

## 拮抗链霉菌 AFLP 分析技术体系的研究

金来武<sup>1,2</sup>, 刘伟成<sup>2</sup>, 潘争艳<sup>2,3</sup>, 袁季燕<sup>2</sup>, 刘学敏<sup>3</sup> (1. 辽宁省凌源市森林病虫害防治站, 辽宁凌源 122500; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 3. 东北农业大学植保系, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要** [目的] 探索基于 AFLP 的拮抗链霉菌 DNA 模板制备方法及其扩增体系, 为 AFLP 技术在链霉菌乃至放线菌资源分析中的应用提供依据。[方法] 以改进的 CTAB 法提取 DNA, 利用 *Pst* I/*Mse* I 型 AFLP 试剂盒及其反应体系进行扩增, 采用 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析扩增结果。[结果] 提取了 10 个拮抗链霉菌菌株的基因组 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测显示其主带清晰, 片段大小为 37.64~40.86 Kb, 无降解现象, 亦无 RNA 残留; 其  $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.625~1.833; *Pst* I/*Mse* I 双酶切产物琼脂糖电泳呈弥散荧光长带, 说明酶解充分; 筛选出的 3 对引物对 DNA 模板的扩增谱带清晰, 多态性丰富。[结论] 该研究建立的 DNA 模板制备方法及其扩增反应体系可用于链霉菌的 AFLP 分析。

**关键词** 拮抗链霉菌; DNA 提取; AFLP

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)18-08370-03

Studies on the Technological System for AFLP in Antagonistic Strains from *Streptomyces*

JIN Lai-wu et al (Lingyuan Forest Pest & Disease Control Station, Liaoning Province, Lingyuan, Liaoning 122500)

**Abstract** [Objective] This research was to study the preparation method of DNA template and amplification system for AFLP in antagonistic strains from *Streptomyces*, so as to provide the basic data for the application of AFLP in the resource analysis of *Streptomyces* and even actinomycete. [Method] The genomic DNAs were extracted by using the modified CTAB method. The amplifications were carried out with the reaction system of *Pst* I/*Mse* I AFLP kit purchased from Beijing Dingguo Biotechnology Co. Ltd. The amplified products were analyzed via 5% denatured polyacrylamide gel electrophoresis. [Result] The genomic DNA samples extracted from 10 strains presented the clear main bands composed of 37.64~40.86 Kb fragments by 0.8% agarose gel electrophoresis, which shows no degradation and no RNA residue, and could be completely digested by *Pst* I/*Mse* I. The  $OD_{260}/OD_{280}$  values of the DNA samples varied within the range of 1.625~1.833. The clear bands with high polymorphism were obtained by amplifying with 3 screened primer pairs. [Conclusion] The modified CTAB method for DNA extraction and the amplification system tested in the research are suitable for the AFLP analysis of *Streptomyces*.

**Key words** Antagonistic *Streptomyces*; Extraction of DNA; AFLP

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 是在 RFLP 和 RAPD 基础上发展起来的新一代 DNA 分子标记技术, 既具有 RFLP 的稳定可靠性, 又具有 RAPD 的简便快捷性, 其多态性丰富、灵敏度高、重复性好, 被认为是迄今为止最有效的分子标记方法, 近年在植物、动物和微生物的遗传多样性研究、基因定位、品系分析、种群鉴定、抗性育种等方面得到广泛的应用<sup>[1-4]</sup>。链霉菌 (*Streptomyces* spp.) 是一类最重要的天然活性产物产生菌, 其资源丰富、种类繁多, 在医药生产、食品卫生和农林作物病虫害防治等领域得到了广泛的应用。据估测, 链霉菌能产生的抗菌化合物总数量约 294 300 种, 而迄今已报道过的只有总数的 3% 左右<sup>[5]</sup>, 可见尚有大量的链霉菌资源有待开发。

AFLP 分子标记技术在链霉菌资源的挖掘和改造利用中具有广阔的应用前景。笔者所在的课题组近年分离筛选了一批拮抗链霉菌, 其中很多菌株对农林作物的病原菌具有很强的抑制作用<sup>[6-7]</sup>, 开发应用潜力较大。前人对拮抗链霉菌的 AFLP 研究报道较少, 而 AFLP 对模板 DNA 的质量要求较高, 样品必须达到一定纯度, 无酶切和扩增抑制物存在, 并要避免部分降解。因此, 该试验选取代表性链霉菌菌株, 重点研究其适于 AFLP 分析的高质量模板 DNA 的制备, 并对其技术体系进行探索, 以期拮抗链霉菌乃至放线菌资源为 AFLP 分析提供依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 供试菌株 供试拮抗链霉菌共 10 个菌株, 均由该课题

