

RAPD 用于 20 株嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株亲缘性研究

吴学玲, 范宏伟, 段 红, 张真真, 刘莉莉, 刘新星

(中南大学 资源加工与生物工程学院, 长沙 410083)

摘 要: 为研究中国 20 株嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株的基因多样性, 以及基因指纹技术分类与嗜酸氧化亚铁硫杆菌生理生化特性的相关性, 使用 20 种随机引物, 通过 PCR 扩增 20 株菌株的基因组 DNA, 并分析凝胶电泳条带的有无, 使用 Jaccard 系数和 UPGMA 分析菌株间相关性。20 种引物产生的条带将 20 株菌株分成了 5 组, 菌株间相关性系数最小为 35.1%(YTW 与 DXS), 而相似系数最大为 96.9%(BY-0502 与 DXS, DY26 与 DY30)。结果表明: 20 株来自不同地区的嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌株具有较高的多样性, 并且亲缘性分类与各菌株取样地以及最大铜离子耐受能力分类, 有较高的分类相似性, 说明 RAPD 技术拥有在嗜酸氧化亚铁硫杆菌内分类鉴定菌株的能力。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; RAPD; 多样性

中图分类号: Q751

文献标志码: A

RAPD to study relatedness of 20 *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains

WU Xue-ling, FAN Hong-wei, DUAN Hong, ZHANG Zhen-zhen, LIU Li-li, LIU Xin-xing

(School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: To study the genome diversity of 20 *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains in China, and the relationship between the genome classification and physiological-biochemical characteristic of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, DNA was amplified by PCR and twenty random primers, amplification products were separated by gel electrophoresis and photographed under UV light. The RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) profiles were compared on the basis of the presence or absence of each DNA band, and strain diversity was calculated using the Jaccard's coefficient and UPGMA (Unweighted Pair-Group Arithmetic Average Clustering) cluster analysis. The primers used in this study grouped the 20 strains into five major groups. Similarities between the strains ranged from 35.1%(YTW and DXS) to 96.9%(BY-0502 and DXS, DY26 and DY30). These results indicate that the 20 strains have a high degree of genomic diversity and the RAPD markers related to characteristics, such as metal resistance and geographical locations. The RAPD procedure is a powerful technique to assess strain variability in *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; RAPD; diversity

随着生物冶金的逐步发展, 许多与生物冶金相关的微生物菌株被分离鉴定, 并用于各种条件下的金属矿石预处理与浸出过程^[1]。嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)是最早被分离鉴定出用于生物浸出的微生物之一^[2], 而其菌种内不同菌株间的生理生化特性千差万别^[3]。吴学玲等^[4]对 3 株

A. ferrooxidans 菌株进行比较后发现, 三者 Cu^{2+} 抗性与浸矿能力均存在较大差异, 而 16s rRNA DNA 序列差异很小。随着诸多菌株逐步被分离出, 一个快速、有效、辨识率高的分子生物学鉴定方法的构建, 对于研究不同菌株之间的差异性, 以及快速分类筛选出特殊能力菌株有着十分重要的意义。

RAPD(Random amplification of polymorphic DNA)于1990年由WILIAMS^[5]和WELSH^[6]分别提出,是一种利用随机引物对细菌基因组进行扩增并分析其多态性的分子生物学技术。RAPD操作简便,且用于鉴定菌种不同菌株时多样性比较明显,但是RAPD技术的影响因素较多,因此对不同实验中反应条件的掌握以及改良是目前该技术的难点^[7],如果能标准化实验操作,并构建相关数据库,RAPD技术将拥有快速鉴定*A. ferrooxidans*菌株的潜力^[8]。

RAPD方法是分析全基因组的一种基因指纹技术,这种分子生物学方法利用合成寡核苷酸随机产生基因组DNA扩增片段,从而产生样品条带的多样性特性^[9]。DNA指纹技术和RAPD是分类学与流行病学强有力的工具^[10],可以用于各种细菌以及真菌的DNA指纹鉴定,而且可以用于同种菌不同菌株间的区分^[11]。由于引物的随机性,RAPD方法无需预知基因组DNA的相关信息,可以直接使用基因组DNA进行实验。

