

变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解

王小芬¹ 王伟东² 高丽娟¹ 崔宗均¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094;

2. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要 结合笔者等多年积累的经验详细介绍环境微生物学研究中变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术应用全步骤:从环境样品中直接提取总DNA,利用5'端含GC夹子的引物PCR 16S rDNA的部分片段,将PCR产物在含有浓度线性递增的变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分析,使不同来源的DNA片段在电泳胶中分离,从胶中切出分离的DNA片段测定碱基序列,进行分类分析。PCR-DGGE技术能够检测不可培养的微生物基因,而DGGE技术与克隆等其他技术结合更能发挥其分离作用。

关键词 环境微生物;变性梯度凝胶电泳;聚合酶链式反应;方法详解;酒精沉淀法;细菌

中图分类号 Q-33

文章编号 1007-4333(2006)05-0001-07

文献标识码 A

Protocols of application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in studies of environmental microorganism

Wang Xiaofen¹, Wang Weidong², Gao Lijuan¹, Cui Zongjun¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Biological Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University; Daqing 163319, China)

Abstract The aim is to introduce detailed procedures for the application denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in the study of environmental microorganisms based on our current experience in molecular ecology. The procedure for DGGE includes: Extracting DNA directly from environmental samples; PCR in the region of 16S rDNA using a primer with GC clamp in 5'; analyzing the PCR products in a polyacrylamide gel with a chemical denaturing gradient which could separate the different DNA fragments and then extracting bands from the gel and performing sequencing and phylogenetic analysis. PCR-DGGE could detect the gene of unculturable microorganisms, and the combination of DGGE with clone library and other molecular techniques is more appropriate to exert its predominance in separating DNA.

Key words environmental microorganism; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); PCR; protocol; ethanol precipitation methods; bacteria

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术应用于微生物生态学已经历10多年,它对各种环境中的微生物群体研究起到了重要作用。DGGE是应用于染色体DNA点变异检测的方法。1992年荷兰科学家Gerard Muyzer在西班牙召开的第6次微生物生态学会议上,首次介绍了DGGE技术在微生物生态学研究上应用的可能性^[1],1993年Muyzer等便首先在Applied and

Environmental Microbiology上发表DGGE方法在微生物生态研究上的应用^[2]。之后,DGGE及温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)技术^[3]便在微生物生态学领域迅速发展。

目前,DGGE技术广泛应用于土壤^[4]、水体^[5]、发酵食品^[6]等环境微生物群体多样性的研究和微生物群体动态的追踪研究上,并与其他分子生态学

收稿日期:2006-05-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571088)

作者简介:王小芬,讲师;崔宗均,教授,通讯作者,主要从事环境微生物与生物质利用研究,E-mail: acuijz@cau.edu.cn

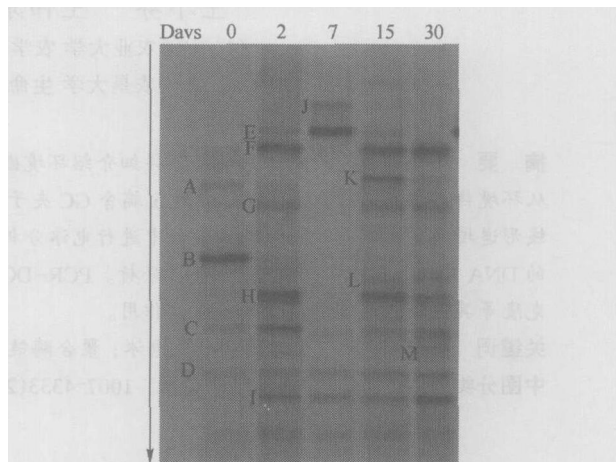
技术结合,将微生物生态学、尤其是环境微生物学的研究引入了新的阶段。目前 DGGE 技术也迅速在国内推开,但还未见详细介绍这项技术的中文文献。因此,本文结合笔者等多年来与东京大学合作研究中积累的经验系统地介绍环境微生物学研究中 DGGE 技术应用的全步骤,为更多的研究人员掌握该技术提供参考。

