

3 种 DNA 提取方法对养殖池塘不同生境菌群 PCR-DGGE 分析的影响

何凤旭¹, 周志刚¹, 姚斌¹, 白东清²

(1. 中国农业科学院饲料研究所农业部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081;
2. 天津农学院水产科学系天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要:比较 3 种 DNA 提取方法(溶菌酶法、CTAB 法及珠磨法)对养殖池塘几种生境(底泥、饲料、草鱼肠道内容物及肠道壁)菌群 PCR-DGGE 分析的影响。结果表明,以 3 种提取方法获得的 DNA 为模板均能进行 16S rDNA V3 区特异性片段扩增;但不同 DNA 提取方法对池塘不同生境菌群 DGGE 指纹图谱存在显著影响。DGGE 指纹图谱显示草鱼肠道内容物菌群(溶菌酶法)与肠道壁菌群(溶菌酶法)存在较高一致性,底泥菌群(CTAB 法)及饲料菌群(溶菌酶法)与鱼体肠道菌群(包括内容物菌群和肠道壁菌群)则存在明显差异,但肠道菌群与底泥菌群的相似度相对更高。研究提示采用微生物分子生态学工具对养殖池塘不同生境进行菌群结构分析时,需提前优化 DNA 提取方法;在以投饲为主的养殖鱼塘中,草鱼肠道菌群更多源自于池塘底泥。

关键词:养殖池塘;菌群;PCR-DGGE

中图分类号:S962.3⁺² 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2009)01-0073-07

Effects of Three Different DNA Extraction Methods on the Analysis of Bacteria Community from Different Micro-ecological Environments in a Farming Pond by PCR-DGGE

HE Su-xu¹, ZHOU Zhi-gang¹, YAO Bin¹, BAI Dong-qing²

(1. Key Laboratory for Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. Tianjin Key Laboratory of Aqua-ecology and Aquaculture, Fisheries Science Department, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: This study compared the effects of three different DNA extraction methods (lysozyme digestion, CTAB method and bead mill) on analyzing bacteria from different micro-ecological environments in an farming pond (pond sludge, feed, intestinal content and intestinal wall of grass carp) by PCR-DGGE. The results showed that 16S rDNA V3 fragments were successfully amplified from samples extracted by three DNA extraction methods in all micro-ecological environments; but different DNA extraction methods had remarkable influence on DGGE fingerprints of bacteria under different micro-ecological environments. The cluster analysis of DGGE fingerprints showed that the bacterial community of intestinal content (lysozyme digestion) was almost identical to that of intestinal wall (lysozyme digestion) in grass carp, while the bacterial community of pond sludge (CTAB method) or feed (lysozyme digestion) showed obvious difference to the intestinal bacterial community of grass carp. However, the bacterial community of pond sludge was more similar to intestinal bacterial community compared to that of feed. This study indicated that DNA extraction method should be optimized before analyzing the structure of bacterial community under different micro-ecological environments in an farming pond, and most of the intestinal microbiota in grass carp were derived from the pond sludge in the feed-fed farm pond.

Key words: aquaculture pond; bacterial community; PCR-DGGE

池塘养殖是我国水产养殖的主要作业模式。近年来随着集约化程度不断提升,池塘养殖的负面效应越来越突出:疾病频发导致食品安全问题、养殖排放致使环境污染等。鱼体免疫力调控及养

收稿日期:2008-10-21;修回日期:2008-11-17

基金项目:国家 863 计划项目(2007AA100605);天津市农业科技合作项目(0704090)资助。

作者简介:何凤旭,硕士研究生,主要从事水产动物消化道分子生态学研究。通讯作者:周志刚,副研究员,博士,硕士生导师,从事水产微生物工程及水产动物营养与饲料研究。Tel:010-82106073;E-mail:zhou_zg@msn.com

殖废物排放控制一直是水产养殖的研究热点,添加微生物制剂是目前公认的有效解决措施之一^[1~5]。对养殖池塘包括饵料、养殖对象、水、池塘底泥等在内的不同生境的微生物群落进行调查,则是筛选原位微生物制剂的工作基础。