WALTENBURY等^[12]对分别取样自加拿大、美国和英国的12株*A. ferrooxidans*菌株进行了RAPD基因指纹分析,得出RAPD对于*A. ferrooxidans*有着区分度高的优势,是一种有效可靠的分析该菌种多样性的基因指纹技术。PAULINO等^[13]利用RAPD与rep-PCR(repetitive extragenic palindromic PCR)两种基因指纹技术,研究了巴西矿物废弃物中浸矿菌的基因多样性,得出基于PCR的基因指纹技术比核糖分型技术更为灵敏快捷,但未发现基因亲缘性与菌株的理化特性有任何相关。

本文作者采用RAPD基因指纹分析技术对来自甘肃、江西、广西、湖北、新疆等各地分离的共20株*A. ferrooxidans*菌株进行了实验,并对结果进行了分析,首次对中国各地分离得到的不同的*A. ferrooxidans*菌株进行了基因多样性以及亲缘性研究,就其亲缘性与菌株理化特性进行了比对分析,并就RAPD技术在*A. ferrooxidans*中作为菌株鉴定手段的可能性进行了讨论。

1 实验

1.1 *A. ferrooxidans* 菌株

本研究使用了包括来自甘肃、江西、广西、湖北、新疆等各地分离的共20株*A. ferrooxidans*菌株(见表1)。所有菌株均由教育部中南大学生物冶金重点实验室分离和保藏。

1.2 菌株的活化培养以及铜离子最大耐受能力测定

菌种从保藏库中拿出后常规复苏^[14],之后分别接种至121℃高压蒸汽灭菌的30 mL 9K基础培养基中培养4~7 d。9K培养基配方^[15]为:(NH₄)₂SO₄ 3.0 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, KCl 0.1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, Ca(NO₃)₂ 0.01 g/L。高温灭菌后,加入30 g/L紫外灭菌30 min的FeSO₄·7H₂O混匀,使用浓度为70%的H₂SO₄调整pH至2.0。培养条件如下:温度为30℃,转速为175 r/min。20株菌分别传代4~5次之后,活性达到正常水平。

先通过预实验了解20株*A. ferrooxidans*菌的铜离子最大耐受浓度(MTC, Maximum tolerated concentration)范围,之后按照预实验结果,设定不同铜离子浓度梯度进行试验。根据设定的铜离子浓度梯度,配置加入对应浓度CuSO₄·5H₂O的9K基础培养基,分别接种5×10⁶浓度的*A. ferrooxidans*菌种,每12 h取样,使用重铬酸钾滴定法测定溶液剩余亚铁离子浓度,使用血细胞计数法测定菌液细菌浓度,培养7 d。每种菌设置空白组,每个梯度设置对照组。

1.3 DNA 提取制备

20株菌株分别转接至150 mL培养基于30℃、175 r/min条件下进行扩大培养3~5 d。培养基pH使用70%的硫酸调整至2.0。使用滤纸过滤去除黄钾铁矾后,使用Beckman Avanti J-E离心机在10 000 r/min, 4℃条件下离心15 min收集菌体。离心后除去上清液,菌斑使用70%的硫酸配置的pH 2.0的无菌水进行冲洗,并转移到EP离心管中,12 000 r/min转速离心15 min后,除去上清液,再用无菌水吸打均匀。

收集后的菌液使用天根生化科技(北京)的细菌基因组提取试剂盒对20株*A. f*菌进行基因组DNA的提取纯化。DNA保存在-20℃条件下。

1.4 随机引物扩增(RAPD)及电泳

RAPD的PCR过程采用20个10b长度的DNA单链引物(A1-A20,见表1),购自北京鼎国生物公司。

使用DNA master mix(天根生化科技,包含0.1U Taq Polymerase/μL、500 μmol/L dNTPs each、20 mmol/L Tris-HCl(pH8.3)、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂)与引物和模板构成PCR体系,25 μL的PCR总体系中包含:DNA master mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL, 单链引物1 μL, 模板1 μL。

RAPD的PCR过程为:94℃下解链10 min后,进行42个循环(94℃变性1 min, 37℃退火1 min, 72℃延展2 min),最后72℃下延展10 min后,在-20℃

