

乌头叶面细菌、真菌 DGGE 分析条件的建立与优化

李娜, 胡亮, 王婷, 欧洪, 王光志*
(成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 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, 成都 611137)

[摘要] 目的:筛选并优化适用于分析乌头叶面细菌、真菌多样性的变性梯度凝胶电泳(DGGE)实验条件。方法:采用 Touch Down-PCR 技术扩增乌头叶面细菌 16 S rDNA V3 区域和真菌 18 S rDNA ~ 5.8 S rDNA 序列,利用该扩增产物对乌头叶面细菌、真菌 DGGE 电泳条件进行优化。采用 DGGE 垂直电泳法筛选凝胶变性梯度,时间间隔法优化电泳时间。结果:乌头叶面细菌 DGGE 最佳分析条件为变性剂梯度 30% ~ 65% (Gel 10%),电泳温度 60 ℃,电压 120 V,电泳时间 7 h。乌头叶面真菌 DGGE 最佳分析条件为变性剂梯度 25% ~ 45% (Gel 8%),电泳温度 60 ℃,电压 120 V,电泳时间 10 h。结论:利用以上优化条件能有效分离乌头叶面细菌 16 S rDNA V3 区及真菌 18 S rDNA ~ 5.8 S rDNA 序列,为乌头叶面细菌,真菌的群落结构 PCR-DGGE 分析提供可靠的技术支撑。

[关键词] 乌头; 叶面; 细菌; 真菌; 变性梯度凝胶电泳
[中图分类号] R282 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0058-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040058
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1100.020.html>
[网络出版时间] 2016-11-29 11:00

Establishment and Optimization of DGGE Analysis Methods for Phylloplane Bacteria and Fungi of *Aconitum carmichaeli*

LI Na, HU Liang, WANG Ting, OU Hong, WANG Guang-zhi*
(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, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) experimental methods applicable to analyze the community composition of phylloplane bacteria and fungi sampled from *Aconitum carmichaeli*. **Method:** Touch Down-PCR experiment was conducted to amplified *A. carmichaeli* phylloplane bacteria 16 S rDNA V3 area and fungi 18 S rDNA ~ 5.8 S rDNA sequences, in order to optimize DGGE electrophoresis conditions. DGGE vertical electrophoresis was used to ameliorate degeneration gradient of gels, and time interval method was used to figure out electrophoresis time. **Result:** For the phylloplane bacteria, the optimum analytical conditions were denaturant gradient ranging from 30% to 65% (Gel 10%), electrophoresis temperature at 60 ℃, voltage of 120 V and electrophoresis time of 7 h. For phylloplane fungi, the optimum analytical conditions were denaturant gradient range ranging from 25% to 45% (Gel 8%), electrophoresis temperature at 60 ℃, voltage of 120 V and electrophoresis time of 10 h. **Conclusion:** The above DGGE analysis conditions can be used to effectively distinguish *A. carmichaeli* phylloplane bacteria 16 S rDNA V3 area and fungi 18 S rDNA ~ 5.8 S

[收稿日期] 20160714(012)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901962);四川省教育厅重点项目(15ZA0098)
[第一作者] 李娜,在读硕士,从事中药资源研究,Tel:18384265090,E-mail:18384265090@163.com
[通讯作者] *王光志,硕士生导师,教授,从事中药资源研究与开发,Tel:13348885717,E-mail:kzwon@163.com

rDNA sequences, so as to provide reliable support for PCR-DGGE analysis of community structure of *A. carmichaeli* phylloplane bacteria and fungi.

