

PCR-DGGE 研究微生物种群中多条带 产生原因分析

陈章宝¹ 向少能¹ 江震献¹ 周泽扬^{1,2*}

(1. 西南大学蚕学与系统生物学研究所微生物分室 重庆 400716)
(2. 重庆师范大学生命科学学院 重庆 400047)

摘要: 鸡肠道微生物菌群经 PCR-DGGE 分析, 回收 PCR-DGGE 分析胶上的一条 DNA 片段, 回收的 DNA 片段再重复进行 2 次 PCR-DGGE 分析, 以及分别用 PCR 反复循环扩增和 PCR 高保真酶扩增后再进行 DGGE 分析等方法研究 PCR-DGGE 分析中多条带产生原因。结果显示 PCR-DGGE 分析中多条带产生原因可能是作 PCR 扩增模板的 DNA 混杂有少量其他 DNA 片段, 多条带现象不易被消除。DGGE 分析胶上的 DNA 片段测序时, 将该 DNA 片段回收、PCR 扩增后克隆, 提取多个阳性克隆菌的质粒 DNA 片段, 分别与其原目的 DNA 片段进行 DGGE 分析, 在 DGGE 分析胶上选取与原目的 DNA 片段处于同一电泳位置的质粒 DNA 测序, 提高测序的准确性。

关键词: PCR-DGGE 技术, 多条带, 原因分析, 微生物种群

Analysis on Causes of Multi-bands in Researching on Microbe Populations by PCR-DGGE

CHEN Zhang-Bao¹ XIANG Shao-Neng¹ JIANG Zhen-Xian¹ ZHOU Ze-Yang^{1,2*}

(1. Microbiology Division, Institute of Sericulture and Systems Biology, Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China)
(2. Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: Microbe populations from chicken intestinal were analyzed by PCR-DGGE. DNA fragment represented by a band from DGGE gel was retrieved. DNA fragment was two times repeated analyzed with PCR-DGGE, furthermore PCR reamplification and using high-fidelity DNA polymerase amplification also be applied to study on causes of multi-bands in PCR-DGGE analysis. The results showed that the causes of multi-bands in PCR-DGGE analysis may be that DNA templates for PCR mixed with other DNA fragment, and it was difficult to eliminate phenomenon of multi-bands in PCR-DGGE analysis. While the DNA fragments represented by bands from DGGE gel was sequenced, cloned this DNA fragments and extracted plasmid DNA of positive bacteria, and the plasmid DNA was amplified and analyzed again on DGGE gel to verify its position. Colonies whose positions were the same with the original DNA were selected for DNA sequencing to improve the veracity of DNA sequencing.

Keywords: PCR-DGGE technology, Multi-bands, Analysis on causes, Microbe populations.

变性梯度凝胶电泳 (Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)最初是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最早提出的用于检测 DNA 片段中单个碱基改变的点突变的一种电泳技术^[1]。自从 1993 年 Muyzer 等^[2]引入微生态的研究后,越来越多地运用在了环境微生物生态、人类和动物肠道微生物生态等的分析,这一技术能较好地解决大多数细菌不可培养对研究造成的困难^[3-5]。

PCR-DGGE 技术是提取微生物样品中的总 DNA,以混合的微生物总 DNA 作模板,用同一套 PCR 引物扩增出不同的 DNA 片段,由于不同微生物菌株基因存在碱基的差异,扩增出的双链 DNA 片段解链特性也就会有差异,它们在含有化学变性剂尿素(Urea)和甲酰胺(Formamide)梯度的聚丙烯酰胺凝胶中泳动时(DGGE),在相应的变性剂浓度下在解链点(Melting domain)发生部分解链,同样长度但序列不同的 DNA 片段会在 DGGE 分析胶中不同位置处达到各自最低解链区域的解链温度,随着每一个 DNA 样品核酸序列的不同,部分变性解离的程度也不相同,其在 DGGE 分析胶中的移动速度也有所不同(DNA 双链快、单链慢),使得部分变性的 DNA 会在相同时间内,在凝胶上迁移距离不同,从而被分离开来^[6]。

在用分子生物学 PCR-DGGE 技术分析微生物群落结构组成时,因不同细菌的基因组大小和核糖体 RNA 拷贝数不同、提取基因组总 DNA 时细胞的裂解效率不同、DNA 提取和纯化、PCR 扩增等过程中有偏差导致分析的微生物群落结构存在误差^[7]。