表 1 20 种引物序列(A1-A20 为随机引物)

Primer	Sequence (5' to 3')
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTG
A3	AGTCAGCCAC
A4	AATCAGCCAC
A5	AGGGGTCTTG
A6	GGTCCCTGAC
A7	GAAACGGGTG
A8	GTGACGTAGG
A9	GGGTAACGCC
A10	GTGATCGCAG
A11	CAATCGCCGT
A12	TCGGCGATAG
A13	CAGCACCCAC
A14	TCTGTGCTGG
A15	TTCCGAACCC
A16	AGCCAGCGAA
A17	GACCGCTTGT
A18	AGGTGACCGT
A19	CAAACGTCGG
A20	GTTGCGATCC

冰箱进行保存。

所有扩增产物使用 1.5%琼脂糖凝胶和 1×TAE 缓冲液^[16], 加入 1 μg/mL 的溴乙锭, 在 60 V 电压下电泳 4 h。电泳完成后, 使用 Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 对电泳凝胶进行成像分析。

1.5 电泳条带分析及数据处理

RAPD 结果通过对比每条 DNA 条带的有(1)或无(0), 构建 $n \times t$ 数据矩阵, t 代表归类的 OTU(operational taxonomic unit), n 代表条带数。如果条带存在, 则记为 1; 不存在, 则记为 0。数据矩阵使用 Jaccard 系数(Jaccard's coefficient)检测不同菌株间的相似性。Jaccard 系数方程为 $S_j = n_{11}/(n_{11}+n_{01}+n_{10})$, 其中, n_{11} 代表在两个 OTU 中条带都存在时的 n 值, n_{01} 代表第一个 OTU 中不存在, 但另一个存在条带时的 n 值, n_{10} 代表第一个 OTU 中存在, 但另一个不存在条带时的 n 值^[12]。使用 Ntsys 2.1 软件进行非加权组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)归类分析构建树形图, 并检测共性分类相关系数。

2 结果与讨论

2.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 菌株铜离子耐受能力

20 株 *A. ferrooxidans* 菌株的铜离子耐受能力通过绘制生长曲线与亚铁离子氧化曲线进行分析。本实验就 20 株菌株的铜离子耐受能力高低进行了实验分析, 将其按照生理特性进行归类。20 株 *A. ferrooxidans* 菌的铜离子耐受能力如表 2 所列。

铜离子耐受能力较高的菌株从高到低为 DY26、DY30、DY32、GF、BY-01、BY-0502、GD-A、GD-B、GD-9、DXS、DY15、DY18、JYC-2、JYC-3, 最大铜离子耐受浓度为 200~160 mmol/L; 耐受能力较低的菌株从高到低为 DX5、YTW、JYC-1、BY-03、DC、GD-0, 最大铜离子耐受浓度为 120~60 mmol/L。

2.2 RAPD 实验结果

本次 RAPD 实验中, 部分条带由于可重复性较差, 因此不将这些条带进行统计分析。20 个随机引物共产生 194 个不同长度的可重复条带, 其中, 20 株菌共有条带有 7 条, 分别是由引物 A3(1.0 kb, 1.5 kb)、A6(0.9 kb)、A12(2.0 kb)、A17(2.0 kb)、A19(1.2 kb)、A20(0.5 kb)产生, 单条引物产生最多的条带数为 14 个条带(A4, A13), 产生最少条带数为 7 个条带(A3, A7, A8), 产生条带长度最大为 4.5 kb 左右(A7), 最短长度为 0.2 kb 左右(A18)。根据表格 2 可知, 20 株菌种间相似系数最小为 35.1%(YTW 与 DXS), 而相似系数最大为 96.9%(BY-0502 与 DXS, DY26 与 DY30)。

RAPD 方法使用的是 10 碱基长度的引物, 因此 PCR 扩增过程中的退火时必须使用较低退火温度, 而低退火温度很可能导致识别率低以及不可重复的条带^[17]。本研究中, 通过重复实验, 建立最佳的反应条件和反应体系, 在一定程度上确保了实验数据的可信度。

