

菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较^{*}

徐 丽 蔡俊鹏

(华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 为建立一种快速、经济、敏感的 PCR 检测方法, 以直接检测出环境、海产品等中的靶基因, 通过 PCR 扩增已知携带 tlh 和 tdh 基因的副溶血弧菌标准菌株, 并和常规 PCR 方法比较, 初步建立了菌落 PCR 技术; 再以副溶血弧菌标准菌株为阳性对照, 以本实验室自海洋环境中分离得到的数株野生菌株为检测对象, 采用新建立的菌落 PCR 以及常规 PCR 方法对它们进行扩增比较, 进一步证明了菌落 PCR 技术检测携带相关基因菌株的可靠性. 通过比较, 发现菌落 PCR 和常规 PCR 的结果相当一致, 两种方法均能扩增出阳性对照标准菌株中 tlh 和 tdh 基因.

关键词: 菌落 PCR; 常规 PCR; tdh 基因; tlh 基因

中图分类号: Q 784

文献标识码: A

PCR 是一种快速、特异地扩增某片段 DNA 的分子生物学技术, 自其发明以来, 已在国际上得到了广泛的应用. 常规 PCR 扩增前需制备、纯化 DNA 模板, 其方法主要有酸酚法、碱酚法、碱性 SDS 裂解法、CsCl₂-溴化乙锭密度梯度离心法和煮沸裂解法等^[1]. 它们各有优缺点, 有的操作较繁, 难度大; 有的则成本较高. 例如, 酚-氯仿抽提法是一种经典方法, 这种方法需要通过蛋白酶 K 的消化及有机试剂酚、氯仿的抽提, 而最终获得基因组 DNA. 这种方法虽可以获得质量较高的 DNA, 但操作繁琐, 耗时较长, 且需要昂贵的试剂及一些特殊处理. 同时在反复的操作中 DNA 量损失也较大, 产率较低, 故需要较多的菌种材料. 另外, 一些试剂本身如酚、氯仿等不仅对 DNA 有害, 而且如果残留, 也会对 PCR 反应中的 Taq 酶产生抑制作用^[2].

菌落 PCR 方法最早见于 D. Gussow 和 T. Clackson^[3] 的文章. 他们提到, 用无菌牙签挑取单个菌落到 TE 缓冲液中, 煮沸 5 min, 漩涡振荡后短暂离心,

用 1~2 μ L 裂解液作为 DNA 模板. 省去抽提模板 DNA 这一步, 节省了大量时间和实验成本, 不失为一种经济、快速、准确的好方法^[4].

本实验采用的菌落 PCR 方法, 将样品跳过 DNA 抽提这一步, 而直接以菌体热、冻解后暴露的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 不仅节约了时间, 增加了设备利用率, 同时也降低了实验成本. 本实验采用副溶血弧菌的不耐热溶血素(tlh 基因)和耐热的直接溶血素(tdh 基因)作为扩增对象. 不耐热性溶血毒素(Thermolabile hemolysin, 简称 tlh)是副溶血弧菌产生的毒素之一, tlh 不但溶解人的红细胞, 而且溶解马的红细胞, 生化实验证明 tlh 是一种非典型的磷脂酶, 但其功能和致病性仍不清楚^[5]. 耐热的直接溶血 tdh 基因是目前公认的副溶血弧菌的主要致病因子, 它一般存在于对人体有致病性的副溶血弧菌中^[6].