DGGE 分析胶上的一条带本应代表一种微生物菌株的 DNA 片段, DGGE 分析胶上的一条带所代表的 DNA 片段被切下、回收,该 DNA 片段作模板进行 PCR 扩增后,再次进行 DGGE 分析,理论上在 DGGE 分析胶上也应是一条单一条带,结果往往却出现多条带^[6], Ercolini D^[6]和 Sekiguchi H^[8]等报道 DGGE 分析胶上的一条带并不能完全代表一种微生物菌株 DNA 片段。PCR-DGGE 分析中出现多条带的原因,究竟哪条带真实代表微生物菌株的 DNA 片段基因,如何消除多条带现象对微生物菌株 DNA 片段测序准确性的影响,目前未见文献报道,本研究拟对 PCR-DGGE 技术分析微生物种群时多条带现象产生的原因进行研究,以期提高 PCR-DGGE 分析

微生物种群的准确性。

1. 材料与方法:

1.1 材料

1.1.1 PCR 引物: 未加 GC 夹子 16S rRNA 的 V3 区段上引物序列为: F357: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'R518; 加 GC 夹子 16S rRNA 的 V3 区段上引物序列为: F357-GC: 5'-CGCCGGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'。16S rRNA 的 V3 区段下引物 R518: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。TaKaRa 公司合成。

1.1.2 高保真 Taq DNA 聚合酶: TaKaRa 公司产品。

1.1.3 DGGE 试剂: 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TAE Buffer、TEMED、过硫酸胺、去离子甲酰胺、尿素、DGGE 试剂均为分子生物学级纯,均为 Sigma 公司分装。

1.1.4 胶回收及克隆试剂: DNA 胶回收试剂盒购于绵阳天泽基因公司, pMD18-T 载体试剂盒、酶与 PCR 缓冲试剂均购于 TaKaRa 公司。

1.1.5 质粒提取试剂: 按分子克隆实验指导^[9]配制,试剂均为分析纯。

1.1.6 大肠杆菌菌株: 购于中国药品生物制品检定所(菌号: ATCC2592)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 反应体系为: 在 0.2 mL 的 PCR 管中加入(总反应体系为 25 μ L): 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 引物 (20 μ mol/L) 0.5 μ L, DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 0.25 μ L, DNA 模板 1 μ L (从 DGGE 分析胶回收的 DNA 片段作模板, 5 μ L), 去离子水加至 14.25 μ L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.2.2 DGGE 分析: 变性剂范围为 30%–60% (100%变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40%的去离子甲酰胺的混合物), 10%的聚丙烯酰胺胶(丙烯酰胺/双丙烯酰胺 = 37.5: 1), 变性剂浓度从胶的上方向下方递增。待变性梯度胶完全凝固后, 将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 取 PCR 产物 15 μ L 加入加样孔中, 按设定时间电泳。在 220 V 电压下预电泳 5 min, 电泳样品带过浓缩胶后, 调电压至 85 V

在 60°C 电泳 16 h。显色采用银染法^[10]。

1.2.3 大肠杆菌菌株 DNA 的 PCR-DGGE 分析: 大肠杆菌标准菌株用 LB 培养基培养 24 h, 离心收集菌体约 0.2 g, 用袁志辉等^[11]方法进行 DNA 的提取, 大肠杆菌总 DNA 用带夹子的 16S rRNA 的 V3 区引物按 1.2.1 进行 PCR 扩增, 取 15 μL PCR 扩增产物按 1.2.2 进行 DGGE 电泳分析。

1.2.4 鸡肠道微生物菌群的 PCR-DGGE 分析: (1) 鸡肠道微生物菌群的第 1 次 PCR-DGGE 分析: 选健康鸡停食 4 h 后解剖, 取肠道内容物按袁志辉等^[11]方法进行总 DNA 提取, 提取的总 DNA 用带夹子的 16S rRNA 的 V3 区引物按 1.2.1 进行 PCR 扩增, 取 15 μL PCR 扩增产物按 1.2.2 进行 DGGE 分析。(2) PCR-DGGE 分析胶上单一条带的第 2 次 PCR-DGGE 分析: 选第 1 次 PCR-DGGE 分析胶上的一条特异性条带(图 1 A 泳道中的条带 6), 用无菌手术刀片切下, 用 40 μL 1 × PCR 缓冲溶液洗涤 2 次, 再用枪头捣碎, 用 40 μL 1 × PCR 缓冲溶液浸泡, 4°C 过夜; 取过夜浸泡液 5 μL 作模板, 用带夹子的 16S rRNA 的 V3 区引物按 1.2.1 进行第 2 次 PCR 扩增。取 15 μL PCR 扩增产物按 1.2.2 进行 DGGE 分析。(3) 第 2 次 PCR-DGGE 分析胶上单一条带的第 3 次 PCR-DGGE 分析: 分别选第 2 次 PCR-DGGE 分析胶上的 4 条特异性条带(图 1 B 泳道中的条带 1、3、4、6), 其余分别按 1.2.4(2)进行 PCR-DGGE 分析。