本研究中使用到的 20 株 *A. ferrooxidans* 菌株按照相关性树形图(见图 1), 可以被分为 5 组, 第一组为菌株 DX5、DC、DY15、DY18、DY26、DY30、DY32、GF 和 BY-01, 相似系数在 82.5%(BY-01 与 DC)至 96.9%(DY26 与 DY30)之间; 第二组为菌株 BY-03、BY-0502、DXS、JYC-1、JYC-2、JYC-3、GD-B 和 GD-9, 相似系数在 80.4%(JYC-3 与 GD-B)至 96.9% (BY-0502 与 DXS)之间, 而菌株 GD-A、YTW、GD-0 各单独归类为一组。

表 2 *A. ferrooxidans* 菌株的 GenBank 登录号以及取样地

Table 2 Sources and GenBank accession numbers of *A. ferrooxidans* strains

Strain	GenBank accession number	Origin/source	Cu ²⁺ MTC/(mmol·L ⁻¹)
DX5	FJ157220	Dexing, Jiangxi	120
DC	FJ157221	Dachang, Guangxi	100
DY15	FJ171690	Daye, Hubei	160
DY18	FJ157223	Daye, Hubei	160
DY26	FJ157224	Daye, Hubei	200
DY30	FJ157225	Daye, Hubei	200
DY32	FJ157222	Daye, Hubei	200
GF	DQ062115	Dachang, Guangxi	200
YTW	EU733647	Dexing, Jiangxi	120
BY-01	FJ164046	Baiyin AMD, Gansu	200
BY-03	FJ164047	Baiyin AMD, Gansu	120
BY-0502	DQ427104	Baiyin AMD, Gansu	200
DXS	DQ427103	Xiangshan, Xinjiang	160
JYC-1	FJ164048	Baiyin leaching pool, Gansu	120
JYC-2	FJ164049	Baiyin leaching pool, Gansu	160
JYC-3	FJ164050	Baiyin leaching pool, Gansu	160
GD-0	FJ853654	Shaoguan AMD, Guangdong	60
GD-A	FJ195370	Shaoguan AMD, Guangdong	180
GD-B	FJ195371	Shaoguan AMD, Guangdong	180
GD-9	FJ194540	Shaoguan AMD, Guangdong	180

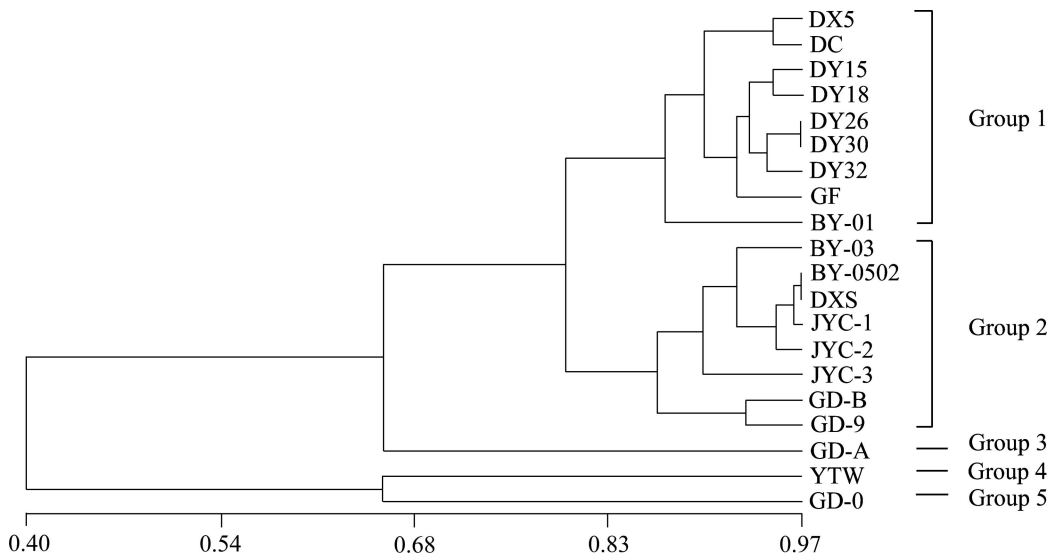


图 1 基于 RAPD 指纹构建 20 株菌株间的相关性树形图(不同条带的相关性(%)使用 Jaccard 相关性系数计算得出(数据使用 UPGMA 分类法进行分类处理))