1 DGGE 技术的原理及应用领域

该技术的主要原理是:在含有浓度线性递增的变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的聚丙烯酰胺凝胶电泳中,可将长度相同的双链 DNA 因其碱基排列的不同而分离^[7]。将以带 GC 夹子(G和C碱基集中的序列)的引物扩增的 PCR 产物在由上(正极)向下(负极)DNA 变性剂浓度递增的垂直电泳胶上泳动,随着 DNA 变性剂浓度的递增,双链 DNA 间的氢键被断裂,双螺旋结构解链成单链,但 GC 堆积部分氢键坚固,仍然保持双链结构,于是部分变性的 DNA 分子成为向 3 方延伸的形状。这种形状的 DNA 分子的电泳迁移率大大降低,具有同样碱基序列的 DNA 集中在一处形成条带,而序列不同的 DNA 分子由于 A-T、G-C 间的氢键数量和排列不同,在不同的变性剂浓度下解链,亦即在不同的位置形成条带;从而将长度相同而序列不同的 DNA 片段在胶上分离。

在自然界的不同环境中,如土壤、农田、河川、海洋、污水、堆肥、发酵食品(饲料)、动物消化道等生息着各种微生物,它们对氧气、酸碱度、营养等环境条件的要求各不相同,之间有着复杂的关系;因此用传统的分离培养技术研究这些生境中微生物种类和群体动态,可培养的范围局限性很大,甚至认为目前人类可培养的微生物种类不到自然界微生物的 1%^[8]。近年分子生物学技术应用到微生物生态的研究中,对复杂环境中微生物的种类和群体动态的认识取得了突破性的进展。PCR-DGGE 技术也是其中之一,它可直接从环境中提取 DNA,用 PCR 扩增微生物的指纹基因片段,根据其碱基序列的不同而分离;因此可不经培养,从微量环境微生物样品的 DNA 检测微生物种类。PCR-DGGE 技术可以用电泳条带将指纹基因可视化,可以容易判断一个环境样品中的微生物种类。由水稻秸秆饲料化发酵中细菌群体动态的 DGGE 分析(图 1)可见,随着发酵进程的进展细菌的群体结构在发生变化;因此,根据

DGGE 胶上 DNA 条带的位置、数量,可以容易地比较判断不同环境、时间、位置的样品之间微生物群体结构。本文中以细菌的 16S rDNA 的 V₃ 区为例说明 PCR-DGGE 的技术步骤。



图中各字母代表不同微生物类群,箭头方向为变性梯度的方向,梯度范围 20%~60%

图 1 水稻秸秆乳酸发酵过程中细菌群体动态变化的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profile of bacterial community during rice straw fermentation

2 技术步骤

2.1 DNA 的提取方法

微生物的细胞壁组成结构复杂,应针对不同的细胞壁采用适宜的破坏细胞壁的方法,达到最佳的细胞壁的破坏率和 DNA 的产出率。DNA 的产率低将导致 DGGE 条带代表性差。本研究室经过反复的试验对比,样品总 DNA 的提取方法采用氯苯法^[9]进行改良:在 1~2 g 样品中加入 3 mL 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L EDTA)充分混合后加入 3 mL 氯苯和 1 mL 的 20 g/100 mL SDS,在 50℃ 水浴 30 min,并且每 5 min 将样品取出充分涡旋(如果样品是细胞壁难以破坏的革兰氏阳性菌,则再在体系中加入 0.1 g 直径为 0.1 mm 的锆珠后,充分涡旋,破坏细胞壁效果较好)在冰上放置 30 min 15 000 r/min 离心 15 min,小心提取上清液移至干净离心管加入与上清液等体积的苯和与上清液等体积氯仿/异戊醇去除蛋白与上清液等体积的异丙醇沉淀 DNA 用 RNase(10 mg)去 RNA 用 PEG 精制 DNA。该法特点是成本低廉,适于提取乳酸菌发酵物^[10]和堆肥中细菌的 DNA^[11]。其他经常见到的提取 DNA 的方法有珠磨法、试剂盒法等。环境样品中,尤其是堆肥和土壤中,腐殖质

