

# PCR-SSCP 技术在嗜盐放线菌链单孢菌属快速筛选中的应用

蔡 曼 职晓阳 吴晋元 唐蜀昆 李文均\*

(云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室 昆明 650091)

**摘 要:** 为提高嗜盐放线菌的研究效率, 快速、准确的从大量分离菌株中去除重复菌株、筛选出目的菌株, 在特异性引物快速定属的基础上, 以嗜盐放线菌链单孢菌属的 34 株菌株为研究对象, 采用与 PCR 相结合的单链构象多态性分析(PCR-SSCP), 扩增出 16S rRNA 基因中的两个高变区, 根据结果对 34 株菌株进行聚类分析, 并将其 16S rRNA 基因片段测序予以验证。结果表明, 聚类后 34 株菌株可大致分为 3 类, 且与 16S rRNA 基因片段分析结果一致。从而可快速去除重复菌株并反映出菌株间的系统进化关系。同时实验数据可构建文库, 使后续分离菌株的筛选工作只需比对数据即可完成, 利于提高工作效率, 降低实验成本。

**关键词:** PCR-SSCP, 链单孢菌属, 快速筛选

## Rapid Selection of Halophilic *Streptomonospora* Strains by PCR-SSCP

CAI Man ZHI Xiao-Yang WU Jin-Yuan TANG Shu-Kun LI Wen-Jun\*

(The Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

**Abstract:** To improve the efficiency of halophilic actinobacteria screening and carry out the rapid selection of targeted strains, we tested 34 strains of *Streptomonospora* by PCR-single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) based on genus-specific primers for the PCR identification. This approach employs PCR with two pairs of primers located in the 16S rRNA sequence flanking two variable region, then build clustering tree according as SSCP data. Synchronously, we sequenced all the 16S rRNA partial sequences for these strains to verify them. The results showed that the PCR-SSCP analysis was an efficient, easy-to-handle and economic method for rapid selection of halophilic actinobacteria resources.

**Keywords:** PCR-SSCP, *Streptomonospora*, Rapid selection

随着对极端环境放线菌资源的不断重视, 寻找嗜盐放线菌新物种的方法也不断创新, 这使得放线

菌分类工作者在短时间内得到大批分离菌株成为现实。然而面对大量形态相似的极端环境放线菌, 快

基金项目: 国家“973 项目”(No. 2004CB719601); 国家自然科学基金(No. 30600001); 教育部科学技术研究重点项目(No. 206139); 教育部新世纪优秀人才支持计划和云南省自然科学基金(No. 2007C167M)

\* 通讯作者: Tel: 0871-5033335; ✉ wjli@ynu.edu.cn, liaact@hotmail.com

收稿日期: 2008-02-09; 接受日期: 2008-04-08

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

速从中筛选出目的菌株就成为后续研究工作的瓶颈。聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)在 1989 年作为一种快速、灵敏的筛选点突变和反映基因多态性的方法被提出<sup>[1]</sup>。此方法主要基于 DNA 单链上碱基及碱基顺序的不同来检测差异性。近些年它得到了不断完善和发展,目前已经成为临床上快速检测细菌抗药性突变和环境微生物中研究微生物群落多样性的重要手段。本实验利用属的特异性引物从大量分离菌株中筛选出嗜盐放线菌链单孢菌属菌株,并首次将 PCR-SSCP 技术运用于放线菌属内菌株的去重复工作中,不仅可以高效、节省的去除重复菌株,而且通过聚类分析在无序列的情况下即可基本反映出菌株间的系统进化关系。同时将每次分离菌株的 SSCP 图谱条带信息构建库,可使后续分离筛选工作只需与库内数据对比即可去除重复菌株,也能体现出分离结果的多样性,从而进一步指导分离方法的改善。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株

实验所用全部菌株由本实验室从新疆、青海和埃及的盐碱环境土壤中分离得到。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

