

### 3种提取河豚鱼肠道微生物总DNA的方法比较

李丹, 潘迎捷, 赵勇, 孙晓红\*

(上海海洋大学食品学院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:**目的: 建立一种有效、节约的河豚鱼肠道内容物总DNA提取方法, 应用于聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)等分子生物学研究。方法: 采取苯酚-氯仿-异戊醇抽提法, QIAamp DNA Stool Mini Kit, 改良FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil这3种DNA提取方法, 并结合PCR-DGGE技术分析河豚鱼肠道微生物多样性。结果: 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法与QIAamp DNA Stool Mini Kit提取的DNA量远高于改良FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil, 并且包含的微生物多样性较高。结论: 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法作为一种有效、节约的DNA提取方法, 可应用于肠道微生物多样性研究。

**关键词:** 肠道内容物; DNA提取; 微生物多样性; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)

#### Comparison of Three Methods for Total DNA Extraction of Intestinal Microorganisms in Puffer Fish

LI Dan, PAN Ying-jie, ZHAO Yong, SUN Xiao-hong\*

(Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing and Preservation, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Objective: To establish an effective and economical method for total DNA extraction from intestinal contents in puffer fish. Methods: Three DNA extraction methods including phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction method, QIAamp DNA Stool Mini Kit, modified FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for soil were designed and used in combination with polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique to analyze the microbial diversity in the intestine of puffer fish. Results: Much more DNA and higher microbial diversity were extracted by phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction method and QIAamp DNA Stool Mini Kit compared with modified FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for soil. Conclusion: Phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction method is an effective and economical method for DNA extraction, and can be applied for studying microbial diversity.

**Key words:** intestinal contents; DNA extraction; microbial diversity; polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

中图分类号: S965.225; Q503

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0154-04

野生河豚鱼肉味鲜美但有剧毒<sup>[1]</sup>, 近年来研究发现养殖河豚鱼毒性降低或没有毒性。随着各地相继颁发实行河豚鱼管理试行办法, 同时为了保护自然资源、开发地方特色优良品种, 河豚鱼养殖业逐渐发展起来。由于肠道微生物在维持肠道功能及机体健康等方面发挥重要作用, 因此评估河豚鱼养殖质量的一项重要指标是肠道微生物组成。传统研究鱼体内微生物组成的方法主要

是通过培养分离细菌, 但研究表明<sup>[2]</sup>依靠培养获得的肠道菌群不足总量的10%, 因此必须发展不依靠培养的分子生物学技术。目前已有很多针对肠道微生物多样性分析的分子生物学方法, 如变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)<sup>[3]</sup>、克隆文库<sup>[4-6]</sup>、焦磷酸测序<sup>[7]</sup>等, 这些技术均建立在肠道微生物总DNA提取的基础之上。肠道微生物DNA提取方法有很多,

收稿日期: 2011-05-28

基金项目: 上海市科委“创新行动计划”部分地方院校计划项目(08390513900);

上海市教育委员会重点学科建设项目资助(J50704); 上海市科委工程中心建设基金项目(11DZ2280300)

作者简介: 李丹(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子微生物学。E-mail: egg19870614@163.com

\*通信作者: 孙晓红(1976—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品安全、食品微生物。E-mail: xhsun@shou.edu.cn

但由于样品和操作方法的差异, DNA 提取质量有差异, 后续 PCR 等分子生物学技术的结果也有差异。为了今后研究河豚鱼肠道微生物多样性, 本实验主要探索河豚鱼肠道微生物总 DNA 的 3 种不同提取方法: FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 试剂盒; 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法, 并进行适当改进; QIAamp DNA Stool Mini Kit 商业试剂盒。通过比较分析, 以期建立一种高效、节约的提取河豚鱼肠道微生物总 DNA 的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

人工养殖一龄暗纹东方豚, 采自上海能正渔业科技开发有限公司。

Taq<sup>™</sup> 日本 TaKaRa 公司; QIAamp DNA Stool Mini Kit 德国 Qiagen 公司; FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 美国 MP Biomedicals 公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

SMA4000 微量紫外-可见分光光度计 美林恒通技术有限责任公司; D-Code System 电泳仪、GelDocXR 凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司; pH 测定仪 瑞士梅特勒-托利多公司; DK-8D 型电热恒温水槽 杭州博日科技有限公司; 236HK 高速冷冻离心机 上海申生科技有限公司; PCR 仪 德国 Eppendorf 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品预处理

用无菌氧气袋将采集到的人工养殖一龄暗纹东方豚运回实验室, 立刻在无菌条件下解剖取肠道, 用无菌剪刀剪开肠道, 收集肠道内容物于无菌冻存管中密封保存, 置于-80℃保存备用。

