

末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术的系统误差分析

任玉晶 芦晓飞 万方浩 刘万学*

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘要: T-RFLP 技术是一种新近发展起来的分析微生物多样性的分子生物学方法, 与其它多样性分析技术相比, 具有一些不可比拟的优势, 但 T-RFLP 技术操作流程将对结果产生系统误差的程度鲜有报道。实验以紫茎泽兰入侵过程中 4 种土样中的 *nifH* 基因多样性分析为例, 进行了只改变 T-RFLP 操作流程中一个步骤的 3 次重复分析, 结果表明: 限制性内切酶种类对 T-RFLP 分析结果的可重复性影响最大, PCR 次之, 而毛细管电泳对结果的可重复性几乎没有影响。

关键词: T-RFLP, 系统误差分析, 多样性分析 *nifH* 基因

System Error Analysis for Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

REN Yu-Jing LU Xiao-Fei WAN Fang-Hao LIU Wan-Xue*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: T-RFLP is a newly developed molecular technique for microbial diversity analysis. Compared with other techniques, T-RFLP has several unparalleled advantages. However, there is no report on measuring the system errors generated in T-RFLP operational process. In this study, diversity analysis of *nifH* gene from 4 soil samples which represented different invaded stages after *Ageratina adenophora* (Sprengel) invasion was chosen as a case. In order to determine possible system errors in our study, multiple analysis in which only one procedure of the whole operational processes was changed each time were conducted. Results showed that repeatability for the results of T-RFLP analysis was influenced mostly by the types of Restriction Endonucleases, followed by the PCR procedure, while capillary electrophoresis has almost no effect.

Keywords: T-RFLP, System error analysis, Diversity analysis *nifH* gene

T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism)技术是发明于上世纪末用于分析环

境微生物多样性的一种新方法, 其原理是在 RFLP 引物的一端加上荧光标记, PCR、酶切后用自动测序

仪进行分析, 但只有末端带有荧光标记的 DNA 片段能被检测到^[1-3]。能被检测到的片段为末端限制性片段(Terminal restriction fragments T-RFs), 其作用等同于开放分类单元(Operational taxonomic unit, OTU), 不同长度的 T-RFs 代表不同的微生物, 同一个 T-RFs 至少代表一种微生物。T-RFLP 技术的结果以峰的位置和面积表示微生物的种类和数量, 进而反映目标微生物群落的组成及时空动态。目前 T-RFLP 技术已被广泛用于分析各种环境中某类微生物的群落结构及动态, 例如土壤、水样、肠道等^[4-8]。

一般而言, 指纹图谱技术都具有高通量的特点, 可以分析微生物群落的结构及其时空动态。T-RFLP 技术相对于其它指纹图谱技术具有如下优势: (1) 高通量, 能够迅速产生大量重复、精确的数据, 有利于分析微生物群落结构的时空演替; (2) 根据 T-RFs 的长度与已有数据库比对, 有可能直接鉴定群落中的单个菌种^[9], 优于除 SSCP (Single-strand conformation polymorphisms, 单链构象多态性法)和 DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, 变性梯度凝胶电泳法)之外所有其它指纹图谱技术。然而, T-RFLP 技术比 DGGE 技术和 SSCP 技术的灵敏度高^[10-11]; (3) T-RFLP 技术操作简单、实验周期短, 比构建克隆文库和 RFLP 分析工作量大为减少; (4) T-RFLP 技术既可以定性分析, 也可以定量分析。任何技术方法的分析过程都会产生误差, 尽管多次重复可以消除人为误差, 但是系统误差仍客观存在, 因此尤其需要通过同一个样品的重复测定来衡量测定过程中产生的误差, 进而估计其对结果的影响。就 T-RFLP 技术而言, 目前很少报道其每个步骤产生误差的定量描述。

紫茎泽兰(*Ageratina adenophora* Sprengel)是一种世界入侵性有毒杂草, 在新的生境定殖后能迅速形成大面积的单优群落^[12], 已有研究发现紫茎泽兰入侵可以增加土壤自生固氮菌数量并提高土壤有效氮含量^[13], 因此研究紫茎泽兰入侵对自生固氮菌群落的影响及其对紫茎泽兰入侵的反馈具有重要意义。由于 *nifH* 基因是固氮菌的识别基因, 为单拷贝基因。本文以紫茎泽兰入侵前后的土壤中自生固氮菌群落变化为例, 分析 T-RFLP 技术流程中各个步骤产生的系统误差的程度, 为后续的自生固氮菌群落多样性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土样采集及处理

