

# DB37

山 东 省 地 方 标 准

DB37/T 4092—2020

---

## 鱼类肠道微生物分离鉴定通用技术要求

The general technical requirements of separation and identification of fish intestinal  
microorganism

2020 - 08 - 20 发布

2020 - 09 - 20 实施

---

山东省市场监督管理局 发布



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省海洋局提出并组织实施。

本标准由山东省海洋标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：青岛华大基因研究院、青岛市标准化研究院。

本标准主要起草人：刘姗姗、乔雪松、王裕宽、王萌萌、杨恒加、王琛、陈建威、苏小珊、翟越、许静、赵丹。



# 鱼类肠道微生物分离鉴定通用技术要求

## 1 范围

本标准规定了鱼类肠道微生物样本的采集、分离、培养、鉴定及保藏等。  
本标准适用于淡水及海水鱼类肠道微生物的研究。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 30744 深海微生物样品前处理技术规范

SN/T 2632 微生物菌种常规保藏技术规程

## 3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**肠道微生物 intestinal microorganism**

生长于动物肠道，并帮助宿主完成多种生理生化功能的微生物群落。

### 3.2

**16S rDNA**

是编码16S rRNA的基因，16S rRNA为核糖体RNA的一个亚基，是系统分类研究中最常用的分子标签，可被用于菌种鉴定。

### 3.3

**聚合酶链式反应 polymerase chain reaction**

一种分子生物学技术，用于扩增特定的DNA/RNA片段，这种方法可在生物体外进行，不必依赖大肠杆菌或酵母菌等生物体。

### 3.4

**Sanger测序 Sanger sequencing**

即双脱氧链终止法测序，为第一代DNA测序技术，是一种常用的核酸测序技术，用于DNA分析，由英国生物化学家弗雷德里克·桑格于1977年发明。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

OD: 光密度 (Optical Density)

## 5 基本要求

### 5.1 实验室通用要求

实验室应满足GB 19489中关于一级或以上级别生物安全实验室的要求。

### 5.2 鱼类样本要求

鱼类样本应尽量保证鲜活, 死亡鱼类样本最长死亡时间不应超过24 h。

### 5.3 实验用具准备

一次性无菌手套、无菌眼科镊、无菌眼科剪、无菌PBS (配方见附录A.1)、2216E培养基(配方见附录A.2)、LB培养基 (配方见附录A.3)、无菌水、无菌50 mL离心管、医用托盘、75 %消毒酒精、涂布棒等。

## 6 鱼类肠道微生物样本采集和保存

### 6.1 鱼类肠道微生物样本采集与储存

6.1.1 活体鱼类样本应先进行麻醉, 之后, 在超净工作台内, 用75 %的酒精对鱼体擦拭消毒。

6.1.2 将鱼类样品从泄殖腔处沿腹部剖开, 用无菌PBS冲洗鱼类腹部, 用吸水纸擦拭腹腔。

6.1.3 分离并剪下鱼类完整肠道, 将肠道内容物全部挤到无菌离心管中, 并将肠道内壁残留物轻刮于离心管中。

6.1.4 对肠道内容物进行称重, 内容物总质量应控制在10 g以下, 按1 g内容物加入3 mL无菌PBS的比例进行稀释, 震荡混匀, 得到肠道微生物样本。

### 6.2 肠道微生物样本存储

肠道微生物样本应储存在2 °C~8 °C低温环境下, 宜立即进行处理, 保存期限不应超过一周。

## 7 鱼类肠道可培养微生物的分离、培养及鉴定

### 7.1 肠道微生物分离和纯化

#### 7.1.1 肠道微生物分离

7.1.1.1 取100 μL肠道微生物样本, 用无菌PBS稀释到1 000 μL, 制成 $10^{-1}$ 样品稀释液, 震荡混匀, 备用。

7.1.1.2 取100 μL  $10^{-1}$ 样品稀释液, 用无菌PBS稀释到1 000 μL, 制成 $10^{-2}$ 样品稀释液, 震荡混匀, 备用。