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (30671346); 北京市自然科学基金项目 (6072010); 北京市科技计划项目 (D0706005000091)

**作者简介** 金来武 (1959-), 男, 辽宁凌源人, 工程师, 从事森林病虫害防治及外来有害生物的研究。\*通讯作者。

**收稿日期** 2009-03-10

组分离自京郊菜田土壤和天然次生林土壤 (表 1)。

表 1 供试拮抗链霉菌株及其来源

Table 1 Tested antagonistic strains of *Streptomyces* and their sources

菌株 Strains	种名 Species	来源 Sources
A01	利迪链霉菌 <i>Streptomyces lydicus</i>	北京延庆菜田土壤 Vegetable soil in Yanqing County, Beijing
A02	利迪链霉菌 <i>S. lydicus</i>	北京延庆森林土壤 Forest soil in Yanqing County, Beijing
A152	吸水链霉菌 <i>S. hygroscopicus</i>	北京延庆森林土壤 Forest soil in Yanqing County, Beijing
A96	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京昌平菜田土壤 Vegetable soil in Changping District, Beijing
A98	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京昌平菜田土壤 Vegetable soil in Changping District, Beijing
A108	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京昌平菜田土壤 Vegetable soil in Changping District, Beijing
B145	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京昌平菜田土壤 Vegetable soil in Changping District, Beijing
M99	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京密云菜田土壤 Vegetable soil in Miyun County, Beijing
112	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京怀柔森林土壤 Forest soil in Huairou County, Beijing
120	链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.	北京怀柔森林土壤 Forest soil in Huairou County, Beijing

1.2 培养基和试剂 液体培养基按文献[6]发酵培养基的方法配制, 灭菌后加 0.5% 过滤灭菌的甘氨酸; TE25S 缓冲液和 CTAB/NaCl 溶液按文献[8]的方法配制, 后者加 1% PVP; 溶菌酶: 用 10mM Tris - Cl (pH8.0) 配成 100 mg/ml 的贮存液; RNase A: 溶于 TE (pH8.0), 配成 10 mg/ml, 80 °C 热灭活 10 min, -20 °C 保存; CTAB 沉淀液<sup>[9]</sup>; 高盐 TE 缓冲液<sup>[9]</sup>; 20

mg/ml 蛋白酶 K 水溶液;10% SDS 水溶液;5 M NaCl;3 M 醋酸钠(pH5.2);氯仿/异戊醇(24:1);TE 缓冲液(pH8.0);异丙醇;乙醇。

AFLP 试剂盒:*Pst* I/*Mse* I 型(北京鼎国生物技术有限责任公司),其中 *Pst* I 引物为 P-GAA、P-GAC、P-GAG、P-GAT、P-GTA、P-GTC、P-GTG、P-GTT;*Mse* I 引物为: M-CAA、M-CAC、M-CAG、M-CAT、M-CTA、M-CTC、M-CTG、M-CTT。

**1.3 菌体的培养与收集** 纯培养菌种接入液体培养基,27 °C 120 r/min 摇瓶培养 72 ~ 96 h, 4 000 r/min 离心 5 ~ 10 min;蒸馏水重悬沉淀,离心 5 min;TE 缓冲液再次重悬离心,收集菌体沉淀备用。

**1.4 DNA 提取** 参照 Kieser 等的 CTAB 法<sup>[8]</sup>,部分步骤略作改进,按以下程序操作:取湿干菌体约 0.5 g 置 7 ml 离心管中,加入 TE25S 缓冲液重悬至 2 ml,加 40 μl 溶菌酶,混匀,37 °C 水浴 30 ~ 60 min;加 20 μl 蛋白酶 K,混匀,再加 120 μl 预热的 10% SDS,轻缓颠倒混匀,55 °C 水浴 1 h;加 0.4 ml 预热的 5 M NaCl,混匀,再加 0.26 ml 预热的 CTAB/NaCl 溶液,混匀,55 °C 水浴 10 min;冷却至室温,加等体积氯仿/异戊醇,轻缓混合 30 min;15 000 r/min,18 °C 离心 15 min;取上清加 1/10 体积预热的 CTAB/NaCl,混匀,55 °C 水浴 10 min,冷却至室温,等体积氯仿/异戊醇再次抽提(离心可用 10 000 ~ 12 000 r/min);取上清加 1 ~ 1.5 体积的 CTAB 沉淀液,混匀,4 °C 静置 15 ~ 30 min,5 000 r/min 离心 3 ~ 5 min;沉淀溶于 0.5 ~ 1 ml 高盐 TE 缓冲液,加 1/10 体积 3 M 醋酸钠,混匀,加 0.6 体积异丙醇沉淀核酸;核酸沉淀,重溶于 0.5 ml TE 缓冲液,加入 5 ~ 10 μl RNase A,37 °C 水浴 30 ~ 60 min,加等体积氯仿/异戊醇抽提,12 000 r/min,4 °C 离心 15 min;取上清重复异丙醇沉淀步骤,DNA 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 ~ 3 次,适当风干,溶于适量(50 ~ 100 μl)TE,保存备用。