采样地点为云南省玉溪市澄江县麒麟桥村(北纬 24°42.36', 东经 102°52.821'), 海拔 1988 m, 属亚热带季风气候; 土壤类型为南方典型红壤土。生境中紫茎泽兰为约 10 年生的单优群落。于 2009 年 12 月初, 分别采集该地点的 4 种生境土样: 紫茎泽兰单优区根际土(SR), 紫茎泽兰单优区根周土(DS), 紫茎泽兰与本地植物混生区根周土(HD), 本地植物单优区根周土(DD)。采集时去除落叶层后, 分别多点撰取 0-10 cm 土层并混合。土样过 20 目筛并去除其中的根组织, 置于-40°C 冰箱保存备用。

1.2 DNA 提取

采用“土壤样品 gDNA 提取试剂盒”(Biomiga)按照其说明书在同一时间提取所有处理土壤样品的 DNA。

1.3 PCR 扩增

nifH 基因扩增采用嵌套 PCR 方法, 引物参考 Poly 等^[16], 由上海生工公司合成。外侧引物为 FGPH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATHG-3')和 PolR(5'-ATSGCCATCATTCRCCGGA-3'), 内侧引物为 FAM-PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3')和 AQER(5'-GACGATGTAGATYTCCTG-3')。第 1 轮扩增用 20 μL 体系, 其中包括: 0.1% BSA (TaKaRa) 2 μL, 10 × ThermoPol buffer (New England BioLabs) 2 μL, 40 mmol/L (每种 10 mmol/L) dNTPs (New England BioLabs) 0.4 μL, FGPH19 (10 mmol/L) 0.5 μL, PolR (10 mmol/L) 0.5 μL, *Taq* 酶(New England BioLabs) 1 U, 模板 1 μL, 去离子水 13.4 μL。第 2 轮扩增用 50 μL 体系, 其中包括: 10 × ThermoPol buffer (New England BioLabs) 5 μL, 40 mmol/L (每种 10 mmol/L) dNTPs (New England BioLabs) 1 μL, FAM-PolF (10 mmol/L) 1.25 μL, AQER (10 mmol/L) 1.25 μL, *Taq* 酶(New England BioLabs) 2.5 U, 模板 2.5 μL, 去离子水 38.5 μL。PCR 程序: 95°C 4 min; 95°C 30 s, 53.6°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min。扩增产物的长度约为 340 bp。第 2 轮 PCR 产物用多功能 DNA 回收试剂盒(北京博迈德公司)回收后溶于 20 μL TE 缓冲液用于后续分析。

同一批土样在同一时间提取的 DNA, 每一个样品在相同条件下进行 3 次 PCR 重复, 比较结果的

差异性,以衡量 PCR 过程对 T-RFLP 结果准确性的影响。

1.4 酶切

参考 Moseman 等^[17]和 Flores-Mireles 等^[18]的方法,选用 *Msp* I 酶、*Taq* I 酶和 *Hinf* I/*Alu* I 酶 3 种酶切方案,酶切体系:内切酶(TaKaRa) 1 μ L (两种酶的各 1 μ L), 10 \times Buffer (TaKaRa) 2 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, 回收后的 PCR 产物 8 μ L, 去离子水 7/6 μ L, 共 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。酶切产物用多功能 DNA 回收试剂盒(北京博迈德公司)回收后溶于 10 μ L 去离子水备用。

取同一批 DNA 样品,在相同的条件下进行一次 PCR 后,分别用 *Taq* I、*Hinf* I/*Alu* I、*Msp* I 进行消化,比较产物的差异性,以衡量内切酶消化对 T-RFLP 技术准确性的影响。

1.5 毛细管电泳

10 μ L 电泳体系包括 9 μ L 甲酰胺(ABI 公司), 0.5 μ L 内标(GeneScanTM-500Liz[®]Size, ABI 公司), 0.5 μ L 酶切回收样品。电泳体系经 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,在 ABI 3730 测序仪上 15 kV 电泳 1600 s。

