N 组河鲀表皮,V17 代表的肠杆菌科细菌仅出现在 C 组河鲀表皮。V6 代表的肠杆菌科细菌仅出现在 N 组河鲀性腺中。V5 代表的弧菌科细菌仅出现在 N 组河鲀的肠道。V5、V8、V13 和 V18 所代表的弧菌科细菌,以及 V6、V14 和 V17 代表的肠杆菌科细菌,占 18 种被鉴定的细菌总数的 39%。

表 2 弧菌特异引物扩增 16S rDNA 特征片段序列分析结果
 Tab. 2 Phylogenetic affiliations of 16S rDNA sequences amplified by *Vibrio* sp. Primers

条带编号 Band No.	序列登录号 Accession No.	序列长度 Length of Seq.	种系型 Phylogenetic Group	相近序列及其登录号 Higher Similar Seq. and Accession No.	相似性 similarity
V1	DQ455053	114bp	<i>Aeromonas</i>	DQ001355 DGGE gel band TM5-b11-69 AY347682 <i>Aeromonas culicicola</i>	97% 97%
V7	DQ455059	114bp	<i>Aeromonas</i>	DQ001355 DGGE gel band TM5-b11-69 AY347682 <i>Aeromonas culicicola</i>	98% 98%
V2	DQ455054	72bp	Vibrionaceae	AY827492 <i>Vibrio olivaceus</i> AJ784125 <i>Photobacterium damsela</i>	94% 94%
V12	DQ455064	74bp	Vibrionaceae	AY827492 <i>Vibrio olivaceus</i> AJ784125 <i>Photobacterium damsela</i>	98% 98%
V18	DQ455070	114bp	Vibrionaceae	DQ223913 gamma proteobacterium clone wom-3 AY780009 <i>Photobacterium phosphoreum</i> isolate PHPH	99% 99%
V6	DQ455058	92bp	Enterobacteriaceae	AM042690 <i>Rahnella aquatilis</i> DQ231053 Enterobacteriaceae bacterium U319	100% 100%
V14	DQ455066	73bp	Enterobacteriaceae	AY696681 <i>Shigella boydii</i> strain 3052-94 AY831405 <i>Escherichia coli</i> strain AB1157	97% 97%
V17	DQ455069	73bp	Enterobacteriaceae	AY696681 <i>Shigella boydii</i> strain 3052-94 AY831405 <i>Escherichia coli</i> strain AB1157	97% 97%
V3	DQ455055	114bp	<i>Vibrio</i>	AY628646 <i>Vibrio ordalii</i> NCMB2168 AY069971 <i>Listonella anguillarum</i> serovar O2a	99% 99%
V5	DQ455057	71bp	<i>Vibrio</i>	AY374408 <i>Vibrio</i> sp. clone 6-268 AY628646 <i>Vibrio ordalii</i> NCMB2168	100% 100%
V9	DQ455061	114bp	<i>Vibrio</i>	AY374408 <i>Vibrio</i> sp. clone 6-268 AY628646 <i>Vibrio ordalii</i> strain NCMB2168	100% 100%
V10	DQ455062	114bp	<i>Vibrio</i>	AY374408 <i>Vibrio</i> sp. clone 6-268 AY628646 <i>Vibrio ordalii</i> strain NCMB2168	100% 100%
V11	DQ455063	114bp	<i>Vibrio</i>	AY628646 <i>Vibrio ordalii</i> NCMB2168 AY069971 <i>Listonella anguillarum</i> serovar O2a	97% 94%
V4	DQ455056	69bp	<i>Vibrio</i>	AY771721 <i>Vibrio lorgei</i> isolate S3-6 AY628646 <i>Vibrio ordalii</i> strain NCMB2168	98% 98%
V16	DQ455068	72bp	<i>Vibrio</i>	AY848855 <i>Vibrio</i> sp. clone VGP11 AY227706 <i>Vibrio splendidus</i>	98% 98%
V15	DQ455067	72bp	<i>Vibrio</i>	AY848849 <i>Vibrio</i> sp. clone VGP8 AY654827 <i>Mucus bacterium</i> 98	98% 98%
V8	DQ455060	114bp	<i>Vibrio</i>	AY848847 <i>Vibrio</i> sp. clone VGP13 AY780439 <i>Vibrio</i> sp. SUB7	100% 100%
V13	DQ455065	64bp	<i>Vibrio</i>	AB031614 gamma proteobacterium THHP302-28 AY848847 <i>Vibrio</i> sp. clone VGP13	100% 98%

