

锁核苷酸 PCR 解析植物内生细菌多样性方法

Locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide PCR clamping method for investigating the plant endophyte bacteria

于镇华¹, Makoto Ikenaga², Masao Sakai², 王光华^{1*}

¹ 中国科学院黑土区农业生态重点实验室, 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨, 黑龙江, 150031

² 日本鹿儿岛大学农学院, 日本鹿儿岛, 890-0065

*通讯作者邮箱: wanggh@iga.ac.cn

摘要

对植物内生细菌进行 PCR 扩增是内生细菌多样性研究的关键实验环节, 对后续进一步解析植物内生细菌多样性和他们的生态功能具有重要意义。但是, 由于植物线粒体和叶绿体 SSU rRNA 基因序列与细菌 SSU rRNA 基因序列存在高度的相似性, 因此, 采用传统的 PCR 扩增方法会带来大量源自植物细胞器扩增产物的污染, 给后续的内生细菌群落结构分析带来干扰。为了克服这一难题, 本方法采用锁核苷酸 LNA (Locked Nucleic Acid) 引物对植物细胞器 SSU rRNA 进行锚定, 可以有效地遏制植物细胞器 SSU rRNA 基因的扩增, 从而达到特异性扩增内生细菌的 SSU rRNA 基因的目的。该方法可与高通量测序方法结合起来获取更多植物内生细菌多样性信息。

关键词: 植物内生菌, 锁核苷酸, LNA, PCR, SSU rRNA 基因

材料与试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (BioTeke, 货号 DP3111)、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Indianapolis IN, USA, Code No. 11732668001)、移液器、枪头、无菌水、PCR 相关试剂 (Takara RR030A Premix Ex Taq™ Hot Start Version, Code No. RR030A)、LNA 扩增引物和细菌特异性扩增引物 (华大公司合成)。

仪器设备

超纯水仪、LDZX-75KB 立式压力蒸汽灭菌器、-20℃ 冰箱、BIO-RAD 低温离心机、DYY-6C 型电泳仪、超净工作台、PCR 仪、Gel Doc 凝胶成像系统、FM40 制冰机。

实验原理:

本方法的设计原理如图 1 所示, 主要是通过设计与常规细菌 PCR 引物有交叠序列的、针对于植物细胞器的特异 LNA 引物, 由于 LNA 引物的 T_m 值较高, 因此可在较高温度 (70℃) 时与植物细胞器基因退火, 而常规细菌 PCR 引物不能完成此过程。之后, 由于交叠部分的碱基位置被 LNA 引物锚定, 在较低温度的 T_m 值时, 如 54℃时, 常规

PCR 产物不能和植物细胞器基因退火，加之 LNA 引物的 3'端引物被磷酸化，不能被用于 PCR 引物，PCR 反应被终止，从而达到选择性的扩增细菌 SSU rRNA 基因，而抑制了植物细胞器基因扩增的目的。

