

芽孢杆菌 TS02 特异 RAPD 标记的 SCAR 标记转化和验证

陈 冲^{1,2**} 佟建明^{1*} 张潞生^{2*} 高微微³ 王程亮^{1,2**}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室 北京 100094)

(2. 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100094)

(3. 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所 北京 100094)

摘 要: 利用自主分离的蜡状芽孢杆菌菌株 TS02, 采用 RAPD 方法对 TS02 及其同源性相近的 5 株芽孢杆菌(地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌) 进行了 RAPD 条带特异性分析, 从 TS02 基因组中筛选获得了一个 533 bp 的特异 RAPD 标记 TSR₁。TSR₁ 克隆、测序后, 根据其序列设计出一对特异引物 P1/P2 进行扩增, 结果只在 TS02 中扩增得到目的片段, 而其余对照菌株扩增为阴性, 从而证明试验得到了在种水平上对该菌种进行准确鉴定的特异 SCAR 标记。

关键词: 芽孢杆菌 TS02, RAPD 标记, SCAR 标记

Transformation and Identification of SCAR Marker from Specific RAPD Marker of *Bacillus* TS02

CHEN Chong^{1, 2**} TONG Jian-Ming^{1*} ZHANG Lu-Sheng^{2*}
GAO Wei-Wei³ WANG Cheng-Liang^{1, 2**}

(1. The State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, CAAS, Beijing 100094)

(2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

(3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100094)

Abstract: *Bacillus cereus* TS02 is a functional strain separated by our laboratory. RAPD was used to analyse the specificity of TS02 in contrast to other five *Bacillus* bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus pumilus*) that are highly homologous to TS02 according to the conventional taxonomy. A specific marker TSR₁ (533 bp) was obtained, cloned and sequenced, a specific primer pair P1/P2 was designed based on the TSR₁ sequence. P1/P2 can specifically amplify the objective band which is only in TS02 and not found in other control strains. The results showed that the specific RAPD marker had been transformed to the steady SCAR marker, and the specific SCAR marker can cor-

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD12B05)

* 通讯作者: 佟建明 Tel: 010-62816061; ✉: tjm606@263.net

张潞生 Tel: 010-62732477; ✉: lusheng@cau.edu.cn

**两位作者对本篇论文具有相同贡献

收稿日期: 2007-08-27; 接受日期: 2007-10-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

rectly detect the *Bacillus* TS02 in specie's lever.

Keywords: *Bacillus cereus* TS02, RAPD marker, SCAR marker

随着人们对农、畜产品安全意识的不断加强, 抗生素与部分化学农药被禁用已成必然趋势, 微生物生态调节剂等对人、畜和植物友好的产品将逐步取代抗生素与部分化学农药, 在食品、医药、畜牧和植物保护等领域发挥作用^[3, 9]。微生物生态调节剂是由有益菌及其代谢产物和促进物质制成的制剂, 有益菌是指必须对宿主有益而无害、安全、无副作用的在肠内或其他生境内具有活力的一类菌^[10]。芽孢杆菌 TS02 是实验室从土壤中自主分离得到的一株功能菌, 研究证明 TS02 可分泌多种消化酶(淀粉酶、蛋白酶、甘露聚糖酶)和抗氧化物质, 不仅对常见的动物致病性大肠杆菌、沙门氏菌有抑制作用, 同时还对植物一些病菌有抑制作用。前期实验室通过 TS02 16S rDNA 全序列同源性等方法的分析, 证明 TS02 菌株属于一株蜡状芽孢杆菌^[1, 2], 目前实验室正在进行 TS02 的安全性和功能性开发研究, TS02 有望作为微生物生态调节剂在相应的生产领域加以应用。

作为微生物生态调节剂, 其中有益目标菌种的存在、含量与活性是保证其产品质量的关键^[4, 5], 因此, 有益目标菌种的检测至关重要。目前人们普遍认知的是有益菌发挥作用是建立在有益菌菌株遗传特异性基础之上的, 它与菌株分子水平的多态性相关, 因此利用分子生物学技术从 DNA 水平上对目标菌种进行鉴定将更为快速、合理、可靠^[6-8]。本实验以 TS02 为研究对象进行有益目标菌种的分子检测技术的研究, 为今后 TS02 种质的保护利用提供技术支持, 同时也为有益微生物分子检测技术的建立和完善提供参考。