### 1.5 DNA 质量检测和产量估计

**1.5.1 琼脂糖凝胶电泳检测**<sup>[10]</sup>。采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,并根据 DNA 分子在凝胶基质中的迁移速率与其碱基对数的常用对数成反比的关系,利用 SPSS 统计分析软件对核酸分子量标准的电泳数据进行曲线回归,估算样品 DNA 分子量。

**1.5.2 紫外分光光度法检测**<sup>[11]</sup>。用 UV - 120 紫外分光光度计测定 DNA 样品的  $OD_{260}/OD_{280}$  值,同时按其 dsDNA 公式计算样品浓度。

**1.5.3 *Pst* I/*Mse* I 双酶切及连接检测。**采用 20 μl 反应体系,取 DNA 样品各 1 ~ 4 μl,按试剂盒说明书进行;0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

**1.6 AFLP 扩增试验** 按试剂盒操作说明书进行。

## 2 结果与分析

**2.1 模板 DNA 的制备** 应用上述改进的 CTAB 法提取了 10 个拮抗链霉菌菌株的基因组 DNA。每样品取 2 μl 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示其均为一高分子量的清晰条带,基本无降解现象,亦无 RNA 残留(图 1);对核酸分子量标准的回归分析所得方程为:  $Y = 5.802 - 0.563t + 0.043t^2 - 0.001t^3$  ( $R^2 = 0.997$ ),估算得样品 DNA 片段的大小为 37.64 ~ 40.86 Kb;样品稀释 200 倍紫外检测,其  $OD_{260}/OD_{280}$

为 1.625 ~ 1.833,DNA 含量为 100 ~ 290 μg/ml(表 2);对其中 6 个样品进行了 *Pst* I/*Mse* I 双酶切和连接试验,产物经 0.8% 琼脂糖电泳检测呈弥散荧光长带(图 2),说明酶解充分,可以做为 AFLP 扩增模板进行下一步试验。

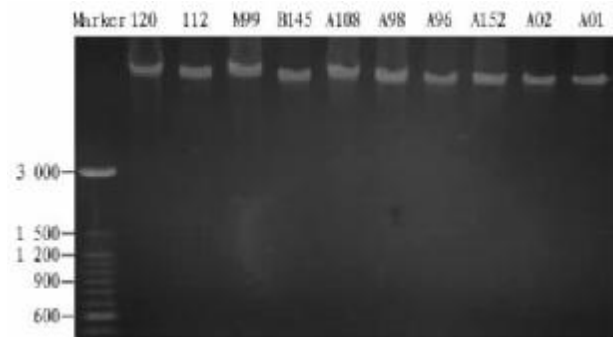


图 1 DNA 样品 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 The 0.8% agarose gel electrophoresis result of DNA samples

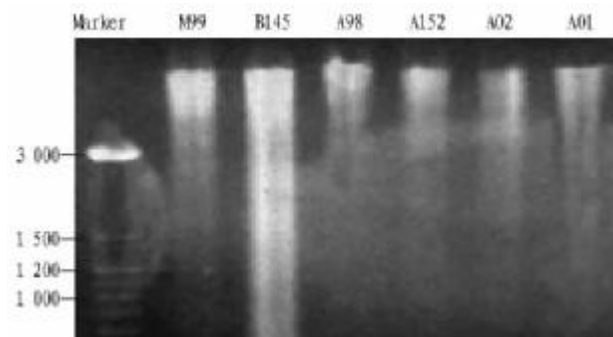


图 2 DNA 样品 *Pst* I/*Mse* I 双酶切产物电泳结果

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis result of DNA double digested by *Pst* I/*Mse* I

