

葡糖醋杆菌高静水压诱变株 AFLP 体系的建立

葛含静, 杜双奎, 林德慧, 向进乐, 李志西

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】从 DNA 分子水平研究葡糖醋杆菌及其经高静水压诱变后所得突变株的差异, 优化建立了适合葡糖醋杆菌的 AFLP 技术体系, 为细菌纤维素产生菌的高静水压诱变育种提供技术支撑。【方法】以 1 株从自制醋中分离出来的细菌纤维素产生菌 J₂ 及其经高静水压诱变后得到的高产细菌纤维素的突变株 M₄₃₈ 为材料, 对选择性扩增程序的影响因素进行分析, 优化建立葡糖醋杆菌的 AFLP 酶切体系, 并对适合葡糖醋杆菌高压诱变前后差异分析的引物组合进行筛选。【结果】酶切模板 DNA 用量 600 ng, 酶切时间 8 h, 过夜连接 (反应时间大于 10 h), 预扩增产物最适稀释倍数为 500 倍, 从 24 对 AFLP 选择性扩增引物组合中筛选出了 E-T/M-G 为适合葡糖醋杆菌高静水压诱变前后差异分析的引物组合。供试 2 株菌的选择性扩增差异位点只有 1 处, 经测序扩增片段长度为 213 bp, 提交 Genbank 比对, 其与 *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 GXY0064 基因组序列中 24 917~24 723 bp 片段相似度为 99%。【结论】所建立的 AFLP 反应体系, 适合葡糖醋杆菌 J₂ 及其突变株 M₄₃₈ 的 AFLP 分析。

【关键词】 葡糖醋杆菌; 突变株; AFLP; 引物对筛选

【中图分类号】 TS201.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0171-07

Establishment of AFLP reaction in a mutated *Gluconacetobacter* sp. induced by high hydrostatic pressure treatment

GE Han-jing, DU Shuang-kui, LIN De-hui, XIANG Jin-le, LI Zhi-xi

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study intended to research the diversity for *Gluconacetobacter* and the mutated strain induced by high hydrostatic pressure treatment on molecular level. An AFLP reaction system suitable for *Gluconacetobacter* was optimized and established in the paper, which could provide a technical support for mutation breeding of bacterial cellulose producing strain by high hydrostatic pressure treatment. 【Method】With a bacterial cellulose producing strain isolated from homemade vinegar and its mutated strain with higher yield bacterial cellulose induced by high hydrostatic pressure treatment as materials, the main factors of selective amplification processes were analyzed. The reaction system of digestion was optimized and established. Then the screening of primer pairs suitable for *Gluconacetobacter* sp. and its mutated strain were carried out. 【Result】600 ng genomic DNA was served as template in the digestion system with 8 hours reaction, overnight ligation (the ligation time was more than 10 hours), 500 times of dilution for the products of pre-amplification for selective amplification, and 1 pair of primers (E-T/M-G) was selected from 24 pairs of primer combination for the AFLP reaction system of bacteria. There was only 1 diversity locus between the two strains, which was 213 bp and had 99% identity with 24 917-24 723 bp in

* [收稿日期] 2010-06-01

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(QN2009072)

[作者简介] 葛含静(1981-), 女, 陕西乾县人, 在读博士, 主要从事细菌纤维素产生菌的发酵及诱变分析研究。

E-mail: gehanjing1981@hotmail.com

[通信作者] 李志西(1958-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事粮食工程与发酵技术创新研究。

E-mail: lzx580721@yahoo.com.cn

the genome sequence of *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 GXY0064. 【Conclusion】 Results showed that it was feasible to use the reaction system constructed by the study to conduct the AFLP analysis of *Gluconacetobacter* sp. and its mutated strain.

