



土壤宏转录组 RNA 的提取方法评价

赵俊¹, 莫永亮^{1,2}, 贾仲君^{1*}

¹中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】比较手工法和试剂盒法提取土壤 RNA 对原核微生物多样性的影响, 评价两种方法研究土壤宏转录组的技术偏好性。【方法】针对黑龙江海伦砂质黑壤土、江苏滨海黏心夹砂土、江西鹰潭第四纪红黏土不同母质发育形成的三种水稻土, 采用手工和试剂盒法分别获得微生物总 RNA, 利用高通量测序原核微生物 16S rRNA 多样性, 通过紫外分光 and 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量, 比较手工和试剂盒法提取 RNA 对水稻土原核微生物群落的影响规律。【结果】三种水稻土中试剂盒提取 RNA 的纯度皆高于手工法, 但 RNA 提取总量不一致。试剂盒提取黑龙江和江苏水稻土的 RNA 总量高于手工法, 而手工法提取的江西水稻土 RNA 总量高于试剂盒法。高通量测序发现土壤类型而不是 RNA 提取方法决定了原核微生物多样性指数和群落结构。3 个水稻土共检测到 27 门和 409 属, 两种 RNA 提取方法偏好性提取了 19 门和 181 属, 这些门和属占水稻土微生物总丰度平均值分别为 40.4% 和 44.4%。与手工提取 RNA 相比, 试剂盒法发现 11 个微生物门的丰度显著偏高($P < 0.05$), 但仅有 Armatimonadetes 门在三种水稻土同时存在专一偏好性; 手工法提取也发现 11 个微生物门的丰度显著高于试剂盒法, 并且仅有 Firmicutes 门在三种水稻土中同时存在专一偏好性。在微生物属水平, 三种水稻土中均发现试剂盒法偏好性提取了 2 属, 而手工法偏好性提取了 5 属。进一步针对 72 个优势微生物属(丰度 $> 0.1\%$ 且同时存在于三种水稻土), 发现其占有微生物丰度 80% 强, 且 48 属的变化规律与 RNA 提取方法无关。例如, 手工法提取水稻土好氧甲烷氧化菌的规律为: 黑龙江(1.68%) $>$ 江西(0.90%) $>$ 江苏(0.59%), 而试剂盒法也得到一致结果, 黑龙江(0.52%) $>$ 江西(0.18%) $>$ 江苏(0.13%)。【结论】两种 RNA 提取方法本身的特异偏好性较小。三种水稻土 27 门 409 属中, 仅有 2 门 7 属可能存在方法本身的专一偏好性, 即在三种水稻土中, 这些微生物均被试剂盒法或手工法特异性偏好提取, 占有原核微生物门和属比例仅为 7% 和 1% 左右。此外, 针对同一水稻土, 手工和试剂盒法提取 RNA 的总量、纯度、微生物相对丰度明显不同, 在原核微生物门和属的分类水平, 约 70% 的门和 22% 的属的丰度具有统计显著性差异, 但两种 RNA 提

基金项目: 国家自然科学基金(31270147, 41530857, 91751204); 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB15040000)

*通信作者。Tel: +86-25-86881311; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jia@issas.ac.cn

收稿日期: 2017-11-06; 修回日期: 2018-03-17; 网络出版日期: 2018-03-22

取方法均能反映优势微生物类群在三种水稻土中的变异规律,土壤类型对原核微生物多样性的影响远大于 RNA 提取方法本身的偏好性。未来原核微生物宏转录组研究中,应优先考虑科学问题及其实验处理可能导致的微生物组及其转录差异,结合微生物 RNA 提取特点,最大限度地发挥宏转录组技术优势。

关键词: 原核微生物, 宏转录组, 水稻土, 试剂盒 RNA 提取, 手工 RNA 提取, 16S rRNA

微生物被认为是地球最大的分解者。据估算,每克土壤中微生物的数量最高可达上百亿,物种可达数十万种^[1]。这些数量巨大、种类繁多、功能多样的微生物推动了土壤的发生和发育,决定了地球演化的方向和进程,形成了人类赖以生存的土壤历史自然体。然而,栖息于土壤中难以计数的海量微生物中,绝大多数被认为难以培养、生理功能未知,最高可达 99%之多,学术界甚至将其类比为物理学中的暗物质,提出了生物暗物质的理念^[2-3]。因此,如何认知这些尚未培养微生物的生理功能及其在原位复杂地球环境中的作用,一直是学术界研究的热点和难点。

宏转录组被认为是研究微生物原位功能表征的重要技术。宏转录组以复杂环境中微生物群落的总 RNA 转录本为具体研究对象。而 RNA 的存在,在很大程度上表明特定的微生物处于生理活性状态,可能在复杂系统的物质和能量代谢过程中发挥着重要作用。与宏基因组相比,宏转录组具有明显的原位研究优势^[4],因为 DNA 水平基因的存在和检出,并不意味着该基因转录表达并发挥作用,特别在复杂土壤中同时存在数以亿计的微生物,这些微生物很难同时大量分裂、增殖并产生大量新生细胞而发挥重要功能,大多时候原位海量的微生物细胞可能在未增殖的情况下也在发挥作用,因此,以 RNA 分析为核心的宏转录组技术在研究原位微生物功能、发掘活性微生物资源方面具有天然的技术优势。然而,原核微生物 mRNA 稳定性差,降解速度快(以秒计);且占总

RNA 比例仅为 5%左右,因此,与宏基因组相比,宏转录组操作复杂,技术要求高。例如,以宏转录组 Metatranscriptomic*为关键词,在 Web of Science 核心数据库可检测到 612 篇论文(截止到 2018 年 3 月 6 日),其中包括 104 篇土壤转录组论文,141 篇海洋转录组论文。而宏基因组论文则高达 8997 篇,约为宏转录组 15 倍之多,土壤和海洋相关分别为 1496 篇和 1245 篇。这些结果表明,与海洋相比,土壤环境更为复杂,土壤宏转录组难度大于宏基因组,土壤 RNA 的提取和纯化,则是宏转录组研究的难点。

传统的宏转录组研究主要以 mRNA 为核心开展测序分析,从土壤总 RNA 中除去核糖体 rRNA 并富集 mRNA 是关键技术^[5],但由于早期测序成本较高,而细胞体内 rRNA 占比高,测序通量较低的情况下,只能检测到极少量的 mRNA。例如,*E. coli* 中 rRNA 占细胞干重可达 16.8%,而 mRNA 占比仅为 0.8%^[6]。同时,由于 mRNA 降解以秒计,准确评估不同方法所得 mRNA 是否代表了土壤及其他环境中的主要微生物类群,具有极大的挑战^[7-8]。已有研究通过提取土壤总 RNA 反转录获得 cDNA 后,比较其中 mRNA 和 18S rRNA 基因的组成,结果发现两者代表的物种组成具有极大差异,并不一致^[9]。此外,由于相当数量的基因功能未知,mRNA 作为生物分类的分子标靶不具有普适性,针对 mRNA 的宏转录组技术评价,通常具有较大的技术难度。然而,理论上而言,宏转录组的核酸序列均来自于完整细胞,同时 16S rRNA

被认为是生物分类的重要标准,在学术界得到广泛认可。因此,通过对宏转录组总 RNA 中 rRNA 序列组成的系统分析,即可初步评价总 RNA 所代表的土壤微生物细胞及其主要类群,也为后续分析 mRNA 提供了重要的参考策略。

据此,我们提出了本研究的科学问题:(1)不同的土壤 RNA 提取方法是否存在方法本身的专一偏好性。例如,无论何种土壤,试剂盒提取 RNA 是否会导致某种原核微生物类群始终被偏好性提取;(2)不同方法提取 RNA 能否获取土壤中主要的原核微生物类群;(3)不同 RNA 提取方法所得到的研究结论是否具有一致性。针对不同母质发育的 3 种典型水稻土(黑龙江海伦、江苏滨海、江西鹰潭),采用两种常规的土壤 RNA 提取方法(手工 MR 法和试剂盒 KR 法),通过凝胶电泳、实时荧光定量 PCR 和高通量测序 16S rRNA 技术,我们比较了三种水稻土之间活性原核微生物的差异,包括水稻土 RNA 质量、微生物群落结构以及好氧甲烷氧化功能微生物组成,比较了手工 MR 提取 RNA 与试剂盒 KR 法的结果一致性,期望为土壤原核微生物宏转录组研究提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 土壤样品描述

土壤样品均采集于我国典型水稻种植区,包

括黑龙江海伦(HL),江苏滨海(BH)和江西鹰潭(YT),具体采样的经纬度和土壤母质信息见表 1。采集 0–20 cm 表层的新鲜土壤,放置于通风阴凉处,在室温下自然风干至基本保持恒重,然后研磨并过筛(2 mm)。将均一混合的土壤置于 4 °C 土库备用。土壤的基本理化性质如表 1 所示。

1.2 水稻土转录组总 RNA 提取

水稻土预培养:将长期低温保存的风干土壤加入适量水分并恒温培养,为可能休眠的微生物细胞复活尽可能提供最佳环境条件。具体操作包括:称取相当于 5 g 干土的水稻土置于 120 mL 的血清瓶中;加入无菌去离子水调节土壤水分含量至最大持水量的 60%;加丁基橡胶塞密封瓶口,并用铝盖加固,将培养瓶置于 28 °C 恒温培养箱中培养 7 d 后收集水稻土。一部分水稻土(2 g)保存于 2.0 mL 带螺帽口的裂解管(0.5 g/管),立即加入 RNA later 保护水稻土 RNA,并放置于–20 °C,用于手工提取法(MR)水稻土 RNA 提取;另一部分水稻土直接保存于–80 °C 超低温冰箱,用于试剂盒法(KR)水稻土 RNA 提取。

手工提取法(MR):根据已有参考文献[10]并略有修改,具体步骤包括:(1)将装有水稻土的裂解管于室温下解冻,于 20000×g 条件下离心 2 min,倒去上层 RNA later 保护液;(2)向管中加入 0.5 g 玻璃珠(0.5 mm:0.1 mm=3:2, Sigma)和 700 μL 预

表 1. 供试水稻土的地理位置和基本理化性质

Table 1. Geographic locations and physiochemical properties of paddy soils in this study