3 讨论

利用 16S rDNA PCR-DGGE 技术来鉴定微生物,已经成为当前研究环境微生物群落生态的主要研究手段之一^[4-6]。本研究利用此法共鉴定出暗纹东方鲀体内 18 种细菌,均归属于变形细菌 (*Proteobacteria*) 的 gamma 亚群,其中 13 种为弧菌科细菌,3 种为肠杆菌科细菌,2 种为气单胞菌属细菌。

本研究发现暗纹东方鲀体内某些组织的细菌组成与不同的食物来源有关,肠道中的细菌组成的差别最大,这可能与食物本身包含的细菌,或不同食物的营养组成需要肠道有相适应的细菌群落有关。Haruo^[10]亦认为淡水养殖池中外界环境和饵料组成等因素对鱼肠道中细菌群落组成有较大影响。本研究中, V5 代表的弧菌仅出现在 N 组河鲀肠道内,表明其可能来自食物本身。早在上个世纪 80 年代,日本的研究者松居隆^[1]等就报道了河豚毒素起源于一些海洋弧菌,并与食物链有关。陈永豪^[11]调查发现在淡水江河、湖荡中长大的暗纹东方鲀完全无毒,而生长在海中以及海潮到达的潮感区的幼鲀,虽小如

葱头也都含毒,说明河豚的毒化与环境条件如盐分、饵料生物密切相关。本实验发现 N 组和 C 组的河豚,其累积大量河豚毒素的性腺组织中的细菌组成有较大的差别,也间接说明了河豚毒性与食物来源是有一定的关系的。由于 V6 代表的肠杆菌科细菌仅出现在 N 组河豚性腺中,今后有必要对其是否能分泌河豚毒素作进一步的研究。不同的食物来源对河豚表皮细菌的组成,没有大的差别。在本实验中,两组河豚所饲养的水环境是一样的,河豚表皮的细菌组成应该是和其生活的水环境的细菌组成是相适应的。

