

用 RAPD 分子标志方法研究 氧化亚铁硫杆菌遗传多样性

贺治国¹, 胡岳华¹, 胡维新², 钟 慧², 徐 兢¹, 朱 敏²

(1. 中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083; 2. 中南大学湘雅医学院分子生物学研究中心, 长沙 410078)

摘要: 本文对采自 7 个不同环境的氧化亚铁硫杆菌进行了随机扩增多态性 DNA(RAPD) 分析, 20 个引物中筛选出扩增效果较好的 4 个引物, 每个引物能产生 1~9 条 DNA 条带。通过 4 个引物的 RAPD 分析获得的平均相似性系数表明不同来源的菌之间的相关系数在 44%~83% 之间。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌; RAPD; 亲缘关系

中图分类号: Q933 文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)01-0069-06

Studies of Polymorphisms of *Thiobacillus Ferrooxidans* Using RAPD

HE Zhi-Guo¹, HU Yue-Hua¹, HU Wei-Xin², ZHONG Hui², XU Jing¹, Zhu Min²

(1. School of Resource Process and Bioengineering, CSU, Changsha 410083, China;

2. Molecular Biology Research Centre, Medical School of Xiangya, CSU, Changsha 410078, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA(RAPD) was used in analyzing the polymorphisms of *Thiobacillus ferrooxidans* from seven different places. Of the 20 primers, four could generate reproducible RAPD profiles, and each one produced 1~9 bands. The similarity coefficients obtained from profiles generated by four primers among *Thiobacillus Ferrooxidans* were about 44%~83%.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*; RAPD; relationship

氧化亚铁硫杆菌是一类革兰氏阴性的化能无机营养细菌, 是极端嗜酸性的专性自养细菌, 最适宜生长 pH 为 2.0~3.5, 广泛分布在硫化矿床的酸性废水中。这类细菌很早就被应用于贵重金属的浸出和回收, 适合于从低品位的矿石中浸出稀有贵重金属。主要是通过氧化 FeSO_4 和 FeS_2 产生 Fe^{3+} 氧化剂, 氧化金属硫化物使之变成可溶性的硫酸盐形式, 称为细菌的间接作用^[1]; 或者细菌直接作用于矿物表面氧化金属硫化物, 称之为直接作用^[2]。细菌浸出的方法具有低成本、低能耗、无污染等特点。美国有

25%左右的铜就是通过这种方法开采的^[3]。此外在含硫废水处理 and 煤的脱硫等方面也有重要的应用前景。氧化亚铁硫杆菌也有一些限制其应用的特点, 比如这类细菌的生长缓慢, 细胞得率低, 生产成本增加, 而且氧化亚铁硫杆菌对某些重金属离子缺乏抗性, 而限制了其应用的范围。有研究表明, 来源不同的氧化亚铁硫杆菌菌株对金属硫化矿物的浸出效果是不一样的, 因而从各个矿山酸性废水中采集氧化亚铁硫杆菌, 并对其氧化金属硫化物能力进行实验, 以筛选出适应于不同底物作用的优良菌株极

收稿日期: 2002-11-26; 修回日期: 2003-03-03

基金项目: 国家杰出青年基金(59925412)资助[Supported by the National Foundation of the Outstanding Youth (No. 59925412)]

作者简介: 贺治国(1978-), 男, 在读博士, 专业: 微生物学, 从事氧化亚铁硫杆菌的分子遗传学基础研究。

E-mail: hzg13@163.com, Tel: 0731-8879815

通讯作者: 胡岳华(1962-), 男, 教授, 博导, 专业: 矿物加工。E-mail: hyh@csu.edu.cn, Tel: 0731-8879815

为重要。

RAPD 技术是由 Williams 等于 1990 年首先创立的一种 DNA 分子标记技术^[4]。近年来分子标记技术发展迅速,其中常用的有 RFLP、AFLP 及 ARD 等,这些方法均为选择性扩增特异的 DNA 片段,要求对所研究物种 DNA 序列文库清楚,以便设计和合成特异的引物碱基序列,这给研究工作带来了局限性。RAPD 技术是利用随机 DNA 序列(引物),在生物种群中寻找同源序列,并将同源序列之间的片段扩增出来的一种分子标记技术,在对研究对象遗传背景知之甚少,是寻找生物间遗传多样性的一种十分有效的手段。但 RAPD 分析技术的工作量较大,在寻找同缘序列的过程中须筛选大量的引物,但一旦找到稳定出现的多态性分子标记,就可反映生物间遗传物质的差异。RAPD 作为一种快速、灵敏的分子标记已广泛应用于微生物的种间、种内遗传多样性分析和各种鉴定等,表现出较强的多态性。

