

RAPD 技术在酿酒酵母分类鉴定与遗传育种中的应用

杨智¹, 杨振泉², 汪志君², 方维明²

(1.扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225001) (2.扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225001)

摘要: 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 具有快速、简便和灵敏等优点, 在酿酒酵母的分子鉴定和分类、菌种分离纯化和污染检验、探索种属间亲缘关系和进化过程以及基因定位和辅助育种等研究中具有广阔的应用前景。本文对 RAPD 在酿酒酵母研究中的应用进行了综述, 并且着重探讨了在上述研究应用中的缺点及改进方法。

关键词: RAPD; 分子鉴定; 分类; 酿酒酵母

中图分类号: TS261.1*5; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)02-0090-04

Application of RAPD in Molecular Classification and Genetic Breeding of *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Zhi¹, YANG Zhen-quan², WANG Zhi-jun², FANG Wei-ming²

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou, 225001, China)

(2.College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, 225001, China)

Abstract: The random amplified polymorphic DNA (RAPD) is a rapid and sensitive method for analysis of characters of microbe. There is a promising prospect for the application of this technology to molecular identification and characterization, separation, purification, research on genetic relation among species or genus, volution of yeast, functional gene location, and the assistant breeding of *Saccharomyces cerevisiae*. In this paper, the application of RAPD to molecular classification and genetic breeding of *Saccharomyces cerevisiae* was examined and its disadvantages and the corresponding improvement methods were also discussed

Key words: RAPD; molecular identification; classification; *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 广泛应用于食品发酵、医药和环保等领域。随着酵母遗传学以及分子生物学的发展, 以个体间遗传物质内核苷酸序列差异为基础的分子标记技术已是酿酒酵母研究中的热点。随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 最早于 1990 年由 Williams^[1] 和 Welsh 领导的两个研究小组各自几乎同时发明的, 主要原理是利用约 10 个碱基的随机引物以 PCR 技术为基础, 对整个基因组 DNA 进行扩增, 得到多个片段, 再利用 PAGE 或琼脂糖凝胶电泳检测个体间扩增出的片断的多态性, 可以辨别出菌株间基因组 DNA 内核苷酸序列存在的微小变异^[2]。RAPD 已被广泛应用于酿酒酵母的亲缘关系, 分子分型, 基因定位, 克隆等领域研究。因此, RAPD 与限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP),

收稿日期: 2006-10-9

基金项目: 江苏省攻关项目 (BE2001397)

作者简介: 杨智, 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食品生化与分子生物学

通讯作者: 方维明博士

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP), 简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 割裂扩增多态性序列 (cleaved amplified poly-morphic sequence, CAPS) 以及 rDNA 序列分析等技术相比具有操作简单、灵敏度高、成本低、信息丰富、多态性强、检测时间短、基因组 DNA 需求量少以及无需放射性元素等优势。

1 RAPD 在酿酒酵母的分类鉴定中的应用

1.1 RAPD 在酿酒酵母分类中的应用

酵母传统的生理生化及形态特征分类不但准确性低, 而且灵敏度也不高, 一般不能精确到种级以下水平^[3]。根据不同菌株的基因组 DNA 内的核苷酸序列的不同, RAPD 可以显示不同菌株之间的差异, 因此可以应用于酿酒酵母的分类分型。沈力飞等^[4]利用 20 条随机引物对 16 株不同来源的酿酒酵母进行 RAPD 研究, 其中筛选到三条适宜引物具有鉴别作用, 共扩增出 34 条 RAPD 谱带, 多态性为 85.3%, 获得了稳定清晰的菌株 RAPD 指纹图谱, 同时把这 16 株菌株分为不同

的亚型。Callego等^[5]对27株酿酒酵母应用32条随机引物进行RAPD分析,共扩增出155个扩增位点,筛选了7条随机引物和13个多态性强的位点,从供试菌株中检测出13株不同的菌株。Paffetti等^[6]将19种酵母利用RAPD技术分为酿酒酵母属和接合酵母属,又通过RFLP和Southern杂交进一步分为酿酒酵母,巴利氏接合酵母,贝酵母和发酵接合酵母四个种。Vasdinyei等^[7]从匈牙利乳制品中分离的酵母利用简化鉴定系统(simplified identification system, SIM)和RFLP鉴定出26个种,随后运用RAPD对2个常见种进行种内分型取得了成功。

