对虾养殖系统微生物组样品的采集与制备

Collection and Preparation of Microbiota Samples in Shrimp Culture System

董鹏生^{1, 2, #}, 黄雷^{1, 2, #}, 王艳婷^{1, 2, #}, 郭海朋^{1, 2, *}, 张德民^{1, 2, *}

¹农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 宁波大学, 宁波, 浙江; ²海洋学院, 宁波大学, 宁波, 浙江

*通讯作者邮箱: guohaipeng@nbu.edu.cn; zhangdemin@nbu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 董鹏生, 黄雷, 王艳婷, 郭海朋, 张德民. (2021). 对虾养殖系统微生物组样品的采集与制备. **Bio-101 e2003389. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003389.**

How to cite: Dong, P. S., Huang, L. Wang, Y. T., Guo, H. P. and Zhang, D. M. (2021). Collection and Preparation of Microbiota Samples in Shrimp Culture System. **Bio-101 e2003389. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003389. (in Chinese)**

摘要: 对虾养殖系统微生物群落的失调与对虾病害发生的关系逐渐引起了人们的重视, 养殖系统微生物组及其生态学过程的研究已成为解决对虾养殖病害问题的重要突破口。微生物组学技术是微生物群落研究的重要手段, 其中样品的采集和制备是最为重要的关键环节之一, 但目前对虾养殖系统微生物组样品的采集和制备仍无标准化流程。本文介绍了凡纳滨对虾高位池、育苗系统和生物絮团养殖系统中微生物组样品采集和制备的步骤和要点, 以期今后对虾养殖系统中微生物组学的标准化研究提供借鉴。

关键词: 对虾养殖系统, 微生物组学, 样品采集与制备, 标准化流程

材料与试剂

1. 无菌一次性培养皿
2. 无菌药匙
3. 无菌牙签
4. 一次性无菌刀片
5. 无菌剪刀、镊子
6. 无菌无酶 EP 管 (2 ml 和 5 ml, Axygen Scientific 公司, Axygen)

7. 无菌无酶移液器吸头(20 μ l、200 μ l 和 1,000 μ l, Axygen Scientific 公司, Axygen)
8. 一次性橡胶手套
9. 160 目筛绢(孔径约 100 μ m, Honeywell International, Honeywell, 产品目录号: gAM5A)
10. 聚碳酸酯膜 (0.22 μ m, Merck Millipore, Isopore, 产品目录号: GTTP02500)
11. 采样瓶 (体积为 1 L, 2 L 或 5 L)
12. 滤液收集瓶 (体积为 1 L)
13. 无磁不锈钢漏斗 (直径为 140 mm)
14. 玻璃烧杯 (500 ml)
15. 研钵
16. 75%酒精
17. 1X TE 缓冲液 (生工生物工程(上海)股份有限公司, 生工, 产品目录号: B548106-0500)
18. 无水乙醇
19. 无菌去离子水
20. 液氮
21. 二氧化氯泡腾片 (河南省南华千牧生物科技有限公司, 南华千牧, 产品目录号: 45632)
22. DNeasy® Power Soil® Kit (QIAGEN 公司, Qiagen, 产品目录号: 12888)
23. QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit(QIAGEN 公司, Qiagen, 产品目录号: 51506)

仪器设备

1. 有机玻璃采水器 (长垣县新长源塑业制品厂, 体积为 5 L)
2. 旋片式真空泵 (浙江飞越机电有限公司, 飞越, 产品型号: FY-1HN)
3. 真空过滤装置 (Thermo 公司, Nalgene, 产品型号: 300-4100)
4. 单道移液器 (Eppendorf 公司, Research plus)
5. 车载冰箱 (河南新飞电器集团有限公司, 新飞, 产品型号: TF-L5D)
6. -80°C 超低温冰箱 (Thermo 公司, Thermo, 产品型号: 902991)

7. 研磨均质破碎仪（Bertin Technologies 公司，Precellys，产品型号：P000671-CLYS1-A）
8. 涡旋振荡器（Scientific Industries 公司，Vortex Genie 2，产品型号：SI-0246）
9. 小型台式冷冻离心机（Eppendorf 公司，Eppendorf，产品型号：5424R）
10. 微量核酸测定仪（Thermo Scientific 公司，产品型号：NanoDrop 2000，产品型号：ND-2000）
11. 核酸定量荧光计（Thermo Scientific 公司，产品型号：Qubit™ 4 Fluorometer，产品型号：Q33327）

