

川芎内生细菌 DGGE 分析条件的筛选与优化

何冬梅, 严铸云*, 王海, 陈彩霞

(成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地,
中药材标准化省部共建教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的:针对川芎内生细菌 16S rDNA 序列进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)适宜序列的筛选与电泳条件优化。方法:川芎内生细菌 16S rDNA 的 V3 区及 V6~V8 区分别进行聚合酶链反应(PCR)及巢式 PCR 以获得各菌种的目标 DNA 序列。采用 DGGE 垂直电泳法优化凝胶变性梯度,时间间隔法优化电泳时间,并根据电泳效果对电压和电泳时间组合进行修正。结果:川芎内生细菌 16S rDNA V6~V8 区序列更能有效排除宿主植物 DNA 的干扰,获得更加丰富的内生细菌 DNA 序列。针对该区的 DGGE 最佳分析条件为变性剂梯度 55%~70% (Gel 6%),电泳温度 60℃,电压 50 V,电泳时间 16 h。结论:利用该优化条件能有效分离川芎各内生细菌 16S rDNA V6~V8 区序列,为川芎内生细菌的群落结构 PCR-DGGE 分析提供可靠的技术基础,为其他药用植物内生细菌的菌群多样性分析提供参考。

[关键词] 川芎; 内生细菌; 变性梯度凝胶电泳; 聚合酶链反应; 引物

[中图分类号] R284.1;R282.5;R932 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0026-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180026

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150807.0954.002.html>

[网络出版时间] 2015-08-07 9:54

Screening and Amelioration of DGGE Analysis Conditions for Endophytic Bacteria of Chuanxiong Rhizoma

HE Dong-mei, YAN Zhu-yun*, WANG Hai, CHEN Cai-xia (State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To screen available 16S rDNA sequences of endophytic bacteria sampled from Chuanxiong Rhizoma for further denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis, and optimize suitable analysis conditions. **Method:** In order to get DNA sequences of endophytic bacteria gathered from Chuanxiong Rhizoma, polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR experiments have been conducted to the V3 region and the V6-V8 region of 16S rDNA respectively. Vertical electrophoresis has been used to ameliorate degeneration gradient of gels, time interval method has been used to figure out electrophoresis time, in addition, some modification of voltage-time context finally been made according to electrophoretograms. **Result:** The 16S rDNA V6-V8 region was ideal for DGGE analysis, owing to that it's effective to purify DNA of endophytic bacteria from their host of Chuanxiong Rhizoma, as a result makes it easy to get diverse sequences. These conclusive ideal analysis conditions for this region: gradient range of denaturing agent 55%-70% (Gel 6%), electrophoresis temperature at 60℃, voltage of 50 V, electrophoresis time of 16 h. **Conclusion:** These DGGE analysis conditions can be useful for distinguishing 16S rDNA V6-V8 sequences of endophytic bacteria of Chuanxiong Rhizoma. This research lays a reliable foundation for further study of exploring endophytic bacterium community structure of Chuanxiong Rhizoma, as well as many other medicinal plants.

[Key words] Chuanxiong Rhizoma; endophytic bacterium; denaturing gradient gel electrophoresis; polymerase chain reaction; primer

[收稿日期] 20150302(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001610);四川省教育厅基金项目(14ZB0090,12ZB212)

[第一作者] 何冬梅, 硕士, 讲师, 从事药用植物微生态研究, Tel:028-61800097, E-mail: dongmeihe_dm@sina.com

[通讯作者] * 严铸云, 博士, 教授, 从事中药资源可持续利用与药材质量标准化研究, Tel:028-02861800231, E-mail: cdutemyan@126.com

植物普遍存在内生菌,对药用植物品质建成过程起着十分重要的作用。深入了解内生菌的菌群结构及其与植物相互作用的机制,对揭示道地药材的形成机制及中药质量的稳定等方面具有重要意义。川芎为川产道地药材,课题组前期研究发现川芎挥发油中某些组分的相对含量与其内生真菌存在一定相关性^[1-2],道地产区川芎的内生真菌多样性较非道地产区更丰富,且菌群结构更加稳定^[2-4]。除内生真菌外,植物内部还存在丰富的内生细菌,其菌群结构也可能对宿主植物产生重要影响。课题组通过对川芎内生细菌的分离纯化已获得了一部分可培养细菌的信息^[5],但该药材中广泛的不可培养的内生细菌还需要依靠分子生物学方法才能全面获知。