1.2 RAPD 在中酿酒酵母鉴定中的应用

酵母菌种种质的纯度直接影响到产品的品质,生产过程中不能做到及时有效的检测并发现污染种,往往给生产带来巨大的损失,RAPD技术的应用提高了检测的准确性和速度。Gomes等^[8]从巴西燃料酒精产品和啤酒产品中分离得到10种具有代表性的酵母菌株,RAPD和SDS-PAGE分析结果表明:燃料酒精来源的5株酵母至少属于2个不同种的酿酒酵母,而啤酒来源的5株酵母与酿酒酵母也具有很高的遗传相似性。Barszczewski等^[9]从波兰的酿造企业的废弃酵母,麦汁发酵液以及最终成品啤酒中分离的19株酵母与其它几株标准菌株共27个样品进行RAPD鉴定。仅用一条序列为:(5'-GCTCGTC GCT-3')的随机引物将所有供试菌株分为酿酒酵母,卡尔斯伯酵母,贝酵母,少孢酵母,巴斯德酵母等6种酵母,表明除酿酒酵母外共有5种污染酵母。Andrade等^[10]从干肉制品中分离出35株酵母经RAPD,18SrRNA,RFLP和SSR技术分离鉴定为酿酒酵母,汉氏德巴利氏酵母,粘质红酵母,淡沫假丝酵母,解脂耶氏酵母,多行德巴利酵母,卡尔毕赤酵母7种酵母菌组成。结果表明了干肉制品中存在部分污染的有害酵母。

1.3 RAPD在中酿酒酵母亲缘关系的应用

在真菌分类系统中,酵母包括56个属,500多个种,分别属于子囊菌纲(*Ascomyctetes*)、担子菌纲(*Basidiomycetes*)和半知菌纲(*Fungiimperfecti*)以及从真菌各纲派生的退化类型^[11]。酿酒酵母亲缘关系的研究对于阐明酵母的进化过程具有重要意义。徐勇等^[12]应用RAPD技术对6个属21个酵母菌株的基因组的多态性进行了研究,并采用聚类分析法评价它们之间的亲缘关系。结果显示嗜单宁管囊酵母与克鲁斯假丝酵母间的亲缘较近,遗传距离为0.383,它们与酿酒酵母间的遗传距离达到0.443,与产朊丝酵母聚类的遗传距离是0.471,表明嗜单宁管囊酵母与酿酒酵母和产朊丝酵母

超出了种间的等级范围,亲缘关系较远,也揭示了这些酵母都是由原始的一种酵母进化发育而来,对研究酵母菌株间进化过程和亲缘关系有重要的参考意义。

2 RAPD 在酿酒酵母遗传育种中的应用

2.1 RAPD 在酿酒酵母辅助育种中的应用

酿酒酵母在工业生产中的应用十分广泛,根据不同要求的育种工作始终是生产中的重要环节。诱变育种与原生质体融合育种是常用的育种方法,在育种过程中应用,RAPD技术可以快速准确的对诱变菌种和融合子进行鉴定。江胜滔等^[13]将雨生红球藻和酿酒酵母通过电穿孔仪进行原生质体融合。融合子与亲本的雨生红球藻和酿酒酵母一起利用7条随机引物进行RAPD分析。在融合子的54条谱带中,有7条为双亲共有,占12.96%,与酿酒酵母相同的18条,与雨生红球藻相同的17条,其余12条为融合子的新谱带,结果表明该融合子很可能是雨生红球藻与酿酒酵母细胞杂种。这种快速准确的鉴定方法可以提高育种的效率。

2.2 RAPD 在酿酒酵母基因定位中的应用

RAPD技术在酿酒酵母研究中的广泛应用,促进了从大量的多态性标记中寻找与功能基因连锁的标记研究。目前发现了丰富的标记可以定位某些基因,并有不少标记已经通过分子克隆技术进行更加深入的研究。方维明等^[14]对9株酿酒酵母进行诱变后测试发酵性能研究。发现在啤酒发酵实验中,菌株Y1110和YZB发酵后双乙酰均可降至0.1%以下。随后对各菌株进行RAPD研究。发现了分子量为2300 bp,650 bp,1500 bp的特异性条带。这些特异性条带是否连锁产双乙酰代谢过程中的某些基因还有待进一步研究。朱旭芬等^[15]对耐高温酿酒酵母HU-TY-1与原始出发菌株LK基因组进行RAPD分析。两菌株间存在特异性标记。而且这些标记经过分析可能连锁耐高温基因。随后对它们进行了热休克蛋白电泳图谱和RAPD的分析^[16],发现两种热休克蛋白HSP72及HSP84与菌株的耐热性是相关的,且RAPD分析也显示了原始出发菌株与耐热菌株HU-TY-1两基因组之间存在着差异,研究结果表明RAPD在酿酒酵母的基因克隆和表达研究具有一定的应用价值。

3 RAPD 技术的缺点与改进方法

RAPD是基于PCR技术的一项分子生物学技术,它具有快速灵敏等优点,但同时也保留了PCR所固有的缺陷,如对环境敏感,模板DNA质量,扩增条件甚

至不同的操作者都有可能影响扩增结果,产生假性条带或不能扩增,影响了结果的稳定性和重复性。为了克服这些缺点,许多学者作了深入细致的研究,可以从操作程序的改进与优化,结果统计分析方法的改进以及与其它分子生物技术联用等方面进行改进。

