

分子生物学技术在海洋微生物多样性研究中的应用*

APPLICATION OF MOLECULAR BIOTECHNIQUES IN RESEARCH ON MARINE MICROBIAL DIVERSITY: A REVIEW

柳承璋¹ 宋林生¹ 吴青²

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 中国深圳出入境检验检疫局 518067)

微生物群落在海洋的碳、氮^[4]、磷^[6]和硫^[14]的循环中具有重要的作用,是海洋微食物环的重要组成部分,作为分解者和二次生产者,影响着颗粒有机物的溶解与沉降、溶解有机物的形成和消耗、无机营养盐的形成等生态过程;有些微生物是初级生产者,能通过光合自养、化能自养等营养方式生产有机物。

早期的海洋微生物多样性研究建立在传统的微生物培养技术的基础上。然而由于培养条件与自然条件的差异,实际上培养所得到的只是自然环境中的少部分菌种(0.001%~15%)^[2, 5, 12, 25],而且往往加入了浓度远高于自然状况的营养物质,其结果是在新的选择压力下群落结构通常会发生变化,适应富营养条件的菌种成为优势种,取代了自然条件下的优势种^[8]。认识到以上问题,人们试图采用其他方法以避开对培养技术的依赖,包括以下几种:(1)表面荧光显微镜法,此方法主要用于观测微生物丰度,但不能提供关于微生物形态的准确信息;(2)扫描电镜法(SEM),只能揭示微生物外部形态,并不能提供进行微生物分类的足够信息;

(3)透射电镜法(TEM),此法的限制性类似于扫描电镜法,且十分昂贵。80年代末至90年代以来,分子生物学技术开始被广泛应用于微生物群落结构分析,且发展非常迅速,研究的焦点集中在具有保守序列的16S rDNA上。研究方法包括分子杂交法^[3]、PCR法^[21, 26]、SSCP法^[15]、DGGE法^[19, 20]、TGGE法^[11]、RFLP法^[1]、克隆基因文库分析法^[9, 14, 23]等,具有很高的灵敏性,与传统的培养方法或其它不依赖培养技术的方法相比显示出明显的优越性,推动了微生物多样性研究的快速发展。1997年Liu等^[16]在RFLP法的基础上发展出TRFLP法,与RFLP法相比,该法能够提供关于微生物多样性的更直接的信息,而具有比DGGE法更高的灵敏度,因此在近3年来被广泛应用^[9, 14, 17]。

物种多样性包含两方面的内容:物种的数量(Species richness)和物种的均一性(Species evenness),因此海洋微生物多样性的研究也有两方面的目标,除分析微生物的物种数量外还要研究各菌种的种群大小。

以下分别介绍几类当前应用

于海洋微生物生物多样性研究的主要的分子生物学研究方法。

1 分子杂交法

包括膜杂交和原位杂交方法等。

其原理是:人工合成能与某类群微生物特征基因序列互补的寡聚DNA或RNA探针,并以荧光或放射性标记该探针,然后利用探针与微生物基因杂交,通过荧光显微镜技术或放射自显影技术对微生物的群落结构进行研究。与后面将

* 中国科学院知识创新项目

KZCX2-403 课题和国家自然科学基金项目 39625008 号部分成果;中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4224 号。

第一作者:柳承璋,出生于1971年,硕士,助研。目前在研课题项目:中国科学院知识创新项目 KZCX2-403;国家自然科学基金资助项目 39625008 号。通信地址:青岛市南海路 7 号中国科学院海洋研究所生态与环境室 邮编 266071;E-mail: liu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2001-04-04;

修回日期:2001-07-27



要介绍的其它方法相比,特点是不需要对目标基因进行 PCR 扩增,因此可以避免 PCR 过程中产生的误差;但是同样由于未对目标基因进行扩增,目标基因浓度较低,有时会给检测带来困难;且有时目标类群的目标基因序列并非完全同一,而是有亚类群之间的差异,结果所设计的探针 DNA 序列与某些亚类群的目标基因互补性较差,从而导致对该类群的估计过低^[14];而更重要的不足之处是,只能用来检测事先估计到其存在、已知其目标基因序列,并为之设计好引物的类群。

2 聚合酶链式反应法 (PCR)