本研究使用常规 PCR 和菌落 PCR 对其进行扩增, 并以其为阳性对照, 对其他几株菌株是否含有该两靶基因进行检测, 分别作了介绍.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

携带有 tlh 和 tdh 基因的副溶血弧菌标准毒力

收稿日期: 2003-07-12

^{*}基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070591, 40176036)

作者简介: 徐丽(1978-), 女, 主要从事食品生物技术方面的研究. E-mail: nancy-xu0775@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

株 vp14-90(vp-)和 vp25-91(vp+)源自上海疾病预防控制中心,由第一军医大学流行病学教研室(陈清教授)惠赠;sh06, sh10, be07, se14 等菌株系本实验室从鲍鱼肠道及其养殖水体环境中分离得到,菌株纯化后,根据菌株培养特征、细胞形态、革兰氏染色、氧化酶反应以及法国梅里埃公司 API 鉴定条鉴定的结果,分别为 sh06: *Vibrio parahaemolyticus* (分离自鲍鱼养殖水体); sh10: *Vibrio cholerae* (分离自鲍鱼养殖水体); be07: *Aeromonas salmonicida* (分离自鲍鱼肠道); se14: *Pasteurella spp* (分离自鲍鱼养殖水体). sh06 和 sh10 采用 TCBS 培养基培养, be07 和 se14 则用 2116E 培养基,其配方为:蛋白胨, 5 g; 酵母膏, 1 g; 海水 1 L; pH7.6~7.8. 培养温度均为 25 °C.

1.1.2 试剂

PCR 试剂盒, 100 bp DNA ladder, 蛋白酶 K, 十二烷基硫酸钠(SDS), 溶菌酶, RNA 酶. 购于北京鼎国生物技术发展中心.

1.1.3 引物

根据文献报道设计,并通过 Blast 的同源性分析,在 tdlh 的下游引物内设计一个混合碱基,PCR 引物由上海基康生物技术有限公司合成. 序列如下:

对于 tdlh^[7], L-tdlh: 5'-aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg-3'; R-tdlh: 5'-gct act ttc tag cat ttt ctc tgc-3'. 对于 tdlh^[8], L-tdlh: 5' gta aag gtc tct gac ttt tgg ac-3'; R-tdlh: 5'-tgg aat aga ac(g) ctt cat ctt cac c-3' [注: (g)为混合碱基].

1.2 方法

1.2.1 菌落 PCR 的 DNA 模板制备方法

将 vp+ 和 vp- 菌种接种于 LB(s)斜面培养,待检测菌接种于 2116E 培养基. 取 0.2 mL 灭菌 PCR 管,分别用来接 vp+ 和 vp- 及待检菌株. 用无菌牙签挑取单个菌落到 0.2 mL PCR 管中,加入 10 μ L 无菌 1 \times TE 缓冲液混匀(可用戴手套的手指弹击离心管),标记,盖紧,100 °C 煮沸 5 min, -20 °C 冷冻 5 min(循环 2 次),5 000 r/min 离心 1 min,吸取 8 μ L 上清液作为 PCR 扩增的 DNA 模板.

1.2.2 常规 PCR 的 DNA 模板制备方法^[9]

将菌株接种于 40 mL 2116E 液体培养基中过夜培养,5 000 r/min 离心 5~10 min,弃上清液,向沉淀中加入 20 mL 裂解液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH7.6; 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA),悬浮沉淀. 再加入 20 mL 裂解液,0.2 mL 质量浓度为 2 g/L 的 SDS(终浓度为 0.02 g/L),0.1 mL 10 mg/mL 溶菌酶(终浓度为 0.05 mg/mL),40 μ L 10 mg/mL 蛋白酶 K(终浓度

为 20 μ g/mL), 4 μ L 10 mg/mL RNase A(终浓度为 2 μ g/mL), 37 °C 裂解 2 h. 4 000 r/min 离心 5 min,将上清液转去一个新管中,加入 50 mL 酚,充分摇匀,再加入 50 mL 氯仿,充分摇匀,4 000 r/min 离心 10 min,取上清,重复 2 次上述酚氯仿抽提过程,4 000 r/min 离心 10 min. 将上清液转入一个新管,加入 2 倍体积体积分数为 1 的冷乙醇(-20 °C)和 0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸钠,充分摇匀,15 000 r/min 离心 15 min,小心倒去上清液,加入体积分数为 0.8 的冷乙醇(-20 °C)清洗沉淀表面,15 000 r/min 离心 15 min. 弃上清液,空气干燥 5~10 min,用 1 mL 1 \times TE 缓冲液(pH8.0)悬浮.