1.2.5 PCR 反复循环扩增: 鸡肠道微生物菌群总 DNA 按 1.2.4(1)进行 PCR-DGGE 分析, 分别切取 DGGE 分析胶上的两条带(图 2 E 泳道中的条带 4、8), 分别进行 DNA 片段回收, 分别以回收的 DNA 片段作模板按 1.2.1 进行第 1 次 PCR 扩增, 取第 1 次 PCR 扩增产物稀释 10 倍后的样品 1 μL 作模板按 1.2.1 进行第 2 次 PCR 扩增, 条带 4 依此进行第 3 次 PCR 扩增。分别取第 1 次、第 2 次、第 3 次 PCR 扩增产物按 1.2.2 进行 DGGE 分析。

1.2.6 高保真酶扩增: 取鸡肠道微生物菌群第 1 次 PCR-DGGE 分析胶上的单一条带, 按 1.2.1 进行 PCR 扩增, 用高保真酶 *Taq* DNA 合成酶代替一般的 *Taq* DNA 合成酶, 其他条件不变, 扩增产物按 1.2.2 进行 DGGE 分析。

1.2.7 特异性 DNA 片段的克隆、测序: (1) 特异性 DNA 片段的回收、扩增。选择 1.2.4(1)中 DGGE 分析胶上的 1 个 DNA 条带(条带 C), 用无菌手术刀片

切下该条带, 用 40 μL 1 × PCR 缓冲溶液洗涤 2 次, 再用枪头捣碎, 用 40 μL 1 × PCR 缓冲溶液浸泡, 4°C 过夜; 取过夜浸泡液 5 μL 中含的 DNA 片段作模板按 1.2.1 进行 PCR 扩增, 用不加夹子的 16S rRNA 的 V3 区引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物用 DNA 胶回收试剂盒纯化。(2) 特异性 DNA 片段的克隆筛选。取 1.2.7(1) PCR 产物纯化液 5 μL 在 10 μL 的 pMD18-T 载体体系中, 16°C 进行过夜连接; 取 5 μL 的连接产物转入大肠杆菌 GM109 感受态细胞中, 涂 LB 平板, 进行蓝白斑筛选, 挑取白斑, 振荡培养 12 h。(3) 质粒的提取及 DGGE 分析。按文献 [9]提取 1.2.7(2)培养的阳性菌的质粒, 用带夹子的 16S rRNA 的 V3 区引物按 1.2.1 进行 PCR 扩增, 取 5 μL 扩增产物按 1.2.2 作 DGGE 分析。(4) 测序。随机选取 1.2.7(3)的质粒 DNA 在 DGGE 分析胶上与条带 C 处于相同位置的质粒送上海英骏公司测序。

2 结果

2.1 大肠杆菌菌株 DNA 的 PCR-DGGE 分析结果
大肠杆菌菌株 DNA 的 PCR-DGGE 分析结果见图 3。结果显示, 大肠杆菌菌株 DNA 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增, 再经 DGGE 分析后显示单一条带, 且强度明显。说明纯菌株的 DNA 在 DGGE 中只产生一条带, PCR 扩增、DGGE 分析条件适宜。

2.2 鸡肠道微生物菌群的 PCR-DGGE 分析

鸡肠道微生物菌群的 DNA 经 PCR 扩增, DGGE 分析结果见图 1。结果表明, 在 DGGE 分析胶上显示 1、2、3、4、5、6、7、8、9 等 9 条主要条带(A 泳道), 根据每一条带代表一种微生物菌株或一个操作单元, 说明鸡肠道中可能存在 9 种不同的微生物菌群。

鸡肠道微生物菌群 PCR-DGGE 分析胶上(图 1 A 泳道)的条带 6 被切下, 回收其 DNA 片段进行第 2 次 PCR-DGGE 分析, 结果见图 1 (B 泳道)。结果显示, 条带 6 所代表的菌株 DNA 片段经 PCR-DGGE 分析, 在 DGGE 分析胶上应显示单一条带, 却出现 1、2、3、4、5、6 等 6 条带, 且条带 6 (B 泳道)与原目的条带 6 (A 泳道)在 DGGE 分析胶上处于相同位置, 其余的条带 1、2、3、4、5 均处于比原条带 6 大的位置, 对应于原样品中的条带。

