

分子生物学技术在瘤胃纤毛虫研究中的应用

李启琳, 李燕鹏, 王士长 (广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530004)

摘要 综述了分子生物学技术在反刍动物纤毛虫研究中的应用, 介绍了包括PCR-RFLP、PCR-RAPD、AFLP、SAP在内的分子标记技术和以SSUrRNA为主的实时定量PCR、单链构象多态性、变性梯度凝胶电泳等技术的原理及对纤毛虫多态性研究的贡献。

关键词 分子生物学技术; 瘤胃纤毛虫; PCR-rRNA

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-00908-03

瘤胃纤毛虫在瘤胃功能中扮演着重要角色, 但它与其他瘤胃微生物之间关系复杂, 而且其种类、数量、功能随着日粮、内容物稀释率、外流速度的变化而改变, 因此应用传统的分析方法很难探究其奥秘, 迫切需要应用新技术、新方法, 从新的角度对其进行研究。分子生物学的飞速发展就为人们提供了研究瘤胃微生态系统的新思路和有力工具, 在瘤胃纤毛虫系统发生学研究中具有重要作用。

1 分子标记技术在瘤胃纤毛虫分类学研究中的应用

运用分子标记技术(包括PCR-RFLP、PCR-RAPD、AFLP、SAP等)研究纤毛虫是近二三十年开展起来的工作, 该方法体现了可靠、准确的优点。通过DNA多态性分析, 可以克服因虫体小、形态相似而无法准确区分的困难。在基因和分子水平上调查纤毛虫群体的遗传多样性, 为研究近缘种及种内群体间的遗传差异, 分析种内及种间的进化时序以及系统地位开辟了一条新的途径^[1]。

1.1 限制性酶切片段长度多态性 限制性酶切片段长度多态性(RFLP)技术是用特异性引物对混合微生物群体DNA提取物进行PCR扩增, 然后用适当的限制性内切酶对扩增产物进行酶解产生若干不同长度的小片段, 其数目和每一片段长度反映了DNA限制性位点(Restriction site)的分布, 由于不同来源的DNA具有不同的限制性酶切位点, 每一种DNA/限制性酶组合所产生的片段是特异的, 从而产生多态性, 所以它能作为某一DNA的特有指纹。

RFLP的优点主要表现在: 无表型效应, 其检测不受环境条件和发育阶段影响; 共显性, 可以区别纯合基因型和杂合基因型; 可利用的探针很多, 可以检测到很多遗传位点。但RFLP指纹技术也有缺陷: RFLP分析所需DNA量较多, 纯度要求较高; RFLP对未知基因进行定位比较方便, 但检测步骤较多, 周期长, 特别是用放射性核素, 影响应用^[2]; 它具有种属特异性, 且只适应单低拷贝基因; RFLP多态位点数仅1~2个, 多态信息含量低, 仅0.2左右。

Mitsunori等^[3]运用PCR-RFLP技术研究了附着于山羊瘤胃纤毛虫上的产甲烷菌的系统发生学。通过对产甲烷菌染色体DNA进行PCR扩增后, 将扩增产物克隆到大肠杆菌, 并对克隆片段分组。通过与已知产甲烷菌的16SrDNA的RFLP类型比较, 分析瘤胃产甲烷杆菌的16SrDNA的丰度。结果表明, 几乎所有纤毛虫体内都含有产甲烷菌, 其中有尾头毛虫和等毛科瘤胃纤毛虫与产甲烷菌结合紧密。

1.2 随机扩增多态DNA指纹图谱 随机扩增多态DNA指纹图谱(RAPD)技术是利用一系列不同随机排列碱基序列的寡核苷酸单链为引物, 通过PCR扩增得到目的基因组特异性DNA片段, 由此研究微生物种群多态性。该技术所用的一系列引物DNA序列各不相同, 但对于任一特定的引物, 它同基因组DNA有其特定的结合位点。如果这些结合位点在基因组某些区域内的分布符合PCR扩增反应条件, 就可扩增出DNA片段。因此, 如果基因组在这些区域内发生DNA片段插入、缺失或碱基突变就可能引起这些特定结合位点分布发生相应的变化, 而使PCR产物增加、减少或发生分子量的改变。通过对PCR产物的检测即可测出基因组DNA在这些区域的多态性。由于进行RAPD分析时, 可用引物数量很大, 虽然对每个引物而言其检测基因组DNA多态性的区域是有限的, 但利用一系列引物则可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。因此RAPD可以对整个基因组DNA进行多态性检测。

