

# 鸡肠道菌基因组 DNA 的 RAPD 分类的研究

吴天星<sup>1</sup>, 金勇丰<sup>2</sup>, 曹广力<sup>2</sup>, 张耀洲<sup>2</sup>

(1. 浙江大学理学院, 杭州 310027;

2. 浙江大学生物化学研究所, 杭州 310027)

**摘要:** 本文以 7 种鸡肠道菌为研究对象, 分别提取基因组 DNA, 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对其基因组进行 DNA 分析, 筛选出一系列随机引物, 能在 7 种肠道细菌中有较好的多态性, 可用作分子标记鉴别这 7 种肠道菌。

**关键词:** 鸡; 肠道菌; RAPD; 分类

中图分类号: S831.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2002)03-0247-03

猪、禽肠道中, 有益菌和有害菌同时存在, 菌种多而复杂, 快速了解动物肠道菌落情况, 可以更好调控肠道微生态平衡。传统的鉴别方法是采用细菌培养或显微镜观察法, 但工作量大、时间长。随着现代分子生物学实验技术的发展, 出现了许多新型的鉴别技术, 包括斑点杂交法<sup>[1]</sup>、限制性内切酶分析<sup>[2]</sup>、rRNA 探针<sup>[3]</sup>、RFLP<sup>[4]</sup>等。但操作繁琐, 花费时间长, 杂交还要求有探针。随机扩增 DNA 多态性分析 (RAPD) 是 90 年代初在 PCR 技术基础上发展起来的一门崭新技术, 即利用一系列不同的随机排列碱基序列的 10 bp 寡聚核苷酸单链为引物, 利用多聚酶链式反应对 DNA 进行扩增, 检测 DNA 序列的多态性。该法已成为遗传图谱构建、基因定位、品种鉴定、分类研究及遗传变异检测等的一种强有力的工具<sup>[5,6]</sup>。本文应用 RAPD 技术对已知几种细菌进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

细菌株分别为消化链球菌、大肠杆菌、拟杆菌、真杆菌, 双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌。随机引物和 Taq DNA 聚合酶等分子生物学试剂均为浙江博联生物技术中心产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌总 DNA 的提取: 取 1.5 ml 细菌 5000 r/min 离心 5 min, 收集细菌, 用 TE 悬浮, 加入 SDS

和蛋白酶 K, 37℃作用 1 h 后加入 NaCl 和 CTAB/NaCl, 65℃作用 10 min, 再用酚, 氯仿/异戊醇 (24:1) 各抽提 2 次, 用 2 倍体积的乙醇沉淀, 混匀后钩出 DNA 沉淀, 用 70% 乙醇清洗 1 次, 溶于 TE 中。在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并测定其 OD 值, 计算 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 RAPD 反应: 以上述 DNA 为模板进行 RAPD 反应, 在 25 μl 反应体系中, 加 2.5 μl 10×PCR 缓冲液, 2 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2 μl dNTPs (2.5 mmol/L), 模板 DNA 50 ng, Taq DNA 聚合酶 2 u, 随机引物 1 μl。反应条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 35℃退火 2 min, 72℃延伸 2 min, 最后一个循环延伸 10 min。每个样品重复 3 次, 反应结束后取 10 μl, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并用 1 次成像仪拍照。

## 2 结果

50 种随机引物对细菌 DNA 进行 RAPD 研究, 结果表明: 大多数细菌中能扩增出清晰条带, 扩增片段大小范围在 0.4~2 kb 之间。多数随机引物的 RAPD 结果没有特异性条带出现, 如 C16, H13, B4, C10, C5, C09, C04 和 C06 等 (如图 1)。C18、T13 等 10 个随机引物扩增出现了多态性。

随机引物 C18 (图 2A) 在消化链球菌、大肠杆菌、真杆菌, 双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌中扩增的 DNA 带型基本相同, 而拟杆菌与其它细菌不同, 说明用 C18 引物可以从 7 种细菌中鉴别出拟杆菌。

随机引物 T13 (图 2B) 在大肠杆菌、拟杆菌、真杆菌, 双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌 DNA 扩增条带相似, 而在消化链球菌中有一条带与其它细菌不同, 因

