

分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用*

杨永华 姚健

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

摘要 微生物多样性是生物多样性的重要组成部分。由于微生物和大生物(动、植物)相比,存在着多种显著差异,因此其多样性研究、保护及利用也有所不同,尤其是研究方法亟待完善、提高。近年来,分子生物学方法广泛用于微生物多样性的研究并取得了一系列研究成果。本文从四个方面加以介绍:1)微生物总DNA制备及其遗传多样性检测方法;2)16S rRNA基因序列研究;3)核酸杂交分析技术;4)DNA动力学的研究。今后的发展趋势是加强这些方法间及其与传统方法的有机结合,并发展新方法,促进微生物多样性研究的深入开展。

关键词 微生物多样性, DNA扩增, 遗传多样性, 16S rRNA基因序列, 核酸杂交, DNA动力学

Molecular techniques and their application to the study of microbial diversity/YANG Yong-Hua, YAO Jian

Abstract Microbial diversity is an important part of biodiversity. Microbial diversity research and its conservation and utilization are quite different from those of macroorganisms including animals and plants. In particular, it is necessary to develop new techniques suitable for microbial diversity research. Recently, as the development of modern molecular biology, several molecular techniques have been used to study microbial diversity, including 1) total DNA extraction of microbe and its genetic diversity assay, 2) 16S rRNA gene sequence analysis, 3) nucleic acid hybridization, and 4) DNA kinetics. In order to promote extensive and intensive research on microbial diversity, it's necessary to integrate these methods to enhance a combination of traditional and modern techniques, and to develop novel method.

Key words microbial diversity, DNA amplification, genetic diversity, 16S rRNA gene sequence, nucleic acid hybridization, DNA kinetics

Author's address Department of Biological Sciences and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093

微生物包括了从原核到真核的不同类群的生物:细菌、放线菌、原生动物、真菌、部分藻类和病毒,是生物多样性的重要组成部分。通过其代谢多样性和遗传适应性,微生物在许多小生境包括其他生命类型不适宜的极端环境中得以生存并发挥作用(Parkinson & Coleman, 1991)。微生物作为生态系统中极重要的一员,对动植物的生长(Kennedy & Smith, 1995)、生态系统中的能流和物质循环(Schlensinger, 1990)及环境污染物的降解和解毒(Lammar & Dietrich, 1990)等方面起着重要作用。

微生物物种的多样性是微生物多样性最基本的内容。微生物是地球上仅次于昆虫的第二大类群的生物,但微生物已知种占估计种的比例很小,细菌、真菌及病毒的已知种占估计种的比例分别仅为5%、10%和4%,微生物物种多样性的研究要落后于其他大生物类群(Hawksworth, 1991)。此外,微生物多样性与其他生物类群相比有许多独特之处,包括:1)生存环境

多样 2)生长、繁殖速度多样 3)营养、代谢类型多样 4)生活方式多样。因而,微生物多样性的研究无论对于生态系统功能的完整理解,还是对于微生物资源的利用和开发都具有特殊重要的意义。研究微生物多样性的传统方法是将微生物从环境中分离、实验室培养和鉴定。然而,微生物种类繁多,自然界中仅有极少数微生物得到鉴定(Hawksworth, 1991),能够在实验室培养的种类则更少,至多为1%(Amann et al., 1995)。近年来,随着从环境中提取微生物群落DNA方法的改进(Zhou et al., 1996),按样品中DNA来计算微生物数目和种类的技术得到了较大发展,这为微生物多样性的研究提供了一些有益的思路。

DNA的多样性是生物多样性的本质内容。现代分子生物学技术在微生物多样性研究上的应用克服了微生物培养技术的限制,能对样品进行较客观的分析,较精确地揭示了微生物种类和遗传的多样性(Pace, 1997)。目前分子生物学在微生物多样性的应用研究主要集中在以下几个方面。

1 微生物总DNA制备及其遗传多样性检测方法

近年来,从环境样品中提取和纯化微生物总DNA的方法不断得到发展,从而可对环境样品总DNA进行PCR扩增(Leff et al., 1995),推动了利用分子标记技术研究微生物的多样性。从环境样本中提取微生物总DNA有两种方法:1)直接用机械或化学的方法破碎样品中的微生物,释放出总DNA(Steffen et al., 1988) 2)从样本中分离出微生物细胞,然后抽提DNA(Brenna & Bianchi, 1994)。从总体上来讲,前一种方法更能代表环境样本中微生物遗传多样性的实际情况(Leff et al., 1995)。