1 材料和方法

1.1 参试菌株及来源

1.2 RAPD 特异标记的筛选

通过文献检索, 筛选出 16 个(表 2) 适合芽孢杆菌 RAPD 分析的引物, 以 TS02 和参试菌株(表 1) DNA 为模板进行 RAPD 扩增。PCR 反应体系为 20 μ L, 其中模板 DNA 50 ng, 10 \times 扩增缓冲液 2 μ L, dNTP 混合物各 0.25 mmol/L, 随机引物 0.50 mmol/L, Taq 聚合酶 1.0 U, Mg²⁺ 2 mmol/L。PCR 反应程序为: 94 2.5 min; 94 30 s, 36 40 s, 72 1.5 min, 进行 40 个循环; 72 延伸 5 min, 最后 4 保存。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离, 通过分析扩增结果, 筛选 TS02 的 RAPD 特异条带。

1.3 RAPD 特异标记的 SCAR 标记转化和验证

筛选到的 TS02 的 RAPD 特异条带经 DNA 胶回收试剂盒分离纯化后克隆至 pGEM-T 载体上, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞, 在氨苄抗性平板上进行蓝白斑筛选。将阳性克隆进行测序, 根据片段测序结果利用 Primer Premier5.0 软件, 设计一对 SCAR 引物 P1/P2。利用合成的 SCAR 引物 P1/P2, 以 TS02 和参试菌株(表 1)DNA 为模板进行 PCR 扩增, 验证 SCAR 标记的准确性; 同时, 设定灭菌超纯水为阴性对照, 设定细菌 16S rDNA 片段为阳性对照。PCR 反应体系为 50 μ L, 其中模板 DNA 50 ng, 10 \times 扩增缓冲液 10 μ L, 4 种 dNTP 混合物各 200 μ mol/L, 正反引物各 20 pmol/L, Pfu 聚合酶 1.5 U, Mg²⁺ 2 mmol/L。PCR 反应程序为: 94 2.5 min; 94 45 s, 52 1 min, 72 1.5 min, 进行 35 个循环; 72 延伸 5 min, 最后 4 保存。

表 1 参试菌株及来源			
Table 1 Strains tested and their resource			
中文名称 Chinese name	拉丁文名称 Latin name	菌株号 Strain number	来源 Resource
蜡状芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	TS02	实验室保存
凝结芽孢杆菌	<i>Bacillus coagulans</i>	7050	ATCC
巨大芽孢杆菌	<i>Bacillus megaterium</i>	14581	ATCC
地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	14580	ATCC
地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	B-402-1	CGMCC
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	6051-U	ATCC
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	ATCC
短小芽孢杆菌	<i>Bacillus pumilus</i>	7061	ATCC

ATCC : 美国典型培养物保藏中心; CGMCC : 中国普通微生物菌种保藏管理中心。

表 2 RAPD 随机引物序列			
Table 2 RAPD random primer sequence			
编号 Primer number	核苷酸序列 Nucleotide sequence	编号 Primer number	核苷酸序列 Nucleotide sequence
A 08	GTGACGTAGG	H 18	GAATCGGCCA
A 17	GACCGCTTGT	Q 03	GGTCACCTCA
A 18	AGGTGACCGT	R 13	GGACGACAAG
B 19	ACCCCGAAG	S 11	AGTCGGGTGG
C 01	TTCGAGCCAG	T 01	GGGCCACTCA
C 06	GAACGGACTC	T 05	GGGTTTGGCA
C 17	TTCCCCCAG	W 14	CTGCTGAGCA
G 09	CTGACGTCAC	W 19	CAAAGCGCTC

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果分析

TS02 基因组 DNA RAPD 扩增结果如图 1 所示, 16 个随机引物均有扩增产物。片段大小分布在 0.2 kb~2 kb 之间。不同引物扩增出的片段数量不同, 少则 1 条, 多则 7 条, 平均每个引物可产生 4~5 条带。选取 6 个带型较为清晰的引物 C01, C06, H18, G09, T05, W14 进行下一步的特异性条带扩增和筛选实验。