分别切下鸡肠道微生物菌群的第 2 次 PCR-DGGE

分析胶上(图 1 B 泳道)的条带 1、3、4、6, 分别回收其 DNA 片段进行第 3 次 PCR-DGGE 分析, 结果见图 1 (C-J 泳道)。结果显示, 条带 1、3、4、6 所代表的菌株 DNA 经 PCR-DGGE 分析后本应分别显示单一条带, 但均出现多条带, 如条带 1 经 PCR 扩增、DGGE 分析出现 1、3、4、6 条带, 其中 1、6 条带明显(C、D 泳道); 条带 3 经 PCR 扩增、DGGE 分析出现 1、3、4、5、6 条带(E、F 泳道); 条带 4 经 PCR 扩增、DGGE 分析出现 1、4、5、6 条带(G、H 泳道); 条带 6 经 PCR 扩增、DGGE 分析出现 1、5、6 条带(I、J 泳道), 说明单一条带的 DNA 片段在扩增时可能会扩增产生多条带的 DNA 片段。

2.3 PCR 反复循环扩增后的 DGGE 分析

鸡肠道微生物菌群 DNA 片段经 PCR-DGGE 分析, 条带 4、8 所代表的 DNA 片段经回收后, 反复循环扩增的产物分别经 DGGE 分析, 结果见图 2。

鸡肠道微生物菌群 DNA 片段经 PCR-DGGE 分析产生 9 条带(E 泳道), 将条带 4 代表的 DNA 片段经 PCR 扩增 1 次后, 扩增的产物 DGGE 分析结果显示 1、3、4 等 3 条带(图 2 C、D 泳道), 条带 4 代表的 DNA 片段经第 2 次 PCR 循环扩增后, 扩增的产物 DGGE 分析结果仍显示 1、3、4、5 及 10、11 等 6 条带(图 2 F、G 泳道); 将条带 8 代表的 DNA 片段经 PCR 扩增一次后, 扩增的产物经 DGGE 分析结果显示 1、3、4、6、8 等 5 条带(图 2 A、B 泳道), 经第 2 次 PCR 扩增、DGGE 分析仍出现 1、3、4、6、7、8 及 12 等 7 条带(图 2 H、I 泳道)。PCR-DGGE 分析显示的 DNA 条带回收后, 经 PCR 循环扩增, DGGE 分析时均显示多条带, 且扩增 1 次与循环扩增 2 次、3 次后的 DGGE 分析主要条带数及电泳迁移位置几乎相同, 且条带 4 和条带 8 经 PCR 循环扩增 2 次分别新出现条带 10、11 和条带 12, 条带 10、11、12 在原样品

