

两种放线菌基因组 DNA PCR 模板制备方法的比较

牛世全, 胡娇龙, 达文燕 (西北师范大学生命科学院, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的]比较制备放线菌基因组 DNA PCR 模板的两种方法液氮研磨法及 TE 煮沸法。[方法]以从河西走廊盐碱土壤中分离鉴定的 8 属 16 株菌为材料, 包括糖丝菌属 (*Saccharothrix*) IV23-3-4、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) V22-5-1、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*) IX5-4-3、小单孢菌属 (*Micromonospora*) II23-4-1、放线多孢菌属 (*Actinopolyspora*) IV8-2-5、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) II8-4-3、链单孢菌属 (*Streptomonospora*) DA01305、链霉菌属金色类群 DA03401、链霉菌属金色类群 DA01408、链霉菌属蓝色类群 DA09140、链霉菌属金色类群 DA01308、链霉菌属灰红紫类群 DA05213、链霉菌属蓝色类群 DA11417、链霉菌属粉红孢类群 DA04401、链霉菌属灰红紫类群 DA04402、链霉菌属球孢类群 DA04307。对两种方法制备的 PCR 模板进行 16S rDNA 的扩增, PCR 产物进行电泳检测。[结果]两种方法均能得到比较清晰的目的条带, 但 TE 煮沸法简化了放线菌基因组 DNA PCR 模板制备的过程, 可用于高通量放线菌 PCR 模板的快速制备。[结论]该研究为大批量菌株的快速鉴别和系统分类提供了有效的方法。

关键词 放线菌; 液氮研磨法; TE 煮沸法; PCR 模板

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)23-09569-02

Comparison of Both Preparation Methods of PCR Templates of Genomic DNA from Actinobacteria

NIU Shi-quan et al (College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The aim was to compare the two preparation methods of PCR templates of genomic Dna from Actinobacteria. [Method] 16 strains of 8 genera separated and identified from saline soil of Langfang, Hexi, including *Saccharothrix* IV23-3-4, *Nocardioides* V22-5-1, *Promicromonospora* IX5-4-3, *Micromonospora* II23-4-1, *Actinopolyspora* IV8-2-5, *Nocardiopsis* II8-4-3, *Streptomonospora* DA01305, Streptomyces golden groups DA03401, Streptomyces golden groups DA01408, Streptomyces blue groups DA09140, Streptomyces golden groups DA01308, Streptomyces ash, red and purple groups DA05213, Streptomyces blue groups DA11417, Streptomyces pink spore groups DA04401, Streptomyces ash, red and purple groups DA04402, Streptomyces ball spore groups DA04307. The liquid nitrogen grinding method and the TE boiling method was used to treat Actinobacteria in order to explore the rapid preparation method of PCR template, and the PCR template was amplified of 16S rDNA, then PCR product was detected by electrophoresis. [Method] The results showed the two methods both got the clear objective band, while the TE boiling method simplified the PCR template preparation process of DNA from Actinobacteria, so could be used to prepare the PCR template of high-throughput Actinobacteria rapidly. [Conclusion] The study provides an effective method for repaid identification and systematic classification of large quantities of strains.

Key words Actinobacteria; Liquid nitrogen grinding method; TE boiling method; PCR template