本实验首次采用 RAPD 法对来自 7 个不同金属矿山的酸性废水的氧化亚铁硫杆菌建立分子遗传标志,从分子生物学角度考查了不同来源的氧化亚铁硫杆菌核酸序列的多态性。对浸矿效果好的菌株通过筛选特异的具有标志性的扩增条带,从而为筛选出优良的氧化亚铁硫杆菌菌株的提供遗传标记。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

氧化亚铁硫杆菌是由本实验室从 7 个不同地方的矿山废水采集富集培养,并经溶液稀释法纯化分离得到。(7 个菌株分别采自:广东韶关大宝山铜矿、长沙浏阳市、南京栖霞山铅锌矿、湖北大冶铜矿、安徽铜陵铜矿、九江城门山铜矿、江西德兴铜矿)。

1.2 试剂

TAQ 酶,dNTP 购自 Sangong 公司;20 个随机引物购自上海生物工程公司(生物公司已合成,随机定购的)。其余试剂均为国产或进口试剂。

1.3 DNA 的提取

基因组 DNA 提取的技术按照 Ausubel 等^[5]来操作。于对数期取 200 mL 在铁培养基培养的氧化亚铁硫杆菌菌液,经离心收集用 10 倍稀释的 9K 培养基冲洗几次以除去沉淀的铁。离心得到的细胞团重悬于含有 10 mmol/L Tris-HCl,pH8,1 mmol/L

EDTA 的 200 μ L 溶液中;然后轻轻地与 80 μ L 10% SDS,80 μ L 0.5 mol/L EDTA pH8 及 10 μ L 10 ng/mL RNase A 混合,在室温下温浴 15min;把重悬液置于-20 $^{\circ}$ C 下冷冻 15 min,在 55 $^{\circ}$ C 溶化 5 分钟后加入 50 μ L 3 ng/mL 蛋白酶 K。混合物在 55 $^{\circ}$ C 下温浴 10min。从细胞中裂解出来的 DNA 用酚抽提,再用酚/氯仿/异丙醇和氯仿/异丙醇抽提。最后,用 Ethanol 沉淀并重悬于 150 μ L Tris-HCl pH8,1 mmol/L EDTA 溶液中。

表 1 随机引物序列

Table 1 The sequences of random primers

S3	CATCCCCCTG	S136	GGAGTACTGG
S35	TTCCGAACCC	S147	AGATGCAGCC
S39	CAAACGTCGG	S1061	TCGCTACGGT
S46	ACCTGAACGG	S1113	CACGGCACAA
S47	TTGGCACGGG	S1244	TTGCCTCGCC
S57	TTTCCCACGG	S1278	CACCACTAGG
S65	GATGACCGCC	S1488	CTCTGCCTGA
S79	GTTGCCAGCC	S1489	CCCCTCAGAA
S87	GAACCTGCGG	S1505	CCCCTAGAC
S109	TGTAGCTGGG	S1520	TGCGCTCCTC

1.4 RAPD 反应条件

扩增 PCR 反应在 Hybird 公司产的 PCR 仪上进行,反应体积为 25 μ L。有关循环热参数,变性:94 $^{\circ}$ C,1 min;退火:36 $^{\circ}$ C 1 min;延伸:72 $^{\circ}$ C 1.5 min;40 次循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 终止反应,产物 4 $^{\circ}$ C 保存。25 μ L 反应体系中的各物质的配比按以下最佳反应体系来优化。

RAPD-PCR 最佳反应体系的建立:以引物浓度、模板浓度、镁离子浓度、脱氧核苷酸(dNTPs)浓度、牛血清白蛋白(BSA)浓度及 TAQ 酶用量为因素,设计因素位级表(表 2),再根据因素位级表确定正交实验方案(表 3),并根据以下的正交实验方案经过实验确定方案 3 为最后条件,建立 RAPD-PCR 最佳反应体系。