Fig. 1 Dendrogram representing relationships between strains of *A. ferrooxidans* based on RAPD fingerprints (Similarity (%) between patterns was calculated by using the Jaccard's coefficient. The data were sorted by using the UPGMA clustering method)

表 3 RAPD 获得的 20 株 *A. ferrooxidans* 菌的 Jaccard 相似系数(%)矩阵

Table 3 Similarity matrix for Jaccard's coefficient(%) of different *A. ferrooxidans* obtained from RAPD markers

Strain	DX5	DC	DY15	DY18	DY26	DY30	DY32	GF	YTW	BY-01	BY-03	BY-0502	DXS	JYC-1	JYC-2	JYC-3	GD-0	GD-A	GD-B	GD-9
DX5	100																			
DC	94.8	100																		
DY15	94.3	93.3	100																	
DY18	91.2	93.3	94.8	100																
DY26	88.1	90.2	93.8	94.8	100															
DY30	87.1	89.2	92.8	93.8	96.9	100														
DY32	87.6	89.7	90.2	93.3	93.3	95.4	100													
GF	86.6	85.6	91.2	90.2	92.3	95.4	91.8	100												
YTW	41.2	42.3	39.7	40.7	38.7	40.7	41.2	40.2	100											
BY-01	84.5	82.5	87.1	87.1	88.1	88.1	88.7	88.7	40.2	100										
BY-03	79.9	80.9	80.4	80.4	80.4	79.4	78.9	77.8	39.7	79.9	100									
BY-0502	80.4	79.4	80.9	82.0	82.0	80.9	79.4	80.4	36.1	81.4	94.3	100								
DXS	78.4	78.4	80.9	82.0	83.0	82.0	79.4	80.4	35.1	81.4	93.3	96.9	100							
JYC-1	79.4	78.4	80.9	80.9	82.0	80.9	77.3	80.4	35.2	80.4	91.2	96.9	95.9	100						
JYC-2	76.8	75.8	78.4	79.4	80.4	79.4	75.8	78.9	35.6	78.9	89.7	95.4	94.3	95.4	100					
JYC-3	72.7	72.7	76.3	76.3	77.3	76.3	72.7	75.8	37.6	74.7	87.6	89.2	90.2	90.2	90.7	100				
GD-0	42.3	44.3	40.7	41.8	39.7	40.7	41.2	39.2	66.0	38.1	42.8	40.2	40.2	38.1	38.7	36.6	100			
GD-A	64.9	66.0	64.4	66.5	65.5	65.5	64.9	63.9	35.2	64.9	64.4	66.0	68.0	69.1	66.5	62.4	42.3	100		
GD-B	82.0	82.0	80.4	83.5	82.5	81.4	79.9	80.9	37.6	79.9	84.5	89.2	89.2	88.1	86.6	80.4	42.8	70.6	100	
GD-9	79.9	80.9	80.4	81.4	81.4	80.4	79.9	78.9	36.6	79.9	86.6	88.1	88.1	88.1	83.5	82.5	43.8	68.6	92.8	100

2.3 菌株表型分类与基因型分类相关性

如表 4 中所列, 菌株 DY15、DY18、DY26、DY30、DY32 均分离自湖北大冶铜矿山, 这 5 株菌均在第一组中, 相似系数在 90.2%(DY15 与 DY32)至 96.9%(DY26 与 DY30)之间; 菌株 BY-01、BY-03、BY-0502、JYC-1、JYC-2、JYC-3 分离自甘肃白银, 其中除 BY-01 在第一组外, 其他菌株均在第二组, 6 株菌相似系数在 74.7%(BY-01 与 JYC-3)至 96.8%(BY0502 与 JYC-1)之间; 菌株 GD-0、GD-A、GD-B、GD-9 均取样自广东韶关矿坑 AMD, 其中 GD-B 和 GD-9 在第二组, 而 GD-0 和 GD-A 各为一组, 4 株菌相似系数在 42.3%(GD-0 与 GD-A)至 92.8%(GD-B 与 GD-9)之间; 菌株 DC 和 GF 取样自广西大厂, 两株菌均在第一组, 相似系数为 85.6%; 菌株 DX5 和 YTW 取样自江西德兴铜矿, 其中 DX5 在第一组, 而 YTW 在第四组, 两株菌相似系数为 41.2%; 菌株 DXS 取样自新疆哈密东香山水样, 归为第二组。