RAPD技术建立在PCR基础之上, 继承了PCR的优点又具有自身特点: 所用的引物为随机设计的寡核苷酸引物; 不同的物种可以使用通用的引物进行遗传分析; 可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下, 分析其DNA多态性; 检测效率高、样品用量少、灵敏度高; RAPD技术简单, 易掌握, 不需要繁杂的准备工作。RAPD也有其缺点: RAPD图谱中某些弱带重复性较差; 目前该法在引物长度和序列及应用的引物数目、扩增反应条件等实验技术方面未标准化, 影响了不同条件下结果的可比性; 每个标记含有的信息量小; 显性标记无法区分从一个位点扩增的DNA片段是纯合的还是杂合的, 无法进行等位基因分析。

目前, 已经采用RAPD方法和ITS1序列分析技术进行了反刍动物瘤胃厌氧真菌 *Neocallimastix frontalis* 不同代基因组相似性的研究^[4], 但应用于瘤胃纤毛虫的研究鲜有报道。

1.3 扩增片段长度多态性 扩增片段长度多态性(AFLP)技术是在PCR和RFLP的基础上发展起来的一种将RAPD的随机性与专一性扩增巧妙结合的新型分子标记技术。该技术是通过基因组DNA进行限制性酶切片段的不同长度进行检测多态性的分子标记, 原理是利用限制性内切酶对基因组DNA进行酶切, 产生不同大小的酶切片段, 用T₄DNA连接酶将双链人工接头与酶切片段进行连接, 从而形成特异片段, 作为扩增的模板; 用含有选择性碱基的引物对特异片段进行扩增, 获得的扩增片段经聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 据扩增片段的长度来揭示其多态性。

AFLP技术作为一种新的分子标记技术, 主要有以下特点: 用少量的选择性引物能在较短的时间内检测到大量的

基金项目 广西自然科学基金项目(桂科攻0428005-18)。

作者简介 李启琳(1982-), 女, 广西桂林人, 硕士研究生, 研究方向: 生物技术在动物营养中的应用。

收稿日期 2007-09-15

位点,且一对引物所检测到的多个位点或多或少地随机分布在多条染色体上,因此可通过选用少量效率高的引物组合,获得覆盖全部基因组的 AFLP 标记; AFLP 的多态性高,一般一次检测可获得 50~100 个 AFLP 扩增产物,能在遗传关系十分相近的材料上产生多态性,且谱带丰富、清晰可辨; AFLP 分析由于扩增片段较短,故分辨率高; AFLP 分析所需 DNA 的量少(0.05~0.50 μg),而且对模板浓度的变化不敏感,允许一定程度的共扩增; AFLP 稳定可靠,直接以 DNA 的形式表现,不受基因组来源和复杂程度的影响,没有种属特异性; AFLP 引物是通用的,可用于没有任何分子生物学研究基础的物种; AFLP 标记银染技术具有快速、方便的特点,在 1~2 d 内可以得到指纹结果; AFLP 标记呈典型的孟德尔方式遗传,可作为物理图谱和遗传图谱的联系桥梁,用于构建基因组的高密度连锁图谱。AFLP 技术的缺点表现为它的整套实验费用昂贵和在操作中通常要利用同位素标记^[5],对样品 DNA 质量要求严格。

国内利用该法对瘤胃纤毛虫的系统分类研究仍为空白,但此方法不失为一种极有希望的 DNA 分子标记手段。

1.4 酶切扩增多态性 酶切扩增多态性(CAPS)技术是将 RFLP 探针的两端测序,合成引物,扩增的是探针本身,然后用多种内切酶酶解扩增产物,产生的多态性称为酶切扩增多态性序列。由于仅在探针片段以内的多态性才有可能检测到,因此用该方法检测到的多态性水平较低。采用 CAPS 法的关键是如何扩增出有代表性的多态性片段。当前研究较多的线粒体 DNA(mtDNA) 是良好的目的片段,mtDNA 具有结构简单、母系遗传、进化速度快等特点,因而对于调查微生物群体遗传多样性、研究近缘种及种内群体间的遗传差异、分析种内及种间的遗传分化特别有效。利用扩增 mtDNA 片段的通用引物,结合纤毛虫的序列特点设计专一性 mtDNA 引物进行特异性 PCR 扩增,再利用识别特定碱基序列的限制性内切酶对产物进行酶、双酶或不完全酶消化,用琼脂糖凝胶电泳将各消化片段分开,测定其迁移距离,计算大小,分析结果,可确定限制酶在 mtDNA 上消化位点的位置并构建出该 mtDNA 的限制性酶切图谱。目前,国内已经有应用 mtDNA 酶切技术对哺乳类动物进行的研究^[6],但应用于瘤胃纤毛虫的研究鲜有报道。