变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术是当前微生物生态研究中一种重要的分子生物学方法,该技术可有效地避免在传统富集、培养、分离、研究过程中造成的微生物多样性丢失,种群构成发生变化等弊病^[3]。但该技术的可靠性必须基于前期的实验条件优化,尤其在获取与分析植物内部的内生菌 DNA 序列时,有效排除宿主植物的影响是亟待解决的难题。以具有合适序列差异的目的基因进行特异性扩增和有效分离^[6],是解决该难题至关重要的途径。

在细菌多样性的分子研究技术中,通常选取 16S rDNA V3 区进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 结合 DGGE 分析,课题组前期以此序列进行纯培细菌分析时证明确实可行,但细菌该区序列与植物线粒体及叶绿体中的相应 DNA 序列具有相似性,因此以 V3 区进行植物组织内生细菌的 PCR-DGGE 分析的有效性尚待考证。报道称细菌基因组与植物核外基因组在 16S rDNA V6 ~ V8 区具有较好的差异性^[7-8]。本实验主要针对川芎内

生细菌的 16S rDNA,展开 V3 区及 V6 ~ V8 区 PCR-DGGE 分离效果的比较研究,并进行电泳条件的优化,筛选出川芎内生细菌 PCR-DGGE 研究的适宜序列和电泳条件,为后期研究川芎内生细菌的群落结构及其与川芎品质的关系奠定基础,为其他药用植物内生细菌的菌群多样性分析提供参考。

1 材料

Dcode 型变性梯度凝胶电泳系统, EP-1 Econo Pump 型自动混胶仪和 GelDoc XR 型凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司。PCR 缓冲体系, DNA 聚合酶和引物均购自日本 Takara 公司; DNA 提取、纯化试剂盒 (美国 Omega 公司), Golden View™ 核酸染料 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 水为无菌水或双蒸水, 试剂均为分析纯。川芎新鲜根茎及茎节采自四川省都江堰石羊镇川芎生产基地, 经成都中医药大学中药资源教研室严铸云教授鉴定为 *Ligusticum chuanxiong*。

2 方法与结果

2.1 川芎组织总 DNA 的提取 将样品表面的杂物除去,用流水冲洗干净,参考文献[9]方法对植物组织表面进行消毒,加水冲洗 3 次,用无菌滤纸擦干。取经过表面消毒处理的川芎根茎组织块,加液氮充分研磨成干燥细粉,取粉末约 0.1 g,采用 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取^[3-4],参考试剂盒说明书的步骤进行操作, DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, -20 °C 保存备用。

2.2 DNA 样品的 PCR

2.2.1 引物 针对细菌 16S rDNA V3 区选用通用引物 357f-GC 和 518r 对进行特异性扩增,针对细菌 16S rDNA V6 ~ V8 区采用巢式扩增的方法进行特异性扩增,外引物对为 779f/1492r,内引物对为 968f-GC/1378r^[7],见表 1。

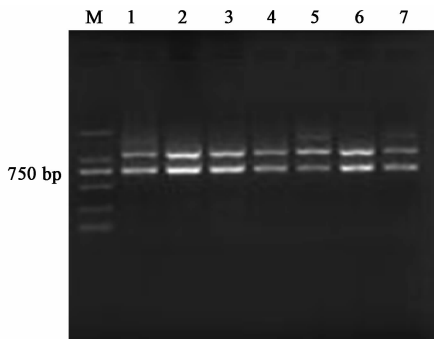
表 1 川芎内生细菌 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences for endophytic bacteria of Chuanxiong Rhizoma

引物	引物序列 (5'→3')	引物长度/mer
779f	AACAGGATTAGATACCCTG	19
968f-GC	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC	57
1378r	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	24
1492r	GGTTACCTTGTTCGACTT	19
357f-GC	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG	57
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG	17

2.2.2 16S rDNA V6 ~ V8 区巢式扩增第一轮 反 应体系 25 μL 为 PCR 缓冲体系 (Mg²⁺, dNTP plus)

12.5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下引物 (779f/1492r) 各 0.75 μL , DNA 聚合酶 0.5 μL , DNA 模板 1 μL , 双蒸水 9.5 μL 。扩增程序为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环。扩增结束后全部产物上样于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中进行检测, 染色, 采集图像, 见图 1。结果显示各样品首轮扩增后均产生了明亮清晰的双条带, 其中 1 条长度 > 1 000 bp, 另一条则约 750 bp, 扩增结果与预期相符, 其中 750 bp 左右的条带为细菌的 DNA 序列, 而较长的条带 (> 1 000 bp) 为植物线粒体及叶绿体的 DNA 序列^[7-8], 无非特异性扩增。在紫外灯下用无菌刀片对该胶片中 750 bp 左右的川芎内生细菌 V6 ~ V8 片段进行切胶, 回收 PCR 产物, 按说明书进行操作, 将宿主植物的 DNA 片段予以排除。