[Key words] *Aconitum carmichaeli*; phylloplane; bacteria; fungi; denaturing gradient gel electrophoresis

毛茛科植物乌头为常见药用植物,其母根川乌、子根附子为知名川产道地药材,在四川江油地区已有千年的栽培历史^[1]。相关调查研究表明,乌头的病害种类较多,其中,霜霉病是乌头植株较为普遍的叶类病害,其流行范围广,危害面积大等特点已严重影响药材附子、川乌的品质及产量^[2-3]。然而目前对乌头霜霉病的研究少,主要集中在病原菌的鉴定、病害的发生规律、栽培技术等研究^[4-5]。前期工作已从形态学和分子生物学两方面对乌头霜霉菌进行了准确鉴定,明确了乌头霜霉病病原菌的分类学地位。但目前还缺乏乌头霜霉病致病机制、传播机制等研究,乌头霜霉病的防治问题依然严重。

植物叶面 (phylloplane) 微环境中栖息着各种微生物如细菌、真菌、病毒、放线菌等,其中,细菌,真菌通常是最主要的微生物类群^[6-7]。叶面微生物与植物病害存在定性和定量的关系,病害的发生与叶面微生物群体水平有关^[8-9]。通过改善和调节植物体表面有益附生微生物的种群和数量,有利于发挥微生物对病害的自然控制作用,减少农药的使用,促进绿色种植业的发展。目前叶面微生物多样性与叶部病害的发生与防治的相关性研究多集中于经济作物,如烟草、茶叶等,而在药用植物方面,鲜见报道。

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术因其简便快速、分离效果好,已经被广泛用于研究各种环境样品中的微生物。与传统培养法相比,DGGE 技术在揭示环境中无法通过培养的微生物信息方面具有显著的优势^[10]。本研究以乌头叶面微生物为研究对象,旨在通过 DGGE 技术揭示乌头叶面微生物种类差异与乌头霜霉病的相关性,以期实现乌头霜霉病的微生态调控,文中针对乌头叶面细菌 16 S rDNA V3 区以及真菌 18 S ~ 5.8 S rDNA 间隔区序列进行 DGGE 电泳条件的筛选优化,为后期研究乌头叶面细菌,真菌的的群落结构及其与乌头霜霉病的相关性奠定基础。

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 (美国 Bio-Rad 公司);Soil DNA Kit (Omega 公司);Golden View TM 核酸染料以及 2 × Taq PCR MasterMix (天根生化科技有限公司)。40% 丙烯

酰胺 (solarbio),去离子甲酰胺 (biosharp) 均为分析纯。乌头新鲜叶片采自四川省江油市附子生产基地,经成都中医药大学中药资源教研室王光志教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* 的新鲜叶。

2 方法与结果

2.1 叶面微生物总 DNA 的提取 取 10.0 g 已剪成 1 cm 左右大小的乌头叶片,加入磷酸盐缓冲液 (PBS)150 mL,室温下震荡 30 min,超声 (40 kHz) 3 min,4 ℃ 下 10 000 × g 离心 20 min^[11-13],所收集到的菌体沉淀用 Soil DNA Kit 试剂盒提取微生物总 DNA,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果见图 1。所得 DNA 片段大于 15 000 bp,DNA 条带清晰,浓度适中,可用于后续分析。

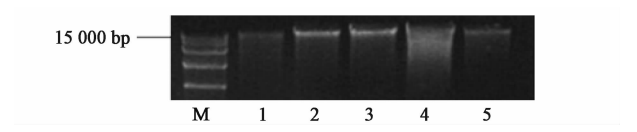


图 1 乌头叶面微生物总 DNA
Fig.1 Genomic DNA of phylloplane microbes of *Aconitum carmichaeli*

2.2 Touch Down-PCR 扩增 将乌头叶面微生物总 DNA 作为扩增模板,进行降落 PCR 扩增。针对细菌 16S rDNA V3 区选用通用引物对 338f-GC 和 518r 进行特异性扩增^[14],针对真菌 18 S ~ 5.8 S rDNA 选用通用引物对 Fungi-GC 和 NS1 进行特异性扩增^[15],引物信息见表 1。

细菌 16 S rDNA V3 区降落 PCR 扩增,50 μL 的 PCR 反应体系组成如下:模板 DNA 2 μL,2 × Taq PCR MasterMix 25 μL,双蒸水 19 μL,2 种引物各 2 μL.PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min,先 20 个循环 (94 ℃ 变性 50 s,退火温度从 63 ℃ 到 58 ℃,每个循环降低 0.5 ℃,退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min),再于恒定退火温度 58 ℃ 下进行 10 个循环 (94 ℃ 变性 50 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min),最后 72 ℃ 延伸 8 min。

