

武丽娟,陈月星,刘小凤,等. PCR 反应程序对土壤微生物 PCR-DGGE 分析的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):48-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.011

PCR 反应程序对土壤微生物 PCR-DGGE 分析的影响

武丽娟¹, 陈月星², 刘小凤¹, 宋月¹, 张战凤¹, 樊永亮¹

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)探讨不同 PCR 反应程序(降落式 PCR、巢式-降落式 PCR、普通 PCR、巢式 PCR)对土壤微生物 PCR-DGGE 群落结构和种群多样性分析的影响。利用 Quantity One 4.6.2 软件对 DGGE 指纹图谱进行数字化处理,并计算相应 PCR 程序下 DGGE 图谱的多样性指数、丰富度指数、均匀度指数和不同反应程序下图谱的戴斯系数,应用 SPSS 16.0 软件对相关指数进行方差分析,检测不同反应程序间各指数的差异显著性。不同 PCR 反应程序在土壤微生物 PCR-DGGE 分析时,其群落结构和种群多样性指数间存在明显差异。单纯应用降落式 PCR 虽然提高了扩增的特异性,却降低了扩增效率,其 DGGE 图谱丰富度较低,多样性较差,与其他反应程序的 DGGE 图谱相似度较低;普通 PCR 反应的 DGGE 图谱多样性和丰富度较高,与 2 种巢式 PCR 相似,然而由于普通 PCR 在复杂模板情况下容易发生错配,难以保证扩增特异性,因而夸大样品中微生物种群多样性,与 2 种巢式 PCR 的 DGGE 图谱相似度较低。2 种巢式 PCR 反应程序下的 DGGE 图谱条带丰富,多样性高,群落结构相似度高,能比较全面和科学地反映样品中微生物群落结构和种群多样性。因此,在利用 PCR-DGGE 分析土壤微生物群落结构和种群多样性时,采用巢式 PCR(包括巢式 PCR 和巢式-降落式 PCR)比较合适。研究 PCR 反应程序对土壤微生物 PCR-DGGE 分析的影响,可为 PCR-DGGE 技术在土壤微生物群落结构和多样性分析中的应用和完善提供理论依据。

关键词:土壤微生物;群落结构;种群多样性;PCR-DGGE;PCR 反应程序

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)21-0048-04

土壤微生物是陆地生态系统中重要的组成部分,积极参与土壤养分循环、有机质分解及肥力形成等重要的生态过程^[1]。它们的生存很容易受到很多环境因子的影响,如污染物、地表植被、土地利用方式、土壤类型等,因此常常被认为是土壤生态系统变化的指示者。除了对与土壤微生物密切相关的土壤酶和土壤微生物量的研究外,近年来,对土壤微生物多样性的研究密集起来,这主要得益于不依赖微生物培养的分子生物学技术[脂肪酸甲酯/磷脂脂肪酸(FAME/PLFA)、扩增的 rDNA 限制性分析(ARDRA)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、肠杆菌重复基因间一致序列 PCR(ERIC-PCR)、单链构象多态性(SSCP)、16S rDNA 序列分析]的发展和 DNA 测序技术的日益成熟。自 Muyzer 等将聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术引入到微生物多样性分析以来^[2],该技术被广泛应用于检测各种环境中微生物群落结构多样性、监测微生物群落动态变化等方面^[3-6]。然而在试验操作中,该技术各个环节均需完善才能准确而科学地反映试验结果,以往研究主要集中于 DNA 提取^[7-8]、靶序列选择^[9]及变性梯度摸索等方面,而对于 PCR 反应程序的系统比较研究还未见报道,因此,本试验针对该技术的目的基因片段扩增(PCR)环

节,以 16S rDNA 基因 V3 区片段扩增为例,比较 4 种不同的 PCR 反应程序对土壤微生物 PCR-DGGE 多样性分析的影响,从而评价和筛选出适合于土壤微生物多样性 PCR-DGGE 分析的反应程序,以期 PCR-DGGE 技术在土壤微生物群落结构和种群多样性分析中的应用和完善提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试验仪器和试剂

仪器:基因扩增仪(美国伯乐公司),涡旋仪、水浴锅、高速冷冻离心机(德国艾本德生命科学公司),核酸突变检测系统(美国伯乐公司),核酸电泳仪(美国伯乐公司),凝胶成像系统(美国伯乐公司),蓝盾® 621 可见光凝胶透射仪。