目前用于遗传多样性检测的分子标记主要包括限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性DNA(RAPD)、DNA扩增指纹分析(DAF)(Caetano-Anolles et al., 1991)和扩增片段长度多态性(AFLP)等。其中应用较广的是RAPD分子标记,如Xia等(1995)利用RAPD分子标记技术研究了处于2, 4-D不同影响下的土壤微生物群落遗传特征的变化等。

2 16S rRNA基因序列研究

Pace等(1986)首次利用rRNA基因确定环境样品中的微生物,通过对5S rRNA基因的序列分析来研究微生物的生态和进化。该方法很快被用于微生物多样性研究领域。由于5S rRNA基因相对较小(约120个核苷酸),携带信息相对较少,因而揭示微生物群落多样性的能力有限。相比之下,随后开展的16S rRNA基因序列(约1500个核苷酸)分析为微生物多样性研究提供了更多信息,且效率更高。

目前,16S rRNA基因序列分析已广泛应用于微生物多样性的研究(Heuer et al., 1997)。16S rRNA基因序列分析是主要基于已建立的微生物16S rRNA基因序列数据库,用以确定细菌的系统发育关系,并使序列探针用于识别未知菌(uncultured microbes)成为可能。当然,序列探针的确定也可根据分子标记方法如RAPD方法进行。利用16S rRNA基因序列研究微生物多样性可采用不同的策略。目前一般常用以下几种方法。

方法一:1)从样品中分离总微生物DNA 2)PCR扩增16S rRNA基因 3)对PCR扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)或温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)分析,直接观察其多样性。

方法二:步骤1)和2)同方法一 3)对PCR扩增产物用限制性内切酶进行切割并电泳,然后用标记探针杂交,从而可进行RFLP分析,用以揭示微生物RFLP的多样性(PCR-RFLP)。

方法三:步骤1)同方法一 2)建立DNA文库 3)用16S rRNA基因探针筛选DNA文库中

的 rDNA 克隆;4)克隆的序列测定和比较,用以鉴定微生物序列的多样性或利用已知各物种的 16S rRNA 基因序列数据库鉴定未知菌的归属,从而可发现新菌种。

方法四:步骤 1)从环境样品中分离微生物菌落;2)对各单菌落分离微生物总 DNA;3)以 16S rRNA 基因探针(包括 domain、属或种等专一性探针)进行杂交,常用于鉴定未知菌或研究微生物物种的多样性。

事实上,上述四种方法可根据研究的需要加以调整,从而衍生出分析 16S rRNA 基因多样性的其他方法。至于探针的选取,图 1 示意了微生物属、种和菌株的专一性探针及其多态性的电泳图型式。由图 1 可见,A 凝胶上可确定 g2 属的一条专一性片断,B 凝胶上可确定 g2 属内 s3 种的一条专一性片断,这些专一性片断可分别作为 g2 属和 s3 种的专一性探针;C 凝胶上的 5 个多样性片断可作 s3 种内的多样性分析。在方法二的分析中,按所用的探针是否为特定属、种或其他分类地位的专一性探针,可获得供试各样品中有关该属、种或其他分类等级的 16S rRNA 基因多样性的信息。如果各样品是微生物菌落,若用传统方法进行多样性分析,需分离各个微生物菌落,鉴定种、属及其计数等,由于微生物已知的物种数很少等原因,研究的深度和广度会十分有限。此外,用全部已知的属或种专一性探针对某一样品的 16S rRNA 基因作 RFLP 分析,若均无阳性杂交片断出现,则说明该样品中可能存在着未知菌属或种。

