

分子生物学方法在微生物生态学中的应用^{*}

夏北成¹⁾ Zhou J Z²⁾ Tiedje J M³⁾

(1) 中山大学环境科学研究所, 广州 510275; 2) Oak Ridge National Laboratory;
3) Center for Microbial Ecology, Michigan State University, USA)

摘要 给出了植被对微生物群落结构影响的研究结果, 同时较详细地介绍了从土壤样品中提取 DNA 以及对 DNA 进行克隆, 并获得微生物克隆群落的方法和步骤. 应用该方法在获得高产量 DNA 的同时, 获得了多样性极高的微生物克隆群落.

关键词 DNA 提取, 微生物群落, 多样性分析

分类号 X 172, Q 938. 1

环境土壤样品中存在着极其丰富的微生物种类, 它们在土壤生态系统中各自行使着独特的功能, 其作用不可忽视. 在生态学和环境科学的研究领域里, 关于土壤微生物的研究越来越受到重视. 微生物生态学的研究依赖于微生物学的研究方法, 然而, 传统的微生物学研究手段已不能满足要求. 土壤中绝大部分微生物种类不能在人工培养基上培养^[1,2], 因此, 为全面了解土壤中微生物群落中各物种的信息, 科学家从分子生物学的角度发展了多种技术^[3-5]. 作者将应用这些方法进行研究.

1 材料与方方法

1.1 取样地点及土壤样品

于 1995 年 12 月初, 在土壤被冻结前, 在 Michigan State University 的 Kellogg 生物实验站的长期生态观测点的白杨树实验区取样. 实验区建立于 1989 年, 分多草 (weedy) 和无草 (weed-free) 小区, 各区取 0~ 4 和 0~ 15 cm. 多草小区自白杨树种植以后未受到人为的干扰, 地表植被以多年生草本为主, 总数约 3 种, 密度 10~ 1 种 /m². 无草区自 1989 年施用除草剂以来, 每年都使用除草剂除草, 并辅以机械松土除草.

每个样品分别按相同的取样深度取 6 个土柱, 混匀后取约 100 g 土壤, 放入冷藏盒内, 带回实验室藏于 - 20℃.

1.2 样品处理及 DNA 提取

1.2.1 研磨 从每个样品中称取 5 g 土壤, 放入研钵中, 倒入适量的液氮, 立即研磨. 再倒入适量液氮, 研磨, 如此重复 3~ 5 次, 使土壤颗粒研成粉末.

1.2.2 提取缓冲液 适合于土壤样品的缓冲液配比为 0.1 mol/L 磷酸盐 (pH 8.0), 0.1

* 收稿日期: 1997-07-14 夏北成, 男, 4 岁, 副教授

mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-base (pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1.0% CTAB.

1.2.3 样品处理及 DNA 提取 ① 将 13.5 mL 提取缓冲液和 50 μ L 蛋白酶 K (10 g/L) 与 5 g 土壤置于 50 mL 的离心管中, 放入 37 $^{\circ}$ C 恒温室内的摇床上, 以 225 r/min 摇 30 min. ② 加入 1.5 mL 20% SDS, 轻轻混匀. 放入 65 $^{\circ}$ C 水浴加热 2 h, 每隔 15~30 min 轻轻摇动 1 次, 摇匀泥浆. ③ 用 2000~3000 r/min 离心 5~10 min, 将上清液转入新的 50 mL 离心管中. ④ 取 4.5 mL 提取缓冲液加入原离心管, 摇匀泥浆, 加入 0.5 mL 20% SDS, 放回水浴 15 min, 用上述同样的速度离心 5~10 min. 将上清液转出并与原上清液合并. 再重复此步骤 1 次. ⑤ 用与上清液等量的三氯甲烷于离心管中混匀, 用 3300~3600 r/min 的速度离心 20 min. 然后收集上清液, 于上清液中加入 0.6~1.0 倍体积的异丙醇, 静置于室温下 1 h 或过夜. ⑥ 用 9000 r/min 的速度在 25 $^{\circ}$ C 下离心 20 min, 倒出清液, 加入 200~500 μ L 去离子水, 溶解粘附于离心管壁的 DNA 及其杂质, 并收集于 1.5 mL 的微型离心管中.