由表 4 可知, 来自同一地区的菌株, 亲缘性部分

较高(大冶, 大厂), 而部分较低(白银, 韶关, 德兴)。通过菌株相关性系数可以区分主要的地理取样地(城市, 矿区)^[18], 白银地区的 6 株菌株取样自两个不同的取样点(酸性矿坑水与矿山积液池), 两个取样点的理化条件有较大差异, 而相同取样点的菌株间亲缘性较高。德兴地区的两株菌株相似系数也较低(41.2%, YTW 与 DX5), 这可能是因为菌株 YTW 与 DX5 虽然都来自江西德兴铜矿, 但 YTW 取样自德兴铜矿的杨桃坞酸性矿坑水, 杨桃坞是主要的废弃物存放地, 包括废石与酸性废水^[19], pH 值多在 2.5~4.5, 且含多种重金属离子, 而 DX5 取样自德兴铜矿山, 因此, 该亲缘性差异可能是外部环境造成。而韶关的部分菌株 (GD-0、GD-A)与同取样地其他菌株的相似系数较低, 这可能是由于这些菌株是不同时期从其他环境中进入 AMD 开放环境中, 故该菌株与其他菌株的亲缘性较低。由以上数据可知, 来自同一地区的菌株, 大多数相似系数较高, 这说明了菌株的地理特性与亲缘性有一定程度的相关。

表 4 20 株 *A. ferrooxidans* 菌株取样地分组

Table 4 Source grouping of 20 *A. ferrooxidans* strains

Location	Strains	Cluster/group	Percent similarity/%
Daye	DY15, DY18, DY26, DY30, DY32	1	90.2–96.9
Baiyin AMD	BY-01, BY-03, BY-0502	1, 2	79.9–94.3
Baiyin leaching pool	JYC-1, JYC-2, JYC-3	2	90.2–95.4
Shaoguan	GD-0, GD-A, GD-B, GD-9	2, 3, 5	42.3–92.8
Dachang	DC, GF	1	85.6
Dexing	DX5, YTW	1, 4	41.2
Xiangshan	DXS	2	N/A

冯敏等^[20]研究了在部分微生物中 RAPD 基因指纹与菌株起源地的相关性。GANTER 等^[21]利用 RAPD 技术研究了 40 株毕赤酵母属菌株的群落结构。结果表明：在研究的每个菌种中，RAPD 的分类结果与地理取样地相关。PATHANIA 等^[22]运用 RAPD、通用报告引物(universal rice primers, URP)、简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)和 delta 分型这 4 种方法，对 43 株酵母菌进行鉴定分析，不仅在菌株水平存在差异，它们的地理起源也有所不同。此外，他还采用 UPGMA 对 9 个 RAPD 标记的分析结果构树，43 个菌株共分为 6 组，结果显示除了少数个例，大多数菌株可依照其地理起源分类。这印证了 RAPD 指纹变异与菌株的起源地息息相关^[22]。

铜离子耐受能力较高的 14 株菌株中，相似系数最高为 96.9%(BY-0502 与 DXS, DY26 与 DY30)，相似系数最低为 62.4%(GD-A 与 JYC-3)，铜离子耐受能力较低的 6 株菌株中，相似系数最高为 94.8%(DX5 与 DC)，而相似系数最低为 35.2%(YTW 与 JYC-1)。本次试验期望通过铜离子耐受能力试验以及 RAPD 试验得出 *A. ferrooxidans* 菌株表型与 RAPD 基因型的相关性。实验结果表明，耐受能力较高的 14 株菌株间亲缘性较高，而耐受能力较低的菌株中部分菌株间的相似系数较低，这可能是由于高耐受能力菌株拥有类似的铜抗性基因，而低耐受能力菌株缺少相关基因，因此，部分菌株基因型差异较明显。CHEN 等^[23]在通过研究 4 株 *A. ferrooxidans* 菌株的重金属离子耐受能力、最适温度、pH 等表型以及 RAPD 基因型之后，发现菌株 AF2 与其他菌株的表型与基因型菌差异较大，且表型分类与基因型分类相关，并发现在该菌株中缺少两种其他菌株共有的重金属抗性基因，该结果佐证了本实验中的结论。

