

新疆一号冰川土壤细菌多样性的研究*

石鹏君¹ 孟 昆¹ 伍宁丰² 付建红³ 姚 斌^{1**}

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)¹ (中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)²
(新疆农业科学院微生物研究所 乌鲁木齐 830000)³

摘要:应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术分离 PCR 扩增的 16S rDNA 来研究土壤微生物的多样性。直接从新疆一号冰川不同海拔高度的土壤样品中提取总 DNA。用两套细菌通用引物分别扩增 16S rDNA 的 V3 和 V6/V9 高变区的特异性片段,PCR 产物进行 DGGE 分析。PCR-DGGE 图谱表明,PCR 产物经 DGGE 检测到的条带清晰且分离效果好。结果表明,PCR-DGGE 是一种快速研究微生物群落结构的有效方法。

关键词:冰川土壤, DGGE, 细菌多样性

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0058-06

Application of PCR-DGGE to Study Microbial Diversity in Glacier No. 1 Soils in Xinjiang*

SHI Peng-Jun¹ MENG Kun¹ WU Ning-Feng² FU Jian-Hong³ YAO Bin^{1**}

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)¹

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)²

(Microbial Application Institute, Xinjiang Agriculture Sciences Academy, Urumqi 830000)³

Abstract: Separation of polymerase chain reaction (PCR) -amplified 16S rDNA products using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was tested as a means to study microbial community composition in soil samples. The soil total DNA was directly extracted from five Glacier No. 1 soils from different altitudes in Xinjiang. Two sets of primers specific for bacteria (V3 and V6/V9 regions of 16S rDNA) were used to amplify specific segments. The PCR products were analyzed using DGGE. The electrophoresis lanes obtained by PCR-DGGE were legible and distinguishable. The results suggested that PCR-DGGE is a rapid and efficient method to discriminate among microbial communities.

Key words: Glacier soil, DGGE, Microbial diversity

微生物是地球上最早的生命形式,在数 10 亿年的进化过程中,形成了适应各种环境的生理和分子机制,占据了地球几乎所有环境。微生物支撑着整个地球上的物质循环和生命的持续,其多样性被用于监视和预测环境变化,也是新基因资源的重要来源^[1]。目前自然界中只有 0.1% ~ 1% 的微生物能被分离和纯化,通过传统的平板培养分离方法不能真实的反映土壤微生物的多样性^[2]。

DNA 指纹技术的分子生物学研究手段如 PCR-DGGE/TGGE^[3,4], PCR-RFLP^[5], PCR-SSCP^[6]等使得研究者可以直接利用 DNA 及 RNA 在分子水平上对微生物多样性进行研究。

* 国际科技合作重点项目计划 (No. 2004DFA060800)

其他作者: 李 江¹, 邵 娜¹

** 通讯作者 Tel: 86-10-68975126, Fax: 86-10-68975127, E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2005-10-20, 修回日期: 2005-12-28

本实验在新疆一号冰川 5 个不同海拔高度采集土壤样品, 通过 PCR-DGGE 技术研究其土壤微生物多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 5 种土壤样品取自新疆一号冰川, 坐标 43°06.183'N, 86°50.453'E, 海拔高度分别为①3,558 ± 9; ②3,608 ± 11; ③3,616 ± 12; ④3,630 ± 9; ⑤3,447 ± 7。采样深度 5cm ~ 10cm, 取样时间为 2005 年 5 月, 于 4℃ 保存。

1.1.2 主要仪器和试剂: Mini-Beadbeater 购自 BIOSPEC 公司, 试剂盒 Cycle-Pure kit, Gel Extraction kit 购自 OMEGA 公司, DGGE 所用仪器为 The Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Co.), 第一对 PCR 引物扩增 16S rDNA V3 高变区: V338F (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGC GCA CGG GGG G-AC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3'), V534R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'); 第二对引物扩增 V6/V9 高变区: V968F (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGC GCA CGG GGG G-AA CGC GAA GAA CCT TAC 3'), V1406R (5' ACG GGC GGT GTG TAC 3') 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 提取 DNA