由于常规的平板培养法在微生物学研究上存在太多局限性,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)作为一种免培养的微生物分析手段逐步引起人们的重视^[6~8],并已应用到水产养殖中,在水产菌群结构分析中发挥着重要作用^[9~13]。菌群 DNA 提取是 DGGE 分析的重要环节,已有文献关于水产微生物群落 DNA 提取方法的报道并不统一,常见手段包括溶菌酶法^[10]、CTAB 法^[15]及珠磨法^[5]等,然而不同 DNA 提取方法是否会影响养殖池塘菌群分子生态的分析,目前报道并不多见,Luo 等^[14]曾详细比较了 7 种 DNA 提取方法对草鱼池塘菌群 DGGE 分析的影响。养殖池塘存在几个典型生境,包括池塘底泥、饵料、鱼肠道内容物及鱼肠道壁等,其中蕴藏着丰富的功能微生物,有必要进行解析,另外,探讨这些微生境之间在结构上的相关性对于微生物制剂的施加途径也具有指导意义。因此,本文探讨几种常用 DNA 提取方法对养殖池塘复杂生境微生物群落 PCR-DGGE 分析的影响,并尝试解释这些生境菌群之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 样品准备

取样养殖池塘位于江苏省南京市,面积约 6.67 hm²,水深约 1.5 m,系长江沿岸芦苇荡改造而成。2008 年 3 月首次人工放苗,为混养模式,放养品种包括鳊鱼、鲢鱼、草鱼、团头鲂及鲫鱼等,于 2008 年 5 月上旬投喂商品饲料(江苏省丹阳市乐开怀饲料有限公司提取,粗蛋白 28%)。取样时间为 2008 年 6 月 8 日上午,在第一次投料结束后 1 h 内,取样时用抛网随机捕获 3 尾草鱼(平均体重 2 kg),在无菌条件下收集鱼肠道置于无菌塑料封口袋中,于冰块中保存;从投饵机中收集约 30 g 饲料置于无菌塑料封口袋中,于冰块中保存;用底泥采样器从池塘中央采集底泥,置于无菌塑料封口袋中,于冰块中保存。全部样品于 12 h 内移至中国农业科学院饲料研究所生物工程

研究室,在无菌操作台上进行 3 尾鱼肠道内容物与肠道壁分离^[16],将分离后的样品混匀,装入样品管,并分装底泥及饲料样品,-20℃条件下保存,待分析。

1.2 总 DNA 提取

本实验测试样品对象包括:池塘底泥、饵料、草鱼肠道内容物、草鱼肠道壁。本实验所比较的 DNA 提取方法包括溶菌酶法^[10]、CTAB 法^[15]及珠磨法^[5],所获 DNA 均经过商业纯化试剂盒(TIANquick Midi Purification Kit)进行纯化并用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 扩增与变性梯度凝胶电泳(DGGE)

针对 16S rDNA V3 区片段的 PCR 扩增、PCR 反应条件及 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳回收纯化步骤、变性梯度凝胶电泳操作过程参考 Liu 等^[6]和 Zhou 等^[7]方法。电泳结束后,将凝胶进行 EB 染色。将染色后凝胶在 Vilber 凝胶成像扫描系统中获取胶图,用 Bio-1D++ 软件进行 DGGE 指纹图谱聚类分析及相似系数矩阵分析^[5~7, 16],用 NIH 图像软件(<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>)对图谱图像进行分析^[17]。

2 结果

2.1 养殖池塘原位生境总 DNA 的提取及 16S rDNA V3 区片段 PCR 扩增

将不同方法提取的样品 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳,如图 1 所示 1~12 样品。对底泥样品总 DNA 的提取,珠磨法在 1.0 kb 以上最亮,CTAB 法次之,溶菌酶法最弱;饵料样品总 DNA 的提取则以溶菌酶法及 CTAB 法较亮,而珠磨法较弱;肠道内容物及肠道壁样的提取以 CTAB 法较亮,而溶菌酶法与珠磨法均较弱。12 个总 DNA 样品的 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测均呈阳性,经 PCR 扩增后获得的样品微生物的 16S rDNA 基因片段大小约为 200 bp,是 16S rDNA V3 区特异性片段。

