

基于 PCR-DGGE 指纹图谱川纹笛鲷及圆白鲳 消化道壁优势菌群结构比较分析

周志刚^{1,2} 石鹏君² 姚 斌² 何夙旭² 苏永全³ 丁兆坤²

(1. 汕头大学海洋生物研究所, 汕头 515063; 2. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081;

3. 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005)

摘要:本文采用免培养的 16S rDNA 梯度凝胶电泳技术(DGGE)对集约化海水网箱养殖川纹笛鲷 *Lutjanus sebae* 及圆白鲳 *Ephippus orbis* 消化道壁优势菌群结构进行了比较分析。研究结果显示川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁存在着大量细菌群落,对 DGGE 指纹图谱聚类分析表明两种鱼肠道壁及胃壁菌群组成相似度高于 50%,其中二者肠道壁细菌组成相似性最高(67%),这些可能与两种鱼养殖在同一水域、摄食相同饵料相关,另外通过软件对 DGGE 指纹带谱相对丰度分析表明同种鱼肠道壁及胃壁具有相同最大优势菌群。同时,两种鱼消化道壁之间在细菌多样性及相对丰度上亦存在明显区别,圆白鲳消化道壁细菌多样性要高于川纹笛鲷,这可能归因于川纹笛鲷与圆白鲳在天然环境中栖息地的差异性。本研究通过首次建立不同海水鱼消化道壁 16S rDNA-DGGE 指纹图谱及比较分析,为澄清海水鱼消化道壁微生物区系奠定基础。

关键词: 川纹笛鲷;圆白鲳;16S rDNA;DGGE 指纹图谱

中图分类号: Q 938.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)05-0682-07

作为我国海洋资源利用的重要板块,海水鱼养殖目前面临两个关键问题^[1]: 苗种培育成功率低,限制了海水鱼苗的供给及集约化养殖的发展;

病害防治所致的抗生素滥用。生态养殖成为突破海水鱼养殖瓶颈的关键方式,而其中益生菌的开发则成为了生态养殖的重要手段^[2],然而由于借鉴畜禽思路所研制的水产益生菌存在难定植的不足,其功能效应较难充分发挥^[3],益生菌直接施加到水体亦存在一些隐患^[4]: 破坏水域环境中的微生态平衡; 利用效率低导致过度使用; 作为海水鱼的主养模式——网箱养殖无法施加。直接开发高效的可定植益生菌是必然发展趋势。消化道黏膜层及黏液多为消化道菌群的吸附定植位点^[5,6],海水鱼消化道壁菌群结构的澄清则成为了海水鱼养殖可定植益生菌研究的前提条件,Gate 与 Lesel 认为健康动物中正常的优势菌或次优势菌可以作为益生菌的来源^[7]。

海水鱼消化道存在大量微生物群落,是海水鱼

微生态环境的重要成分。Smith 早在 20 世纪 30 年代开始探讨鱼类细菌,从 50 年代开始研究鱼类肠道细菌^[8,9],相关报道非常丰富。然而,一方面,这些研究大多以肠道内容物或包含食糜的肠管为研究对象,而较少单独关注肠壁菌群,有研究表明肠壁菌群结构显著性区别于肠道内容物菌群,并且非常稳定,是真正意义上的可定植菌群^[10];另一方面,这些研究均依据常规的人工培养法,存在一定局限性^[11]: 自然界很多微生物不能人工培养;

绝大多数严格厌氧微生物尚未得到鉴定和描述;

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; 操作过程繁冗^[12]。例如:水环境(海水、淡水、中营养湖泊)可培养细菌占总数仅 1%^[13];鱼体表可培养微生物更不足总量 0.01%^[14];虹鳟肠道细菌 50%—89%无法培养,可培养细菌中亦有 20%无法定性分析^[15]。可以推断,常规的人工培养法无法获取海水鱼消化道壁菌群的全面信息。