的存在严重影响 PCR 的扩增效率,去除腐殖质的常用方法有玻璃奶纯化等。笔者采用的是稀释法,即将 DNA 稀释为 10 ng/ μ L 后,再进行 PCR,此时对堆肥样品尤其有效。

2.2 PCR 扩增

用于 DGGE 的 PCR 条件,需要针对不同的样品摸索。笔者结合国内的条件建立了一套适合乳酸菌、纤维素分解菌和堆肥中细菌 16S rDNA V₃ 区扩增的方法,现介绍如下。

2.2.1 试验药品的准备 试验药品中需要注意的是由于 DGGE 的 PCR 引物特殊,需要 GC clamp,所以要选择适宜的引物公司合成引物,笔者选用的是北京六合通公司用 PAGE 法合成的引物。引物 357F- GC 序列为,GC clamp - 5 - CCTACGGGA G-GCAGCAG- 3 (其中 GC-clamp 序列为 5 - CGCC-CGCCGC GCGCGGC GGGC GGGGC GGGGCACGG GGGG- 3);引物 517R 的序列为 5 - GTGCCAGC (A/C) GCCGCGG- 3^[2]。使用时引物用灭菌的去离子水稀释为 45 pmol。dNTP 购自法玛西雅公司,将 4 种 dNTP 等体积混合后,稀释为 10 mmol/L, Taq 酶购自 TIANGEN 公司。

2.2.2 PCR 体系的调制 按笔者的经验,细菌 16S rDNA V₃ 区域的 PCR 所需要模板 DNA 的量有一个适宜的范围,50 μ L 的反应体系的适宜范围在 10 ~ 20 ng (浓度由 UV concentration 测量)。由于 TE 对 Taq 酶有抑制作用,DNA 溶液的体积要控制在 2 μ L 之内,即质量浓度至少要达到 5 ng/ μ L。50 μ L 反应体系的各组分如表 1。

表 1 PCR 反应体系的组成

药品	总体积 (50 μ L)
10 \times PCR Buffer (含 Mg ²⁺)	5
10 mmol/L dNTP mix (每种 2.5 mmol/L)	1
primer (forward 517F 45 pmol/ μ L)	0.5
primer (reverse 357R 45 pmol/ μ L)	0.5
Taq 酶 (2.5 U/ μ L)	0.2
DNA 模板	1
SDW (灭菌去离子水)	补足

2.2.3 PCR 反应程序 以下是本试验室常用的程序,适用于不同的体系。可根据试验结果,调整程序。

1) 适用于乳酸菌 16S rDNA 扩增的程序(热启

动程序): 95 5 min; 93 解链 1 min, 48 退火 1 min, 72 延伸 1 min 10 s, 30 个循环; 最后 93 解链 1 min, 48 退火 1 min, 72 延伸 5 min 结束。

2) 适用于纤维素分解菌、堆肥及土壤样品 16S rDNA 扩增的程序(热启动- Touch down PCR): 95 5 min; 93 解链 30 s, 65 退火 40 s, 72 延伸 1 min, 10 个循环; 93 解链 30 s, 60 退火 40 s, 72 延伸 1 min, 10 个循环; 93 解链 30 s, 55 退火 40 s, 72 延伸 1 min, 9 个循环; 最后 93 解链 30 s, 55 退火 40 s, 72 延伸 5 min 结束。

