

土壤细菌 DNA 提取及多样性分析的 T-RFLP 方法

葛芸英* 陈松 胡兰 涂政
(公安部物证鉴定中心 北京 100038)

摘要: 获得高质量的土壤总 DNA 是土壤细菌生态学的关键步骤之一。实验通过综合应用两个试剂盒(Soilmaster kit 和 DNA IQ™ 系统)的优点进行土壤样品总 DNA 的提取, 结果证明该方法是一种快速、有效、灵敏、稳定的土壤 DNA 提取方法。另外尝试将 16S rDNA 序列和 T-RFLP(Terminal restriction fragment length polymorphism)技术引入土壤细菌 DNA 群落多样性的研究中, 证明 T-RFLP 是一种有力的土壤细菌多样性分析工具。

关键词: 土壤细菌, 多样性分析, DNA 提取, T-RFLP 分析

A New Method of Soil Bacterial DNA Extraction and T-RFLP Analysis for Diversity

GE Yun-Ying* CHEN Song HU Lan TU Zheng
(Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038)

Abstract: Obtaining soil bacterial DNA of good quality is a key step in soil bacterial ecology study. A quick, efficient, sensitive and stably method of DNA extraction from soil were established by combining strong-points of two kits (Soilmaster kit and DNA IQ™ kit). In addition, the 16S rDNA gene and T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) were used in the analysis of soil bacterial community diversity and the result show that T-RFLP is a powerful tool for bacterial community study.

Keywords: Soil bacterial, Diversity analysis, DNA extraction, T-RFLP

土壤是各种生物体包括人类赖以生存的物质基础, 虽然土壤细菌研究一直深受各国土壤学家和生态学家的关注, 对其物理和化学性质已进行了广泛深入的研究, 但是对于土壤中的生物区系特别是土壤细菌的研究却相对落后得多。比如对于土壤细菌的认识, 人们通常是通过先分离细菌再在培养基上培养、鉴定菌落的方法; 但事实上, 土壤中只有少部

分细菌可以通过此方法得到, 而大部分细菌是极难培养成功的, 这使得许多土壤细菌包含的大量遗传信息难以被发现^[1, 2]。近些年来, 把分子生物学技术运用在土壤细菌生态学的研究中, 使人们可以避开传统的分离培养过程, 通过 DNA 水平上的研究, 直接探讨土壤细菌的种群结构及其与环境的关系。目前已经涌现出许多用于研究土壤细菌多样性和生态

基金项目: 公安部重点研究项目(No. 20038221401)

* 通讯作者: Tel: 010-66269472; 信箱: easygy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-18; 接受日期: 2007-10-19

学的技术, 比如:ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis), SSCP (Single strand conformation Polymorphism), RFLP(Restriction fragment length polymorphism Sequencing), DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 和 T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 等。这些技术和方法的采用, 使得在土壤细菌多样性、细菌种群的结构和功能、土壤细菌的系统发生和分类、土壤细菌与污染土壤的相互作用及影响等多领域的研究上得以突破, 发挥了传统方法所不能替代的作用^[1,2,3]。其中 T-RFLP 技术作为一种新兴的研究微生物群体多态性的方法, 也越来越受到相关研究的重视。

但是, 这些方法成功的首要问题是能否获得高质量和高纯度的 DNA, 本文综合两个试剂盒 (Soilmaster kit 和 DNA IQ™ 系统) 的优点进行土壤 DNA 提取并且将细菌 16S rDNA 序列和 T-RFLP 技术应用于土壤细菌群落多样性的研究中。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂(盒)及土壤样品

Soilmaster kit(EPICENTRE 公司)、DNA IQ™ 系统(PROMEGA 公司)、TaKaRa Tag HS 酶(TaKaRa 公司)、*Alu* 内切酶(Biolabs 公司)、内标 LIZ-500(AB 公司); 土壤样品来自于北京周围随机采集的土壤。

1.2 土壤样品的采集及预处理

取距离土层表面 1~5cm 的土壤, 装入灭菌封口塑料样品袋中, 去除样品中自带的植物残体、砂石等大颗粒后置于 4℃ 冰箱保存。

1.3 土壤总 DNA 提取(参照 Soilmaster kit 操作步骤并作适当调整)