1.5 数据分析

1.5.1 菌株间相似系数

电泳图谱中的每一条带(DNA 片段)均为一个分子标记,并代表一个引物结合位点,根据各分子标记的迁移率及其有无所有位点的二元数据,在同一电泳迁移位置上,有 DNA 扩增条带记为 1,没有记为 0,强带和弱带的赋值均为 1,按以下公式计算物

种 X 和物种 Y 间的相似性系数:

$$\text{相似性系数 SIM} = 2 \times n_{xy} / (n_x + n_y) \times 100\%$$

n_{xy} : 两样品共有的 DNA 条带数; n_x : X 样品的 DNA 条带数; n_y : Y 样品的 DNA 条带数。

表 2 因素位级表

Table 2 The grades of factors table

位 级 Grades	因 素 (Factors)					
	模板浓度 (mol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	MgCl ₂ 浓度 (mmol/L)	BSA 浓度 (ng/ μ L)	Taq 酶 用量(U)
	Con. of model(mol/L)	Con. of primer (μ mol/L)	Con. of dNTPs (mmol/L)	Con. of MgCl ₂ (mmol/L)	Con. of BSA (ng/ μ L)	Con. of enzyme(U)
1	0.1	0.4	0.1	1.0	0	0.5
2	0.5	0.6	0.15	1.5	125	1.0
3	1.0	0.8	0.20	2.0	250	1.5
4	1.5	1.0	0.25	2.5	375	2.0

表 3 正交实验方案表

Table 3 The intercross experiments' scheme

位 级 Grades	因 素 (Factors)					
	模板浓度 (mol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	MgCl ₂ 浓度 (mmol/L)	BSA 浓度 (ng/ μ L)	Taq 酶 用量(U)
	Con. of model (mol/L)	Con. of primer (μ mol/L)	Con. of dNTPs (mmol/L)	Con. of MgCl ₂ (mmol/L)	Con. of BSA (ng/ μ L)	Con. of enzyme(U)
1	1	2	3	2	3	3
2	3	4	1	2	1	2
3	2	4	3	3	1	4
4	4	2	1	3	3	1
5	1	3	1	4	4	4
6	3	1	3	4	2	1
7	2	1	1	1	2	3
8	4	3	3	1	4	2
9	1	1	4	3	1	2
10	3	3	2	3	3	3
11	2	3	4	2	3	1
12	4	1	2	2	1	4
13	1	4	2	1	2	1
14	3	2	4	1	4	4
15	2	2	2	4	4	2
16	4	4	4	4	2	3

1.5.2 聚类分析

采用平均链锁聚类方式(average linkage clustering)运用 SPSS 系统软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 城门山氧化亚铁硫杆菌的 PCR 扩增

以正交方案中的方案 2 为条件,用 20 种引物对城门山铜矿分离的氧化亚铁硫杆菌进行 PCR 扩增(如图 1),从中筛选出多态性好的引物 S3; S35; S147; S1113 作为下一步扩增的引物。

2.2 按正交实验表,用引物 S35 对城门山的细菌进行扩增

氧化亚铁硫杆菌的 RAPD-PCR 正交实验的扩增结果(图 2)。可分为 3 种情况:(1)无任何扩增带,如 4,5 号实验;(2)有扩增带但重复性不好如 1、6、9、10、13、15、16 号;(3)扩增带数多,谱带较清晰,重复性好,如 2、3、7、8、11、12 号实验,因此实验号为 2、3、7、8、11、12 的反应为最佳体系。选用 3 号实验作为氧化亚铁硫杆菌的最佳扩增反应体系。大多数有关 RAPD-PCR 文献认为^[6,7],模板浓度一般采用 0.1 ng/ μ L~10 ng/ μ L。引物浓度在 0.1 μ mol/L~2.0 μ mol/L 之间为最佳。dNTP 各自在反应的最终浓度在 0.1 μ mol/L~2.0 μ mol/L 之间最佳。Mg²⁺ 是 Taq 酶的激活剂,其优化浓度

在 $1.0 \mu\text{mol/L} \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 之间。有的学者^[6]还在反应体系中加入蛋白质保护剂牛血清白蛋白(BSA),以延缓 TAQ 酶活性的丧失,使扩增稳定。

