

T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用

T-RFLP technique and its application in research on microbial community structure

贾俊涛¹, 宋林生², 李 筠¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q919.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)03-0064-05

微生物是生态系统的重要组成部分,在各种元素的生物地化循环中起关键作用。因此研究微生物的群落结构,借此了解微生物和环境的关系就尤为重要。长久以来微生物群落结构的调查方法一直是建立在分离和培养的方法上。这种方法不但费时费力,而且不够准确。这反映在如下几个方面(1)微生物群落组成极度复杂,有报道称,每 30 g 土壤中含有 4 000 多种微生物^[1]因而采用传统方法工作量巨大。(2)反应结果的阳性阴性有时不好判断,容易产生偏差。(3)培养的方法对菌有选择性。4. 环境中的绝大多数微生物是不可培养的,可培养的微生物只占总量的 0.1%~10%^[2]。因此用传统培养方法所得出的调查结果不能准确反映微生物群落组成情况,建立和发展一种不依赖微生物培养的方法来进行微生物群落结构调查是非常必要的。

近年来随着分子生物学技术的迅速发展,从分子水平对微生物的群落结构进行研究已经成为可能。PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应) 技术、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性) 技术的建立和 DNA 测序技术的不断完善以及这些技术的融合产生了一种全新、快速、有效的微生物群落结构分析方法,即 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, 末端标记限制性片段长度多态性)。该方法有传统方法无可比拟的优越性,它建立在 PCR 的基础上,不需要分离培养细菌,因而避免了培养方法的弊端。更重要的是该方法可以检测到环境中所有的菌,包括活菌(可培养的和不可培养的)和未降解的死菌。T-RFLP 技术与其它调查微生物群落结构的分子生物学方法相比也有自己的优势,它比 SSCIF (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)有更高的灵敏度^[3,4],比构建 16SrDNA 克隆文库和 RFLP 分析工作量少很多。

1 原理方法

首先根据比较基因组学的研究结果选取一段具有系统进化标记 (phylogenetic marker) 特征的 DNA 序列作为目的分析序列。目前,16S rRNA 基因(rDNA)是最常用的作为细菌群落结构分析的系统进化标记分子。从 70 年代初开始,Carl Woese 分析了大量菌的 16SrDNA 序列,建立了原核生物系统发育的基本框架。Woese^[5]意识到由于 rRNA 的保守性,它可以用来揭示不同物种的系统进化关系。1989 年在美国国家科学基金的资助下核糖体数据库计划 (Ribosomal Database Project, RDP)启动了。经过长期研究,人们对细菌的 16S rDNA 序列有了清晰的认识:该序列全长约 1540bp,有多个区段高度保守。根据这些保守区人们可以设计出细菌的通用引物,用来扩增所有细菌的 16S rDNA 片段。16S rDNA 可变区的差异则可以用来区分不同的菌。

随着核酸测序技术的发展,越来越多的 rRNA 基因序列被输入数据库。现在最新的 RDP 版本是 RDP8.1^①。其中原核生物核糖体小亚基 (small-subunit, SSU) RNA 的基因序列已达到 16277 条。有了强

收稿日期:2003-01-30;修回日期:2003-04-22

作者简介:贾俊涛(1977-),硕士在读,从事海洋微生物学研究, E-mail: jiajt@sina.com.cn, 电话: 0532-2032266

① 下载网址: <http://rdp.cme.msu.edu>

大的数据库支持,采用 16S rDNA 作目的序列进行细菌群落结构分析就更加方便可靠。

确定了合适的目的序列后,接下来根据序列的保守区设计引物,其中一个引物的 5' 用荧光物质标记,常用的荧光物质有 TET^[6], HEX^[7], 6-FAM^[8] 等。然后提取待分析样品的总 DNA,以它为模板进行 PCR 扩增,所得到的 PCR 产物一端就带有这种荧光标记。然后,将 PCR 产物用合适的四碱基的限制性内切酶消化,由于在不同菌的扩增片段内存在核苷酸序列的差

异,酶切位点会存在差异,酶切后就产生许多不同长度的限制性片段。消化产物用 DNA 自动测序仪(选用 genescan 功能)进行检测获得峰值图,末端带荧光标记的片段(Terminal Restriction Fragment, T-RF)或者称作操纵分类单元(operational taxonomic unit, OTU)被检测到,而其它没带荧光标记的片段则检测不到。因为一种菌的 T-RF 长度是惟一的,所以峰值图上的每一个峰至少代表了一种菌。