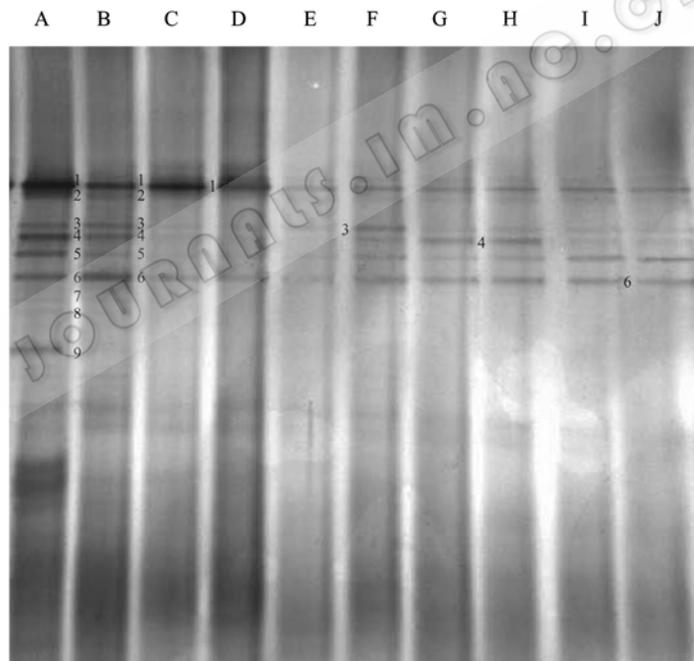


图 1 鸡肠道微生物菌群的 PCR-DGGE 分析

Fig. 1 PCR-DGGE analysis of microbe populations from chicken intestinal

注: 1-9: 不同条带; A-J: 不同样品。

A: 鸡肠道微生物菌群的 PCR-DGGE 分析; B: 鸡肠道微生物菌群第 1 次 PCR-DGGE 分析(A 泳道)的条带 6 的第 2 次 PCR-DGGE 分析; C、D: 鸡肠道微生物菌群第 2 次 PCR-DGGE 分析(B 泳道)的条带 1 的第 3 次 PCR-DGGE 分析; E、F: 鸡肠道微生物菌群第 2 次 PCR-DGGE 分析(B 泳道)的条带 3 的第 3 次 PCR-DGGE 分析; G、H: 鸡肠道微生物菌群第 2 次 PCR-DGGE 分析(B 泳道)的条带 4 的第 3 次 PCR-DGGE 分析; I、J: 鸡肠道微生物菌群第 2 次 PCR-DGGE 分析(B 泳道)的条带 6 的第 3 次 PCR-DGGE 分析。

Note: 1-9: Different bands; A-J: Different samples.

A: PCR-DGGE analysis of microbe populations from chicken intestinal; B: Second PCR-DGGE analysis of band 6 from the first PCR-DGGE analysis of microbe populations from chicken intestinal(A); C,D: Third PCR-DGGE analysis of band 1 from second PCR-DGGE analysis(B); E,F: Third PCR-DGGE analysis of band 3 from second PCR-DGGE analysis(B); G,H: Third PCR-DGGE analysis of band 4 from second PCR-DGGE analysis(B); I,J: Third PCR-DGGE analysis of band 6 from second PCR-DGGE analysis(B).

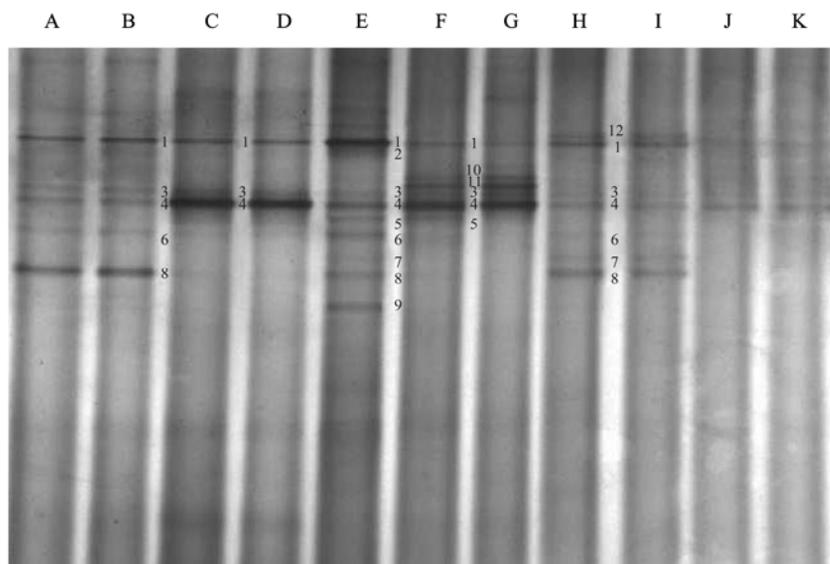


图2 PCR-DGGE 分析胶上 DNA 条带 4、8 回收后经循环 PCR 扩增后的 DGGE 分析

Fig. 2 PCR-DGGE analysis of PCR reamplification production of band 4,8 from PCR-DGGE analysis of microbe populations of chicken intestinal

注: 1-9: 不同条带; A-K: 不同样品; E: 鸡肠道微生物菌群的 PCR-DGGE 分析; C、D: PCR-DGGE 分析胶上条带 4 (E 泳道) 的一次 PCR 扩增后的 DGGE 分析; A、B: PCR-DGGE 分析胶上条带 8 (E 泳道) 的一次 PCR 扩增后的 DGGE 分析; F、G: PCR-DGGE 分析胶上条带 4 (E 泳道) 的二次 PCR 循环扩增后的 DGGE 分析; H、I: PCR-DGGE 分析胶上条带 8 (E 泳道) 的二次 PCR 循环扩增后的 DGGE 分析; J、K: PCR-DGGE 分析胶上条带 4 (E 泳道) 的三次 PCR 循环扩增后的 DGGE 分析。

Note: 1-9: Different bands; A-K: Different samples. E: PCR-DGGE analysis of microbe populations from chicken intestinal; C,D: PCR-DGGE analysis of one amplification production of DNA (band 4); A,B: PCR-DGGE analysis of one amplification production of DNA (band 8); F,G: PCR-DGGE analysis of two reamplification production of DNA (band 4); H,I: PCR-DGGE analysis of two reamplification production of DNA (band 8); J,K: PCR-DGGE analysis of three reamplification production of DNA (band 4).