No.	Sampling site	Geographic locations	pH (H ₂ O)	Total N/ (g/kg soil)	Total organic carbon/ (g/kg soil)	Soil type
1	Hailun city	N47°26' E126°38'	5.97±0.06	2.65±0.01	34.10±0.20	Mollisol, Sandy soil
2	Binhai city	N33°59' E119°47'	7.95±0.04	1.44±0.07	25.10±1.42	Inceptisol, Sandy loam
3	Yingtang city	N28°23' E116°82'	5.77±0.03	1.38±0.02	13.17±1.00	Quaternary red lay

冷的 TPM 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 5.0, 1.7% polyvinylpyrrolidone, 20 mmol/L MgCl₂), 在核酸裂解仪(Fast PrepTM FP120)以 6 m/s 的速度振荡 35 s, 随后将剧烈振荡的裂解混合物在 20000×g 条件下离心 2 min, 上清液转移至 2.0 mL 的无菌离心管中; (3) 再向裂解管中加入 700 μL 预冷的 PBL 裂解液(5 mmol/L Tris-HCl pH 5.0, 5 mmol/L EDTA-2Na pH 8.0, 0.1% SDS, 6% 水饱和酚), 使用核酸提取仪在相同的条件下振荡, 振荡后将上层裂解液与之前的上清合并; (5) 向两次合并上清的离心管中加入 500 μL 的水饱和酚(pH 4.5), 上下振荡 30 次后离心 2 min; 将上清轻轻吸出转移至新的 2.0 mL 离心管中; 再依次加入 500 μL 的氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)(pH 4.5)、氯仿: 异戊醇(24: 1), 用相同的方法振荡、离心、回收上清液; (6) 最后一次上清转移至 1.5 mL 的离心管中, 加入 2 倍体积的 PEG-NaCl 溶液(30% PEG-6000, 1.6 mol/L NaCl), 混匀后室温静置 2 h; (7) 将离心管在常温下 20000×g 离心 10 min, 倒去液体, 加入 400 μL 70% 乙醇洗涤沉淀; 20000×g 条件下离心 5 min 后用枪头轻轻吸去乙醇溶液; (8) 将离心沉淀在无菌通风厨中晾干 5 min, 用 50 μL DNase/RNase-free H₂O 溶解 RNA; (9) 加入 Recombinant DNase I (TaKaRa) 除去溶液中的 DNA 成分; (10) 使用 RNeasyMinElute cleanup Kit (QIAGEN) 试剂盒纯化得到最终的 RNA, 每个样品的每个重复提取 2 g 土壤并溶于 60 μL DNase/RNase-free H₂O 中, RNA 提取物保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

试剂盒提取法(KR): 采用目前市场流行的 PowerSoilTM Total RNA Isolation Kit (MoBio) 试剂盒, 提取水稻土转录组总 RNA, 每个水稻土设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复使用 2 g 土壤全部

用于 RNA 提取, 所有操作均按试剂盒说明书进行, 水稻土 RNA 提取产物溶于 60 μL DNase/RNase-free H₂O 中备用, RNA 提取物保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.3 水稻土转录组总 RNA 分析

水稻土 RNA 纯度及可能的 DNA 污染检测。将上述水稻土转录组总 RNA 作为模板, 利用微生物 16S rRNA 基因通用引物(515F: 5'-CCAGCMGC CGCGG-3'/907R: 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTT T-3')^[11]进行 PCR 扩增, 扩增反应条件如下: 94 °C 1 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 分析为阴性结果, 确保土壤总 RNA 中不存在 DNA 污染。确认 RNA 提取液中无污染后, 将 RNA 溶液样品取 1.5 μL 进行微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000 UV-Vis)检测, 同时取 4 μL 水稻土 RNA 提取液进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。所有实验均设置 3 个重复。

水稻土 RNA 反转录 cDNA 合成。取 7 μL RNA 溶液样品用于反转录合成 cDNA, 所用试剂盒为 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)。将合成的 cDNA 稀释 20 倍作为模板, 开展下游实时荧光定量 PCR 及高通量测序 16S rRNA 基因分析。

1.4 高通量测序及实时荧光定量 PCR 分析水稻土转录组 16S rRNA

高通量测序水稻土原核微生物转录组 16S rRNA。针对水稻土反转录 cDNA 模板, 采用上述微生物通用引物进行 PCR 扩增测序其 16S rRNA。但与上述微生物 16S rRNA 基因的通用引物 515F/907R 略有不同, 高通量 MiSeq 测序所用的正向引物 515F 含有 Taq 标签(12 base-pair 的碱基序列), 作为 barcode 序列用于后续数据分析并区别不同水

稻土样品。高通量测序扩增子的 PCR 反应体系为 50 μL ，包括：25 μL Premix *Taq* (TaKaRa)，正向与反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)，cDNA 模板 2.5 μL ，20.5 μL DNase/RNase-free H_2O 。PCR 扩增的反应条件如下：94 $^\circ\text{C}$ 1 min，94 $^\circ\text{C}$ 30 s，55 $^\circ\text{C}$ 30 s，72 $^\circ\text{C}$ 45 s，32 个循环；72 $^\circ\text{C}$ 10 min。扩增完毕后将 PCR 产物进行 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯下切割回收目标产物片段，用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 试剂盒(TaKaRa)纯化电泳片段，最终将 PCR 产物溶于 30 μL DNase-free H_2O 。进一步通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物纯化效果，使用微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000 UV-Vis)测定纯化后 PCR 产物的浓度。将所有样品 PCR 纯化产物按照等摩尔数进行混合并进行建库和测序(MiSeq PE300)。

实时荧光定量 PCR。标准曲线制备如下：首先利用上述微生物通用引物(515F/907R)对水稻土总 DNA 中的目的基因进行扩增，构建克隆文库后，将含有目的基因的克隆在 LB 营养液中过夜培养，提取、纯化质粒并测定浓度，根据摩尔常数计算出目的基因的拷贝数，随后用 DNase-free H_2O 将质粒连续稀释 8 个数量级，从而得到 16S rRNA 基因的标准曲线。实时荧光定量 PCR 反应仍采用上述通用引物，反应体系如下：10 μL SYBR Premix Ex *Taq* (TaKaRa)，正向与反向引物各 0.3 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)，1 μL DNA 模板，8.4 μL DNase/RNase-free H_2O 至体系终体积为 20 μL 。聚合酶链式 PCR 反应在 CFX96 Optical Real-Time PCR System (Bio-Rad) 扩增仪上完成，反应条件设置如下：94 $^\circ\text{C}$ 3 min；94 $^\circ\text{C}$ 30 s，55 $^\circ\text{C}$ 30 s，72 $^\circ\text{C}$ 30 s + Plate Read，40 个循环；65 $^\circ\text{C}$ to 94 $^\circ\text{C}$ increment 0.5 $^\circ\text{C}$ ，0.05 s + Plate Read。

1.5 高通量数据分析

首先利用 QIIME 对原始序列进行拼接^[12]，并根据不同的 barcode 标签拆分获得不同样品序列；随后除去质量得分 < 20 的序列；进一步通过 UPARSE 命令对所有高质量序列在 97% 相似度水平进行分析，获得不同操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU)^[13]。根据 OTU 列表对不同样品进行物种多样性分析，在全局水平计算微生物群落的多样性指数，包括 observed OTUs 和 Chao1 指数分析。依据不同样品的 OTU 列表在 R 环境下通过 vegan 软件包进行非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)^[14]。此外，进一步抽取每个 OTU 的代表序列，并通过与 SILVA 数据库进行比对，开展基于 16S rRNA 基因序列的物种分类，筛选好氧甲烷氧化菌序列，计算不同类型好氧甲烷氧化菌占总的甲烷氧化菌的相对丰度，同时抽取好氧甲烷氧化菌的代表性 OTU 序列，在分类学属和种的水平精细化分析好氧甲烷氧化菌的系统发育进化关系。

利用 SPSS 16.0 软件开展差异分析。对于两组数据间比较，采用 Wilcoxon rank-sum test 分析不同提取方法的定量数据差异；对于群落组成相对丰度的多组数据，则采用一元方差分析使用 Tukey 检验进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著，在柱状图中用不同小写字母表示。

2 结果和分析

2.1 手工法和试剂盒法提取对水稻土 RNA 质量的影响

试剂盒 KR 法提取的 RNA 纯度明显高于手工 MR 法。针对 3 种水稻土，如表 2 所示，试剂盒

KR 法提取 RNA 的 $OD_{260/280}$ 的比例更加接近 2.0, 表明 RNA 中蛋白质污染较小, 同时, $OD_{260/230}$ 比值均大于或高于 2.0, 表明试剂盒 KR 法提取 RNA 中糖类、盐类或有机溶剂污染程度较低、不易检测。相反, 手工 MR 法所获 RNA 的 $OD_{260/230}$ 比值大多低于 1.0, 表明土壤 RNA 受碳水化合物等杂质污染尤其严重, 特别是鹰潭水稻土, 手工 MR 法提取 RNA 有明显的黄色杂质, 无法获得 $OD_{260/230}$ 比值, 纯度最差。

琼脂糖凝胶电泳分析表明, 试剂盒 KR 法适合于东北海伦和江苏滨海水稻土 RNA 提取, 而手工 MR 法更适合江西鹰潭水稻土。如图 1-A 所示, 两种提取方法均获得明显的水稻土总 RNA, 但针

对海伦和滨海水稻土, 试剂盒 KR 法提取的 rRNA 条带亮度明显高于手工 MR 法, 与 NanoDrop 结果一致。而江西鹰潭水稻土则得到了相反的结果, 手工 MR 法明显优于试剂盒 KR 法, 后者甚至未有明显可见的 rRNA 条带(图 1-A)。值得注意的是, 两种方法均表明鹰潭水稻土 RNA 总量最低, 表明土壤类型是影响水稻土 RNA 总量的主要因素。实时荧光定量 PCR 也得到类似结果。如图 1-B 所示, 针对海伦和滨海水稻土, 试剂盒 KR 法所得 16S rRNA 拷贝数分别是手工法的 2.35 倍和 10.7 倍。然而, 江西鹰潭水稻土结果相反, 手工法提取的 16S rRNA 转录子明显高于试剂盒法, 但统计上未有显著差异。

表 2. 手工法和试剂盒法提取的 RNA 浓度和纯度

Table 2. The concentration and purity of RNA extracted by Manual method and Kit method