Key words: *Gluconacetobacter*; mutated strain; AFLP; screening of primer pairs

扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 技术是由荷兰 Key-gene 公司科学家 Zabeau 和 Vos 于 1993 年创建的一种 DNA 指纹技术^[1], 该方法结合了限制片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 和随机扩增多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术的特点, 更加高效、快速、稳定、可靠, 被认为是迄今为止最有效的分子标记技术^[2-3]。目前, AFLP 技术已被广泛用于遗传多样性、系统发育、遗传图谱构建、基因定位、品种鉴定及分子育种等研究中^[4-13]。AFLP 在微生物研究中的应用主要集中在菌株的鉴定、分类与分型, 遗传多样性研究, 遗传图谱及指纹图谱的构建等方面^[14], 许多微生物的 AFLP 反应体系已经建立, 如幽门螺杆菌、芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、香菇菌株、*Stenotrophomonas maltophilia* 菌株等^[15-19]。

在分类学上, 葡糖醋杆菌属 (*Gluconacetobacter*) 是醋酸菌科下的 15 个属之一。到 2007 年, 该属共收集了 16 个种^[20], 种间生理生化特性不尽相同, 发酵产生细菌纤维素和耐高糖度是它们在工业生产中的主要应用特性。细菌纤维素由于其独特的理化特性, 如高结晶度、高持水量、较高生物适应性和良好的可降解性, 以及生物合成时物理性能的可调控性, 被广泛应用于生物医学、食品工业、造纸工业、化妆品工业、声学器材等领域^[21]。细菌耐高糖度的特性, 常被用于葡萄糖酸的批量生产以及高酸度工业

醋的生产^[22]。

西北农林科技大学食品科学与工程学院发酵技术实验室从自制醋中分离出了 1 株能发酵产生细菌的葡糖醋杆菌, 并以其为出发菌, 经高静水压诱变后筛选出了 1 株细菌纤维素产量为出发菌 3 倍多的突变株。本试验在上述研究的基础上, 以这 2 株菌为材料, 建立了葡糖醋杆菌的 AFLP 反应体系, 以期高静水压对微生物的诱变作用及细菌纤维素产生菌的高静水压诱变育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种的准备 细菌纤维素产生菌 J₂, 从西北农林科技大学食品科学与工程学院发酵技术实验室自制醋中分离得到, 经鉴定为葡糖醋杆菌。将 J₂ 在高静水压条件下诱变, 从中筛选出细菌纤维素产量为 J₂ 3 倍多的突变株 M₄₃₈。将 J₂ 和 M₄₃₈ 于优化的液体培养基中振荡培养至对数期, 加入体积分数 20% 的甘油, 置于 -80 °C 超低温保存, 备用。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组提取试剂盒 (TaKaRa, Japan); *Mse*I 和 *Eco*R I 接头、引物 (参考 AFLP Analysis System for Microorganisms AFLP Microorganism Primer Kit (Invitrogen, 2004) 说明手册), 由 TaKaRa 合成, 序列见表 1; *Mse*I 和 *Eco*R I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, 均购自 NEB 公司; *Taq* DNA 聚合酶、100 bp Ladder, 购自 MBI 公司; 琼脂糖, 购自 Invitrogen 公司。其他常规试剂均为国产分析纯。

表 1 葡糖醋杆菌 AFLP 分析的限制性内切酶接头及引物序列

Table 1 Adapters and primers sequences used in the AFLP analysis of *Gluconacetobacter*

项目 Item	<i>Mse</i> I	<i>Eco</i> R I
接头序列 ^[23] Adapters	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 5'-TACTCAGGACTCAT-3'	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
预扩增引物序列 ^[23] Preamplification primers	M ₀ : 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' M ₀ : 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'	E ₀ : 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' E ₀ : 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
选择性扩增引物序列 Selective amplification primers	M-A: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAA-3' M-C: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAC-3' M-G: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAG-3' M-T: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAT-3'	E-A: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' E-C: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' E-G: 5'-GACTGCGTACCAATTCG-3' E-T: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

1.1.3 主要仪器 主要仪器有高速台式离心机 (Eppendorf, 德国)、核酸蛋白检测仪 (NanoDrop, ND-1000)、PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)、凝胶成像仪

(Bio-Rad, 美国)、聚丙烯酰胺凝胶电泳系统装置 (Bio-Rad, 美国)、电泳仪和垂直电泳槽 (北京君意, JY-SC26)。

1.2 基因组 DNA 的提取及检测

挑取一环超低温保存的菌种至装有 10 mL 优化种子培养基(葡萄糖 0.7 g, 酵母膏 0.1 g, K_2HPO_4 0.05 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g, 无水乙醇 0.2 mL)的试管中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 18~24 h, 至菌种生长到对数期。收集 J_2 和 M_{438} 的菌体, 采用细菌基因组提取试剂盒提取 J_2 和 M_{438} 基因组 DNA。取 5 μ L 提取的基因组 DNA 与 2 μ L loading buffer 混合, 用 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 并用核酸蛋白检测仪检测基因组 DNA 的纯度和浓度。