实际上除上面的分子杂交法之外,下面将要介绍的几类分子生物学方法都需要对目标基因进行 PCR 扩增,然而仅依靠在 PCR 试验中使用具有类群特异性的引物,不进行酶切、变性、克隆和电泳等后续手段,也能够用来鉴别特定微生物类群的存在^[26]。PCR 法与后面几种方法是紧密联系的,它的优缺点也影响着后面将要介绍的几种方法的质量。其原理是利用人工合成的引物介导的 DNA 聚合酶链式反应,根据不同水平的特异性,仅需知道两段已知序列,就可以扩增出未知的 DNA 区段。微生物多样性研究中对 PCR 法的应用包括定性和定量研究,定量的 PCR 分析方法较为复杂,可分为:稀释 PCR (Limiting Dilution PCR)^[22, 24]、动力学 PCR (kinetic PCR) 和竞争性 PCR (Competitive PCR)。PCR 法实验操作简单快捷,灵敏度高,对样品的要求低,只要有完整的靶序列即可,失活的样品也同样适用。但 PCR 也具有其显著的局限性:首先, Taq 酶

缺乏 3' → 5' 端的外切酶活性,因而不能纠正反应中发生的错误的核苷酸掺入,发生“错配”使 PCR 产物有一定比例的错误序列,而且随着反应循环数的增加,错配将不断积累;其次,当扩增目标是所有微生物时,PCR 的高灵敏度也容易导致污染,可能出现假阳性的结果;而在抑制剂等影响下也可能出现假阴性结果。在定量 PCR 分析中存在的问题是:由于不同种群的基因组大小和每个细胞复制子数量的差异,单个细胞中 16S rDNA 的数量难以估计,进而造成对种群丰度估计的偏差。

3 克隆基因文库分析法

其原理是:提取微生物的基因组 DNA 并以 PCR 法扩增保守序列,然后建立基因文库,最后通过分析基因文库获得关于微生物群落多样性的信息。基因文库分析的具体方法有以下几种:(1) 以菌落杂交法 (Colony hybridization) 利用具有类群特异性的 DNA 探针针对文库进行快速扫描^[6, 13],通过观测每一种基因型的拷贝数,可以估计各类群微生物的丰度,应用此方法的前提是已知群落中各类群的特征基因序列,并针对特征序列合成探针,但实际上预测各类群的特征序列比较困难;(2) RFLP 分析:对各个克隆进行 RFLP 指纹图谱分析,此方法较 DNA 测序法节省时间,但本身不能确定各菌种的分类地位。(3) DNA 测序:能够提供关于各个克隆分类地位的可靠的信息,但需要很长的试验周期、大量的试验材料,实际工作中对所有的克隆进行测序难以实现,通常需要与 RFLP 法或 F-RFLP 法结合,或者只随机挑选部分克隆进行测序;而且根据克隆的拷贝数估计种群丰度将导入

随机误差。

4 基因指纹图谱技术

4.1 单链构象多态性法 (SSCP)

此技术 1989 年由 Orita 等首先采用,其基本原理是:对 PCR 产物进行变性处理,使双链 DNA 变为单链,然后进行非变性凝胶电泳,单链 DNA 在非变性条件下通过分子内力形成与其碱基序列有关的二级结构,此二级结构的形成影响 DNA 分子的电泳迁移速率,从而可以将序列有差别的单链 DNA 分离开来。SSCP 法中对 PCR 产物的显色可以使用硝酸银或溴乙啶,也可以对 PCR 引物或产物进行荧光或放射性标记,以提高方法的灵敏度。SSCP 法的优点是操作比较简便,价格低廉,而且 SSCP 分离的 PCR 产物可以直接用来进行序列测定。SSCP 法的弱点在于其灵敏度随 PCR 产物 DNA 长度的增加而下降。

4.2 变性梯度凝胶电泳法 (DGGE)

1993 年 Myzer^[18]首先采用变性梯度凝胶电泳法分析 16S rDNA,其原理是通过在电泳凝胶中建立由低到高的变性条件梯度,使变性条件不同的 DNA 依次变性,产生电泳迁移速率的差异,从而将其分离开来,由于 DGGE 法不依赖限制性酶切,从而能够保证目标 DNA 的完整性,分离所得的目标 DNA 片段经纯化后可直接用来测序,是该法的优点。但是到目前为止,对没有进行荧光或同位素标记的 DNA 的染色技术灵敏性相对较低,造成 DGGE 法的灵敏度较低;与可以使用内标法的 F-RFLP 法相比, DGGE 法的另一个缺陷是没有合适的分



子量标准物,使得不同次电泳的样品之间难以进行比较。

4.3 温度梯度凝胶电泳法 (TGGE)

其原理及优缺点类似于 DGGE,只是在使 DNA 变性时采取升高温度的方法,而不是化学变性剂方法。

4.4 限制性酶切片段长度多态性法 (RFLP)