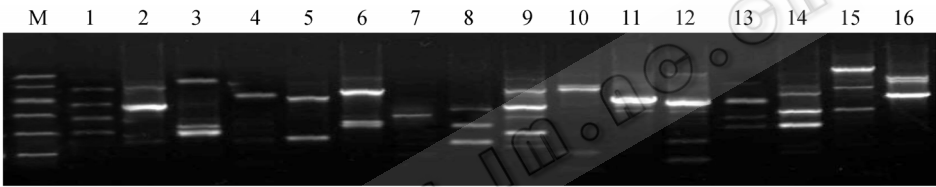


图 1 随机引物对 TS02 的 RAPD 扩增

Fig. 1 TS02 RAPD amplification with random primers

M: Marker v; 1-16 随机引物依次为 A08, A17, A18, B19, C01, C06, C17, G09, H18, Q03, R13, S11, T01, T05, W14, W19
M: Marker v; 1-16: The random primers are A08, A17, A18, B19, C01, C06, C17, G09, H18, Q03, R13, S11, T01, T05, W14, W19 respectively

2.2 RAPD 特异标记的筛选

筛选的 6 个随机引物对同源性相近的 5 株芽孢杆菌菌株基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 经分析比较发现, 只有引物 G09 在 TS02 中扩增到 1 条特异性条带 TSR₁(图 2 箭头所指), 分子量为 500 bp 左右。在地衣芽孢杆菌(ATCC 14580), 枯草芽孢杆菌(ATCC 6051-U), 凝结芽孢杆菌(ATCC 7050), 巨大芽孢杆菌(ATCC 14581)和短小芽孢杆菌(ATCC 7061)其他 5 株芽孢杆菌菌株中没有扩增到 TSR₁ 条带。

2.3 RAPD 特异标记的 SCAR 标记转化和验证

回收、克隆上述 RAPD 特异标记片段, 经测序后获得这个片段的全序列(图 3), 两端的 10 个碱基序列为 G09 的碱基序列及其反向序列, 全长共 533 bp。

将此序列输入 Primer Premier 5.0 软件, 设计一对 PCR 特异引物 P1/P2: 5'-TCCAAGTACTTCTCCAT-3' 和 3'-TTTGCCATTACATAGAGT-5', 利用

P1/P2 特异引物对 TS02 和其他同源性相近 7 株芽孢杆菌菌株: 地衣芽孢杆菌(ATCC 14580 和 CGMCC B-402-1), 枯草芽孢杆菌(ATCC6051-U 和 ATCC

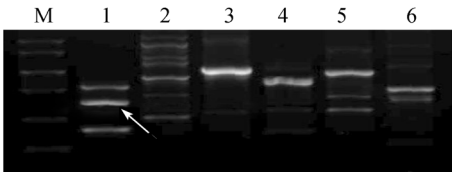


图 2 G09 随机引物对 6 个供试菌株基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 2 PCR amplified results from 6 bacterial genomic DNA using G09 primer

M: Marker v; 1-6 菌株依次为 TS02, 地衣芽孢杆菌(ATCC 14580), 枯草芽孢杆菌(ATCC 6051-U), 凝结芽孢杆菌(ATCC 7050), 巨大芽孢杆菌(ATCC 14581), 短小芽孢杆菌(ATCC 7061)
M: Marker v; 1-6: The strains are TS02, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051-U, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Bacillus megaterium* ATCC 14581 and *Bacillus pumilus* ATCC 7061 respectively

6633), 凝结芽孢杆菌(ATCC 7050), 巨大芽孢杆菌(ATCC 14581), 短小芽孢杆菌(ATCC 7061)基因组 DNA 进行扩增, 获得了预期的结果(图 4)。引物对