图 1 显示了 T-RFLP 分析的全过程。

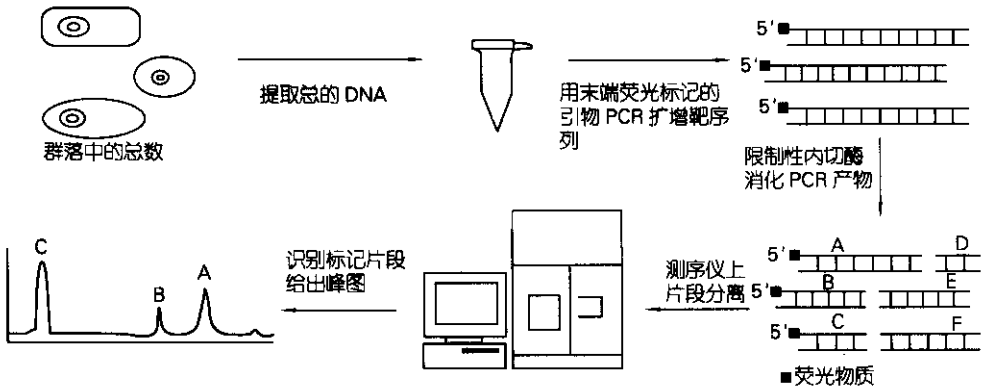


图 1 T-RFLP 流程

在 GeneScan 的峰值图上,每个峰所占据的面积占总面积的百分数就代表了这种 T-RF 的相对数量。虽然不同细菌基因组上 16S rDNA 以不同数量的多拷贝形式存在,导致了 T-RF 的量与细菌个数不是直接对应关系^[8],但是由于基因组上拷贝数不高,一般情况下可以近似地认为哪种细菌对应的 T-RF 峰曲线下的面积大,该菌的相对数量就大。据报道,峰值图的重复性很高^[9,10],因而该技术做定量分析是非常可靠的。

单纯的 T-RFLP 可以提供微生物的种类和相对数量的信息。但是还无法确定是何种微生物,定性信息不足^[11]。结合克隆文库分析^[12,13]或者核酸杂交分析^[14],就能确定微生物的种类。

2 T-RFLP 技术的应用

2.1 用 16S rDNA 调查全部细菌的群落结构

目前多数关于 T-RFLP 的资料是用它来进行细菌群落结构的分析以及不同群落结构间的比较,其中尤其以调查土壤中^[13,15-19]以及经济动物体内^[20]细菌群落的构成为主。

Lüdemann 等^[21]分析了水稻种植区土壤中沿着氧垂直梯度上的细菌群落组成变化。进行了基于 16S rDNA 的 T-RFLP 分析。同时结合 16S rDNA 克隆文库的构建和测序分析,获得了与氧垂直梯度相关的不同深度细菌群落组成情况。Gong 等^[22]将基于 16S rDNA 的 T-RFLP 用于分析鸡盲肠和回肠中的细菌组成。

Liu 等^[6]分别分析了活性污泥、生物反应器、沙质、地下水以及白蚁消化道中的细菌组成,同时比较了这些群落结构的相似性,发现白蚁消化道中的细菌组成与其它样品显著不同。Liu 还将 6 种已知菌混和在一起组成模拟的群落,然后做 T-RFLP 分析后,获得了 6 种 TRF 片段,验证了该方法,表明该方法是目前分析细菌群落结构的强有力的工具。

近年来,该技术开始应用到海洋细菌群落调查方面。1999 年,Moeseeder 等^[7]对海洋浮游细菌群落做了 T-RFLP 分析,最后用毛细管电泳仪检测了 T-RF,并且对电泳条件做了优化。Maarel 等^[23]用此方法研究了 2 种海洋鱼类消化道中细菌的情况。Gonzalez 等^[12]对赤潮海域的细菌做了 16S rDNA 克隆文库测序和 T-RFLP 分析,将 T-RF 与克隆测序后的结果比

对后,发现 Rosebacter 在整个群落中数量最多。

以上 T-RFLP 分析都是建立在 16S rDNA 基础上的。16S rDNA 数据库的发展完善为 T-RFLP 的应用带来了广阔的前景。人们可以对数据库中的序列进行模拟分析,做法是从数据库中选出序列,输入分析软件(例如:TAP^[24]),选择限制酶,就可实现“电子”消化 16S rDNA。从而检验引物的特异性或者选取的限制性内切酶是否合适,也可将软件分析结果与实际实验结果做比较。