2.2 养殖池塘不同生境菌群 16S rDNA-DGGE 指纹图谱建立、聚类分析及种群丰度分析

养殖池塘不同生境菌群 16S rDNA V3 区片段的 DGGE 指纹图谱及聚类分析结果如图 2、图 3

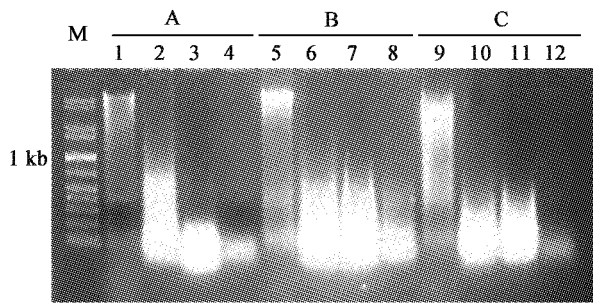


图 1 养殖池塘不同生境样品不同 DNA 提取方法提取总 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the community DNA extracted from different micro-ecological environments in a farming pond by different DNA extraction methods.

1,5,9: 池塘底泥样品; 2,6,10: 饲料样品; 3,7,11: 草鱼肠道内容物样品; 4,8,12: 草鱼肠道壁样品

A: 溶菌酶法; B: CTAB 法; C 珠磨法

1,5,9: Pond sludge sample; 2,6,10: Feed sample; 3,7,11: Intestinal content sample; 4,8,12: Intestinal wall sample.

A: Lysozyme digestion; B: CTAB method; C: Bead mill.

及表 1, 图谱图像分析结果见图 4 ~ 图 6。不同 DNA 提取方法对养殖池塘不同生境菌群的 DGGE 指纹图谱影响不尽相同。

2.2.1 底泥样品 不同 DNA 提取方法所获得的 DGGE 指纹图谱相似度较差, 相似系数均低于

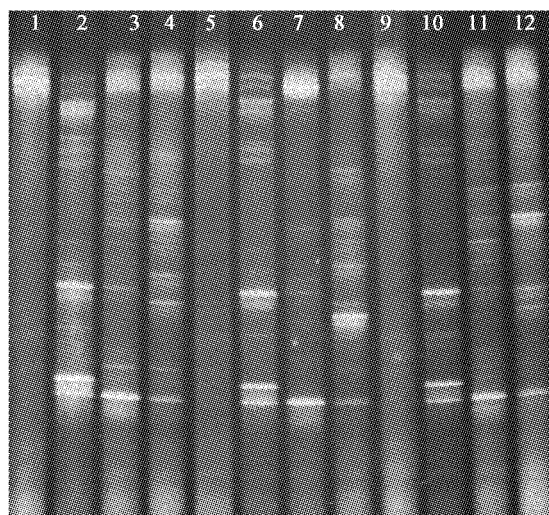


图 2 不同 DNA 提取方法养殖池塘不同生境菌群 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 2 The PCR-DGGE fingerprints of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from different micro-ecological environments in a farming pond by different DNA extraction methods.

0.70, 溶菌酶法(样品 1)与 CTAB 法(样品 5)相似系数为 0.62, 溶菌酶法与珠磨法(样品 9)相似系数为 0.55, 而 CTAB 法与珠磨法相似系数相对最高为 0.67(图 2、图 3, 表 1), 图谱图像分析(图 4)表明通过 CTAB 法可侦测的优势条带数最多(约 21 条)、条带更清晰锐利, 珠磨法次之(约 17 条), 而溶菌酶法最差(约 15 条)。

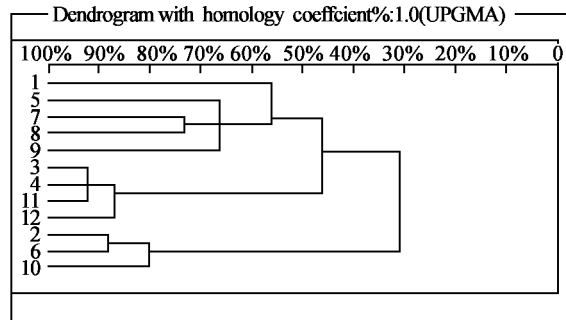


图 3 不同 DNA 提取方法养殖池塘不同生境菌群 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 The dendrogram of the PCR-DGGE fingerprint of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from different micro-ecological environments in a farming pond by different DNA extraction methods.