试验结果表明该方法提取的链霉菌基因组 DNA 质量较高,适合于 AFLP 分析。一般情况,每克湿干菌体可提取约 30 ~ 50 μg 纯度较高的 DNA。

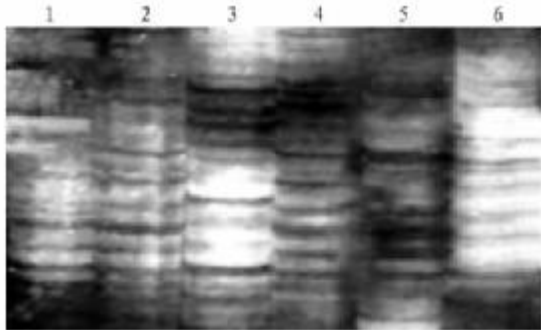
**2.2 AFLP 扩增** 以经过双酶切和连接的 6 个菌株的 DNA 混合样品为模板,对 *Pst* I 和 *Mse* I 各 8 个引物共 64 对组合进行了筛选,其中对混合样品模板选择性扩增效果较好的引对有 P-GAT/M-CTA、P-GTG/M-CAA、P-GTT/M-CAC、P-GTC/M-CTC、P-GAA/M-CAC 和 P-GTC/M-CAT,均可扩增出多态性丰富的条带;利用此 6 对引物组合分别对菌株 A02 的模板

表 2 DNA 样品紫外分光光度法检测结果

Table 2 The test result of DNA samples by UV spectrophotometry

样品 Samples	光密度值 Optical density values				浓度//μg/ml Concentration
	$OD_{260}$	$OD_{280}$	$OD_{310}$	$OD_{260}/OD_{280}$	
A01	0.016 8	0.010 0	0.000 9	1.680	159
A02	0.021 5	0.012 5	0.007 5	1.720	140
A152	0.011 0	0.006 0	0.001 0	1.833	100
A96	0.016 6	0.010 2	0.003 5	1.627	131
A98	0.029 0	0.016 5	0.004 0	1.758	250
A108	0.031 0	0.019 0	0.002 0	1.632	290
B145	0.025 3	0.014 4	0.000 0	1.757	253
M99	0.029 8	0.018 0	0.006 3	1.656	235
112	0.028 6	0.017 6	0.002 0	1.625	266
120	0.013 0	0.008 0	0.000 0	1.625	130

DNA 进行选择性的扩增,扩增产物的 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的部分谱带如图 3 所示, P-GTG/M-CAA、P-GTT/M-CAC 和 P-GTC/M-CTC 等 3 个引物组合扩增效果相对较好,条带清晰,可辨性高,具有较好的分子标记作用,可作为拮抗性链霉菌 AFLP 分析的引物。



注:1~6 泳道引物依次为 P-GAT/M-CTA、P-GTG/M-CAA、P-GTT/M-CAC、P-GTC/M-CTC、P-GAA/M-CAC 和 P-GTC/M-CAT。

Note:Primer pairs in 1-6 lanes are P-GAT/M-CTA, P-GTG/M-CAA, P-GTT/M-CAC, P-GTC/M-CTC, P-GAA/M-CAC and P-GTC/M-CAT, respectively.

图 3 6 个引物组合对菌株 A02 选择性扩增结果

Fig.3 The selective amplification result of strain A02 DNA with 6 primer pairs

综上,初步确定拮抗性链霉菌 AFLP 分析技术体系为:以改进的 CTAB 法提取基因组 DNA;取约 200 ng DNA 样品,按北京鼎国生物技术有限责任公司 *Pst* I/*Mse* I 型试剂盒的 20  $\mu$ l 反应体系及程序进行双酶切及连接;取连接后的模板 DNA 2  $\mu$ l,按试剂盒的 25  $\mu$ l 反应体系和以下参数进行预扩增:94  $^{\circ}$ C 30 S,56  $^{\circ}$ C 30 S,72  $^{\circ}$ C 80 S,循环 30 轮;预扩增产物 TE 缓冲液稀释 20 倍,取 2  $\mu$ l,选用 P-GTG/M-CAA、P-GTT/M-CAC 或 P-GTC/M-CTC 引物对,按试剂盒的 20  $\mu$ l 反应体系和以下参数进行选择性的扩增:首轮 94  $^{\circ}$ C 30 S,65  $^{\circ}$ C 30 S,72  $^{\circ}$ C 80 S,以后每轮循环退火温度递减 1  $^{\circ}$ C,扩增 10 轮,然后按 94  $^{\circ}$ C 30 S,55  $^{\circ}$ C 30 S,72  $^{\circ}$ C 80 S 扩增 23 轮;选择性的扩增产物按试剂盒推荐的方法进行 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染。