收稿日期: 2000-10-08

基金项目: 浙江省“九五”重点项目资助

作者简介: 吴天星 (1963-), 男, 浙江仙居人, 副教授, 博士, 主要从事动物营养和饲料科学方面的研究。

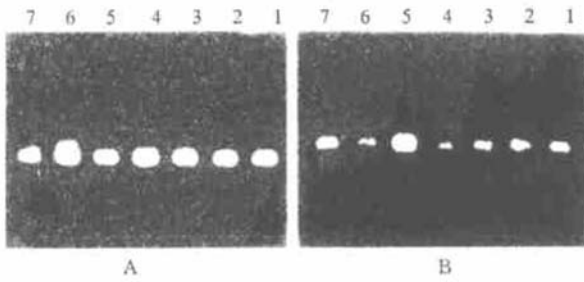


图1 7种鸡肠道细菌的 RAPD 结果  
A,B 分别为随机引物 C04 和 C06 的扩增结果  
1—7 分别代表消化链球菌、大肠杆菌、拟杆菌、真杆菌、双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌

Fig.1 RAPD products of seven intestinal microflora species with random primer C04(A) and C06(B)  
No1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represented *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *E.coli* and *Clostridium*, respectively

此 T13 可以用于鉴别消化链球菌与其它 6 种菌的差异。随机引物 F19(图 2C)所扩增条带均不相同,特异性明显,可以一次性鉴别这几个菌株。用 C07 引物扩增的条带中(图 2E),消化链球菌和双歧杆菌条带比较相似,但与其它细菌比较则特异性十分明显,因此可以用该引物区别这两种细菌与其它 5 种细菌。

用 C01 引物扩增的 DNA 条带中(图 2F),真杆菌和芽胞球菌比较相似,但与其它细菌则特异性明显,因此用该引物不能区分真杆菌和芽胞球菌,但能区分消化链球菌、大肠杆菌、双歧杆菌、拟杆菌、梭菌。

随机引物 T1, T5, C17, V07 等均能扩增出特异性条带。V07 引物在消化链球菌、大肠杆菌、真杆菌、双歧杆菌、梭菌能扩增出特异条带,但在拟杆菌和芽胞杆菌中未能扩增出条带。T1 引物在消化链球菌、大肠杆菌、双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌的扩增图谱相似,但与真杆菌图谱不同, T1 在拟杆菌中未能扩增出条带。T5 在消化链球菌、拟杆菌、双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌扩增出特异性条带,但在大肠杆菌、真杆菌中未能扩增出条带。C17 引物在真杆菌和梭菌扩增图谱一致,消化链球菌和芽胞杆菌的图谱一致,但与大肠杆菌中扩增图谱不同, C17 在拟杆菌和双歧杆菌中未能扩增出条带。

综合结果说明,区分这 7 种菌最好的随机引物为 F19, 一次性鉴别这 7 种细菌, 随机引物 C17, C07, V07, T13 等不能一次性鉴别这 7 种细菌,但结

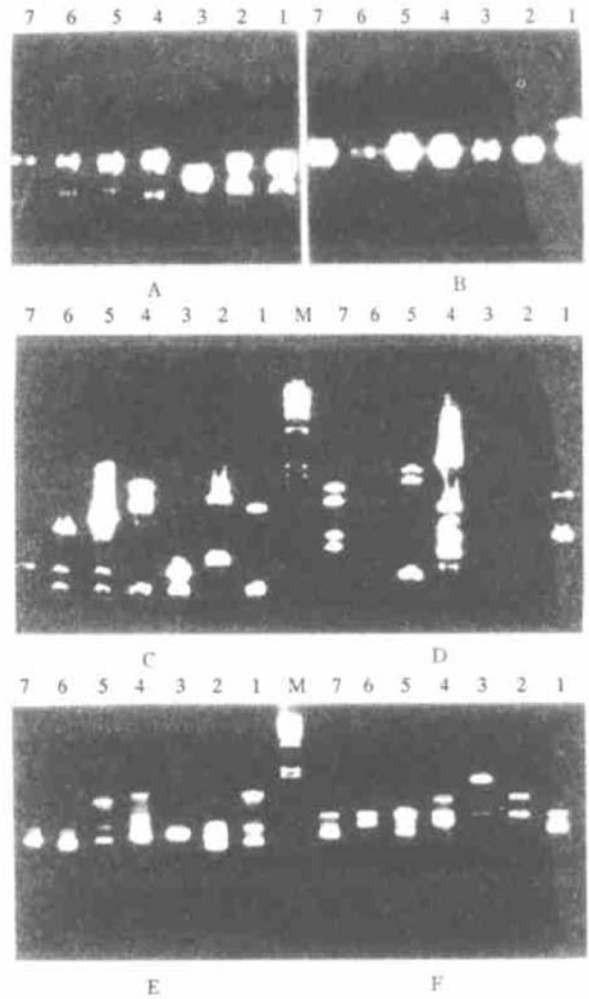


图2 7种鸡肠道细菌的 RAPD 结果  
A,B,C,D,E,F 分别为随机引物 C18,T13,F19,V07,C07 和 C01 的扩增结果。1—7 分别代表消化链球菌、大肠杆菌、拟杆菌、真杆菌、双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌

Fig.2 RAPD products of seven intestinal microflora species with random primer C18(A),T13(B),F19(C),V07(D),C07(E) and C01(F)  
No1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represented *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *E.coli* and *Clostridium*, respectively

合几个随机引物结果也可以鉴别这 7 种细菌。

### 3 讨论

随着现代分子生物学理论和实验技术的发展,已产生新型的分子技术用于鉴别细菌,与传统的细菌培养、生化分析、显微镜等方法相比,具有操作性强,时间短等诸多优点。Tto 等<sup>[4]</sup>从短双歧杆菌染色体 DNA 克隆筛选出一个片段(BB22, 1.8kb)用作探针,与 47 种 18 属的细菌杂交。结果 BB22 只与短双歧杆菌 DNA 杂交,与其它双歧杆菌不杂交。

Yamamoto 等<sup>[7]</sup>对相近种的双歧杆菌 16SrRNA 测序, 合成分别与青春双歧杆菌, 分叉双歧杆菌, 短双歧杆菌, 婴儿双歧杆菌和长双歧杆菌 16SrDNA 序列互补的 5 种寡核苷酸探针, 发现这些探针具有良好的特异性, 1 个核苷酸差异也能分辨。但是上述所用的方法还是比较麻烦, 需要制备探针和杂交。RAPD 是 90 年代初发展起来的新的分子标记, 由于该方法操作简便, 对模板 DNA 要求不高, 因此广泛用于植物、动物和微生物的遗传和进化分析, 基因克隆, 雌雄性别鉴定等方面。我们利用 RAPD 技术对细菌 DNA 进行特异性分析, 并筛选了一些随机引物, 可用于鉴别细菌种类, 其中随机引物 F19, 可以同时区分消化链球菌、大肠杆菌、拟杆菌、真杆菌、双歧杆菌、芽胞球菌、梭菌。C18 引物可以用于鉴别拟杆菌, T13 引物可以用于鉴别消化链球菌。不仅省时, 只用 6 h 就能出结果, 而且结果比较理想, 稳定性好。

#### 参考文献:

- [1] Tannock GW, Fuller R, Smith SL, et al. Plasmid Profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilli*, and *Bifidobacteria* to study the transmission of Bacteria from mother to infant[J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(6): 1125~ 1128.
- [2] Mattarelli P, Biavati B, Alessandrini A, et al. Characterization of the Plasmid pVS 809 from *Bifidobacterium globosum*[J]. *Micobiologica(Pavia)*, 1994, 17(4): 327.
- [3] Bourget N, Simonet JM, Decaris B. Analysis of the five *Bifidobacterium breve* Strains: Plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis, Genome Size estimation and *rrn* Loci number[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 110: 11.
- [4] Ito M, Ohno T, Tanaka R. A specific DNA probe for identification of *Bifidobacterium breve*[J]. *Microb Ecol Health Dis*, 1992, 5: 185.
- [5] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acid Res*, 1990, 18(22): 6531~ 6535.
- [6] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 7213~ 7218.
- [7] Yamamoto T, Morotomi M, Tanaka R. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(12): 4076~ 4079.
- [8] Lan DJ, Pace B, Olsen GJ, et al. Rapid determination of 16S rRNA sequences for phylogenetic analyses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 6955~ 6959.
- [9] Salama M, Sandine W, Giovannoni S. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(5): 1313~ 1318.
- [10] Stackebrandt E, Charfreitag O. Partial 16s rRNA primary structure of five Actinomyces species: phylogenetic implications and development of an Actinomyces israelii specific oligonucleotide probe[J]. *J Gen Microbiol*, 1990, 136: 37~ 43.

## Classification of Chicken Intestinal Microflora Species Using RAPD Analysis

WU Tian-xing<sup>1</sup>, JIN Yong-feng<sup>2</sup>, CAO Guang-li<sup>2</sup>, ZHANG Ya-zhou<sup>2</sup>

(1. College of Sciences; 2. Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** In this study, a molecular approach based on random amplified polymorphic DNA has been used for the detection and identification of *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacteri*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *E. coli* and *Clostridium*, the seven major constituents of chicken intestinal microflora. Some RAPD markers are selected to distinguish among seven intestinal microflora species and shows promise for use in rapid diagnostic tests.

**Key words:** Chicken, Intestinal microflora, Classification