实验步骤

一、凡纳滨对虾高位池养殖系统微生物样品的采集和制备

本文以典型凡纳滨对虾高位池养殖系统为例（图 1），介绍该养殖系统中微生物样品的采集和制备流程（该流程同样适用于土塘生态池、生物絮团养殖池等对虾养殖系统）。养殖期间采集对虾消化道（Xiong *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020）和水体（Zhang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; 杨坤杰等, 2016）微生物样品，具体流程如下：

图 1. 实验用对虾养殖高位池

a. 高位池对虾消化道微生物样品的采集和制备

1. 对虾消化道组成。对虾消化道主要包括贲门胃、幽门胃、肝胰腺、中肠和后肠（图2）。

图2. 凡纳滨对虾消化道组成图（改编自网络）

2. 对虾样品采集及前处理。每池随机采集 10 只对虾，先用 75%酒精的棉球擦拭对虾体表，再用一次性无菌刀片沿头胸甲下部将虾体切开，虾体上部用于采集肝胰腺和胃样品，下部分用于采集肠道样品。
3. 肝胰腺样品采集。用无菌镊子剥开头胸甲，再用另一把镊子从切口处取出肝胰腺，装入 2 ml EP 管中，5 个肝胰腺混合成一个样品。
4. 胃样品采集。用无菌镊子夹取出整个胃（贲门胃、幽门胃），装入 2 ml EP 管中，5 个胃混合成一个样品。
5. 肠道样品采集。用一次性无菌刀片沿对虾背部划开，用无菌牙签挑取出肠道（中肠和后肠），装入 2 ml EP 管中，5 个肠道混合成一个样品。
6. 样品保存。样品收集后迅速置于液氮中，运回实验室后转入-80°C 超低温冰箱保存，并尽快提取 DNA。
7. 对虾消化道微生物组 DNA 提取。将样品从超低温冰箱取出，用无菌药匙取约 0.1 g 样品，采用 QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒分别提取肝胰腺、胃、肠道微生物组 DNA（具体操作步骤见附录 1）。

b. 高位池水体微生物样品的采集和制备

1. 采集器具灭菌。1) 高压蒸汽灭菌：将剪刀、镊子、筛绢和去离子水等在 121°C 条件下高压灭菌 20 min。2) 表面消毒：有机玻璃采样器、采样瓶、滤液收集瓶、无磁不锈钢漏斗、真空抽虑装置等，使用前先用 50 mg/L 的二氧化氯溶液浸泡 5 min，再用无菌去离子水润洗 2 次。
2. 水样采集。每个养殖池选取 4 个采样点（图 3），用有机玻璃采水器分别采集各点水面下 50 cm 的养殖水体 500 ml，装入 2 L 采样瓶中。

图 3. 养殖池采样点示意图

3. 水样预过滤。采集的水样预先用 160 目的灭菌筛绢过滤（图 4），去除大型浮游动植物和大颗粒悬浮物，滤液收集到 1 L 滤液收集瓶。

图 4. 养殖水样的预过滤装置

4. 水样运输。将预过滤后的水样放入车载冰箱或冰盒尽快运回实验室，一半用于收集微生物样本，一半用于测定水化学指标。
5. 抽滤装置的安装。连接旋片式真空泵、真空过滤装置、橡胶管、气管、开关阀门等装置（图 5），并加装 0.22 μm 的聚碳酸酯膜。安装前，过滤装置中的抽滤瓶和漏斗预先用去离子水冲洗 3 次。

图 5. 养殖水样微生物的过滤收集装置

6. 微生物样本的收集。在过滤装置的漏斗中加入 200~500 ml 的水样（同一批次过滤水量应相同），启动抽滤泵，水样抽滤完后再抽滤 1 min，使滤膜完全干燥。每瓶水样收集 3 张富集微生物的滤膜。
7. 样品保存。用无菌镊子将富集微生物的滤膜装入 5 ml EP 管，迅速置于液氮中，之后转至 -80°C 超低温冰箱保存，并尽快提取 DNA。
8. 微生物组 DNA 提取。用无菌镊子将滤膜取出放置在培养皿中，用无菌剪刀将滤膜尽可能剪碎；用无菌镊子将滤膜转移至 -4°C 预冷的 PowerBead Tubes 中（试剂盒提供），并使用 DNeasy® Power Soil® Kit 提取水体微生物组 DNA（具体操作步骤见附录 2）。