放线菌资源是微生物资源中的重要部分, 放线菌群中的大多数放线菌种类可以产生不同的抗生素和非抗生素活性物质, 因而近年来, 放线菌的研究受到世界各国学者的极大重视。放线菌的分类学研究为新型生物活性物质的开发和利用提供了有效的理论指导, 随着分子生物学的迅速发展, 16S rRNA 基因序列分析技术被大量应用到不同菌群的放线菌分类研究中。有关放线菌 16S rRNA 基因 PCR 模板的制备, 可以归纳为物理破壁 (如微波法^[1]、液氮磨法^[2])、化学破壁^[3]、或酶法破壁^[4], 之后可用有机溶剂抽提提取基因组 DNA 作为 PCR 模板, 以及 Chelex-100 法^[5]直接制备 PCR 模板。这些方法中前者步骤多、费时, 抽提过程中使用的有机溶剂对人体健康也有损害, 后者使用的 Chelex-100 价格昂贵, 而且对极端环境放线菌的成功率较低。因此, 探索一种快速、安全、高效且经济的 DNA 模板制备方法, 对于放线菌菌株大规模地筛选和分类鉴定显得十分必要。煮沸裂解法提取 DNA 已应用于多种材料^[6-8]。为此, 笔者参考煮沸法制备质粒 DNA 方法^[9], 改进后用于快速制备放线菌基因组 DNA PCR 模板, 并与液氮研磨法^[10]制备 PCR 模板的方法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。以从河西走廊盐碱土壤中分离鉴定的 8 属 16 株菌为材料, 包括糖丝菌属 (*Saccharothrix*) IV23-3-4、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) V22-5-1、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*) IX5-4-3、小单孢菌属 (*Micromonospora*) II23-4-1、放线多孢菌属 (*Actinopolyspora*) IV8-2-5、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) II8-4-3、链单孢菌属 (*Streptomonospora*) DA01305、链霉菌属金色类群 DA03401、链霉菌属金色类群 DA01408、链霉菌属蓝色类群 DA09140、链霉菌属金色类群 DA01308、链霉菌属灰红紫类群 DA05213、链霉菌属蓝色类群 DA11417、链霉菌属粉红孢类群 DA04401、链霉菌属灰红紫类群 DA04402、链霉菌属球孢类群 DA04307。

1.1.2 主要试剂。TE 缓冲液, 灭菌超纯水, CTAB, 20 mg/ml 蛋白酶 K, 20% SDS, 苯酚-氯仿异丙醇 (25:2:1), ExTaq 预混酶 (TaKaRa), 16S rDNA 扩增用 PCR 引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3') 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, 放线菌培养用高氏培养基。

1.1.3 主要仪器。电泳仪 (DYY-12 型), PCR 仪 (EDC-810 型), 凝胶成像仪 (ChemiDoc™ XRS + Bio-Rod)。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养。取斜面保存菌种, 采用高氏液体培养基 28 °C 摇瓶培养 3~4 d。

基金项目 国家自然科学基金项目 (31260134)。

作者简介 牛世全 (1963-), 男, 甘肃陇西人, 教授, 硕士生导师, 从事旱区微生物资源与生态研究, E-mail: sqniu@nwnu.edu.cn。

收稿日期 2013-07-08

1.2.2 TE煮沸法制备模板。取1.5 ml菌液于2 ml无菌离心管中,12 000 r/min,4℃离心5 min去上清液,加1 ml TE缓冲液洗涤沉淀1次,所得菌体备用。将菌体悬浮于1 ml TE中,沸水浴5 min后,轻柔颠倒混匀,然后继续沸水浴10 min,取出后置于-20℃冷却10 min,12 000 r/min,4℃离心10 min,上清液即为PCR模板,转移上清液于-20℃下保存备用。

1.2.3 液氮研磨法制备模板。将菌悬液分装入离心管,6 000 r/min离心10 min,留沉淀;将菌体置于干净研钵中加液氮充分研磨后,倒入1.5 ml离心管中,再加入1 ml CTAB缓冲液混匀,然后置于液氮中数十秒冰冻,65℃,水浴至融化,反复3次;冷却后加入20 mg/ml蛋白酶K 5 μl,水平摇床振荡30 min(37℃,225 r/min),然后加入20% SDS 0.2 ml,混匀后65℃水浴保温2~3 h;12 000 r/min室温离心10 min,搜集上清液入2 ml离心管,加苯酚-氯仿异丙醇(25:24:1)等体积混匀,12 000 r/min低温离心10 min,取上清液(若中间层浑浊,再重复1次),再加入0.1体积3 mol/L乙酸钠和等

体积异丙醇,混匀,置于-20℃冷冻30 min后,12 000 r/min低温(4℃)离心15 min,留沉淀;用70%乙醇洗涤沉淀,晾干,用100 μl TE缓冲液溶解,-20℃下保存备用。

