

RAPD 分子标记在酱油生产菌系统发育分析中的应用*

王 斌 潘 力** 郭 勇

(华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510640)

摘要 :以米曲霉沪酿 3.042(AS3.951) 酱油曲霉 AS3.495 为参照 ,对从商品酱油曲精中分离到的 8 株酱油生产菌进行 RAPD 分析。实验筛选到 6 个扩增产物谱带多、特征好、覆盖面广的引物 :Primer1、Primer5、Primer6、Primer7、Primer8、Primer9 ,重复实验证明其 RAPD-PCR 扩增图谱具有较好的稳定性 ,扩增产物谱带一般 4~8 条 ,各实验菌株主带 1~4 条 ,次带丰富。根据 RAPD-PCR 扩增图谱构建的系统进化树较好地吻合了传统的形态分类学 ,证实了 RAPD 分子标记在酱油生产菌系统发育分析中应用的可行性。

关键词 :RAPD 分子标记 ,酱油生产菌 ,系统发育分析 ,多态性

中图分类号 :Q939-64 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)03-0508-04

Application of RAPD Molecular Marker in the Phylogenetic Analysis of Soy Sauce Strains*

WANG Bin PAN Li** GUO Yong

(School of Bioscience and Bioengineering ,South China University of Technology ,Guangzhou 510640)

Abstract :RAPD analysis of eight soy sauce strains isolated from commercial soy sauce koji was done with random primers ,using *Aspergillus oryzae* AS3.951 and *Aspergillus sojae* AS3.495 as controls. Six appropriate primers (Primer1 ,Primer5 ,Primer6 ,Primer7 ,Primer8 ,Primer9) for RAPD-PCR were screened from nine random primers ,and repetitive experiments demonstrated that their RAPD-PCR polymorphic patterns were stable. There were usually 4~8 bands in their RAPD-PCR patterns ,where the number of the main bands was 1~4 and the secondary bands were abundant. The phylogenetic tree of these strains was reconstructed according to their RAPD-PCR patterns ,and it basically corresponded to traditional morphological taxonomy ,demonstrating that the application of RAPD molecular marker in the phylogenetic analysis of soy sauce strains was feasible.

Key words :RAPD molecular marker ,Soy sauce strain ,Phylogenetic analysis ,Polymorphism

酱油生产菌主要是黄曲霉菌群(*Aspergillus flavus* Group)中的一些丝状真菌 ,包括米曲霉、酱油曲霉、黄曲霉(应用较少)等 ,其代表种是米曲霉沪酿 3.042(AS3.951)。鉴于这类丝状真菌在酿造工业上的重要应用 ,对其进行分类研究就显得十分重要。然而 ,长期以来对酱油生产菌的分类研究主要依据菌丝、色素、无性世代的形态、性征、致病性等形态及生理生化特征^[1,2] ,这些分类指标易受环境因素的影响而不稳定 ,使得不同研究者的研究结果并不一致 ,甚至偏差很大 ,导致酱油生产菌的分类研究比较混乱 ,亟需更加可靠的分类手段。

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA ,RAPD)是由 Williams 和 Welsh 等

1990 年建立的一种有效的分子标记技术 ,它利用 PCR 技术和基因组信息对研究对象进行分类分析 ,较之以形态及生理生化特征作为分类依据的传统分类手段更加稳定、可靠、快速 ,而且不易受环境、发育等因素的影响 ,具有很高的可信度 ,现已广泛应用于动植物及微生物的分子进化、遗传多样性分析等领域^[3]。例如 ,赵福宽等^[4]利用 RAPD 技术对 76 份南瓜种质资源进行多态性分析 ,将其分为中国南瓜、美洲南瓜和印度南瓜三大类 ,表明南瓜种质资源遗传多样性丰富 ;宓鹤鸣等^[1]利用 RAPD 技术对中药红曲基原菌进行分类研究 ,证明橙色红曲霉与红色红曲霉可能为同一个种。国外研究人员则倾向于 RAPD 技术与其它分子生物学技术联用以提

* 广东省自然科学基金项目(No.04020061) ,广东省科技攻关项目(No.2004B20201011)

** 通讯作者 Tel 020-87113841 ,E-mail :btlipan@scut.edu.cn

收稿日期 2006-08-25 ,修回日期 2006-10-25

高分类研究的准确性,如 Simpson P J 等^[5]利用 RAPD 技术和脉冲场凝胶电泳技术(Pulsed-Field Gel Electrophoresis ,PFGE)对小球菌属 6 个种的 33 个菌株进行遗传多样性分析,得到了精确的分类图谱。

到目前为止,国内外鲜见利用 RAPD 技术对酱油生产菌进行分类分析的研究。本文应用该技术对从商品酱油曲精中分离到的 8 株酱油生产菌进行分类分析,以考察 RAPD 技术在酱油生产菌分类