1.3 AFLP 反应体系的建立及优化

在 Vos 等^[1]的研究基础上, 参考 NEB 试剂公司提供的酶切反应体系和 T4 DNA 连接酶说明书, 以及 AFLP Analysis System for Microorganisms AFLP Microorganism Primer Kit (Invitrogen, 2004) 说明手册, 进行试验, 建立 AFLP 体系, 并对其部分参数进行优化。

1.3.1 双酶切体系的优化 将提取的 J_2 和 M_{438} 菌体基因组 DNA 作为 AFLP 反应的模板, 用 *Mse* I 和 *Eco*R I 2 种限制性内切酶在 37 °C 条件下双酶切 6 h, 比较不同模板用量对 AFLP 酶切体系的影响。酶切体系为: BSA 0.25 μ L, Buffer4 2.5 μ L, *Mse* I (10 U/ μ L) 2 μ L, *Eco*R I (10 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 (200 ng/ μ L) 用量分别为 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ng 8 个梯度, 补加 ddH₂O 至 25 μ L。为了获得葡萄糖杆菌基因组 DNA 双酶切的最佳反应时间, 取 500 ng 模板进行双酶切, 酶切时间分别设为 2, 4, 6, 8, 10 h。酶切完成后, 于 65 °C 灭活 20 min, 取 5 μ L 酶切产物与 2 μ L loading buffer 混合, 用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测双酶切效果。双酶切产物于 -20 °C 保存。

1.3.2 连接 连接效果主要取决于连接时间, 连接时间过短, 接头与酶切片段连接不完全, 造成预扩增后缺少扩增片段; 连接时间过长又影响试验效率。按 NEB 公司 T4 DNA 连接酶产品说明书, 在 25 μ L 酶切产物中加入 10 μ L 连接反应成分, 即 ddH₂O 3.5 μ L, T4 Buffer 3.5 μ L, *Mse* I adapter 1 μ L, *Eco*R I adapter 1 μ L, T4 ligase (400 U/ μ L) 1 μ L, 过夜连接(大于 10 h), 反应在 16~22 °C 进行, 结束后 65 °C 灭活 20 min。连接产物于 -20 °C 保存。

1.3.3 预扩增 预扩增反应体系为: 连接产物 1 μ L, M_0 (10 μ mol/ μ L) 1 μ L, E_0 (10 μ mol/ μ L) 1 μ L, $MgCl_2$ (50 mmol/L) 3 μ L, *Taq* DNA polymeras (5

U/ μ L) 1 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 1 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, ddH₂O 12 μ L。预扩增程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min 后温度降至 4 °C。反应结束后, 取 5 μ L 预扩增产物与 2 μ L loading buffer 混合, 用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测预扩增效果。预扩增产物于 -20 °C 保存。

1.3.4 选择性扩增体系的优化 从 10 条选择性扩增引物组成的 24 对引物组合中 (E_0/M_0 组合除外), 任选 1 对(这里选择 E-G/M-G) 作为优化选择性扩增体系的引物对, 进行选择性扩增。选择性扩增体系为: 不同稀释倍数 (1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1 000 倍) 的预扩增产物 1 μ L, *Mse* I primer (10 μ mol/ μ L) 1 μ L, *Eco*R I primer (10 μ mol/ μ L) 1 μ L, $MgCl_2$ (50 mmol/L) 1.5 μ L, *Taq* DNA polymeras (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 0.5 μ L, ddH₂O 17 μ L。扩增程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s (每个循环下降 0.7 °C), 72 °C 延伸 1 min, 13 个循环; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 23 个循环; 72 °C 延伸 5 min 后温度降至 4 °C。反应结束后, 取 5 μ L 选择性扩增产物与 2 μ L loading buffer 混合, 用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测选择性扩增效果。选择性扩增产物于 -20 °C 保存。

1.3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 取 70 mL 60 g/L 聚丙烯酰胺, 加 400 μ L 100 g/L APS、100 μ L TEMED 制胶, 聚合 1 h 以上, 恒定电压 250 V 预电泳 30 min。在选择性扩增产物中加入 10 μ L Loading Buffer, 混匀后于 95 °C 变性 5 min, 然后立即冰浴。取 5 μ L 变性后的样品加入聚丙烯酰胺凝胶点样孔, 恒定电压 250 V 下电泳 3.5 h。