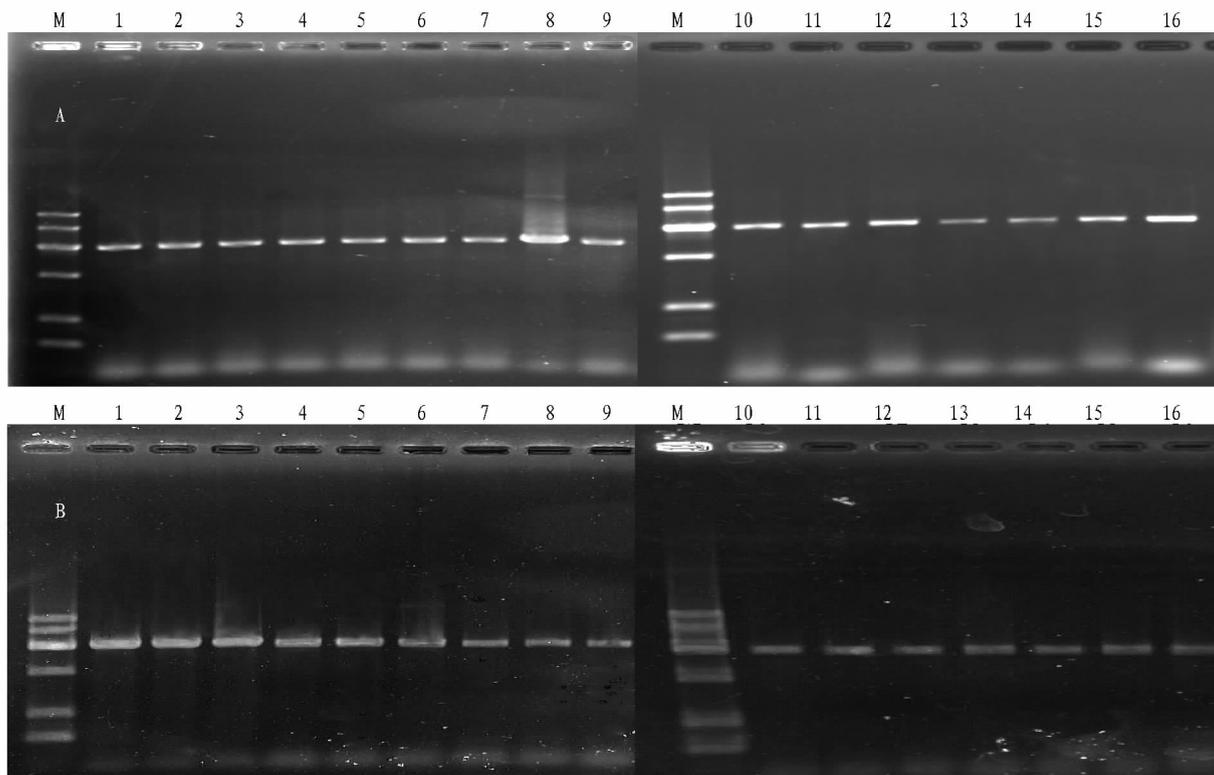
1.2.4 16S rDNA扩增。取上述两种方法制备的模板1 μl进行PCR扩增。

反应体系25 μl:DNA模板1 μl,上下泳引物各1 μl,ExTaq预混酶12.5 μl,ddH₂O 9.5 μl。

反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性45 s,55℃复性45 s,72℃延伸1.5 min,35个循环;72℃延伸10 min。取4 μl PCR产物在1%琼脂糖凝胶80 V电泳,在凝胶成像分析系统中成像分析。

2 结果与分析

选取16株从河西走廊盐碱土壤中分离的放线菌菌株,进行16S rRNA基因扩增的比较研究,结果如图1所示,所有菌株经两种方法提取基因组DNA作为模板,都可有效扩增16S rDNA序列,扩增产物经电泳检测均得到1 500 bp左右条带,条带清晰明亮,产物量足以用来测序和酶切等分析。



注:A,TE煮沸法;B,液氮研磨法。M,Marker VII;1~16分别为IV23-3-4、V22-5-1、IX5-4-3、II23-4-1、IV8-2-5、II8-4-3、DA03401、DA01305、DA01408、DA04307、DA09140、DA01308、DA05213、DA04402、DA11417、DA04401。