研究中应用的可行性,为 RAPD 技术在真菌分类中的应用积累经验。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及其来源

试验菌株包括从商品酱油曲精中分离到的 8 株酱油生产菌和两株标准菌株(AS3.951、AS3.495),如表 1 所示。

表 1 试验菌株及其来源

编号	名称	来源	编号	名称	来源
1	B1	商品酱油曲精	6	SM	商品酱油曲精
2	B2	商品酱油曲精	7	SN1	商品酱油曲精
3	A	商品酱油曲精	8	SN2	商品酱油曲精
4	J1	商品酱油曲精	9	AS3.951(沪酿 3.042)	广东省微生物研究所
5	J2	商品酱油曲精	10	AS3.495(GIM3.33)	广东省微生物研究所

1.2 查氏平板穿刺培养

将 10 株试验菌株从活化的斜面培养物中穿刺接种到查氏培养基平板上,置 28℃ 培养箱中培养,每天观察菌株生长状态,待培养特征明显时(5d 左右)进行特征数据采集。

1.3 基因组 DNA 的提取

将试验菌株的孢子悬浮液接种于综合马铃薯液体培养基中,28℃,200 r/min 振荡培养 2d 左右。过滤收集菌丝体,冻干,液氮研磨后转移至 EP 管中,参考 Laura E. via 等人^[6]的方法经改良后提取基因组 DNA,双蒸水(加入适量 10 mg/mL RNase)溶解,-20℃ 保存备用。1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度法检测 DNA 质量和浓度。

1.4 RAPD-PCR 反应

PCR 扩增采用 Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪(Eppendorf,德国),所用的 9 个引物见表 2,由美国 Invitrogen 公司合成。扩增体系如下(总体积为 25 μ L):10 \times PCR buffer(TaKaRa)2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂(TaKaRa)1.5 μ L,2.5 mmol/L(each)dNTPs(TaKaRa)1.0 μ L,25 μ mol/L 引物 0.2 μ L,5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)0.2 μ L,50 μ g/mL 基因组 DNA 1.0 μ L,双蒸水 18.6 μ L。扩增程序为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,36℃ 1 min,72℃ 2 min(45 个循环);72℃ 5 min,4℃ 保存。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,拍照、保存。

表 2 RAPD-PCR 反应所使用的引物

编号	序列	编号	序列
Primer1	5'-AATCGGGCTG-3'	Primer6	5'-CTGCATCGTG-3'
Primer2	5'-CTGCTGGGAC-3'	Primer7	5'-AGCGCCATTG-3'
Primer3	5'-TGCGGGTCT-3'	Primer8	5'-GTGCGAGCAA-3'
Primer4	5'-ATGTAACGCC-3'	Primer9	5'-GTATTGCCCT-3'
Primer5*	5'-CGGC[A/C]CTG [T/A]3'		

* Primer5 为简并引物

1.5 数据处理

根据 RAPD-PCR 扩增结果得出各菌株的扩增数据,在得到的 RAPD-PCR 扩增产物电泳图上有条带记为“ 1 ”,无条带记为“ 0 ”,缺失数据记为“ * ”。所有菌株的扩增数据共同组成一个“ 0 - 1 ”数据矩阵。然后,根据 Nei 等的相似系数分析公式计算两两菌株间的相似系数。相似系数(F_{ab})=(2 \times N_{ab})/(N_a + N_b) \times 100%。其中, N_{ab} 为菌株 a 和菌株 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目, N_a 为菌株 a 具有的 DNA 扩增片段数目, N_b 为菌株 b 具有的 DNA 扩增片段数目。根据原始的“ 0 - 1 ”数据矩阵,利用 Phylip3.65 软件包采用距离法(distance based method)中的邻位相连法(neighbor-joining method)构建 10 株试验菌株的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的鉴定

本实验参考了 Laura E. via 等人所用的基因组 DNA 的提取方法,主要是针对丝状真菌细胞壁的结构

特点进行了改进。由于试验菌株均属于曲霉属,因此它们的基因组 DNA 的大小相差不大,在琼脂糖凝胶电泳图上显示大小一致的电泳条带,约为 20kb,如图 1 所示。利用分光光度法测定其浓度和纯度,证明所得基因组 DNA 纯度较高,浓度适中(800 μ g/mL 左右),这说明提取的基因组 DNA 比较完整,没有污染,能够用于进一步的 RAPD 实验。