Soil sample	Extraction method	Replicate	Concentration of RNA/(ng/ μ L)	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}
Hailun of Heilongjiang Province	Manual extraction method	1	27.34	1.65	0.17
		2	19.25	1.76	0.56
		3	26.24	1.65	0.13
	Kit extraction method	1	41.75	2.04	2.19
		2	80.24	1.91	2.06
		3	56.85	1.97	2.24
Binhai of Jiangsu Province	Manual extraction method	1	14.06	1.50	0.72
		2	13.61	1.75	0.05
		3	22.62	1.51	0.30
	Kit extraction method	1	107.41	1.91	2.02
		2	94.79	1.98	2.11
		3	100.21	2.00	2.18
Yingtian of Jiangxi Province	Manual extraction method	1	N/A	N/A	N/A
		2	N/A	N/A	N/A
		3	N/A	N/A	N/A
	Kit extraction method	1	5.44	1.85	2.01
		2	7.87	1.83	1.93
		3	6.98	1.89	2.01

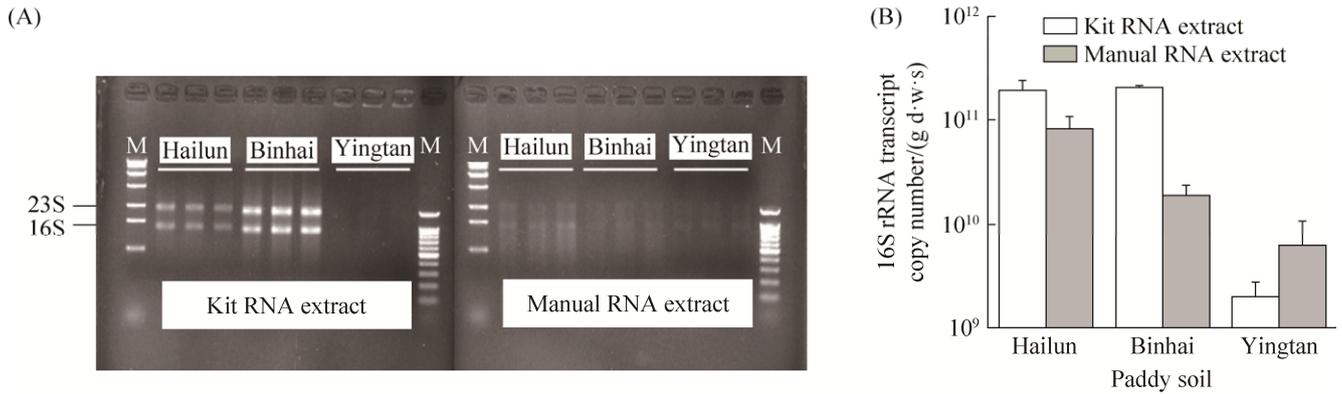


图 1. 手工法和试剂盒法提取三种水稻土总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图(A)及 16S rRNA 转录本丰度(B)

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of total RNA (A) and the number of 16S rRNA transcript (B) from three paddy soils by Kit method and Manual method-based RNA extraction. Hailun, Binhai and Yingtan represent paddy soil RNAs from Hailun city of Heilongjiang province, Binhai city of Jiangsu province and Yingtan city of Jiangxi province respectively. KR: Kit method-based RNA extraction; MR: Manual method-based RNA extraction; M: DNA marker.

这些结果表明，黑龙江海伦和江苏滨海水稻土中活性原核微生物的 RNA 总量均明显高于江西鹰潭水稻土。水稻土原核微生物宏转录组 RNA 的提取质量和效率取决于水稻土类型，而不是提取方法。

2.2 手工法和试剂盒法提取 RNA 对水稻土原核微生物群落结构的影响

高通量测序 16S rRNA 表明，试剂盒 KR 和手工 MR 法的 RNA 提取结果明显不同，但水稻土原核微生物多样性取决于土壤类型，而不是提取方法。如图 2-A 所示，针对海伦和鹰潭水稻土，试剂盒 KR 法所得 Chao 1 指数略高于手工 MR 法，而江苏滨海水稻土结果相反。值得注意的是，无论试剂盒 KR 还是手工 MR 法，三种水稻土的 Chao 1 指数趋势一致，均为鹰潭>海伦>滨海(图 2-A)。非度量多维尺度(NMDS)群落结构分析也得到了类似结果(图 2-B)，三种不同类型的水稻土在多维尺度中完全分离，但同一种水稻土试剂盒 KR 和手

工 MR 法所得微生物群落几乎完全重叠，表明其群落结构高度相似、无本质差异。这些结果表明，尽管手工 MR 和试剂盒 KR 法提取 RNA 影响原核微生物多样性的结果，但土壤类型仍是微生物群落集聚的主要因子。

在原核微生物门水平(图 2-C)，试剂盒 KR 和手工 MR 法提取的门数量没有显著差异，但门的相对丰度存在一定差异。海伦、滨海和鹰潭的各水稻土分别检测到 27 门、24 门、28 门，相对丰度具有统计显著差异的分别有 8 门、13 门和 11 门($P<0.05$)，相对丰度差异大于 0.5%的则分别有 6 门、8 门和 7 门。

在原核微生物属水平(图 2-D)，三种水稻土共计检测到 409 属，试剂盒 KR 和手工 MR 法提取微生物的数量和相对丰度均有一定的差异。海伦、滨海和鹰潭水稻土分别检测到 363 属、327 属、362 属，相对丰度具有统计显著差异的分别有 108 属、71 属和 93 属($P<0.05$)，相对丰度差异大于 0.5%则分别有

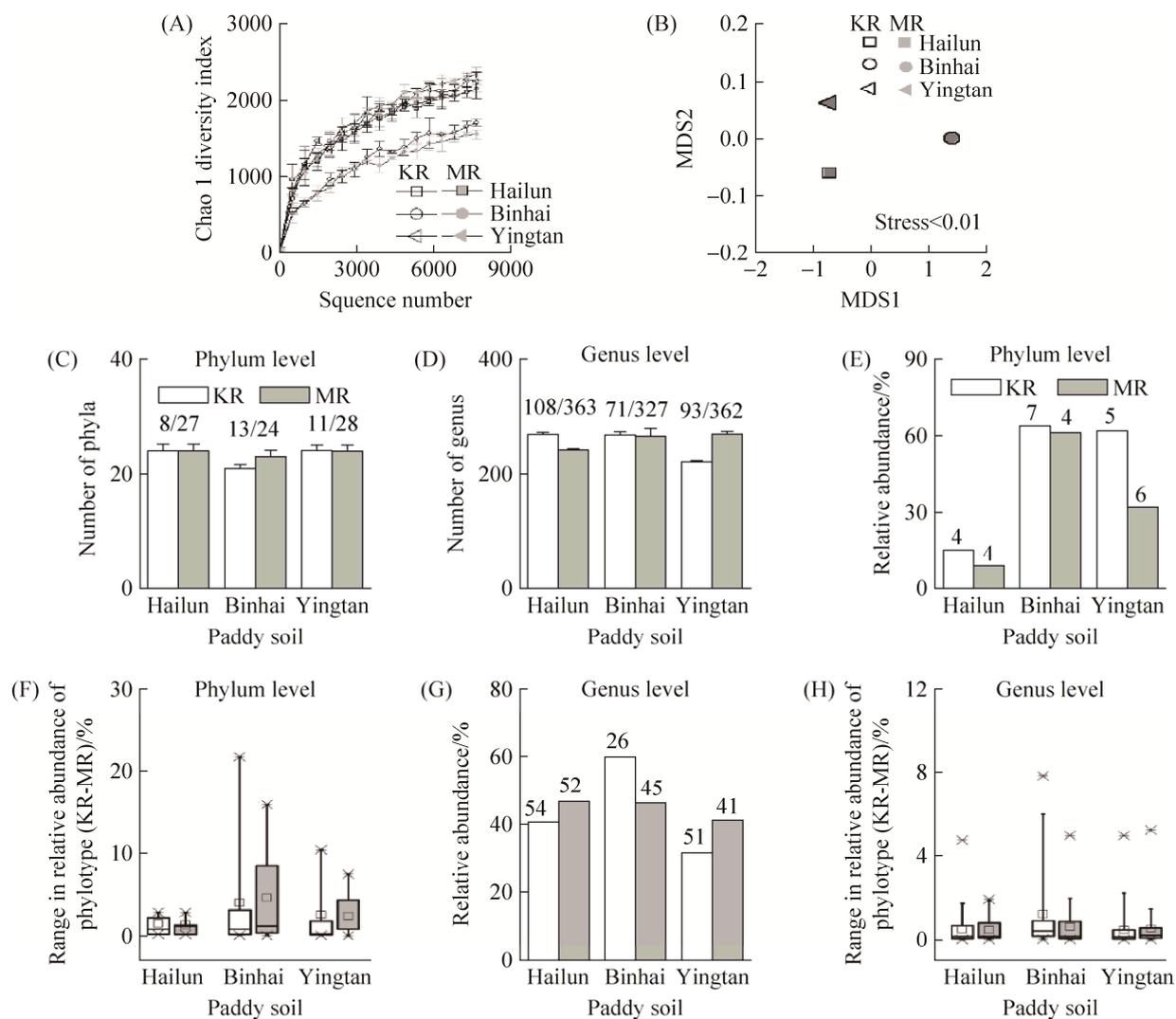


图 2. 手工法和试剂盒法提取水稻土 RNA 的原核微生物多样性偏好性分析

Figure 2. Bias assessment of microbial diversity associated with KR and MR methods for RNA extractions of three paddy soils. A: The rarefaction curves of chao1 richness index. B: Non-metric multidimensional scaling analysis of soil microbial communities. C: The number of phylum biased in association with KR and MR extractions and the total number of microbial phylum extracted. 8/27 indicates that 8 out of 27 phyla in paddy soil are statistically significantly biased by KR or MR methods. D: The number of genus biased in association with KR and MR methods and the total number of microbial genus extracted. 108/363 indicates 108 out of 363 genera in paddy soil of Hailun city are statistically significantly biased by KR and MR methods. E: The total relative abundance of the biased phyla by KR and MR methods. The value above the column refers to the number of the biased phyla by KR and MR methods. F: Range of relative abundance in difference between KR and MR methods. KR means microbial taxa is favored by KR method and the range of difference is calculated by KR minus MR; MR means microbial taxa is favored by MR method and the range of difference is calculated by MR minus KR. G: The total relative abundance of the biased genus by KR and MR methods. The value above the column refers to the number of the biased phyla by KR and MR methods. H: Range of relative abundance in difference between KR and MR methods. The bias definition is based on the statistically significant difference in relative abundance of microbial taxa obtained between KR and MR methods for RNA extractions. All other abbreviations and definitions are the same as those in Figure 1.