2.2.4 操作 PCR 添加药品要在冰盒上快速进行,由于 Taq 酶对温度很敏感,吸取使用量后迅速放入 - 20 冰箱。

步骤: 1) 按表 1 中每种样品量和样品数计算每种反应液的总需要量。为避免最后量不足,每种反应液多计算 1 个样品份,即一种反应液的总需要量 = 1 个反应所需量 \times (样品数 + 1)。

2) 将各样品模板 DNA 1 μ L 分装到 PCR 反应管(0.2 或 0.5 μ L 离心管), 4 冷藏。

3) 将模板 DNA 以外的前 5 种试剂和水的总量加入到 1.5 μ L 离心管中,用移液枪混匀放入冰盒,其中 dNTP 由 4 种核苷酸组成,吸取前一定要充分混匀。

4) 将模板 DNA 管从冰箱中取出,分别向每个管分装 49 μ L 上述混合液。当操作熟练时可以用同一移液器吸头连续分装,但注意移液器吸头不要碰到管壁,以防污染。

5) 完成后迅速将样品插入 PCR 机器上,标记好位置,以防混淆。

注意: 药品混合时一定要充分混匀! 选择程序时,要选择 Lid heat,否则,管盖上有水汽! Taq 酶最短时间内放入冰箱!

2.2.5 PCR 产物的检查 在进行 DGGE 之前,应确认 PCR 产物是否正确扩增。PCR 产物以 2 g/100 mL 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色后检测。电泳缓冲液用 1 \times TAE,电泳约 15 ~ 20 min, EB 染色 20 min。注意 EB 是致癌物,必须制定有效的措施防止 EB 的污染。本研究室的做法是,EB 染色后的胶用大量水冲洗(带手套)后,放到保鲜膜上,摘掉手套端起保鲜膜放到凝胶成像系统舱内,赤手操作凝胶成像系统,避免对成像仪和计算机的污染。操作完后,用保鲜膜包好 EB 胶,将 EB 胶和手套放入专用的 EB 垃圾桶中。

2.3 DGGE

如果首次 DGGE 的条带不是很清晰,可以考虑将 PCR 产物浓缩后进样,一般是将 100 μ L PCR 产物用酒精沉淀法浓缩到 15 μ L (酒精沉淀法见后)。本试验按 16 cm 胶的规格举例,10 和 20 cm 胶的做法可以根据比例换算。

2.3.1 DGGE 装置 本研究用 Bio-RAD 公司的 Dcode 突变检测系统 16 cm \times 16 cm 胶板操作。

装置的组成:电源、温度控制系统、凝胶板架、水槽以及配套的梯度生成仪组成。

2.3.2 DGGE 药品的准备

2.3.2.1 梯度胶的药品配方及步骤

本研究室采用双梯度法,即聚丙烯酰胺和变性剂 2 个梯度,聚丙烯酰胺 (PA) 一般 6 ~ 12 g/100 mL,变性剂梯度 (UF) 可以根据情况调整,一般在 15% ~ 60% (尿素为 7 mol/L、甲酰胺为 40% (体积分数) 时的变性浓度为 100%) 的范围内,制备胶还需要 10 g/100 mL APS (过硫酸铵 - 20 保存), TEMED (4 保存)。制胶之前要根据需要分别配制 4 种不同浓度的胶溶液储备液,避光储存在 4 冰箱。以 PA 6% ~ 12% 为例的胶溶液配制法见表 2。

表 2 配制 300 mL PA 6% ~ 12% 的梯度胶的药品配方

Table 2 Directions for preparing 300 mL of PA 6% ~ 12% gradient gel solution

所用药剂	胶溶液储备液			
	6%PA	6%PA	12%PA	12%PA
	0 UF	50%UF	0 UF	80%UF
50 \times TAE(DGGE 专用)/mL	3	3	3	3
丙烯酰胺/g	18	18	36	36
甲叉双丙稀酰胺/g	0.48	0.48	0.96	0.96
尿素/g	0	63.0	0	100.8
去离子甲酰胺/mL	0	60	0	96