2.4 RAPD 技术与其他基因分类技术比较

本次研究中，RAPD 的结果分析表明了 20 株 *A. ferrooxidans* 菌株有较高的基因多样性。AKBAR 等^[24]也同样使用 RAPD 方法对 6 株 *A. ferrooxidans* 以及 3 株 *Acidithiobacillus thiooxidans* 进行了分析，得到了类似的相关性结果。相对于其他分子生物学方法，RAPD 使用全基因组作为扩增模板，因此相比较于 RFLP 等方法有明显优势^[25]。POWELL 等^[26]通过利用 RAPD，RFLP (Restriction fragment length polymorphism)、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 和 SSR (Simple sequence repeat, microsatellite) 4 不同的基因分类技术比较大豆的基因亲缘性^[26]，发现基于 RFLP, AFLP 和 SSR 分析得出驯化与野生大豆的相关性较高，而通过 RAPD 技术得出了较低的相关性，并得出了 RAPD 在种内相关性比较时更有优势。而相对于 rep-PCR 技术，KŘÍŽOVÁ 等^[27]使用了 RAPD 与 rep-PCR 技术研究了 *Bifidobacteriu* 菌属内菌株的基因相关性，rep-PCR (84%和 93 %)产生条带的多样性相比 RAPD(53%)较低，而 RAPD 在亲缘性较近的菌株中，表现出较高的基因多样性。

3 结论

- 1) RAPD 技术适用于本文中的 20 株 *A. ferrooxidans* 菌菌株的亲缘性分析，通过条带分析得到的结果说明 20 株菌株拥有较高的基因多样性。
- 2) 通过对比 RAPD 凝胶电泳条带的有无得出，该 20 种随机引物对于 20 株菌株均能产生较好的可重复条带，且引物产生的条带特异性良好，均可以应用于 RAPD 实验。
- 3) 通过分析 RAPD 条带得到的分类结果显示，

20株菌株的亲缘性分类与各菌株取样地以及最大铜离子耐受能力分类,具有较高的分类相似性,说明RAPD技术拥有在*A. ferrooxidans*菌内分类鉴定菌株的能力。