2 以 SSU rRNA 为主的分子生物学技术在瘤胃纤毛虫研究中的应用

目前瘤胃微生物标记物不能很好地区分纤毛虫氮和细菌氮,因此限制了对瘤胃纤毛虫数量的研究^[7],而实时定量 PCR(Real-time quantitative PCR)、单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphism,SSCP)、变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis,DGGE)等技术的应用,为研究瘤胃纤毛虫提供了极有效的工具。

2.1 实时定量 PCR 技术 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。定量的原理:PCR 反应过程中产生的 DNA 拷贝数是呈指数方式增加的,随着反应循环数的增加,最终 PCR 反应不再以指数方式生成模板,从而进入平台期。在传统的 PCR 中,常用凝胶电泳分

离并用荧光染色来检测 PCR 反应的最终扩增产物,因此用此终点法对 PCR 产物定量存在不可靠之处。在实时荧光定量 PCR 反应中,对整个 PCR 反应扩增过程进行了实时的监测和连续地分析扩增相关的荧光信号,随着反应时间的进行,监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。在 PCR 反应早期,产生荧光的水平不能与背景明显地区别,而后荧光的产生进入指数期、线性期和最终的平台期,因此可以在 PCR 反应处于指数期的某一点上来检测 PCR 产物的量,并且由此来推断模板最初的含量。

实时定量 PCR 不仅操作简便、快速高效、高通量,而且具有很高的敏感性、重复性和特异性;在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定,大大降低了污染的可能性且无须在扩增后进行操作。同时,它还可以通过不同的引物设计在同一反应体系中同时对多个靶基因分子进行扩增,即多重扩增。目前它作为一种极有效的实验方法,已广泛地应用于病原微生物检测、细胞因子表达分析、基因突变分析等研究中^[8-13],但应用于瘤胃纤毛虫的研究不多。Sylvester 等^[10]认为,可以用实时 PCR 半定量地间接估测瘤胃的纤毛虫数量。他们用专一性的纤毛虫 18S rRNA 探针(P.SSU 54f/P.SSU 1747r),测定了瘤胃液和小肠食糜中的纤毛虫数,发现 PCR 产物中有 6.38×10^8 个/ng 纤毛虫 rDNA 拷贝,而且还发现 7.2×10^5 个/ng 未知 rDNA 拷贝。

2.2 单链构象多态性技术 是由于单链 DNA 片段呈复杂的空间折叠构象,这种立体结构主要是由其内部碱基配对等分子内相互作用力来维持的,当有一个碱基发生改变时,会或多或少地影响其空间构象,使构象发生改变,空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中受排阻大小不同。因此,通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),可以非常敏锐地将构象上有差异的分子分离开,并称该方法为单链构象多态性分析。在随后的研究中,又将 SSCP 用于检查 PCR 扩增产物的基因突变,从而建立了 PCR-SSCP 技术,进一步提高了检测突变方法的简便性和灵敏性。

SSCP 方法简便、快速、灵敏,不需要特殊的仪器,适合临床实验的需要。但它也有不足之处,例如,只能作为一种突变检测方法,要最后确定突变的位置和类型,还需进一步测序;电泳条件要求较严格;另外,由于 SSCP 是依据点突变引起单链 DNA 分子立体构象的改变来实现电泳分离的,这样就可能会出现当某些位置的点突变对单链 DNA 分子立体构象的改变不起作用或作用很小时,再加上其他条件的影响,使聚丙烯酰胺凝胶电泳无法分辨造成漏检。尽管如此,该方法和其他方法相比仍有较高的检测率。首先,它可以发现靶 DNA 片段中未知位置的碱基突变,Takao 经实验证明小于 300 bp 的 DNA 片段中的单碱基突变,90% 可被 SSCP 发现,他认为现在知道的所有单碱基改变绝大多数可用该方法检测出来。另外,SSCP 方法可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同迁移率的突变单链 DNA 分离,并且还可以进一步提纯。用这种方法可以最终从 DNA 序列水平上鉴别突变 DNA 片段。目前国内利用该法对瘤胃纤毛虫的系统分类研究仍为空白。