1.2.4 DNA 纯化 从土壤中直接提取的 DNA 抽提物中含有许多杂质, 例如有机质、腐质酸、无机盐和一些重金属等. 为了使提取的 DNA 能很好地扩增, 这些杂质必须从 DNA 中除去. 本项研究中采用 3 种方法进行纯化. ① 单个微型过滤柱, 为 Promega 公司生产的 Wizard DNA Clean Preps 或 Wizard PCR Preps. 取 DNA 粗提液 100 μ L (约为 5 g 土壤粗提液的 1/5~1/10), 加入 100 μ L 纯化缓冲液和 1 mL 纯化粘接树脂液, 混匀, 静置几 min. 于过滤柱上加 1 个 3 mL 的注射器管, 然后将混合液转入注射器管内, 用真空泵抽吸, 抽干后再继续抽 15~20 s. 抽完后加 2 mL 80% 异丙醇冲洗过滤柱 (真空抽吸). 取下过滤柱, 以 1400 r/min 的速度在微型离心机上离心 20 s, 进一步去除杂质和异丙醇. 然后将过滤柱取下, 套于 1.5 mL 的微型离心管上, 加入 50~100 μ L 约 75~80 $^{\circ}$ C 的去离子水, 约 5~10 min 后, 再在微型离心机上以同样的速度离心 20 s. 纯化的 DNA 便被收集于微型离心管中. ② 2 次微型过滤柱过滤, 即完成 ① 后再重复 ①. ③ 电泳加微型过滤管. 用 0.8% 的低熔点琼脂糖胶在低电压 (21~25 V) 下电泳. 制胶时使用大孔梳, 将每个样品的粗提液装于 1~2 个孔内, 电泳 15~20 h. 然后将胶置于紫外灯下, 用洁净的刀片将 DNA 带切下 (切下尽可能少的胶), 置于微型离心管内. 加入 100 μ L 的去离子水, 置于 85 $^{\circ}$ C 水浴中, 使胶全部溶解. 然后按 ① 的步骤使用微型过滤柱纯化 DNA.

1.2.5 DNA 定量测定 少量纯化的 DNA 提取液可采用荧光法测定, 或将提取液进行高倍稀释后用紫外分光光度计测定. 这 2 种方法的测定结果, 包含了被破碎的 DNA 小片段和一些同时被提取出来的较大片段的土壤动物 DNA. 本研究采用电泳的方法进行测定. 用 1.5%~2% 的普通琼脂糖胶, 用小孔梳作胶. 用 DNA 相对分子质量标记 III 作定量计算的参照. 根据标记 III 所提供的参数 (总的 DNA 含质量和不同大小片段的含质量), 用不同体积 (1, 3, 5 和 10 μ L) 进行电泳. 比较 4 种不同体积中的各个片段的 DNA 电泳带大小与适量被测样品的 DNA 电泳带的大小, 可得出样品中的 DNA 含质量.

1.2.6 PCR 扩增和基因转移 将获得的被纯化了的 DNA 用作聚合酶链反应 (PCR) 的模板, 对目标 DNA 进行扩增. 以微生物群落分析为目的的研究, 希望获得尽可能多的物种信息, 因此采用对土壤中真细菌类 (Eubacteria) 微生物适应性很广的引物 fD 和 rP1^[6], 与 *Taq* 酶一起将提取的 DNA 的 16S 因子扩增. 扩增后的产物经电泳检测.

用新扩增的 16S 因子之 PCR 产物与基因转移载体在 14 $^{\circ}$ C 下进行连接, 连接的时间约为 10~12 h, 连接时所用 16S 因子的数量与基因载体的数量之比约为 0.5~1. 然后利用热

脉冲的方法将连接有 16S 因子的基因转移载体转移插入到 *Escherichia coli* 中, 将携带 16S 因子的 *E. coli* 细胞转移到 LB 平板培养基上, 置于 37°C 恒温下培养, 待其菌落生长到适度大小, 此时部分未携带转移因子的菌落已经表达为蓝色, 再将其放入 4°C 下 10~20 h, 以使绝大部分不携带转移因子或只携带一个很小的 (小于 16S) 因子的菌落都转变为蓝色, 从而获得所需要的携带转移因子的克隆 (白色菌落)。

用引物 TA-10 和 TA-18 将所获得的携带 16S 因子的克隆细胞直接用 PCR 扩增, 为确保 16S 因子的存在, 再通过电泳检测全部经扩增的克隆, 以确定那些不带 16S 因子或只携带小于 16S 因子的克隆细胞。引物 fD 和 rP 的序列分别为: 5' CCATC GATGT CGACA GAGTT TGATC CTGGC TCAG 3' 和 5' GACTA GTGGA TCCAC GGTTA CCTTG TTACG ACTT 3', 引物 TA10 和 TA18 的序列分别为: 5' GCCGC CAGTG TGCTG GAATT 3' 和 5' TAGAT GCATG CTCGA GCGGC 3'。