3.1 RAPD操作程序的改进与优化

RAPD技术重现性差和稳定性低是最大的缺点。由于PCR所用的引物只有10个碱基。所以在进行PCR反应时受 Mg^{2+} 浓度等因素影响较大,结果有很大的偶然性。这个缺点可以通过优化RAPD条件、更换引物来改进。McGrath^[18]等通过总结酿酒酵母的RAPD引物与基因组DNA结合位点和PCR反应的规律得出:RAPD结果取决于随机引物和基因组DNA结合的位点,而与GC含量的丰富程度无关。反应中随机引物的3'端1-7个碱基错配的可能性很小,向5'端错配的可能性越来越大,上游引物中富含AT时可能会发生错配。所以,在设计随机引物的过程中,这些原因都可能导致RAPD结果的不稳定。

3.2 RAPD结果统计分析改进

RAPD技术本身是10个碱基的简单PCR扩增。后续要通过凝胶电泳检测和专业的统计分析软件才能进行分析,统计分析方法通常会影响到最终结果。现在出现了一种RAPD溶解曲线(melting curve of random amplified polymorphic DNA, McRAPD)的新技术,它是在常规RAPD-PCR程序结束后外加了一段曲线变性的程序。同时加入了荧光物质检测曲线变性过程中的荧光信号。根据不同模板扩增的RAPD片断长度的不同,每个片段的 T_m 值也不同,最终检测的荧光峰强弱与出峰时间也不同。这样就直观的对每个菌株进行鉴定。Plachy等^[17]就是在RAPD-PCR程序结束后降温至40℃,2 min后按0.1℃/s的速度升温,同时加入SYBR Green I荧光物质检测。最终鉴定出5种致病酵母菌分别属于假丝酵母属的不同种。McRAPD技术对于RAPD技术的广泛应用起到了巨大的促进作用。

3.3 RAPD与其它技术的联合使用

RFLP 标记由于有限制性内切酶参与故与 RAPD 标记联合使用可以避免 RAPD 技术的随机性和不稳定性,同时提高了准确性,使多态性更加丰富。Paffetti 等^[6]将 19 种酵母利用 RAPD 技术分为酿酒酵母属和接合酵母属,结果与用 RFLP 标记的结果相同。为了深入的研究更细的分型,又通过 RFLP 和 Southern 杂交具体分为酿酒酵母,巴利氏接合酵母,贝酵母和发酵接合酵母四个种。

RAPD 稳定性差的缺陷也可以通过把 RAPD 标记

转化为更为稳定 SCAR 标记来改进。SCAR 标记是利用 RAPD 的特异性标记经过分子克隆技术转化得来^[19]。由于使用较长的引物和较高的退火温度,既保持了分子标记的鉴定功能又获得了常规 PCR 的稳定可靠的特点。此外 SCAR 还具有转化显性 RAPD 标记为共显性 SCAR 标记的可能。如果为显性可以直接染色检测。Clercq 等^[20]对苹果表皮的毕赤酵母的菌株 K 和其他 30 株酵母(其中包括 21 株毕赤酵母)进行 SCAR 标记把 RAPD 扩增的菌株 K 的 2000 bp 标记转化为 SCAR 262 bp 的标记已经获得了成功,且 DNA 标记十分稳定。目前酿酒酵母的 SCAR 标记尚未见报道。

SSR 与 RAPD 也可以联合应用。真核生物基因组中均含有的一类由 1-6 个碱基串联而成的基本序列。简单重复序列在群体中通常经过多年的变异具有很高的多态性,而且一般为共显性,因此是一类很好的分子标记。它的结果一般可以与 RAPD 结果结合参考应用。Walczak 等^[21]在研究酿酒酵母污染情况时,从波兰酿造企业分离了 15 株非生产用酵母菌株经过 API 32C system 鉴定其中 7 种为清酒假丝酵母,随后与生产菌株酿酒酵母共同通过 RAPD 和 SSR(GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ 分析鉴定出这些酵母与标准清酒假丝酵母菌株 CBS617 和 CBS159 的遗传相似性最高达到 49%,对追踪污染菌株具有重要意义。

CAPS 也是一种 RAPD 标记的深入研究方向,是利用 PCR 对 RFLP, RAPD 标记的转化。CAPS 技术是在获得某个位点特异扩增产物的基础上,将该扩增产物进行酶切,电泳检测酶切片段的多态性。其引物通常来自基因库染色体组 DNA 克隆、cDNA 克隆或 RAPD 谱带克隆的测序。Perez 等^[22]利用 HaeIII, MspI, EcoRI, EcoRV, XhoI 和 HindIII 等限制性内切酶消化由 RAPD 扩增的产物 349 条,利用这些产物的多态性对酿酒酵母进行鉴定分型,获得了稳定的结果。