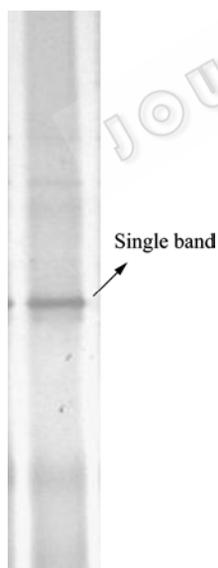


图3 大肠杆菌菌株 DNA 的 PCR-DGGE 分析

Fig. 3 PCR-DGGE analysis of DNA from *E. coli*

中及第 1 次扩增产物中并没有对应的条带。说明反复循环稀释模板 DNA 再扩增并不能减少多条带的产生, 相反随着多次循环扩增, 原样品中混杂的邻近条带的极微量 DNA 片段经多次 PCR 扩增而在

DGGE 分析时可能显示出来。

2.4 高保真酶扩增后的 DGGE 分析

鸡肠道微生物菌群的 PCR-DGGE 分析胶上的单一条带用高保真 *Taq* DNA 合成酶扩增产物, 分别用琼脂糖凝胶电泳和 DGGE 分析结果(图 4)。琼脂糖凝胶电泳结果(图 4A)显示, 回收 DNA 片段的 PCR 产物在 250 bp 左右有相同长度和亮度的单一条带, 但同样的产物在 DGGE 分析胶上(图 4B)就分成了几条不同的条带, 说明 DGGE 多条带的产生不是由于在 PCR 过程中碱基的错配造成的, 不同条带可能是由于回收 DNA 中本来就存在有不同的 DNA 片段, 经过 PCR 扩增的放大而显现出来。

2.5 特异性 DNA 片段的克隆、测序

鸡肠道菌群及菌株 DNA 片段的克隆质粒 PCR-DGGE 分析结果见图 5。结果显示, 将鸡肠道微生物菌群经 PCR-DGGE 分析胶上条带 C 的 DNA 片段回收、扩增、克隆、筛选, 随机挑取阳性克隆菌 13 个, 分别提取 13 个阳性菌的质粒 DNA 片段经 PCR 扩增后, 进行 DGGE 分析(图 5, 2-14 泳道)。结果显示, 条带 C 的 DNA 片段通过克隆, 第 2、3、6、

7、8、9、13 等 7 个克隆质粒 DNA 与原目的条带 C 的 DNA 在 DGGE 分析胶上处于同一位置, 表明这 7 个克隆质粒 DNA 代表条带 C 的 DNA; 而第 4、10、11 等 3 个克隆质粒的 DNA 与原目的条带 C 的 DNA 在 DGGE 分析胶上不处于同一位置, 表明这 3 个克隆质粒 DNA 不代表条带 C 的 DNA; 第 12、14 等 2 个阳性菌不含有克隆质粒 DNA。

选取第 2、6、9 阳性菌进行测序, 序列均为: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCG GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCT CTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAAC TGGCCTTTATTTGACGGTAATTAAGTAAAGTC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TA-3'。结果进一步证实在 DGGE 分析胶上与条带 C 处于相同位置的质粒 DNA 均代表同一种 DNA 序列。该序列在 GenBank (网址: [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 数据库中使用 BLAST 工具进行比对。如以上序列比对结果为: *Lactobacillus johnsonii* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 登录号: EF187257。

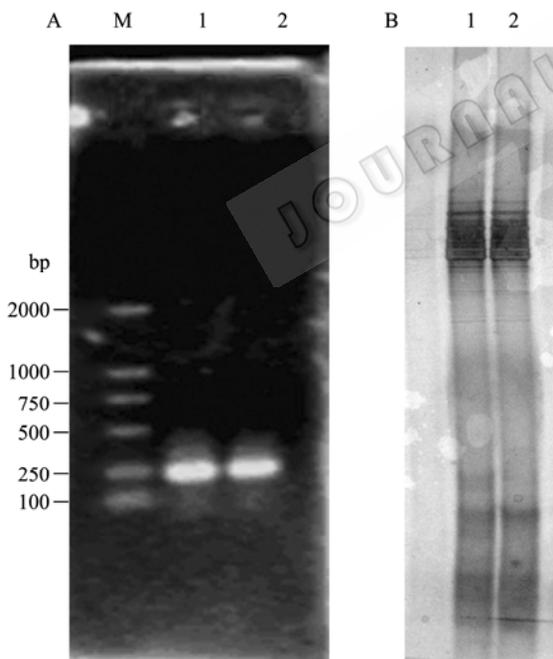


图 4 DGGE 分析胶上的单一条带 DNA 片段回收后用高保真酶扩增产物的 DGGE 分析

Fig. 4 Analysis of PCR amplification production with high-fidelity DNA polymerase of a single band from DGGE gel
注: A: 琼脂糖凝胶电泳; B: DGGE 分析; M: Marker; 1,2: PCR 扩增产物。

Note: A: Agarose gel electrophoresis; B: DGGE analysis; M: Marker; 1,2: PCR amplification production.

