

IKPF 菌株 Fhhh 及其三亲基因组 RAPD 分析研究

赵大勇, 贾海鹰, 吴兵, 孙石磊, 潘文扬, 张徐祥, 程树培

污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院,

水处理与水环境修复教育部工程研究中心 (210093)

Email (chengsp@nju.edu.cn)

摘要: 应用随机扩增多态性DNA技术(RAPD),以跨界原生质体融合(IKPF)菌株Fhhh及其三亲株(PC、SC、YZ1)总DNA为扩增模板,采用20条随机引物,进行PCR扩增反应。所用的20条随机引物中,有16条引物与供试菌株的DNA模板具有较好的结合能力。Fhhh与其三亲菌株的PCR电泳条带的相似系数分别为: $S_{FP}=25.5\%$ $S_{FS}=36.7\%$ $S_{FY}=24.4\%$ 。Fhhh的基因组不同于三亲菌株,与三亲菌株之间存在亲缘关系。结果表明,RAPD技术可以快速、简便、准确的用于原生质体融合菌株的分子遗传特征鉴定,促进IKPF技术构建新菌种应用于废水处理。

关键词: IKPF 菌株, 基因组, RAPD, 废水处理

中图分类号: Q89

1. 引言

为了高效处理精对苯二甲酸(purified terephthalic acid, PTA)生产废水,应用跨界原生质体融合(inter-kingdom protoplast fusion, IKPF)技术,构建出处理PTA废水的工程菌株Fhhh。Fhhh是由真核原核两界细胞的3个亲株的原生质体,跨界融合而成的基因工程菌^[1]。3个亲株是:亲株1真核细胞,黄孢原毛平革菌PC(*Phanerochaete chrysosporium*),含有锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)等降解性酶的功能基因,具有高效降解有机污染物的优势性能^[2,3];亲株2真核细胞,酿酒酵母菌SC(*Saccharomyces cerevisiae*)含有FLO1等14个以上的絮凝性基因,具有高絮凝性;亲株3原核细胞,土著细菌YZ1(*Bacillus*)筛选自扬子石化PTA废水处理系统,对该废水具有高适应性。

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)技术,于1990年由美国杜邦公司J.G.K.William与加利福尼亚生物研究所J. Welsh的两个小组几乎同时建立^[4,5]。RAPD以PCR(Polymerase Chain Reaction)为基础,采用的引物为随机的10碱基引物,反应条件类似于常规PCR,目标是检查PCR反应扩增的DNA片段的多态性^[6]。

本研究旨在通过RAPD分析,研究跨界融合子Fhhh基因组与其三亲菌株之间的相似性,以发现Fhhh与其三亲株之间亲缘关系的分子遗传学证据。

2. 材料与方法

2.1 菌株

跨界融合菌株Fhhh,由本课题组原创构建。

Fhhh的亲株1:黄孢原毛平革真菌PC(*Phanerochaete chrysosporium*);

Fhhh的亲株2:酿酒酵母真菌SC(*Saccharomyces cerevisiae*);

Fhhh的亲株3:土著细菌YZ1(*Bacillus*)。

2.2 试剂

(1)20条随机引物,由invitrogen生物技术有限公司合成,核酸序列见表1。

第一作者,赵大勇,南京大学环境学院在读博士生,环境生物技术及信息学方向。

通讯联系人,程树培,教授博导,环境生物技术及信息学方向,Email:chengsp@nju.edu.cn

基金项目:教育部博士点基金项目(20030284038),水处理与水环境修复教育部工程研究中心项目

表 1 随机引物核酸序列及实验编号

Table 1 The experiment serial number and the nucleotide sequence of 20 primers

引物编号	核苷酸序列 (5→3)	引物编号	核苷酸序列 (5→3)
01	AGTCAGCCAC	11	TGGACCGGTG
02	CAATCGCCGT	12	GAGAGCCAAC
03	AGGTGACCGT	13	CAGCACCCAC
04	GAATGCGACC	14	GTGTGCCCCA
05	GTGAAGGAGG	15	AGGGAACGAG
06	AGCACTGGGG	16	GTCGCCGTCA
07	TCCCAGCAGA	17	TGTCTGGGTG
08	CACTGGCCCA	18	GGTGACGCAG
09	CACGCCCTTC	19	GAAACGGGTG
10	ATGCAGCCAC	20	CGAGTACTGG