1.2.7 电泳胶片图象聚类分析 用 2 组 DNA 限制性内切酶 (*MspI* -*RsaI* 和 *HhaI* -*HaeIII*) 对所有携带 16S 因子的克隆的 PCR 产物进行消化 (置于 37°C 下 5~15 h)。先用 *MspI* 和 *RsaI* 对全部携带 16S 因子的、经 PCR 扩增的克隆进行消化处理。制备特别的 3.1%~3.3% 的 Metaphor 琼脂糖胶, 在 4°C 下对消化了的 DNA 进行电泳分离, 从而获得每个克隆的基因型。将所有基因型图象通过摄影机录入电脑, 应用 Gelcompar 电泳胶片图象分析软件分析。将相同的基因型聚合到一起, 并根据各基因型间的相似性进行聚类。各不相同的基因型为唯一基因型, 称为 OTU (operational taxonomic unit) 操作分类单位。对经 *MspI* 和 *RsaI* 消化处理而获得的具相同基因型的克隆再用 *HhaI* 和 *HaeIII* 进行消化处理, 并按上述同样的步骤, 确定被消化处理的克隆是否为不同的 OTU。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取

2.1.1 产量高 使用 SDS 和加液氮速冻并进行研磨的提取方法, 可使得被处理的土壤样品悬浮物中的细菌细胞和 DNA 物质能最大限度地游离出来^[7], 与用玻璃珠破碎的方法比较, 经处理后滞留于残余物中的细胞从 26% 减少至 13%^[8], 且使 DNA 的破碎率减少。从表可以看到, DNA 的产量还与土壤样品的性质有关。多草的土壤样品中生物种类较丰富, 所以 DNA 的含量较高, 所以提取物的产量也就较高。

表 1 4 种不同土壤样品中的 DNA 产量

Tab. 1 Yields extracted from four samples

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

样 品	多草 (0~4 cm)	多草 (0~15 cm)	无草 (0~4 cm)	无草 (0~15 cm)
粗提物 DNA	25.2~32.1	24.7~31.5	17.1~20.3	18.3~21.6
纯化后 DNA	17.8~28.3	18.2~26.5	12.9~17.5	14.1~18.8

2.1.2 目标 DNA 比例较大 细菌 DNA 片段约为 23 000 bp。如果 DNA 破碎, 则目标片段的产量就低。用电泳测定与紫外分光光度计测定的结果比较, 所获得的目标片段的比例在 83.2%~91.5% 之间。与人工培养的假单胞菌的 DNA 提取物对比, 片段大小相等。

2.1.3 纯度高 用粗提物中的 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 不能得到任何 PCR 产品。粗

提物中的杂质抑制了 PCR 的反应过程. 3 种纯化方法中, 纯度最高的方法是先用琼脂糖胶电泳后, 再经过微型过滤柱的方法. 这个方法中先去掉了粗提中破碎的小片段和其他的大片段, 另一方面, 在电泳过程中一些杂质被分离开, 例如腐殖质和某些盐类物质等. 用纯化后的 DNA 作为 PCR 反应中的模板进行扩增, 效果较理想. 用 2 次微型过滤柱能获得纯度较好的提取物, 但 DNA 产量损失较大, 有时在 40% 以上. 纯化过程中最难去除的物质是腐殖质, 且腐殖质对 PCR 扩增过程的影响很大, 增加纯化过程中电泳的时间对去除腐殖质会有所帮助.

2.2 微生物群落结构及多样性

2.2.1 群落多样性极高 本次研究的 4 个样品均获得极高的群落多样性. 各样品获得的克隆数量、OTU 数量及群落的多样性指数如表 2.