#### 1.3.2 肠道内容物微生物总 DNA 的提取

方法一: 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法, 参考《分子克隆实验指南》(第三版)<sup>[8]</sup>, 并作改进。取 0.2g 肠道内容物, 加入 500 μL 含有 0.1% Tween-20 的磷酸盐缓冲液。高速振荡 45s, 迅速置于冰上 2min, 反复 4 次。于 5000r/min 离心 10min 收集上清。重复上述操作, 合并两次上清液, 12000r/min 离心 10min 收集沉淀。加入 500 μL SDS 提取液(包括 100mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 50mmol/L EDTA, 250mmol/L NaCl)重新悬浮, 加入 50 μL 10% SDS 混匀; 65℃水浴 10min; -80℃冷冻 5min, 65℃水浴 10min, 反复 3 次。用等体积酚抽提, 再用等体积氯仿-异戊醇(体积比 24:1)抽提。用异丙醇沉淀, 再用 70% 乙醇洗涤 2 次(12500r/min, 10min)。最后用 100 μL 灭菌蒸馏水溶解。加入 2 μL RNase A, 37℃水浴 30min。

方法二: 改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil。参考

More 等<sup>[9]</sup>对肠道内容物进行前处理, 并做适当改进。取 0.2g 肠道内容物, 加入 1mL 0.2mol/L 磷酸钠(pH7.2), 10000 × g 离心 10min 收集沉淀。加入 1mL 磷酸钠重新悬浮沉淀, 9500 × g 离心 1min 收集沉淀。加入 150 μL TNE Buffer(含有 40mmol/L、pH7.5 Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA)和 150 μL TNS Buffer(含有 0.5mmol/L、pH8.0 Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, 4% SDS)。65℃水浴 5min, 液氮冷冻 2min, 反复 4 次。产物转移至 Lysing Matrix E Tube(FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil), 加入 600 μL TNE Buffer。高速振荡 45s, 迅速置于冰上 2min, 反复 4 次。14000 × g 离心 10min 收集上清, 然后参考试剂盒说明书进行操作。

方法三: QIAamp DNA Stool Mini Kit。取 0.2g 肠道内容物参考试剂盒说明书操作。

#### 1.3.3 肠道微生物总 DNA 分子质量和质量浓度检测

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的分子质量, GelDocXR 凝胶成像系统观察并照相。同时, 使用微量紫外分光光度计检测所提取 DNA 的质量浓度, 分别测定 260nm 和 280nm 波长处的吸光度, 记为  $A_{260nm}$  和  $A_{280nm}$ , 根据  $A_{260nm}/A_{280nm}$  比值来判断 DNA 的纯度。

#### 1.3.4 PCR 扩增 V3 区

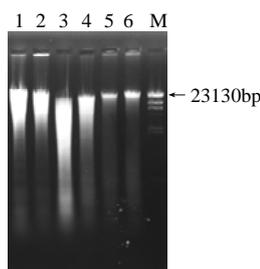
以上述 3 种方法提取的 DNA 为模板, 对 V3 区片段进行扩增。采用 V3 区特异性引物: 341f(5' -CCTACGGGAGGCA GCAG-3'), 并且在其 5' 端加入 1 段 GC 夹子(CGCCCGC CGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG)和 518r(5' - ATTACCGCGGCTGCTGG -3')<sup>[10]</sup>。PCR 反应体系: 10 × PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus)2.5 μL, 2.5mmol/L dNTP 2.5 μL, 25 μmol/L 引物各 1 μL, 5U/μL Taq 酶 0.3 μL, 模板 DNA 1.5 μL, 蒸馏水补足体积至 25 μL。PCR 反应条件: 95℃预变性 3min; 然后 95℃变性 1min, 55℃退火 1min, 72℃延伸 30s, 25 个循环; 最后 72℃延伸 10min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

#### 1.3.5 DGGE 实验

利用 D-Code System 电泳仪进行 DGGE 实验。具体条件: 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度为 30% ~ 60% (100% 变性胶中含有 7mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺), 电泳缓冲液为 1 × TAE。以步骤 1.3.4 节所得 PCR 产物为模板, DGGE 上样量为 2 μL。电泳参数: 温度 60℃, 电压 100V, 时间 5h。电泳结束, 用 SYBR Green I 染色 3 次, 每次 10min。用 GelDocXR 凝胶成像系统拍照, 用 Image Lab 软件分析图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 分子质量



M.  $\lambda$  DNA/*Hind* III; 1, 2. QIAamp DNA Stool Mini Kit; 3, 4. 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法; 5, 6. 改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil.