(2) 抽提缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl pH7.2, 50mmol/L EDTA pH8.0, 2.8 %SDS。

(3) TE 缓冲液: 10mmol/L Tris - HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0。

(4) 凝胶加样缓冲液: 10×loading buffer(购自 Takara 公司)

(5) 溴化乙锭液: 100mg 溴化乙锭充分溶解在 10mL 水中, 4℃下避光保存。

(6) 5×Tris-硼酸电泳缓冲液 (pH 8.0): 54g Tris, 27.5g 硼酸, 20mL 0.5mol/L EDTA。

2.3 提取细胞总DNA^[7]

菌株接种于液体培养基中 (PC、SC及Fhhh采用PDA培养基, YZ1 采用牛肉膏蛋白胨培养基^[8]), 于 30℃培养 3d。

对于 PC、SC 及 Fhhh, 离心或过滤收集菌体。称取 0.2~0.3g 菌体, 置于预冷的研钵中, 加入液氮研磨成细粉状, 迅速分装于 1.5mL 离心管中。

对于亲株细菌 YZ1, 直接吸取 1.5mL 菌液于离心管中, 离心去上清收集菌体。

在离心管中, 分别加入 450μL 预热到 65℃的抽提缓冲液及 5μL 蛋白酶 K 贮液 (20 mg/mL), 用无菌牙签充分搅拌混匀, 65℃水浴 20~30min。加入 135μL 5mol/L NaCl 和 65μL 10 % (W/V) 的 CTAB, 反转混均后, 65℃水浴至 1h。加入等体积的苯酚、氯仿、异戊醇混合液 (25: 24: 1), 短暂振荡混匀, 12000r/min 离心 10~15min。移取上清至一新离心管中, 加入 0.54 体积的异丙醇, 轻轻反转混匀, 4℃短暂放置。12000r/min 离心 10min, 小心倒掉上清。用 0.5mL 70%的乙醇洗沉淀 2 次, 每次处理 3~5min, 10000r/min 离心 5min 后, 倒掉乙醇。将装有 DNA 沉淀的离心管于室温自然风干。加入 600μL TE 溶解 DNA, 再加入 2~3μL Rnase (20mg/mL), 37℃水浴保温 1~2h。加入等体积的苯酚、氯仿、异戊醇混合液 (25: 24: 1) 再抽提一次, 12000r/min 离心 10min, 将上清液转至一新离心管中。加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc(pH8.0)和 2 倍体积的无水乙醇, 短暂放置, 12000r/min 离心 10min, 倒掉上清, 70%乙醇洗沉淀 2 次, 自然风干。用 100μL TE 溶解 DNA, 4℃冰箱保存备用。

2.4 RAPD 反应

模板 DNA 定量分析: 用紫外分光光度计测定提取的不同菌株的 DNA 浓度, 稀释, 使其终浓度为 100ng/μL。

RAPD反应体系: 反应体系的总体积为 25μL, 其组分为 2.5μL 10×PCR Buffer, 2μL 25mM MgCl₂, 2μL dNTPs (各 2.5mM), 0.2μL Taq酶 (5U/μL), 1.5μL随机引物 (10μM), 1μL DNA 模板, 15.8μL MilliQ 二级水。

PCR 反应条件: 反应在 Eppendorf Autorisierter Thermocycler PCR 仪上进行。扩增反应程序为: 94℃变性 5min, 94℃变性 1min, 36℃退火 1min, 72℃延伸 2min, 共进行 40 个循

环，最后 72℃ 延伸 10min，终止温度为 4℃。

产物检测：取 10μL 反应液，加 2μL 10×loading buffer，在 0.5×TBE 电泳缓冲体系中，用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 扩增片段，EB 染色，于凝胶分析仪下观察结果并拍照。

2.6 相似系数的统计

对扩增DNA片段按相似率 $S_{xy}=2 \cdot N_{xy}/(N_x+N_y) \times 100\%$ 进行相似指数 (Similarity index) 分析，其中 N_{xy} 是比较两种菌株x和y共有的DNA片段数目， N_x 和 N_y 分别为菌株x和y各自的DNA扩增片段数目。

