

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℃~8℃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 °C 恒温培养, 培养时间 1~3 天, 每隔 12 h 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 °C 恒温培养 12 h~24 h。

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 °C 条件下恒温震荡培养至菌液 OD 600 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 ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	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 ₄	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 μ L)

组分	用量 μ 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	∞	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 μ L/100 mL的量加入SYBR Safe染料。吸取Loading buffer、纯化PCR样品各2 μ L, 混匀。待凝胶冷却后, 放入电泳槽。各梳孔内加入3 μ L混合样品, 加入3 μ 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。

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.
-