2.2 RAPD-PCR 扩增图谱分析

在选用的 9 个引物中,Primer1、Primer5、Primer6、Primer7、Primer8、Primer9 共 6 个引物通过 RAPD-PCR 反应在试验菌株上获得了基因组多态性条带,其扩增产物谱带多,特征好,覆盖面广。统计所有电泳图谱获得条带 122 条,其中多态性条带 12 条,约占总数的 10%;基因组特异条带 42 条,约占总数的 34.4%。由于 RAPD 标记是一种显性标记,通常 RAPD 分析中一条带就代表基因组中的一个位点,这意味着对试验菌株的 122 个位点进行了检测。6 个引物的扩增图谱中,Primer1 和 Primer7 的扩增图

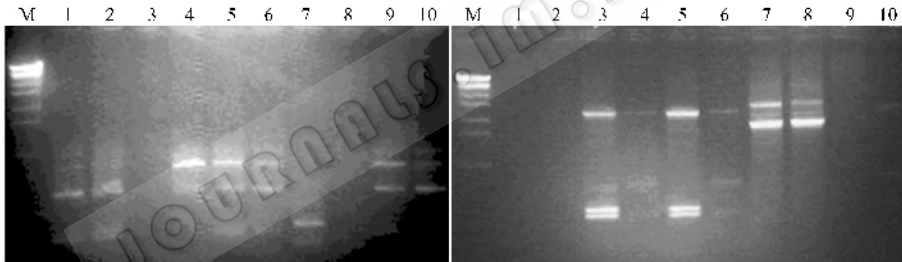


图 2 利用 Primer1、Primer7 得到的试验菌株的 RAPD-PCR 扩增图谱
左图为 Primer1 的 RAPD-PCR 扩增图谱,右图为 Primer7 的 RAPD-PCR 扩增图谱

2.3 基于 RAPD-PCR 扩增图谱的系统发育分析

根据上述 6 个引物的 RAPD-PCR 扩增图谱的原始数据得到“0-1”数据矩阵,由此计算出了菌株间的遗传相似系数,如表 3。利用 Phylip3.65 软件包采用距离法中的邻位相连法构建了 10 株试验菌株的系统发育树,如图 3。各菌株间的相似系数在 7.1%~80%之间,平均 40.13%,说明各菌株之间具有比较丰富的 RAPD-PCR 扩增产物多态性,遗传分化比较明显。

从图 3 可以看出,当相似系数达到 0.25 的水平时,10 株菌株聚成 3 组:菌株 J2 分化较大,单独成为 1 组;菌株 SM 虽与其它菌株相似程度稍大,但分化明显,也单独成组,查氏平板穿刺培养结果证明其生理生化特征明显地区别于其它菌株,接近黑曲霉的

谱较好(如图 2,图中各编号的意义同图 1),扩增产物谱带一般 4~8 条,各试验菌株主带 1~4 条,次带丰富。各菌株既有彼此相同的共同条带,又有各自的特征条带,共同条带证明各菌株具有大致相同的遗传基础,特征条带则说明了它们的遗传分化。重复实验证明试验菌株的 RAPD-PCR 扩增图谱具有较好的稳定性。综合分析 6 个引物的扩增图谱,可以将 10 株试验菌株清楚地区分开。

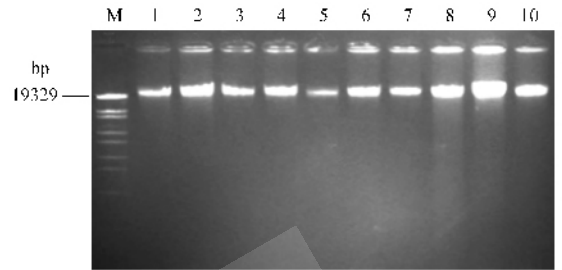


图 1 各试验菌株的基因组 DNA

M DNA 分子量标准(λ -EcoT 14I Digest),1 B1 2 B2 3 A 4 J1 5 J2 6 SM 7 SN1 8 SN2 9 AS3.951(沪酿 3.042),10 AS3.495(GIM3.33)

培养特征,初步断定其为黑曲霉的 1 种;剩余菌株 A、B1、B2、SN1、SN2、J1、AS3.951、AS3.495 组成第 3 组。当相似系数达到 0.45 的水平时,上述第 3 组菌株又分为两组:菌株 A、B2 与米曲霉沪酿 3.042(AS3.951)聚为 1 组,穿刺培养结果证明它们具有典型的米曲霉培养特征;菌株 SN1、SN2、J1、B1 与酱油曲霉 AS3.495 聚为 1 组,它们的穿刺培养结果也支持这样的聚类结果。由于米曲霉沪酿 3.042(AS3.951)和酱油曲霉 AS3.495 是典型的酱油生产菌,上述聚类结果表明菌株 A、B1、B2、SN1、SN2、J1 适合用于酱油生产,而菌株 J2 和 SM 可能是为增加酱油风味而特意增添的菌株或者是生产中污染的杂菌。此外,根据文献报道^[5]相似程度 70% 是区分不同种的界限,因此可以认为菌株 B1 和 J1、SN1 和