试剂:小量土壤 DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司)、DNA 回收纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、琼脂糖、GenFinder 核酸染料(厦门百维信生物科技有限公司)、GelRed 核酸染料(美国 Biotium 生物技术公司),rTaq DNA 聚合酶和 dNTPs[宝生物工程(大连)有限公司],40% 丙烯酰胺溶液(丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺=37.5:1)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(西陇)、PCR 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 研究区概况和土壤样品的采集

本试验所用土样采集于延安市果业研究发展中心苹果试验基地,该区域位于渭北旱塬核心地段,属于温带半湿润大陆性季风气候,年均气温 9.2℃,平均海拔 1 100 m,多年平均降水量 622 mm,主要集中于 6—9 月;地貌以塬、梁、沟相间,以塬为主;土壤为黄土母质发育而成的疏松黑垆土。

于 2011 年 10 月 19 日苹果成熟期,分别在苹果生育期内

收稿日期:2018-05-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31772533)。

作者简介:武丽娟(1984—),女,山西临汾人,硕士,实验师,主要从事蛋白电泳技术相关研究。E-mail:wu_lujuan@nwfu.edu.cn。

通信作者:樊永亮,博士,研究员,主要从事昆虫生理生化和分子生物学研究。Tel:(029)87082351;E-mail:yfan@nwfu.edu.cn。

种植三叶草 (*Trifolium repens* L.) 和覆盖玉米秸秆 (30 000 kg/hm²) 的园区采用多点采样法采集土样 (地表下 5 ~ 15 cm 土层), 土样均匀混合后装入标记好的无菌密封袋中带回实验室, 取出石块、草根、秸秆及其他肉眼可见的杂物, 过 2 mm 钢筛, 于 -80 ℃ 保存, 7 d 内完成土壤微生物总 DNA 的提取。

1.3 土壤微生物总 DNA 的提取

土壤微生物总 DNA 采用小量土壤 DNA 提取试剂盒, 参照试剂盒操作说明进行提取, 得到的 DNA 提取液经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 16S rDNA 基因 V3 区片段的扩增

本研究采用引物对 27F^[10]/1492R^[11] 和 GC - 338F/518R^[2] 分别对 16S rDNA 基因全长和 V3 区片段进行扩增。16S rDNA 基因全长扩增体系和程序参照 Nicomrat 等的方法^[12]; V3 区片段扩增体系如下: 10 × PCR 缓冲液 (含 Mg²⁺) 5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μL, 正反向引物 (各 5 μmol/L) 4 μL, 模板 DNA 2 μL, TaKaRa rTaq (5 U/μL) 0.5 μL, 补充双蒸水至 50 μL。反应程序为

A: 降落式 PCR。以提取的微生物总 DNA 为模板, 进行 V3 区片段扩增, 参考 Kihara 等的方法, 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 65 ~ 55 ℃ (每个循环退火温度降低 0.5 ℃, 直至退火温度降至 55 ℃) 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 20 个循环; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 10 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min^[13]。

B: 巢式 - 降落式 PCR。以 27F/1492R 引物扩增产物为模板, 进行 V3 区片段扩增, 反应程序同 A。

C: 普通 PCR。以提取的微生物总 DNA 为模板, 进行 V3 区片段扩增, 参考 Kimura 等的方法, 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min^[14]。

D: 巢式 PCR。以 27F/1492R 引物扩增产物为模板, 进行 V3 区片段扩增, 反应程序同 C。

每个土样 PCR 均设置 3 个重复, 合并后采用琼脂糖凝胶 DNA 回收和纯化试剂盒进行回收纯化, 依据试剂盒使用说明进行操作, 浓缩产物保存于 -20 ℃, 以备 DGGE 分析。

1.5 DGGE 分析

应用美国伯乐公司核酸突变检测系统进行 DGGE 分析, 凝胶的变性梯度为 45% ~ 65% (100% 变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺的混合物), 凝胶浓度为 8%, 在 60 ℃、120 V 条件下, 凝胶在 1 × TAE 缓冲液中电泳 510 min。电泳完毕, 将凝胶浸在含 Gel Red (体积分数为 1 : 10 000) 的 1 × TAE 溶液中避光染色 10 ~ 15 min, 采用 Bio - Rad 凝胶成像系统进行拍照。