收稿日期:2005-10-31;修订日期:2006-12-28

基金项目:国际科技合作重点项目计划(2004DF100229);中国博士后科学基金(2005037625);广东省自然科学基金(05300945)资助

作者简介:周志刚(1974—),男,湖北仙桃人;副研究员,博士;主要从事水产微生物分子生态学研究。E-mail:zhouzhigang@caas.net.cn

通讯作者:姚斌, E-mail: yaobin@mail.caas.net.cn

基于 DNA 指纹技术的分子生物学研究手段,如限制性片段长度多态性分析(RFLP)、末端限制性片段长度多态分析(T-RFLP)^[16]、单链构象多态性分析(SSCP)^[17]等逐渐被引入到环境微生物生态研究中^[18],逐步克服常规人工培养法的不足。其中,变性梯度凝胶电泳(DGGE)^[19]和温度梯度凝胶电泳(TGGE)技术直接利用 DNA 或 RNA 对微生物遗传特性进行表征,不但避免了传统培养法的繁冗,更可进而鉴定出常规平板技术无法分离出的菌种^[18]。结合 PCR 的变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)已在土壤、人粪、猪胃肠道、反刍动物瘤胃、昆虫消化道、海绵、对虾等的菌群研究中得到应用^[4]。

川纹笛鲷 *Lutjanus sebae* 及圆白鲳 *Ephippus orbis* 是我国重要海水养殖经济品种,也面临着海水鱼养殖的共性瓶颈问题,二者均为热带海洋肉食性鱼类^[20, 21],只是在天然环境中栖息地存在差异^[21-23]。本文拟用 PCR-DGGE 指纹图谱比较分析集约化网箱养殖健康川纹笛鲷及圆白鲳的消化道壁优势菌群结构,探讨二者在胃壁及肠道壁菌群组成上的差异,亦为澄清海水鱼消化道壁微生物区系及开发可定植益生菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品准备 健康川纹笛鲷(241.8 ± 74.9) g 及圆白鲳(17.69 ± 3.0) g 于 2005 年 7 月随机挑选自海南省陵水新村港海水养殖网箱,取样时经测定水温 30 ℃、海水盐度 33 ‰,实验鱼连续投喂单一膨化饲料(水分 8.2 %、粗蛋白 45.0 %DM 及粗脂肪 8.5 %DM)至少 1 个月以上,每天投喂 3—4 次,在取样当日 13:00—14:00 投喂后在 15:10 进行取样。取样时用抄网迅速将鱼从网箱中捞出,剪刀敲击头部致死,随后将鱼置于灭菌塑料密封袋内,保存在冰块中,3h 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 %酒精体表消毒、解剖剪消毒,用解剖剪沿肛门向上朝前呈弧形剪开,用无菌棉线分别结扎胃部与肠段,75 %酒精棉球擦拭消化管外壁,并用无菌冲洗液(灭菌人工配制海水,盐度 33 ‰)冲洗数遍^[24]。用剪刀分离出消化道各段,用 1 mL 离心管收集消化道内容物, - 20 ℃ 保存;剖开消化道各段,在无菌冲洗液中轻轻漂洗 2 min^[24],置入 1 mL 离心管中 - 20 ℃ 保存。

1.2 总 DNA 提取 选择消化道堵塞度好的 1 尾川纹笛鲷及 1 尾圆白鲳的样品进行后续实验操作,本文只探讨消化道壁菌群结构。

细胞裂解 在无菌操作台上从样品管中称取约 0.25 g 胃壁或肠道壁样品置于 2 mL 裂解管,加入 1 mL 裂解缓冲液(500 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、50 mmol/L EDTA 及 4 % SDS,灭菌 121 ℃, 20min),再加入 0.3 g 直径 0.1 mm 和 0.1 g 直径 0.5 mm 氧化锆珠;珠磨仪(Mini-Beadbeater™, USA)振荡 3min;70 ℃ 水浴 15min;4 ℃ 16000 r/min 离心 5min,将上清倒入 2 mL 离心管中;加入 300 μL 新鲜裂解液到裂解管中,重复以上步骤,合并两次上清。