2.2 用功能基因作某一类群菌的群落结构

T-RFLP 技术能分析的目的分子不仅限于 16S rRNA。选用某种功能基因作目的序列进行分析就能确定具有这种代谢功能的这一类群微生物的组成情况。Bruce 等^[15]用细菌基因组上水银抗性基因进行 T-RFLP 分析,结果表明依据水银抗性基因,T-RFLP 可以区分数据库中的所有具有这一基因的细菌。

氨氧化菌在生物地化循环中起着重要作用,对它的检测就尤为重要。然而氨氧化菌生长缓慢,采用培养的方法检测就非常耗时,而且不准确^[25]。Horz 等^[14]扩增了氨氧化菌特有的编码氨单加氧酶(ammonia monooxygenase)的 amoA 基因序列,用限制酶 TaqI 切割后,获得了长度为 48 bp、219 bp 和 283 bp 的 T-RF,与 amoA 基因序列数据库中的数据对比后确定了后 2 种 T-RF 分别对应着 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira* 属的菌;48bp 的 T-RF 对应着 2 种菌,虽然用 TaqI 无法区分二者,但是换用 AluI 切割就能分开二者。

反硝化细菌也在元素循环中起这关键作用。Scala 等^[10]扩增出反硝化细菌特有的氧化亚氮还原酶(nitrous oxide reductase 基因(nosZ 基因)序列,然后用限制酶 HinPI 消化,从而检测了海底细菌群落中反硝化细菌水平分布上的差异。

Horz 等^[3]扩增了编码颗粒性甲烷单加氧酶(particulate methane monooxygenase α 亚基的 pmoA 基因。酶切产物来分析噬甲烷菌(methanotroph)的种群多样性。

突柄微菌(planctomycetes)的 16S rDNA 与其它细菌的同源性较低。Derakshani 等^[13]采用它的特异性引物扩增了这类菌的 16S rDNA。通过酶切分析获得 33 种 TRF。同时将扩出的 16S rDNA 克隆测序后发现能与这 33 种中的 20 种 TRF 匹配。

最近的研究发现,延伸因子基因也可以应用于

T-RFLP 分析,Marsh^[26]通过对延伸因子基因数据库中的序列进行计算机模拟限制性消化分析后发现所获得的末端标记片段要多于采用对 16S rRNA 数据库进行的分析。但这还不能表明用延伸因子比用 16S rDNA 更有效,因为目前延伸因子的数据库还不够完善。

选择其它的系统进化标记做目的序列还能取得特殊的分析成果。例如,选用 16S rRNA 可以调查群落中有代谢活性的菌的组成情况,这是因为有代谢活性的菌处于休眠状态的菌含有更多的 rRNA,rRNA 就成为检测有代谢活性的细菌的一种指标。Moeseneider 等就依据这一原理分析了海洋浮游细菌群落中有代谢活性的菌的组成。

2.3 检测真菌的群落结构

如果选用的目的基因片段合适,T-RFLP 技术也可以应用于真菌的群落结构分析。1998 年 Marsh 等^[6]首次将 T-RFLP 技术应用到真核生物群落结构的调查方面。用真核生物 18S rDNA 保守区特异的引物扩增出真核生物的 SSUrDNA,同时进行了 T-RFLP、DGGE 和克隆文库序列分析。T-RFLP 分析获得 18 种 T-RF,是 DGGE 所能检测出的核糖型(ribotype)的 2 倍,并结合克隆文库序列分析,鉴定了样品中的优势种。

2.4 群落结构的比较

对 T-RFLP 的结果作进一步的数据分析,可以比较不同生态系统中微生物群落结构。其中用 Shannon-Wiener 指数(H')计算得到的微生物群落结构的多样性就是一个常用的参数。通过 H' 的比较可以进一步明确各种微生物群落结构的相似性^[7,17]以及同一群落在空间水平^[10,27,28]和垂直^[21]以及随时间^[28]而发生的变化。

Clement 等^[16]用 T-RFLP 技术调查了 3 个不同系统的细菌群落,根据每个群落所产生的 T-RF 清楚地区分了三者。

Bernhard 等^[9]用此技术区分了来自人和奶牛的非点粪便污染源(nonpoint sources of fecal pollution),传统上粪便污染指示菌是大肠菌群,但是检测大肠菌群不能区分不同来源的粪便污染,有学者建议用拟杆菌属(*Bacteroides*)^[29]和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)^[30]的细菌作为污染指示菌。由于它们是专性厌氧菌,在水体中存活时间短,所以不能用培养的方法检测它,需要采用分子生物学手段。Bernhard 等先分别使用这两类菌特异性的引物从人粪和牛粪扩出 16S rDNA 片段,再进行 T-RFLP 分析,发现了人粪和牛粪的峰图上出现各自的特征峰,