4 RAPD 的应用前景

目前出现的 RAPD 技术在鉴定酿酒酵母的常见种或亚种水平上应用已经十分广泛,技术也日趋成熟。但各生产研究单位的菌株材料众多,常常造成知识产权纠纷。为了避免纠纷, RAPD 分子标记作为快速检测的手段将会广泛被采用。一个重复稳定性好的 RAPD 标记可以直接或以转化为更稳定的 SCAR 标记的形式申请专利来维护自身的权益。RAPD 技术在酿酒酵母辅助育种中的应用是今后 RAPD 技术的一个研究方向。在育种前出发菌株的选择以及优良性状的寻找上, RAPD 的分析结果可以作为参考,也可以作为

育种过程中快速鉴定是否为新菌株的重要手段。酿酒酵母作为一种广泛应用的模式微生物,已被广大研究者常常作为研究对象。RAPD技术可以作为野生分离的酵母菌株或是新菌株的分类分型的依据。而这一类RAPD标记今后应当试剂盒化,结合形态学和生理生化鉴定方法成为酿酒酵母快速分类的方法。

参考文献

- [1] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22):6531-6535
- [2] 吕长武,吕杰,陈恒雷,等. RAPD分子标记在食用菌研究中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(1):77-80
- [3] Sule SE, Agoston R, Belak A, et al. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests.[J] *International Journal of Food Microbiology* , 2006, 108: 120-124
- [4] 沈力飞,杨振泉,方维明,等. 不同来源酿酒酵母菌株的随机扩增多态DNA分析[J], *食品与发酵工业*,2005, 31(10): 1-4
- [5] Callego FJ, Perez MA, Nunes Y, et al. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Food Microbiology* , 2005, 22 : 561-568
- [6] Paffetti D, Barberio C, Casalone E, et al. DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing[J]. *Res Microbiol*, 1995, 146: 587-594
- [7] Vasdinyei P, Valmorri S, Gatto V, et al. A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet leavened baked good fermentation[J]. *Food Research International*, 2004, 37: 469-476
- [8] Gomes LH, Duarte KMR, Argueso JL, et al. Methods for yeast characterization from industrial products[J]. *Food Microbiology*, 2000, 17: 217-223
- [9] Barszczewski W, Robak M. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques[J]. *Food Microbiology*, 2004, 21: 227-231
- [10] Andrade MJ, Rodriguez M, Sanchez B. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*[J], 2006, 107: 48-58
- [11] 毛志群,张伟,马雯. 分子生物技术在酵母菌分类中的应用进展[J].*河北农业大学学报*, 2002 , 5 (25): 230-233
- [12] 徐勇,张博,勇强,等. 利用RAPD分子标记研究酵母菌的亲缘关系[J]. *林产化学与工业*, 2005, 25(1): 1-4
- [13] 江胜滔,施巧琴,黄建忠,等. 酿酒酵母与雨生红球藻的细胞融合子的RAPD鉴定[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*,2004, 20(4): 76-79
- [14] 方维明,杨振泉,沈力飞,等. 啤酒酵母突变株发酵性能比较及随机扩增多态DNA分析[J].*中国酿造*,2005(12):23-26
- [15] 朱旭芬,曾云中,吴雪昌,等. 酿酒酵母耐热相关基因DNA片断的初探[J].*菌物系统*, 2000 , 19(2): 248-253
- [16] 朱旭芬,吴雪昌,林靛,等. 耐高温酿酒酵母单倍体的RAPD分析[J].*生物工程学报*,2001, 17(5): 557-560
- [17] Plachy R, Hamala P, Raclavsky V, et al. McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts[J].*Journal of Microbiological Methods*, 2005, 60: 107-113
- [18] McGrath A, Higgins DG, McCarthy TV. Sequence analysis of DNA randomly amplified from the *Saccharomyces cerevisiae* genome[J].*Molecular and Cellular Probes*, 1998, 12: 397-405
- [19] Paran I, Michelmore RW. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce[J].*Theor.Appl.Genet*,1993,85: 985-993
- [20] Clercq DD , Cagnet S, Pujol M, et al.2003. Development of a SCAR marker and a semi-selective medium for specific quantification of *Pichia anomala* strain K on apple fruit surfaces. *Postharvest Biology and Technology*, 2003,29: 237-247
- [21] Walczaka E, Czaplinska A, Barszczewski W, et al. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing[J]. *Food Microbiology*, 2006, 4: 1-4
- [22] Perez MA, Gallego FJ. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *FEMS Microbiology Letters* , 2001, 205: 375-378