参照 Bassam 等^[24]的方法并略作改进, 进行银染, 具体步骤如下: 将凝胶从电泳板上取下, 蒸馏水漂洗 2 次, 每次 30 s; 然后于 250 mL 固定液(体积分数 10% 的无水乙醇, 体积分数 0.50% 的冰乙酸) 中固定 20 min, 蒸馏水漂洗 30 s; 放入银染液(0.6 g $AgNO_3$ 加入到 500 mL H₂O 中) 中轻轻摇动 15 min; 蒸馏水漂洗 2 次, 每次不超过 10 s; 立即放入预冷的显影液(7.5 g 无水碳酸钠溶于 500 mL 水中, 4 °C 预冷, 显影时加 5 mL 体积分数为 37% 甲醛) 中, 显色至谱带清晰。

1.3.6 AFLP 引物的筛选 用 10 条选择性扩增引物组成的 24 对引物组合 (E_0/M_0 组合除外) 进行选

择性扩增,银染后对聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱进行分析,筛选出带型质量好、分辨率高、有差异条带的引物组合。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 质量的检测

高质量的基因组 DNA 模板是 AFLP 反应成败的重要前提。由图 1 可知, J_2 和 M_{438} 的基因组 DNA 条带整齐,无弥散,点样孔附近无滞留物亮点,溴酚蓝指示剂前没有光亮区,表明基因组 DNA 完整且 DNA 纯度高,降解少,蛋白质等杂质去除彻底,无 RNA 残留。经测定, J_2 和 M_{438} 的基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 分

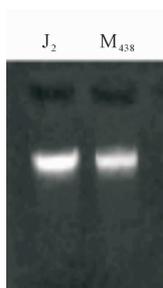


图 1 J_2 和 M_{438} 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Result of agarose gel electrophoresis of genomic DNA of J_2 and M_{438}

别为 1.98 和 1.96,质量浓度分别为 203.1 和 209.6 $ng/\mu L$,说明 J_2 和 M_{438} 的基因组 DNA 均无降解,无 RNA 污染,样品均匀,质量良好,可完全满足 AFLP 反应对高纯度基因组 DNA 的要求。

2.2 AFIP 体系的优化

2.2.1 双酶切体系 不同模板用量及双酶切时间的双酶切效果不同。模板用量过少,产生的限制性酶切片段量少,影响后续步骤;反之,模板用量过多,双酶切反应不完全。由图 2 可知,在模板用量为 100~500 ng 时, AFLP 对模板 DNA 的用量不敏感;模板用量为 600~800 ng 时,限制性酶切反应彻底,酶切产物随模板用量的增加而增大。

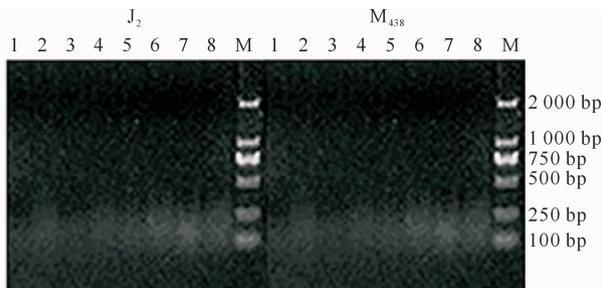


图 2 J_2 和 M_{438} 不同 DNA 模板用量对 AFLP 酶切反应的影响

M. DNA Marker DL2000; 1~8. 分别为 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ng DNA 的酶切产物

Fig. 2 Effect of *EcoR* I / *Mse* I with different concentrations on the digestion products of DNA M. DNA Marker DL2000; 1~8. Digestion products of genomic DNA of 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ng