DNA 沉淀 在合并上清中加入 260 μL 10 mol/L (NH₄)Ac 溶解产物,混匀,冰浴 5 min。4 ℃ 16000 r/min 离心 10 min。将上清移入两个 1.5 mL 离心管中,每个管中加等体积异丙醇混匀,冰浴 30 min。4 ℃ 16000 r/min 离心 15 min,用枪吸出上清,70 %乙醇洗 DNA 沉淀,真空干燥 3 min。最后用 100 μL TE (pH 8.5)溶解 DNA,并合并两管中 DNA。

DNA 纯化 在粗 DNA 样品中加 12 μL RNA 酶(浓度 10mg/mL), 37 ℃ 水浴 15 min。再加 20 μL 蛋白酶 K 70 ℃ 水浴 10 min。用等体积氯仿 苯酚、氯仿分别抽提(10000 r/min 10 min,吸取上清)。再用等体积异丙醇沉淀 DNA 16000 r/min 15 min,弃上清。然后用 70 %乙醇 500 μL 洗 DNA,弃上清。超净台吹干后,200 μL TE 溶解。取 5 μL 样品,0.8 % DNA 琼脂糖电泳检测。

试剂盒纯化 取约 50 μL DNA 样品按 Cycle-Pure DNA 纯化试剂盒操作。取 5 μL 样品,0.8 % DNA 琼脂糖电泳检测。

1.3 PCR 扩增

针对 16S rDNA v3 区片段的 PCR 扩增 按 50 μL PCR 反应体系:5.0 μL 10 ×buffer (200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4); 200 mmol/L KCl; 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄; 15 mmol/L MgCl₂), 4.0 μL dNTPs, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 8.0 μL 0.1 %BSA, 0.5 μL 2.5 U/μL TaqE, 50 ng 模板 DNA, 0.5 μL 引物 BV₃F (5' - AC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3'), 其中 5' 包含 40 对 GC 夹子 CCG CCG CCG CCG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA CGG GGG G, 0.5 μL 引物 BV₃R (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'), BV₃F 与 BV₃R 为细菌 16S rDNA 第 3 可变区特异性引物,然后用 dd H₂O 调整至 50 μL。实验设置不添加模板的阴性对照组,模板体积由 dd H₂O 补充。

PCR 扩增程序 采用降落式 PCR 反应程序:94 ℃ 变性 5min;进入降落程序,94 ℃ 30 s, 65—56 ℃ (每个循环降低 0.5 ℃) 30 s, 72 ℃ 1min;再进入以下循环 94 ℃, 30 s; 55 ℃, 30 s; 72 ℃, 1 min; 25 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min。反应结束后取 3 μL 反应产物

1.5 %琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR产物琼脂糖电泳回收纯化 取全部样品在 1.5 %琼脂糖凝胶上电泳 (100V , 30min) ,紫外灯下切胶回收。

按 Cycle- Pure DNA 纯化试剂盒操作纯化。反应结束后取 3 μL 反应产物 1.5 %琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) DGGE 指纹图谱构建采用 DCODE™系统 (BIO-RAD)。

v3 区扩增纯化产物 (约 200bp) 在 10 %聚丙烯变性胶中分离 (丙烯酰胺浓度 40 %—60 %) , 200V , 4.5h ,每个样品点样量约 150ng DNA。

按快速银染法对聚丙烯变性胶染色:固定液 (10 %无水乙醇,0.5 %冰乙酸) 固定 15min;0.2 %硝酸银染色 15min;显色液 (3.0 %NaOH, 0.5 %甲醛) 显色 5min;固定液终止反应。每一步均用去离子水冲洗胶面。

1.5 凝胶成像扫描及分析 在 Vilber 凝胶成像扫描系统中照像 ,Bio-1D ++ 软件对 DGGE 指纹图谱进行聚类及定量分析。

2 结 果

2.1 消化道壁菌群总 DNA 的提取

按材料与方法 1.2 所提取总 DNA 电泳图如图 1 所示 ,其中川纹笛鲷及圆白鲳肠道壁菌群总 DNA 带较弱 (大小 1.6kb 部分) ,而胃壁菌群总 DNA 带较强 (大小 1.6kb 部分)。