1.6 数据分析

应用 Quantity One 4.6.2 软件对 DGGE 图谱进行数字化分析, 用以计算香农指数 (H)、丰富度指数 (R)、均匀度指数 (E) 和戴斯系数 (D), 并利用 SPSS 16.0 软件应用单因素方差分析方法检测处理间的差异显著性。相关指数计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i (\ln P_i); \quad (1)$$

$$E = H / \ln S; \quad (2)$$

$$D = \frac{2S_e}{S_x + S_y} \times 100\%。 \quad (3)$$

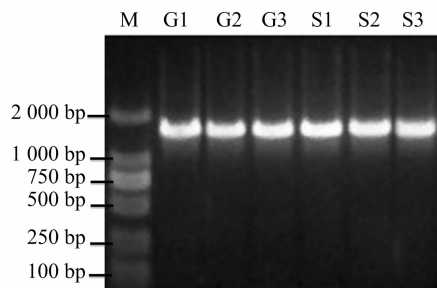
式中: P_i 为某一条带的峰强度与该泳道中所有条带峰强度和的比值; S 为某一泳道的 DNA 条带数。 S_x 为泳道 x 中的条带数; S_y 为泳道 y 中的条带数; S_e 为泳道 x 和泳道 y 所共有的条带数。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 提取和 16S rDNA V3 区扩增

2.1.1 土壤微生物总 DNA 提取 本试验采用土壤 DNA 提取试剂盒提取土壤微生物总 DNA, 所提取的 DNA 溶液 $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$ 介于 1.8 ~ 2.0 之间, 其 $D_{260 \text{ nm}}/D_{230 \text{ nm}}$ 介于 0.1 ~ 0.5 之间; 经 8% 琼脂糖凝胶电泳后得到单一、清晰的条带, 大小约为 23 kb, 说明所提取的 DNA 溶液在纯度和长度上均满足后续试验的要求。

2.1.2 PCR 扩增结果 应用通用引物对 27F/1492R 扩增 16S rDNA 基因全长, 并经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。由图 1 可知, 通过应用 27F/1492R 引物对的扩增, 2 份土样均成功扩增出 16S rDNA 基因的全长序列, 长度约为 1 500 bp。将扩增得到的 3 份 PCR 反应液进行合并, 经 DNA 回收纯化试剂盒回收纯化后, 于 -20 ℃ 冰箱保存备用。



M 表示 DNA marker; G1~G3 表示植草覆盖果园土壤样品; S1~S3 表示秸秆覆盖果园土壤样品

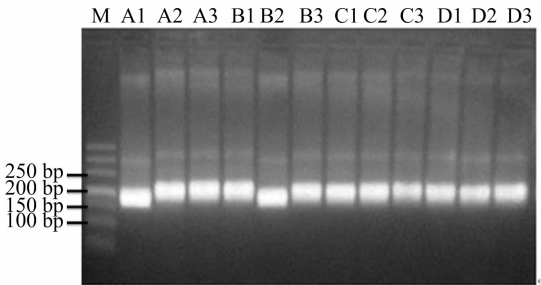
图1 2 种土壤样品 16S rDNA 基因全长扩增结果

应用同样的反应体系, 不同的反应程序扩增 16S rDNA 基因 V3 区片段, 并经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。由图 2 - A 和图 2 - B 可知, 用 4 种不同的 PCR 反应程序, 2 份土样的所有处理样品均扩增出正确大小的目的片段, 约为 220 bp; 重复之间和不同反应程序之间, 电泳条带的大小和强度没有明显差异, 而在 2 份土样之间, 植草覆盖果园土样 (G) 比秸秆覆盖果园土样 (S) 亮度暗。同一处理的 PCR 反应液合并后经 DNA 纯化回收试剂盒回收纯化, 于 -20 ℃ 冰箱保存, 以备 DGGE 分析。