由图 3 可知,反应时间过短,双酶切不充分,反应 8 h 以上酶切效果最佳,酶切产物分子片段较小,在电泳图上呈弥散状,说明基因组 DNA 被彻底酶

切。酶切反应的条件确定为:模板 600 ng , 37 $^{\circ}C$ 酶切 8 h。

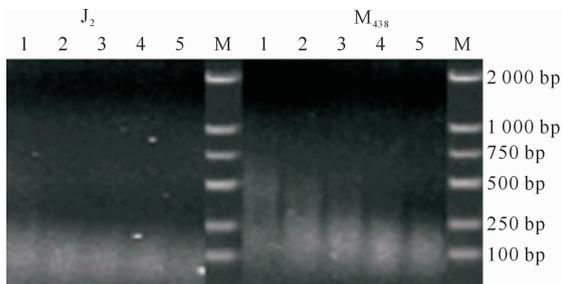


图 3 不同反应时间对 AFLP 酶切反应的影响

M. DNA Marker DL2000; 1~5. 分别为酶切 2, 4, 6, 8, 10 h 的产物

Fig. 3 Effect of *EcoR* I and *Mse* I with different reaction time on the digestion products of DNA M. DNA Marker DL2000; 1~5. Digestion products of reaction 2, 4, 6, 8, 10 h

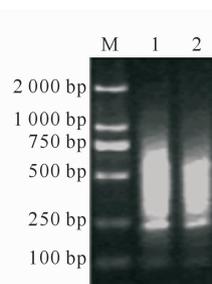


图 4 J_2 和 M_{438} 基因组 DNA 预扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

M. DNA Marker DL2000; 1, 2. 分别为 J_2 和 M_{438} 连接 10 h 产物的预扩增产物

Fig. 4 Result of agarose gel electrophoresis of pre-amplification products

M. DNA Marker DL2000; 1, 2. Pre-amplifications of ligation products for 10 h of J_2 and M_{438} , respectively

2.2.2 预扩增 由于预扩增所用的引物不含有选择性碱基,因此预扩增的选择性差,琼脂糖凝胶电泳检测时往往连成一片。

本试验中连接产物的预扩增产物片段长度为 100~750 bp(图 4),预扩增效果良好,为选择性扩增提供了理想的模板,也说明本研究中 DNA 提取、酶切、连接都符合 AFLP 的技术要求。

2.2.3 选择性扩增体系 预扩增产物须稀释后才能进行选择性扩增。由图 5 可知,预扩增产物稀释 1~20 倍,选择性扩增的效果不理想,带型弥散严重;预扩增产物稀释 30~100 倍,选择性扩增效果较好,但在大片段仍有弥散带;预扩增产物稀释 200~1 000 倍,选择性扩增效果最好,均能扩增出良好的

带型。因此,将预扩增产物稀释 500 倍的产物,确定为选择性扩增的模板。

2.2.4 AFLP 选择性扩增引物的筛选 选择性扩增引物对 J_2 和 M_{438} 的扩增结果(图 6)表明,24 对引物对 J_2 和 M_{438} 所扩增出的位点数量、带型质量均不相同;只有第 23 对引物组合(E-T/M-G)在 200~300 bp 有选择性扩增差异位点。经反复验证,E-T/M-G 选择性扩增结果符合“带型质量高、分辨率高且重现性良好”的标准(图 7),因此 J_2 和 M_{438} 的选择性扩增差异位点只有 1 处,引物对 E-T/M-G 为适合葡糖醋杆菌高静水压诱变前后菌株 AFLP 分析的选择性扩增引物。

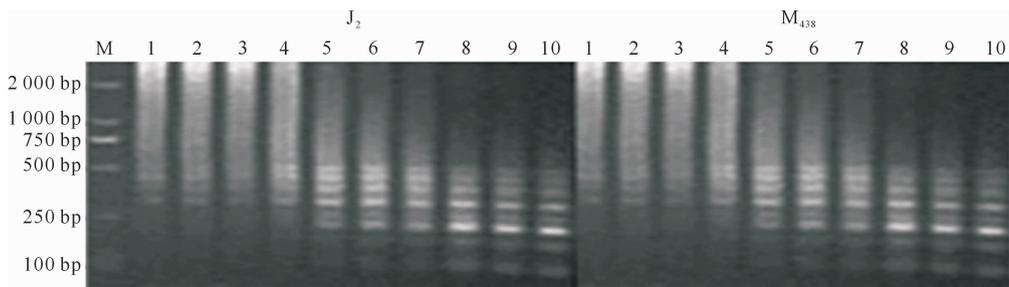


图 5 预扩增产物不同稀释倍数对选择性扩增的影响

M. DNA Marker DL2000;1~10. 分别为预扩增产物稀释 1,5,10,20,30,50,100, 200,500,1 000 倍的选择性扩增产物

Fig. 5 Effect of dilution pre-amplification products of different times on the selective amplification reaction