TAQ 酶的用量至关重要,研究表明其用量大都在 $0.5 \text{ U} \sim 2 \text{ U}$ 之间。因此我们设计各因素的位级都在以上范围内。

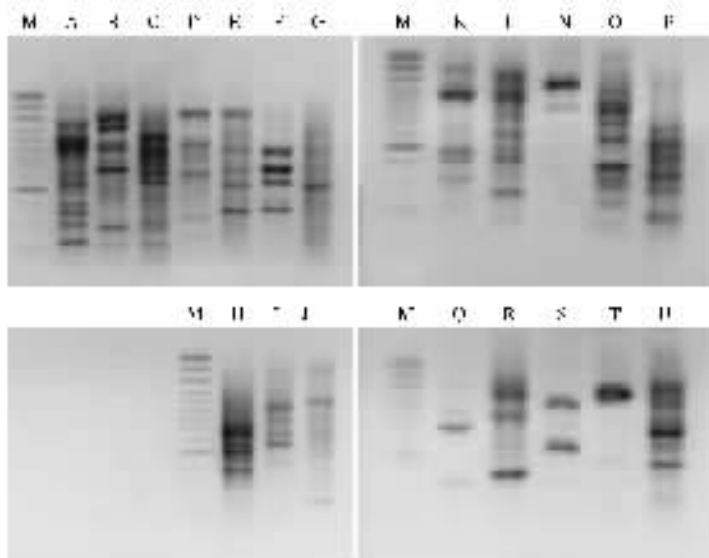


图 1 20 条引物对城门山氧化亚铁硫杆菌的随机扩增

M: Mark; A: S3 引物; B: S35 引物; C: S39 引物; D: S46 引物; E: S47 引物; F: S57 引物; G: S65 引物; H: S79 引物; I: S87 引物; J: S109 引物; K: S136 引物; L: S147 引物; N: S1061 引物; O: S1113 引物; P: S1244 引物; Q: S1278 引物; R: S1488 引物; S: S1489 引物; T: S1505 引物; U: S1520 引物。

Fig. 1 Random amplified *Thiobacillus ferrooxidans* (T. f) from Chengmenshang with 20 pieces of primers

M: Mark; A: S3 primer; B: S35 primer; C: S39 primer; D: S46 primer; E: S47 primer; F: S57 primer; G: S65 primer; H: S79 primer; I: S87 primer; J: S109 primer; K: S136 primer; L: S147 primer; N: S1061 primer; O: S1113 primer; P: S1244 primer; Q: S1278 primer; R: S1488 primer; S: S1489 primer; T: S1505 primer; U: S1520 primer.

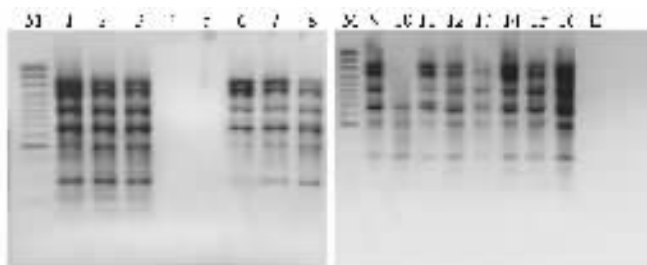


图 2 按正交实验表用引物 S35 对城门山的细菌进行扩增

M: Mark; 1~16: 与正交实验方案表对应; E: 空白对照。

Fig. 2 Amplification for T. f from Chengmenshang with primer S35

M: Mark; 1~16: corresponding with Table 3; E: blank comparison.

2.3 4 种引物对 7 种氧化亚铁硫杆菌的扩增结果

从 20 条引物中筛选出 4 条引物对 7 种氧化亚铁硫杆菌进行 PCR 扩增。4 条引物对 7 个不同地方的氧化亚铁硫杆菌扩增都有条带出现。经重复实验,各引物的扩增图谱重复性较好,说明 RAPD 图

谱能稳定地反映出各氧化亚铁硫杆菌的遗传差异性。每条引物对不同地方的氧化亚铁硫杆菌扩增的 DNA 条带数不等,都在 1~9 条之间,扩增 DNA 产物其长度范围在 $100 \sim 1250 \text{ bp}$ 之间。每个引物对 7 种氧化亚铁硫杆菌扩增的 RAPD 图谱都