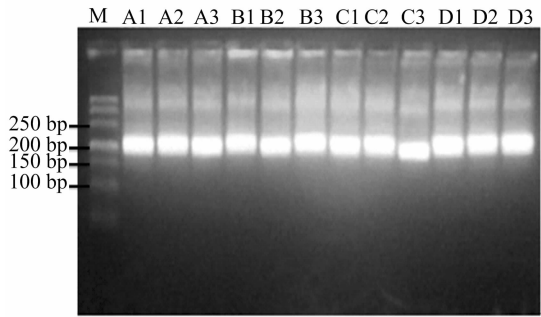
2.2 DGGE 图谱分析

应用 PCR - DGGE 分析自然环境中细菌、古菌、真核生物及病毒群落的生物多样性, 通过添加化学变性剂使 DNA 在电泳过程中发生解链变性, 降低迁移率, 从而使不同 DNA 分子得以分离。理论上, DGGE 图谱上 1 个条带代表 1 个微生物优势菌群或操作分类单, 条带数目的多寡反映细菌的多样性高低, 对应条带的强度反映该优势菌群的相对丰度, 因此可以依据图谱中的条带信息分析样品中微生物的群落结构和微生物种群多样性。

4 种不同 PCR 反应程序下土壤微生物多样性 DGGE 指纹



A. 植草覆盖果园土壤样品



B. 秸秆覆盖果园土壤样品

M 为 DNA marker; A、B、C、D 分别代表不同 PCR 应程序, A 为降落式 PCR; B 为巢式-降落式 PCR; C 为普通 PCR; D 为巢式 PCR。下图同

图2 不同 PCR 反应程序下 2 份土壤样品 16S rDNA 基因 V3 区片段扩增结果

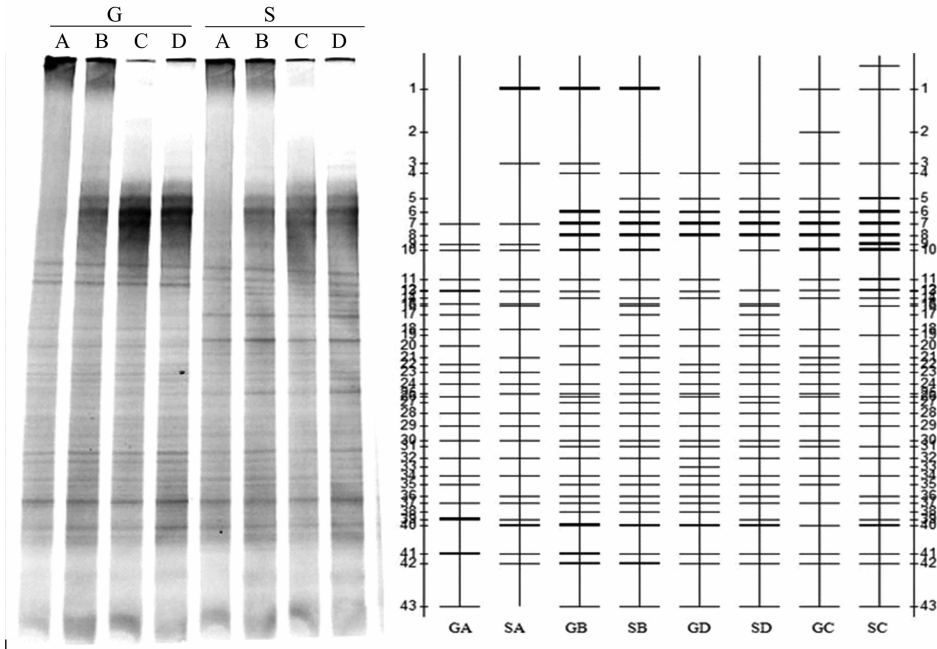


图3 不同 PCR 反应程序下土壤微生物 16S rDNA 基因 V3 区 DGGE 指纹图谱及其示意

表 1 不同 PCR 反应程序下土壤微生物多样性指数

PCR 程序	G			S		
	多样性指数	丰富度指数	均匀度指数	多样性指数	丰富度指数	均匀度指数
A	2.89 ± 0.08b	25 ± 2.65b	0.90 ± 0.47a	2.95 ± 0.16b	24 ± 1.73b	0.93 ± 0.03a
B	3.15 ± 0.13a	30 ± 1.53ab	0.93 ± 0.48a	3.11 ± 0.10ab	32 ± 1.00a	0.90 ± 0.02a
C	3.10 ± 0.11ab	30 ± 1.73a	0.91 ± 0.22a	3.10 ± 0.08ab	31 ± 2.65a	0.91 ± 0.01a
D	3.11 ± 0.14ab	31 ± 3.33a	0.90 ± 0.45a	3.23 ± 0.07a	32 ± 2.65a	0.93 ± 0.03a