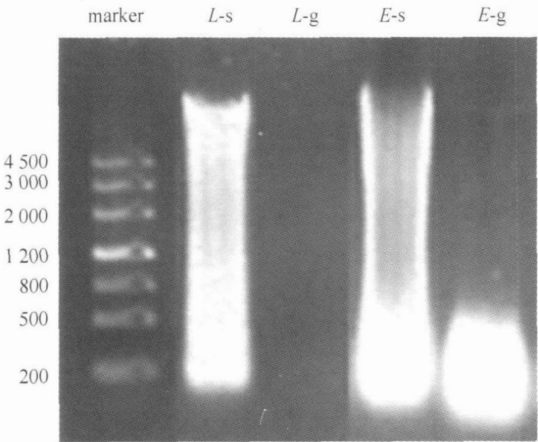


图 1 川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁样品总 DNA 电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the community DNA extracted from the gastrointestinal wall of *Lutjanus sebae* and *Ephippus orbis*
L-s: 川纹笛鲷胃壁样品;L-g: 川纹笛鲷肠壁样品;E-s: 圆白鲳胃壁样品;E-g: 圆白鲳肠壁样品 (Fig. 2, 3, 4 同)
L-s: the stomach sample of *Lutjanus sebae*;L-g: the gut sample of *Lutjanus sebae*; E-s: the stomach sample of *Ephippus orbis*; E-g: the gut sample of *Ephippus orbis* (Fig. 2, 3, 4 are the same)

2.2 消化道壁 16S rDNA- V3 区片段 PCR 扩增

以所提取的川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁菌群总 DNA 为模板我们成功地扩增出相应 16S rDNA V3 区片段 (约 200bp) ,纯化后电泳图见图 2 ,阴性对照组 CK 没有条带 (图 2)。

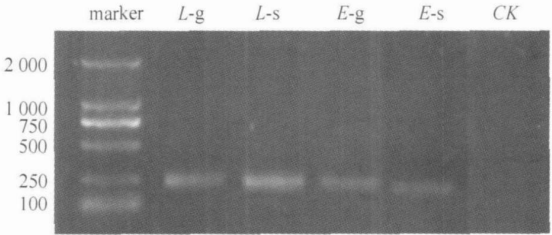


图 2 川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁细菌 16S rDNA-V3 区片段 PCR 扩增图谱 (CK: 阴性对照)
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR for the v3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastrointestinal wall of *Lutjanus sebae* and *Ephippus orbis* (CK: the negative control)

2.3 消化道壁 16S rDNA-DGGE 指纹图谱建立及聚类分析

川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁细菌 16S rDNA V3 区片段的 DGGE 指纹图谱及聚类分析结果如图 3 及图 4 所示。各组样品所在泳道均可观察到明显的条带 (图 3) ,表明川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁存在着大量细菌群落 ,其中川纹笛鲷肠道壁及胃壁条带分别有 5 条 (band 1—5) 及 4 条 (band 2、3、5、6) ,而圆白鲳肠道壁与胃壁则分别有 7 条 (band 7、8、2、9、11、12) 与 5 条 (band 7、9、13、10、11) ,说明肠道壁菌群要比胃壁的丰富 ,同时肠道壁及胃壁泳道中均有处于同一位置的条带 ,其中川纹笛鲷有 3 条 (band 2、3、5) ,圆白鲳有 4 条 (band 7、9、10、11) ,表明消化道壁不同部位菌群组成中可能存在着相同成分 ,并且川纹笛鲷肠道壁及圆白鲳肠道壁泳道有 1 条带处于同一位置 (band 2) ,另有 3 组带处于相近位置 (band 1 与 band 7;band 4 与 band 9;band 5 与 band 10)。

聚类分析结果表明 (图 4) ,川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁细菌结构相似度较高 (≥50.0 %) ,其中川纹笛鲷及圆白鲳肠道壁菌群结构最为接近 (相似度 67.0 %) ,而与各自的胃壁菌群组成相似度稍差。