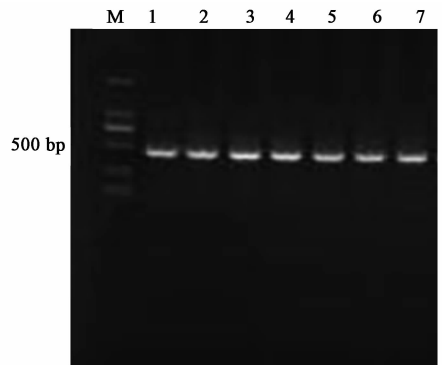


M. maker; 1 ~ 7. 模板分别来自 1 ~ 7 号川芎样本的总 DNA

图 1 川芎内生细菌 16S rDNA V6 ~ V8 区外引物 PCR

Fig. 1 PCR of 16S rDNA V6-V8 region outer primer for endophytic bacteria in Chuanxiong Rhizoma

2.2.3 16S rDNA V6 ~ V8 区巢式扩增第二轮 首轮扩增产物切胶回收后的 DNA 较长, 不能直接用于 DGGE 分析, 故将回收 DNA 作为模板进行第二轮 PCR, 以获得更短的 DNA 片段。反应体系 (50 μL) 为 PCR 缓冲体系 25 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下引物 (779f/1492r) 各 1.5 μL , 1.25 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 聚合酶 1 μL , DNA 模板 1 μL , 双蒸水 20 μL 。为提高反应的特异性, 进行降落式 PCR, 程序为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 68 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 14 个循环, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}\text{C}$; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 16 个循环。扩增结束后以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 见图 2。结果显示各样品的扩增产物均匀, 条带单一明亮, 长度略 < 500 bp, 与预期相符, 无非特异性扩增产物, 扩增效果良好, 产物长度适于 DGGE 电泳分析。

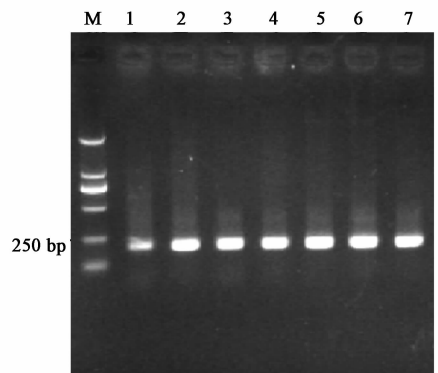


M. maker; 1 ~ 7. 模板分别为 16S rDNA V6-V8 区外引物 PCR 产物 1 ~ 7 号

图 2 川芎内生细菌 16S rDNA V6 ~ V8 区内引物 PCR

Fig. 2 PCR of 16S rDNA V6 ~ V8 region inner primer for endophytic bacteria in Chuanxiong Rhizoma

2.2.4 16S rDNA V3 区 PCR 针对 16S rDNA V3 区的 PCR 反应体系同 2.2.3 项, 引物对 357f-GC/518r。扩增程序为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环。1.2% 琼脂糖凝胶电泳中进行检测, 见图 3。结果显示各样品经扩增后均产生了明亮清晰的单一条带, 长度 < 250 bp, 扩增结果与预期相符, 产物长度符合 DGGE 电泳要求, 无需进行巢式 PCR。



M. maker; 1 ~ 7. 模板分别来自 1 ~ 7 号川芎样本的总 DNA

图 3 川芎内生细菌 16S rDNA V3 区 PCR

Fig. 3 PCR of 16S rDNA V3 region for endophytic bacteria of Chuanxiong Rhizoma

2.3 DGGE 变性梯度的优化 采用垂直电泳法确定 DGGE 变性梯度范围。利用自动凝胶仪制备变性梯度 0% ~ 100% 的聚丙烯酰胺凝胶 (Gel 6%)^[3], 变性梯度方向与电泳方向垂直, 在加样孔中加入混合 PCR 产物总计 150 μL (含上样缓冲液 30 μL)。缓冲液温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 电压 100 V, 电泳时间 4 h, 电泳结束后用银染法进行染色^[10]。经垂直电泳后, 整个图谱显示出光滑的 S 形条带, 见图 4。但

形态较为陡峭,表明变性范围较窄。根据文献[3]的方法测量变性曲线,计算待测样品 DGGE 电泳的最适变性梯度 55% ~ 70%,说明在此变性梯度范围内,川芎中的内生细菌的 16S rDNA V6 ~ V8 区序列分离情况较好。同样实验方法用于确定 16S rDNA V3 区序列的最适变性梯度 45% ~ 80% (Gel 8%)。

