

长寿老人体内分离的鼠李糖乳杆菌 RAPD 体系优化研究

顾瑞霞¹, 蔡敬敬¹, 王 琴², 杨振泉¹, 任远庆²

(1. 扬州大学乳品研究所, 江苏 扬州

225001; 2. 克拉玛依农牧科学技术研究所, 新疆 克拉玛依

834000)

摘 要: 采用 CTAB 改良法提取 11 株鼠李糖乳杆菌的基因组 DNA, 对其完整性进行了测定, 并以此为模板进行 RAPD 反应。优化的 RAPD 反应体系为: 模板 50 ng, Taq 酶 2 U, dNTPs 3.25 mmol/L, 随机引物 5 mmol/L, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl, Mg²⁺ 7.5 mmol/L, 反应总体积为 25 μl; PCR 扩增参数: 93℃ 2 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min 1 次循环; 93℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 40 次循环; 93℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 10 min 1 次循环。

关键词: 鼠李糖乳杆菌; RAPD; 优化

Study on *Lactobacillus rhamnosus* RAPD System Optimization from Macrobian

GU Rui-xia¹, CAI Jing-jing¹, WANG Qin², YANG Zhen-quan¹, REN Yuan-qing²

(1. Institute of Dairy Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

2. Institute of Agriculture and Farming Science and Technology of Kelamayi, Kelamayi 834000, China)

Abstract: An improved DNA extraction protocol with CTAB was developed for *Lactobacillus rhamnosus*. DNA was extracted successfully from the samples of 11 strains and was suitable for RAPD analysis. The optimization of a 25 μl RAPD was determined as followed: template 50 ng, 2 U TaqDNA polymerase, 3.25 mmol/L dNTPs for each, 5 mmol/L primer, 2.5 μl 10×PCR buffer, and 7.5 mmol/L Mg²⁺. The reaction program was devised for one cycle at 93 °C 2 minutes, 36 °C 1 minutes, 72 °C 2 minutes, which is followed by 40 cycles, each 1 minutes at 93 °C, 1 minute at 36 °C, 2 minutes at 72 °C, and a final extension at 93 °C 2 minutes, 36 °C 1 minutes, 72 °C 10 minutes.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*; RAPD; optimization

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0268-04

鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)是一种性能优良的益生菌,它有调节微生态平衡,增强宿主肠道抵抗力,预防和治疗腹泻,消除过敏的功能。它可用于各种食品,保健食品和微生态制品或药品,其应用前景广泛。传统的 *Lactobacillus rhamnosus* 分类鉴定方法建立在表型和生理生化特征的基础上,难以区别鼠李糖乳杆菌种内间的差异^[1]。随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术是近几年来应用甚广的一种分子遗传标记技术^[2],它能准确、快速、定性的检测不同种间乃至不同菌株之间存在的差异,从而分离鉴定乳酸菌。目前在种属特异性鉴定及基因水平种内分型与亚分型中已得到高度重视和广泛应用^[3]。

由于 RAPD 稳定性不甚理想,提取鼠李糖乳杆菌

DNA 的方法以及反应体系的优劣,直接影响着 RAPD 扩增结果。因此,必须对反应条件进行筛选优化,以提高反应结果的稳定程度,最大限度地降低其随机性。本研究对从广西巴马和新疆和田地区长寿老人体内分离筛选鼠李糖乳杆菌提取 DNA 方法的进行探讨,同时对鼠李糖乳杆菌 RAPD 反应中的 DNA 模板浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、Taq 酶用量等因素对 RAPD 结果的影响进行了比较,建立稳定性好、重复性高的 RAPD 反应体系,为进一步分析鼠李糖乳杆菌遗传多样性打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及引物

10 株鼠李糖乳杆菌 LV108、R18、F、R02、R20、

收稿日期: 2007-02-08

基金项目: 江苏省“六大高峰人才计划”(06-B-42); 新疆克拉玛依市农业科技重点项目(SK2006-2)

作者简介: 顾瑞霞(1955-),男,教授,博士,研究方向为乳品科学。E-mail: rxgu@yzu.edu.cn

R26、R04、R13、LV01、LV02 由扬州大学乳品研究所从广西、新疆 90 岁以上长寿老人粪便中分离获得, 1 株鼠李糖乳杆菌菌株 R03(ATCC7469) 购于中国微生物菌种保藏中心。将 11 株鼠李糖乳杆菌菌种接种于脱脂乳培养基中, 37℃、培养 24h, 活化培养 2~3 代保存备用; 实验中所用的引物由上海生物工程公司合成。