31 属、25 属和 23 属。此外，海伦水稻土中，试剂盒 KR 法获得 269 属，明显高于手工 MR 法 240 属；而鹰潭水稻土中，试剂盒 KR 法获得 221 属，明显低于手工 MR 法 269 属。江苏滨海水稻土中，试剂盒 KR 法(267 属)与手工 MR 法(266 属)无显著差异。

试剂盒 KR 和手工 MR 法的偏好性明显不同。在原核微生物门水平，海伦、滨海和鹰潭各水稻土中，试剂盒 KR 法偏好性提取到 4 门、7 门、5 门(图 2-E) 相对丰度的变幅分别为 0.21%–2.84%、0.10%–21.70%、0.08%–10.40% (图 2-F)，这些微生物丰度占有所有微生物分别为 15.0%、63.7%、62.0%(图 2-E)；其中丰度偏好性差异大于 0.5% 的门分别为 3 门、4 门、2 门，占有所有微生物总丰度分别为 14.8%、62.8%、61.3%。相应地，手工 MR 法偏好性提取到 4 门、6 门、6 门(图 2-E)，相对丰度的变幅分别为 0.20%–2.80%、0.06%–15.90%、0.02%–7.37% (图 2-F)，这些微生物丰度占有所有微生物分别为 8.79%、61.2%、31.9% (图 2-E)，其中丰度偏好性差异大于 0.5% 的门分别为 3 门、4 门、5 门，占有所有微生物总丰度分别为 8.55%、60.70%、31.91%。

在原核微生物属水平，海伦、滨海和鹰潭水稻土中，试剂盒 KR 法偏好性提取到 54 属、26 属、51 属(图 2-G) 相对丰度的变幅分别为 0.016–4.74%、0.028–7.82%、0.016–4.95% (图 2-H)，这些微生物属的丰度占有所有微生物分别为 40.5%、59.9%、31.6% (图 2-G)，其中丰度偏好性差异大于 0.5% 的属分别为 16 属、11 属、12 属，占有所有微生物总丰度分别为 31.9%、51.2%、23.7%。相应地，手工 MR 法偏好性提取到 52 属、45 属、41 属，相对丰度的变幅分别为 0.016%–1.900%、0.020%–4.906%、0.016%–5.210% (图 2-H)，这些微生物属的丰度占有所有微生物分别为 46.8%、46.3%、41.2%，其中丰度偏

好性差异大于 0.5% 的门分别为 15 属、14 属、11 属，占有所有微生物总丰度分别为 38.6%、38.9%、31.8%。

2.3 手工法和试剂盒法提取 RNA 对水稻土原核微生物类群(门/纲)的影响

试剂盒 KR 法在 3 种水稻土中偏好性提取了 11 微生物门，即这些原核微生物门的相对丰度显著高于手工 MR 法($P < 0.05$)，其中 6 个门的丰度差异 $> 0.5%$ 。如图 3-A 所示，试剂盒 KR 法在三种水稻土中均专一偏好性提取了 *Armatimonadetes* 门，在海伦和滨海水稻土中均偏好性提取了 *Acidobacteria* 门、*Actinobacteria* 门，在海伦和鹰潭水稻土中偏好性提取了 *Bacteroidetes* 门。此外，海伦水稻土中未检测到试剂盒 KR 法特异偏好的门，但滨海和鹰潭水稻土分别获得了 4 门和 3 门，其中鹰潭 *Proteobacteria* 门相对丰度偏差最高为 10.4%，而 *Planctomycetes* 门在滨海水稻土偏差最大为 1.55%。

手工 MR 法在 3 种水稻土中偏好性提取了 11 微生物门，即这些原核微生物门的相对丰度显著高于试剂盒 KR 法($P < 0.05$)，其中 8 个门的丰度差异 $> 0.5%$ 。如图 3-B 所示，手工 MR 法在三种水稻土中均专一偏好性提取了 *Firmicutes* 门；在海伦和滨海水稻土中均偏好性提取了难培养的 *Proteobacteria* 门，在海伦和鹰潭水稻土中的 *Planctomycetes* 门，在滨海和鹰潭水稻土中的 *Cyanobacteria* 门。此外，海伦、滨海和鹰潭水稻土中分别偏好性获得了 1 门、3 门、3 门，其中海伦水稻土为 *Euryarchaeota* 古菌门，滨海水稻土中 *Proteobacteria* 门相对丰度偏差最高为 15.9%，而 *Chloroflexi* 门在滨海水稻土中偏差最大为 4.26%。

针对水稻土中数量上占优势的前 10 个门(总丰度 $> 90%$) 进行分析(*Proteobacteria* 细化至纲水平)，如图 3-C 所示，尽管手工 MR 和试剂盒 KR 法所得微生物丰度并不完全相同，但两种方法均

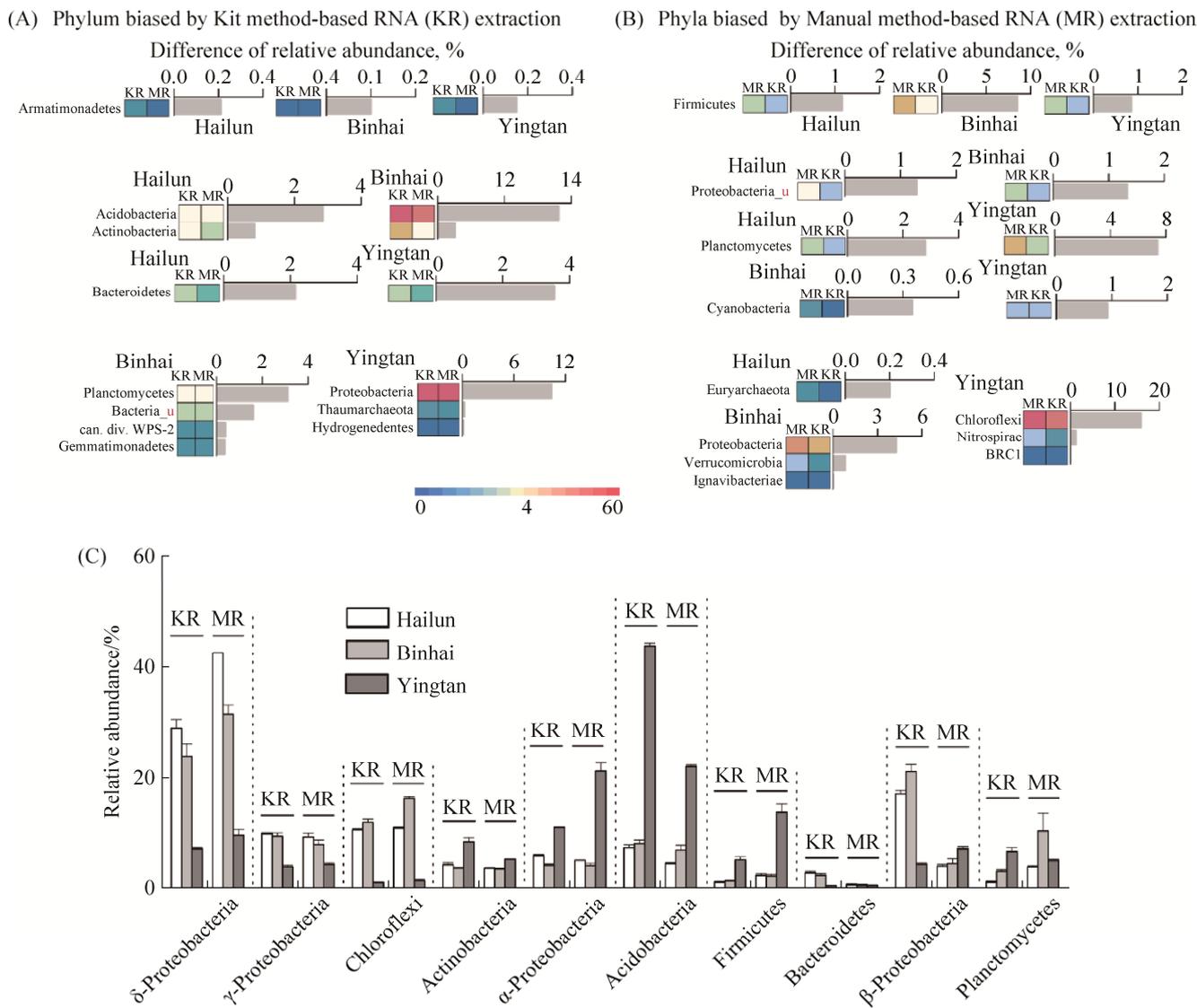


图 3. 手工法和试剂盒法提取水稻土 RNA 对原核微生物类群(门/纲)的偏好性分析

Figure 3. Biased phylum in three paddy soils based on RNA extraction by different KR and MR methods. A: The statistically significant increase in the relative abundance of microbial phylum in paddy soil based on RNA extraction by KR method when compared to MR method. There are 11 phyla with relative abundance statistically significantly higher by KR methods than those by MR method. And 1 phylum is consistently detected in three soils, 3 phyla appeared in two of three soils, and the rest 7 phyla appeared only once in either Binhai or Yingtan paddy soil. B: The statistically significant increase in the relative abundance of microbial phylum in paddy soil based on RNA extraction by MR method when compared to KR method. There are 11 phyla with relative abundance statistically significantly higher by MR methods than those by KR method. And 1 phylum is consistently detected in three soils, 3 phyla appeared in two of three soils, and the rest 7 phyla appeared only once among the three paddy soils tested. C: The relative abundance of dominant phylum in three paddy soils based on RNA extraction by KR and MR methods. These 10 phyla contributed to >90% of total microbial abundance in the three paddy soils tested. All other abbreviations and definitions are the same as those in Figure 1 and Figure 2.