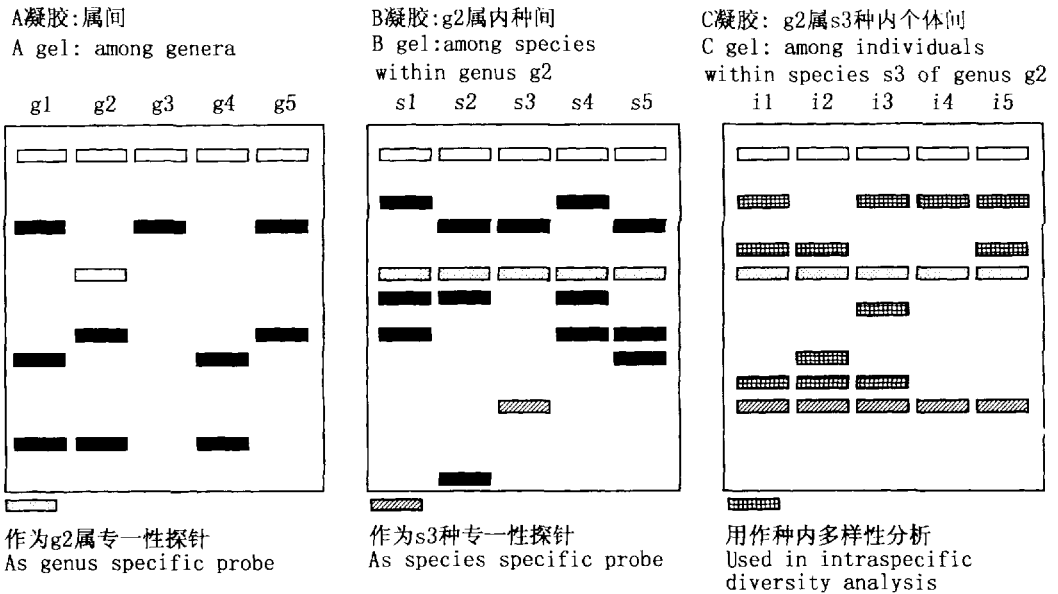


图 1 属、种及其种内 16S rRNA 基因多态性和非多态性片断

Fig. 1 Polymorphic and non-polymorphic fragments of 16S rRNA gene among genera, species and individuals

无论采用何种方法,16S rRNA 基因序列水平的多样性为微生物的系统发育和未知菌的鉴定提供了全新的方法。不少学者利用 16S rRNA 基因序列分析技术研究了多种环境的微生物多样性,并得到了一些有意义的结果。如 Glovanoni 等(1990)研究了 Sargasso 海中浮游细菌的遗传多样性;Palys 等(1997)发现 rRNA 基因序列结构和功能十分保守;Tanner 等(1998)发现不同污染物对细菌群落多样性有显著的作用;Oureas 等(1998)发现农业土壤微生物群落显示生理活性差异及其多样性;Nuble 等(1999)发现氧化光能利用菌群落 16S rRNA 基因的丰度与其形态型显著相关。不少新的微生物物种的发现,尤其是和一般细菌差异显著的古细菌的发现,奠定了有关古生物、真细菌和真核生物“三域”理论的基础(Woese & Fox, 1977)。

3 核酸杂交分析技术

核酸分子杂交技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种崭新的分子生物学技术。它是基于 DNA 分子碱基互补配对的原理,用特异性的 cDNA 探针与待测样品的 DNA 或 RNA 形成杂交分子的过程。由于它的高度特异性和灵敏性,近年来被广泛应用于微生物多样性的研究中。

用于微生物多样性研究的探针主要有双链 DNA、单链 DNA 和 RNA 以及寡核苷酸探针等三类,可对有关微生物在特定环境中的存在与否、分布模式和丰度等情况进行研究。包括:

1) 对环境样品直接作原位杂交(*in situ hybridization*),可获得未知菌的微生物多样性的大量信息,如微生物的形态特征和丰度以及在样品上的空间分布和动态(Saylor & Layton, 1990)。由于是对环境样品直接进行检测,所以获得的结果理论上应更能反映自然环境下微生物的多样性特征。这种研究成功的关键是前期研究工作的积累,尤其是已具有对属、种或种群等具特异性的 DNA 探针。如 Jain 等(1987)采用特异性的探针地对地下水中的细菌进行原位杂交,研究了细菌有关质粒基因的存在和分布情况;Barkay 等(1989)研究了汞污染土壤中抗汞细菌的种类、数量和变化趋势等。

2) 对微生物菌落作全细胞杂交(whole-cell hybridization),可提供比用探针作 Southern 印迹杂交更直观的信息。其简单原理为:i)以适当的介质固定样品细胞并保持细胞的形态完整、渗透性和代谢活性;ii)固定的细胞用含荧光标记的寡核苷酸探针的杂交液处理;iii)样品温育 2~3 h 以使标记探针和互补 DNA 序列杂交;iv)杂交后洗去未杂交上的探针;v)样品用落射荧光显微镜(epifluorescence microscopy)进行微生物鉴定和计数。最初此方法以放射性标记的 rRNA 基因探针用于镜检单个微生物细胞(Amann et al., 1990)。Lobet-Brossa 等(1998)也曾应用荧光标记的 rRNA 基因探针对海底沉积物微生物群落进行杂交分析。