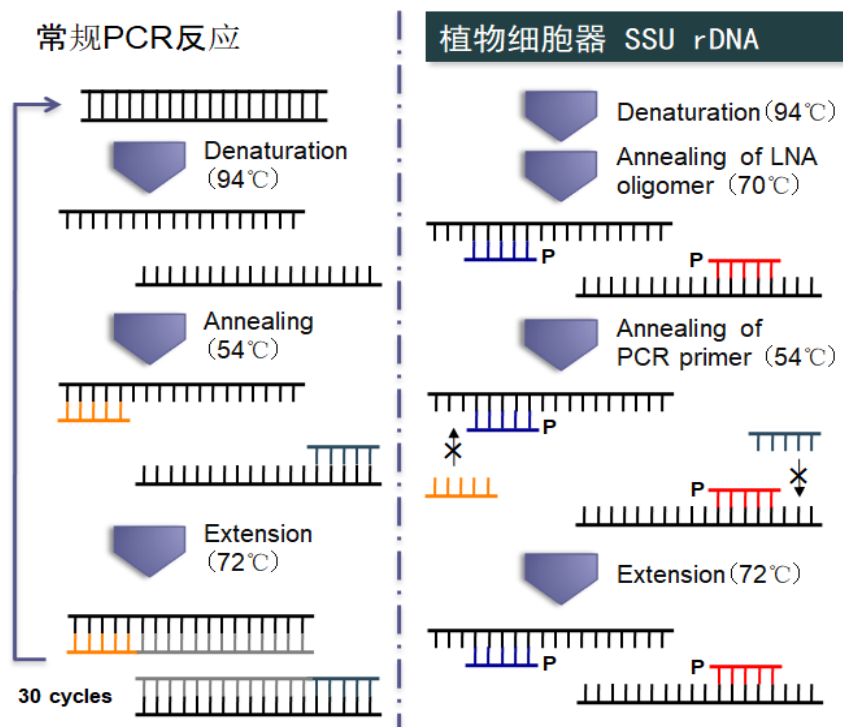


图 1 LNA-PCR 工作原理简图

实验步骤

以提取样品 DNA 为模板，利用 LNA-PCR 引物（表 1）进行第一轮 PCR 扩增，25 μL 反应体系为：Premix (5 U μL^{-1} , ExTaq, Takara) 12.5 μL 、KU63f/KU1494r (20 pmol μL^{-1}) 各 1 μL 、LNA-Mit63/LNA-Mit1492 (20 pmol μL^{-1}) 各 3.75 μL 、LNA-Pla63/LNA-Pla1492 (20 pmol μL^{-1}) 各 1.25 μL 、DNA 模板 0.5 μL 、无菌水定容至 25 μL 。扩增条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、70 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min (30 个循环)、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。获得 PCR 产物后，将 PCR 产物进行琼脂糖电泳检测，电泳条件如下（供参考，可根据电压和电泳时间进行调整）：琼脂糖浓度 1-1.5%；电压 120 V-150 V；marker (100 bp-1500 bp)。此步 PCR 反应的目的是抑制来自植物体本身细胞器的基因对 PCR 扩增的干扰，最大限度的提高来自植物内生细菌基因的 PCR 扩增。研究者可以根据自身实验目的和需求，决定是否以第一步 PCR 扩增产物为模板进行第二步 PCR 反应。比如，想用 DGGE 技术来研究植物内生细菌多样

性，那么，由于第一步 PCR 反应的产物片段较长，不适用于 DGGE 技术（片段长度最好小于 500 bp），因此需要通过第二步 PCR 扩增缩短片段长度；如果想进行二代高通量测序，也需要进行第二步 PCR 扩增来缩小片段长度并使用带 barcode 的扩增引物。进行第二步 PCR 时首先要利用 High Pure PCR Product Purification Kit（Roche, Indianapolis IN, USA, Code No. 11732668001）对上述 PCR 产物进行纯化，目的是对第一步 PCR 产物进行纯化稀释，去除第一步 PCR 产物中可能会对第二步 PCR 反应产生干扰的杂质，比如盐类物质和核苷酸等（详细纯化步骤及试剂盒原理请参照试剂盒说明书介绍），以便第二步 PCR 扩增获取更好的扩增效果。

第二轮 PCR 扩增以上述第一轮 PCR 产物经纯化稀释后的样品为模板^{注 1}，以 341F/907R（341F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'；907R（5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'）为扩增引物，进行第二轮扩增^{注 2}。25 μ L 反应为：Premix（5 U μ L⁻¹，ExTaq，Takara）12.5 μ L、341F/907R（20 pmol μ L⁻¹）各 1 μ L、第一轮 PCR 产物 1 μ L、无菌水定容至 25 μ L 扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 3 min、94 $^{\circ}$ C 1 min、54 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min（30 个循环^{注 3}）、72 $^{\circ}$ C 10 min。

采用该方法所得的 PCR 产物可有效排除来自植物细胞器 SSU rRNA 基因的干扰，可进行高通量测序等下游实验，而且后续结果分析中也不需要进一步人工筛选不属于植物内生细菌的序列。

表 1 LNA-PCR 扩增引物和细菌特异性扩增引物

Table 1 Sequences of the designed LNA oligonucleotides and bacterial primers specific for the SSU rRNA genes from plant mitochondria and plastids