图1 放线菌16S rRNA基因PCR扩增电泳图

3 讨论

目前PCR反应技术已成为取得特异基因片段的基本工具^[11],它对模板要求不太严格,可以直接用各种模板DNA的粗提物来进行^[12]。原有的放线菌PCR模板制备,一般要经裂解、有机溶剂抽提、沉淀等多步复杂的操作才能得到DNA模板,虽然DNA样品纯度较高,但作为PCR模板使用,费时、费力且价格又昂贵。此外,在抽提过程中使用的酚/氯仿不仅对操作人员及环境都有不利影响,而且残留的酚/氯仿还

可能影响Taq酶的扩增效率^[13]。

从试验结果来看,两个方法制备的模板均表现出了良好的扩增效率和特异性,但从试验操作来看,液氮研磨法步骤繁琐,所需试剂多且耗时较长,而用TE煮沸法所提取的DNA,其16S rRNA基因扩增条带同样明亮清晰、特异性强,而且PCR模板制备过程中不需要特殊的仪器,所用试剂便宜,操作方便,经3次重复试验证明,该方法的重复性高,该

(下转第9574页)

特别是对生产危害严重的落叶型黄萎病,其发生蔓延快,致病机理复杂,目前仍缺乏理想的抗源^[17]。枯萎病抬头,黄萎病逐步加重,严重影响了棉花生产的发展。随着生物技术的发展,抗性基因导入解决了棉铃虫、红铃虫的抗性并在生产上广泛应用。但抗虫棉种植后害虫种类的分布发生了较大的变化,棉铃虫受到了抑制,盲蝽蟥发生较重。这些问题需引起育种者的足够重视,从基本环节入手,通过生物技术、修饰性回交、轮回选择等方法,控制并逐步解决病害问题。选育的品种应抗枯萎病、耐黄萎病,对棉铃虫的抗性水平应达到抗级以上。

3.4 强化品质育种 我国是世界原棉生产大国。棉花纤维强度的高低是影响棉纺织品质量和原棉外销的重要指标。江苏省审定的常规品种纤维品质集中表现在纤维长度、比强度和马克隆值三者不协调,较多品种因纤维细度达到标准要求而成为Ⅲ型品种。结合目前品种实际状况,在品种筛选上,应强化纤维细度的选择,稳步提高纤维长度与比强度。在育种材料的取舍上要特别注意结合品质测试结果^[18]。

3.5 同步改进产量构成要素 高产是棉花育种的主要目标之一,而棉花的产量是总铃数、铃重和衣分共同作用的结果。承鸿良等经过5年研究表明:单株铃数与皮棉产量之间的关联度大于铃重、衣分与皮棉产量之间的关联度,而衣分与皮棉产量之间的关联度又大于铃重与皮棉产量之间的关联度^[19]。也就是说,对皮棉产量影响大小的因素依次为铃数、衣分和铃重。在进行选择时,一般优先选择铃数,再选择衣分和铃重,但实际生产上,棉农对铃重的要求较高,高铃重的品种也具有较好的市场适应性。结合江苏具体情况,品种选择铃重应在6.0 g以上,衣分40%~42%,保持