注:同列数据后不同小写字母表示经 Duncan's 检验在 0.05 水平上差异显著。A 表示降落式 PCR;B 表示巢式-降落式 PCR;C 表示普通 PCR;D 表示巢式 PCR。下表同。

图谱见图 3,通过对 DGGE 图谱的初步分析,可以发现,2 个土样 DGGE 图谱中的各泳道的条带数目比较丰富、迁移率及条带亮度间存在一定差异,说明 2 份土样所含微生物多样性较高,且样品间微生物种类和数量差异较大;同时 2 个土样图谱中存在若干共同条带,说明供试土样中存在多种共有细菌;样品内不同反应程序处理间各泳道的条带数目、亮度及迁移率也存在一定差异,说明不同的 PCR 反应程序对 DGGE 多样性分析存在一定的影响,且明显可以看出,A 与 B、C、D 差异较为明显,而 B、C、D 之间条带类型较为相似。

2.3 不同 PCR 反应程序下细菌群落结构分析

应用 Quantity One 4.6.2 软件对 DGGE 图谱进行数字化处理,并计算样品中各泳道的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数。由表 1 可知,2 个土样不同处理间多样性指数相似,A 处理的多样性指数最低,与 B 处理间差异显著 ($P < 0.05$);B、C、D 处理多样性指数均大于等于 3.10,且 C、D 处理间无显著差异。丰富度指数与多样性指数比较结果相似,2 个土样中 A 处理的丰富度最低,分别为 25 (G) 和 24 (S),且与 C、D 处理间差异显著 ($P < 0.05$),B、C、D 丰富度指数无显著性差异。结果表明,单纯应用降落式 PCR 在提高扩增特异性的同时降低了扩增效率,从而导致 DGGE 图谱条带数目较少,反映样品中微生物种群多样性较低;在巢式-降落式 PCR、普通 PCR 和巢式 PCR 扩增条件下,DGGE 图谱多样性较好、丰富度指数较高,能够较好地反映土壤微生物的群落结构和种

群多样性,并且表现出较好的一致性。

2.4 群落相似性分析

DGGE 图谱经 Quantity One 4.6.2 软件分析,通过戴斯系数公式计算 2 份土样在 4 个不同 PCR 反应程序下各泳道的戴斯系数,得到相似性矩阵(表 2、表 3)。2 个土样中降落式 PCR 与其他 3 个处理相似度普遍较低,最低为 0.78;普通 PCR 与其他 3 个 PCR 处理相似度比较低,主要因为普通 PCR 在扩增复杂模板时存在一定的非特异性扩增,表现在 DGGE 图谱上为出现不代表任何细菌种群的特异条带,从而夸大样品中微生物的种群多样性和丰富度;巢式-降落式 PCR 和巢式 PCR 处理间一致性较高,具有相似的微生物群落结构,尤其 S 的巢式-降落式 PCR 和巢式 PCR 处理反映的土壤微生物群落结构基本一致,相似度为 0.97,说明巢式 PCR 不仅确保了扩增的特异性,且克服了降落式 PCR 扩增效率低的问题。

表 2 不同反应程序下植草覆盖果园土壤样品微生物群落结构相似性分析

处理	相似度			
	GA	GB	GC	GD
GA	1.00			
GB	0.78	1.00		
GC	0.81	0.84	1.00	
GD	0.81	0.90	0.86	1.00

表 3 不同反应程序下秸秆覆盖果园土壤样品微生物群落结构相似性分析

处理	相似度			
	SA	SB	SC	SD
SA	1.00			
SB	0.86	1.00		
SC	0.81	0.89	1.00	
SD	0.82	0.97	0.86	1.00

3 讨论

DGGE 凝胶电泳技术于 1979 年被提出,是一种用于 DNA 突变检测的分子生物技术^[15],该技术被 Muyzer 等^[2]引入到微生物生态学研究领域,并证实了该技术在自然界微生物生态学研究领域的实用性和优越性。这是因为(1)DGGE 是一种不依赖于纯培养的 DNA 片段分离技术,能够较全面反映样品中微生物的群落结构、种类和数量;(2)DGGE 凝胶电泳可以同时运行多个样品,适用于研究环境样品中微生物群落结构的演替规律、种群动态变化等;(3)DGGE 凝胶电泳具有重现性高、可靠性强及操作简单等优点,因此 DGGE 自诞生以来被广泛应用于各种环境(土壤、活性污泥、生物膜、动物肠胃以及水生生态环境)微生物多样性的检测及群落动态变化规律的研究。