表 2 土壤样品的克隆数及群落多样性

Tab. 2 Clones obtained from soil samples and diversity of soil microbial community

项 目	多草 (0~ 4 cm)	多草 (0~ 15 cm)	无草 (0~ 4 cm)	无草 (0~ 15 cm)
克隆数 (带 16S 转移因子)	606	705	210	324
OTU 数量	551	684	191	311
OTU 数 / 总克隆数	0.91	0.97	0.91	0.96
群落多样性指数 ¹⁾	2.77	2.93	2.27	2.49

1) 根据香农 (Shannon) 指数计算

表 2 说明土壤样品的微生物群落有极高的多样性. 所获得的克隆数比同类研究高很多^[7-9]. 这可能是以前的研究只注重方法, 而没有注重 OTU 的数量. 表 2 中 OTU 数量并非克隆数的极限值, 实际从 2 个多草的样品所获得的克隆很多, 但由于处理样品的难度和人力所限, 未将所有的克隆都进行扩增和消化处理等分析, 只是作了尽可能的努力.

2.2.2 无显著优势 OTU 从表 2 中 OTU 数与总克隆数的比值可以看出, 唯一基因型的比值高, 而具有相同基因型的克隆很少. 所获得的克隆中没有显著的优势 OTU.

2.2.3 植物群落的影响 多草小区表层土壤具有很丰富的植物群落, 而无草小区则除了白杨树以外没有其他的植物, 而且每年都会对其土壤表层进行人为的干扰. 从克隆数、OTU 数和群落多样性指数来看, 多草小区具有更为丰富的生物种类. 多草小区中, 由于多年连续有丰富的植被生长, 且土壤环境长期不受人造的干扰, 土壤环境稳定; 植物根系为微生物栖息提供更好的场所, 其分泌物可使微生物具有更丰富的资源可以利用; 植被的覆盖使得土壤湿度条件更适合于群落的发展; 植物根系的生长活动可以改变土壤的物理环境, 并有利于微生物的生长. 微生物群落的发展反过来又有利于植物群落的发展.

2.2.4 表层土壤微生物群落无优势种群 从表层土壤微生物群落的结构看出, 基本上不存在优势的种群或 OTU. 根据一般的生态学原理, 这说明在表层土壤微生物群落中不存在明显的竞争作用. 这可能与表层土壤环境的异质性有关. 表层土壤环境中具有十分丰富的可用资源, 可使微生物群落中种群间就资源的竞争减到最低; 表层土壤微生物群落的生态功能极其多样化, 因此各种群间的生态位重叠较小; 表层土壤环境中, 因为资源丰富且土壤颗粒间缺少可供微生物种群自由移动和交流的介质, 从而形成种群间的空间隔离.

2.3 方法的评价

对一个方法的评价, 有不同的指标. 对于从样品中提取 DNA 物质, 有效性是最重要的

另外, 过程是否简单、省时, 也是不可忽视的. 采用本文方法比其他方法获得的 DNA 产量略高, 本文方法的有效性是肯定的. 根据经验, 用此方法提取土壤样品中的 DNA, 1 d 可以处理一批样品而获得粗提物, 纯化的过程如果利用晚上进行电泳, 则第 2 天可以获得纯化的 DNA, 并进行含量测定和 PCR 反应. 在群落分析的研究中, 所获得的土壤微生物的克隆群落多样性极高, 也说明本方法适合于这类研究. 该方法能有效地提取不同微生物种类的 DNA, 能真实地反映环境中的微生物群落结构.

参 考 文 献

- 1 Liesack W, Stackbrandt E. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol*, 1992, 174: 5072~ 5078
- 2 Ward D M, Weller R, Basteson M M. 16S rDNA sequences reveal numerous uncultured inhabitants in a natural community. *Nature*, 1990, 345: 63~ 65
- 3 Zhou J Z, Tiedje J M. Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 613~ 618
- 4 Holben W E, Jansson J K, Chelm B K, et al. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54: 703~ 711
- 5 Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 316~ 322
- 6 Liesack W, Weyland H, Stackbrandt E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, 1991, 21: 191~ 198
- 7 Trevors J T, Lee H, Cook S. Direct extraction of DNA from soil. *Microbiology Releases*, 1992 (1): 111~ 115
- 8 More M I, Herrick J B, Silva M C, et al. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 1572~ 1580
- 9 Craig L M, Dobbs F C, Carl D M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 871~ 879

Application of Molecular Methods in Microbial Ecology

Xia Beicheng* Zhou J Z Tiedje J M

Abstract This paper reports the results of soil microbial community structure obtained using molecular method. Meanwhile all details of this method including DNA extraction and cloning are introduced. High yield of DNA extracted from soil samples and high diversity of soil microbial community show this method is available and effective for microbial community analysis.

Keywords DNA extraction, microbial community, diversity analysis

* Institute of Environmental Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China