能较好反映三种水稻土原核微生物类群之间的差异,并且规律一致,表明土壤类型是决定原核微生物类群的主要因素,而非 RNA 提取方法。例如:试剂盒 KR 法提取 RNA 发现 δ -Proteobacteria 纲的相对丰度大小依次为:海伦水稻土(28.9%)>鹰潭水稻土(23.9%)>滨海水稻土(7.27%);与手工 MR 法的规律相同,其丰度分别为 42.6%、31.6%和 9.72%。其他 5 个优势微生物门(纲)也得到了类似规律,包括 γ -Proteobacteria、Chloroflexi、Actinobacteria、 α -Proteobacteria、Acidobacteria、Firmicutes 和 Bacteroidetes 门的变化规律也基本一致。但另外 2 个优势微生物 β -Proteobacteria 和 Planctomycetes 则表现出不一致的规律。例如,试剂盒 KR 法表明 β -Proteobacteria 门的相对丰度依次为:鹰潭水稻土(22.2%)>滨海水稻土(17.2%)>海伦水稻土(4.54%),而手工 MR 法的结果为:滨海水稻土(7.29%)>鹰潭水稻土(4.67%)>海伦水稻土(4.14%)。此外,针对 4 种数量上占弱势但具有重要功能的微生物门,包括 Euryarchaeota、Nitrospirae、Thaumarchaeota、Verrucomicrobia,也发现两种 RNA 提取方法均得到一致规律,能够较好反映三种水稻土原核微生物类群之间的差异。

2.4 手工法和试剂盒法提取 RNA 对水稻土原核微生物类群(属)的影响

试剂盒 KR 法在 3 种水稻土中偏好性提取了 94 微生物属,即这些原核微生物属的相对丰度显著高于手工 MR 法($P < 0.05$),其中 30 属的丰度差异 $> 0.5\%$ 。如图 4-A 所示,试剂盒 KR 法在三种水稻土中皆专一偏好性地提取了 2 个属,其丰度差异均 $> 0.5\%$,包括难培养 β -Proteobacteria 属和 Acidobacteria Gp3 属,前者的偏好性差异最高达 5.98%。海伦和滨海水稻土中偏好性提取了 4 属,其中 2 属的偏好性 $> 0.5\%$,包括难培养优势菌

Acidobacteria Gp6 属(3.83%)和 Chloroflexi 属(1.59%)。海伦和鹰潭水稻土中偏好性提取了 26 属,其中 12 属的偏好性 $> 0.5\%$,其中丰度较高的 8 个优势类群分别为 Azoarcus (2.96%)、Burkholderiales (2.52%)、Lysobacter (2.41%)、Methyloversatilis (2.32%)、Nitrosospora (2.15%)、Variovorax (1.54%)、Burkholderiales incertae sedis (1.22%)和 Bacteroidetes (1.17%)。滨海和鹰潭水稻土中偏好性提取了 3 个属,但其偏好性差异均 $< 0.5\%$,未在图中展示。此外,海伦、滨海、鹰潭三种水稻土中,试剂盒 KR 法分别偏好地提取了 22 属、17 属、20 属,如图 4-A 所示,偏好性差异 $> 0.5\%$ 的分别为 2 属、10 属、2 属。其中偏好性最大的属分别为海伦水稻土的 Byssovorax (0.88%)、滨海水稻土的 unclassified Acidobacteria Gp1 (4.96%)和鹰潭水稻土的 Thiobacillus (0.84%)。

手工 MR 法在 3 种水稻土中偏好性提取了 103 属($P < 0.05$),即这些原核微生物属的相对丰度显著高于试剂盒 KR 法($P < 0.05$),其中 32 属的丰度差异 $> 0.5\%$ 。如图 4-B 所示,手工 MR 法在三种水稻土中偏好性提取了 5 个属,其中 4 属的丰度偏好性 $> 0.5\%$,包括优势类群 Blastopirellula (3.63%)、Haliangium (3.31%)、Corallococcus (2.34%)、Bradyrhizobium (2.13%),其中 Haliangium 属和 Bradyrhizobium 属的偏好性较大,分别为 1.86%和 1.75%。海伦和鹰潭水稻土中偏好性提取了 21 属,其中 9 属的偏好性 $> 0.5\%$,包括丰度较高($> 1.5\%$)的 3 个优势类群 unclassified Anaerolineaceae (14.3%)、unclassified Planctomycetaceae (6.80%)、Syntrophobacter (1.61),其偏好性分别达到了 4.56%、5.21%、1.90%。海伦和滨海水稻土中偏好性提取了 3 属,仅 1 属的偏好性 $> 0.5\%$,即 unclassified Proteobacteria。滨海和鹰潭水稻土中仅偏好性提取了 1 个属,即 unclassified Rhizobiales,其丰度和

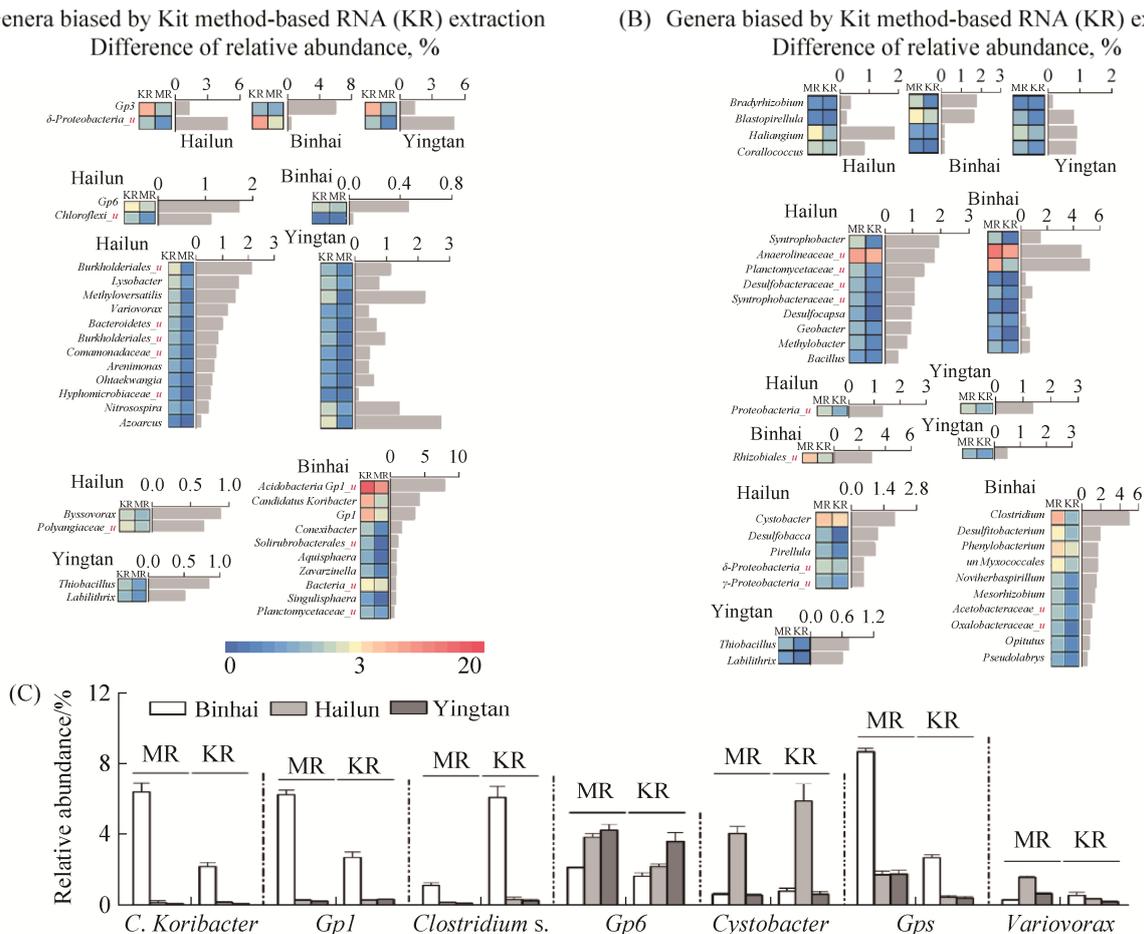


图 4. 手工法和试剂盒法提取水稻土 RNA 对原核微生物类群(属)的偏好性分析

Figure 4. Biased genera in three paddy soils based on RNA extraction by different KR and MR methods. A: The statistically significant increase in the relative abundance of microbial genera in paddy soil based on RNA extraction by KR method when compared to MR method. There are 94 genera with relative abundance significantly higher by KR methods than those by MR method, while 30 genera having a difference of >0.5%. Among these 30 genera, 2 genera are consistently detected in three soils, 14 genera appeared in two of three soils, and the rest 14 genera appeared only once among the three soils studied. B: The statistically significant increase in the relative abundance of microbial genera in paddy soil based on RNA extraction by MR method when compared to KR method. There are 108 genera with relative abundance significantly higher by MR method than those by KR method, while 32 genera having a difference of >0.5%. Among these 32 genera, 4 genera are consistently detected in three soils, 11 genera appeared in two of three soils, and the rest 17 genera appeared only once among the three soils studied. C: The relative abundance of dominant 7 genera in three paddy soils based on RNA extraction by KR and MR methods. Up to 409 genera were detected in all three paddy soils and 72 dominant genera with relative abundance of >0.1% consistently appeared in three paddy soils accounting for more than 80% of the total abundance of soil microbial communities. It is found that 48 genera out of these 72 genera showed similar changing patterns of relative abundance between KR and MR methods, i.e., for each of these 48 genera the relative abundance is ranked in the same order among these three paddy soils regardless of KR and MR extraction methods. The rest 24 genera showed the opposite trend while accounting only for 7.63% of these dominant genera. Presented in the figure are the 6 genera with relative abundance >5.0% among 48 genera showing consistent changing patterns and 1 genera with relative abundance >1.5% among 24 genera showing inconsistent changing patterns. All other abbreviations and definitions are the same as those in Figure 1, Figure 2 and Figure 3.