1.2.1 抽提土壤总 DNA: DNA 的提取参照 Miller 的方法^[7], 用酚: 氯仿抽提法代替基因组 DNA 纯化试剂盒对总 DNA 进行初步纯化。然后用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 纯化土壤总 DNA: 得到的 DNA 溶液用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 将大于 2kb 的 DNA 条带用 DNA 回收试剂盒进行纯化。

1.3 PCR 扩增

PCR 体系: 10 × PCR buffer (不含 Mg^{2+}); 200 μmol/L dNTP; 500 nmol/L 引物; 1.75 mmol/L $MgCl_2$; 800 ng/μL BSA; 0.5 μL 甲酰胺; Taq DNA 聚合酶 2 U; 模板 DNA 10 ng; 最后加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应采用降落 PCR 策略, 具体运行条件如下: 94℃, 预变性 5 min, 然后加入 Taq 酶, 前 20 个循环为 94℃ 1 min, 65℃ ~ 55℃ 1 min 和 72℃ 1 min (其中每个循环后复性温度下降 0.5℃), 后 10 个循环为 94℃ 1 min, 55℃ 1 min 和 72℃ 1 min, 最后 72℃ 延伸 7 min。将 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 对特异性条带用 DNA 回收试剂盒进行回收。

1.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

对于引物 V338F 和 V534R 扩增的片段, DGGE 所用胶的浓度为 10%, 其变性梯度为 40% ~ 60%, 上样量为 25 μL 的 PCR 产物。其运行条件是: 1 × TAE 电泳缓冲液, 60℃ 条件下, 150V, 4.5h, 银染^[8]。而对于引物 V968F 和 V1406R 扩增的片段, DGGE 所用胶的浓度为 6%, 其变性梯度为 35% ~ 65%, 上样量同为 25 μL。其运行条件是: 0.5 × TAE 电泳缓冲液, 60℃ 条件下, 75 V, 16 h, 银染。

2 结果

2.1 土壤总 DNA 的直接抽提

将提取的土壤总 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 如图 1 所示① ~ ⑤号样品总 DNA 抽提物中 90% 的条带大于 1.6 kb (16S rRNA 的全长), 适合进行下游反应。将凝胶中所有大于 2 kb 的 DNA 条带全部回收。

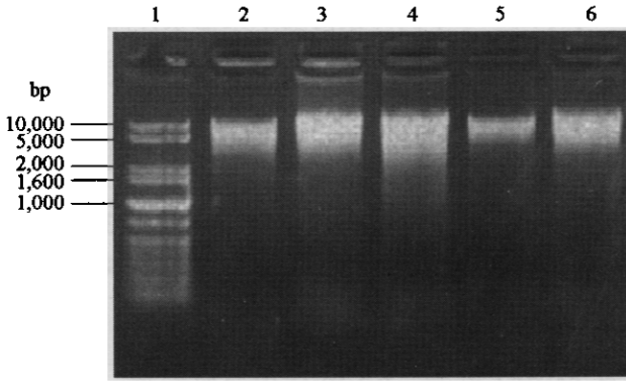


图 1 不同土壤提取的总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

1 DNA marker, 2 样品①, 3 样品②, 4 样品③, 5 样品④, 6 样品⑤

2.2 16S rDNA 片段的扩增

以土壤总 DNA 的纯化物作模板进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 发现扩增 V3 高变区的 PCR 反应获得特异性扩增片段, 长度在 200 ~ 250bp; 扩增 V6/V9 高变区的 PCR 反应主要条带集中在 450 ~ 500bp, 但有非特异性条带, 将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 回收试剂盒回收特异性条带。

2.3 DGGE 分离 PCR 产物

2.3.1 DGGE 图谱分析: 应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3, V6/V9 片段 PCR 产物, 可以看到其分离为若干条带, 但不同土壤样品的 16S rDNA V3, V6/V9 片段 PCR 产物出现的带型有一定差别, 对电泳图谱进行初步统计, 结果见表 1。从 16S rDNA V3, V6/V9 片断 PCR 产物的 DGGE 图谱发现 (见图 2, 图 3): ①、②、③、④、⑤号土壤