M. DNA Marker DL2000;1~10. Results of dilution pre-amplification products by 1,5,10,20,30,50,100,200,500, 1 000 times on the selective amplification reaction

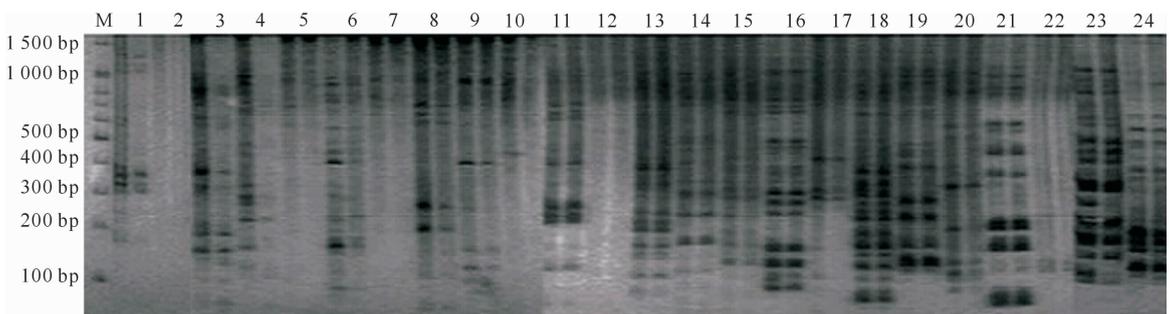


图 6 J_2 和 M_{438} 基因组 DNA 选择性扩增的银染结果

M. 100 bp Ladder;1~24. 分别为引物对 $E_0/M-A, E_0/M-C, E_0/M-G, E_0/M-T, E-A/M_0, E-A/M-A, E-A/M-C, E-A/M-G, E-A/M-T, E-C/M_0, E-C/M-A, E-C/M-C, E-C/M-G, E-C/M-T, E-G/M_0, E-G/M-A, E-G/M-C, E-G/M-G, E-G/M-T, E-T/M_0, E-T/M-A, E-T/M-C, E-T/M-G, E-T/M-T$ 等的选择性扩增产物泳道对,每对泳道左为 J_2 DNA 选择性扩增产物,右为 M_{438} DNA 选择性扩增产物

Fig. 6 Silver-staining result of selective amplification reaction of J_2 and M_{438}

M. 100 bp Ladder;1~24. Results of selective amplification reaction of M_{438} and J_2 by the primer pairs $E_0/M-A,$

$E_0/M-C, E_0/M-G, E_0/M-T, E-A/M_0, E-A/M-A, E-A/M-C, E-A/M-G, E-A/M-T, E-C/M_0, E-C/M-A, E-C/M-C, E-C/M-G, E-C/M-T, E-G/M_0, E-G/M-A, E-G/M-C, E-G/M-G, E-G/M-T, E-T/M_0, E-T/M-A, E-T/M-C, E-T/M-G$ and $E-T/M-T$, respectively.

The left band in each pair is the result of J_2 , and the right one is that of M_{438} .

经测序(Invitrogen 公司),可知 J_2 和 M_{438} 的选择性扩增差异片段长 213 bp,序列见图 8。将该序列提交 GenBank 进行 Blast 比对,其与 *Gluconace*

tobacter hansenii ATCC23769 GXY0064(GenBank 号:ADTV 01000064. 1) 基因组序列中 24 917~24 723 bp 片段相似度为 99%,但其功能不明确。因

此,葡糖醋杆菌及其突变株的细菌纤维素产量差异

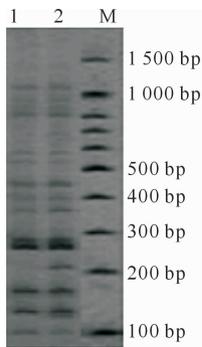


图 7 筛选出的 E-T/M-G 引物选择性扩增的银染结果
M. 100 bp ladder; 1, 2. 分别为 M_{438} 和 J_2 基因组 DNA 的扩增条带

Fig. 7 Silver-staining result of selective amplification reaction by 1 pair of screened primers
M. 100 bp ladder; 1 and 2. Results of amplification reaction of M_{438} and J_2 , respectively