(1) 称取 300 mg 土壤置于 1.5 mL 离心管中, 加入 375 μ L DNA 提取液和 5 μ L 蛋白酶 K(50 mg/mL), 振荡后 37℃ 水浴保温 30 min; (2) 加入 75 μ L 裂解液, 振荡后 65℃ 保温 1h; (3) 10000 r/min 离心 3 min 后吸出上清至新的 1.5 mL 离心管中; (4) 在新管中加入 90 μ L 去蛋白剂, 颠倒数次混匀后置于冰上 8 min; (5) 13000 r/min 离心 8 min 后, 吸出上清转移至另一离心管中备用。

1.4 土壤总 DNA 的纯化(参照 DNA IQ™ 系统的操作步骤)

(1) 加入与以上所提 DNA 等体积配制好的裂解液(100 μ L 裂解液+1 μ L 1 mol/L DTT), 振荡后加入 7 μ L 树脂, 室温放置 5 min; (2) 涡旋振荡后将离心管放在磁架上, 小心吸去溶液; (3) 用 100 μ L 裂解

液洗涤一次, 涡旋振荡后将离心管放在磁架上, 小心吸去溶液; (4) 用 100 μ L 洗液洗涤 3 次, 每次涡旋振荡使树脂悬浮; (5) 打开离心管盖子, 室温下空气干燥 5~10 min, 加入 20 μ L 的无菌去离子水, 盖好盖子, 65℃ 加热 5 min; (6) 取出离心管, 涡旋振荡后, 立即将离心管放回磁架上, 小心吸出上清液, -20℃ 保存备用。

1.5 土壤总 DNA 的检测

取 5 μ L DNA 溶液, 用 0.8% 含 EB 琼脂糖凝胶、5V/cm 电压电泳, 同时用 DNA 作对照, 紫外光下观察 DNA 样品谱带与对照谱带的位置和亮度。

1.6 16S rDNA 扩增及产物检测

选用通用引物扩增参试土壤样品 DNA 的 16S rDNA 序列^[5], 正向引物 63f 序列为: 5'-CAGGC-CTAACACATGCAAGTC-3' (5'-FAM 标记), 反向引物 1387r 序列为 5'-GGGCGGWGTGTACAAG-GC-3'。扩增反应采用 25 μ L 体系, 模板量为 2 μ L, 阴性对照用 ddH₂O 代替模板 DNA。PCR 扩增条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30s, 58℃ 45s, 72℃ 1.5 min, 32 个循环; 72℃ 10 min。

取 1 μ L 扩增产物+12 μ L 甲酰胺+0.2 μ L 内标混匀后, 在 ABI 310 遗传分析仪上进行毛细管电泳, 电泳时间为 50 min。

1.7 T-RFLP 的原理

T-RFLP 根据样品中的目标区域 DNA 序列的不同或变化, 进行 PCR 扩增后得到目标 DNA 片段, 酶切后将会产生不同长度的限制性片段。由于 T-RFLP 方法是把目标 DNA 片段的一个末端(通常是 5' 端)用荧光标记, 这样在酶切后, 分析的目标只限于有荧光标记的末端限制性片段上。酶切后产生长度不等的末端限制性长度片段经过毛细管电泳分离, 并经 ABI 自动测序仪上检测和计算后, 输出末端限制性片段的大小和强度图。测序仪上输出的图谱含有的不同波峰越多, 则表明微生物种类越丰富。通过比较不同样品图谱间的峰的异同, 可以为评估土壤微生物多样性提供更敏感的数量化基础, 从而为比较土壤样品之间的关系提供一种依据。

1.8 产物酶切、检测及分析

依据 PCR 产物检测峰高, 取适量 PCR 产物用 *Alu* 进行酶切; 反应采用 10 μ L 体系, 37℃ 3 h 酶切完成后 65℃ 20 min 终止反应。