3) 对环境样品中提取的 DNA 作数量印迹杂交(quantitative dot blot),可获得有关特定 DNA 序列丰度的信息。其主要原理是基于专一性探针(如特定 16S rRNA 基因探针)、通用型探针(如总 16S rRNA 基因探针)和环境样品中分离的总 DNA 可分别进行杂交,其特定 DNA(如 16S rRNA 基因序列)的相对丰度可用此两类探针杂交信号的比值加以确定,用以间接反映特定的微生物细胞的数量或特定种群的相对生理活性等。如 Lee & Fuhrman(1990)应用该方法研究海洋浮游细菌群落结构的多样性;Ritz & Griffiths(1994)研究土壤微生物群落种群结构的变化,用来评估海洋浮游细菌群落的结构相似性;Wiches 等(1998)研究北海中噬菌体多样性及遗传关系等。

4) 对 rDNA 的扩增产物或 rRNA 的反转录产物作 Southern 杂交(Southern hybridization),其主要原理是基于微生物的 rRNA 基因的信号序列在不同物种层次上存在差异。根据这些不同层次的信号序列而设计的特定寡核苷酸探针可检测相应微生物的层次,用古生物、真细菌和真核生物等三域专一性探针可鉴别未知菌所属的域类;如有必要可用更低分类级别(如属、种和亚种等)的专一性探针进行检测,从而确定未知菌的相应种类。利用此法,Murray 等(1998)成功地研究了南极洲 Anvers 岛附近海水中细菌和古细菌的季节变化和空间变异等。

4 DNA 动力学的研究

样品中 DNA 的复杂性同样可用于微生物多样性的研究,尤其是对于土壤微生物群落的研究。一般地,DNA 混合物的复杂性可用 C_0t 1/2 值(经热变性解链后,50%的 DNA 链复性为双链 DNA 所需的时间)评估(De Ley, 1970): C_0t 1/2 值越大,DNA 复性所需时间就越长,相应的 DNA 混合物就越复杂。因而提取环境样品中的总 DNA,测量其 C_0t 1/2 值,并与简单 DNA(如

质粒或单基因组) C_0t 1/2 值相比,可知该 DNA 样品的复杂程度。

Torsvik 等(1990)研究了挪威等地的森林土壤样品,通过提取样品的总 DNA,而后在高压下将其剪切成分子量平均为 420 kD 的 DNA 片段,测定热变性复性过程,得到 C_0t 1/2 值,结果显示该土样的基因多样性是一般分离法所得基因多样性的 200 多倍。Atlas 等(1992)所作的相似研究表明有些土壤微生物群落 DNA 更复杂。Ritz 等(1997)也对土壤微生物及浮游细菌群落作了 DNA 复性动力学研究,比较了群落间基因多样性的差异。

5 微生物分子多样性的研究展望

微生物在地球生物圈中扮演了一个极为重要的角色,起着关键作用,但由于微生物的形体小、结构简单,微生物多样性的研究一直不为人们所重视。尽管近十几年来,各种研究方法的发展使得这种状况有了很大改观,但还远远不够(Pace, 1997)。许多涉及微生物的过程还不为人所真正了解,如地球化学过程和对全球变化的影响、微生物标准生态系的建立和种群间关系的研究等方面,都需要加倍努力研究(Pace, 1997; Boschker et al., 1998)。

本文所介绍的一些 DNA 分析方法是研究微生物多样性的有力工具,但还只是孤立地研究微生物多样性的某个方面。笔者认为,今后有必要加强这些方法的有机联系及其与传统研究方法的结合,并不断地设计新方法。事实上,已有使用上述方法综合研究的一些报道,如厌氧菌培养条件的改进(Janssen & Frenzel, 1997),荧光标记技术与 16S rRNA 基因序列多样性研究方法相结合(Chen et al., 1997),16S rRNA 基因序列多样性研究方法与杂交技术的结合(Coastes et al., 1998)等,这些无疑会促进微生物多样性研究的深入。

参 考 文 献

- Atlas R M, Horowitz A, Krichevsky M, Bej A K, 1992. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology*, **22**: 249 ~ 256
- Amann R I, Krumholz L, Stahl D A, 1990. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, **172**: 762 ~ 770
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H, 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**: 143 ~ 169
- Barkay T, Libebert C, Gillman M, 1989. Hybridization of DNA probes with whole community genome for detection of genes that encode microbial responses to pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 1574 ~ 1577
- Boschker H T S, Nold S C, Wellsbury P, Bos D, de Graaf W, Pel R, Parkes R J, Cappenberg T E, 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers. *Nature*, **392**: 801 ~ 805
- Brenna O, Bianchi E, 1994. Immobilised lacase for phenolic removal in Mustand wine. *Biotechnology Letters*, **16**: 35 ~ 40
- Caetano-Anolles G, Bassam B J, Gresshoff P M, 1991. DNA fingerprinting using very short oligonucleotide primers. *Biotechnology*, **9**: 553 ~ 556
- Chen F, Goniolet J M, Dustman W A, Maron M A, Hodson R E, 1997. *In situ* reverse transcription, an approach to characterize genetic diversity and activity of prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4907 ~ 4913
- Coastes J D, Ellis P J, Blunt-Harris E L, Gaw C V, Rosen E E, Lovley P R, 1998. Recovering of humic-reducing bacteria from a diverse environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 185 ~ 191
- De Ley J, 1970. Reexamination of association between melting point, bouyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, **101**: 738 ~ 754
- Glovanoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, Field K G, 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea Bacterioplankton. *Nature*, **345**: 60 ~ 63
- Hawksworth D L, 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, **95**: 641 ~ 655
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E M H, 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene coding 16S rRNA and gel electrophoresis separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3233 ~ 3241