图1 河豚鱼肠道微生物总 DNA 琼脂糖电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA from intestinal bacteria in puffer fish

如图1所示, 改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 所提 DNA 条带单一清晰, 且较为明亮, 片段大小为 23000bp 左右。苯酚-氯仿-异戊醇抽提法与 QIAamp DNA Stool Mini Kit 所提取 DNA 条带亮度很高, 片段大小跨度较大, 原因可能是提取过程中部分细菌 DNA 发生不同程度的降解, 也可能是操作过程中剧烈振荡将大片段 DNA 分子断裂成较小片段, 但不影响后续 V3 区扩增。分析琼脂糖凝胶电泳图谱得出, 从 DNA 提取量角度出发, QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取 DNA 效果最优, 其次是苯酚-氯仿-异戊醇抽提法, 再次是改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil。改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 所得条带亮度不如苯酚-氯仿-异戊醇抽提法和 QIAamp DNA Stool Mini Kit 所得条带, 可能是由于 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 中的过滤柱子专门针对底泥颗粒样品, 而肠道内容物较为黏稠, 黏稠物在过滤过程中堵塞滤膜, 未能将 DNA 完全过滤出来, 造成损失。

## 2.2 紫外分光光度法检测 DNA 质量浓度

表1 紫外分光光度法检测河豚鱼肠道微生物总 DNA 质量浓度  
Table 1 Total DNA concentration extracted from intestinal bacteria of puffer fish (as determined by UV spectroscopy)

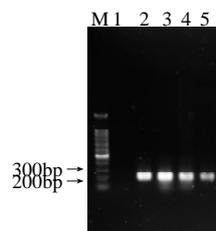
DNA 提取方法	$A_{260nm}/A_{280nm}$ 比值	DNA 质量浓度/(ng/ $\mu$ L)
QIAamp DNA Stool Mini Kit	1.91	1471.53
苯酚-氯仿-异戊醇抽提法	1.96	707.93
改良 FastDNA <sup>®</sup> SPIN Kit for Soil	2.00	17.63

从表1可以看出, 3种 DNA 提取方法所得  $A_{260nm}/A_{280nm}$  比值均处于 1.8~2.0 之间, 表明所提取的 DNA 都较为纯净。QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取 DNA 质量浓度最高, 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法次之, 改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 最低。

## 2.3 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物

以3种提取方法所得 DNA 为模板, 阴性对照组用无菌去离子水作为模板, 阳性对照组用 ATCC33846 副溶

血性弧菌的 DNA 作为模板, 对 16S rRNA 基因上 V3 区进行扩增。琼脂糖凝胶电泳图谱见图2, 3种提取 DNA 的方法所得的 PCR 产物大小均为 230bp 左右, 条带明亮单一, 表明3种方法所提的基因组 DNA 较纯, 可用于 PCR 扩增。

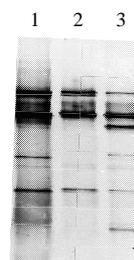


M. 100bp DNA Ladder; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3. QIAampDNA Stool Mini Kit; 4. 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法; 5. 改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil.

图2 PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

## 2.4 DGGE 凝胶电泳



1. 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法; 2. 改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil; 3. QIAamp DNA Stool Mini Kit.

图3 不同提取方法河豚鱼肠道微生物 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.3 PCR-DGGE fingerprints of the V3 region of 16S rDNA extracted from intestinal bacteria in puffer fish by different DNA extraction methods

DGGE 图谱用来反映样品中微生物多样性, 图谱上不同泳道中处于同一位置的条带代表同一种细菌。如图3所示, 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法与 QIAamp DNA Stool Mini Kit 所得的 DGGE 图谱包含的条带数目相同, 均为 14 条, 且条带位置均一致。改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 所得的 DGGE 图谱包含 8 条条带, 且与另两种方法所得 DGGE 图谱条带位置相对应。由此得出, 由苯酚-氯仿-异戊醇抽提法提取的 DNA 经 PCR-DGGE 分析后, 所反映的微生物多样性与由 QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取的 DNA 所反映的微生物多样性一致。而改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 提取的 DNA 所反映的微生物多样性不如前两种 DNA 提取方法。

### 3 结论与讨论

近年来随着河豚鱼养殖业的发展, 养殖河豚鱼的经济价值逐渐提高, 人们对于河豚鱼的需求也日益增加。但食用河豚鱼仍具有高风险, 多项研究表明野生河豚鱼体内存在产河豚毒素的细菌<sup>[11-14]</sup>, 因此在开放养殖河豚鱼市场之前, 必须对养殖河豚鱼体内菌群进行透彻研究。评估河豚鱼养殖质量的重要指标是河豚鱼肠道微生物多样性, 分析河豚鱼肠道微生物多样性的关键前提是有效提取河豚鱼肠道内容物微生物总 DNA。然而, 由于河豚鱼肠道细长, 内容物含量少, 利用传统的拍打方式很难将内容物挤压出来; 并且肠道柔韧性大, 利用研磨方式很难将肠壁磨碎, 内容物无法释放; 此外, 收集肠道内容物时 DNA 很易降解。因此, 有效获取肠道内容物对于提取 DNA 的质量十分关键。