取同一批 DNA 样品,在相同的条件下进行一次 PCR 后,用 *Msp* I 进行消化,上 ABI 3730 测序仪分析 3 次,比较结果的差异性,以衡量毛细管电泳对 T-RFLP 技术准确性的影响。

1.6 数据处理

1.6.1 去除噪声:依据 Blackwood^[19]描述的噪声峰去除方法去除实验过程中产生的噪声峰:(1)按照公式①计算所有图谱的相对荧光强度;(2)选取同一批样品中(本试验中为平行测定的 4 个样 SR、DS、HD 和 DD)总荧光面积最小的样品,求得其中最小的相对荧光强度值(令其为 Min 值),将其作为噪声上限,所有相对荧光强度小于 Min 值的峰都将被作为噪声峰去除。

相对荧光强度(Relative fluorescence) (%)

$$= \frac{\text{图谱中单个峰的峰面积}}{\text{图谱中所有峰的面积之和}} \times 100 \quad \text{①}$$

1.6.2 计算图谱之间的相似性:选用海灵格距离(Hellinger distance)^[20]和 Sorenson 系数^[21]作为比较图谱差异性的指标,算法公式见②和③。多个平行样品之间的平均海灵格距离和 Sorenson 系数为样品两两之间值的平均值。两个样品之间的海灵格距离

越大,说明样品的相似度越小;Sorenson 系数越大,说明相似度越高。

海灵格距离(Hellinger distance)

$$= \sqrt{\sum_{j=1}^p \left[\frac{X_{1j}}{X_{1++}} - \frac{X_{2j}}{X_{2++}} \right]^2} \quad \text{②}$$

x_{1j} = 第 1 个图谱(样品)中第 j 个峰的峰面积;

x_{1++} = 第 1 个图谱(样品)中所有的峰面积之和;

x_{2j} = 第 2 个图谱(样品)中第 j 个峰的峰面积;

x_{2++} = 第 2 个图谱(样品)中所有的峰面积之和。

$$\text{Sorenson 系数} = \frac{2 \times N_{AB}}{N_A + N_B} \quad \text{③}$$

N_{AB} = A、B 两个图谱(样品)中共有的峰的数目;

N_A = A 样品中峰的数目;

N_B = B 样品中峰的数目。

1.7 统计分析

用 SAS (The SAS system for windows V8) 统计分析软件对得到的重复数据进行方差分析,多重比较采用 LSD 法。

2 结果与讨论

2.1 以海灵格距离评价 T-RFLP 过程中产生的误差

对于 T-RFLP 技术而言,Blackwood 等^[19]认为海灵格距离可以较好地比较其产生的图谱之间相似性程度;采用这个参数,可以降低产生 II 型错误(结果中丢失了某些荧光强度弱的 T-RFs)的几率,并且可以降低其中峰面积大的峰在整个结果中的比重。本研究表明(图 1),T-RFLP 技术的最后一步,即在遗传分析仪上进行毛细管电泳时产生的误差最小,并且对所有供试样品的影响一致;与其他几个步骤相比,采用不同的限制性内切酶消化后,结果之间差异最大,明显大于 3 次 PCR 和 3 次毛细管电泳后结果之间的差异;不同限制性内切酶对不同样品的影响没有显著性的差异,即只要选择相同的限制性内切酶分析同一批样品,不会在样品间引入新的误差。

PCR 过程也会对 T-RFLP 技术的结果带来显著的影响,并且对不同样品的影响显著不同。但是,对 4 个样品中的 3 个影响都显著小于酶切的影响,对 4 个样品中的 2 个影响与毛细管电泳没有显著差异。

2.2 以 Sorenson 系数评价 T-RFLP 过程中产生的误差

Sorenson 系数评价结果显示,毛细管电泳对

T-RFLP 技术的影响最小, PCR 次之, 内切酶最大(图 2)。毛细管电泳对 T-RFLP 结果的影响要显著小于 PCR 和内切酶, 而且对于 4 个样品之中的 3 个而言, PCR 和内切酶对 T-RFLP 结果的影响没有显著差异 ($P < 0.05$)。此外, Sorenson 系数对样品本身的差异不敏感。