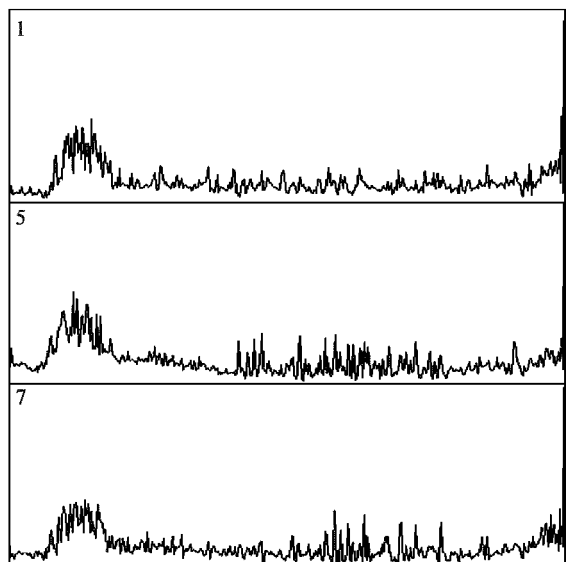


图 4 不同 DNA 提取方法池塘底泥样品 16S rDNA V3 区 DGGE 指纹图谱图像分析

Fig. 4 Image analysis of the PCR-DGGE fingerprints of the V3 region of 16S rDNA of pond sludge sample in a farming pond by different DNA extraction methods.

1: 溶菌酶法; 5: CTAB 法; 7: 珠磨法

1: Lysozyme digestion; 5: CTAB method; 7: Bead mill.

表 1 不同 DNA 提取方法养殖池塘不同生境菌群结构相似系数矩阵

Table 1 Pairwise similarity coefficients matrix of different micro-ecological environments in a farming pond by different DNA extraction methods.

样本 Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.00											
2	0.40	1.00										
3	0.43	0.44	1.00									
4	0.48	0.36	0.93	1.00								
5	0.62	0.29	0.48	0.54	1.00							
6	0.32	0.89	0.46	0.38	0.30	1.00						
7	0.53	0.43	0.58	0.57	0.63	0.36	1.00					
8	0.63	0.42	0.63	0.69	0.71	0.43	0.74	1.00				
9	0.55	0.32	0.37	0.42	0.67	0.22	0.57	0.67	1.00			
10	0.27	0.80	0.47	0.40	0.43	0.83	0.48	0.46	0.38	1.00		
11	0.48	0.48	0.93	0.84	0.54	0.50	0.57	0.69	0.42	0.51	1.00	
12	0.48	0.48	0.88	0.89	0.54	0.50	0.50	0.69	0.42	0.51	0.89	1.00

2.2.2 饲料样品 不同 DNA 提取方法获得的 DGGE 指纹图谱相似度较高,相似系数均高于 0.80,溶菌酶法(样品 2)与 CTAB 法(样品 6)相似系数为 0.89,溶菌酶法与珠磨法(样品 10)相似系数为 0.80,CTAB 法与珠磨法相似系数为 0.83,图谱图像分析(图 5)表明溶菌酶法侦测的优势条带数最多(约 31 条),CTAB 法侦测到的优势条带数次之(约 27 条),珠磨法最少(约 20 条),3 种方法获得的条带清晰度一致,优势条带位置较为一致。

2.2.3 草鱼肠道内容物样品 不同 DNA 提取方法获得的 DGGE 指纹图谱相似度反差大,溶菌酶法(样品 3)与 CTAB 法(样品 7)相似系数为 0.58,溶菌酶法与珠磨法(样品 11)相似度最高,相似系数达 0.93,而 CTAB 法与珠磨法相似系数仅 0.57,图谱图像分析(图 6)表明通过溶菌酶法(约 25 条)与珠磨法(约 25 条)可侦测到的优势条带最多、清晰度较高,CTAB 法(约 19)表现较差,但溶菌酶法与珠磨法侦测到的优势条带位置与峰值存在一定差别。