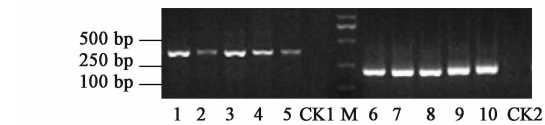
真菌 18 S ~ 5.8 S rDNA 间隔区降落 PCR 扩增,反应体系同细菌 V3 区的 PCR 扩增。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min,先 10 个循环 (94 ℃ 变性 50 s,退火温度 53 ℃ 到 48 ℃,每个循环降低 0.5 ℃,退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min),再于恒定退火温度 48 ℃ 下进行 20 个循环 (94 ℃ 变性 50 s,48 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min),最后 72 ℃ 延伸 8 min。

表 1 乌头叶面细菌,真菌 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences for phylloplane microbial of *Aconitum carmichaeli*

引物	序列	长度/bp
338f-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGACG GGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3'	57
518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	17
Fungi-GC	5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGTTACCCGTTG-3'	59
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3'	19

细菌,真菌 PCR 扩增产物均由 1.5% 琼脂糖电泳检测,并用凝胶成像系统采集图像。结果如图 2 所示,乌头叶面细菌 DNA 的 Touch Down-PCR 扩增得到约 230 bp 目标条带,真菌得到约 400 bp 的目标条带。细菌,真菌各样品扩增的条带清晰明亮,且特异性高,表明各样品细菌 16S rDNA V3 区以及真菌 18S~5.8S rDNA 间隔区序列的扩增效果良好,适用于 DGGE 电泳分析。



M. DL 2000 Marker;1 ~ 5. 真菌 18S rDNA 序列 PCR 扩增条带;6 ~ 10. 细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增条带;CK1,CK2 为空白

图 2 乌头叶面微生物 Touch Down-PCR 扩增

Fig. 2 Touch Down-PCR amplification results of phylloplane microbes of *Aconitum carmichaeli*

2.3 DGGE 条件的优化

2.3.1 DGGE 变性梯度的优化

2.3.1.1 DGGE 垂直电泳筛选变性梯度 采用垂直电泳法确定 DGGE 变性梯度范围。细菌、真菌分别配制 10.0% 和 8.0% 丙烯酰胺凝胶,用自动混胶仪制备变性梯度 0% ~ 80% 的聚丙烯酰胺凝胶,上样共计混合 PCR 产物 150 μ L。电泳温度 60 $^{\circ}$ C,电压 120 V,细菌电泳时间为 3.5 h,真菌为 4.5 h。电泳结束后用银染法进行染色。垂直 DGGE 对变性梯度的优化结果见图 3。通过测量变性曲线,计算待测样品 DGGE 电泳的适宜变性梯度,初步确定细菌适宜变性梯度为 40% ~ 60% (Gel 10%)。同样实验方法用于初步确定真菌 18 S rDNA 区序列的适宜变性梯度 20% ~ 40% (Gel 8%)。

2.3.1.2 最佳变性梯度的确定 配制 2.3.1.1 项中初步确定的两种凝胶变性梯度,采用 DGGE 水平电泳验证最佳变性梯度。电泳条件:电压 120 V,电泳温度 60 ℃,细菌样品电泳 7 h,真菌 10 h。

细菌 DGGE 图谱中各条带主要集中分布在上部,且条带分离不理想,见图 4(A),推测 40% ~ 60% 的变性梯度范围过窄,故调整为 30% ~ 65% 变性梯度,见图 4(B)。所得条带分离效果较好,条带

清晰可辨,主要集中于图谱中部,与预期目标相符,确定细菌 16 S rDNA V3 区序列最佳变性梯度为 30% ~ 65% (Gel 10%)。真菌 DGGE 图谱中各条带集中于上部和下部,分离效果不佳,见图 4(C) 同样通过调整变性梯度,确定真菌 18 S rDNA 序列最佳变性梯度为 25% ~ 45% (Gel 8%)。