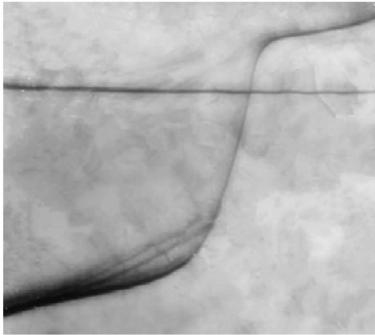


图 4 川芎内生细菌 DGGE 变性梯度优化
Fig. 4 Amelioration of degeneration gradient of gels for endophytic bacteria of Chuansong Rhizoma

2.4 电压及电泳时间组合的优化 采用时间间隔法优化电泳时间^[3]。将同一份 PCR 产物作为唯一样品,每隔 1 h 上样 1 次,每次加入混合样品(含 PCR 产物 12 μ L 及上样缓冲液 3 μ L)15 μ L,初步设定在电压 120 V 下进行 DGGE 水平电泳,见图 5。结果显示当电泳时间为 7 h 时,分离到的条带最清晰;电泳时间 < 7 h,条带分离效果不理想,时间过长则条带易弥散,故初步认为当电压为 120 V 时,最佳电泳时间 7 h。同样实验方法用于分析 16S rDNA V3 区序列,电泳时间过长导致部分条带电泳出胶,剩余条带弥散,最适电泳时间确定为 4 h。

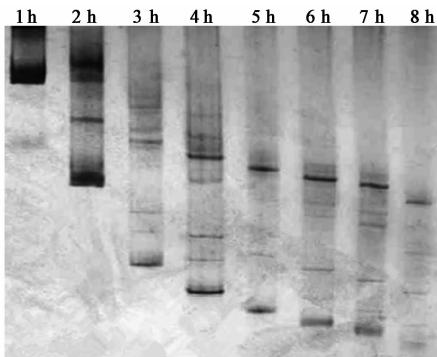
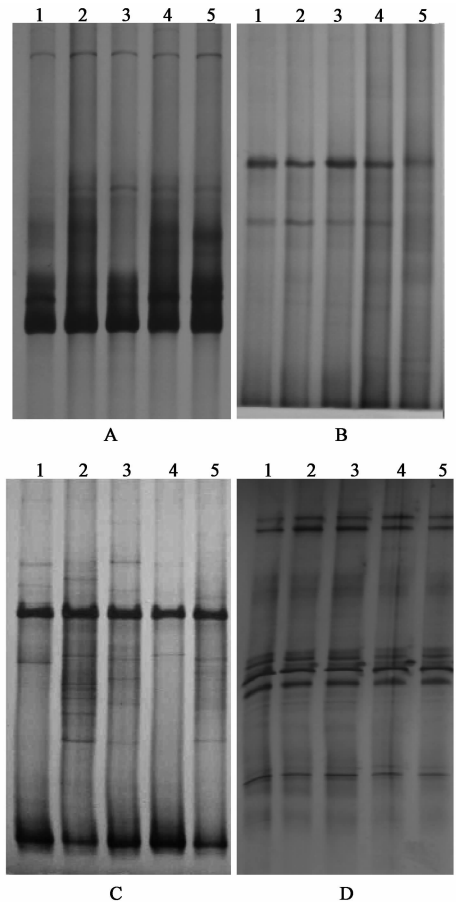


图 5 川芎内生细菌 DGGE 电泳时间优化
Fig. 5 Amelioration of DGGE electrophoresis time for endophytic bacteria of Chuansong Rhizoma

根据上述实验结果,按电压 120 V,分离梯度 55% ~ 70% 进行川芎内生细菌 16S rDNA V6-V8 区

序列的 DGGE 电泳分离试验,见图 6(A),各条带稍集中分布稍靠上,下部条带分离不理想。故调整为低电压的长时电泳法,将电压减半,电压时间延长 1 倍,见图 6(B),少量条带已经电泳出胶。因此降低电压至 50 V,见图 6(C),所得条带分离效果较好,条带清晰可辨,确定 16S rDNA V6-V8 区序列 DGGE 最佳电泳条件为温度 60 $^{\circ}$ C,变性梯度 55% ~ 70% (Gel 6%),电压 50 V,电泳时间 16 h。同时,按电压 120 V,分离梯度 45% ~ 80% (Gel 8%) 进行川芎内生细菌 16S rDNA V3 区序列的 DGGE 电泳分离试验,电泳时间 4 h,见图 6(D),各样本均有明显的条带,条带分布尚可,确定针对 V3 序列进行 DGGE 分离的适宜电泳条件为温度 60 $^{\circ}$ C,变性梯度 45% ~ 80% (Gel 8%),电压 120 V,电泳时间 4 h。