2.2.4 草鱼肠道壁样品 不同 DNA 提取方法获得的 DGGE 指纹图谱相似度反差较大,溶菌酶法(样品 4)与 CTAB 法(样品 8)相似系数为 0.69,溶菌酶法与珠磨法(样品 12)相似度最高,相似系数为 0.89,而 CTAB 法与珠磨法相似系数仅 0.69,

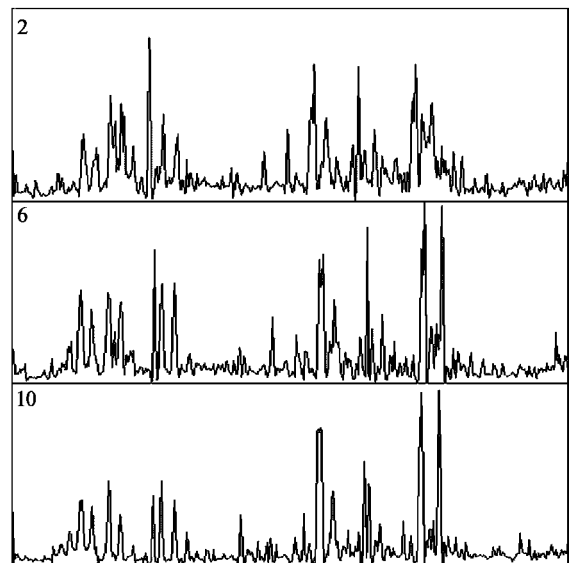


图 5 不同 DNA 提取方法饲料样品 16S rDNA V3 区 DGGE 指纹图谱图像分析

Fig. 5 Image analysis of the PCR-DGGE fingerprints of the V3 region of 16S rDNA of feed sample in a farming pond by different DNA extraction methods.

2: 溶菌酶法;6: CTAB 法;10: 珠磨法

2: Lysozyme digestion; 6: CTAB method; 10: Bead mill.

图谱图像分析(图 7)表明通过溶菌酶法可侦测到的优势条带数最多(约 34 条)、清晰度最高,珠磨法次之(约 29 条),CTAB 法表现最差(约 23 条)。

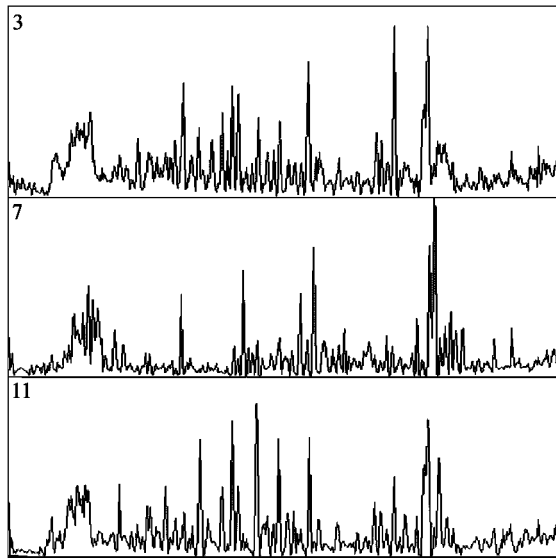


图 6 不同 DNA 提取方法草鱼肠道内容物样品 16S rDNA V3 区 DGGE 指纹图谱图像分析

Fig. 6 Image analysis of the PCR-DGGE fingerprints of the V3 region of 16S rDNA of intestinal content sample of grass carp in a farming pond by different DNA extraction methods.

3: 溶菌酶法; 7: CTAB 法; 11: 珠磨法

3: Lysozyme digestion; 7: CTAB method; 11: Bead mill.