2.4 DGGE 指纹图谱优势条带定量分析

通过 Bio-1D ++ 软件对 16S rDNA-DGGE 指纹图谱各条带光密度进行分析 ,川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁样品泳道优势条带相对丰度见表 1。由表 1 可

知,各泳道中均存在明显的主带与次带之分(变异系数 $c.v. \geq 22.9\%$),其中 band 5 为川纹笛鲷肠道壁与胃壁共有最大优势带,而 band 9 则为圆白鲳肠道壁与胃壁共有的最大优势带(band 9 及 band 13 共为圆白鲳胃壁的最大优势带)。

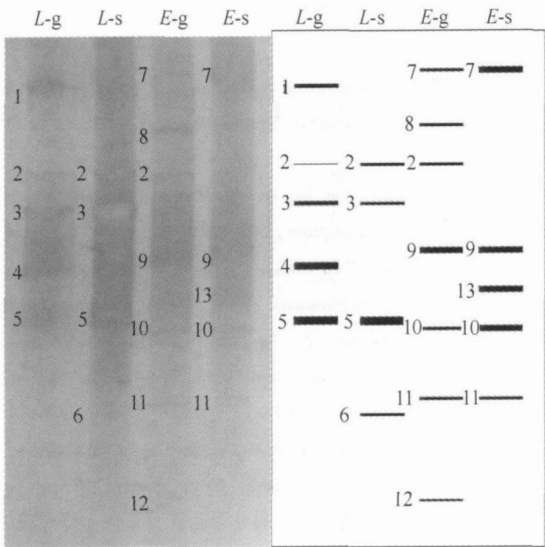


图3 川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱及模式图(1—12:条带数)
Fig. 3 The PCR-DGGE fingerprint and its pattern of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastrointestinal wall of *Lutjanus sebae* and *Ehippus orbis* (1—12: no. of the band)

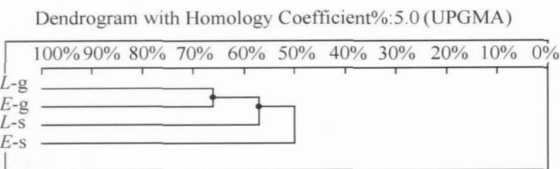


图4 川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱聚类分析
Fig. 4 The dendrogram of the PCR-DGGE fingerprint of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastrointestinal wall of *Lutjanus sebae* and *Ehippus orbis*

表1 PCR-DGGE 指纹图谱中圆白鲳及川纹笛鲷消化道壁菌群优势条带相对丰度(%)

Tab.1 The relative abundance of predominant band in the PCR-DGGE fingerprint of the bacteria from the gastrointestinal wall of *Lutjanus sebae* and *Ehippus orbis* (%)

条带 Band	L-g	L-s	E-g	E-s
7	—	—	13.0	17.9
1	18.3	—	—	—
8	—	—	14.0	—

续表

条带 Band	L-g	L-s	E-g	E-s
2	13.5	20.9	17.1	—
3	18.0	18.0	—	—
9	—	—	25.2	27.1
4	23.5	—	—	—
13	—	—	—	27.9
5	26.6	35.2	—	—
10	—	—	18.6	18.1
11	—	—	7.8	9.1
6	—	10.5	—	—
12	—	—	4.3	—
变异系数 c. v.	22.9	42.3	45.0	34.6

注:L-s: 川纹笛鲷胃壁样品;L-g: 川纹笛鲷肠道壁样品;E-s: 圆白鲳胃壁样品;E-g: 圆白鲳肠道壁样品;变异系数 = $100 \times \text{相对含量标准差} / \text{相对含量平均值}$;条带顺序按图3中自上而下顺序排列
Note :L-s: the stomach sample of *Lutjanus sebae*; L-g: the gut sample of *Lutjanus sebae*; E-s: the stomach sample of *Ehippus orbis*; E-g: the gut sample of *Ehippus orbis*; c. v. = $100 \times \text{s. d. of the abundance} / \text{mean of the abundance}$; band listed as the order from the top to bottom