取 1 μ L 酶切产物+12 μ L 甲酰胺+0.2 μ L 内标混匀后, 在 ABI 310 遗传分析仪上进行电泳, 电泳时间为 25 min。

用 GeneScan 软件分析各样品, 得到各样品所包含的末端片断的数目及分子量大小, 即每个样品的最终分型。依据公式 $C_s = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 人工计算出两样品之间的 Sorenson 相似系数。其中: N_{AB} 指 A、B 两样品共有的条带数目(人为规定分子量相差 ± 1 bp 内算是同一条带); N_A 、 N_B 指 A、B 两样品各自包含的条带数目。

1.9 提取及 T-RFLP 方法稳定性实验

按 300 mg、200 mg、100 mg 的梯度提取同一份土壤样品的 DNA, 依次编号为 S6B、S6C、S6D; PCR 扩增后依据 1.8 中的步骤进行酶切和电泳, 得到各个样本末端酶切片段的图谱和分型。

取编号为 30、31 号的两个土壤样品的 DNA 相距一个月分别进行前后两次 PCR 扩增, 并对其产物进行酶切, 观察并分析其末端酶切片段的图谱。

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 的琼脂糖电泳结果

在用紫外光检测时, 可以看到所提取样品的总 DNA 条带清晰完整, 基本无弥散, 分子量接近 DNA。由于 DNA IQ™ 系统具有简单定量功能(7 μ L 磁珠溶液最多只能吸附 100 ngDNA), 因此在最理想

的状态下, 该方法所提取的 DNA 浓度最大为 5 ng/ μ L, 用一般的照相技术无法清楚拍摄, 只能用肉眼看到。

2.2 PCR 扩增产物检测结果

通用引物 63f/1387R 对所提 DNA 进行 PCR 扩增后, 所检土壤样本均得到了分子量相近的主要扩增产物, 而阴性对照则无产物, 结果见图 1。依据文献报道, 细菌目标片段的大致分子量为 1300 bp 左右; 由于没有这么大的分子量内标, 不能得到该扩增片段的具体分子量, 不过依据其横坐标的点数以及内标所作曲线, 可以估算其片段的大小为 1300 bp 左右, 确定为细菌的目标片段。

2.3 提取及 T-RFLP 方法稳定性实验结果

S6B、S6C、S6D 经过 PCR、酶切、毛细管检测后, 得到了较为一致的末端片段图谱, 结果见图 2。30、31 两个样品在前后相隔一个月进行的 T-RFLP 实验中, 均得到了非常相似的末端片段图谱, 结果见图 3、4。其中横坐标反映了 DNA 片段(峰)在毛细管中的电泳至检测孔的时间, 经过软件计算后对应其分子量大小; 纵坐标是 DNA 片段(峰)的强弱程度, 横坐标代表了该片段分子量的大小。用 GeneScan 软件分析得到各样品所包含的末端片断的数目及分子量大小结果见表 1。