较好的结铃性,这样的品种较易通过品种审定与市场认可。

参考文献

- [1] 黄骏麒. 中国棉花抗虫育种[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2002.
- [2] 翟学军,张锡明. 我国棉花育种现状与发展对策[J]. 中国棉花,1998,25(4):6-8.
- [3] 江苏省统计局. 江苏统计年鉴2012[EB/OL]. <http://www.jssb.gov.cn/jstj/jsnj/2012/nj10/nj1007.htm>.
- [4] 江苏省统计局,国家统计局江苏农村调查总队,江苏省农业委员会,江苏省海洋与渔业局. 江苏省农村统计年鉴(2013年)[M]. 江苏省统计局,2013.
- [5] 江苏省农林厅公告(2002年第2号)[R]. 2002.
- [6] 江苏省农林厅公告(2005年第6号)[R]. 2005.
- [7] 江苏省农林厅公告(2005年第13号)[R]. 2005.
- [8] 江苏省农林厅公告(2006年第4号)[R]. 2006.
- [9] 江苏省农林厅公告(2007年第4号)[R]. 2007.
- [10] 江苏省农林厅公告(2008年第6号)[R]. 2008.
- [11] 江苏省农业委员会公告(2010年第26号)[R]. 2010.
- [12] 江苏省农业委员会公告(2011年第4号)[R]. 2011.
- [13] 全国农业技术推广服务中心,中华人民共和国农业行业标准 NY/T 1297-2007 农作物品种审定规范 棉花[S]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [14] 张献龙. 湖北省棉花育种“十二五”研究构思[J]. 中国棉花,2011,38(3):5-7.
- [15] 张天真,郭旺珍. 棉花分子育种的现状、问题与展望[J]. 中国农业科技导报,2007,9(2):19-25.
- [16] 郭旺珍,张天真. 棉花基因组育种现状与展望[J]. 棉花学报,2003,15(5):298-303.
- [17] 宋锦花,冷苏凤,李燕. 江苏棉花育种30年回顾与展望[J]. 农业科技通讯,2012(8):5-7,11.
- [18] 蔡立旺,潘群斌,陈建平. 江苏省棉花育种的现状与发展策略[J]. 江西农业学报,2009,21(4):21-23.
- [19] 江苏省农学会. 江苏棉作科学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1992.
- [20] XIE Y F, LIANG Y L, MI Y, et al. Research on Activities of Antioxidant Enzymes during Pigment Gland Morphogenesis in Cotton[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(1):44-48.
- [21] 杨艳敏,欧阳竹,王淑芬. 棉花在不同整枝方式下生长发育规律的研究[J]. 华北农学报,2012(S1):234-239.
- [22] 张志敏,刘南君,牛静,等. 煮沸裂解法快速提取大鲵 DNA[J]. 遵义医学院学报,2010,33(5):424-425.
- [23] 赵宏宇,蔡祿,赵秀娟,等. 三种快速制备含重复序列质粒 PCR 模板的方法[J]. 生物技术通报,2010(2):119-122.
- [24] 曹燕,王媛,齐进焕,等. 一种简便快速的制备水稻基因组 DNA PCR 模板的方法[J]. 生物技术,2010,20(4):30-32.
- [25] J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,等,译. 北京:科学出版社,2002:36-39.
- [26] 刘炳辉,曹远银,闫建芳,等. 6种链霉菌基因组 DNA 提取方法比较[J]. 河南农业科学,2008(10):86-89.
- [27] MULLIS K B, FALLOONA F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction[J]. Methods Enzymol, 1987, 155:335-350.
- [28] 苏应斌,莫道君,戴天力. 改进的 PCR 模板制备及 DNA 回收方法[J]. 湖北医科大学学报,1997,18(1):24-25.
- [29] 陈新华,王小文,吴文忠. 一种简便、快速从病毒感染鱼、虾组织中制备 PCR 模板的方法[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(8):66-68.
- [30] 王静,杨澄然,郭芳芳,等. 一株放线菌的分子鉴定与抗菌谱研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(34):20964-20967.
- [31] 陈华保,亢瑜,方敏,等. 2株内生放线菌在玉米植株内的定殖及防病作用研究[J]. 西南农业学报,2011(1):117-119.

(上接第9570页)

研究室已利用此方法从50株盐碱土壤放线菌成功提取了基因组DNA,用作16S rRNA基因的PCR扩增模板。

TE煮沸法使放线菌16S rRNA基因的PCR扩增更加简便、省时和经济,在大规模快速筛选、鉴定放线菌资源方面具有重要的意义,为放线菌的分子生物学快速鉴定提供了有效的方法。

参考文献

- [1] 徐平,李文均,徐丽华,等. 微波法快速提取放线菌基因组DNA[J]. 微生物学通报,2003,30(4):82-84.
- [2] HOPWOOD D H, BIBB M J, CHATER K F, et al. Genetic manipulation of actinomycetes a laboratory manual[M]//In preparation of chromosomal, plasmid and phage DNA. Norwich: F1 Crowe & Sons Ltd, 1985:79-80.
- [3] 日本放线菌学会. 放线菌的分类与同定[M]. 日本放线菌学会, 2001:83-88.
- [4] 姜淑梅,张龙,戴世鲲,等. 一种简单、有效的适于PCR操作的放线菌DNA提取方法[J]. 生物技术,2007,17(1):40-41.
- [5] 周双清,黄小龙,黄东益,等. Chelex-100快速提取放线菌DNA作为PCR扩增模板[J]. 生物技术通报,2010(2):123-125.