然而,与其他分子生物技术一样,DGGE 技术也存在一定的局限性,如只能分离 500 bp 以下的 DNA 片段,序列信息量较小;具有相同解链行为的微生物 DNA 序列在 DGGE 图谱上迁移率一致,无法准确区分;DGGE 只能检测环境中优势菌群的种类和数量(1% 以上),且无法提供代谢活性和基因表达水平方面的信息。除此之外,DGGE 图谱分析还受到各环节的影响,包括总 DNA 的提取、PCR 扩增引物选择、凝胶和变性剂梯度的设置、电泳温度和时间的确定、染色方法的选择^[16-17]以及后续条带的测序步骤^[18]。

本研究针对 PCR 扩增环节,采用目前 DGGE 分析中比较常用的 4 种扩增程序(A:降落式 PCR;B:巢式-降落式 PCR;C:普通 PCR;D:巢式 PCR)对 16S rDNA 基因 V3 区进行扩增,并进行 DGGE 图谱分析,结果表明,与普通 PCR 和降落式 PCR 相比,巢式 PCR(巢式 PCR 和巢式-降落式 PCR)所获得的 DGGE 条带较为清晰,条带数目较丰富。雷娟利等在研究不同蔬菜连作对土壤细菌 DNA 分子水平多态性影响中也发现,巢式 PCR 所获得的 DGGE 条带比直接 PCR 更清晰,可分辨的条带数量也更多^[19]。同样,江芸等在研究真空包装冷却猪肉冷藏过程中菌相变化时发现,巢式 PCR(巢式-降落式 PCR)能够增加 PCR 反应的灵敏性^[20]。表明在其他技术操作相同的情况下,巢式 PCR(巢式 PCR 和巢式-降落式 PCR)比其他 PCR 更适用于土壤及其他微生物群落结构比较复杂的样品的 PCR-DGGE 分析。

然而,PCR 只是 PCR-DGGE 技术流程的一个环节,保证 PCR 扩增的特异性和效率是整个试验的一部分,其他环节对 DGGE 图谱分析同样也存在一定影响,因此,在应用 PCR-DGGE 技术对土壤微生物群落结构进行分析时,须摸索和完善各个环节才能得到全面和科学的结果。

4 结论

综上所述,应用 PCR-DGGE 分析土壤微生物群落结构和种群多样性时,不同的 PCR 反应程序获得的 DGGE 图谱分析结果存在明显差异。本试验结果表明,巢式 PCR(巢式 PCR 和巢式-降落式 PCR)反应处理下的 DGGE 图谱条带丰富,多样性高,能够比较全面和科学地反映样品中微生物群落结构和种群多样性。

参考文献:

- [1] Kennedy A C. Bacterial diversity in agroecosystems[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1999, 74(1/2/3): 65-76.
- [2] Muyzer G, de Waal E C, 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]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [3] 邝斌宇,史青, Montcho, 等. A/O MBR 处理生活污水效率与菌群多样性的关系[J]. 环境科学, 2012, 33(6): 2061-2067.
- [4] Leite A M, Mayo B, Rachid C T, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 215-221.
- [5] Chen T T, Jiang S Y, Xiong S Q, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to microbial diversity analysis in Chinese Douchi[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92: 2171-2176.
- [6] Gertler C, Näther D J, Cappello S, et al. Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean Seas: a mesocosm study. [J]. Fems Microbiology Ecology, 2012, 81(3): 520-536.
- [7] Özgül İnceo lu, Hoogwout E F, Hill P, et al. Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3378-3382.