参照 Li 等<sup>[2]</sup>描述的方法提取。

### 1.3 链单孢菌属菌株的快速筛选

参照 Zhi 等<sup>[3]</sup>描述的方法完成。

### 1.4 PCR-SSCP 实验

**1.4.1 引物的选择及 PCR 扩增:** PCR 扩增采用两对细菌的通用引物<sup>[4]</sup>, P13P(5'-AGGCCCGGGAACGTATTCAC), P11P(5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGT); ER10(5'-GGCGGACGGGTGAGTAA), ER11(5'-ACTGCTGCCTCCCGTAG)。其扩增片段为 216 bp 和 255 bp,分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 V6 和 V2 区,由上海生工生物工程有限公司合成。

扩增条件:95℃ 4 min;加 Taq 酶后 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环;72℃ 后 5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶检测后用纯化试剂盒(上海生工生物工程有限公司)切胶纯化。

**1.4.2 SSCP 分析:** PCR 产物与 3 倍上样缓冲液(二甲苯氰 0.006 g, 溴酚蓝 0.01 g, 0.5 mol/L EDTA 0.8 mL, 甲酰胺至 20 mL)混合, 99℃ 变性 10 min

后立即冰浴 10 min。处理产物上样于 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 1×TBE, 4℃, 200V, 2 h 40 min。

电泳结束后,参照 Bassam 等<sup>[5]</sup>描述的方法进行银染。获得的 SSCP 图谱用凝胶成像分析软件记录,然后使用 NTSYSpc 2.1 软件构建菌株间的聚类树。全程仅需 6 h。

### 1.5 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增及系统发育分析

**1.5.1 PCR 扩增及产物测序:** 参照李文均等<sup>[6]</sup>描述的方法扩增并对 16S rRNA 基因部分序列测序,测序由上海生工生物工程有限公司协助完成。

**1.5.2 系统进化树的构建及分析:** 将测序结果用 CLUSTAL X<sup>[7]</sup> 软件进行多序列比对并计算菌株之间的序列相似性,采用邻接法<sup>[8]</sup>,用 MEGA 3.1<sup>[9]</sup> 构建出菌株间的系统发育树。

## 2 结果

经属的特异性引物对全部分离菌株的扩增检测,共筛选出 34 株嗜盐放线菌链单孢菌属菌株。

### 2.1 SSCP 图谱

34 株菌纯化后的 PCR 产物经变性、冰浴得到单链,其在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。部分结果如图 1 和图 2 所示。结果证实,两对引物扩出的两条不同片段经变性后均产生单链条带。且从图 1 可以看出:YIM 90586、YIM 90593 和 YIM 91353 条带一致,YIM 92066、YIM 92086 和 YIM 91439 条带一致,同时 YIM 91424 和 YIM 91498 的电泳结果也较为相似。从图 2 可以明显看出:YIM 90494 和 YIM 91394 条带一致,YIM 92082、YIM 90577 和 YIM 91353 条带一致,其他菌株则各有差异。

90586 90593 92086 91424 91498 91439 92066 91353(M)