其原理是:利用能识别特定 DN 序列的限制性核酸内切酶处理 16S rDNA,基于不同种群 16S rDNA 序列的差异,将得到长度与数量不同的 DNA 片段,通常用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离,并利用溴乙啶等荧光染料进行显色,得到的特异性的电泳图谱称基因的酶切指纹图谱。此法能够反映多个酶切位点所包含的 DNA 序列信息,因此在进行微生物群落物种多样性比较时能提供较丰富的信息,适用于较复杂的群落之间的比较,其缺点是:(1) 末端片段所提供的序列信息混杂在其它片段的信息中,无法判断群落中有多少物种。(2) 和 DGGE 法相似, DNA 的荧光染色法的灵敏度较低。

4.5 限制性酶切末端片段长度多态性法 (FRFLP)

其原理与 RFLP 法相似,只是 PCR 中所用引物一端或两端带有标记,因此酶切所得的末端片段被标记,电泳后通常只分析此末端片段的种类、长度与数量。FRFLP 法方便快捷,由于使用了荧光或放射性标记,具有较高的灵敏度,Moeseeder 等^[17]报道在一个样品中可以鉴别 44 种微生物,Dunbar 等^[9]报道占群落 0.1%~1% 的微生物类群即可以被检测出。

FRFLP 法另一优越性在于:

由于酶切片段中仅有末端片段长度被测定,每一种长度的末端片段至少代表一种微生物基因型,因此可以直接给出对群落中微生物种群数的最小估计值。其缺点是,由于仅有末端片段长度被分析,获得的信息较少,不足以分析非常复杂的微生物群落,如土壤微生物群落,因为多种微生物的酶切末端片段长度可能相同,造成对物种丰度的估计过低^[10]。Dunbar 等^[10]还发现由不同酶切所得的末端片段数目不一致,造成对群落中类群数估计值不一致。究其原因,我们认为,由于微生物种群之间存在或远或近的系统进化关系,其 16S rDNA 序列必然有或多或少的相同区域,在使用某一特异性限制性内切酶的条件下,若酶切位点落在此共同区域内(且此区域在 16S rDNA 中的位置相同)时,各类群的 DNA 序列差异就不会被反映出来,而表现为"同一类",此现象并非偶然,其合理性在于反映了微生物种群之间存在一定程度的亲缘关系,可以被认为属于同一大类。而在使用另一种特异性限制性内切酶的情况下,若酶切位点没有落在群落中不同类群的 16S rDNA 的共同区域,则可以将它们区别开来,反映了他们在系统进化中的分化。总之,在使用不同限制性内切酶处理同一群落样品时,期望得到同样多的末端片段种类(即对类群数的估计值)是不现实的,此期望基于以下假设,即微生物 16S rDNA 的碱基序列是随机的,这显然与事实不符,事实上 16S rDNA 序列的保守性正是所有以 16S rDNA 为目标进行分类学和群落多样性研究的分子

生物学方法的共同基础。基于以上原理,在进行限制性酶切时,应该分别使用多种酶,并比较其结果。

其它较新的 DNA 指纹图谱技术还有随机扩增多态性 DNA 分析 (RAPD) 等,在此不多做陈述。

5 不同分子生物学方法联合研究

鉴于以上各种分子生物学方法虽然各有其优点,但又都有其不足之处,在实际进行微生物群落生物多样性研究时,往往需要将两种以上的方法联合起来使用,以便于互相取长补短,或进行比较,前人用过的组合有: RFLP + FRFLP^[16]; DGGE + FRFLP^[17]; 克隆、测序 + RFLP^[7]; 克隆、测序 + 分子杂交 + DGGE^[27]; 克隆、测序 + 分子杂交 + FRFLP^[14]; 克隆、测序 + 分子杂交 + 传统的微生物培养技术 + FRFLP^[10]。

关于不同方法组合的策略, Dunbar 等^[10]认为对克隆基因文库进行 RFLP 法或测序法分析能够提供关于微生物群落多样性的最详细、可靠的信息,但我们认为此观点有失偏颇。事实上以克隆的拷贝数代表自然水体中该种群大小,所获得的是离散的信息,必然产生随机误差,降低误差的方法是进行大量的克隆和对克隆的分析工作,但若想以此方法将随机误差降低到统计上可以接受的程度实际上非常困难,某一种群占群落 DNA 总量的比例越低,则需要建立并分析更多该群落的克隆,才能准确地估算该种群所占比例。假定由克隆文库分析所得的某种群



比例的分布服从二项分布 $X \sim B(n, p)$, 如果在置信度为 $1-\alpha=95\%$ 时, 要求对比例 p 的区间估计为 $l=0.1$, 即对 p 估计的绝对误差不超过 5% 时, 需分析的克隆数

$$n \geq \left(\frac{U_{\alpha/2}}{l}\right)^2 = \left(\frac{1.96}{0.1}\right)^2 = 384.16$$