1.2 基因组 DNA 的提取

对传统酚/氯仿/异戊醇提取 DNA 方法^[4]进行改进, 在酚:氯仿:异戊醇抽提前加入 1.2mol/L NaCl 和 10%(W/V) CTAB 提高破壁效果。鼠李糖乳杆菌菌株经上述方法提取后的基因组 DNA, 经紫外分光光度计检测后, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.80~1.90, DNA 总量为 15~20 μg, 取 10 μl 经 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.3 RAPD 反应条件的研究^[4-5]

1.3.1 单因素选择

选取模板浓度、引物浓度、Taq 酶浓度、dNTPs 浓度作为研究对象, 研究单因素对 RAPD 扩增反应的影响。反应体系为: 鼠李糖乳杆菌 LV108 DNA 4ng/μl, 引物 OPG26(5'-ACGCGACAGA-3') 为 1pmol/μl, 10×PCR 缓冲液 2.5μl/μl, 25mmol/L Mg²⁺ 3.0μl/μl, 0.04U/μl Tag 酶, 0.15mmol/μl dNTP, 反应体系为 25μl。

1.3.2 RAPD 反应条件的优化

选取模板浓度、引物浓度、Taq 酶浓度、dNTPs 浓度作为四个因素, 每个因素各取三个水平正交试验安排如表 1。除上述四种成分以外每个反应管加入 2.5μl 10×缓冲液并补双蒸水至总反应体积为 25μl。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平	模板 (50ng/μl)	引物 (5pmol/μl)	Taq 酶 (5U/μl)	dNTPs (2.5mmol/L)
1	1	0.5	0.2	0.5
2	1.5	1	0.3	1
3	2	1.5	0.4	1.5

1.3.3 不同的扩增循环参数

为了研究不同的扩增循环参数对 RAPD 的影响, 使用同一菌株采用 3 种不同引物(P5:5'-AATCGGGCTG-3', P6:5'-AGGCATCGTG-3', P7: 5'-CTACGCTCAC-3') 分别用 3 种扩增程序(表 2) 进行 PCR 扩增。

1.3.4 不同反应体积

取反应体系分别为 25、50、75μl, 研究不同反应体积对 RAPD 扩增的影响, 确定最适的反应体积。

2 结果与分析

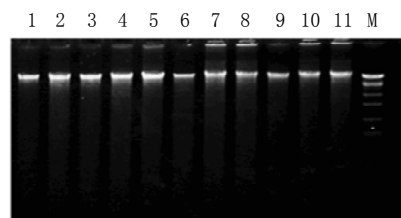
2.1 基因组 DNA 提取

11 株鼠李糖乳杆菌菌株经上述方法提取后的基因组

表 2 PCR 扩增程序
Table 2 PCR reaction program

序号	扩增程序
A	93℃ 2 min; 34℃ 1min, 72℃ 2min, 1 次循环; 93℃ 1min, 34℃ 1min, 72℃ 10min 1次循环
B	93℃ 2 min; 36℃ 1min, 72℃ 2min, 1 次循环; 93℃ 1min, 36℃ 1min, 72℃ 2min, 1 次循环
C	93℃ 2 min; 38℃ 1min, 72℃ 2min, 1 次循环; 93℃ 1min, 38℃ 1min, 72℃ 10min 1次循环

DNA, 经紫外分光光度计检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.80~1.90, DNA 总量为 15~20 μg, 取 10 μl 经 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 其结果如图 1 所示。



M. DNA 分子标准 λ-EcoT14 I digest; 1. 鼠李糖乳杆菌标准株 R03; 2. 鼠李糖乳杆菌标准株 R18; 3. 鼠李糖乳杆菌分离株 LV108; 4. 鼠李糖乳杆菌分离株 F; 5. 鼠李糖乳杆菌分离株 R02; 6. 鼠李糖乳杆菌分离株 R20; 7. 鼠李糖乳杆菌分离株 R26; 8. 鼠李糖乳杆菌分离株 R04; 9. 鼠李糖乳杆菌分离株 R13; 10. 鼠李糖乳杆菌 LV01; 11. 鼠李糖乳杆菌 LV02。