- Jain R K , Saylor G S , Wilson J T , Houston L , Pacia D , 1987. Maintenance and stability of introduced genotypes in groundwater aquifer material. *Applied and Environmental Microbiology* , **53** : 996 ~ 1002
- Janssen P H , Frenzel P , 1997. Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride : studies of pure and defined mixed culture of anaerobic bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology* , **63** : 4552 ~ 4557
- Kennedy A C , Smith K L , 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In : Collins H P , Robertson G P , Klug M J (eds.) , *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity* , Netherlands : Kluwer Academic Publishers , 75 ~ 86
- Lammar R T , Dietrich D M , 1990. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Applied and Environmental Microbiology* , **56** : 3093 ~ 3100
- Lee S , Fuhrman J A , 1990. DNA hybridization to compare species composition of natural bacterioplankton assemblages. *Applied and Environmental Microbiology* , **56** : 739 ~ 746
- Leff L G , Dana J R , McArthur J V , Shimkets L J , 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediment. *Applied and Environmental Microbiology* , **61** : 1141 ~ 1143
- Lobet_Brossa E , Rossello_Mora R , Amann R , 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* , **64** : 2691 ~ 2696
- Murray A E , Preston C M , Massawa R , Taylor L T , Blakis A , Delong E F , 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island , Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* , **64** : 2585 ~ 2595
- Nuble U , Garcia_Pichel F , Kuhl M , Muyzer G , 1999. Quantifying microbial diversity : morphotypes , 16S rRNA genes , and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology* , **65** : 422 ~ 430
- Oureas L , Jensen S , Daae F L , Torsvik V L , 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology* , **64** : 2739 ~ 2742
- Pace N R , 1997. A molecular viewer of microbial diversity and the biosphere. *Science* , **276** : 734 ~ 740
- Pace N R , Stahl. D A , Lane D J , Olsen G J , 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequence. *Advances in Microbial Ecology* , **9** : 1 ~ 55
- Palys T , Nakamura L K , Cohan F M , 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world : the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology* , **47** : 1145 ~ 1156
- Parkinson D , Coleman D C , 1991. Microbial communities , activity , and biomass. *Agriculture , Ecosystem and Environment* , **34** : 3 ~ 33
- Ritz K , Griffiths B S , 1994. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* , **26** : 963 ~ 971
- Ritz K , Griffiths B S , Torsvik V L , Hendriksen N B , 1997. Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. *FEMS Microbiology Letter* , **149** : 151 ~ 156
- Saylor G S , Layton A C , 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Annual Review of Microbiology* , **44** : 625 ~ 648
- Schlensinger W H , 1990. Evidence from chronosequence studies for a low carbon_storage potential of soil. *Nature* , **348** : 232 ~ 234
- Steffen R J , Goksoyr J , Bej A K , Atlas R M , 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* , **54** : 2908 ~ 2915
- Tanner M A , Goebel B M , Dojka M A , Pace N R , 1998. Specific ribosomal DNA sequence from diverse environmental settings correlate with experimental contaminant. *Applied and Environmental Microbiology* , **64** : 3110 ~ 3113
- Torsvik V L , Goksoyr J , Daae F L , 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , **56** : 782 ~ 787
- Wiches A , Biel S S , Gelderblom H R , Brikoff T , Muyzer G , Schutt C , 1998. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* , **64** : 4128 ~ 4133
- Woese C R , Fox G E , 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms , *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , **74**(11) 5088 ~ 5090
- Xia X , Bollinger J , Ogram A , 1995. Molecular genetic analysis of response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Molecular Ecology* , **4** : 17 ~ 28
- Zhou J Z , Bruns M A , Tiedje J M , 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* , **62** : 316 ~ 322