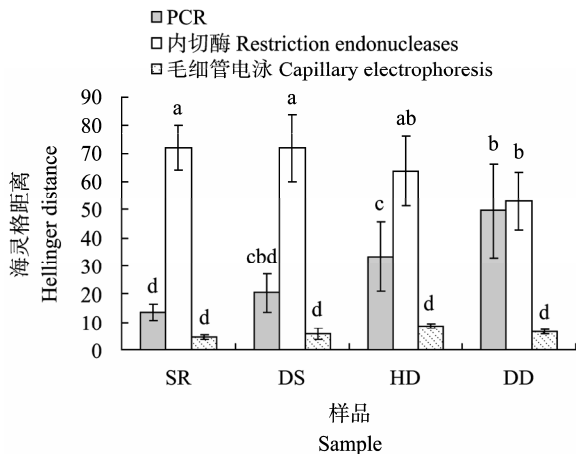


图 1 用海灵格距离评价 T-RFLP 过程中产生的误差

Fig. 1 Measure the variation of T-RFLP by Hellinger distance

注: 图中数据为平均值 \pm 标准差, 不同的小写字母表示不同过程处理之间的海灵格距离在不同样品间的差异显著性 ($P < 0.05$, $n = 3$)。

Note: Bars with different letters indicates that means are significantly different between samples. Data are means \pm standard deviation ($P < 0.05$, $n = 3$).

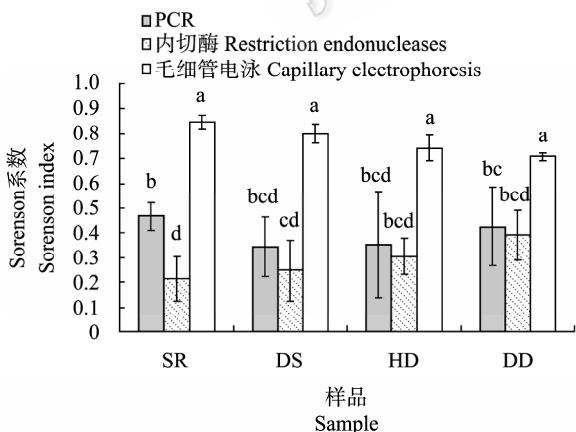


图 2 用 Sorenson 系数评价 T-RFLP 过程中产生的误差

Fig. 2 Measure the variation of T-RFLP by Sorenson index

注: 图中数据为平均值 \pm 标准差, 不同的小写字母表示不同过程处理之间的 Sorenson 系数在不同样品间的差异显著性 ($P < 0.05$, $n = 3$)。

Note: Bars with different letters indicates that means are significantly different between samples. Data are means \pm standard deviation ($P < 0.05$, $n = 3$).

2.3 两种距离参数总评 T-RFLP 过程中产生的误差

两种评价方法的结果表明, T-RFLP 技术结果的准确性几乎不受毛细管电泳的影响。以往 T-RFLP 技术大部分试验中所采用的遗传分析仪为 ABI310 型, 由于遗传分析仪的更新换代, 本实验中采用的遗传分析仪为 ABI3730 型, 结果说明采用 ABI3730 进行 T-RFLP 技术分析同样是可靠的。

T-RFLP 的数据输出形式允许对大量信息的快速分析, 由于片段分析软件已经预装于 DNA 测序仪中, 这些软件能够自动将电泳结果数字化并以表格方式输出以用于统计分析, 避免了将指纹图谱再数字化的程序^[22]以及在这个过程中引入的误差, 这一点也优于其它指纹图谱技术。由于产生 T-RFs 图谱的设备为 DNA 测序仪, 所以图谱的精确度和分辨率均高于其它方法^[23]。

PCR 过程的步骤差异会导致相当大的误差, 对同一样品在相同条件下进行多次 PCR 最终产生的结果间差异较大; 对不同的样品 PCR 过程引入的误差程度不相同, 且没有规律性。为了减少 PCR 步骤对结果准确性的影响, 一般采取混合同一个样品的多次 PCR 产物, 再进行下游分析。然而, 所有依赖于 PCR 的多样性分析方法都存在这个缺陷, 而目前在国内, 要想研究环境中某一类微生物的多样性几乎离不开 PCR 这个步骤。虽然宏基因组测序和大规模的芯片技术(例如 Geochip)可以较好地解决这一问题, 并同时能全面检测环境中微生物的组成、数量、功能及相互的联系, 但是由于种种原因, 这些技术在中国还没有得到广泛的应用。