LNA 扩增引物和细菌 特异性扩增引物 LNA oligonucleotide and bacterial primers	序列 Sequence	长度 Length (bases)	参考文献 Reference
LNA-Mit63	5'- <u>GTC</u> GAACGTTGTTTTCGGp-3'	18	(Ikenaga and Sakai 2014)
LNA-Mit1492	5'- <u>CTT</u> CACCCCAGTCGAAGAp-3'	18	(Ikenaga and Sakai 2014)
LNA oligonucleotide	LNA-Pla63（大豆）5'- <u>T</u> CGGACGGGAAGTGGTp-3'	16	(Yu 等, 2016)
	LNA-Pla1492（大豆）5'- <u>CTT</u> CACTCCAGTCACTAGCp-3'	19	(Yu 等, 2016)
	LNA-Pla63（玉米）5'- <u>GTC</u> GAACGGGAAGTGGTp-3'	17	(Ikenaga and Sakai 2014)
	LNA-Pla1492（玉米）5'- <u>CTT</u> CACTCCAGTCGCAAGCp-3'	19	(Ikenaga and Sakai 2014)

2014)

Bacterial primer	KU63f	5'-GCYTWAYACATGCAAGTC-3'	18	(Ikenaga 等, 2018)
	KU1494r	5'-GGYTACCTTGTTACGAC-3'	17	(Ikenaga 等, 2018)

注：“粗体碱基”表示 LNA 碱基；“下划线碱基”表示 LNA 引物和细菌引物交叉部分；“p”表示 3'末端为磷酸化处理。

其中

注意事项：

1. 不同植物的 LNA-Pla63/1492 序列有所不同，本表格以大豆和玉米为例展示不同之处，
可以和大豆使用相同引物的植物还包括黄瓜、菠菜、莴苣和荞麦等；可以和玉米使用相同引物的植物还包括水稻、小麦、玉米和大麦等。
2. 本方法采用的引物浓度为推荐浓度，具体实验时可根据第一步 PCR 结果调整引物浓度。比如，研究者发现经过第一轮 PCR 后，PCR 产物中仍然有来自植物细胞器的基因被扩增出来，那么可能说明第一轮 PCR 扩增中的 LNA 引物浓度太低，可适当加大浓度。

注释：

1. 此步稀释可以先选择少量样品进行不同稀释浓度的 PCR 扩增效果摸索，找到最优扩增效果下的稀释梯度，进而再对所有样品进行该稀释浓度下的 PCR 扩增。本方法中，作者将第一步 PCR 产物的 10^{-1} - 10^{-4} 稀释度都进行了 PCR 扩增和琼脂糖电泳检测，发现 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释度下条带杂带较少，最后从中选择了 10^{-3} 稀释度作为第二步 PCR 反应的模板。
2. 此步扩增引物可以根据下游实验需要进行更换，比如，如果进行变性梯度凝胶电泳，那么可以换成带 GC-夹的引物；如果进行高通量测序，可以换成带 barcode 的引物，本方法中使用的具体 barcode 引物序列是测序公司提供的，但需要提前告知测序公司样品数目和本次测序所用的引物，测序公司会基于以上两点给出与每一个样品对应的 barcode 引物序列，也可以根据拟测序公司提供的 barcode 引物序列自行选择引物合成公司进行 barcode 引物的合成。
3. 本研究中作者在进行 PCR 扩增时发现 30 个循环是能够将所有样品都扩增出来的最低循环数，因此采用了 30 个循环，在数据处理分析时也没有发现高比例的嵌合体，故采用了 30 个循环，此步骤中研究者可以在保证扩增效率的前提下使用最低的循环数。

结果与分析

采用此方法得到的第一轮 PCR 产物经电泳检测后，在未采用 LNA 引物进行 PCR 扩增的样品中来自植物叶绿体和线粒体的条带占有优势，相反，在采用 LNA 引物进行 PCR 扩增的样品中，来自植物内生细菌的条带占有优势，如下图所示：