3 讨论

菌群总 DNA 高效提取是免培养复杂环境微生物研究的关键技术。李志勇等^[25]在提取对虾鳃部及肠道细菌总 DNA 时采取了经典的酚-氯仿法^[19], 本文在提取海水鱼消化道壁菌群总 DNA 时采用了结合 DNA 纯化柱的珠磨法,该方法借鉴了反刍动物瘤胃内容物及粪便微生物总 DNA 提取方法,并在相关研究中被证实为高效的微生物总 DNA 提取法,即细胞裂解率接近 100 %、同时 DNA 片段保持完整^[26],虽然在鱼类消化道壁菌群总 DNA 提取中该方法尚未与其他方法开展比较研究,但从 DNA 电泳图来看,胃壁样品中 DNA 片段大于 1.6kb 部分清晰、亮度大(图 1),即使肠道壁样品中大于 1.6kb DNA 片段亮度较弱,但对 V3 区 PCR 结果仍然成功(图 2)。

通过 DGGE 带谱可以反映出环境微生物群落中优势类群的数量,即微生物种类的多样性,同时通过测定某一特定条带着色深浅程度可以半定量地计算出该条带所代表的特定种类微生物在整个区系中所占的比例(即相对丰度,Relative abundance)^[19]。

从本文 PCR-DGGE 指纹图谱(图 3)可以看出,川纹笛鲷及圆白鲳的胃壁与肠道壁上均存在大量细菌群落,与尹军霞等对乌鳢、鲢鱼、鲂鱼及鲫鱼肠壁细菌分析结论一致^[10]。川纹笛鲷及圆白鲳同属肉食性鱼类^[20, 21],在本研究中养殖在同一区域并饲喂同一种饲料达 1 个月以上,而鱼类消化道微生物易受到水环境和饵料的影响^[28-31],这一点从本研究聚类分析结果各组样品同源性大于 50 %可以得到证实(图 4)。尽管如此,从 DGGE 指纹图谱仍可以看出二者在消化道壁细菌组成上存在区别,这反映了细菌定植的宿主特异性,可能与鱼体自身的免疫反应不同有关^[32, 33],归因于鱼类长期进化的结果^[34];在天然环境中,川纹笛鲷生活在海水相对洁净的礁石深海区^[21, 23],而圆白鲳则栖息在具有泥底的浅海区,并有回游习性^[22]。本研究结果显示圆白鲳肠道壁及胃壁样品条带均丰富于川纹笛鲷(图 3),佐证了这一点。尹军霞等报道鱼体肠壁厌氧菌稳定性高于好氧菌^[10],本研究尚未开展对泳道上不同条带 16S rDNA V3 区的测序、GenBank 比对等细菌的定性测定工作,相关结论尚无法得出,有待于进一步研究确定。

分别从川纹笛鲷及圆白鲳分析,各自肠道壁菌群均比胃壁丰富,可能与肠道及胃生理环境差异有关,这一点与猪的研究结果相似^[35]。尽管从条带位置来看,同一种鱼的肠道壁及胃壁相同细菌种类要显著多于不同鱼之间的,但从 DGGE 指纹图谱聚类分析结果表明,两种海水鱼肠道壁菌群组成具有最高的相似度(67 %),可能与两种鱼肠道有 3 组条带处于相近位置及相似的相对丰度相关,有待测序确认。

目前虽然 PCR-DGGE 技术并不成熟,在引物设计、变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)、优势菌群半定量分析等关键环节尚待进一步完善^[4],但是由于该方法已克服了常规平板培养细菌研究方法诸多缺点,在鉴定自然生境或人工生境中的微生物个体、分析复杂微生态演替规律、微生物种群动态性评估、重要基因定位、表达及调控评价存在巨大的应用空间^[4],在地球生物学(Geobiology)研究领域中将发挥重要作用。在水产养殖中,利用 PCR-DGGE 技术可建立不依赖常规分离培养的病原菌分子诊断技术、基于机体内优势菌群结构的健康水产动物评价技术,并可用于研究养殖品种与养殖水体以及底泥中微生物的关系、食物链等^[25],系统评估水产养殖对湿地微生态系统的影响。同时,由于健康动物中正常的优势菌或次优势菌可以作为益生菌的来