1.2.3 PCR 扩增

参考文献[1]中的 PCR 设计原则,综合考虑各个因子的影响水平,采用 50 μ L 反应体系. 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+} 1.5 mmol/L)5 μ L, dNTP(10 mmol/L) 1 μ L, 上、下游引物(25 μ mol/L)各 2 μ L(终浓度为 1 μ mol/L), Taq 酶(每微升含 2 单位)2 μ L. 对菌落 PCR,模板为 8 μ L 上清液,对常规 PCR,模板为 1 μ L DNA(DNA 浓度约为 100 ng/L),补双蒸水至 50 μ L.

综合两对引物的退火温度, t_{L-tdlh} =55.7 °C, t_{R-tdlh} =54.0 °C, t_{L-tdlh} =53.5 °C, t_{R-tdlh} =53.1 °C, 实验从退火温度 45 °C 开始,选择最佳退火温度为 54 °C,可将两种基因特异地扩增出来.

PCR 参数: 95 °C 预变性 5 min; 主循环 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 30 次; 终延伸 72 °C 7 min; 4 °C 保存.

设立阳性对照和没有模板的阴性对照.

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳

用 1 \times TAE 缓冲液配制质量浓度为 0.1 g/L 的琼脂糖凝胶,加 EB 至终浓度为 0.5 μ g/mL. 将 PCR 扩增产物与 6 倍载样缓冲液混合,每个样品加样 10 μ L, 10 V/cm 电泳 40 min,用紫外凝胶成像系统拍摄电泳结果.

2 结果与分析

2.1 菌落 PCR 扩增参数的确定

退火温度是影响 PCR 特异性的一个主要因素,退火温度越高,特异性越强. 因此,为了保证反应的特异性,本实验从较低的退火温度开始,即从 45 °C 开始摸索,兼顾特异性阳性对照条带扩增成功及其亮度,最后确定最佳退火温度为 54 °C. 对于菌落

PCR 的模板, 开始试验直接将沸、冻后, 包括裂解的细胞壁等杂质的裂解液作为模板. 但经过扩增后发现, 可能由于细胞内的蛋白质、细胞壁等杂质的缘故, 使得反应的非特异性结合较多, 电泳后出现较明显的拖尾现象, 且有时会抑制扩增反应, 使得反应的重现性较差. 经 5 000 r/min 离心 1 min 后, 取 8 μ L 上清液作为模板, 反应效果明显增强.

2.2 菌落 PCR 与常规 PCR 的比较

根据 DNA 序列的分析以及相关文献报道^[7~9], 采用我们设计的引物对, 预计 t_{lh} 扩增条带长为 450 bp, t_{dh} 的扩增条带长为 269 bp. 因此, 凡是在该两处出现扩增条带的样品, 均定为阳性.

2.2.1 两种 PCR 方法对 t_{lh} 基因的扩增

在选择了最佳退火温度后, 为了辨别菌落 PCR 反应效果如何, 在相同条件下, 我们同时做了常规 PCR 和菌落 PCR 的对比试验, 结果见图 1.