梯度胶配制的步骤为:将丙烯酰胺和甲叉双丙稀酰胺从 4 冰箱拿出,达到室温,在试剂瓶中依次加入尿素、甲叉双丙稀酰胺、丙烯酰胺、去离子甲酰胺,用去离子水 (DW) 将附着在壁上的药品冲下,加 DGGE 专用 50 \times TAE,加适量 DW,闭光溶解,全部溶解后用 DW 定容用铝箔纸将试剂瓶包好,闭光 4 保存。

2.3.2.2 DGGE 专用缓冲液的配制方法

1) 50 \times TAE - DGGE 专用缓冲液 (pH 7.4)

500 mL。

称取 41.015 g 无水乙酸钠,溶解在 200 mL 去离子水中加入 121.14 g Tris 溶解后,加 50 mL EDTA 用乙酸调节 pH 到 7.4,大约需要 40 mL 定容至 500 mL。

2) Loading Buffer (DGGE 专用) 10 mL。

配制 10 mL 60 g/100 mL 的蔗糖溶液,121 灭菌 15 min 在 15 mL 的塑料离心管中,加 2.5 g/100 mL 溴酚蓝 200 μ L (0.005 g 溴酚蓝溶于 200 μ L SDW) (如果有沉淀,0.8 μ m 滤膜过滤),0.5 mol/L EDTA 2 mL,20 g/100 mL SDS 250 μ L 后,混匀加 6.66 mL 60 g/100 mL 蔗糖后,用 SDW 定容至 10 mL。

3) Diffusion buffer (DGGE 专用) 100 mL。

在试剂瓶中依次加入 3.854 g 醋酸铵、0.214 g 四水合醋酸镁、0.2 mL 0.5 mol/L EDTA pH8.0 SDW 定容到 100 mL,121 灭菌 15 min 灭菌后,再向试剂瓶中加 0.5 mL 20 g/100 mL SDS。

2.3.3 DGGE 胶的制备 在 DGGE 整个过程中,制胶是非常关键的步骤,其步骤繁琐。笔者列出了具体制胶步骤,并指出应该注意的细节。胶的制备大约需要 3 ~ 4 h,具体操作如下:

1) 擦玻璃板,在平坦的桌面上铺层软纸,选择底部没有缺口的玻璃板,先用 kimwipe (特制没有碎纤维的纸)蘸去离子水,沿水平方向擦,以保证同一水平下玻璃板对条带的影响一致,然后再蘸酒精擦,使水分蒸发。

2) 将 spacer 放在 2 个玻璃板中间,插入 clamp 中,将 alignment 板放入,用螺丝夹子固定,将 alignment 取出,用手摸底部是否平整,要绝对的平,否则漏。Spacer 要稍微出来一点,达到用手刚能摸到的程度。调整好后再拧紧螺丝。

3) 将软垫放在底座上,玻璃板放在软垫上固定,用水平器调节。将进胶管用胶布固定在大玻璃板中间部位,使管口距离小玻璃板正上方 0.2 cm 处,否则进胶时液体易溢出。

4) 准备冰盒,将 10% APS, TEMED, 2 个 50 mL 的三角瓶 (三角瓶上贴上不同颜色的胶布以区分高低含量,防止混淆。本实验室设定黄色表示高含量 12% PA,白色表示低含量 6% PA),及配好的 4 种胶溶液 6% PA, 0 UF; 6% PA, 50% UF; 12% PA, 0 UF; 12% PA, 80% UF 放在冰盒上。

5) 制胶时要选择 1 个梯度范围,按照所需要的

浓度,将相应体积的各溶液加在 2 个 50 mL 的三角瓶中,高浓度的是黄色,低浓度的是白色。常用变性浓度范围下各胶溶液加入量见表 3。为保证溶液成分均一,吸前先将瓶摇匀再吸。加好液体后,将 70 μL 的 10%APS 分别加入到 2 个三角瓶中,摇匀。