不一样,都有其独特的谱带,也就是说每一种都有各自的“指纹”。同时,很多 DNA 扩增片段是几种氧

化亚铁硫杆菌所共有的,即某一引物的结合位点较保守。

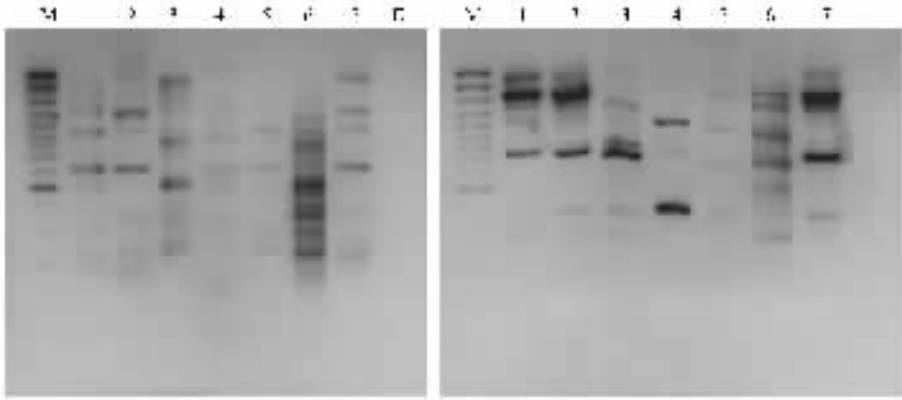


图 3 S3 引物扩增结果(左)与 S35 引物扩增结果(右)

1:大宝山 T. f 菌;2:浏阳 T. f 菌;3:栖霞山 T. f 菌;4:铜禄山 T. f 菌;5:铜陵 T. f 菌;6:城门山 T. f 菌;7:德兴 T. f 菌;E:空白对照。

Fig. 3 The results amplified with S3 primer(left) and the results amplified with S35 primer(right)

1;Dabaoshang T. f;2;Liuyang T. f;3;Xixiashang T. f;4;Tonglushang T. f;5;Tongling T. f;
6;Chengmenshang T. f;7;Deixing T. f;E;the blank comparison.

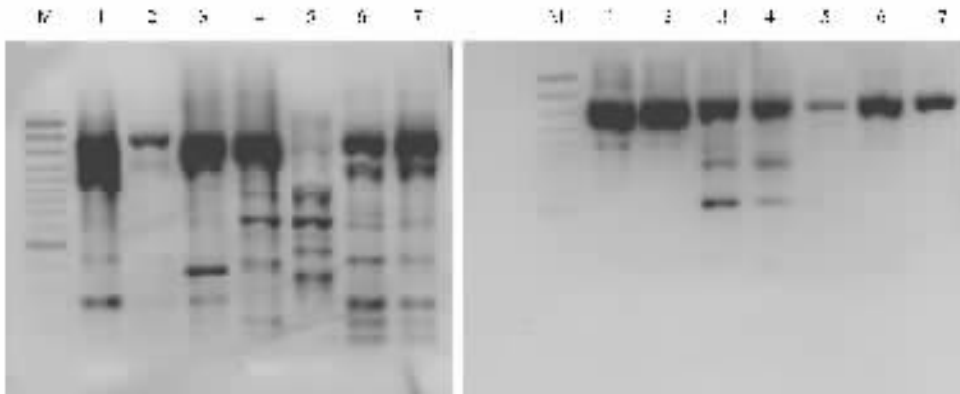


图 4 S147 引物扩增结果(左)与 S1113 引物扩增结果(右)

1:大宝山 T. f 菌;2:浏阳 T. f 菌;3:西峡山 T. f 菌;4:铜禄山 T. f 菌;5:铜陵 T. f 菌;6:城门山 T. f 菌;7:德兴 T. f 菌;M:Mark。

Fig. 4 Results amplified with S147 primer (left) and the results amplified with S1113(right)

1;Dabaoshang T. f;2;Liuyang T. f;3;Xixiashang T. f;4;Tonglushang T. f;
5;Tongling T. f;6;Chengmengshang T. f;7;Deixing T. f;M;Mark.