针对如何有效、节约的提取河豚鱼肠道内容物 DNA 设计了 3 种提取方法, 通过比较发现, 3 种方法均可得到一定质量浓度较纯净的 DNA 片段。在 DNA 提取过程中, QIAamp DNA Stool Mini Kit 操作简单、省时, 所得 DNA 质量浓度高, 但造价昂贵。苯酚-氯仿-异戊醇抽提法造价低, 但耗时较长, 且部分试剂对人体有毒, 操作时需做好防护。苯酚-氯仿-异戊醇抽提法将样品进行反复冻融处理, 可以裂解如革兰氏阳性菌等难以裂解的细菌, 做到最大程度的 DNA 提取, 并且所用试剂为实验室常见试剂, 以最低耗费提取 DNA。

本研究选取 16S rRNA 基因上 V3 区进行 PCR 扩增, 由于 16S rRNA 序列含有 9 个可变区, 不同可变区适合不同菌群的鉴定与分析, 而 V3 区适用于大多数细菌的分离鉴定<sup>[15]</sup>。经 PCR 扩增, 3 种 DNA 提取方法所得 V3 区扩增产物条带均清晰可见, 明亮单一。

为了分析 3 种方法所获得的微生物总 DNA 的容量, 本研究采用 DGGE 指纹图谱进行分析。结果表明苯酚-氯仿-异戊醇抽提法与 QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取的 DNA 其 DGGE 指纹图谱包含的细菌种类相同。虽然这两种 DNA 提取方法的 DGGE 指纹图谱中同一细菌条带亮度不尽相同, 但是它们反映出的微生物多样性是一致的, 且微生物多样性覆盖率高于改良 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil, 能够尽可能全面的反应样品中微生物多样性。

综上所述, 与商业试剂盒 QIAamp DNA Stool Mini Kit 和 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil 相比, 苯酚-氯仿-异戊醇抽提法在提取 DNA 的高效能和低成本方面具有双重优越性, 能够有效提取少量样品及易降解样品中的微生

物总 DNA, 普遍适用于其他肠道样品或环境样品的 DNA 提取工作, 能够为后续微生物多样性分析等提供参考。

#### 参考文献:

- [1] MATSUMOTO T, NAGASHIMA Y, KUSUHARA H, et al. Pharmacokinetics of tetrodotoxin in puffer fish *Takifugu rubripes* by a single administration technique[J]. *Toxicon*, 2008, 51(6): 1051-1059.
- [2] TANAKA R, SUGIMURA I, SAWABE T, et al. Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet[J]. *Fish Sci*, 2003, 69(5): 951-958.
- [3] LI K, GUAN W, WEI G, et al. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(3): 1-8.
- [4] WANG X, HOEFEL D, SAINT C P, et al. The isolation and microbial community analysis of hydrogen producing bacteria from activated sludge [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1415-1423.
- [5] YANG Mingxia, ZHANG Hanbo. Diversity of microorganisms in decaying maize stalks revealed by a molecular method[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(4): 367-370.
- [6] RUDI K, ZIMONJA M, KVENSHAGEN B, et al. Alignment-independent comparisons of human gastrointestinal tract microbial communities in a multidimensional 16S rRNA gene evolutionary space[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(8): 2727-2734.
- [7] SHENDURE J, MITRA R D, VARMA C, et al. Advanced sequencing technologies: methods and goals[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5: 335-344.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 26-32.
- [9] MORE M I, HERRICK J B, SILVA M C, et al. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1994, 60(5): 1572-1580.
- [10] LI Youxun, LI Fuchao, ZHANG Xiaowen, et al. Vertical distribution of bacterial and archaeal communities along discrete layers of a deep-sea cold sediment sample at the East Pacific Rise (approximately 13 degrees N)[J]. *Extremophiles*, 2008, 12(4): 573-585.
- [11] YU Chunfai, YU P H, CHAN Puiling, et al. Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes [J]. *Toxicon*, 2004, 44(4): 641-647.
- [12] WU Zhenglong, XIE Liping, XIA Guoliang, et al. A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes*[J]. *Toxicon*, 2005, 45(7): 851-859.
- [13] LEE M J, JEONG D Y, KIM W S, et al. A tetrodotoxin-producing vibrio strain, LM-1 from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1698-1701.
- [14] MATSUI T, TAKETSUGU S, KODAMA K, et al. Production of tetrodotoxin by the intestinal bacteria of a puffer fish *Takifugu niphobles*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, 12: 2199-2203.
- [15] CHAKRAVORTY S, HELB D, BURDAY M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(2): 330-339.