3. 结果

3.1 总 DNA 的提取

应用本方法提取了三亲株PC、SC、YZ1 及融合子Fhhh的总DNA，经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所有提取的DNA样品大小都在 23Kb 以上，呈带状，所得DNA质量较高，电泳照片见图 1。1~4 号泳道分别为YZ1、SC、PC和Fhhh的总DNA。M为分子量标记，最上面一条为 23130bp。N为ddH₂O空白对照。

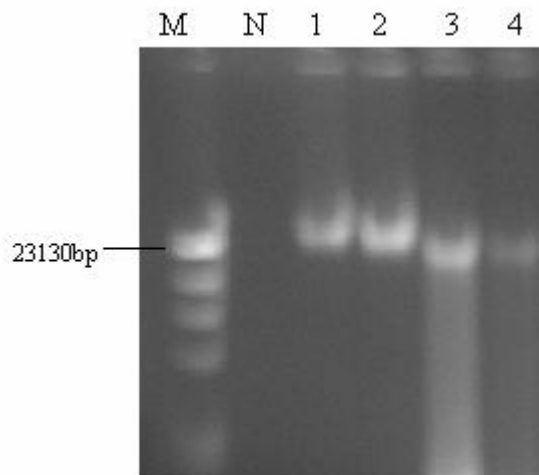


图 1 三亲株及融合子基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of three parental strains and Fhhh

3.2 引物的筛选

实验所采用的 20 条随机引物中，除 4, 5, 7, 20 号引物外，都能有效地同时对 PC、SC、YZ1 及融合子 Fhhh 的 DNA 进行扩增，扩增产物的片段大都在 0.25Kb~2Kb 之间 (图 2)。图中 1, 2, 3, 4 号泳道分别为 SC、PC、YZ1 和 Fhhh 的扩增谱带。

表 2 16 种随机引物的扩增谱带

Table 2 The amplification bands with 16 random primers

菌株	谱带总数	PF 共同谱带	SF 共同谱带	YF 共同谱带
黄孢原毛平革菌 (<i>P. chrysosporium</i>)	68	18	—	—
酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i>)	85	—	29	—
土著细菌 YZ1 (<i>Bacillus</i>)	58	—	—	16
融合子 Fhhh	73	18	29	16

3.3 亲株与融合子间扩增谱带相似率

根据表 2 的数据计算亲株PC、SC、YZ1 与融合子Fhhh之间的相似系数分别为： $S_{PF}=25.5\%$

$S_{SF}=36.7\%$ $S_{YF}=24.4\%$ 。

3.4 融合子和亲株扩增的谱带类型

从图 2 扩增结果可见,三亲株间相同的谱带较少。酿酒酵母 SC 与融合子 Fhhh 的相似率最高($S_{SF}=36.7\%$),可见,融合子的生物学特性与酿酒酵母更接近。