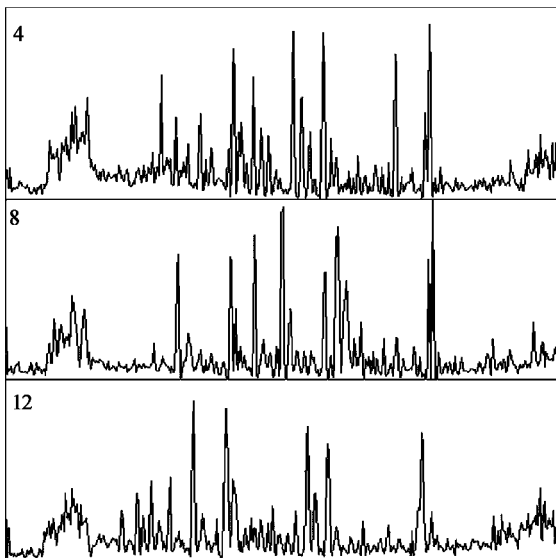


图 7 不同 DNA 提取方法草鱼肠道壁样品 16S rDNA V3 区 DGGE 指纹图谱图像分析

Fig. 7 Image analysis of the PCR-DGGE fingerprints of the V3 region of 16S rDNA of intestinal wall sample of grass carp in a farming pond by different DNA extraction methods.

4: 溶菌酶法; 8: CTAB 法; 12: 珠磨法

4: Lysozyme digestion; 8: CTAB method; 12: Bead mill.

综上所述,池塘底泥样品更适合于 CTAB 法;饲料样品更适合于溶菌酶法;草鱼肠道内容物样品适合于溶菌酶法与珠磨法;草鱼肠道壁样品适合于溶菌酶法。

2.3 养殖池塘不同生境菌群结构比较分析

作为养殖池塘 4 个特殊生境来源,池塘底泥、饲料、鱼肠道内容物与肠道壁的菌群结构存在显著区别:草鱼肠道内容物(溶菌酶法)与肠道壁(溶菌酶法) DGGE 指纹图谱相似系数为 0.93,底泥(CTAB 法)与肠道内容物(溶菌酶法)及肠道壁(溶菌酶法)指纹图谱相似系数分别为 0.48 及 0.54,饲料(溶菌酶法)与肠道内容物(溶菌酶法)及肠道壁(溶菌酶法)相似系数分别为 0.44 及 0.36,池塘底泥(CTAB 法)与饲料(溶菌酶法)间的相似系数最差,仅 0.29。结果表明草鱼肠道内容物菌群与肠道壁菌群存在较高一致性,底泥菌群及饲料菌群与鱼体肠道菌群存在明显差异,但底泥菌群与肠道菌群的相似度相对更高。

3 讨论

本研究表明,不同 DNA 提取方法对养殖池塘包括底泥、饲料、鱼肠道内容物或鱼肠道壁等复杂生境菌群 DGGE 指纹图谱存在明显影响,与 Luo 等^[14]关于草鱼池塘水菌群的研究报道一致。Luo 等^[14]对草鱼池塘水样品尝试了 7 种 DNA 提取方法,每种方法所获得 DGGE 指纹图谱不尽相同,表现在优势条带数目与条带亮度不一致,主要原因在于不同 DNA 提取方法会导致弱势条带产生亮度上的变化,其中微波消解法获得的优势条带数目最多。本研究以优势条带数作为判断依据,发现溶菌酶法与珠磨法均适用于草鱼肠道内容物样,但这两种方法获得的优势条带位置与亮度不尽相同,需要进一步甄别。

DNA 提取方法影响 DGGE 指纹图谱的可能原因有:①不同 DNA 提取方法导致微生物的不同裂解度^[14],所释放的核酸数量不尽相同,因此可作为 PCR 模板的 DNA 数量在不同方法中并不一致;②不同 DNA 提取方法导致抑制剂残留水平不同,会在不同程度上影响 PCR 的特异性扩增^[18];③不同 DNA 提取方法可导致小 DNA 片段产生的数量不同,这些小 DNA 片段会影响 PCR 扩增的

敏感性^[19],同时也增加了嵌套作用的可能性^[20],从而可能对 DGGE 的结果产生影响。DNA 提取质量的高低一般通过测定 DNA 的产率与纯度来判断,但由于本研究对象养殖池塘生境具有复杂性,包括大量非目的 DNA 片段,并且 DNA 产率与纯度无法单方面说明 DGGE 指纹图谱的可靠性^[18],而且本研究中 3 种方法获得的总 DNA 均经过商业试剂盒进行纯化,因而本文并未就这两个参数展开探讨。另外,小 DNA 片段也会影响到 DGGE 结果^[19,20],因此本文直接以 DGGE 指纹图谱所反应的微生物多样性进行判别,来选定养殖池塘不同复杂生境菌群 DNA 的适宜提取方法。总 DNA 电泳图(图 1)也证实了这一点,底泥样品总 DNA 以珠磨法提取在 1.0 kb 以上最亮,饲料样以溶菌酶法及 CTAB 法较亮,肠道内容物及肠道壁样以 CTAB 法较亮,与我们通过优势条带数所判定的适宜提取方法并无一致性。