3 讨论

AFLP 反应过程复杂,影响因素多,从模板 DNA 的提取到银染,每个环节都必须严格要求。高质量基因组 DNA 是 AFLP 反应体系成功建立的前提,没有高质量的基因组 DNA, AFLP 反应就不能顺利进行,得到的结果就不稳定,重现性差。因此本研究在提取过程中采用 TakaRa 细菌基因组提取试剂盒,获得了高质量的 DNA,为酶切提供了优良的模板。

基因组 DNA 的酶切是成功建立 AFLP 反应体系的关键。AFLP 反应体系是对酶切后再连接的 DNA 片段进行选择扩增,若酶切时间过短,则酶切不完全,接头难以连接;若酶切时时间过长,则整个试验周期延长,且酶切产物片段过小,影响后续试验进行,所以酶切反应时间的把握很重要。

聚丙烯酰胺凝胶的银染对获得高分辨率、高质量的谱带十分重要。银染时新配制的 $AgNO_3$ 浓度高,可适当缩短染色时间;相反, $AgNO_3$ 溶液浓度较低时则应适当延长染色时间。同时,应要掌握好染色后漂洗的时间,在染色结束后的漂洗时间不超过 10 s,银染所用的试剂最好现配现用,不宜长期保存。

本试验对影响 J_2 和 M_{438} AFLP 反应体系的各因素进行了优化,成功建立了葡糖醋杆菌高静水压诱变前后菌株差异的 AFLP 反应体系:双酶切模板 DNA 用量为 600 ng、反应时间 8 h,连接反应过夜,预扩增产物稀释 500 倍用于选择性扩增模板,适合的引物组合为 E-T/M-G。经多次重复试验证明,该

可能与遗传物质的改变有关,需进一步研究。

```
AGGCAATGCATGTCGGGAGCT
CATTAGCTTTGGCCTTCTGTCT
CTGGCTATGAAGTCACTGCCG
TTGGGAACGGCTTACACTGTC
TGGACAGGAATAGGCGCGGTT
GGGCATTCCCTGGTTGGGATAG
TTATCTGGGGGAAGCGTTCAC
GCTGKACCCGAGCTTTAGCTGC
CATCTTCATTGTTTGTGGTCTCG
TCTTACTCAGGACTCATCA
```

图 8 J_2 和 M_{438} 的选择性扩增差异片段的序列

Fig. 8 Sequence of diversity gene for selective amplification reaction of J_2 and M_{438}

体系具有较高的稳定性,说明建立并优化的 AFLP 体系,能够满足葡糖醋杆菌高静水压诱变的 AFLP 分析需要,为进一步研究高静水压对微生物的诱变作用及微生物的高静水压诱变育种奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23 (21): 4407-4414.
- [2] 尹佟明, 黄敏仁. AFLP 分子标记及其在植物育种上的应用 [J]. *生物工程进展*, 1997, 17(1): 11-16.
Yin T M, Huang M R. The AFLP technique and its applications in plant breeding [J]. *Bioengineering Evolution*, 1997, 17 (1): 11-16. (in Chinese)
- [3] 张德强, 张志毅, 杨凯. AFLP 技术在林木遗传改良中的应用 [J]. *北京林业大学学报*, 2000, 22(6): 75-78.
Zhang D Q, Zhang Z Y, Yang K. Applications of AFLP technique to genetic improvement in forest trees [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2000, 22(6): 75-78. (in Chinese)
- [4] Rajan K M, Swati Sen-Mandi. 利用多态性片段长度扩增 (AFLP) 法对印度大吉岭茶树遗传多样性的研究 [J]. *茶叶科学*, 2004, 24(2): 86-92.
Kumar R M, Swati S M. Genetic diversity estimates for Darjeeling tea clones based on amplified fragment length polymorphism markers [J]. *Journal of Tea Science*, 2004, 24(2): 86-92. (in Chinese)
- [5] Zhu S L, Monti M L, Rao R. Genetic diversity of Chinese soybean germplasm revealed by amplified fragment length polymorphism [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 1998, 10(6): 302-309.
- [6] Tohme M J, González D O, Beebe S, et al. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection [J]. *Crop Science*, 1996, 36(5): 1375-1384.