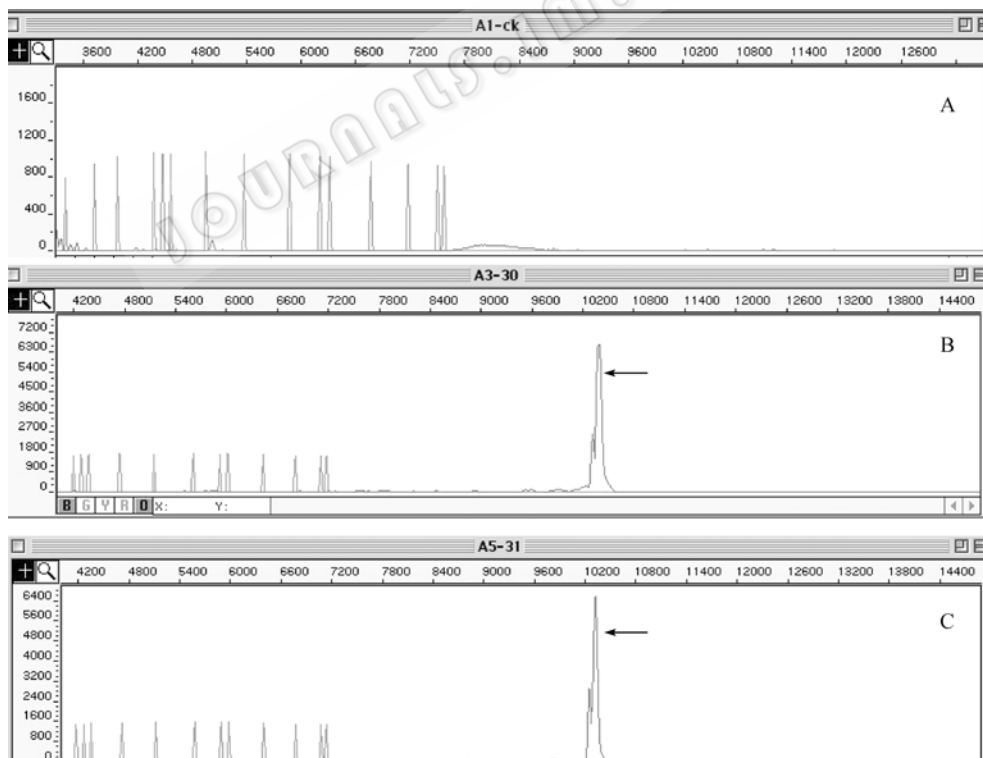


图 1 土壤细菌 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of soil bacteria's 16S rDNA

A: 阴性对照; B、C: 不同土壤样品

A: Negative sample; B, C: Deferent soil samples.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 1 分析后各样本具体的 T-RFLP 结果(bp)
Table 1 Details of T-RFLP fragments from every sample after analysis (bp)

S6B	S6C	S6D	30(First)	30(Second)	31(First)	31(Second)
103.00	103.32	103.23	104.32	104.23	104.14	104.25
104.18	104.56	104.48	112.7	115.43	105.60	105.71
105.17	105.52	105.44	115.51	117.04	115.59	116.07
106.91	156.73	171.94	117.18	125.56	129.60	129.77
156.69	171.88	182.57	125.76	136.82	156.74	156.85
168.27	182.55	186.52	137.00	155.10	160.00	160.00
172.21	190.44	190.45	155.20	156.44	161.53	161.64
181.93	196.21	196.62	156.57	160.00	162.46	167.57
190.41	201.06	201.18	160.11	167.03	167.26	171.70
196.77	203.19	203.32	167.10	171.34	171.11	181.31
201.36	208.96	209.23	171.36	172.50	181.69	187.31
203.06	212.18	212.36	172.48	181.40	187.23	196.26
208.87	236.88	227.75	181.37	182.44	194.03	197.40
212.87	256.04	237.37	182.47	192.39	196.10	199.43
236.82		256.92	192.59	195.12	197.25	200.00
256.21			195.10	196.37	199.55	201.15
			196.3	199.77	200.81	205.30
			199.57	200.81	203.15	207.85
			205.01	205.10	205.25	211.10
			207.70	207.78	207.82	213.66
			210.62	210.82	211.41	228.59
			213.21	213.40	213.59	255.62
			255.54	255.55	228.46	
					255.61	