### 3 讨论

放线菌是介于真菌和细菌之间的一类原核生物,其细胞壁主要成分为肽聚糖,培养性状有自身特点,加之一些菌株在代谢过程中具有很强的产生色素的能力,因此在 DNA 提取时,要考虑选取细胞破壁、去除多糖和色素等化合物的适当方法,以保证 DNA 样品的质量。

DNA 提取的传统方法主要有 SDS 法、CTAB 法、碱法等,该研究通过试验比较,选用 Kieser 等的 CTAB 法,并在其基础上对某些步骤进行了以下调整,成功地提取了适于 AFLP 分析的 DNA 样品。

第 1 次氯仿/异戊醇抽提时,样品提取液中破碎的菌体细胞及变性蛋白等固形物经 10 000 r/min 离心 20 min 仍有大部分呈悬浮态,致使上清不能顺利移出,因而将离心转速

提高到 15 000 r/min,使这些固形物质沉淀呈一致密的中间层,另外高速离心也利于多糖类杂质的沉淀去除,可起到一箭双雕的作用;CTAB/NaCl 溶液中加入 1% PVP,以利于去除多酚类物质;第 2 次氯仿/异戊醇抽提后,增加了 1% CTAB 沉淀缓冲液沉淀 DNA 的步骤,可更有效地使多糖、色素、多酚类化合物与核酸分开而除去;核酸与 CTAB 复合沉淀物重溶于高盐 TE 缓冲液,再经异丙醇沉淀核酸而除去 CTAB,至此所得核酸溶液已相对较纯,此时用 RNase A 处理水解 RNA,有利于酶解作用的进行,既可减少 RNase A 用量,又能提高酶解效果,便于 RNA 的彻底去除。整个提取过程所用器具均经灭菌处理,吸头适当去尖,各步操作避免动作过于剧烈,混匀时采取轻缓颠倒的方式,防止 DNA 片段的降解;异丙醇沉淀核酸时,均采用轻轻抖动使核酸沉淀聚合成丝团状而移出或贴于管壁与液体分开的方式,从而既避免了采用离心方式而造成某些杂质共沉淀的现象,也使得随后的乙醇洗涤时丝状 DNA 处于松散状态,可以洗脱粘附其上的部分色素等杂质。改进后所获得的 DNA 均为白色或灰白色,尤其对产生色素能力较强的菌株也能达到较好的效果。

菌体培养也可采用固体平板的方法,在 PDA 或高氏一号培养基表面铺一张灭菌的玻璃纸,接种菌悬液后 28  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,刮取菌体直接悬于提取液中,用无菌玻棒捣成均匀的悬液后再进行溶菌操作。

通过多次扩增实验,从北京鼎国生物技术有限责任公司 *Pst* I/*Mse* I 型 AFLP 试剂盒推荐的引物中筛选出了适宜的引物组合,并利用试剂盒的反应体系和方法扩增出多态性丰富的条带,初步建立了拮抗性链霉菌 AFLP 分析的技术体系,为利用 AFLP 分子标记技术进行生防放线菌资源的遗传多样性分析、菌株 DNA 指纹鉴定、分子标记辅助育种、菌种遗传稳定性鉴定及专有菌株知识产权的保护等研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 王斌,翁曼丽. AFLP 的原理及其应用[J]. 杂交水稻,1996(5):27-30.
- [2] 陶文静,刘大钧. AFLP 技术及其在植物基因组研究中的应用[J]. 世界农业,1998(12):16-19.
- [3] 朱伟铨,王义全. AFLP 分子标记技术及其在动物学研究中的应用[J]. 动物学杂志,2003,38(2):101-107.
- [4] 胡娜,许杨. AFLP 技术在真菌研究中的应用[J]. 生物技术,2003,13(4):43-44.
- [5] 曾文兵,王锦,段学辉. 从链霉菌中发现新抗生素的趋势分析[J]. 江西科学,2004,22(4):293-296,300.
- [6] 潘争艳,刘伟成,裘季燕,等. 放线菌 III-61 和 A-21 对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用[J]. 华北农学报,2005,20(4):92-97.
- [7] 杨秀芳,刘伟成,卢彩鸽,等. 拮抗放线菌 A03 的生防作用及其分类鉴定[J]. 植物保护学报,2007,34(1):73-77.
- [8] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000:170-171.
- [9] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯屯 R E,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1998:705-705.
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版,黄培堂,等译. 北京:科学出版社,2002:387-400.
- [11] 李永明,赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京:科学出版社,1998:21-22.