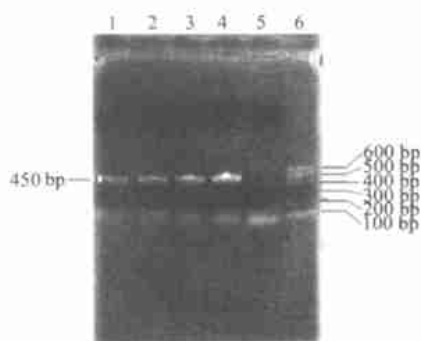


图 1 菌落 PCR 和常规 PCR 对 t_{lh} 的扩增对比

Fig. 1 Comparison of colony PCR and conventional PCR products amplified with t_{lh} primers

- 1—菌落 PCR(v_p+); 2—菌落 PCR(v_p-);
3—常规 PCR(v_p+); 4—常规 PCR(v_p-);
5—阴性对照; 6—100 bp DNA ladder

由图 1 可见, 1, 2, 3, 4 泳道在 450 bp 出现特异亮带, 可以断定两种方法均扩增出 t_{lh} 基因. 之后, 我们又进一步采用菌落 PCR 的方法对 sh06, be07, sh10, se14 四株菌进行 t_{lh} 靶基因扩增(见图 2). 从图 2 可以看出, 阳性对照 v_p+、v_p- 成功地获得了扩增; 同时, 待检菌株 sh06, be07 在 450 bp 处也出现明显亮带(第 3, 5 泳道), 说明这两株菌中含有 t_{lh} 基因.

图 3 为以 v_p+, v_p- 为阳性对照的、对 sh06, be07, sh10, se14 四株菌进行 t_{lh} 靶基因扩增的常规 PCR 结果的电泳图. 同样地, 阳性对照 v_p+, v_p- 成功地获得了扩增. 同时, 待检菌株 sh06, be07 在 450 bp 处也出现明显亮带(第 3, 4 泳道), 与菌落 PCR 结果完全一致. 比较两个图谱, 发现从扩增效果

上来看, 虽然菌落 PCR 方法的电泳结果有拖尾现象, 但就定性检测而言, 已经达到了证明靶基因存在的目的.

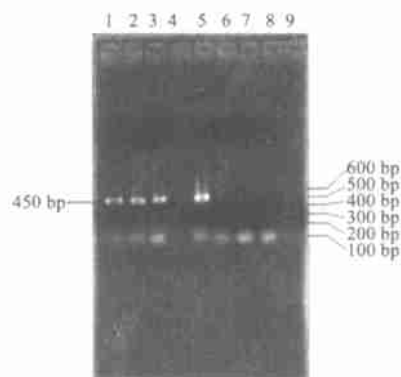


图 2 t_{lh} 引物的菌落 PCR 电泳图谱

Fig. 2 Gel electrophoresis of colony PCR products amplified with t_{lh} primers

- 1—阳性对照(v_p+); 2—阳性对照(v_p-); 3—Sh06;
4—未加样; 5—Be07; 6—Sh10; 7—Se14;
8—阴性对照; 9—100 bp DNA ladder

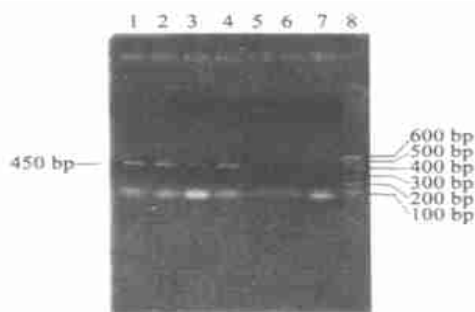


图 3 t_{lh} 引物的常规 PCR 电泳图谱

Fig. 3 Gel electrophoresis of conventional PCR products amplified with t_{lh} primers

- 1—阳性对照(v_p+); 2—阳性对照(v_p-); 3—Sh06;
4—Be07; 5—Sh10; 6—Se14; 7—阴性对照;
8—100 bp DNA ladder

2.2.2 两种 PCR 方法对 t_{dh} 基因的扩增

首先, 我们采用菌落 PCR 和常规 PCR 两种方法对阳性对照菌株 v_p+ 和 v_p- 进行了扩增(见图 4). 在 269 bp 处均出现明显亮带, 由此我们可以确定这两种方法均可以扩增出 t_{dh} 基因. 同样, 在确定了方法之后, 我们进一步用这两种方法对 sh06, be07, se14, sh10 四株待检菌株是否含有 t_{dh} 靶基因进行了检测. 从图 5 可知, 没有待检菌株含有 t_{dh} 基因. 图 6 为常规 PCR 方法的扩增结果, 除了两个阳性对照以外, 其它泳道也均没有亮带. 由此可见, 两种方法得到的结果完全一致.