表 3 常用变性梯度范围各胶溶液的加入量
Table 3 Volume of each gel solution in commonly used denaturing gradient mL

胶溶液 储备液	常用的变性梯度范围		
	UF 15%~60%	UF 20%~55%	UF 20%~50%
6%PA,0 UF	11.2	9.6	9.6
6%PA,50%UF	4.8	6.4	6.4
12%PA,0 UF	4	5	6
12%PA,80%UF	12	11	10

6) 过滤,脱气。将液体倒入 50 mL 的注射器中,过 0.45 μm 的滤膜,接入到放在冰上的 50 mL 的三角瓶中,注意黄色和白色不要混淆。将三角瓶放入真空干燥器中真空脱气 5 min。

7) 在每个三角瓶中加入 15 μL 的 TEMED,摇匀放冰上。用专用的注射器(事先贴上黄、白 2 种颜色的胶布把高低浓度的注射器区分开)吸入三角瓶中的液体,注意黄色和白色不要混淆。排出气泡,将注射器安装在进样器(事先分别在高浓度和低浓度端贴上黄、白 2 种颜色的胶布)上,注意进样器要归零。先装黄色高浓度的这端,然后装白色低浓度的那端,连好三通。注意要提前准备一烧杯水放在进样器旁。

8) 进胶。匀速转动,进胶完成后,将胶管卸下放在烧杯中,反相转动,使水进入注射器中,防止胶凝固在注射器中。

9) 用去离子水冲洗梳子,然后小心地插入到玻璃板中,只插入一半,防止扭曲,注意观察胶是否漏,少量的漏可以通过配制 1 mL 的 6%PA,0 UF,2 μL APS,1 μL TEMED 弥补。

10) 打开灯,凝固需室温 2~3 h。为节省时间,在胶凝固过程中可以打开电泳槽加热,加热至 66 大约需要 90 min。

11) 清洗。把做胶用的三角瓶、注射器等用洗涤剂洗净,蒸馏水润洗后,放在吸水纸上晾干。

2.3.4 电泳 单梯度 DGGE 的电泳时间一般为 3 h,双梯度 DGGE 的电泳时间一般为 5 h,以下介绍

以双梯度 DGGE 为例的电泳步骤。

1) 在 DGGE 槽中加 60 mL 50 \times TAE(DGGE 专用),加去离子水至 6 L 刻度线;再在三角瓶中准备 1 L 0.5 \times TAE,将槽中的水补至 Full 和 Run 的中间位置;加盖,注意长杆进入底部的窟窿中,打开电源,将温度设置到 66,打开 heat 键。

2) 温度到 55 时开始准备样品,将 PCR 产物各 13 μL 加入 1.5 mL 离心管中,将 DGGE 专用 loading buffer 各 7 μL 加到每个离心管盖子上,flash 后,检查 loading buffer 与 DNA 是否融合。把样品放冰盒上准备点样。(如果用大梳子的话,需加 10 μL 的 loading buffer,20 μL 的 DNA。)

3) 当梳子位置的胶凝固好后,关闭电源,用去离子水冲洗黄色的凝胶板架底部,将玻璃板固定在黄色的凝胶板架上,如果只有 1 板胶,注意另一侧也要固定玻璃板(不加 spacer),否则漏水。黄凝胶板架的两侧固定好玻璃板后,凝胶板架子上方形成一个密闭的槽,在槽中加适量去离子水检查是否漏水,若漏水,则重新安装玻璃板,直至不漏水为止(如果出现漏水的情况,会导致电路不通,DGGE 主机无法运转)。安装好玻璃板后,将凝胶板架(红点在右边)放入水槽中,之后将温度控制器盖在电泳槽上,注意长杆进入底部的窟窿中。打开电源,打开 heat 键和 bump 键,开 bump 键后,水位会下降,降至 run 与 maximum 的中间,水若不够的话,关闭电源,打开温度控制器上方的探望口,加 0.5 \times TAE 补足。