通过 DGGE 指纹图谱聚类分析表明,草鱼肠道内容物与肠道壁菌群结构较为一致,这与周志刚等^[16]关于圆白鲟的报道一致。从圆白鲟肠壁及肠道内容物样品的 DGGE 基因指纹图谱来看,二者具有相近的条带数、条带位置及相对丰度,显示二者菌群结构多样性接近(相似系数为 0.82),提示肠壁菌群大多源于其内容物。本研究显示草鱼肠道内容物与肠道壁菌群结构相似度更高(相似系数为 0.93),表明二者之间微生物多样性更趋于一致,可能与养殖品种、养殖环境、摄食饵料等不同有关,需要进一步研究。本研究结果表明池塘底泥与饲料菌群的相关性不大(相似系数为 0.29),这与实际情况相符。因为商业饲料中没有添加任何微生态制剂,同时草鱼肠道菌群结构与底泥或饲料菌群结构相似性均不高(相似系数 < 0.55),显示出草鱼肠道微生态环境的特殊性。也可能与草鱼的草食性摄食习惯有关,因为养殖池塘是经芦苇塘改造而成,池塘一部分区域仍生长有芦苇。但也表现出一定的相似度(相似系数 > 0.35),这是因为草鱼摄食饲料及吸收池塘水,而养殖水体菌群绝大部分来源于底泥^[21],其中草鱼肠道内容物及肠道壁菌群结构与底泥的相似系数更高(分别为 0.48 及 0.54;表 1),而与饲料的略低(分别为 0.44 及 0.36;表 1),暗示底泥(或水体)影响程度大于摄食饲料,可能是因为草鱼每天饱食 2 次饲料,而排空时间在 4 h 以内(水温

约 25℃),而草鱼吸收池塘水是不间断的,并且不难发现底泥更大程度影响的是肠道壁菌群,而饲料影响的是肠道内容物菌群。

参 考 文 献

- [1] Lilly D M, Stillwell R H. Probiotics growth promoting factors produced by micro-organisms [J]. Science, 1965, 147: 747 - 748.
- [2] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture [J]. Aquaculture, 2001, 200: 223 - 247.
- [3] 王 华,陈有容. 益生菌和水产动物饲料添加剂 [J]. 中国微生物学杂志, 2001, 13(3): 181 - 182, 186.
- [4] Irianto A, Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. J. Fish Dis., 2002, 25: 633 - 642.
- [5] 周志刚, 石鹏君, 姚 斌, 等. 基于 PCR-DGGE 指纹图谱川纹笛鲷及圆白鲟消化道壁优势菌群结构比较分析 [J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 78 - 84.
- [6] 刘玉春, 周志刚, 石鹏君, 等. 网箱养殖青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群的 PCR-DGGE 比较分析 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(1): 76 - 81.
- [7] Liu Y, Zhou Z, Yao B, et al. The effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient Gel electrophoresis (DGGE) [J]. Aquacult. Res., 2008, 39: 635 - 646.
- [8] Zhou Z, He S, Liu Y, et al. The effects of dietary yeast culture or short-chain fructo-oligosaccharides on the intestinal autochthonous bacterial communities in juvenile hybrid tilapia. *Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂ [J]. J. World Aquacult. Soc., 2009, in press.
- [9] 李志勇, 何丽明, 吴 杰, 等. 基于 PCR-DGGE 基因指纹图谱的对虾体内优势细菌的组成分析 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 82 - 86.
- [10] 杨桂梅, 唐文乔, 李会荣, 等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方鲀的弧菌菌群组成 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 257 - 263.
- [11] 罗 鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析 [J]. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 49 - 55.
- [12] Li K, Guan W, Wei G, et al. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. J. Appl. Microbiol., 2007, 103(3): 1 - 8.
- [13] 钱丽君, 张德民, 徐小红. 应用 DGGE 分析三疣梭子蟹养殖塘底泥细菌的多样性 [J]. 水产学报, 31(2): 204 - 210.
- [14] Luo P, Hu C, Zhang L, et al. Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rRNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water [J]. Chin. J. Oceanol. Limnol., 2007, 25(3): 310 - 316.
- [15] 向少能, 陈 琳, 何晓丽, 等. 水体微生物多样性 PCR-DGGE 分析方法的比较研究 [J]. 重庆工学院学报, 2007, 21(13): 74 - 78, 97.
- [16] 周志刚, 石鹏君, 姚 斌, 等. 圆白鲟 *Ephippus orbis* 消化道