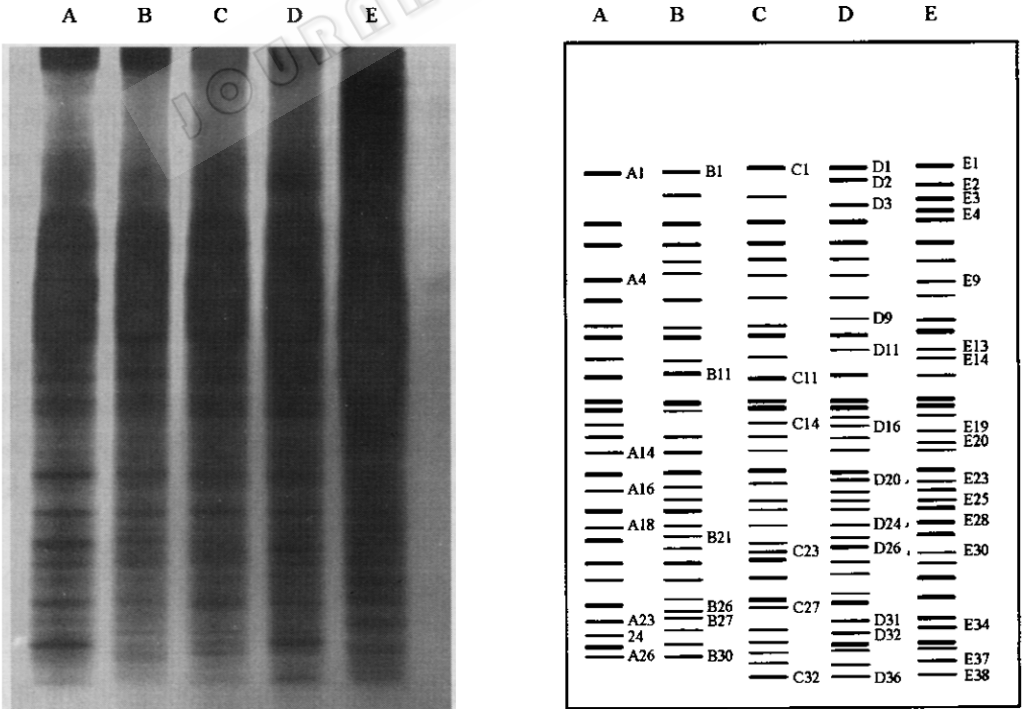


图 2 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱

A 样品①, B 样品②, C 样品③, D 样品④, E 样品⑤

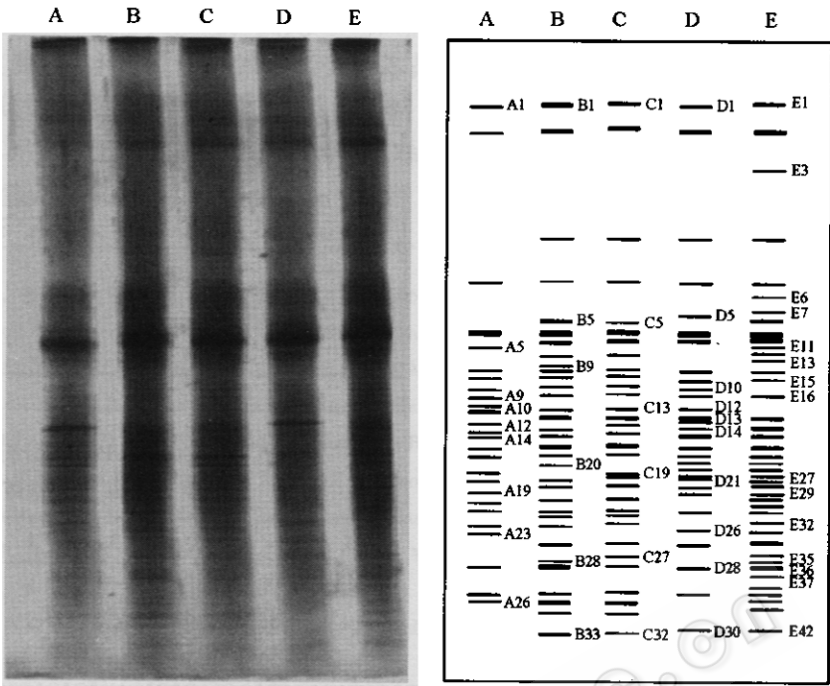


图3 16S rDNA V6/V9 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱

A 样品①, B 样品②, C 样品③, D 样品④, E 样品⑤

在两种 DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在一定程度的差异,充分显示了微生物的多样性。不同土壤间具有许多共同的条带,说明这些供试土壤之间可能存在一些共有的细菌类型,然而这些公共条带的强度也不相同,表明土壤微生物在 DNA 水平上有明显改变。供试土壤在 V6/V9 DGGE 图谱比在 V3 DGGE 图谱中表现出更高的差异性。⑤号土壤在两种 DGGE 图谱中条带数量相对其它土壤明显多,说明其微生物丰度最高,至少有 30 个以上的细菌物种组成,其它样品也至少有 20 个以上的物种组成。②、③号土壤的海拔高度最接近,在两种 DGGE 图谱中相似性最高,说明地域因素是影响土壤细菌种群构成的重要因素^[9],这与前人的研究结果一致。

表 1 DGGE 带谱条带检测结果

样品	①	②	③	④	⑤
V3 DGGE 条带数	26	30	32	36	37
样品独有的条带数	6	4	4	10	14
