

浓度梯度凝胶配制的简易装置设计及应用效果^{*}

王德国¹ 雷勃钧² 张俐俐² 刘琦² 刘昭军²

(1. 东北农业大学生命科学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要 PCR-DGGE 是分子生物学工作者分析微生物区系的一个有效的方法, 但是较贵的浓度梯度配胶设备限制了该技术的应用, 一个简易的装置能够有效地普及这项技术。本文报道了这一简易装置的设计和利用该装置对大豆根化感物质降解细菌的分析效果。

关键词 浓度梯度凝胶; 电泳; 装置; 大豆根际细菌

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)02-0195-02

0 前言

目前, 在生态学和环境科学的研究领域, 关于土壤微生物, 尤其是土壤中微生物多样性及其在生态系统中的作用的研究越来越受到重视; 对土壤生物的研究方法大多采用平板计数法, 该方法认为是检测特殊微生物群变化的非常有用的方法。但传统的平板培养分离方法, 对研究土壤微生物多样性有很大的缺陷和局限性, 如可分离出微生物种类只占土壤微生物种类总数的 0.1%~1%^[1], 且这种分离培养方法不能很好地反映土壤微生物多样性的原始状态等, 这就使得采用新的技术和方法显得尤为必要^[2]。

随着现代分子生物学和分子技术的发展, 使对土壤生物的分析进入分子水平。其中浓度梯度变性凝胶电泳(DGGE)技术, 已成为目前对土壤生物分析的最有效的分子生物学方法。DGGE 可广泛用于分析自然环境中细菌、蓝细菌, 古细菌、微微型真核生物、真核生物和病毒群落的生物多样性。这一技术能够提供群落中优势种类信息和同时分析多个样品。具有可重复和容易操作等特点, 适合于调查种群的时空变化, 并且可通过对切下的带进行序列分析与特异性探针杂交分析鉴定群落成员^[3,4]等。

进行 DGGE 技术分析, 关键是配置浓度梯度胶, 而现在市场上销售的比较好的配置浓度梯度胶

的设备都在近万元以上。为节约经费, 我们设计了一个装置, 可以在普通生物学实验室设备的基础上只增加一元的投资, 买两个医用输液管, 就可以制出理想的梯度浓度胶。利用该装置对大豆根际化感物质降解细菌进行了分析, 取得满意效果。现将该简易装置的设计和使用效果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

两个 50mL 烧杯; 两个医用输液管; 磁棒, 磁力搅拌器, 制胶板

1.2 方法: 如图(1)。

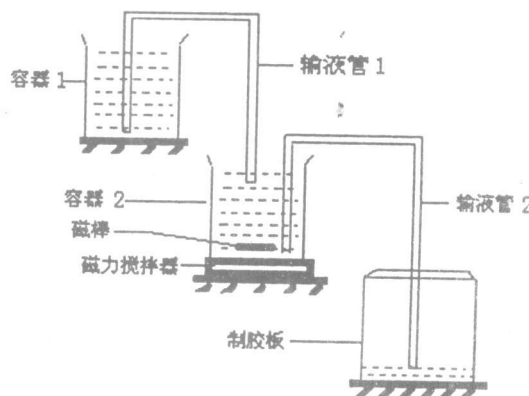


图 1 浓度梯度凝胶配制装置

Fig. 1 Equipment for making denature gradient gel

* 收稿日期: 2005-11-30

作者简介: 王德国(1975-), 男, 讲师, 在读硕士, 研究方向农业应用微生物。

①将两个容器和制胶板放置于不同高度;②启动磁力搅拌器;③用注射器或吸耳球吸取输液管2中的空气,使容器1中低浓度的溶液流到容器2中;④用注射器或吸耳球吸取输液管2中的空气,使容器2中高浓度的液体流到制胶板中,随着液面升高不断提升输液管2。

2 技术原理及应用效果

2.1 原理

变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对PCR产物进行分离,其主要原理基于在含有浓度线形递增的变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的聚丙烯酰胺凝胶

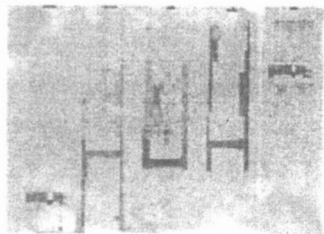


图2 用简易装置制作的梯度胶上的电泳图谱

Fig. 2 DGGE fingerprints of 5 bacteria on gel made by simple equipment

3 讨论

在制胶过程中需要注意的问题有三个,一是控制流速20~40滴/分钟;二是将制胶板平放稍微倾斜,防止流速快而导致的边缘和中间的胶不均匀;三要注意输液管不要太长,防止胶液长时间不与氧接触而凝固。这个简易装置的设计可以降低经济相对紧张的分子生物学实验室对设备的投入,同时能加速变性梯度聚丙烯酰胺电泳技术的普及。

参 考 文 献

1 Brock TD. The study of microorganisms in situ: progress and problems[J]. Symp. Soc. Gene. Microbiol., 1987, 41: 1-17

电泳中,部分解链的双链DNA分子的电泳迁移率降低;而序列不同的DNA分子有着不同的解链行为,它们在凝胶的不同位置停止迁移,从而使长度相同而序列不同的DNA片段分离^{5~7}。