4) 温度达到 66,立即进样(加热时间过长则对胶有损伤),先关掉所有电源,取下温度控制器,小心地拔掉梳子,用移液枪冲洗每一个进样口;进样要缓慢,使样品顺着玻璃板均匀地落入到进样口中。

5) 将温度控制器盖在电泳槽上,打开电源,将温度调到 61,打开 heat 键,运行 5 min 后,在主机上插入红黑电源线,注意红黑线不要颠倒。打开主机电源,电压调到 200 V(constant),时间调为 5 h。

6) 运行 5 min 后看到 DNA 跑入胶内后,打开 pump 键,观察机器运转正常,水位正常后,人可以离开。

2.3.5 DGGE 胶的染色 DGGE 胶用 SYBR Green 染色,它的染色效率是 EB 的 25~100 倍,至少可检出 20 pg DNA。具体染色步骤如下:

1) 在专用的托盘中铺层保鲜膜,准备好切胶用的离心管。

2) 关掉电源,打开盖子,将凝胶板架拿出,控

水,卸下玻璃板。将玻璃板放到水池中的泡沫塑料上(防止打碎玻璃),将 clamp 卸下,手抓住 spacer,向内侧拧,揭下短玻璃板,胶粘在长玻璃板上。

3) 将托盘上平铺张保鲜膜后,将长板和胶放入托盘中准备染色,在专用的 50 mL 的 SYBR Green 专用的离心管中加 15 mL DGGE 专用的 0.5 × TAE,再向离心管中加入 1.5 μL 的 SYBR Green,摇匀。如果是单板便在 8 mL 中加入 0.8 μL SYBR Green。用移液枪将液体顺着每个条带的方向均匀的滴在胶上。染色 30 min。

4) 染色结束后,带手套将托盘一侧抬起,使余液集中在另一侧,用吸水纸将余液吸干,将玻璃板拿出。在专门清洗胶板的水盆内接满水,将玻璃板放入缓缓冲洗几次,注意防止胶滑下。最后控掉多余的水。

5) 将预先撕好的保鲜膜盖在胶上,反转胶板,慢慢取下玻璃板,将粘有胶的保鲜膜,放在没有灰尘的桌面上,注意不要用污染的手套触摸到保鲜膜,脱下手套扔掉。

6) 赤手将胶放入凝胶成像仪舱内,将胶放平整,排出多余气泡,照相。注意选用波长 302 nm 的紫外线,并尽量减少紫外照射时间,减少 DNA 降解。

2.3.6 条带分析及 DNA 回收 得到 DGGE 图谱后,需将特征条带从胶上切下,并回收,具体步骤如下:

1) 分析要切的条带,并编号。将离心管也编号,准备放入切下的条带。准备镊子、刀子、酒精和打火机。

2) 戴上手套,面具。将刀子蘸酒精,用打火机烧后,切条带,将切下的条带按序号放入离心管内。最后,将切完的胶再放入凝胶成像仪内,检查是否将条带全部切下。

3) 分别在每个离心管中加入 400 μL 酒精(特级),10~15 min 后,胶变为白色。真空吸走上清液,再在离心管中加入 200 μL diffusion buffer。待胶从白色变为透明后,4 过夜。如果时间紧迫,可以采用 50 °C 水浴 30 min。

4) 最后,用酒精沉淀法回收 DNA,具体步骤为:

分别在每个离心管中加入 3 mol/L NaOAc 20 μL (×1/10),酒精 500 μL (×2.5),轻轻上下混匀后,-80 °C 放置 30 min。