偏好性最高分别为 5.30% 和 2.91%。此外, 海伦、滨海、鹰潭三种水稻土中, 手工 MR 法特异性地偏好提取了 23 属、36 属、14 属, 如图 4-B 所示, 偏好性差异 >0.5% 的分别为 5 属、10 属、2 属。其中偏好性最大的属分别为海伦水稻土的 *Cystobacter* (1.83%)、滨海水稻土的 *Clostridium sensu stricto* (4.96%) 和鹰潭水稻土的 *Nitrospira* (0.72%)。

三种水稻土共计检测到 409 微生物属, 其中海伦、滨海、鹰潭水稻土中相对丰度 >0.1% 的分别为 139 属、113 属、136 属, 占原核微生物总丰度高达 96.0%、97.0%、95.9%, 其中 72 属普遍存在于三种水稻土, 占微生物总丰度约为 80%, 是三种水稻土的主要微生物类群。如图 4 所示, 针对这些微生物优势属的分析结果表明, 尽管手工 MR 和试剂盒 KR 法提取的微生物丰度并不完全相同, 但两种方法均能较好反映三种水稻土微生物类群之间的差异, 并且规律基本一致, 表明土壤类型是决定微生物类群的主要因素, 而非 RNA 提取方法。例如, 试剂盒 KR 法提取 RNA 发现 *Candidatus Koribacter* 属的相对丰度大小依次为: 滨海水稻土 (6.36%) > 海伦水稻土 (0.15%) > 鹰潭水稻土 (0.10%); 而手工 MR 法结果为 2.12% > 0.16% > 0.10%, 两种 RNA 提取方法得到丰度变化规律完全一致。其他 7 个优势微生物属也得到了相同结果, 包括 *Gp1*、*Phenylobacterium*、*Blastopirellula*、*Clostridium sensu stricto*、*Gp6*、*Cystobacter*、*Haliangium* 属。其他 2 个属尽管不完全一致, 但也得到了类似的规律, 如试剂盒 KR 和手工 MR 法皆表明滨海水稻土中, *Gp3* 属的丰度最高, 固氮菌属 *Azotobacter* 的丰度最低(图 4-C)。但也有一些数量上不占优势的微生物属表现出不一致的规律, 这些微生物属在海伦、滨海、鹰潭水稻土中占微生物总丰度分别为 9.58%、12.60%、12.70%。例如, 试剂盒 KR 法表明 *Variovorax*

属的相对丰度依次为: 海伦水稻土 (1.54%) > 鹰潭水稻土 (0.64%) > 滨海水稻土 (0.29%), 而手工 MR 法的结果为: 滨海水稻土 (0.56%) > 海伦水稻土 (0.35%) > 鹰潭水稻土 (0.20%)。

2.5 手工法和试剂盒提取 RNA 对水稻土好氧甲烷氧化菌的影响

水稻土中好氧甲烷氧化菌的丰度较低, 但在温室气体甲烷减排方面发挥着重要作用。针对这些功能微生物, 如图 5-A 所示, 首先从所有水稻土中筛选获得好氧甲烷氧化菌的序列并构建系统发育进化树, 发现水稻土中好氧甲烷氧化菌可分为 7 个属, 其中的优势类群包括 Type I 型的 *Methylobacter*、*Methylosarcina*、*Methylomonas*、*Methylocaldum* 和 Type II 型的 *Methylocystis*, 这些可培养属占甲烷氧化菌总丰度最低可达 87.6%, 其他序列均为目前尚未培养的好氧甲烷氧化菌。

尽管手工 MR 法和试剂盒 KR 法提取的好氧甲烷氧化菌丰度并不完全相同, 但两种方法均能较好反映其在三种水稻土中的变化规律。例如, 手工 MR 法提取甲烷氧化菌的丰度依次为: 海伦水稻土 (1.68%) > 鹰潭水稻土 (0.90%) > 滨海水稻土 (0.59%), 而试剂盒法所得甲烷氧化菌的丰度明显偏低, 其大小依次为: 海伦水稻土 (0.52%) > 鹰潭水稻土 (0.18%) > 滨海水稻土 (0.13%)。进一步在微生物属的水平进行分析, 发现 3 个属的趋势一致, 3 个属的趋势不一致。例如, 手工 MR 法和试剂盒 KR 法均表明水稻土中 *Methylocystis* 的丰度依次为: 滨海 > 鹰潭 > 海伦。而 *Methylobacter* 的变化规律则不尽相同, 手工 MR 法结果的丰度大小依次为: 鹰潭 > 海伦 > 滨海, 而试剂盒 KR 法结果的丰度排序为: 海伦 > 鹰潭 > 滨海, 但两种方法对海伦和鹰潭水稻土的 *Methylobacter* 丰度无显著性差异。

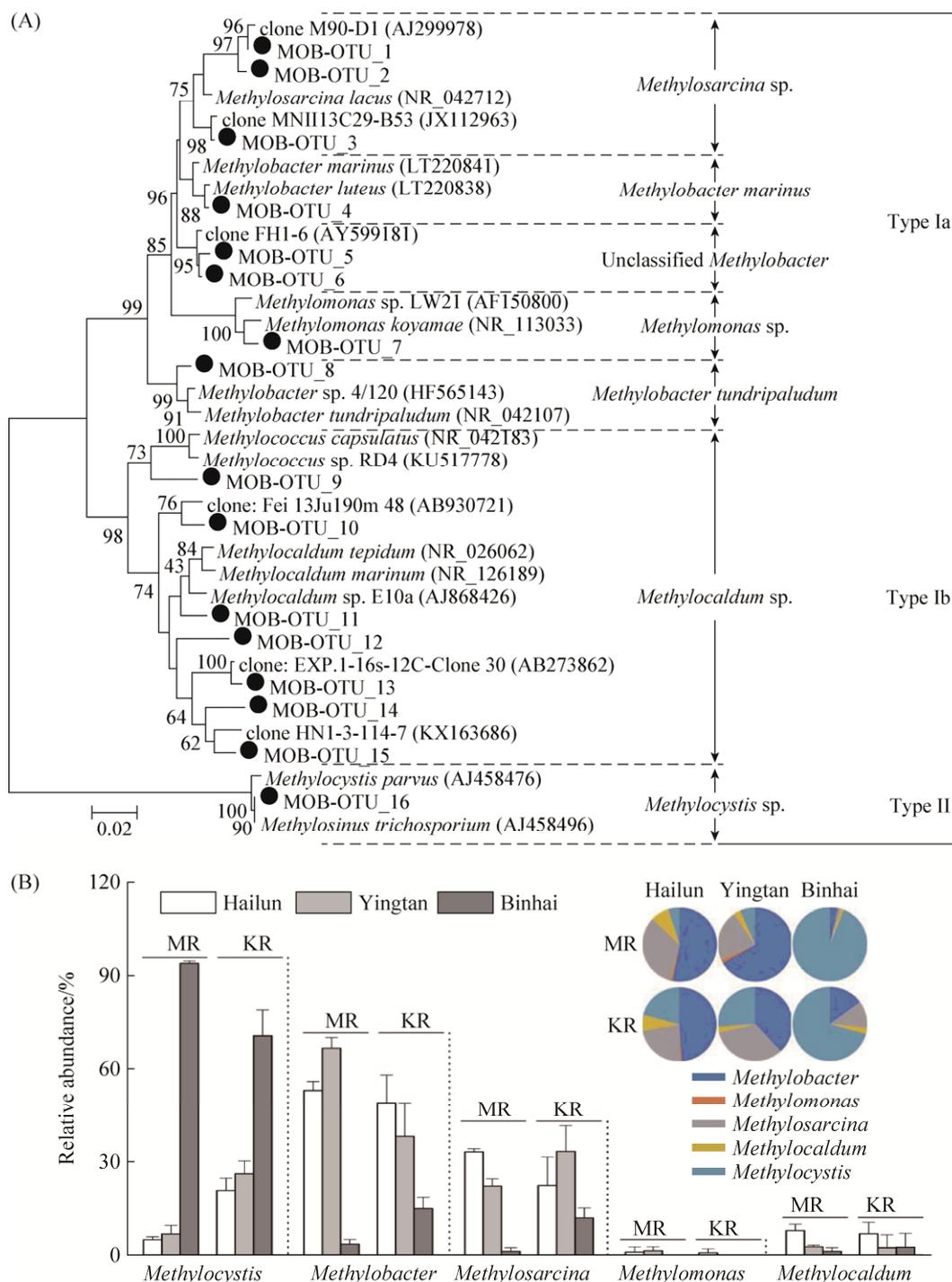


图 5. 手工法和试剂盒法提取 RNA 对水稻土好氧甲烷氧化菌的物种组成(A)和相对丰度(B)的影响

Figure 5. The phylogeny of aerobic methanotrophs (A) and their relative abundances (B) in three paddy soils. A: All methanotrophic 16S rRNA genes were screened from the three paddy soils and the phylogenetic analysis were performed. The scale bar represents nucleotide acid substitution percentage. B: the relative abundance of individual genus of methanotrophs in each of the paddy soil. The inset pie shows the trend of methanotrophic frequency of dominant genera in the three paddy soils tested. Hailun, Binhai and Yingtan represent paddy soils from Hailun city of Heilongjiang province, Binhai city of Jiangsu province and Yingtan city of Jiangxi province respectively. All other abbreviation and definitions are the same as those in Figure 1.