- 菌群 PCR-DGGE 基因指纹图谱构建[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 140-144.
- [17] Simpson J M, McCracken V J, White B A, *et al.*. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota[J]. J. Microbiol. Met., 1999, 36: 167-179.
- [18] 徐晓宇, 闵航, 刘和, 等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 377-381.
- [19] Kuske C R, Banton K L, Adorada D L, *et al.*. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 2463-2472.
- [20] Chandler D P, Frederickson J K, Brockman J. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries[J]. Mol. Ecol., 1997, 6: 475-482.
- [21] 黄光祥. 养殖鱼肠道菌群分子生态的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 硕士学位论文, 2008.

【863 课题介绍】

课题名称: 有机磷降解酶及毒素解毒酶的分子改良与产品研制

子课题名称: 产 N-酰化高丝氨酸内酯水解酶微生物筛选、基因克隆、高效表达及性质研究

课题编号: 2007AA100605

所属专题: 农业蛋白质工程技术与产品

课题内容:

针对当前已分离得到的有机磷降解酶、黄曲霉毒素解毒酶和 N-酰化高丝氨酸内酯降解酶的缺陷与不足, 以蛋白质组学和生物信息学为基础, 利用基因改组、定点突变、随机突变、蛋白质分子修饰等手段及蛋白质分子设计技术, 结合生物信息学理论, 对有机磷降解酶、黄曲霉毒素解毒酶关键氨基酸残基的分析, 并通过理性设计和密码子偏好性改造等, 着重对酶蛋白特性进行分子改良, 筛选出具有更加优良特性的蛋白质分子, 建立酶蛋白的分子改良和修饰技术的方法体系。进一步构建高效重组生物反应器, 研究改良酶的高效发酵技术和酶的后加工技术, 实现产业化廉价生产。

课题目标:

针对当前已分离得到的有机磷降解酶、黄曲霉毒素解毒酶和 N-酰化高丝氨酸内酯降解酶的缺陷, 利用基因改组、定点突变、随机突变、蛋白质分子修饰等手段及蛋白质分子设计技术, 着重对酶蛋白特性进行分子改良, 筛选出具有更加优良特性的蛋白质分子, 建立酶蛋白的分子改良和修饰技术的方法体系。进一步构建高效重组生物反应器, 研究改良酶的高效发酵技术和

酶的后加工技术, 实现产业化廉价生产。

子课题目标:

构建高效重组生物反应器, 研究改良酶的高效发酵技术和酶的后加工技术, 实现产业化廉价生产。N-酰化高丝氨酸内酯降解酶的表达量达到 0.5 g/L, 效价达到 20 IU/mL。

子课题进展:

1. 成功构建革兰氏阴性菌信号分子鉴定平台并实施。

2. 解析不同养殖环境微生态结构, 并高通量筛选来源于池塘底泥产 N-酰化高丝氨酸内酯水解酶菌株。

从天津鱼塘、长江下游鱼塘及蟹塘已筛到的产酶菌株包括 *Bacillus* sp. B-26、*Bacillus* sp. C-18、*Bacillus* sp. W28、*Bacillus* sp. C-24、*Rahnella* sp. BIHB 783, 这一工作仍将从不同养殖环境延续, 寻找新的产酶菌株及新基因。本文即是这部分研究的成果之一。

3. 确立 N-酰化高丝氨酸内酯水解酶活性单位。

4. 构建 N-酰化高丝氨酸内酯水解酶基因毕赤酵母表达元件, 并实施高效表达研究。