- [7] 马玉花,杨吉安,贾万忠,等. 中国不同地区杜仲 rDNA 的 ITS 序列分析 [J]. 西北林学院学报,2004,19(4):16-19.
Ma Y H, Yang J A, Jia W Z, et al. Sequence analysis of ITS of nuclear ribosomal DNA (n rDNA) of *Eucommia ulmoides* from different geographical origin in China [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(4): 16-19. (in Chinese)
- [8] Roa A C, Maya M M, Duque M C, et al. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(5/6): 741-750.
- [9] Keim P, Schupp J M, Travis S E, et al. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers [J]. Crop Sci, 1997, 37: 537-543.
- [10] Mackill D J, Zhang Z, Redona E D, et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice [J]. Genome, 1996, 39: 969-977.
- [11] 陈万权,漆小泉, R E Nikes. 利用 AFLP 遗传连锁图定位大麦苗期对叶锈病的部分抗性基因 [J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 690-694.
Chen W Q, Qi X Q, Nike R E. Localization of genes for partial resistance to *Puccinia hordei* at the seedling stage in barley by using AFLP markers [J]. Acta Genetica Sinica, 1999, 26(6): 690-694. (in Chinese)
- [12] 胡晓丽,周春江,岳良松. 三倍体毛白杨无性系的 AFLP 分子标记鉴定 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(2): 9-14.
Hu X L, Zhou C J, Yue L S. Molecular identification of *Populus tomentosa* triploid clones by AFLP [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2006, 28(2): 9-14. (in Chinese)
- [13] 黄少伟. 松树分子标记辅助育种研究进展 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 799-806.
Huang S W. Progress on the research of marker-aided breeding of *Pinus* spp. [J]. Forest Research, 2006, 19(6): 799-806. (in Chinese)
- [14] 黄韬睿,李玉锋,王 鑫. AFLP 技术及其在微生物研究中的应用 [EB/OL]. [2009-01-06] <http://www.gongkong.com/common/webmodule/media/MediaColumn.aspx?Type=mediaPaper&Pid=6-AE58-21670CC3F102&Id=2009010610552500006>.
Huang T R, Li Y F, Wang X. AFLP technology and its application in researching of microorganism [EB/OL] [2009-01-06] <http://www.gongkong.com/common/webmodule/media/MediaColumn.aspx?Type=mediaPaper&Pid=6-AE58-21670CC3F102&Id=2009010610552500006>. (in Chinese)
- [15] Gibson J R, Slater E, Xerry J, et al. Use of AFLP to fingerprint and differentiate isolates of *Hulicobacter pylori* [J]. J Clin. Microbiol, 1998, 36: 2580-2585.
- [16] Velappan N, Sondgrass J L, Hakovirta J R, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis [J]. Diag Micr Infec Dis, 2001, 39: 77-83.
- [17] Mcauliffe L, Kokotovic B, Ayling R D, et al. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4556-4565.
- [18] 贾建航,李传友,金德敏,等. 香菇空间诱变突变体的分子生物学鉴定研究 [J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 20-24.
Jia J H, Li C Y, Jin D M, et al. Molecular biological characterization of *Lentinula edodes* mutant obtained through space mutagenesis [J]. Mycosystema, 1999, 18(1): 20-24. (in Chinese)
- [19] Hauben L, Vauterin L, Moore E R B, et al. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas* [J]. Int J of Syst Bacteriol, 1999, 49: 1749-1760.
- [20] 冯 静,施庆珊,欧阳友生,等. 葡糖醋杆菌的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2009, 26(5): 10-13.
Feng J, Shi Q S, Ouyang Y S, et al. Research progress on *Gluconacetobacter* [J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(5): 10-13. (in Chinese)
- [21] 毋瑞琴. 高产细菌纤维素菌株的筛选及发酵工艺优化 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2008.
Wu R Q. Selection of strain with high-yield bacterial cellulose and optimization of fermentation process [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2008. (in Chinese)
- [22] Maria G, Cinzia C, Luciana DV, et al. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar" [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 106: 209-212
- [23] 李海星,曹郁生,付琳琳. AFLP 技术对发酵酸面团中乳酸菌多态性的研究 [J]. 微生物学杂志, 2005, 25(5): 50-53.
Li H X, Cao Y S, Fu L L. Polymorphism of *Lactobacillus strains* from sourdough by AFLP methods [J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(5): 50-53. (in Chinese)
- [24] Bassam B J, Caetano-anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal Bio Chem, 1991, 196(1): 80-83.