图 1 鼠李糖乳杆菌的基因组 DNA
Fig.1 Genomic DNA of *Lactobacillus rhamnosus*

由图 1 可以看出, 电泳分析能够显示单一清晰的条带, 主带清晰, 分子量大, 完整性好, 集中在靠近点样孔处呈单一强亮带, 未见降解, 表明 DNA 浓度与纯度以及完整性符合 RAPD 技术要求。

2.2 RAPD 的反应条件研究

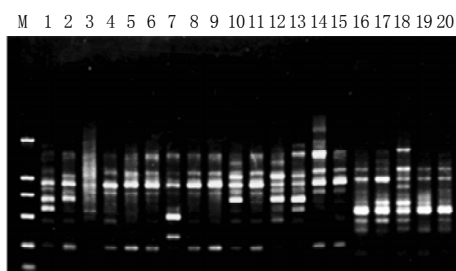
2.2.1 单因素选择

分别研究了模板浓度、引物浓度、Taq 酶浓度、dNTPs 浓度各单因素对 RAPD 扩增反应的影响, 结果如图 2 所示。

由图 2 显示, 模板和 Taq 酶浓度对 RAPD 反应结果的影响较大, 引物和 dNTPs 浓度影响不大。确定了比较理想的单因素组分含量分别为: 模板 50ng/μl 1.5μl, 5pmol/μl 随机引物 1μl, Taq 酶 5U/μl 0.3μl, 2.5μmol/L dNTPs 1μl。

2.2.2 RAPD 反应条件的优化

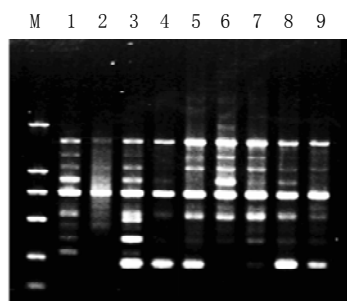
根据以上获得的单因素组分含量设计四因素三水平正交试验分别进行扩增。由图 3 可以看出, 3 号泳道对应的扩增条件产生的电泳图谱条带清晰、多态性明显, 背景小且强弱分明而其他泳道所对应的扩增条件达不到上



M. DNA marker DL2000; 1~5号. 模板(50ng/ μ l)浓度分别为: 1、1.2、1.5、2.0、2.5 μ l; 6~10号. 引物(5pmol/ μ l)浓度分别为: 0.2、0.5、0.8、1.1、1.4 μ l; 11~15号. Taq酶(5U/ μ l)浓度分别为: 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μ l; 16~20号. 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μ l。

图2 单因素对 RAPD 的扩增反应

Fig.2 PCR profile reaction of single factor



M. DNA marker DL2000; 1~9. 对应表2。

图3 四因素三水平正交试验扩增产物电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis profile of 9 tests in $L_9(3^4)$ orthogonal test design

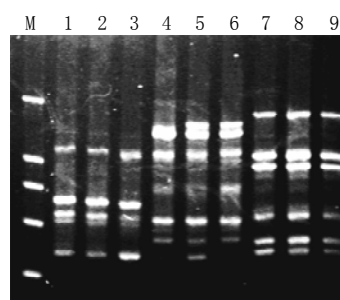
述理想的电泳谱带。因此,通过正交试验可以确定比较理想的扩增体系的组分含量为:模板 50ng/ μ l 1.0 μ l, $10 \times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, 25mmol/L Mg^{2+} 3.0 μ l, Taq 酶 2U, 2.5 μ mol/L dNTPs 1.5 μ l, 5pmol/ μ l 随机引物 1 μ l, 反应总体积为 25 μ l。