葛春艳,李雪彤,刘福鹏,等. 红景天 *AG* 基因(*RrAG*)的电子克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):52–57.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.21.012

红景天 *AG* 基因(*RrAG*)的电子克隆及生物信息学分析

葛春艳^{1,2}, 李雪彤¹, 刘福鹏¹, 郑大浩¹, 吴委林¹

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 2. 长春科技学院, 吉林长春 130600)

摘要: *AG* 基因对植物的花发育具有至关重要的作用。以拟南芥 *AG* 基因(NP_001190766.1)为参考序列,采用电子克隆技术获得红景天 *AG* 基因(*RrAG*),并通过生物信息学分析预测该基因的结构、功能等。结果表明:该基因全长为 1 037 bp,包含 789 bp 的开放阅读框,编码 262 个氨基酸,理论等电点为 9.27,是定位于细胞核内不稳定的亲水性蛋白,起到转录调控的作用。序列比对发现,红景天 *AG* 编码蛋白与荞麦的 *AG* 蛋白亲缘关系最近。研究结果为进一步研究 *RrAG* 基因的功能奠定了基础。

关键词: 红景天; *AG* 基因; 电子克隆; 生物信息学分析

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)21–0052–06

红景天(*Rhodiola rosea*)为景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.)多年生草本植物,是我国传统珍稀药用植物,具有抗氧化、抗衰老、抗辐射、抗缺氧、抗疲劳、抗病毒、抗肿瘤、抗应激反应、增强机体免疫力、改善心血管系统功能等药理作用,广泛应用于军事、航天、医药、功能性食品、化妆品等保健和临床方面^[1–4]。目前,相关研究主要关注红景天形

态特性、栽培措施、红景天苷的生物合成以及药理与药性方面,未见关于其花器官发育等方面的相关研究。研究者依据大量花发育的研究结果提出 ABCE 模型,其中 C + E 基因控制雌蕊发育,而 C 组基因中的 *AG* 基因的弱突变体为心皮发育缺陷但雄蕊的发育正常,说明雄蕊和心皮属性的确定与发育对 *AG* 基因表达水平的要求不同^[5]。

电子克隆(*in silico* cloning)技术是近几年来新发展的一种新的基因快速克隆方法,基本原理是基于已建立的核酸序列与蛋白质序列数据库,利用计算机技术与生物信息学工具进行比对、拼接及分析而快速获得相应的功能基因。该技术具有高效率、低成本且针对性强等优点^[6],已被研究者在基因克隆之前广泛使用。但是,当前研究者基本以已知相关物种的 EST(expressed sequence tags,表达序列标签)序列在基因组数据库中进行反复比对、拼接到没有可供延长的序列

收稿日期:2018–01–08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660395);吉林省教育厅项目(编号:吉教科合字[2015]第 29 号);延边大学科研课题(编号:延大科合字[2014]第 26 号);延边大学博士科研启动基金。

作者简介:葛春艳(1978—),女,吉林长春人,硕士研究生,从事作物遗传资源评价及种质创新研究。E-mail:514130628@qq.com。

通信作者:吴委林,博士,讲师,硕士生导师,从事作物遗传育种研究。

Tel:(0433)2435569;E-mail:wluwu@ybu.edu.cn。

[8]李 鹏,毕学军,汝少国. DNA 提取方法对活性污泥微生物多样性 PCR–DGGE 检测的影响[J]. 安全与环境学报,2007(2): 53–57.

[9]邢德峰,任南琪,宋佳秀,等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. 环境科学,2006,27(7):1424–1428.

[10]Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1995, 59(1): 143–169.

[11]Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing [J]. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1991:115–175.

[12]Nicomrat D, Dick W A, Dopson M, et al. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(2):312–321.

[13]Kihara J, Bationo A, Thuita M, et al. Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 58: 12–20.

[14]Kimura M, Shibagaki T, Nakajima Y, et al. Community structure of

the microbiota in the floodwater of a Japanese paddy field estimated by restriction fragment length polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis pattern analyses[J]. Biology & Fertility of Soils, 2002, 36(4):306–312.

[15]Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1):127–141.

[16]邢德峰,任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析[J]. 微生物学报,2006,46(2):331–335.

[17]宫曼丽,任南琪,邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. 微生物学报,2004,44(6):845–848.

[18]Darja Kušar, Gorazd Avguštin. Optimization of the DGGE band identification method [J]. Folia Microbiologica, 2012, 57(4): 301–306.

[19]雷娟利,周艳虹,丁 桔,等. 不同蔬菜连作对土壤细菌 DNA 分子水平多态性影响的研究[J]. 中国农业科学,2005,38(10): 2076–2083.

[20]江 芸,高峰,徐幸莲,等. 真空包装冷却猪肉冷藏过程中菌相变化[J]. 食品科学,2011,32(4):241–245.