源^[7],在探讨川纹笛鲷及圆白鲳高效可定植益生菌,我们可以通过 PCR-DGGE 指纹图谱快速鉴定消化壁优势菌群结构,寻求共有优势菌组成,进而通过纯培养或共培养手段达到筛选目标可定植益生菌的目的。

参考文献:

- [1] Zhou Z, Wang Z. Marine fish aquaculture in China [J]. *Asia-Pacific Marine Finfish Aquaculture Network Magazine*, 2004, (2): 18—20
- [2] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2001, **200**: 223—247
- [3] Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, et al. Probiotic supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* in rainbow trout diet: viability and innate immune response [A]. In: Abstract of the eleventh international symposium on nutrition and feeding in fish [C]. Phuket Island, Thailand, 2004, 240p
- [4] Zhou Z G, Shi P J, Yao B, et al. A review of the micro-ecology in the digestive tract of marine finfish. *Marine Science*, 2007, in press [周志刚, 石鹏君, 姚斌, 等. 海水鱼消化道微生态研究进展. 海洋科学, 2007, 刊印中]
- [5] Hansen G H, Olafsen J A. Bacterial interactions in early life stage of marine cold water fish [J]. *Microbial Ecology*, 1999, **38**: 1—16
- [6] Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms [J]. *Aquaculture*, 2000, **191**: 259—270
- [7] Gatesoupe F J, Lesel R. An environmental approach to intestinal microflora in fish [J]. *Cahiers Agricultures*, 1998, **7**(1): 29—35.
- [8] Liston J. The occurrence and distribution of bacterial types on flatfish [J]. *Journal of Genetic Microbiology*, 1957, **16**, 205—216
- [9] Margolis L. The effect of fasting on the bacterial flora of the intestine of fish [J]. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 1953, **10**(2): 95—104
- [10] Yin J X, Zhang J L, Sheng W Y, et al. Study on the relation between eating patterns of fishes and intestinal microflora [J]. *Fisheries Science*, 2004, **23**(3): 4—6 [尹军霞, 张建龙, 沈文英, 等. 鱼食性与肠道菌群关系的初步研究. 水产科学, 2004, **23**(3): 4—6]
- [11] Feng Y L. Ruminant nutrition [M]. Beijing: Science Press. 2004, 114—130 [冯仰廉. 反刍动物营养学. 北京: 科学出版社. 2004, 114—130]
- [12] Ji N, Peng B, Wang G, et al. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **57**: 409—413
- [13] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**: 143—169
- [14] Bernadsky G, Rosenberg E. Drag-reducing properties of bacteria from the skin mucus of the cornefish (*Fistularia commersonii*) [J]. *Microbial Ecology*, 1992, **24**: 63—74
- [15] Huber I, Spanggaard B, Appel K F, et al. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **96**: 117—132
- [16] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**: 4516—4522
- [17] Stach J M, Bathe S, Clapp J, *et al.* PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods [J]. *Fems Microbiol. Ecol.*, 2001, **36**: 139—151
- [18] Gong M L, Ren N Q, Xing D F. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44** (6): 845—848 [宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/ TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用. 微生物学报, 2004, **44** (6): 845—848]
- [19] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 695—700
- [20] Maugé A. Ephippidae [A]. In: Fischer W, Bianchi G (Eds.), FAO species identification sheets for fishery purposes. *Western Indian Ocean* (Fishing area 51) [C]. Rome: FAO. 1984, Vol. 2
- [21] Anderson W D. Lutjanidae [A]. In: Smith M M, Heemstra P C (Eds.), *Smiths' sea fishes* [C]. Berlin: Springer-Verlag. 1986, 572—579
- [22] Riede K. Global register of migratory species: from global to regional scales [A]. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081 [C]. Bonn: Federal Agency for Nature Conservation. 2004, 329
- [23] Allen G R. An annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date [J]. *Fao Fish. Synop.*, 1985, **125**(6): 208
- [24] MacDonald N L, Stark J R, Ausin B. 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*, 1986, **35**: 107—111
- [25] Li Z Y, He L M, Wu J, *et al.* Study on the predominant bacterial community in prawn based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint [J]. *Microbiology*, 2005, **32**(3): 82—86 [李志勇, 何丽明, 吴杰, 等. 基于 PCR-DGGE 基因指纹的对虾体内优势细菌的组成分析. 微生物学通报, 2005, **32**(3): 82—86]
- [26] Yu Z T, Morrison M. Improve extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples [J]. *BioTechniques*, 2004, **36** (5): 808—812
- [27] Hansen G, Fujia K. Effect of different holding regiments on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**(2): 461—470
- [28] Trust T J, Bull L M. Obligate anaerobes bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp, goldfish, and rainbow trout [J]. *Fish Res. Board Can.*, 1979, **36**: 1174—1179
- [29] Sakata T, Sugita H, Mitsuoka T, *et al.* Isolation and distribution of obligate anaerobic bacteria from the intestines of freshwater fish [J]. *Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish.*, 1980, **46**: 1249—1255
- [30] Sugita H, Tokuyama K, Deguchi Y. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp and tilapia [J]. *Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish.*, 1985, **51**: 1325—1329
- [31] MacFarlane R D, McLaughlin J J, Bullock G L. Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal environments [J]. *J. Wildl. Dis.*, 1986, **22**: 344—348
- [32] Harrell L W, Erlinger H M, Hodgins H O. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. . Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement [J]. *Aquaculture*, 1976, **7**: 363—370
- [33] Fletcher T C. Non-specific defence mechanisms in fish [J]. *Develop. Comp. Immunol.*, 1982, **2**(suppl.): 123—132
- [34] Zhao Q X. An analysis of intestinal microflora of Cyprinidae [J]. *Journal of Microbiology*, 2001, **21**(2): 18—20 [赵庆新. 鲤科 (Cyprinidae) 鱼肠道菌群分析. 微生物学杂志, 2001, **21**(2): 18—20]
- [35] Simpson J M, McCracken V J, White B A, *et al.* Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **36**: 167—179