7.1.1.3 按上述步骤依次稀释获得 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 的样品稀释液, 震荡混匀, 备用。

7.1.1.4 取 $10^{-2}$ ， $10^{-3}$ ， $10^{-4}$ 样品稀释液进行固体培养基平板涂布，涂布平板宜28℃恒温培养，培养时间1~3天，每隔12h观察菌落生长状态。

## 7.1.2 肠道微生物纯化

7.1.2.1 观察涂布平板的生长情况及菌落形态特征，选择合适稀释度（约10~200个菌落）的平板挑选菌落，选择不同形态的单菌落编号后划线，于28℃恒温培养12h~24h。

7.1.2.2 观察划线培养菌落形态特征是否单一，对于形态结构不单一的平板继续挑单菌落并划线培养，直至获得菌落形态特征一致的纯培养单菌，并填写《菌落形态特征统计表》，参见附录B。

## 7.2 肠道微生物培养

挑取分离、纯化出的纯培养单菌落接种至液体培养基中，宜150 rpm 28℃条件下恒温震荡培养至菌液OD<sub>600</sub>值达到0.6~1.0之间。

## 7.3 肠道微生物鉴定

### 7.3.1 微生物基因组提取

对培养得到的菌液进行基因组提取，参照GB/T 30744内相关内容进行。

### 7.3.2 基因组16S rDNA基因扩增

对所提取菌株基因组的16S rDNA基因进行PCR扩增，扩增引物及反应条件详见附录C。

### 7.3.3 PCR产物电泳检测

对扩增所得PCR产物进行电泳检测，步骤参见附录D。

### 7.3.4 PCR产物测序及序列比对

对检测合格的PCR产物进行Sanger测序，测序结果与EzBioCloud数据库进行序列比对，确定分离微生物的种类并参考附录E的信息记录表进行记录。

### 7.3.5 其他情况

对于测序比对没有结果的菌株，可进行生化鉴定，包括镜检、革兰氏染色、接触酶试验、氧化酶试验等，根据实验结果鉴定菌株种属类别。

## 8 鱼类肠道微生物的保藏

### 8.1 肠道微生物保藏

菌种保藏参见SN/T 2632规范内容。

### 8.2 保藏微生物信息记录

参照附录E的信息记录表，对保藏信息进行记录。

附 录 A  
(规范性附录)  
缓冲液及培养基配方

表A.1给出PBS配方。

表A.1 PBS 配方

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
蒸馏水	定容至 1 000 mL
pH 值	7.4

表A.2给出2216E培养基配方。

表A.2 2216E 培养基配方

蛋白胨	5 g
酵母膏	1 g
FePO <sub>4</sub>	0.01 g
陈海水	定容至 1 000 mL
琼脂糖（固体培养基添加）	15 g
pH 值	7.6
注：适用海水鱼肠道微生物培养	

表A.3给出LB培养基配方。

表A.3 LB 培养基配方

蛋白胨	10 g
酵母膏	5 g
NaCl	10 g
蒸馏水	定容至 1 000 mL
琼脂糖（固体培养基添加）	15 g
pH 值	7.6
注：适用淡水鱼肠道微生物培养	





附 录 C  
(规范性附录)  
菌液 PCR

表C.1给出PCR反应引物序列。

表C.1 PCR 反应引物序列

引物名称	序列
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT

表C.2给出PCR反应体系。

表C.2 PCR 反应体系 (25  $\mu$ L)

组分	用量 $\mu$ L
无菌水	17.2
10 $\times$ PCR Buffer	2.5
dNTP	2.0
27F	1.0
1492R	1.0
Taq 酶	0.3
模板 (菌液)	1.0