P1/P2 只在 TS02 中扩增到唯一的一条条带, 在其他同源性相近的芽孢杆菌菌株中没有此带, 表明 RAPD 标记已成功转化为 SCAR 标记。

```

1   CTGACGTCAC TTTCTTATTT CAAAACGAT CTTTCGTTTC TACTTTTACT TTTTGTTTAC
61  CGATTTTTGT TGTATTCGGT TTTTCTACAA ATCCAACCTAC TTCTCCATCT TTTACTTCAA
121 CAAAGTTTTT CGCATCTAAC TTCTTAATAT CTGTTCGAC TACTACTTTT TGCGGTTTCG
181 CCGTCACTTC TTGTAAACCA TCTTTTAACT CGAACCCCTG CGGAGTAATT TTGAATAATT
241 TTTCTTCTTT ATTTTATAGCT TTCCCTTGAT CTACAAGTGC GTTATTTTTG TACCATTTC
301 GACGGCTTGG TTCTGCGTGG AATACTTTTA CTACATCACC ATATTCAAAA TCCAATTTCAT
361 TTAGTTCCAT TGCGAATCGT TTTCCAGTTT CTTGCCCTTC TGCTGATACA CGTTTCTTTT
421 CAATCCCATT TCGATCGTAT AGCGTTAAGC CCATATATTC TTCTTTTTC A AACGGTAAT
481 GTATCTCATT ATTAGTAAAG TTTGCATTTA ATTTTTTTTC ATTGTGACGT CAG

```

图 3 RAPD 特异标记片段的测序结果

Fig. 3 The result of RAPD special marker's sequence

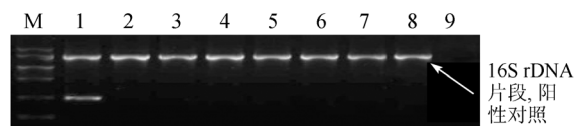


图 4 特异性 SCAR 引物 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplified results with specific SCAR primer

M: Marker v; 1-8 菌株依次为 TS02, 地衣芽孢杆菌 ATCC 14580, 地衣芽孢杆菌 CGMCC B-402-1, 枯草芽孢杆菌 ATCC 6051-U, 枯草芽孢杆菌 ATCC 6633, 凝结芽孢杆菌 ATCC 7050, 巨大芽孢杆菌 ATCC 14581, 短小芽孢杆菌 ATCC 7061; 9: 阴性对照

M: Marker v; 1-8: The strains are TS02, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus licheniformis* CGMCC B-402-1, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* ATCC 6051-U, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Bacillus megaterium* ATCC 14581, *Bacillus pumilus* ATCC 7061 respectively; 9: Negative control

3 结论

本研究通过 RAPD 分析从芽孢杆菌 TS02 菌株中获得了一条特异性片段, 并将该标记转化为稳定的 SCAR 标记, 并通过验证, 该特异 SCAR 标记的获得为从分子水平上对 TS02 种质的保护利用提供了技术支持。

参 考 文 献

[1] 陈 冲. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)防治草莓病害的功效及其分子鉴别的研究. 中国农业大学硕士学位论文, 2007.

[2] 陈 冲, 张潞生, 高微微, 王程亮, 王红清, 佟建明. 芽孢杆菌 TS02 对草莓白粉病菌的抑制及其 16S rDNA 的遗传鉴定. 中国园艺学会十届二次理事会暨学术研讨会(南京), 2007, p.50.

[3] 范 玲. 微生物农药研究进展及产业发展对策. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 83-86.

[4] 任锦玉. 微生态调节剂中益生菌的检测研究. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(3): 259-261.

[5] 袁佩娜. 微生态药品制剂的质量控制. 中国食品卫生杂志, 1999, 11(2): 15-16.

[6] 袁铁铮, 姚 斌. 分子水平上益生菌研究进展. 中国生物工程杂志, 2004, 10: 27

[7] Elaine E Vaughan, Hans GHJ Heilig, Erwin G Zoetendal, et al. Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. 1999, 10: 400-404.

[8] Jeanne D, Bette B, Cheryl G. Evaluation of Five Probiotic Products for Label Claims by DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction Analysis. *Digestive Diseases and Sciences*, 2005, 50(6): 1113-1117.

[9] Robert A Rastall, Glenn R Gibson, Harsharnjit S Gill, et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(2): 145-152.

[10] Weese JS. Microbiologic evaluation of commercial probiotics. *Am Vet Med ASSOC*, 2002, 220(6): 794.