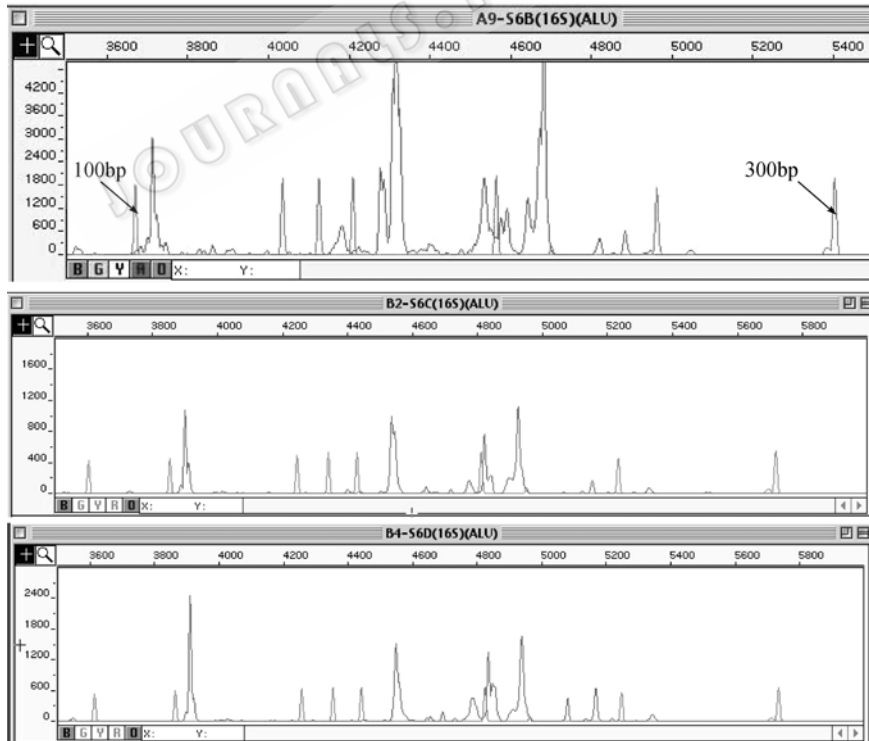


图 2 S6B、S6C、S6D 样品的酶切末端片段的检测图谱

Fig. 2 Electropherograms of the bacterial community T-RFLP profiles from soil samples (S6B, S6C, S6D)

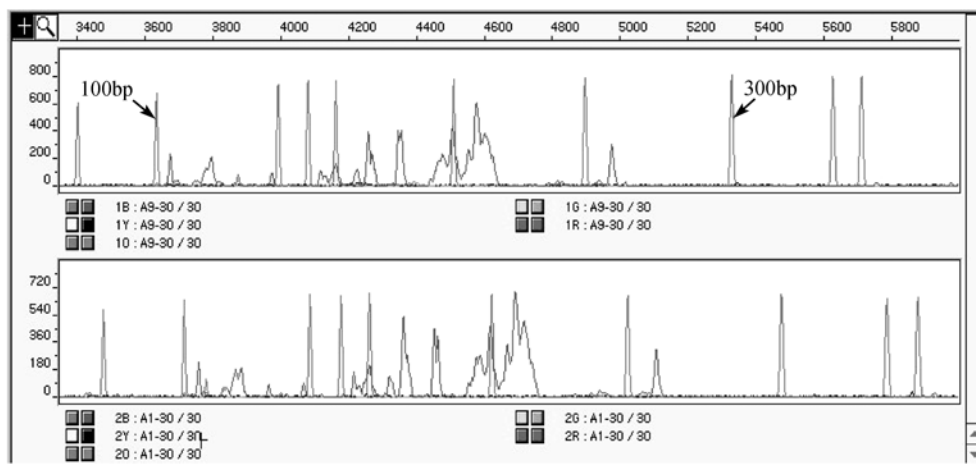


图 3 30 号样品两次扩增产物的酶切末端片段的检测图谱

Fig. 3 Electropherograms of asynchronous T-RFLP profiles of the bacterial community from No.30 soil samples