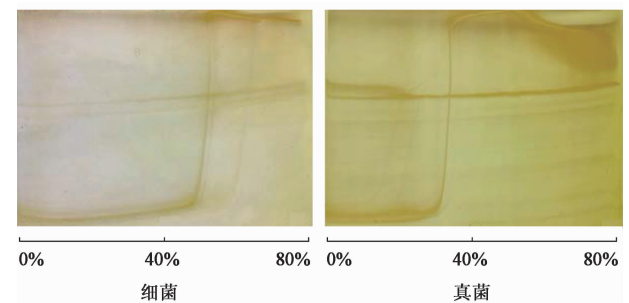
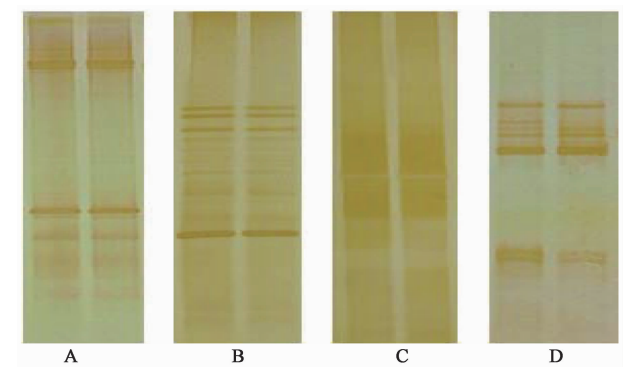


图3 乌头叶面细菌、真菌 DGGE 变性梯度优化

Fig.3 Optimization of DGGE degeneration gradient of phylloplane bacteria and fungi of *Aconitum carmichaeli*



A. 细菌:变性梯度 40% ~ 60%; B. 细菌:变性梯度 30% ~ 65%; C. 真菌:变性梯度 20% ~ 40%; D. 真菌:变性梯度 25% ~ 45%;

图4 乌头叶面细菌、真菌不同变性梯度 DGGE

Fig. 4 DGGE profiles on different denaturing gradient of phylloplane bacteria and fungi of *Aconitum carmichaeli*

2.3.2 最佳电泳时间的确定 采用时间间隔法优化电泳时间。将同 1 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 10 μL ,在电压 120 V 下进行 DGGE 水平电泳。细菌共电泳 8 h,真菌 10 h。结果见图 5,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,有些目标条带数甚至减

少,故初步确定当电压为 120 V 时,最佳电泳时间 7 h。同理,初步确定真菌最佳电泳时间为 10 h。

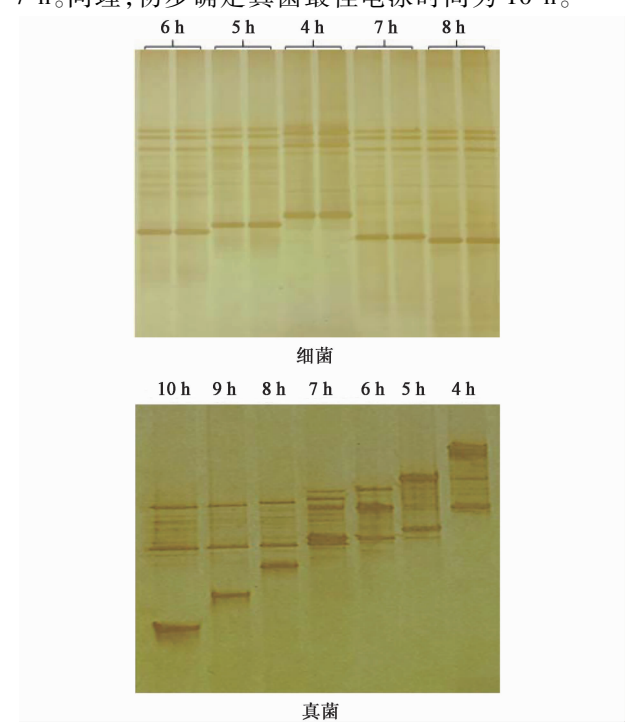


图 5 乌头叶面细菌、真菌 DGGE 电泳时间优化
Fig.5 Optimization of DGGE electrophoresis time for phylloplane bacteria and fungi of *Aconitum carmichaeli*