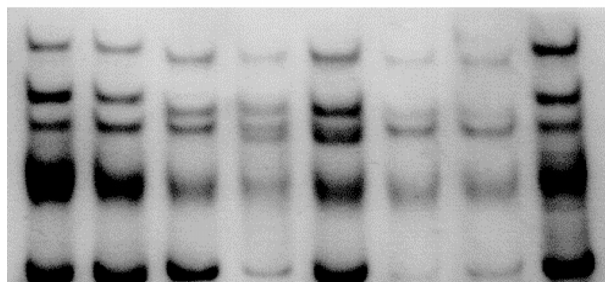


图 1 8 株菌的 SSCP 图谱

Fig. 1 SSCP profile of eight strains

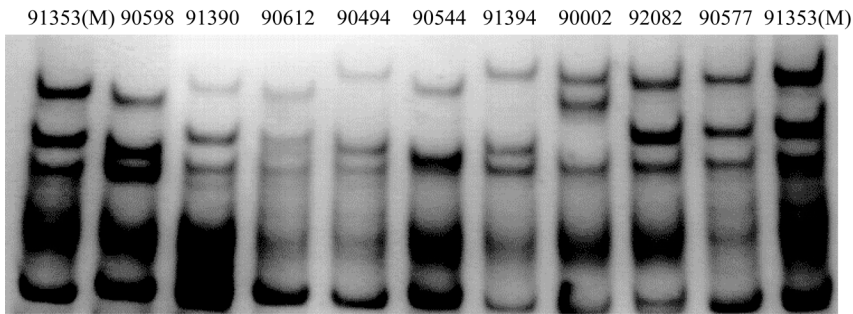


图 2 10 株菌的 SSCP 图谱  
Fig. 2 SSCP profile of ten strains

2.2 菌株聚类分析

为了更直观的反映出 34 株链单孢菌属菌株之间的关系, 我们将凝胶中的条带信息转换为数据信息, 利用 NTSYSpc 2.1 软件通过 UPGMA 分析得到了以上菌株的聚类树(图 3)。聚类树上, 34 株菌在标尺处大致分为 3 支。在系数 1.00 处聚在一起的菌株其图谱条带是完全一致的, 因此可以视为重复菌株, 这样在去除重复菌株后研究范围即可缩小 55%。

2.3 基于 16S rRNA 基因片段序列的系统发育分析

用引物 PA 对 34 株链单孢菌属菌株 16S rRNA 基因片段测序后, 我们根据邻接法用 MEGA 3.1 构建了系统发育树(图 4)。很明显, 34 株菌也大致分为 3 支。第一支上有 12 株, 以 YIM 90577、YIM 90562 等 6 株菌的关系最近。第二支上有 7 株菌, 以

YIM 91398、YIM 90608 及 YIM 90566 关系最近。而第三支是最大一支有 15 株菌, 以 YIM 91424、YIM 90598 等 9 株菌关系最近。此结果与聚类分析一致。

2.4 序列登录号(Accession number)

本次研究所得序列的 GenBank 登录号为: EU442550-EU442566。

3 讨论

根据 SSCP 图谱条带信息构建的聚类树与基于 16S rRNA 基因片段构建的系统发育树表达出了较为一致的信息。聚类树第一分支中的 9 株菌在系统发育树中也完全聚在一支上, 同时与其他 8 株菌聚类关系较远的菌株 YIM 90002 在系统发育树上也表现出了与其余菌株较远的亲缘关系。同样, 聚类树