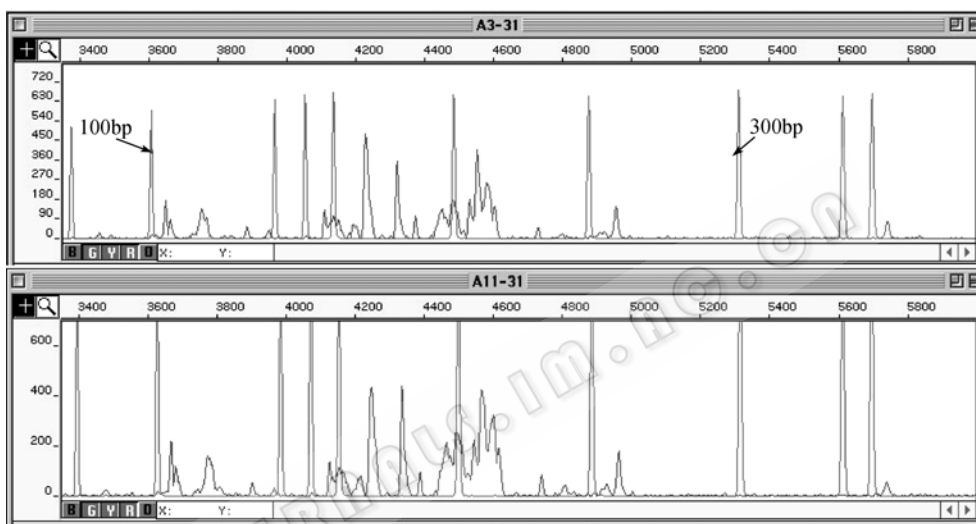


图 4 31 号样品两次扩增产物的酶切末端片段的检测图谱

Fig. 4 Electropherograms of asynchronous T-RFLP profiles of the bacterial community from No.31 soil samples

由图 2 可以看出, S6B、S6C、S6D 三个样本的 T-RFLP 片段主要集中在 100 bp~300 bp 之间, 且其中包含的 DNA 片段(峰)的数量(分别是 16 条、14 条和 15 条)和大小基本一致; 三份样本之间的 Sorenson 相似系数分别是 0.93、0.84、0.90。由图 3、4 可以看出, 30、31 号两个样品前后相距一个月所进行的 T-RFLP 实验的结果显示峰的强度、数目和大小都很接近, 其中 30 号样品的前后的结果在片段数目上保持一致, 均为 23 条; Sorenson 相似系数为 0.96。而 31 号样品的前后的结果在片段数目上也基本一致, 分别为 24、22 条; Sorenson 相似系数为 0.91。

以上结果表明尽管 S6B、S6C、S6D 样本原始的提取土壤重量不一样, 但获得的末端片段的图谱非常接近, 说明这三个样本中细菌群落的组成非常

相近。因此证明即使在提取样本极微量的情况下, 采用该研究中建立的提取方法提取的 DNA 质量稳定, 可以很好地代表土壤中微生物的真实性和异质性。另外在 T-RFLP 分析中, 虽然需经过 PCR、限制性酶切以及毛细管电泳等分子生物学步骤, 但得到的结果非常相似, 即使是前后相距一个月的实验结果; 因此在本研究中所建立起来的 T-RFLP 方法具有很高的重复性和稳定性。

3 结论与讨论

建立高效、可靠的微生物总 DNA 提取方法是进行微生物分子生态学的基础, 但由于在土壤中原有的腐殖物质等容易干扰 DNA 的扩增和检测, 这些污染可能抑制 PCR 中的聚合酶活性^[4]、干扰限制

性内切酶的消化^[5]等,所以 DNA 的纯化是获取高纯度微生物总 DNA 的关键步骤,传统的 CsCl-梯度离心、Sephadex 凝胶层析等方法对 DNA 的损耗较多,且操作复杂。

评价一种土壤 DNA 提取方法是否有效,除了通常要求的提取片段无降解比较完整外,还需要能够有效去除土壤中大量存在的影响后续实验的物质,如腐殖酸、腐殖酸似物、酚类化合物、重金属离子等;能在单位样本量中比较彻底地提取出微生物 DNA;提取方法应具广普性,对土壤中大多数微生物能够有效等^[6],且提取的 DNA 需要更好地代表了土壤微生物的真实性和异质性。