尽管 T-RFLP 技术是建立在 PCR 基础上, 但是有研究认为, 在混合多次 PCR 产物的情况下它的重复性好, 对平行样分析得到的峰也是几乎完全一样的, 因此用它来进行定性和定量分析是可靠的^[24]。

不论是海灵格距离作为参数还是 Sorenson 系数作为参数, 其比较结果均显示限制性内切酶对 T-RFLP 的结果产生重要的影响, 相同的样品用不同的限制性内切酶消化后产生的图谱之间的相似度很低, 但是对样品本身的差异不敏感。因此, 只要选用相同的内切酶, T-RFLP 技术在目前同类技术中具有不可比拟的优势。

参 考 文 献

- [1] Bruce KD. Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997(63): 4914–4919.
- [2] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997(63): 4516–4522.
- [3] Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, *et al.* Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1998(31): 135–142.
- [4] Lillis L, Doyle E, Clipson N. Comparison of DNA- and RNA-based bacterial community structures in soil exposed to 2,4-dichlorophenol. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, **107**(6): 1883–1893.
- [5] Kirk MF, Crosse LJ, Takacs-Vesbach C, *et al.* Influence of upwelling saline groundwater on iron and manganese cycling in the Rio Grande floodplain aquifer. *Applied Geochemistry*, 2009, **24**(3): 426–437.
- [6] Liu XY, Shen J, Wang TT, *et al.* He application of T-RFLP in analyzing *Clostridium leptum* group in human gut microbiota. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, **21**(8): 696–700.
- [7] Hommez GMG, Verhelst R, Vanechoutte M, *et al.* Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the microflora in necrotic teeth of patients irradiated in the head and neck region. *Journal of Endodontics*, 2008, **34**(9): 1048–1051.
- [8] 葛芸英, 陈松, 孙辉, 等. 土壤细菌群体多样性的 T-RFLP 分析应用探讨. *中国法医学杂志*, 2008, **23**(2): 104–107.
- [9] Kent AD, Smith DJ, Benson BJ, *et al.* Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(11): 6768–6776.
- [10] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993: 398.
- [11] 柳承璋, 宋林生, 吴青. 分子生物学技术在海洋微生物多样性研究中的应用. *海洋科学*, 2002, **26**(8): 27–30.
- [12] 刘万学, 杨国庆, 冯玉龙, 等. 紫茎泽兰的入侵机制与控制管理//万方浩, 郭建英, 张峰, 等. 中国生物入侵研究. 北京: 科学出版社, 2009: 197–208.
- [13] Niu HB, Liu WX, Wan FH, *et al.* An invasive aster (*Ageratina adenophora*) invades and dominates forest understories in China: altered soil microbial communities facilitate the invader and inhibit natives. *Plant Soil*, 2007(294): 73–85.
- [14] 牛红榜, 刘万学, 万方浩. 紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*)入侵对土壤微生物群落和理化性质的影响. *生态学报*, 2007, **27**(7): 3051–3060.
- [15] 李会娜, 刘万学, 戴莲, 等. 紫茎泽兰入侵对土壤微生物、酶活性及肥力的影响. *中国农业科学*, 2009, **42**(11): 3964–3971.
- [16] Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 2001(152): 95–103.
- [17] Moseman M, Zhang R, Qian PY, *et al.* Diversity and functional responses of nitrogen-fixing microbes to three wetland invasions. *Biological Invasions*, 2009(11): 225–239.
- [18] Flores-Mireles AL, Winans SC, Holguin G. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(22): 7308–7321.
- [19] Blackwood CB. Analysing microbial community structure by means of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) // Cooper JE, Rao JR. Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis. CABI, 2006: 84–98.
- [20] Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, *et al.* Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003(69): 926–932.
- [21] Horswell J, Cordiner SJ, Maas EW, *et al.* Forensic comparison of soils by bacterial community DNA profiling. *Journal of Forensic Sciences*, 2002, **47**(2): 350–353.
- [22] 任南琪, 赵阳国, 高崇洋, 等. TRFLP 在微生物群落结构与动态分析中的应用. *哈尔滨工业大学学报*, 2007, **39**(4): 552–556.
- [23] Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, **2**(3): 323–327.
- [24] Lueders T, Friedrich MW. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(1): 320–326.