二、对虾育苗系统微生物样品的采集和制备

凡纳滨对虾幼体发育包括无节幼体(*nauplius*)、蚤状幼体(*zoea*)、糠虾幼体(*mysis*)和仔虾早期(*early postlarvae*)四个阶段(图 6)。由于对虾幼体较小,很难从虾体中分离完整的肠道,因此采集整只虾体测定微生物组。本文以标准化温室育苗体系(4 m × 5 m × 1.3 m, 图 7)为例,介绍该体系中微生物样品的采集与制备,具体步骤如下(参考 Zheng *et al.*, 2017, Xue *et al.*, 2018, Duan *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020):

1. 水样采集。用有机玻璃采水器在育苗池的四周分别采集 500 ml 水体(采样点参考图 2), 装入 2 L 无菌采样瓶中, 混合均匀。
2. 对虾幼体微生物样品采集。用 160 目灭菌筛绢过滤水样, 对虾幼体被截留在筛绢上, 用无菌药匙将它们收集于 500 ml 无菌烧杯中, 用灭菌海水冲洗 3 次。用药匙将幼体转入 2 ml EP 管, 4°C 100 × *g* 离心 1 min, 用移液器吸出上层液体, 获得的沉淀即为对虾幼体样品, 每个样品约收集 0.5 ~1.0 g 幼体。
3. 育苗水体微生物样品收集。经步骤 2 过滤的水样, 用于收集水体微生物(操作步骤同“高位池水体微生物样品的采集和制备”)。
4. 样品保存。将收集到的对虾幼体和水体微生物样品保存于液氮中, 运回实验室后转入-80 °C 超低温冰箱, 并尽快提取 DNA。
5. 对虾幼体微生物组 DNA 提取。在灭菌后的研钵中加入液氮, 将幼虾样品研磨成粉状。取 0.2 g 研磨后样品, 使用 QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取对虾幼体微生物组 DNA (具体操作步骤见附录 1)。
6. 育苗水体微生物组 DNA 提取。具体操作参考“高位池水体微生物样品的采集和制备”步骤 7。

图 6. 幼虾发育的不同阶段示意图（改编自网络）

图 7. 标准化对虾温室育苗池

三、生物絮团微生物样品的采集和制备

本文以代表性生物絮团养殖系统为例（图 8），介绍该养殖系统中生物絮团微生物样品的采集和制备过程（Huang *et al.*, 2020），具体步骤如下：

1. 水样采集。用有机玻璃采水器在生物絮团养殖池的四周分别采集 500 ml 水体（采样点参考图 2），装入 2 L 无菌采样瓶中，混合均匀。
2. 生物絮团收集。用量筒量取 1 L 水样，用 160 目灭菌筛绢过滤，截留在筛绢上的即为大粒径生物絮团（ $> 100 \mu\text{m}$ ）；如需收集较小粒径的生物絮团（例如 $20\sim 100 \mu\text{m}$ ），则用滤膜（例如 $20 \mu\text{m}$ ）继续过滤以上滤液，滤膜上收集的即为小粒径的生物絮团。
3. 样品保存。用无菌药匙刮取生物絮团，分装到 3 个 2 ml EP 管中，并迅速置于液氮中，运回实验室后转入 -80°C 超低温冰箱保存。

4. DNA 提取。从超低温冰箱取出生物絮团样品，加入 100 μ L TE 缓冲液后，置于 4°C 冰箱解冻，4°C 100 $\times$ g 离心 2 min，用移液器吸出上层液体，得到纯净的生物絮团样品。用药匙取 0.1 g 生物絮团样品，采用 DNeasy® Power Soil® Kit 试剂盒提取生物絮团微生物组 DNA（具体操作步骤见附录 2）。

图 8. 生物絮团养殖池与生物絮团

结果与分析

按照本实验流程进行微生物样本的收集和 DNA 提取，可以得到 DNA 完整性和纯度较高的样本。合格 DNA 样品结果如下：1）琼脂糖凝胶电泳显示 DNA 样本条带单一且明显或轻微弥散，无明显或轻微降解，无或轻微杂质和 RNA 污染，无或轻微杂带和胶孔滞留，（图 9A）；2）采用 Qubit™ 4 核酸定量荧光计测定核酸浓度，核酸浓度 ≥ 20 ng/ul，核酸总量 ≥ 10 ug， $1.6 < OD\ 260/280 < 2.0$ ， $OD\ 260/230 > 2.0$ 。不合格样品结果为：琼脂糖凝胶电泳显示 DNA 样本条带出现严重降解或杂质污染且主条带不明显（图 9B）；核酸总量 ≤ 0.2 ug。