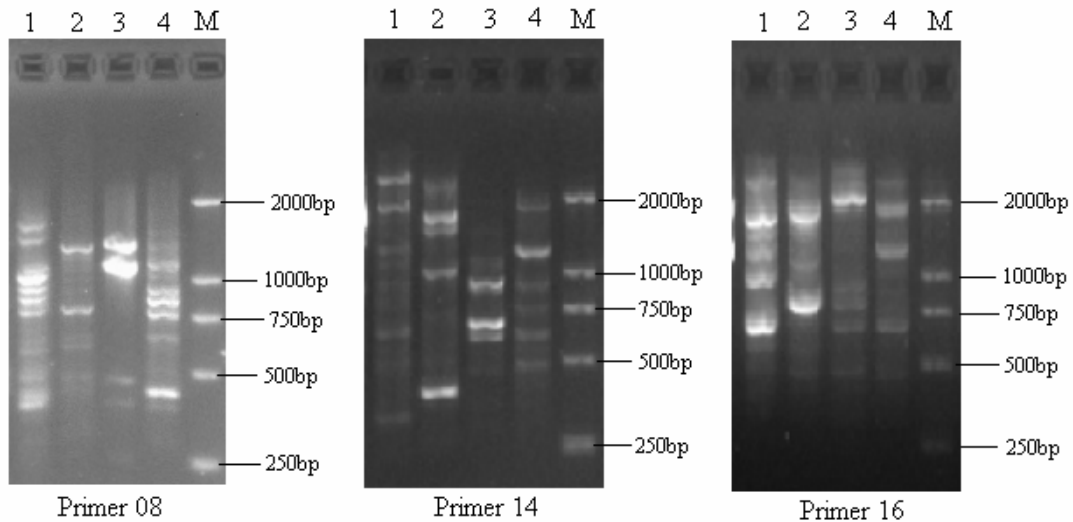


图 2 三亲株及融合子的 RAPD 分析

Fig.2 RAPD analysis of three parental strains and Fhhh

4. 讨论

根据 RAPD 原理,每种随机引物扩增的 1 条 DNA 谱带代表了被扩增的基因组中的一个遗传位点。因此,本研究中 16 条随机引物总共检查了黄孢原毛平革菌 (*P. chrysosporium*) 的 68 个位点,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的 85 个位点,土著细菌 YZ1 的 58 个位点,融合子 Fhhh 的 73 个位点,表明融合子与两亲本基因组中的遗传位点总数有差别。

融合子的谱带有的与亲株 PC 相同,有的与 SC、YZ1 相同,其基因组 DNA 既有与 PC 同源的序列,又有与 SC、YZ1 同源的序列。本文对黄孢原毛平革菌 (*P. chrysosporium*)、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和土著细菌 YZ1 的原生质体融合子基因组进行了 RAPD 分析。初步证实,该融合子确为三亲株原生质体融合后的融合子,将在此基础上进一步做分子杂交实验。

根据 Williams 等^[4]的实验,RAPD 符合孟德尔遗传规律,但融合子的谱带不是三亲株谱带的简单叠加,融合子中还出现了新的谱带(图 2),这可能是融合后基因重组引起引物结合位点改变的结果。

参考文献

- [1] 程树培,张徐祥,石磊等. Fhhh 工程菌株降解 PTA 废水动力学研究 [J]. 环境科学, 2003, 24 (6): 116-120.
- [2] A.T. Martinez. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(4): 425-444.
- [3] F.J. Xu, H.Z. Chen, Z.H. Li. Solid-state production of lignin peroxidase(LiP) and manganese peroxidase(MnP) by Phanerochaete chrysosporium using steam-exploded straw as substrate[J]. Bioresource Technology, 2001, 80: 149-151.
- [4] J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):6531-6535.
- [5] J. Welsh, M. McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research,

1990, 18(24):7213-7218.

- [6] 施庆利, 罗信昌. RAPD 技术在木耳属杂交种及原生质体融合子鉴定分析中的应用 [J]. 食用菌学报, 1993, 12 (6): 3-5.
- [7] 曾大兴. 适于 RAPD 分析的真菌 DNA 提取方法 [J]. 生物技术, 2003, 13 (2): 20-21.
- [8] 沈萍, 范秀容, 李广武等. 微生物学实验 (第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.

RAPD Analysis of IKPF Strain Fhhh and Its Parental Strains Genome

DaYong ZHAO, HaiYing JIA, Bing Wu, ShiLei SUN, WenYang PAN, XuXiang ZHANG, ShuPei CHENG

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Engineering Center of Water treatment and Environment Remediation, Ministry of Education, Nanjing (210093)

Abstract

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) was used to analyze the differences of DNA fragments of genomes between inter-kingdom protoplast fusion (IKPF) strain Fhhh and its three parental strains. Among twenty arbitrary primers, sixteen of them had good compatibility with total DNA templates of each strain in RAPD assay. The similarity index between Fhhh and its three parental strains were $S_{PF}=25.5\%$, $S_{SF}=36.7\%$ and $S_{YF}=24.4\%$, respectively. The data suggested that RAPD is a rapid, simple, accurate method for identification of IKPF strain Fhhh, which would be helpful to create new strain with IKPF in wastewater treatment.

Keywords: IKPF Strain; Genome; RAPD; Wastewater Treatment