表C.3给出PCR反应时间。

表C.3 PCR 反应时间

温度	时间	循环
94 $^{\circ}$ C	5min	1 个循环
94 $^{\circ}$ C	30s	30 个循环
55 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	10min	1 个循环
4 $^{\circ}$ C	$\infty$	1 个循环

附 录 D  
(规范性附录)  
电泳测试

#### D.1 材料准备

Loading buffer, 纯化PCR样品, DL2000 Marker, 琼脂糖, TAE缓冲液, SYBR Safe染料, 凝胶托盘, 电泳槽, 凝胶用梳子。

#### D.2 电泳检测

配制1.5%浓度(w/v)琼脂糖凝胶(小托盘一般需30 mL, 中托盘需50 mL, 大托盘需100 mL), 以4  $\mu$  L/100 mL的量加入SYBR Safe染料。吸取Loading buffer、纯化PCR样品各2  $\mu$  L, 混匀。待凝胶冷却后, 放入电泳槽。各梳孔内加入3  $\mu$  L混合样品, 加入3  $\mu$  L Marker, 接通电源, 调节电压至120 V~200 V进行跑凝胶电泳。

#### D.3 凝胶成像

将凝胶电泳放入凝胶成像仪成像观察。

#### D.4 产物验证

观察电泳条带是否单一、条带是否明亮、产物大小是否为1 500 bp左右, 若满足上述要求, 则表明PCR成功。对于没有成功的样品可再次进行PCR验证, 或将保藏的菌液进行活化, 培养后再次进行PCR。

附 录 E  
(规范性附录)  
菌株信息记录表

表E.1给出菌株信息记录表。

表E.1 菌株信息记录表

鱼种信息							
鱼种	鱼编号	采集日期	获取方式	采集地点	样品状态	保藏人	备注
菌株16S rDNA鉴定及保藏信息							
菌株编号	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity %	保藏时间	保藏方式	保藏孔位	
注：鱼种编号和菌株编号可根据自身需要进行编制，如：AK1（1号鮫鯪鱼），2018-AK1-G-001（1号鮫鯪鱼肠道第一株菌）。							

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 张美玲, 杜震宇. 水生动物肠道微生物研究进展[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2016, 2016(1):1-8.
- [3] Roeselers G, Mittge E K, Stephens W Z, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish[J]. *ISME Journal*, 2011, 5(10):1595.
- [4] Li X, Yu Y, Feng W, et al. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. [J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(1):29-37.
- [5] 张涵, 周涛, 王岩. 综合养殖池塘中三角帆蚌和鱼类肠道细菌的组成[J]. 水生生物学报, 2013(5):824-835.
- [6] 邢孟欣, 李贵阳, 侯战辉, 等. 不同大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)个体肠道菌群结构差异研究[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(20):3801-3805.
- [7] 王纯, 倪加加, 颜庆云, 等. 草鱼与团头鲂肠道菌群结构比较分析[J]. 水生生物学报, 2014(5):868-875.
- [8] Sanchez L M, Weng R W, Riener R M, et al. Examining the Fish Microbiome: Vertebrate-Derived Bacteria as an Environmental Niche for the Discovery of Unique Marine Natural Products[J]. *Plos One*, 2012, 7(5):e35398.
- [9] Dong B, Yi Y, Liang L, et al. High Throughput Identification of Antimicrobial Peptides from Fish Gastrointestinal Microbiota. [J]. *Toxins*, 2017, 9(9):266.
- [10] 张晓华. 海洋微生物学[M]. 中国海洋大学出版社, 2007.
- [11] 中华人民共和国国务院. 医疗废物管理条例[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2003, 3(21):5-10.
- [12] 孟庆闻. 鱼类学实验指导[M]. 中国农业出版社, 1995.
- [13] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海科学技术出版社, 1986.
- [14] Robert F. Weaver. 分子生物学= Molecular Biology : 第3版 : 英文[M]. 科学出版社, 2008.
- [15] 国家微生物资源平台. 微生物菌种资源收集整理、保藏技术规程汇编[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2011.
-