图 9. DNA 电泳结果。A: 合格 DNA 样本，条带自左至右依次为 **5,000 bp DNA marker**，水体样本、消化道样本、幼体样本和絮团样本的微生物基因组 DNA；**B:** 不合格样本的 DNA

失败经验

1. 取样过程中可能因样本微生物生物量过少导致 DNA 总量不足，导致制备的样品不合格。此时可以提取备样样品 DNA 后，混合浓缩后重新检测 DNA 质量。
2. 若 DNA 样品在琼脂糖凝胶上主条带明显，但有杂质污染，可以再次进行过柱纯化（具体操作步骤见附录 2: 步骤 14-22）；若 DNA 降解严重，可提取备样样品 DNA，重新进行检测。因此建议在样品采集阶段额外准备 2-4 份备样，防止意外情况发生。

致谢

本工作承国家 863 项目（2012AA092001）、国家自然科学基金（31672658）、宁波市农业重大专项（2017C110001）、浙江省自然科学基金（LY18C030002）和浙江省教育厅科研项目（Y201839299）的资助。感谢王凯、熊金波、路正、陈和平和王一农老师对本工作的指导和帮助；感谢宁波大学张德民教授课题组历届同学，特别是从事对虾微生物组研究的裘钱玲琳、吴金凤、郑嘉来、胡常巨、杨坤杰、刘紫丹、陈伟、刘佳佳、王思鹏、杜世聪等同学对该方法的持续完善。

参考文献

1. 杨坤杰, 王欣, 熊金波, 裘钱玲琳, 黄雷, 张化俊, 郭安南, 李来国, 张德民 (2016). [健康和患病凡纳滨对虾幼体消化道菌群结构的比较](#). *水产学报* 40(11):1765-1773.
2. Guo, H., Huang, L., Hu, S., Chen, C., Huang, X., Liu, W., Wang, S., Zhu, Y., Zhao, Y., and Zhang, D. (2020). [Effects of carbon/nitrogen ratio on growth, intestinal microbiota and metabolome of shrimp \(*Litopenaeus vannamei*\)](#). *Front Microbiol* 11: 652.
3. Huang, L., Guo, H., Chen, C., Huang, X., Chen, W., Bao, F., Liu, W., Wang, S., and Zhang, D. (2020). [The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system](#). *Aquaculture* 523: 735159.
4. Liu, J., Wang, K., Wang, Y., Chen, W., Jin, Z., Yao, Z., and Zhang, D. (2019). [Strain-specific changes in the gut microbiota profiles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to cold stress](#). *Aquaculture* 503: 357-366.
5. Liu, Z., Qiuqian, L., Yao, Z., Wang, X., Huang, L., Zheng, J., Wang, K., Li, L., and Zhang, D. (2018). [Effects of a commercial microbial agent on the bacterial communities in shrimp culture system](#). *Front Microbiol* 9: 2430.
6. Wang, Y., Wang, K., Huang, L., Dong, P., Wang, S., Chen, H., Lu, Z., Hou, D., and Zhang, D. (2020). [Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle](#). *Microbiome* 8(1): 106.
7. Xiong, J., Wang, K., Wu, J., Qiuqian, L., Yang, K., Qian, Y., Zhang, D. (2015). [Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity](#). *Appl Microbiol Biotechnol* 99(16): 6911-6919.
8. Xue, M., Wu, L., He, Y., Liang, H., and Wen, C. (2018). [Biases during DNA extraction affect characterization of the microbiota associated with larvae of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*](#). *PeerJ* 6: e5257.
9. Zhang, D., Wang, X., Xiong, J., Zhu, J., Wang, Y., Zhao, Q., Chen, H., Guo, A., Wu, J., and Dai, H. (2014). [Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status](#). *Ecol Indic* 38: 218-224.
10. Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., Zhang, X., and Yu, M. (2017). [Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp \(*Litopenaeus vannamei*\) larvae and rearing water across different growth stages](#).

Front Microbiol 8: 1362.