2.2 应用效果

本实验室所筛选的大豆根际化感物质降解细菌HK53-1、HK46-2、HN31-1、HK26-2、HK14-2的V3区经PCR扩增后,在上述装置制备的凝胶上电泳,变性剂浓度为35%~65%(100%变性剂为7M尿素,40%的甲酰胺),电压80V,温度60℃,16小时。图谱如图(2)所示,和SJ-1060GF(2300122)梯度制胶器配置的凝胶上的电泳图谱相比较,如图(3),几乎具有完全一致的效果。

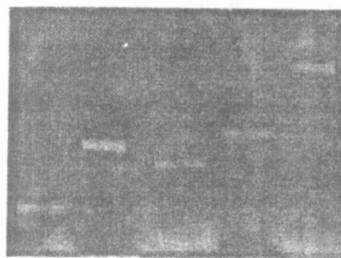


图3 用SJ-1060GF(2300122)梯度制胶器制作的梯度胶上的电泳图谱

Fig. 3 DGGE fingerprints of 5 bacteria on gel made by SJ-1060GF(2300122)

2 Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol. Rev. 1995, 59(1): 143-169.

3 付琳林, 李海星, 曹郁生. 利用变性梯度凝胶电泳分析微生物的多样性[J]. 生物技术通报, 2004, (2): 38-42.

4 马悦欣, Carola Holmström, Jeremy Webb, Staffan Kjelleberg. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2003, 23(8): 1561-1569.

5 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报, 2003, 23(8): 2170-2175.

6 赵翔, 安志东. 现代生物技术在环境微生物学中的应用 III: 限制性片段长度多态性分析、变性/温度凝胶电泳和报道基因[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 2(25): 51-54.

7 刘上峰, 傅俊江, 李麓芸. 变性梯度电泳的原理、应用及其进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2002, 2(25): 74-76.

(下转第198页)

科技论文中,主要目的就是突出研究结论,将研究结果分析后的数据列入表格即可,原始数据不必列入;还有的表格过大、内容过多,一个版面都排不下,这种表格最好精简。列入表内的数据应是有显著意义的主要数据,其他次要的不必列入,使读者快速获得数据内在规律。

4 计量单位(Unit)

法定计量单位是自然科学界国际、国内共有的科技语言。对于常用的计量单位,国家标准有明确严格的规定。科技期刊执行量和单位的国家标准,有利于国内外的学术交流,有利于科技期刊走向世界。在编辑部收到的一些稿件中,发现有一些量和单位使用的不规范,如过去常用的土地面积“亩”,现已改用“ hm^2 ”、“ m^2 ”,可有些作者还使用“亩”;还有的使用相关学科已废弃的量和单位的名称,如克分子浓度、克当量浓度和“ ha^{-1} ”等。之所以出现这些问题,可能是这些作者对现在的国家标准不了解,希望作者在撰稿时应遵循征稿简则的要求,使用计量单位参照现在公布的国家标准。

5 参考文献(Reference)

参考文献在科技期刊的引用体现了科学和技术发展的继承性和连续性,它是科技论文的重要组成部分。美国科技情报研究所(ISI)出版的科学引文索引(SCI)就是对其选刊中论文被引用情况进行考察分析,以此为依据,提出总被引频次,影响因子和即年指标等文献计量学指标,以反映论文在科学发展中的影响力及其在科学研究中的价值和重要程

度。因此,科技论文中必须著录参考文献^[3]。文献引用的原则是要求作者引用亲自阅读过的文献,这样才能对论文的背景及目的有明确地阐述,才能以科学的态度对自己的论文及他人的工作进行客观的评价,才能真实地对文献中的数据、共识、结论等进行比较和引用,为科学引文分析提供客观的依据。但是,在有些稿中,作者所引用的文献是从其查阅的文章中所引的文献中引用过来的,这样的文献为二次文献。在二次文献中经常出现有些作者著录文献不准确,著录项目残缺或写错而无法查找,因而影响期刊的编排规范。所以,要求作者在申请参考文献时,一定要著录一次文献,避免用二次文献。《大豆科学》著录参考文献的要求:1. 只著录最必要、最新的文献;2. 只著录公开发表的文献,未公开发表的文献不要引用;3. 采用标准化的著录格式。引用书籍的著录格式为:著者. 书名[文献类型标识]. 版本(初版省略). 出版地:出版者,出版年:起止页。引用期刊的著录格式:作者. 文献题名[文献类型标识]. 刊名(全称),出版年,卷(期):起止页。

参 考 文 献

- 1 张琪玉. 情报语言基础[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1987: 19 - 20.
- 2 陈浩元. 科技书刊标准化 18 讲[M]. 北京:北京师范大学出版社, 1998.
- 3 向政, 王燕平, 闫雪, 等. 科技论文参考文献的著录原则及编辑方法[J]. 编辑学报, 2003, 15(2): 108 - 109

(上接第 196 页)

DESIGN SIMPLE EQUIPMENT FOR MAKING DENATURE GRADIENT GEL

Wang Deguo¹ Lei Bojun² Zhang Lili² Liu Qi² Liu Zhaojun²

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, 150030;

2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086)

Abstract PCR - DGGE is an effective method that molecular biologist use to analyze microorganism diversity. But expensive equipment limits its application. A simple equipment designed can popularize such technology successfully.

Key words Concentration gradient gel; Electrophoresis; Equipment ; Soybean rhizosphere bacteria