2.3 变性梯度凝胶电泳技术 是通过在一段引物上附加富含 GC 的约 40 个碱基组成的一段序列(GC 夹子),使双链

DNA 分子在梯度变性的凝胶中解开但不彻底解离,使 DNA 泳带的形成位置更有特异性,而序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为,它们在凝胶的不同位置停止迁移,从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段分离。基本原理是:双链 DNA 在变性梯度凝胶(变性剂浓度从小到大)的泳动过程中,恒定的电泳温度(45~65)和化学变性剂(尿素、甲酰胺)作用 DNA 双链分子,DNA 的两条链就会开始解开(解链)。其解链的速度和程度与其碱基序链的区域由解链温度较低的碱基组成,由于 GC 碱基对比 AT 碱基对结合得牢固,因此 GC 含量高的区域具有较高的解链温度。解链温度低的区域,通常位于端部称作低温解链区(Lower melting domain)。如果端部解开,那么双螺旋就由未解链部分束在一起,这一区域便称作高温解链区(High melting domain)。如果变性剂浓度继续升高,两条链就会完全解开。变性梯度凝胶电泳的依据,首要的一点是 DNA 双链末端一旦解链,其在凝胶中的电泳速度将会急剧下降。其次,如果某一区域首先解链,而与其仅有一个碱基之差的另一条链就会有不同的解链温度,因此,不同碱基序列的 DNA 片段加入到含有梯度变性的凝胶中进行电泳,碱基序列不同的 DNA 片段就会在各自相应的变性剂浓度下变性,导致其电泳速度的急剧下降,从而使不同碱基序列的 DNA 片段滞留在凝胶的不同位置。

DGGE 作为一种新的核酸分离电泳技术,主要的优点有:

无需进行体外培养,直接利用微生物样品中的 DNA 或 RNA 对微生物群体加以区别,这样不但避免了传统上耗时的厌氧分离,更可鉴定出传统方式难以培养的微生物种类;检出率很高,即使微生物样品量极少,经过 PCR 扩增后,也可以检测分离得出;结果稳定,重复性好,因为电泳条件(如温度、时间等)由微处理器控制,可以保证电泳的重现性和结果的重复性;便于后续研究分析,根据微生物样品 DNA 或 RNA 的 PCR 扩增后产物在凝胶中的相对位置,经过切胶、测序、分析,就可以很准确地判断出它们之间的种属关系,甚至还可能发现尚未分离鉴定的微生物;操作简便,容易掌握,不需要繁杂的准备工作,耗时少,一般电泳 3~5 h 就可以达到很好的分离效果。其缺点主要是只能对不同微生物 DNA 序列进行分离,而不能确定各 DNA 序列中突变的位置及相关信息,最终还得依赖于 DNA 测序分析。

DGGE 技术以瘤胃微生物群体的基因组 DNA 为研究对象,通过比较不同瘤胃中各种微生物的 18S rRNA 的基因信息来了解微生物的多样性。Sylvester 等^[14]用它研究了纤毛

虫氮向小肠的流动,表明尽管相对于内毛目纤毛虫、等毛科纤毛虫的过瘤胃速度较慢,但大多数瘤胃纤毛虫的过瘤胃速度相差不大。Regensbogenova 等^[15]采用 DGGE 技术测定瘦管羊瘤胃中纤毛虫的多样性。实验中,同一羊舍饲喂相同日粮的 8 只瘦管羊,瘤胃各种纤毛虫的数量占总数量的比例有很大的差异,并且这一比例不随饲喂天数的增加而改变。另外还发现日粮中蛋白质含量的高低对瘤胃纤毛虫种群的多样性影响显著。

3 展望

目前分子生物学技术在瘤胃微生物分子生态学研究中的应用还处于起步阶段,但其迅猛的发展给反刍动物瘤胃纤毛虫研究带来了一次方法上的革命,它方法简易、重现性强、可靠性高、速度快,能够弥补传统分析方法的不足,必将成为评价复杂微生物种群结构及其动态学最有前景的技术之一。