附录 1:

QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit 操作步骤

1. 取 180~220 mg (根据需要样品量可增加) 新鲜或冷冻粪便样品 (或液氮研磨后的样品) 放入预冷的 2 ml 的含砂柱中。
2. 加入 1 ml InhibitEX Buffer, 涡旋 10 s, 细胞破碎仪震荡 1 min (4,000 次/分钟)。
3. 70°C 水浴 5 min, 使细胞充分裂解。
4. 13,500 × g 离心 1 min, 使 DNA (上清液) 和破碎的细胞分离 (沉淀物)。
5. 在新的 1.5 ml EP 管中加入 25 µl 蛋白酶 K。
6. 取步骤 4 离心后的上清液 400 µl 加入到含蛋白酶 K 的 EP 管中。
7. 加入 400 µl Buffer AL, 涡旋 15 s。
8. 70°C 水浴 10 min, 5 min 时取出震荡混匀后继续水浴。
9. 加入 400 µl 无水乙醇, 涡旋混匀。
10. 吸取上述裂解液 600 µl 加入到预先写过标签的 QIAamp 自旋柱中, 18,400 × g 离心 1 min; 小心取出 QIAamp 柱, 加入到新收集管 1 中, 弃去滤液。
11. 重复以上步骤, 将 QIAamp 柱加到新收集管 2 中, 把剩余裂解液加入到 QIAamp 柱中。
12. 小心打开 QIAamp 柱盖子, 加入 500 µl Buffer AW1, 18,400 × g 离心 2 min。取出 QIAamp 柱套入新的收集管 3 中, 弃去滤液。
13. 小心打开 QIAamp 柱盖子, 加入 500 µl Buffer AW2, 18,400 × g 离心 3 min, 弃去滤液。
14. 取出 QIAamp 柱套入新的收集管 4 中, 18,400 × g 空管离心 3 min, 弃去滤液。
15. 取出 QIAamp 柱套入新的 1.5 ml EP 管中, 加入 100 µl Buffer ATE, 室温静置 2 min, 18,400 × g 离心 2 min。
16. 将步骤 15 的离心液再次加入到 QIAamp 柱中, 室温静置 2 min, 18,400 × g 离心 3 min, 弃去 QIAamp 柱, 得到最终纯化的 DNA, 置于 -20°C 保存。

附录 2:

DNeasy® Power Soil® Kit 操作步骤

1. 将装有水体微生物滤膜的EP管从-80°C冰箱取出，插入冰盒中。
2. 用无菌镊子将滤膜取出放置在无菌培养皿中，用无菌剪刀将滤膜尽可能剪碎，再用无菌镊子把破碎滤膜加入到PowerBead Tubes中。
3. 轻轻涡旋混匀10 s。
4. 检测C1溶液质量。若出现沉淀，60°C水浴至全溶解。
5. 加入60 µl C1溶液，上下颠倒数次混匀。
6. 把PowerBead Tubes固定在细胞破碎仪中，在4,000次/分钟下震荡1 min。
7. 室温13,500 × g离心5 min。
8. 转移上清液至一个干净的2 ml Collection Tube中。
9. 加入250 µl C2溶液到上清液中，涡旋混匀8 s。4°C孵育5 min。
10. 室温13,500 × g离心1 min。
11. 转移≤ 600 µl的上清液到一个新的收集管中。
12. 加入200 µl C3溶液到上清液中，涡旋混匀8 s。4°C孵育5 min。
13. 室温13,500 × g离心1 min。
14. 转移≤ 750 µl的上清液到新的收集管中。
15. 收集管中加入1,200 µl C4溶液 (注意使用前混匀)，涡旋混匀5 s。
16. 吸取约675 µl的上清液到Spin Filter中，室温13,500 × g离心1 min。弃去滤液。重复两次直至过滤完所有上清液。
17. 加入500 µl C5溶液到Spin Filter中，室温13,500 × g离心45 s。
18. 弃去滤液，室温13,500 × g离心1 min。
19. 转移Spin filter到2 ml Collection Tube中。
20. 加入50 µl C6溶液到Spin Filter的滤膜中心，室温静置2~3 min，室温13,500 × g离心45 s。
21. 将洗脱后的C6溶液再加至Spin Filter的滤膜中心，室温静置2~3 min，室温13,500 × g离心45 s。
22. 弃去 Spin Filter，得到最终纯化的 DNA，置于-20°C 保存。