V6/V9 DGGE 条带数	26	33	32	30	42
样品独有的条带数	7	4	4	7	13

2.3.2 样品相似性分析: 所得图像用 Bio Rad QUANTITY ONE4.3.0 软件进行处理,有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行。DGGE 条带图案相似性的系统树图,由系统依据戴斯系数 C_s (Dice coefficient) 按照有关方法 (UPGMA 算法) 计算绘出 (见图 4, 图 5)。 $C_s = 2j / (a + b)$, j 是样品 A 和 B 共有的条带, a 和 b 分别是样品 A 和 B 中各自的条带数。戴斯系数的范围是从 0 (没有共同带) 到 1 (所有的条带相同)。用戴斯系数计算出的各泳道样品相似性的矩阵,用它可以分别对 V3, V6/V9 DGGE 图谱中各泳

道样品之间的相似性进行比较（见表 2，表 3）。从表 2，3 可以看出供试土壤样品间的相似性比较大，在 V3，V6/V9 DGGE 中样品之间的相似性都高于 44%。在两种 DGGE 中都是样品②和③之间的相似性最高，均为 86%。对两个表之间的数据进行分析比较，虽然存在一定的差异，但得出的结论基本一致。

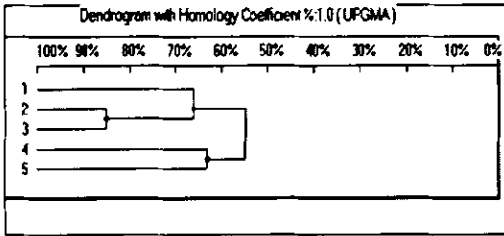


图 4 V3 DGGE UPGMA 分析

表 2 V3 DGGE 相似性矩阵

泳道	1	2	3	4	5
1	1.00				
2	0.67	1.00			
3	0.67	0.86	1.00		
4	0.62	0.53	0.67	1.00	
5	0.50	0.44	0.44	0.63	1.00