本研究中采用的方法综合运用了两个试剂盒,即应用了 Soilmaster kit 的高效裂解功能和 DNA IQ™ 系统的简单、快速、高效的纯化作用,将提取时间缩短至 3 h,且将 DNA 的提取、纯化及简单定量融为一体。研究中也尝试单独使用 Soilmaster kit 进行少量土壤 DNA 的提取,即完全采用该试剂盒的裂解和纯化步骤;结果发现提取的效率较低,有些极微量的土壤样品不能成功被提取,可能原因之一是土壤成分差异很大,致使 DNA 初提液中所含杂质不同,有些杂质的存在改变了该试剂盒设定的纯化过程中吸附过柱和洗脱的最适条件,致使 DNA 洗脱效率低,损失较大;再由于土壤样品中细菌的量本身很低,而该试剂盒最后所需的洗脱体积较大(50 μL),所以导致所提 DNA 浓度太低无法进行后续实验操作。而 DNA IQ™ 纯化过程非常简单,省却了许多纯化试剂盒所需的反复离心的过程,将纯化时间缩短至 10 min,且可以进行简单定量。该 DNA 提取方法对于大多土壤样品的最小检出量为 100 mg,这是现如今很多文献报道的土壤微生物 DNA 提取方法很难达到的灵敏度;灵敏度的提高可以将采样点缩小,很好地避免采样中由于垂直或水平距离差异造成的微生物群落上的差异。当然土壤中细菌的数量受气候和营养成分的影响很大,所以该研究中建立起来的 DNA 提取方法的灵敏度也会有所变化。

从文中的实验结果可以看出, T-RFLP 分析具有很多优点,例如分析精细(每个土壤样品能得到二十几个末端片段),较 DGGE、SSCP 或 ARDRA 等方法有更强的分析能力;易于自动化(仪器直接检测后以数字化的形式直接输出结果,减少了分析时人为误差);另外通过 ABI 自动测序仪对任一末端限制性片段的测序,并与 Internet 中的数据库的数据进行比较分析,可以确定样品所包含的微生物在系统中分类地位^[1-7],从而可以做系统发育的推断。T-RFLP

技术这三个明显的优势使其必然成为一种理想的群落对比分析的方法。该技术目前已被成功的应用到了菌种的鉴定、各种微生物群落的比较分析、多样性及结构特征的研究等方面。Clement 等^[8]也是利用 T-RFLP 技术分析了三种不同的细菌群落,包括鹿肠道、沙地以及被污染沙地中的微生物群落。詹鑫峰等^[9]为了协助慢性腹泻病原学诊断,利用 T-RFLP 方法对 30 例慢性腹泻患者和 22 例健康人进行肠道菌群分析,结果发现 30 例腹泻患者均发现肠道菌群紊乱,建立了一种新的快速检测分析人体肠道菌群的方法。因此我们相信,随着该方法的进一步完善和相关仪器的普及,对大规模普查各类土壤细菌群落的组成分布,以及快速寻找目的细菌等研究具有重要的意义,并将发挥更大的作用。

综上所述,本研究中建立起来的从土壤中直接提取 DNA 的方法是一种快速、高效、稳定的方法,该方法无需特殊仪器,整个过程可在较短的时间内完成;在本研究中选用 16S rDNA 序列以及 T-RFLP 技术相结合的方法对土壤细菌群落进行研究,结果证明该方法在土壤多态性研究方面是一种有效的手段,重复性好,稳定性高。为检测土壤微生物的群落结构、微生物的多样性和功能微生物的代谢途径研究提供了一种可行的方法。

参 考 文 献

- [1] Tiedje JM, Asuming Brempong S, Nüsslein K, *et al.* Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 1999, **13**(1): 109-122.
- [2] Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultivated microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, **345**: 63-65.
- [3] Bridge Paul, Brian Spooner. Soil fungi: Diversity and detection. *Plant and Soil*, 2001, **232**: 147-154.
- [4] Smalla K, Cresswell N, Mendonca Hagler LC, *et al.* Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction mediated amplification. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **74**: 78-85.
- [5] Porteous LA, Armstrong JL. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small scale extraction method. *Curr Microbiol*, 1991, **22**: 345-348.
- [6] 范圣第, 权春善. 环境 DNA 的提取和纯化方法的研究. 大连民族学院学报, 2005, **7**(9): 1-4.
- [7] Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 173-174.
- [8] Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, *et al.* Terminal restriction fragment patterns, a rapid PCR--based method for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Methods*, 1998, **31**: 135-142.
- [9] 詹鑫峰, 高 鹏, 张卓然, 等. T-RFLP 快速分析慢性腹泻患者肠道菌群及其应用研究. 医学研究通讯, 2005, **34**(10): 27-30.