A. 电压 120 V,时间 7 h,变性梯度 55% ~ 70%;B. 电压 60 V,时间 14 h,变性梯度 55% ~ 70%;C. 电压 50 V,时间 16 h,变性梯度 55% ~ 70%;D. 电压 120 V,时间 4 h,变性梯度 45% ~ 80%;A ~ C 中泳道 1 ~ 5. 16S rDNA V6-V8 区内巢式 PCR 产物 1 ~ 5 号;D 中泳道 1 ~ 5. 16S rDNA V3 区巢式 PCR 产物 1 ~ 5 号

图 6 川芎内生细菌 DGGE 电压及电泳时间组合优化
Fig. 6 Amelioration of DGGE voltage-time context for endophytic bacteria of Chuansong Rhizoma

2.5 V3区与V6-V8区DCGE谱带差异分析 由图6(D)可知,在适宜电泳条件下,对川芎内生细菌16S rDNA V3进行PCR-DGGE分离,可获得清晰条带,但受到宿主植物线粒体和叶绿体基因组的干扰,所得序列多数来源于川芎本身,因此未能在不同川芎样本间显示出谱带的差异性。针对不同川芎样品内生细菌V6~V8区进行的巢式PCR-DGGE,在首轮PCR阶段将植物序列与细菌序列进行分离,通过针对细菌条带的切胶回收和内引物PCR,排除了绝大部分植物线粒体和叶绿体基因组的干扰后,能够获得较好的谱带差异,见图6(C),说明内生细菌群不同的川芎样本中确实存在物种差异的事实。因此,最终确定川芎组织中内生细菌16S rDNA直接进行PCR-DGGE分析的适宜序列为V6~V8区,对应的最佳电泳参数为变性梯度55%~70%(Gel 6%),电泳温度60℃,电压50V,电泳时间16h。

3 讨论

曾采用文献[7]针对毛竹同一序列(16S rDNA V6~V8区)的PCR-DGGE电泳参数分析川芎内生细菌群结构的差异,未能得到理想的分离效果,经本文优化所得电泳参数与文献[7]有别,表明对于不同的物种,因其内生菌群构成、碱基序列和长度等存在差异,DGGE电泳参数会有所不同。因此,针对不同研究对象,DGGE试验之前均应进行细致的条件优化。

DGGE对<500 bp的DNA才具有良好的分辨率。本文针对16S rDNA V6~V8区采用了巢式PCR的扩增方式,在2次扩增之间进行了目的片段(750 bp左右的片段)的切胶回收,不仅能有效排除宿主DNA的干扰,且所得最终扩增产物长度略<500 bp,完全符合DGGE电泳要求;并且16S rDNA V6~V8区巢式PCR所得DNA产物明显长于V3区PCR产物(<250 bp),包含了更多的物种分类

信息,提高了后期序列分析时物种鉴别的准确性和科学性。

[参考文献]

- [1] 汪杨丽.川芎内生菌与品质相关性研究[D].成都:成都中医药大学,2008.
- [2] 王海.川芎内生菌对品质影响的初步研究[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [3] 王萌,严铸云,何冬梅,等.川芎内生真菌PCR-DGGE分析条件的建立和优化[J].华西药学杂志,2013,8(4):335-337.
- [4] 王海,严铸云,何冬梅,等.多产区川芎内生真菌菌群组成的PCR-DGGE分析[J].中国中药杂志,2013,38(12):1893-1897.
- [5] 汪杨丽,马云桐,陈新,等.变性梯度凝胶电泳分析川芎可培养内生细菌种群的多样性[J].华西药学杂志,2010,25(1):95-97.
- [6] Kowalchuk G, Smit E. Section 3 update: Fungal community analysis using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Molecular microbial ecology manual [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2004: 2673-2690.
- [7] 夏冬亮.毛竹根部内生细菌多样性研究[D].保定:河北大学,2009.
- [8] 孙磊.非培养方法和培养方法对水稻内生细菌和根结合细菌的研究[D].北京:首都师范大学,2006.
- [9] Zhang W P, Wendel J F, Clark L G. Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae) [J]. Mol Phylogenet Evol, 1997, 8(2): 205-217.
- [10] Creste S A, Neto T A, Figueira A V O. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining [J]. Plant Mol Biol Rep, 2001, 19(4): 299-306.

[责任编辑 刘德文]