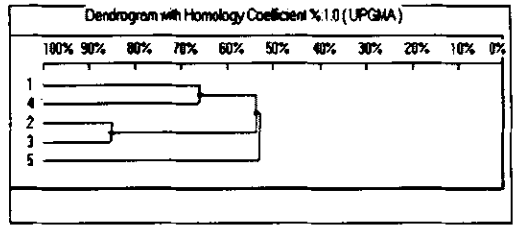


图 5 V6 DGGE UPGMA 分析

表 3 V6/V9 DGGE 相似性矩阵

泳道	1	2	3	4	5
1	1.00				
2	0.55	1.00			
3	0.55	0.86	1.00		
4	0.67	0.67	0.83	1.00	
5	0.53	0.44	0.44	0.50	1.00

3 讨论

PCR-DGGE 技术是一种免培养的方法，从土壤微生物基因组的角度研究其多样性。由于土壤中多酚、腐质酸类物质在提取过程中很难去除，直接影响后续的 PCR 反应，这一技术的第一个关键点就在于总 DNA 的提取和纯化。我们比较了珠磨法和基于 SDS 的高盐提取法，发现基于 SDS 的高盐提取法提取的总 DNA 比较完整，而珠磨法提取的比较弥散，但 90% 均大于 2kb；从提取的效率来看，珠磨法明显高于基于 SDS 的高盐提取法；从含有的杂质来看，珠磨法也明显低于基于 SDS 的高盐提取法。因此本实验我们采用珠磨法和微型柱法对土壤总 DNA 进行提取和纯化。

新疆一号冰川常年处于冰雪覆盖之下，不同海拔之间的温度差异不大，均处于低温的状态，其存在着丰富的微生物资源，是低温菌天然的种质资源库。这种特殊的气候决定一号冰川区域间的土壤理化性质以及细菌群落具有较大的相似性，因此在两种 DGGE 图谱中均可以发现，供试土壤间共有的条带相对较多，各泳道条带的相似性也比较高，说明新疆一号冰川地区土壤间的微生物群落具有比较高的相似性。

基于 PCR-DGGE 技术研究土壤微生物群体的多样性，主要取决于供试土壤和所选用的引物。对新疆一号冰川的五个海拔高度的土壤样品进行研究发现，选用不同的引物扩增产物 DGGE 分析得出的结论基本一致，但由于两套引物的扩增产物是包含不同高变区的大小不同的片段，从而同一样品不同扩增产物的 DGGE 条带数目并不完全相同，所检测到的优势菌群也有一定的差异。从 DGGE 图谱比较分析，V6/V9 DGGE 图谱从其条带的位置、多少、亮度比之 V3 DGGE 图谱能更好的分析细菌群落的多样性。同时选择 16S rDNA 968 ~ 1406bp 片断作为靶标，用于分析的 DNA 长度接近 500bp，能

更好的提供细菌的分类信息, 因此 V6/V9 高变区更适合研究土壤细菌的多样性^[10]。

本文从 DGGE 带谱的差异上初步比较了距离相近, 环境相似的新疆一号冰川的五个海拔高度的土壤样品细菌多样性的差异, 结果表明供试样品具有丰富的细菌多样性组成, 不同样品之间具有一定的差异性, 对更深入地研究该环境中的微生物多样性具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 许晓妍, 崔承彬, 朱天骄, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (1): 108 ~ 112.
- [2] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, *et al.* European Journal of Soil Science, 2003, 54: 655 ~ 670.
- [3] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695 ~ 700.
- [4] Saikaly P E, Stroot P C, Oerther D B. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 5814 ~ 5822.
- [5] Zhang R F, Zhu Z H, Zhu H M, *et al.* Nucleic Acids Res, 2005, 33: 489 ~ 492.
- [6] Kong P, Richardson P A, Hong C X. Journal of Microbiological Methods, 2005, 61: 25 ~ 32.
- [7] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 4715 ~ 4724.
- [8] Heuer H, Hartung K, Wieland C, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 1045 ~ 1049.
- [9] 王岳坤, 洪 葵. 微生物学报, 2005, 45: 201 ~ 204.
- [10] Gomes N C M, Heuer H, Schonfeld J, *et al.* Plant and Soil, © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>