15 000 r/min 离心 20 min,去掉上清,在离心管中加 75%(体积分数)酒精 1 mL。

上下混匀后,15 000 r/min 离心 2 min,去掉上清,室温干燥。

在离心管中分别加 15 μL TE 溶解。

2.4 测序

测序前,先要经过一次 PCR,PCR 的引物为 357F(45 pmol)(无 GC clamp)和 517R(45 pmol)。用于测序的 PCR 程序与 PCR-DGGE 的程序基本相同,但循环数要少于 25 个。

PCR 的模板为 1 μL,按 50 μL 的体系,每个样品扩增 2 管,然后把 2 个 PCR 产物合一起 100 μL。经 TIANGEN 公司的 PCR 产物纯化试剂盒去掉引物后,送测序公司测序。(测序所需要的 DNA 浓度要达到 15 ng。)

3 讨论

DGGE 技术具有其他技术不可代替的优点,但也有局限性。为了更好地利用 DGGE 技术的优点取得客观、珍贵的结果,要充分注意 DGGE 技术过程的局限性。

1) 提取 DNA 阶段,获得样品中所有种类微生物的 rDNA 是取得全面结果的前提,但实际微生物细胞壁的坚实度不同,如不注意就会选择性地获得那些易破细胞壁的微生物 DNA,并且 DNA 回收率低的样品,会降低重复性;因此需要摸索适合具体样品的 DNA 提取方法。

2) PCR 阶段,是能够获得微生物指纹基因的重要步骤,但实际 PCR 扩增过程中不均等扩增(Bias)^[12-13]、有些微生物 rDNA 条数不同^[14]等都会造成 PCR 结果的代表性下降。

3) DGGE 本身的局限性。理论上对于 500 bp 以内含 GC 堆积的 rDNA,DGGE 可以分离其所有点变异的 95%^[15],但实际上来自一种微生物的 DNA 量不到样品 DNA 量的 1%时,肉眼难以检测其条带^[16]。由于一些 DNA 的特性,有时不同序列的 DNA 片段有可能在同一位置形成条带;或因有时 DNA 会形成异源复合体,会出现比实际更多的条带。这些现象都会影响 DGGE 的分离和检测效果,故应注意确定最佳条件,仔细分析具体结果;同时,DGGE 与克隆文库^[17]等技术结合,可克服局限性,充分发挥分离的优势。

只要用高纯度的模板 DNA,严格按照操作步骤

进行实验, DGGE 技术是较容易获得理想的实验结果, 并且重复性也较好的技术; 但实际实验中, 仅靠设备说明书和一些参考文献不易掌握细节, 并且一旦碰到问题便难以判断问题所在。这便需要实验者认真摸索条件, 那时希望本文能够提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Ishii K, Nakagawa T, Fukui M. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology [J]. *Microbes and Environments*, 2000, 15(1): 59-73
- [2] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695-700
- [3] Heuer H, Krsek M, Baker P, et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of 16S rDNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 3233-3241
- [4] Pedro M S, Haruta S, Hazaka M, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91: 159-165
- [5] Araya R, Tani K, Takagi T, et al. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43: 111-119
- [6] Randazzo C L, Torriani S, Akkermans A D L, et al. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 68: 1882-1892
- [7] Fischer S G, Lerman L S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Cell*, 1979, 16: 191-200
- [8] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143-169
- [9] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5278-5280
- [10] Yang H Y, Wang X F, Liu J B, et al. Effects of water-soluble carbohydrates content on silage fermentation of the wheat straw [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 101(3): 232-237
- [11] 王伟东, 崔宗均, 王小芬, 等. 快速纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性 [J]. *环境科学*, 2005, 26(5): 156-160
- [12] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3724-3730
- [13] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 625-630
- [14] Farrelly V, Rainey F A, Stackebrandt E. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacteria species [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 2798-2801
- [15] Myers R M, Fischer S G, Maniatis T, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13: 3131-3145
- [16] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology [M] Akkermans A S L. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997: 1-27
- [17] Wang X, Haruta S, Wang P, et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57: 106-115