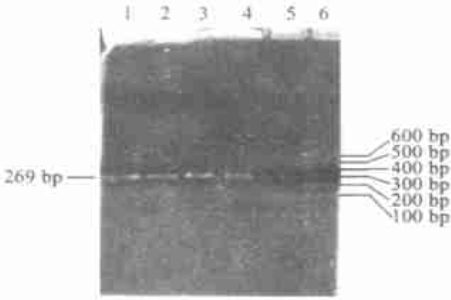


图4 菌落 PCR 和常规 PCR 对 tdh 的扩增对比
Fig.4 Comparison of colony PCR and conventional PCR products amplified with tdh primers

1—菌落 PCR(vp+);2—菌落 PCR(vp-);
3—常规 PCR(vp+);4—常规 PCR(vp-);
5—阴性对照;6—100 bp DNA ladder

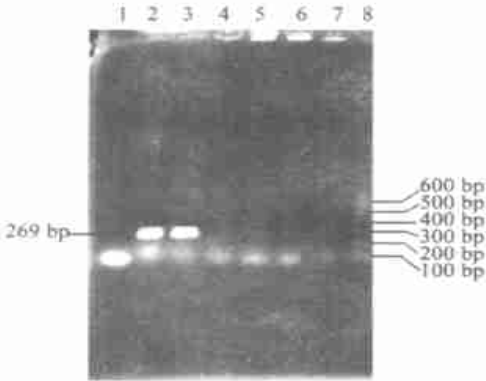


图5 tdh 引物的菌落 PCR 电泳图谱
Fig.5 Gel electrophoresis of colony PCR products amplified with tdh primers

1—阴性对照;2—阳性对照(vp+);
3—阳性对照(vp-);4—Sh06;5—Se14;6—Be07;
7—Sh10;8—100 bp DNA ladder

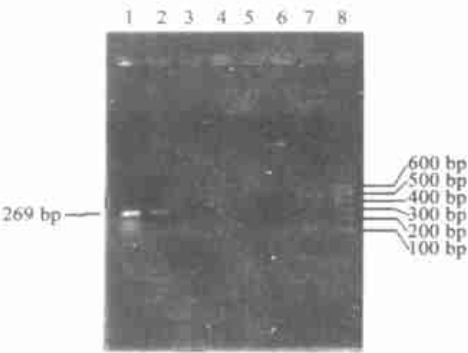


图6 tdh 引物的常规 PCR 电泳图谱
Fig.6 Gel electrophoresis of conventional PCR products amplified with tdh primers

1—阳性对照(vp+);2—阳性对照(vp-);
3—Sh06;4—Se14;5—Be07;6—Sh10;
7—阴性对照;8—100 bp DNA ladder

3 结论

通过对菌落 PCR 方法和常规 PCR 方法扩增结果的分析比较可知,两种方法得到的结果完全一致,只是在效果上,菌落 PCR 稍逊一筹.同时,我们还发现,正如 D.Gussow 和 T.Clackson^[3] 所述,煮沸、冻解后暴露出的 DNA 要及时进行 PCR 扩增,不能放置太久,否则扩增效果略差.从电泳图上都可以看到,相同条件下菌落 PCR 存在着一些非特异性结合的现象,这可能是细胞里的破碎细胞壁、其它蛋白质、多糖等杂质的存在影响或抑制了扩增反应,使得扩增效果不太理想.但是如果用作定性检测,菌落 PCR 不失为一种好方法,它能得到与常规 PCR 相同的结论,且可以节省大量的人力、物力和财力,同时还可减少或避免因操作步骤过多产生污染所带来的假阳性等问题,确实是一种切实可行的检测和监测方法.本方法可用于水产养殖的水体环境监测、进出口水产品卫生检测及临床诊断,以便及时、有效地发现问题,确保商家和消费者的利益.