**COMPARISON OF THE PREDOMINANT BACTERIAL COMMUNITY
STRUCTURE IN THE GASTROINTESTINAL WALL BETWEEN *LUTJANUS SEBAE*
AND *EPHIPPIUS ORBIS* BASED ON 16S rDNA PCR-DGGE FINGERPRINT**

ZHOU Zhi-Gang^{1,2}, SHI Peng-Jun², YAO Bin², HE Si-Xu², SU Yong-Quan³ and DING Zhao-Kun²

(1. Marine Biology Institute of Shantou University, Shantou 515063;

2. Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

3. Marine & Environ, College of Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract : The comparison of the predominant bacterial community structure in the gastrointestinal walls between *Lutjanus sebae* (Cuvier, 1816) and *Ephippus orbis* (Bloch, 1787) based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint using a culture-independent method was conducted in the paper. The results showed that abundant bacterium were planted in the gastrointestinal walls of both marine finfish species, the similarity was above 50 % in the community structures in the gastrointestinal walls with the highest similarity of 67 % in the bacterial composition between the intestinal wall of *Lutjanus sebae* and that of *Ephippus orbis*, and the walls of the stomach and the intestinal in one fish shared the same most predominant bacteria species, which might reflect the same aquaculture environment and the diet fed for both finfish species. However, the difference of the richness and relative abundance in the bacterium of the gastrointestinal walls in both finfish species was also observed from the DGGE fingerprint with the results of richer bacterium of the gastrointestinal wall in *Ephippus orbis* compared to that in *Lutjanus sebae*, which might due to the different natural living habits. The first time of the establishment and comparison of the 16S rDNA-DGGE fingerprint in the gastrointestinal wall of marine finfish in present study do help to elucidate the microflora structure in the gastrointestinal wall of marine finfish.

Key words : *Lutjanus sebae*; *Ephippus orbis*; 16S rDNA; DGGE fingerprint