3 讨论

以 RNA 为核心的宏转录组是研究复杂环境中微生物生理功能的重要技术,但 RNA 提取方法可能对下游微生物分析产生重要影响^[15]。据此,针对黑龙江海伦、江苏滨海和江西鹰潭三种不同母质起源的典型水稻土,以 16S rRNA 为分子标靶基因,比较了手工 MR 和试剂盒 KR 法提取水稻土 RNA 及其对原核微生物结构和组成的影响。结果发现,手工 MR 法或试剂盒 KR 法本身对特定微生物的专一偏好性较小。三种水稻土中共检测到 27 门 409 属,但试剂盒 KR 法在三种水稻土仅专一偏好性提取到 1 门 2 属,其相对丰度显著高于手工 MR 法结果;而手工 MR 法仅专一偏好性提取到 1 门 5 属。这些结果表明,本研究中手工法和试剂盒法本身特有的偏好性可能仅为 2 门/27 门、7 属/409 属,占所有微生物类群的比例分别仅约为 7%和 1%。同时发现两种 RNA 提取方法所得微生物组成和丰度并不完全相同,三种水稻土中平均 41%微生物门、25%微生物属的相对丰度具有显著性差异($P < 0.05$),但两种方法均能检测到三种水稻土中的优势微生物类群,并且较好反映这些优势微生物类群在三种水稻土中的变异规律。例如,两种方法均发现 δ -Proteobacteria 纲在水稻土中的丰度大小依次为海伦>鹰潭>滨海。这些结果表明,三种水稻土原核微生物群落结构差异主要取决于土壤类型, RNA 提取方法的影响相对较小。这些结果在一定程度上表明,土壤类型差异足够大的条件下,手工 MR 或者试剂盒 KR 法提取 RNA 均能较好区分水稻土优势原核微生物类群的地理分异规律。

理论上而言,如果试剂盒提取 RNA 方法本身对特定微生物具有偏好性,那么针对任何土壤或环境样品,试剂盒法提取该微生物丰度均应显著高

于手工法。手工法本身对特定微生物的偏好性也应符合类似规律。然而,值得注意的是,本研究检测到的 27 个微生物门中,仅发现 Armatimonadetes 门具有类似规律,即在三种水稻土中,试剂盒 KR 法提取该微生物的丰度均显著高于手工 MR 法结果(图 3-A);而手工 MR 法仅发现 Firmicutes 门具有类似规律,在三种水稻土中的丰度均显著高于试剂盒 KR 法结果(图 3-B)。在微生物属的分类水平,试剂盒 KR 法偏好性提取了 94 属并具有显著差异,但仅难培养 β -Proteobacteria 属和 *Acidobacteria Gp3* 属具有类似规律,在三种水稻土中试剂盒 KR 法提取的微生物丰度均显著高于手工 MR 法结果(图 4-A);而手工 MR 法结果发现 108 属具有显著性差异,但仅有 5 属(其中 4 属差异>0.5%)具有类似规律并在三种水稻土中的丰度皆显著高于试剂盒 KR 法结果(图 4-B)。总体而言,两种 RNA 提取方法在三种水稻土中共检测到 409 属,其中 181 属具有显著差异,但仅有 7 属可能存在 RNA 提取方法本身特异的偏好性,占显著差异的原核微生物类群比例不到 4%,占所有原核微生物类群仅为 1%强。其中的原因可能是试剂盒法和手工法均采用了剧烈振荡破碎细胞策略提取 RNA,这一方法能够将土壤中几乎所有微生物细胞裂解并提取 RNA,因此两种方法本身的专一偏好性并不明显。

已有的 RNA 提取方法评价主要集中于 RNA 提取效率,如浓度和纯度等方面的比较^[16-18],对微生物群落结构的比较研究较少,或者仅针对某个环境样品在原核微生物门水平开展研究。我们针对三种不同母质发育的水稻土分析表明,试剂盒 KR 法和 MR 法对微生物门的数量没有显著影响(图 2-C),但对海伦水稻土和鹰潭水稻土的微生物属的数量有显著影响,并且偏好性规律相反(图 2-D),

表明 KR 法和 MR 法的偏好性更多取决于土壤类型,而非方法本身。进一步针对微生物相对丰度开展分析,三种水稻土共检测到 27 门、409 属,两种 RNA 提取方法导致 19 门、181 属的相对丰度发生了统计显著性偏差,这些显著差异门占有所有微生物总丰度的范围为 8.79%–63.70% (平均为 40.40%);占有所有微生物属的丰度范围 31.6%–59.9% (平均为 44.4%),其中,滨海水稻土微生物门和属的偏好性最大,与手工 MR 法相比其差异分别达到 21.7% (图 2-F)和 7.82% (图 2-G)。具体而言,三种水稻土中试剂盒 KR 法提取 RNA 发现 11 个微生物门、94 属的丰度显著高于手工 MR 法结果;而手工 MR 法提取 RNA 中则发现 11 个微生物门、108 属的丰度显著高于试剂盒 KR 法结果。其中约 30% 微生物属的丰度差异 >0.5%,占有所有显著差异微生物类群总丰度 >75% (图 2-G),对试剂盒 KR 法和手工 MR 法 RNA 提取响应最强。但值得注意的是,即便同一个样品同一个方法多次反复提取 RNA,其所得结果也可能存在一定的偏差,测定值和真实值很难完全相同。因此,未来可考虑加入已知微生物内标,以进行更加全面的评价。

不同 RNA 提取方法的细胞破碎和 RNA 分离方式,可能是特定原核微生物类群丰度产生差异的主要原因。本实验选用的两种方法的核心步骤均包括土壤细胞的分离、裂解,总核酸的分相萃取和沉淀,以及总 RNA 的分离和纯化^[19]。复杂土壤环境中游离的 RNA 降解速度快,水稻土总 RNA 极有可能来自完整细胞,而两种方法尽管都采用了研磨珠剧烈振荡破碎细胞,但研磨珠直径和配比以及操作时间的差异,可能对后续 RNA 分离产生了一定的影响。此外,手工 MR 法和试剂盒 KR 法分离 RNA 的原理差别较大,并且前者操作繁复,极可

能是两种方法 RNA 提取效率不同的主要原因。例如,手工方法利用 PEG 进行核酸的沉淀,而试剂盒法则采用异丙醇沉淀核酸。另外,两种方法在去除总核酸中 DNA 的策略也不尽相同。手工法通过脱氧核糖核酸酶降解总核酸中的 DNA,以获得纯净的土壤总 RNA;而试剂盒法则将总核酸进行层析过柱分离,利用特定的盐洗液将 RNA 专一性地从层析柱上洗脱达到与 DNA 分离的目的。我们的结果表明,试剂盒 KR 法在 RNA 纯度上有着绝对的优势,分光光度检测表明总 RNA 中的蛋白质和盐类等杂质的污染很小。手工 MR 法提取过程中的纯化效率差,土壤腐殖酸等杂质去除效果不明显,可能是水稻土 RNA 纯度较差的主要原因,导致 $OD_{260/230}$ 比值偏低,且江西鹰潭酸性土壤样品中色素污染严重。此外,试剂盒 KR 法可能适合于总 RNA 量较高的东北海伦和江苏滨海水稻土,而手工 MR 法更适合总 RNA 量较低的江西鹰潭水稻土。但采用手工 MR 法应兼顾 RNA 质量,提升纯化效率从而减少杂质对 RNA 的污染。值得注意的是,本研究仅采用了两种方法,诸多基于 RNA 的宏转录组分析均需要较高的 RNA 总量,如土壤宏转录组测试一般需要提供 2 μg ,甚至 10 μg 以上的 RNA 样品,以构建可靠的文库。未来应根据供试土壤特征和实验目的,结合 RNA 提取原理优化实验策略。

本文的研究结果与已有报道基本一致^[18],表明不同方法可能会对土壤 RNA 的总量和质量产生较大影响。但是,基于高通量测序 16S rRNA 分析结果表明,土壤类型而非提取方法决定了土壤活性原核微生物群落的分异规律。例如,在微生物门(图 3)和属(图 4)的分类水平,无论采用何种 RNA 提取方法,优势微生物类群的丰度在三种水稻土中的变化规律基本一致,表明不同土壤的活

性原核微生物物种多样性具有明显的区域分异规律,不同提取方法研究特定微生物地理分异规律的结果基本相同,方法本身对某一种土壤中微生物的群落结构影响相对较小甚至可忽略不计。这一结果对未来土壤 RNA 水平的转录组学研究具有重要意义,表明基于 PCR 扩增和高通量测序的微生物分类学研究, RNA 提取方法带来的差异要远远小于土壤本身造成的差异。这些结果表明,优化土壤 RNA 提取策略的同时,需要考虑供试样品的差异性,当供试样品之间的差异达到一定程度时,即便手工法提取 RNA 的质量和浓度偏低,也能较好反映不同样品活性原核微生物之间的差异。

自然土壤中某些原核微生物类群数量较少,但功能重要,在元素生物地球化学循环和农业生产等方面发挥了重要作用^[11,21-24]。在不同的时间和空间尺度下,准确检测这一类功能微生物并研究其在转录水平的差异具有重要意义。但不同 RNA 提取方法是否偏好性提取这些功能微生物的相关报道较少。本研究针对水稻土中普遍存在但相对丰度较低的好氧甲烷氧化菌开展了系统发育分析和 RNA 提取效率比较^[25-26]。结果显示,不同的土壤 RNA 提取方法均能检测到甲烷氧化菌的 16S rRNA 转录组。尽管提取效率各异,但这些方法均未遗漏数量上处于劣势的功能微生物。在微生物属的水平进一步分析好氧甲烷氧化菌的提取效率,则发现不同水稻土中甲烷氧化菌的群落组成具有明显差异,试剂盒 KR 法和手工 MR 法提取 RNA 对具体甲烷氧化菌属的影响通常未达到统计显著水平,但两种方法所得微生物变异规律基本一致,与前期基于 *pmoA* 功能基因的 mRNA 方法比较结果一致^[18]。这些结果表明,与土壤类型的影响相比, RNA 提取方法引起的功能微生物群落结构差异相对较小。

4 结论

基于 RNA 提取的宏转录组技术已经成为微生物组研究的重要手段。本研究表明,手工法或试剂盒法本身对特定原核微生物的专一偏好性较小,供试的三种水稻土所有 27 门 409 属中,方法本身的特异性偏好提取仅为 2 门 7 属,占有原核微生物类群的比例仅约为 7% 和 1%。此外,尽管手工法和试剂盒法提取 RNA 的总量和纯度具有明显的差异,但两种方法所得优势微生物类群基本一致,仅在微生物丰度方面存在一定的差异。手工 MR 法发现三种水稻土的活性微生物群落结构具有明显差异,而采用试剂盒 KR 法也得到了相同的结论。这些结果表明:土壤类型对活性原核微生物群落组成的影响远大于 RNA 提取方法。针对微生物量较大的土壤,试剂盒 KR 法能同时获得较高的 RNA 总量和质量,但对于微生物量较小的土壤,手工 MR 法尽管提取的 RNA 质量较低,但提取产量可能较高。未来在以 RNA 提取为基础的土壤宏转录组研究中,应围绕科学问题系统评估实验处理可能产生差异,结合不同的 RNA 提取方法优势,开展针对性的实验设计,确保不同处理的实验差异大于不同 RNA 提取方法所导致的差异,特别是在同一实验中尽量采用同一方法开展相关研究,提高研究结果的可信度和普适性。

参考文献

- [1] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309(5739): 1387-1390.
- [2] Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch HM. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(35): 12471-12476.
- [3] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Lösekann T, Ivanova N,