请注意, 此时的绝对误差看似较低, 但如果某一种群占群落 DNA 总量的比例为 10% , 则对其比例估计的相对误差已达到 50% , 若要求相对误差 $\leq 10\%$, 则只有对比例超过 50% 的优势种的比例的估计才是可靠的。

在我们所知采用这种克隆 + 克隆文库分析试验策略的工作中, 没有人能达到这种工作量。Dunbar^[10], Crump^[7] 对每个文库分别分析了 200, 75 个克隆, 以 95% 置信度计算, 若要求估计的相对误差小于 10% , 只有对比例达到 69% 和 113.15% 以上的优势种的估计才可信, 因此在此工作量条件下进行群落结构的定量分析是不可靠的。

综上所述, 克隆 + 克隆文库分析试验方案的精确度不适于用来做群落结构空间和时间尺度上定量的生态学研究。与此相反, FRFLP 法能够提供连续的定量信息, 其缺陷是用于鉴别各种群的定性信息不足, 若能将其与克隆 + 克隆文库分析法结合使用, 则可以取长补短, 获得最优化的信息。

参考文献

- 1 Acinas S., Rodriguez Valera F., Pedros-Alio, C.. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 24: 27 ~ 40
- 2 Amann R. I., Ludwig Schleifer K. H.. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial

- cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 1995, 59: 143 ~ 169
- 3 Bach H. J., Errampalli D., Leung K. T., Lee H. et al.. Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 3 226 ~ 3 228
- 4 Barak Y., Tal Y., van Rijn J.. Light mediated nitrite accumulation during denitrification by *Pseudomonas* sp. strain JRI 2, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 813 ~ 817
- 5 Barns S. M., Fundyha R. E., Jeffries M. W. et al.. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 1 609 ~ 1 613
- 6 Bond P. L., Hugenholz P., Keller J. et al.. Bacterial community structures of phosphate-re moving and nonphosphate-re moving activated sludge from sequencing batch reactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 1 910 ~ 1 916
- 7 Crump B. C., Armbrust E. V., Baross J. A.. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 3 192 ~ 3 204
- 8 Dunbar J., White S., Forney L. J.. Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 1 326 ~ 1 331
- 9 Dunbar J., Takala S., Barns M. S., Davis J. A. et al.. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 1 662 ~ 1 669
- 10 Dunbar J., Ticknor L. O., Kuske C. R.. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States Soils by 16S rDNA gene terminal restriction fragment analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2 943 ~ 2 950
- 11 Felske A., Akkermans A. D. L., de Vos W. M.. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 4 581 ~ 4 587
- 12 Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L. et al.. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton, *Nature (London)*, 1990, 345: 60-63
- 13 González J. M., Moran M. A.. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 4 237 ~ 4 242
- 14 González J. M., Simo R., Massana R. et al.. Bacterial community structure associated with a dimethyl sulfoniopropionate-producing north Atlantic algal bloom, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 4 237 ~ 4 246
- 15 Lee D. H., Zo Y. G., Kim S. J.. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-conformation polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 3 112 ~ 3 220
- 16 Liu Wei-Tso, Marsh T., Cheng H., Forney L. J.. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 4 516 ~ 4 522

(下转 57 页)

(上接 30 页)

- 17 Møseeder M. M., Jesus M. A., Gerard M., *et al.*. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 3 518 ~ 3 525
- 18 Myzer G. E. C. de Waal, Utterinden A. G.. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 695 ~ 700
- 19 Myzer G., Teske A., Wirsén C. O.. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments, *Arch. Microbiol.*, 1995, 164: 165 ~ 172
- 20 Murray A. E., Hollibaugh J. T., Orrego C.. Polygenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 2 676 ~ 2 680
- 21 Nørgaard H. K., Kristine K. R., Naterstad K. *et al.*. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 4 266 ~ 4 271
- 22 Pilai S. D., Josephson R. L., Bailey C. P. *et al.*. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 2 283 ~ 2 286
- 23 Rondon M. R., August P. R., Betermann A. D. *et al.*. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2 541 ~ 2 547
- 24 Sykes P. J., Neoh S. H., Brisco M. J. *et al.*. Quantification of targets for PCR by use of limiting dilution, *Bio. Techniques*, 1992, 13: 444 ~ 449
- 25 Torsvik V., Goksøyr J., Daae F. L.. High diversity in DNA of soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56: 782 ~ 787
- 26 Voytek M. A., Ward, B. B.. Detection of ammonium oxidizing bacteria of the betasubclass of the class *Proteobacteria* in aquatic samples with the PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 1 444 ~ 1 450
- 27 Ward, B. B., Martino, D. P., Diaz, M. C., Joye, S. B.. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2 873 ~ 2 881

(本文编辑:刘珊珊)