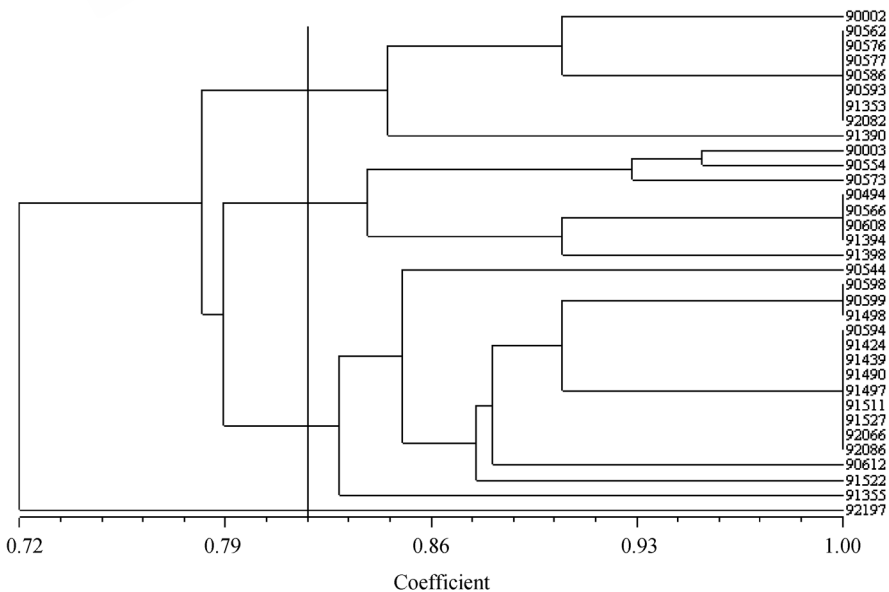


图 3 34 株菌株的聚类树  
Fig. 3 The clustering tree polt of 34 strains

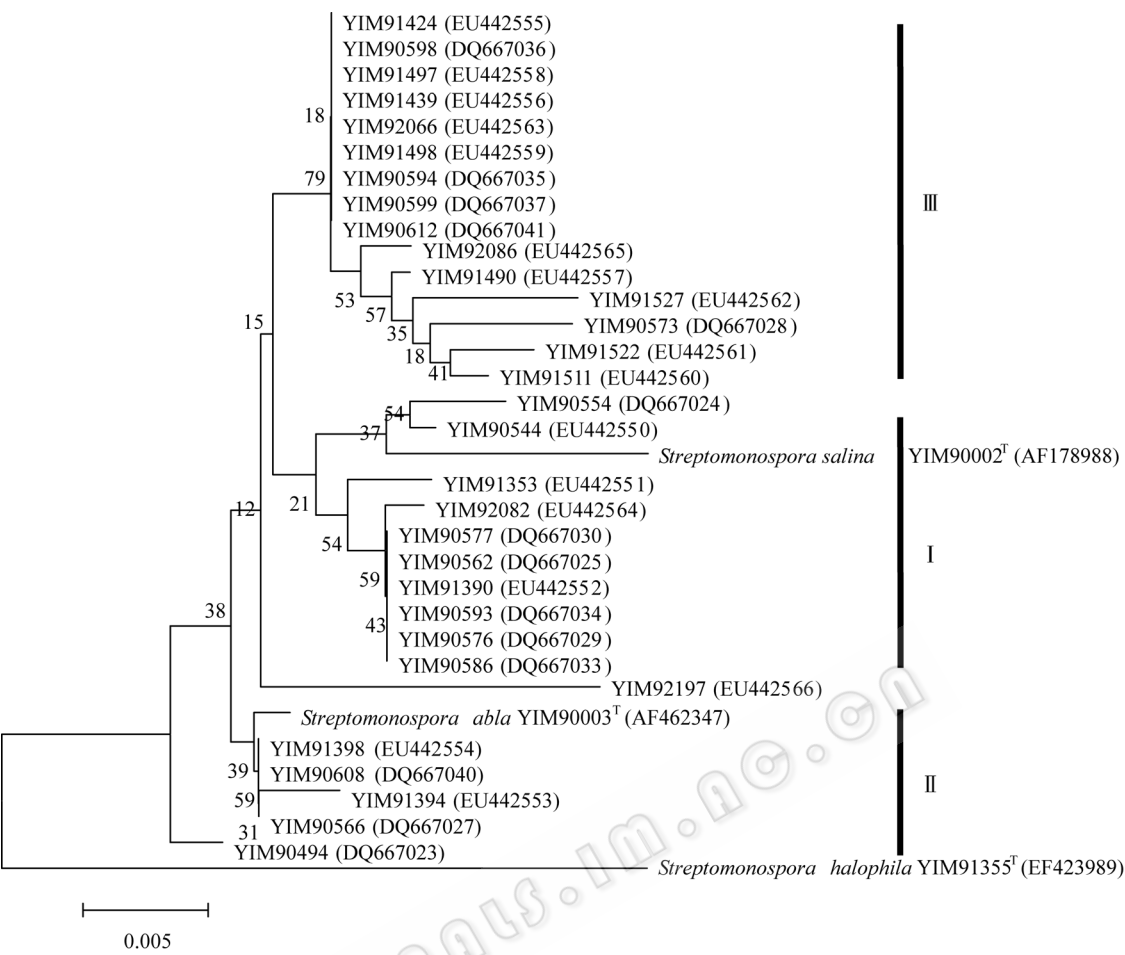


图 4 34 株链单孢菌属菌株基于 16S rRNA 基因片段序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of 34 strains of *Streptomonospora* based on 16S rRNA gene partial sequences. Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbour-joining analysis of 1000 resampled datasets