参考文献

- [1] JEON KW. Molecular approaches to the study of protozoan cells[J]. *Int Rev Cytol*, 1986, 99: 1.
 - [2] 杨歧生. 分子生物学 M. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 6.
 - [3] MISUNORI T, IRIBIS C, KAZUNARI U, et al. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates[J]. *Gen Microbiol*, 1999, 39: 23.
 - [4] CHEN YO CHA, HSEU RUEY SHYANG, CHENG KOU JOAN. The genetic similarity of different generations of *Neocallimastix frontalis* SK[J]. *FRMS Micro Lett*, 2003, 221: 227.
 - [5] VOS P, HOGERS R, BLWIKER M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nuc Acid Res*, 1995, 23: 4407.
 - [6] 兰宏, 熊习昆, 林世英, 等. 云南黄牛和大额牛的 mtDNA 多态性研究[J]. *遗传学报*, 1993, 20(5): 419.
 - [7] BERGEN WG. Quantitative determination of rumen ciliate protozoal biomass with Real-Time PCR[J]. *J Nutr*, 2005, 134: 3223.
 - [8] 阳成波, 印遇龙, 龚建华, 等. 实时定量 PCR 研究进展及其应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(5): 395.
 - [9] 张蓓. 实时荧光定量 PCR 的研究进展及其应用[J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 2003, 27(1): 329.
 - [10] SYLVESTER JT, KARNATI SKR, YU ZHONGIANG, et al. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cow using Real-Time PCR[J]. *J Nutr*, 2005, 134: 3378.
 - [11] PEI A, LUCIAN A, DE SANIIS P, et al. Quantitation of the cytokines TNF- α , IL-8 and IL-10 in bovine milk using Real-Time TaqMan-PCR[J]. *Veterinary Res Communications*, 2004, 28: 359.
 - [12] SCHENA L, NIGRO F, IPPOLITO A, et al. Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2004, 110: 893.
 - [13] SYLVESTER JT, KARNATI SKR, YU ZHONGIANG, et al. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cow using Real-Time PCR[J]. *J Nutr*, 2005, 134: 3378.
 - [14] SYLVESTER JT, KARNATI SKR, YU Z. Determining if protozoal cell is dead from ruminal fluid represent those passing[J]. *Reprod Nutr Dev*, 2004, 44(1): 30.
 - [15] REGENSBGENOVA M, PRISIAS P, JAVORSKY P, et al. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39(2): 144-147.
- (上接第 880 页)
- [5] 史跃林, 罗庆熙, 刘佩英. Ca^{2+} 对盐胁迫下黄瓜幼苗中 CaM、MDA 含量和质膜透性的影响[J]. *植物生理学通讯*, 1995, 31(5): 347-349.
 - [6] VOGELIEN D L, HICKOK L G, WARNE T R. Differential effects of Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} and osmotic stress on the wild type and the *Na*-tolerant mutant *sl1* and *sl2* of *Ceratopteris richardii*[J]. *Plant Cell Environ*, 1996, 19: 17-23.
 - [7] 陈秀兰, 赵可夫. $NaCl$ 胁迫对玉米种子萌发的抑制及外源 Ca^{2+} 的缓解效应[J]. *华北农学报*, 1995, 31(5): 347-349.
 - [8] 王广印, 周秀梅, 张建伟, 等. Ca^{2+} 对 $NaCl$ 胁迫下黄瓜和南瓜种子发芽的影响[J]. *浙江农业科学*, 2004(6): 307-309.
 - [9] 朱晓军, 梁永超, 杨劲松, 等. 钙对盐胁迫下水稻幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. *土壤学报*, 2005, 42(3): 453-459.
 - [10] 毛桂莲, 郑国琦, 章英才, 等. 不同钙盐对 $NaCl$ 胁迫下枸杞愈伤组织耐盐性的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2007, 25(1): 131-134.
 - [11] 李银鹏, 林鹏. 盐度对木榄幼苗某些金属元素累积的影响及钙的效应[J]. *应用生态学报*, 2000, 11(2): 177-180.
 - [12] 赫再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验 M. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 106-108, 111-117.
 - [13] 杨素欣. 盐胁迫下小麦的愈伤组织生理生化特性的变化[J]. *西北农业大学学报*, 1999, 27(2): 49-52.
 - [14] GANNOPOLITIS C N, RIESS K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309-314.
 - [15] HANSON A D, NELSEN C E, EVERSON E H. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars[J]. *Genet Sci*, 1977, 17: 720.