- Martin HG, Szeto E, Platt P, Hugennoltz P, Relman DA, Quake SR. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 11889–11894.
- [4] Manefield M. The ecology of RNA. *The ISME Journal*, 2007, 2(1): 1–2.
- [5] Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 960–970.
- [6] Neidhardt FC. Chemical composition of *Escherichia coli*//Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE. *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Washington DC: ASM Press, 1987.
- [7] Urich T, Lanzén A, Qi J, Huson DH, Schleper C, Schuster SC. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2527.
- [8] Baker BJ, Sheik CS, Taylor CA, Jain S, Bhasi A, Cavalcoli JD, Dick GJ. Community transcriptomic assembly reveals microbes that contribute to deep-sea carbon and nitrogen cycling. *The ISME Journal*, 2013, 7(10): 1962–1973.
- [9] Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner MC, Debaud, JC, Lemaire M, Wésolowski-Louvel M, Marmeisse R. Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *The ISME Journal*, 2007, 1(7): 632–642.
- [10] Mettel C, Kim Y, Shrestha PM, Liesack W. Extraction of mRNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5995–6000.
- [11] Angenent LT, Kelley ST, St Amand A, Pace NR, Hernandez MT. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(13): 4860–4865.
- [12] Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [13] Edgar RC. UPARSE: highly accurate otu sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [14] Dixon P. Vegan, a package of r functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14(6): 927–930.
- [15] Sessitsch A, Gyamfi S, Stralis-Pavese N, Weillharter A, Pfeifer U. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: Evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 51(2): 171–179.
- [16] Dineen SM, Aranda IV R, Dietz ME, Anders DL, Robertson JM. Evaluation of commercial RNA extraction kits for the isolation of viral MS2 RNA from soil. *Journal of Virological Methods*, 2010, 168(1/2): 44–50.
- [17] Jin M, Zhao ZG, Qiu ZG, Wang JF, Chen ZL, Shen ZQ, Li C, Wang XW, Dong Y, Li JW. Rapid method to extract High-Quality RNA from activated sludge. *Environmental Science*, 2010, 31(1): 260–265. (in Chinese)
金敏, 赵祖国, 邱志刚, 王景峰, 陈照立, 谌志强, 李超, 王新为, 董彦, 李君文. 活性污泥高质量 RNA 快速提取方法研究. *环境科学*, 2010, 31(1): 260–265.
- [18] Zheng Y, Chen Z, Hou HJ, Wu MN, Wei WX. Comparing study on different methods for RNA extraction from paddy soils. *Environmental Science*, 2010, 31(4): 1066–1071. (in Chinese)
郑燕, 陈哲, 侯海军, 吴敏娜, 魏文学. 典型水稻土微生物 RNA 的提取方法比较. *环境科学*, 2010, 31(4): 1066–1071.
- [19] Carvalhais LC, Schenk PM. Sample processing and cDNA preparation for microbial metatranscriptomics in complex soil communities. *Methods in Enzymology*, 2013, 531: 251–267.
- [20] Dohrmann AB, Küting M, Jünemann S, Jaenicke S, Schlüter A, Tebbe CC. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of bt- and conventional maize varieties. *The ISME Journal*, 2013, 7(1): 37–49.
- [21] Elshahed MS, Youssef NH, Spain AM, Sheik C, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Roe BA, Davis JP, Schloss PD, Bailey VL, Bailey LR. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5422–5428.
- [22] Shade A, Jones SE, Caporaso JG, Handelsman J, Knight R, Fierer N, Gilbert JA. Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *MBio*, 2014, 5(4): e01371–14.
- [23] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115–12120.
- [24] Wilhelm L, Besemer K, Fasching C, Urich T, Singer GA, Singer C, Battin TJ. Rare but active taxa contribute to community dynamics of benthic biofilms in glacier-fed streams. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(8): 2514–2524.
- [25] Yun JL, Wang YF, Zhang HX. Ecology of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs). *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(21): 6774–6785. (in Chinese)
俞娟莉, 王艳芬, 张洪勋. 好氧甲烷氧化菌生态学研究进展. *生态学报*, 2013, 33(21): 6774–6785.
- [26] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2): 439–471.

Assessment of method-specific bias associated with RNA extractions for metatranscriptomics in three geographically distinct paddy soils with different origin of parent materials

Jun Zhao¹, Yongliang Mo^{1,2}, Zhongjun Jia^{1*}

¹ State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] RNA extraction is considered the key for soil metatranscriptomics and it is expected that different methods would have generated distinct resolution of active soil microbiome. However, it remains largely unknown about the quantitative bias assessment of soil microbial communities associated with commercial Kits RNA (KR) and Manual RNA extraction (MR) methods. The aim of this study was to assess the bias of metatranscriptomics associated with total RNA extractions by commercial kits and manual methods from three geographically distinct paddy soils. [Methods] Three kinds of paddy soils were collected, representing distinctly different origin of parent materials including viscous black sand in Hailun city of Heilongjiang province, sandy loam in Binhai city of Jiangsu province, quaternary red clay in Yingtan city of Jiangxi province. Total RNA was obtained by commercial kit method and manual methods. The quantity and quality of total RNA were assessed by ultraviolet spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. The abundance and composition of soil microbiome was analyzed by real-time quantitative PCR and high-throughput sequencing of cDNA reversely transcribed from 16S rRNA. [Results] The purity of RNA extracted by kit method was higher than that of manual method, but it did not hold true for the quantity of RNA extracts. The kit method generated higher quantity of soil RNA extract from paddy soils with higher organic matters from Heilongjiang and Jiangsu provinces, while the manual MR method recovered more RNA from paddy soil in Yingtan city of Jiangxi province with lower organic matter. High-throughput sequencing revealed a total of 27 phyla and 409 genera in three paddy soils, and 19 phyla and 181 genera were statistically significantly biased, i.e., the significant difference in relative abundance of these phylotypes was observed between manual MR and kit KR methods. These 19 phyla and 181 genera averaged for 40.4% and 44.4% of the total microbial abundance in soils. There are 11 phyla with higher relative abundance by KR than MR methods, and it is noteworthy that only Armatimonadetes phylum was KR-specifically biased, i.e., it is consistently detected in three soils with higher abundance by KR than MR methods. Similarly, the MR method also led to higher abundance of 11 phyla than KR method, and the Firmicutes is the only phylum for MR-specific bias, i.e., it is consistently observed with higher abundance in three soils by MR than KR method. At the genus level, the kit method consistently revealed two genera with higher relative abundance in all three paddy soils than manual method, and five genera were preferentially recovered by MR method in all three soils. We further assessed a total of 72 numerically dominant genera that could be recovered from all three soils having a relative

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270147, 41530857, 91751204), and by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB15040000)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86881311; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jia@issas.ac.cn

Received: 6 November 2017; Revised: 17 March 2018; Published online: 22 March 2018

abundance>0.1%. These genera accounted for more than 80% of total microbial abundance in the three soils. The result suggested that 48 out of 72 genera have the same changing patterns of relative abundance among three paddy soils regardless of KR and MR methods. For example, the manual RNA extraction method indicated that the relative abundance of aerobic methanotrophs could be arranged in a decreasing order as Heilongjiang (1.68%)> Jiangxi (0.90%)> Jiangsu (0.59%), while the kit KR RNA extraction method has the same order as Heilongjiang (0.52%)> Jiangxi (0.18%)> Jiangsu (0.13%). **[Conclusion]** Among 27 phyla and 409 genera detected in paddy soils, there are only 2 phyla and 7 genera that was consistently biased in all three paddy soils by either kits KR or manual MR methods. It suggests that the biased phylotypes associated with the RNA extraction method itself could be insignificant, accounting only for 7.4% and 1.7% of the total phyla and genera respectively. Although the quantity and quality of RNA extracted from paddy soil are obviously different between manual MR and kit KR methods, the bias associated with these two RNA extraction methods has no significant impact on the biogeographic patterns of soil microbiomes in the three paddy soil tested. It is estimated that 70% of phyla and 22% of genera detected were observed with statistically significant difference between KR and MR methods. However, both RNA extraction methods could lead to the same conclusions regarding the changing patterns in relative abundance of microbial phylotypes among the three paddy soil tested. Despite the fact that the detection of every individual phylotype cannot be entirely reproduced by both methods and there are huge difference between these two methods, it seems plausible that the difference among soil types is sufficiently large so that the recovery of microbial communities would not be biased by RNA extraction method itself. These results imply that the method-specific bias of phylotype detection is much less than expected during soil RNA extraction. For future study the choice of RNA extraction method may not be of significant help, and the priority is to have experimental manipulation and treatments that would select for microbiomes with difference significantly larger than the bias associated with RNA extraction methods.

Keywords: prokaryote, metatranscriptomics, paddy soil, kit method-based RNA extraction, manual method-based RNA extraction, 16S rRNA

(本文责编: 李磊)

贾仲君, 男, 研究员, 博士生导师, 中国科学院南京土壤研究所, 中国科学院特聘研究员, 主要从事微生物生态与进化研究。2002年获博士学位后连续在美国农业部、日本名古屋大学和德国马普陆地微生物所工作。2008入选中国科学院“百人计划”, 2012年获终期评估优秀。连续入选江苏省“333高层次人才培养工程”。曾获国际全球变化分析研究青年科学家奖、江苏省科技进步一等奖等。担任了中国植物营养与肥料学会生物与有机肥料专业委员会副主任、中国矿物岩石地球化学学会地表与生物地球化学专业委员会、中国微生物学会环境微生物专业委员会委员等; 主持了国家基金委重大项目课题、重点项目、重大研究计划重点项目、中国科学院战略性科技先导专项 B 类项目, 科技部国际科技合作项目和 973 项目课题等。建立了稳定同位素示踪环境微生物 DNA/RNA-SIP 及高通量测序技术平台; 揭示了氨氧化古菌和细菌适应土壤地理环境分异的竞争排斥机制, 发现古菌能更好适应低氧环境并通过脲酶进化适应性低氨胁迫; 阐明了湿地土壤氧化极低浓度甲烷的高亲和力功能代谢机制。近 5 年在 *Nature Communications* 和 *ISMEJ* 等刊物发表论文 72 篇, 一半以上 SCI 论文发表于 TOP 期刊。担任欧洲地球学会 *Biogeosciences* 和 *Frontiers in Microbiology* 等 3 份 SCI 期刊副主编及领域编辑, 《土壤学报》和《微生物学报》编委。