第二、第三分支中的菌株在系统发育树上也分别聚为两大支。此结果表明, 仅通过 PCR-SSCP 得到的菌株条带信息即可正确的反映出菌株间的大致进化关系。在此基础上, 根据聚类树上系数 1.00 处的标尺我们还可以把重复菌株去除, 快速筛选出后续实验的目的菌株。

但两树中也有差异存在。如在聚类树第一分支中YIM 91353 和YIM 92082 与另 5 株菌在系数 1.00 处聚为一支, 他们的SSCP图谱条带是一样的, 但在基于 16S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树中这两株菌表现出了差异性。这是由于SSCP技术本身也存在局限性, 当电泳片段大小在 200 bp以内时该技术的差异检出率可在 90%以上, 随着片段增大表现差异的正确率就降低<sup>[10]</sup>。本PCR-SSCP实验中的扩增片段即为 16S rRNA基因中的两小段, 分别为 216

bp和 255 bp, 且其承载的信息量有限, 因此会与用相对较完整的 16S rRNA基因片段序列构建的系统发育树有不同。这一点同时也说明PCR-SSCP实验中引物的选择与设计是至关重要的。我们也可以看到, 系统发育树中进化关系较近的YIM 90554 和YIM 90544 在聚类分析树中却相距很远。这两株菌与YIM 90577 等同枝菌株的建树序列在相同位置有 3 个碱基的差异, YIM 90544 又单独存在一个差异, 因此表现出了系统发育树上的关系。但SSCP图谱条带的差异不仅与序列差异的多少有关也与差异的位点有关, 与此同时构建聚类树和系统发育树的软件算法不同, 所以差异的存在是正常的。

总之, 毋庸置疑, PCR-SSCP 技术可以高效、准确、简单的进行属内菌株去重复, 反映菌株间的大致进化关系, 从而实现快速筛选目的菌株, 提高了

工作效率,降低了实验成本。面对目前高度信息化的生物技术时代,将每次分离菌株的 PCR-SSCP 图谱条带信息收集建库,使后续分离筛选工作只需与库内数据比对即可去除重复菌株,也能体现出分离结果的多样性,从而进一步指导分离方法的改善。这对于大幅提高基础资源研究者的工作效率也是极有帮助的。

## 参 考 文 献

- [1] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and dna polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, **5**: 874–879.
- [2] Li W J, Xu P, Schumann P, *et al.* *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China) and emended description of the genus *Georgenia*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**: 1424–1428.
- [3] Zhi XY, Tang SK, Li WJ, *et al.* New genus-specific primers for the PCR identification of novel isolates of the genus *Streptomonospora*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **263**: 48–53.
- [4] Widjoatmodjo MN, Fluit ADC, Verhoef J. Rapid identification of bacteria by pcr-single-strand conformation polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, **32**: 3002–3007.
- [5] Bassam BJ, Caetano Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, **196**: 80–83.
- [6] 李文均, 唐蜀昆, 王 栋, 等. 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究. *微生物学报*, 2004, **44**: 1–7.
- [7] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4876–4882.
- [8] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1978, **4**: 406–425.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, **5**: 150–163.
- [10] Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl*, 1992, **9**: 73–79.

## 稿件书写规范

### 高等院校教学栏目简介及撰稿要求

“高等院校教学”是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为高等院校教师开辟,是生物学教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师讲堂”版块。旨在通过推广名家的教学经验,帮助青年教师尽快成长,进一步提高教学质量。欢迎获得国家级“名师奖”或教育部“精品课程”等奖项的专家教授们积极撰稿,将你们在教学领域获得的经验和成功体会通过这个栏目展示出来。对于入选“名师讲堂”版块的文章,本刊将开辟快速审稿通道,优先发表,并免收审理费和版面费,支付优厚的稿酬。刊发时还将在正文前附作者简介和大幅彩照,以鼓励和褒奖教学名家不吝赐稿,让所有的读者分享他们的经验和心得。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!