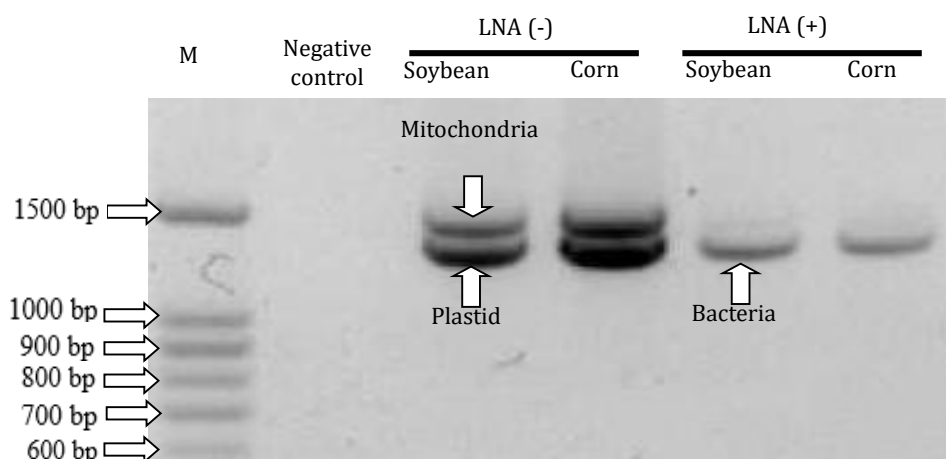


图 2 以大豆和玉米内生细菌 PCR 为例，说明 LNA-PCR 效果图，marker（100 bp-1500 bp）

Fig 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified from the roots of soybean and corn with or without LNA oligonucleotides. M is the marker of 100 bp ladders.

（图片来源：Yu et al., 2016）

以上述第一轮PCR产物为模板，采用带有barcode的细菌引物进行第二轮PCR扩增，再进行高通量测序后发现，对于大豆样品，采用LNA-PCR扩增后没有发现来自大豆叶绿体和线粒体的序列，而未采用LNA-PCR扩增后来自叶绿体和线粒体的序列分别占序列总数的66.43%和1.33%；对于玉米样品，采用LNA-PCR扩增后来自叶绿体和线粒体的序列分别占序列总数的0.13%和0.88%，而未采用LNA-PCR扩增后来自叶绿体和线粒体的序列分别占序列总数的93.15%和4.23%，进一步说明本方法在研究植物内生细菌多样性方面的优势。

致谢

- 1.感谢中国科学院战略先导对本工作的支持（XDB15010103）；
- 2.感谢日本鹿儿岛大学 Masao Sakai 和 Makoto Ikenaga 对实验技术的指导；
- 3.已发表的使用过本实验方案的文章详见Ikenaga et al., 2014 (Microbes and Environments, 29, 286–295)；Ikenaga et al., 2015 (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79, 1556–1566)；Yu et al., 2016 (Journal of Integrative Agriculture 2016, 15(8): 1883–1891)；Ikenaga et al., 2018 (Microbes and Environments, 33, 340–344)；喻江等（应用生态学报，2016，27(8)：2663–2669）；喻江（东北农业大学博士学位论文，2016）。

参考文献

1. Ikenaga, M., Katsuragi, S., Handa, Y., Katsumata, H., Chishaki, N., Kawauchi, T. and Sakai, M. (2018). Improvements in Bacterial Primers to Enhance Selective SSU rRNA Gene Amplification of Plant-associated Bacteria by Applying the LNA Oligonucleotide-PCR Clamping Technique. *Microbes and Environments* 33(3): 340-344. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18071>
2. Ikenaga, M. and Sakai, M. (2014). Application of Locked Nucleic Acid (LNA) Oligonucleotide-PCR Clamping Technique to Selectively PCR Amplify the SSU rRNA Genes of Bacteria in Investigating the Plant-Associated Community Structures. *Microbes and Environments* 29(3): 286-295. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14061>
3. Yu, Z.-H., Yu, J., Ikenaga, M., Sakai, M., Liu, X.-B. and Wang, G.-H. (2016). Characterization of root-associated bacterial community structures in soybean and corn using locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping and 454 pyrosequencing. *Journal of Integrative Agriculture* 15(8): 1883-1891. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61195-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61195-9)