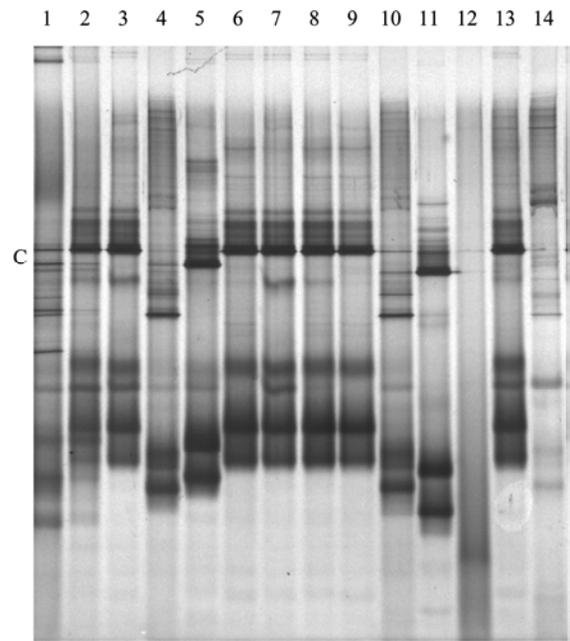


图 5 DGGE 分析胶上条带代表的 DNA 片段的克隆质粒的 PCR-DGGE 分析

Fig. 5 PCR-DGGE analysis of cloning protocol of DNA fragment represented by band from DGGE gel

注: 1: 鸡肠道微生物菌群 DNA 样品; 2-14: 分别代表 13 个阳性克隆质粒 DNA 样品。

Note: 1: Microbe population sample of chicken intestinal; 2-14: represented plasmid DNA fragment of 13 positive clone respectively.

3 讨论

运用 PCR-DGGE 技术分析微生物种群多样性已经得到广泛运用^[3-5], 但由于不同环境微生物菌群进行 PCR-DGGE 分析时, DNA 提取、纯化、PCR 扩增及 DGGE 分析最适条件有一定差异^[10-12], 均会影响 PCR-DGGE 分析结果。通过大肠杆菌菌株 DNA 的 PCR-DGGE 分析显示的单一条带, 表明本试验中采用的 PCR-DGGE 分析条件能保证 DNA 片段的扩增及 DGGE 分析。

鸡肠道微生物菌群总 DNA 提取后进行的第 1 次 PCR-DGGE 分析出现多条带, 表明鸡肠道中可能存在多种微生物菌群, 但切取该 DGGE 分析胶上的单一条带 DNA 片段回收后进行的第 2 次 PCR-DGGE 分析时, DGGE 分析胶上本应显示一条主条带, 却出现多条带, 以及再次进行 PCR-DGGE 分析, 仍然出现同样的多条带现象, 分析认为鸡肠道菌群经过第 1 次 PCR-DGGE 分析时, 切取 DGGE 分析胶上的单一条带实际上并不只有一种微生物菌株的 DNA 基因片段, 而是含有几种微生物菌株的

DNA 基因片段, 这与 Ercolini D^[6]和 Meroth CB^[13]推测 DGGE 分析中易出现不同序列的 DNA 存在共迁移的可能性相符。

PCR-DGGE 分析中出现的多条带主要出现在原目的条带邻近的条带或原样品中的优势条带, 且出现的多条带均对应于原样品中的相应条带, 并没有产生原样品中没有的新条带。如鸡肠道微生物菌群经 PCR-DGGE 分析出现的条带 6 (A 泳道)再次进行 PCR-DGGE 分析时, 产生的多条带均在原目的条带 6 的后面(B 泳道); 条带 6 (B 泳道)再次进行 PCR-DGGE 分析, 出现 1、5、6 条带, 其中条带 6 为目的条带, 条带 1 为原样品中的优势条带, 条带 5 邻近条带 6 (I、J 泳道)。根据 DGGE 分析的原理, 分析认为是目的条带相邻的条带解链区域组成相似, 导致本应处于后面的 DNA 片段有极少量未解链继续迁移至原条带前面的目的条带位置, 或者本应处于前面的 DNA 片段因解链减慢迁移至原条带的后面的目的条带位置, 这样导致目的条带中混杂有邻近条带的 DNA 基因片段, 经过 PCR 扩增放大, 在 DGGE 分析中显现出来。据 Yang CH^[14]报道 PCR 反复循环扩增可减少异源双链对 PCR 扩增的影响, 但 PCR 反复循环扩增和高保真酶扩增结果仍是目的条带前后有多条带出现, 说明 DGGE 分析胶上的多条带应该是在扩增之前的目的条带 DNA 中混杂有极微量的其他条带 DNA 片段, 也可能是在切取分析胶上的 DNA 片段时, 由于相邻条带 DNA 被切取混杂在目的条带中。