3 讨论

研究表明,样品的预处理过程以及电泳条件是影响 DGGE 技术发挥效能的重要因素。本实验所选取的扩增细菌的通用引物对 338f-GC/518r 主要针对 16 S rDNA V3 区,扩增产物约 230 bp,此长度的 DNA 片段在变性梯度凝胶电泳试验中的分离效果更具有优势。真菌 18 S rDNA 序列通用引物 Fungi-GC/NS1 所扩增区域为 18 S ~ 5.8 S rDNA,包含保守序列 ITS 1 区序列,而 ITS 区序列高度差异,具有较高水平的辨识^[16]。两对引物都采用 Touch Down-PCR 进行 DNA 的扩增,所得扩增产物均 <500 bp,且特异性较高,结合 DGGE 图谱分析表明所选引物及扩增方法能取得较好的效果,适用于 DGGE 分析。

植物叶面微生态失衡是植物发生病害的直接诱因之一,叶面微生物多样性及其变化特征在一定程度上能够反应植物病害发生发展规律。因此,深入了解乌头叶面微生态环境中微生物的组成及变化特征有助于揭示乌头霜霉病致病机制,为乌头霜霉病的微生态防治提供科学依据,为促进乌头及其他药用植物栽培业的健康发展提供理论基础。文中优化了乌头叶面细菌、真菌 PCR-DGGE 的电泳条件,建

立了适用于乌头叶面细菌、真菌多样性分析的 PCR-DGGE 技术,为后续乌头叶面微生物群落结构的分析提供可靠的技术基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:39.

[2] 余永年. 霜霉一新种 [J]. 植物病理学报,1979,9 (2) : 127-130.

[3] 唐莉,梁丽娟,叶华智,等. 附子常见病害的调查研究 [J]. 现代中药研究与实践,2004,6 (18) : 29-32.

[4] 欧洪,李娜,等. 乌头霜霉病病原菌形态学研究 [J]. 甘肃中医药大学学报,2016,33 (2) : 59-63.

[5] 欧洪,李娜,徐小山,等. 乌头霜霉病病原菌 DNA 提取方法初步研究 [J]. 中药与临床,2016,7 (2) : 8-10.

[6] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (4) : 1875-1883.

[7] Hirano S S, Upper C D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on pseudomonas syringae-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000,64 (3) : 624-653.

[8] 许秀兰,白燕,刘韩,等. 四川省 6 种竹叶部微生物的组成与结构分析 [J]. 华中农业大学学报,2014,33 (4) : 53-59.

[9] 张丽娜. 山茶叶部微生物区系与灰斑病发生关系的研究 [D]. 雅安:四川农业大学,2009.

[10] 王小芬,王伟东,高丽娟,等. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解 [J]. 中国农业大学学报,2006,11 (5) : 1-7.

[11] 赵辉. 转 Bt 基因玉米叶面微生物多样性变化 [D]. 济南:山东师范大学,2012.

[12] 周育,乔雄梧,王静,等. 植物叶际微生物提取方法研究 [J]. 植物研究,2006,26 (2) : 2233-2237.

[13] 张洪勋,张保国,杜方舟,等. 植物叶际微生物基因组 DNA 提取方法:中国, CN 200710120511. 7 [P]. 2009-02-25.

[14] 杨明月,接伟光,蔡柏岩. PCR-DGGE 技术在活性污泥细菌多样性中的条件研究 [J]. 黑龙江大学自然科学学报,2014,31 (3) : 386-391.

[15] Yuko T H, Kawai S M. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Soil Sci Plant Nutr, 2008, 54 (5) : 701-710.

[16] 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,2013,28 (4) : 335-337.

[责任编辑 邹晓翠]