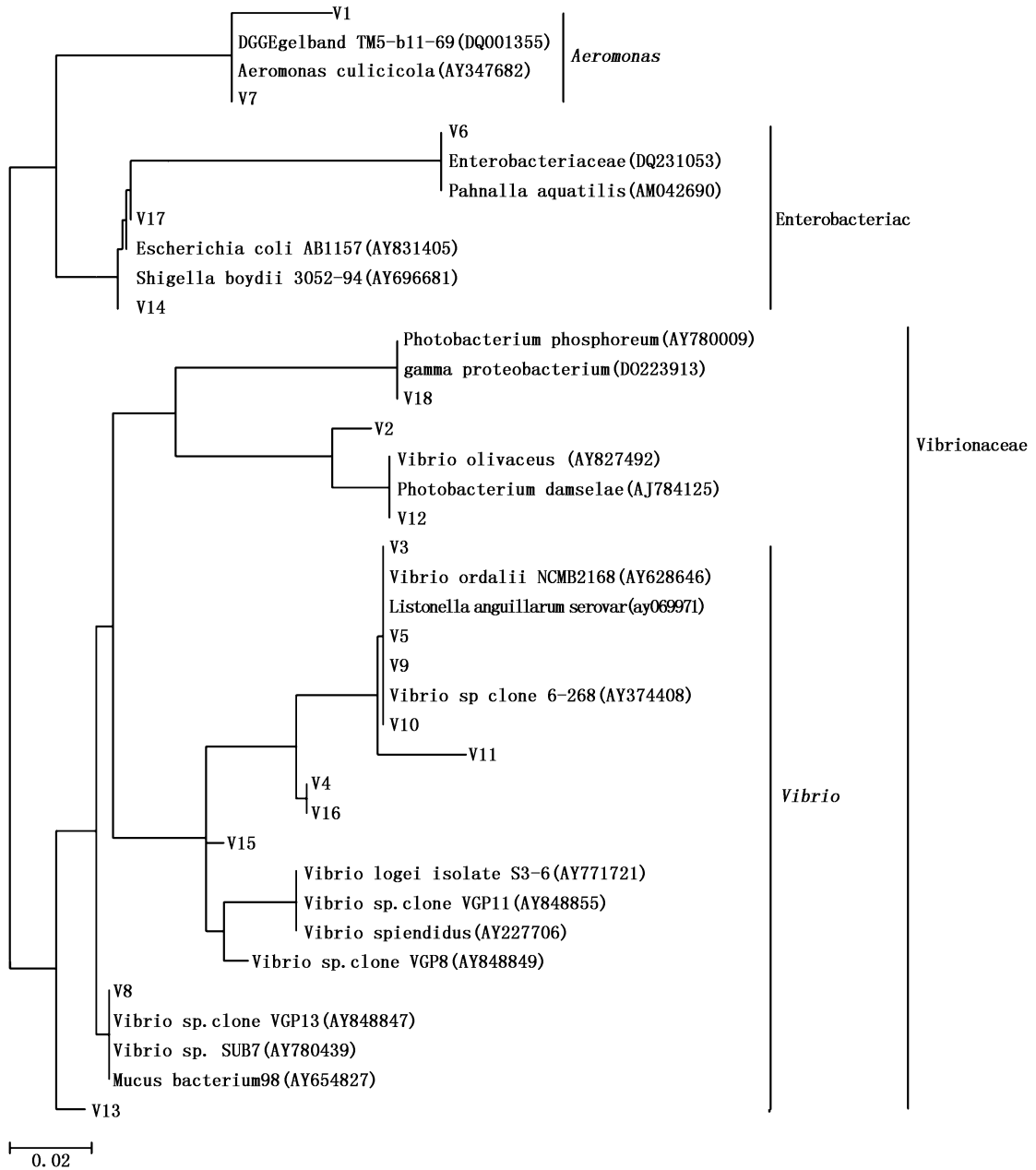


图 2 根据细菌 16S rDNA 特征序列所构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed basing on bacterial 16S rDNA sequences.

应用 MEGA3 构建 Neighbor - joining 系统发育树,bootstrap 为 1000 次重复;V1 ~ V18 为本研究中获得的序列,括号内数字为序列的登录号,标尺代表 0.02 进化距离。

自然环境中有很多微生物在现有的培养条件下是不能生长的,这主要是因为目前对许多微生物的培养条件还不了解。通过直接培养细菌的方法去研究环境的细菌群落组成是比较困难的,或者是不准确的,例如本研究中 V5、V8、V13 和 V18 所代表的弧菌科细菌,以及 V6、V14 和 V17 代表的肠杆菌科细菌就不能在 TCBS 培养基上培养,如果仅通过对经 TCBS 培养基培养的细菌进行分析,对河鲀体内细菌群落组成的研究将是不全面的。利用 16S rDNA PCR-DGGE 技术在这方面而言有一定的优势^[12],但也存在一些不足,对于未经培养的原始细菌菌落组成中某些菌体数目较少的种类,其原始细菌的 PCR-DGGE 条带亮度会很弱,将造成 DGGE 条带回收困难从而导致细菌种类数量被低估。

本研究目的是以 PCR-DGGE 方法来分析河鲀体内及体表细菌类群的组成。通过 16s rDNA 基因序列分析,其中 72% 是弧菌类细菌,也有肠杆菌科和气单胞菌科细菌被扩增,这与本文所选择的弧菌特异引物 567f 有关,肠杆菌科以及气单胞菌科细菌在弧菌特异引物 567f 部位,仅有 2 个位点的差异。由于序列差异较小,设计非常严格的弧菌特异引物还有一定的困难,本文所采用的弧菌特异引物,也是参考 Janelle 等^[9]的文献。

参考文献：

- [1] 松居隆. 化学与生物 M]. 1984 679.
- [2] Noguchi T, D F Hwang, O Arakawa, et al. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestine of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*[J]. Mar Bio, 1987, 94 625 - 630.
- [3] 方 苹, 陈 辉, 黄春贵. 暗纹东方鲀几种常见病原菌防治药物的筛选[J]. 水产科学, 2005, 24(7): 1 - 3.
- [4] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695 - 700.
- [5] 李会容, 俞 勇, 曾胤新, 等. 北极太平洋扇区海洋沉积物细菌多样性的系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 2 in press.
- [6] Løvreås, Torsvik V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities[J]. Microb Ecol, 1998, 36 303 - 315.
- [7] 林业杰, 陈亢川, 陈拱立, 等. 溶藻弧菌噬菌体的分离[J]. 微生物学报, 1993, 33(4) 285 - 289.
- [8] Bosshard P P, Santini Y, Grütter D, et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno a reveal by 16S rDNA analysis[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 31: 173 - 182.
- [9] Janelle R T, A R Mark, A M Luisa, et al. Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(7) 4103 - 4110.
- [10] Harus S. Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1987, 53(2) 287 - 290.
- [11] 陈永豪. 河豚含毒与环境影响[J]. 中国海洋药物, 1990, 35(3) 8 - 9.
- [12] Luo Haifeng, H Qi, H Zhang. Diversity surveys of soil bacterial community by cultivation-based methods and molecular fingerprinting techniques [J]. J Environmental Sciences, 2004, 16(4) 581 - 584.