表 4 数据平均相似性系数矩阵

Table 4 The data average comparability coefficient matrix

SIM(%)	VAR00001	VAR00002	VAR00003	VAR00004	VAR00005	VAR00006	VAR00007
VAR00001	100.00						
VAR00002	78.95	100.00					
VAR00003	55.80	61.58	100.00				
VAR00004	48.89	48.78	60.87	100.00			
VAR00005	80.95	57.89	55.81	44.44	100.00		
VAR00006	72.34	60.47	66.67	52.00	46.81	100.00	
VAR00007	75.00	72.22	82.93	60.47	65.00	71.11	100.00

2.4 聚类分析

4 个引物 RAPD 分析所获得的数据平均相似性系数矩阵(表 4)得知,氧化亚铁硫杆菌的最大相关系数是 82.93,最小是 44.44,这说明它们之间存在较大的差异性。这与由于长期在不同的环境下生存的氧化亚铁硫杆菌具有变异性相吻合;同时,为从自然界中选取优良菌种提供了理论上的可能性。

从图 5 树状数字分类图可以看出,1,2,6 号 3 种氧化亚铁硫杆菌之间及 4,5 号亲缘关系较远,7 号在树状数字分类图中离其他菌株最近,所以相对亲缘关系也较近。

本实验采用正交实验方案建立 RAPD 最佳反应体系,从而提高了 RAPD 法建立遗传标志的稳定性。

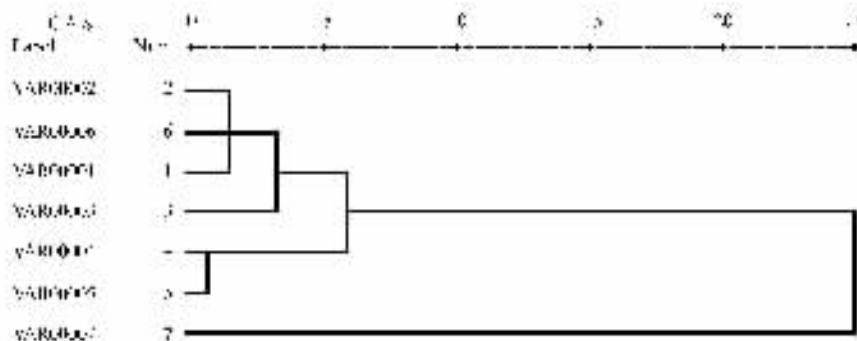


图 5 树状数字分类图

Fig. 5 Endrogram using average linkage (Between groups)

参考文献 (References):

- [1] ZHANG Wei-Qing, WEI De-Zhou, SHEN Jun. Oxidizing action of *Thiobacillus ferrooxidans* on chalcopyrite. *Mining and Metallurgical Engineering*, 1999, 19(3): 30~33.
张维庆, 魏德洲, 沈俊. 氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)对黄铜矿的氧化作用. *矿冶工程*, 1999, 19(3): 30~33.
- [2] Boon M. In: PhDthesis. The Netherlands, 1996, 23~118.
- [3] Williams J G K, Kublik A R, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuclear Acids Research*, 1990, 18(22): 6531~6535.

- [4] Ausubel F M, Brent K R E, Kingston Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene, New York, 1992.
- [5] John Welsh, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nuclear Acids Research*, 1990, 18(19): 5275~5279.
- [6] Lanham P G, Fennell S, Moss J P, Moss J P, Powell W. Detection of polymorphic loci in arachis germplasm using random amplified polymorphic DNAs. *Genome*, 1992, 35: 885~889.
- [7] Soren Brauner, Daniel J, Crawford T F, Stuessy. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *American Journal of Botany*, 1992, 79(12): 1436~1439.

科学出版社新书《植物生物化学与分子生物学》预告

《植物生物化学与分子生物学》(Biochemistry & Molecular Biology of Plants)中文版全彩印刷 科学出版社 2004 年出版,平装,约 1100 页。

本书英文版由国际杰出的植物生物学家编写,美国植物生物学家学会出版,是植物生物学领域的重要著作。全面介绍了植物领域分子水平研究的历史、现状和发展方向,堪称是植物分子生物学研究领域的“圣经”。

该书由北京大学瞿礼嘉、顾红雅、白书农、赵进东、陈章良、邓兴旺等译校。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书。

欢迎访问生命科学图书网站, <http://www.lifescience.com.cn>