SN2、A 和 AS3.951 应属于种以下的分类单元。

表 3 试验菌株间的遗传相似系数矩阵

试验菌株	B1	B2	A	J1	J2	SM	SN1	SN2	AS3.951	AS3.495
B1	1.0000									
B2	0.5333	1.0000								
A	0.2609	0.0833	1.0000							
J1	0.7778	0.4762	0.6207	1.0000						
J2	0.3636	0.5217	0.4516	0.5714	1.0000					
SM	0.3810	0.7273	0.4000	0.5926	0.6207	1.0000				
SN1	0.0952	0.0952	0.1333	0.0741	0.3448	0.2143	1.0000			
SN2	0.2314	0.1863	0.2667	0.3471	0.2759	0.1429	0.7143	1.0000		
AS3.951	0.5714	0.8000	0.6423	0.4000	0.3636	0.6667	0.0952	0.2489	1.0000	
AS3.495	0.6667	0.7273	0.3333	0.6667	0.4828	0.7143	0.0714	0.6482	0.6667	1.0000

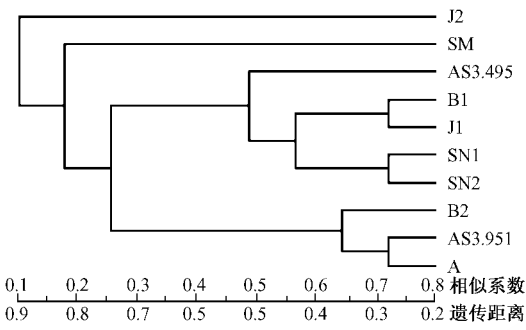


图 3 试验菌株的系统发育树

3 讨论

酱油生产菌是一类重要的工业用丝状真菌,关于其分类的研究一直比较滞后,主要依靠形态学指标进行分类。本文结合传统的分类指标,探索了 RAPD 分子标记在此类真菌分类研究中的应用。从总体上看,基于 RAPD 分子标记的分子分类与基于基因组 DNA 的形态分类具有良好的吻合度,二者均能准确地将 10 株试验菌株划归于黑曲霉、米曲霉、酱油曲霉等不同种属。而且基于 RAPD 分子标记的分析可以实现种以下分类单元的分类,菌株 B1 和 J1、SN1 和 SN2、A 和 AS3.951 应分别属于同一个种。这说明 RAPD 分子标记能较好地反映试验菌株之间的遗传分化,将其应用于丝状真菌,特别是酱油生产菌的系统发育分析是可行的。

研究中发现,基于 RAPD 分子标记构建的系统发育树并不十分准确,例如形态特征上与菌株 B2 更相近的菌株 A 却与菌株 AS3.951 聚类在同一进化枝条上;同样与菌株 SN1、SN2 具有相似形态特征的菌株 B1 却与菌株 J1 聚类在一起。一方面,这是由

RAPD 分子标记自身的特点决定的。RAPD 分子分类的准确性依赖于扩增图谱中多态性条带的丰富程度。因此,进一步的实验应立足于筛选更多的、多态性条带更为丰富的 RAPD 引物,并进一步优化 RAPD-PCR 的反应体系和扩增程序,以期得到更好的分类结果。另一方面,基于 RAPD 分子标记的分子分类与传统分类之间的这种偏离是与不同分类水平相关的,是与它们反映的基因组多态性信息的程度相关的^[1]。因此,虽然 RAPD 分子标记具有许多优点如能够比较全面地反映被测生物基因组 DNA 的多态性^[7]、不易受环境因素的影响、无需事先了解研究对象的基因组信息^[8-9]等,但单单依靠 RAPD 技术很难得到完全准确的分类图谱,这也说明分类研究应综合各种技术手段,才能得到比较客观、准确的分类结果。

参考文献

[1] 宓鹤鸣,邢旺兴,程荣珍,等.第二军医大学学报,2000,21(10):944~946.

[2] 谢艺贤,郑服丛.华南热带农业大学学报,2000,1(1):35~40.

[3] 李钧敏.微生物学通报,2003,30(5):5~9.

[4] 赵福宽,李海英,赵晓萌.分子植物育种,2006,4(3):45~50.

[5] Simpson P J, Stanton C, Fitzgerald G F, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(2):765~771.

[6] Laura E V, Joseph O F. J Microbiol Methods, 1995, 21(2):151~161.

[7] 唐传红,张劲松,陈明杰,等.微生物学通报,2005,32(5):72~76.

[8] YUAN Gwo-Fang, LIU Chiung-Shu, CHEN Chann-Chao. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(6):2384~2387.

[9] Véronique L G, Jean-Louis P, Beate H, et al. Anaerobe, 1997, 3(4):245~250.