为了消除目的条带之外的多条带对 DNA 测序带来的误差, 应切取 DGGE 分析胶上的 DNA 片段, 用该 DNA 片段克隆, 将阳性克隆菌的质粒提取出来, 与该克隆菌的目的 DNA 片段进行 DGGE 分析, 选择 DGGE 分析胶上与原目的 DNA 片段处于相同位置的质粒进行测序, 从而保证 DNA 片段测序准确性。测序结果表明相同位置的克隆质粒 DNA, 序列是相同的, 说明了这种方法是切实可行的。这种质粒 PCR-DGGE 检测测序比 PCR 产物直接测序更准确, 也避免了 PCR 产物直接测序中需纯化 DNA 条带的繁琐, 以及因 DNA 不纯会影响到测序的准确性。相比之下在 PCR-DGGE 分析微生物种群研究中, PCR-DGGE 质粒测序法可直观筛选出需测序的阳性克隆, 提高测序的准确性。

PCR-DGGE 分析中多条带的出现可能是长时间电泳过程中先解链的条带继续迁移, 或者本应未解链的 DNA 条带因解链而迁移滞后到与目的条带同一位置, 从而目的条带所代表的 DNA 中混杂有少量其他 DNA 片段, 该目的条带 DNA 再次进行 PCR-DGGE 分析时, 显示出多条带, 多条带现象不易被消除。DGGE 分析胶上的 DNA 片段测序时, 将该 DNA 片段回收、PCR 扩增后克隆, 随机提取多个阳性克隆菌的质粒 DNA 片段, 分别与其分析胶上的原目的 DNA 片段进行 DGGE 分析, 选取与原目的 DNA 片段处于同一电泳位置的阳性克隆菌的质粒 DNA 进行测序, 提高测序的准确性。

参 考 文 献

- [1] Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 1979, **16**(1): 191-200.
- [2] Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [3] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(10): 5142-5150.
- [4] 李友发, 宋兵, 宋亚娜, 等. 福建省稻田土壤细菌群落的 16S rDNA-PCR-DGGE 分析. *微生物学通报*, 2008, **35**(11): 1715-1720.
- [5] Simpson JM, McCracken VJ, White BA, et al. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods*, 1999, **36**(3): 167-179.
- [6] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*, 2004, **56**(3): 297-314.
- [7] Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, et al. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol*, 2001, **42**(3): 199-202.
- [8] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol Lett*, 2001(23): 1205-1208.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指导. 北京: 科学出版社, 2003: 1727-1728.

- [10] 向少能, 陈琳, 何晓丽, 等. 水体微生物多样性PCR-DGGE分析方法的比较研究. 重庆工学院学报, 2007, **21**(13): 74-78.
- [11] 袁志辉, 蓝希钳, 杨廷, 等. 家蚕肠道细菌群体调查与分析. 微生物学报, 2006, **46**(2): 285-291.
- [12] 张苏, 刘春, 杨景亮, 等. 工业化废水处理反应器污泥总DNA提取方法. 微生物学通报, 2008, **35**(10): 1659-1663.
- [13] Meroth CB, Walter J, Hertel C, *et al.* Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(1): 475-482.
- [14] Yang CH, Crowley DE. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(1): 345-351.

2010年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-2)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网址	E-mail
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN	tongbao@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxxyj.cn	editor@rose.whioib.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	240	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
营养学报	6-22	双月刊	108	http://yyxx.chinajournal.net.cn	yyxx@chinajournal.net.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	Zwyczyxb2003@sina.com Zwyczyxb2003@163.com
中国农业科学 (中文版)	2-138	半月刊	1188	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国农业科学 (英文版)	2-851	月刊	432	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishsci.china.com	zgsckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	90	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwx	xbzw@chinajournal.net.cn