参考文献:

[1] 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]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999. 19—30.
[2] 刘伏玲, 倪晓燕, 马威成. 基因 DNA 制备方法的探讨 [J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(9): 70—76.
[3] Gussow D, Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 4 000.
[4] 唐晔盛, 李英. 菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(2): 316—318.
[5] 李志峰, 聂军. 副溶血弧菌 tth 基因的克隆及序列分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(2): 10—12.
[6] 鲁开国, 胡智慧, 生菊, 等. PCR 检测副溶血弧菌耐热直接溶血素和耐热直接相关溶血素基因的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 1995, 5(2): 83—85.
[7] 吴振龙, 聂军, 鲍慧宁, 等. 副溶血弧菌耐热直接溶血素基因的克隆 [J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 136—139.
[8] Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microb Pathogen, 1986(1): 425—432.
[9] Nishibuchi M, Kaper J B. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Bacteriol, 1985, 162: 558—564.
[10] Asim K, Bej, Donald P Patterson, Cynthia W Brasher, et al.

Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of

tlh, tdh and trh [J] . J of Microbiol Methods, 1999, 36: 215—225.

Establishment of Colony PCR Method and Its Comparison with Conventional PCR Method

Xu Li Cai Jun-peng

(College of Food and Biological Engineering, South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: To establish a quick, sensitive and economical PCR method for directly detecting tlh and adh genes-carrying *Vibrio parahaemolyticus* in environment and seafood, a colony PCR method was developed and its results were compared with those of the conventional PCR method, thus establishing a colony PCR method. By using the *Vibrio parahaemolyticus* strains as positive controls, several marine bacteria strains preserved in the lab were amplified through the colony PCR method and the conventional PCR method, by which the reliability of colony PCR method for the corresponding gene detection was proved. The comparison shows that the results obtained by colony PCR method are in great agreement with those obtained by the conventional PCR method, and that the tlh and tdh genes in positive controls can be amplified by these two PCR methods.

Key words: colony PCR; conventional PCR; tdh gene; tlh gene

(上接第 50 页)

自养、异养和混养下小球藻的生长及生化成分^{*}

王海英 郭祀远 郑必胜 李存芝

(华南理工大学 轻化工研究所, 广东 广州 510640)

摘 要: 对小球藻在自养、异养和混养条件下的生长状况及细胞的生化成分(如可溶性蛋白、可溶性糖、叶绿素及脂肪酸组成)进行了研究. 结果表明: 异养和混养培养的小球藻的生物量远大于自养时的生物量; 异养和混养培养的小球藻的比生长速率分别是自养时的 2.13 倍和 3 倍; 光照对混养条件下的细胞生长有影响, 但光照强度为 2.5 klx 和 4.0 klx 时细胞生长的差别并不明显, 尤其在稳定生长期; 与自养生长相比, 异养过程中小球藻的脂肪含量明显增加, 可溶性蛋白和可溶性糖的含量则有不同程度的降低, 叶绿素含量大大减少; 异养有利于亚麻酸的积累; 在混养条件下, 光照使可溶性蛋白、可溶性糖和叶绿素的含量增加, 其强度对细胞的生化成分有影响.

关键词: 小球藻; 生化成分; 生长; 自养; 异养; 混养

中图分类号: Q 815 文献标识码: A

文章编号: 1000-565X(2004)05-0047-04

责任编辑: 傅晓琴

收稿日期: 2003-10-29

^{*} 基金项目: 广东省科技攻关项目(99M01409G)

作者简介: 王海英(1974-), 女, 博士生, 主要从事微藻生物技术研究. E-mail: whyzb@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>