REFERENCES

- [1] BOSECKER K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 20(3/4): 591–604.
- [2] VESTAL J R, LUNDGREN D. The sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*)[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1971, 49(10): 1125–1130.
- [3] KARAVAIKO G I, TAT'YANA P T, KONDRAT'EVA T F, LYSENKO A M, TAT'YANA V K, AGEEVA S N, MUNT'YAN L N, TAT'YANA A P. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 113–119.
- [4] 吴学玲, 袁 鹏, 胡 琪, 侯冬梅, 苗 博, 邱冠周. 不同嗜酸氧化亚铁硫杆菌(DY15, DY26, DC)对黄铜矿的浸出及其基因 Afe0022 的差异表达[J]. 中国有色金属学报, 2011, 21(4): 932–938.
WU Xue-ling, YUAN Peng, HU Qi, HOU Dong-mei, MIAO Bo, QIU Guan-zhou. Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* DY15, DY26 and DC and difference expressions of Gene Afe0022[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2011, 21(4): 932–938.
- [5] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, RAFALSKI J A, TINGEY S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531–6535.
- [6] WELSH J, McCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213–7218.
- [7] 贺治国, 胡岳华, 胡维新, 钟 慧, 徐 兢, 朱 敏. 用 RAPD 分子标志方法研究氧化亚铁硫杆菌遗传多样性[J]. 遗传, 2004, 26(1): 69–74.
HE Zhi-guo, HU Yue-hua, HU Wei-xing, ZHONG Hui XU Jing, ZHU Min. Studies of polymorphisms of *Thiobacillus ferrooxidans* using RAPD[J]. HEREDITAS, 2004, 26(1): 69–74.
- [8] 杨 坤, 张新明, 刘 平, 吕 波, 饶智宏, 王风格, 赵久然, 史亚兴, 张 俊, 王世亮, 刘 鹏. 植物已知品种数据库构建方法的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(33): 283–287.
YANG Kun, ZHANG Xin-ming, LIU Ping, LÜ Bo, RAO Zhi-hong, WANG Feng-ge, ZHAO Jiu-ran, SHI Ya-xing, ZHANG Jun, WANG Shi-liang, LIU Peng. Study on construction of database of plants varieties of common knowledge[J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2011, 27(33): 283–287.
- [9] JANSSEN P, COOPMAN R, HUYS G, SWINGS J, BLEEKER M, VOS P, ZABEAU M, KERSTERS K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy[J]. Microbiology, 1996, 142(7): 1881–1893.
- [10] ALBUFERA U, BHUGALOO-VIAL P, ISSACK M, JAUFEEERALLY-FAKIM Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2009, 9(3): 322–327.
- [11] CALIGIORNE R B, RESENDE M A, PAIVA E, AZEVEDO V. Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 45(5): 408–412.
- [12] WALTENBURY D R, LEDUC L, FERRONI G. The use of RAPD genomic fingerprinting to study relatedness in strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 62(1): 103–112.
- [13] PAULINO C L, BERGAMO R F, de MELLO M P, GARCIA O, MANFIO G P, OTTOBONI L M M. Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2001, 80(1): 65–75.
- [14] WU X L, XIN X H, JIANG Y, LIANG R X, YUAN P, FANG C X. Liquid-nitrogen cryopreservation of three kinds of autotrophic bioleaching bacteria[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(6): 1386–1391.
- [15] XIE M, YIN H Q, LIU Y, LIU J, LIU X D. Repetitive sequence based polymerase chain reaction to differentiate close bacteria strains in acidic sites[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(6): 1392–1397.
- [16] XIE X, LIANG J, PU T, XU F, YAO F, YANG Y, ZHAO Y L, YOU D, ZHOU X, DENG Z. Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria[J]. Nucleic Acids Research, 2012.
- [17] HADRY S H, BALICK M, SCHIERWATER B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology[J]. Molecular Ecology, 2008, 1(1): 55–63.
- [18] MARTINEZ C, COSGAYA P, VÁSQUEZ C, GAC S, GANGA A. High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2185–2195.
- [19] 刘 成. 德兴铜矿酸性废水成因的研究[J]. 有色矿山, 2001, 30(4): 49–53.
LIU Cheng. Study on the cause of formation of acidic waste water in Dexing Copper Mine[J]. Nonferrous Mines, 2001, 30(4): 49–53.
- [20] 冯 敏, 刘延琳. RAPD 在酵母分类鉴定与育种研究中的应用[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 267–270.
FENG Min, LIU Yan-lin. Application of RAPD in classification, identification and breeding of yeasts[J]. Food Science, 2012, 33(9): 267–270.

- [21] GANTER P F, QUARLES B. Analysis of population structure of cactophilic yeast from the genus *Pichia*: *P. cactophila* and *P. norvegensis*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(1): 35–44.
- [22] PATHANIA N, KANWAR S, JHANG T, KOUNDAL K, SHARMA T. Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(9): 1539–1547.
- [23] CHEN H, YANG B, CHEN X. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China[J]. Microbiological Research, 2009, 164(6): 613–623.
- [24] AKBAR T, AKHTAR K, GHOURI M A, ANWAR M A, REHMAN M, REHMAN M, ZAFAR Y, KHALID A M. Relationship among acidophilic bacteria from diverse environments as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD)[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(5): 645–648.
- [25] RADEMAKER J, HOSTE B, LOUWS F J, KERSTERS K, SWINGS J, VAUTERIN L, VAUTERIN P, de BRUIJN F J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(2): 665–677.
- [26] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, HANAFEY M, VOGEL J, TINGEY S, RAFALSKI A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. Molecular Breeding, 1996, 2(3): 225–238.
- [27] KŘÍŽOVÁ J, ŠPANOVÁ A, RITTICH B. RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species[J]. Folia Microbiologica, 2008, 53(2): 99–104.
- (编辑 何学锋)