2.2.3 不同扩增循环参数对 RAPD 扩增的影响

在 RAPD 的扩增程序中,退火温度较为重要,本实验设置 34、36 和 38 $^{\circ}$ C 三个退火温度,扩增结果如图 4 所示。

由图 4 结果显示可见,不同引物间有一定的差异,可能是由于其碱基组成不同所致。P5 引物在 34 $^{\circ}$ C 和 36 $^{\circ}$ C 退火时无明显的差异,但 P6 和 P7 引物在 34 $^{\circ}$ C 退火时条带的清晰度明显要比 36 $^{\circ}$ C 时差,背景比较模糊,可能是由于退火温度的偏低导致的非特异性扩增所引起。而在 38 $^{\circ}$ C 退火时 P5 引物的扩增产物中,在 1500、1400 和 200bp 左右的两条带出现了缺失, P6 引物在 1500bp 和 750bp 左右的带也出现了缺失, P7 引物则有一条 1800bp 左右的条带出现了缺失,同时条带的亮度也略微减弱,可能是由于退火温度偏高,不利于引物和模板 DNA 的结合所致。由此看来,退火温度设为 36 $^{\circ}$ C 较为合适。

2.2.4 不同反应体积对 RAPD 扩增的影响

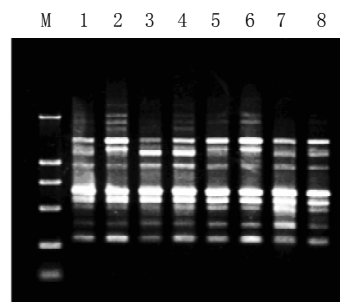


M. DNA marker DL2000; 1~3. 引物 P5; 4~6. 引物 P6; 7~9. 引物 P7。1、4、7 为扩增程序 A; 2、5、8 为扩增程序 B; 3、6、9 为扩增程序 C。

图4 不同扩增程序的 RAPD 扩增产物的电泳图谱

Fig.4 Comparison of RAPD results of different amplified procedures

为了研究不同反应体积对 RAPD 扩增的影响,取反应体积分别为 25、50、75 μ l,其结果如图 5 所示。



M. DNA marker DL2000; 1~3. 25 μ l 体系; 4~6. 50 μ l 体系; 7、8. 75 μ l 体系。

图5 不同反应体积的 RAPD 扩增产物的电泳图谱

Fig.5 Comparison of RAPD results of different amplified volume

由图 5 可以看出相同的反应条件下,不同的反应体积对 RAPD 的扩增效果基本相同,没有明显的影响,说明在一定范围内 RAPD 扩增结果与反应体积关系不大,从扩增效果和节约成本两方面考虑,故选择 25 μ l 的反应体系。

3 讨论

RAPD 是建立在 PCR 技术之上的分子标记技术,尽管 RAPD 对 DNA 模板质量的要求不高,但高质量的 DNA 是试验稳定可靠的保证。本研究通过对煮沸法、研磨法(基因组图未显示)和改进的酚/氯仿/异戊醇法进行比较发现利用加入 CTAB 提取的 DNA 纯度高而且完整性好,经 PCR 扩增产生的 DNA 条带清晰度高,效果好。而其他方法提取的 DNA 浓度较低或者有很亮的拖尾, DNA 浓度较低可能原因是因为鼠李糖乳杆菌细胞壁多糖层较厚,热裂解作用对其破壁不充分,只有小部分鼠李糖乳杆菌释放出 DNA;很亮的拖尾可能是由于 DNA 受到挤压和研磨等机械力的共同作用而使 DNA 出现断

裂。因此,选择加入CTAB的酚/氯仿/异戊醇法提取DNA。

在RAPD标记应用中人们关注RAPD标记的核心是它的可重复性问题,其次是扩增产物量的问题,这两个问题都会影响分析的准确性。由于众多因素的影响和现有技术上的不完善,对以上两方面都会产生影响,然而RAPD标记的确具有潜在的应用可能性。因此本研究从各组分浓度、变性、复性和扩增的温度、时间以及循环的次数等对鼠李糖乳杆菌RAPD扩增条件进行了优化,得出较为理想的RAPD反应体系和扩增程序。

参考文献:

- [1] TILSALA-TIMISJARVI A, ALATOSAVA T. Strain-specific identification of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with randomly amplified polymorphic DNA-derived PCR primers[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(12): 4816-4819.
- [2] RICHARD B, GROISILLIER A, BADET C, et al. Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a specific probe[J]. Res in Microbiol, 2001, 152(2): 157-165.
- [3] TORRIANI S, FELIS G E, DELLAGLIO F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8): 3450-3454.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992: 672-674; 304-308; 22-23; 681-683; 309-313.
- [5] VOGEL R F, EHLMANN M S, GANZLE M G. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sour-dough ecosystem[J]. Anton Van Leeuw, 2002, 81(1-4): 631-638.