作为区分二者的标记。然后再用同样的方法分析受粪便污染的水样,在水样的峰图上出现何种标记,就断定水样被人粪还是牛粪污染,此方法对粪便污染源检测具有实际意义。

3 T-RFLP 技术的缺陷及其应用前景

作为一种技术 T-RFLP 有其自身的缺陷。首先该技术依赖于 PCR 和限制性酶切技术,当近缘种微生物在扩增片段靠近荧光标记端的切点一样时,该技术无法区分出这些近缘种,所以在 T-RFLP 的峰值图上,一个峰代表的有可能不只是一个种。另外,对每个峰的定量只是建立在 PCR 技术的基础上,定量的结果也只是一个相对的含量,不可能真正代表该微生物在某一生态系统中的绝对含量。

样品中的总 DNA 的提取和限制性内切酶的选择是影响分析结果的关键因素^[26]。对于后者,可以分别用几种限制酶进行分析,综合几种酶切的结果可以提高检出效率。这种做法要求几种酶在各自的反应体系中分别进行酶切,而不是进行在同一个反应体系的双酶切,原因是双酶切并不一定比单酶切产生更多的 TRF,甚至可能比单酶切产生的 TRF 片段要少^[31]。

待测片段的长度也会影响结果。这是因为随着片段长度的增加,测序仪检测分辨率降低。测序仪检测 500 bp 以上精度不够^[32]。

尽管还存在一些缺陷,但 T-RFLP 技术仍是目前最好的微生物群落分析工具之一。随着核酸测序技术的发展,数据库中核酸序列的不断丰富,用分子手段进行微生物群落结构分析已成为传统方法不可缺少的补充,而且必将得到更加广泛的应用。T-RFLP 技术也将会在微生物群落结构调查,揭示微生物与环境的关系方面发挥更大作用。

参考文献:

[1] Torsvik V, Goksoyr J, Daae F L. High diversity in DNA of soil bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 782-787.

[2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer H H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143-169.

[3] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. 398.

[4] 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[J]. *海洋科学*, 2002, 26(8): 27-30.

[5] Horz H, Yimga M T, Liesack W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of pmoA,mmoX,mxAf, and 16SrRNA and Ribosomal DNA, including pmoA-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4177-4185.

[6] Marsh T L, Liu W T, Forney L J, et al. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge[J]. *Wat Sci Tech*, 1998, 37(4-5): 455-460.

[7] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16SrRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4516-4522.

[8] Moeseneder M M, Arrieta J M, Muyzer G, et al. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3518-3525.

[9] Hiraishi A, Iwasaki M, Shinjo H. Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(2): 148-156.

[10] Bernhard A E, Field K G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(4): 1587-1594.

[11] Scala D J, Kerkhof L J. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5): 1980-1986.

[12] González J M, Simó R, Massana R, et al. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfonio-propionate-producing north atlantic algal bloom[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4237-4246.

[13] Derakshani M, Lukow T, Liesack W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA

- genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, **67**(2): 623 – 631.
- [14] Horz H P, Rothauwe J H, Lukow T, *et al.* Identification of major subgroups of ammonia – oxidizing bacteria in environmental samples by T – RFLP analysis of *amoA* PCR products, 2000, 39:197 – 204.
- [15] Bruce K. D. Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent – PCR – restriction fragment length polymorphism profiling[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1997, **63**:4 914 – 4 919.
- [16] Clement B G, Kehl L E, DeBord K L, *et al.* Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR – based method for the comparison of complex bacterial communities[J]. **J Microbiol Methods**, 1998, **31**:135 – 142.
- [17] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestern U.S. soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, **66**(7):2 943 – 2 950.
- [18] Osborn A M, Moore E R B, Timmis K N. An evaluation of terminal – restriction fragment length polymorphism (T – RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. **Environ Microbiol**, 2000, **2**: 39 – 50.
- [19] Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M. H, *et al.* Microbial population structures in soil particle size fractions of a long – term fertilizer field experiment[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, **67**(9): 4 215 – 4 224.
- [20] Leser T D, Lindecrona R H, Jensen T, *et al.* Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, **66**(8): 3 290 – 3 296.
- [21] Lüdemann H, Arth I, Liesack W. 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores[J]. **Appl Environ Microbiol**, **66**(2):754 – 762.
- [22] Gong J, Forster R J, Yu H, *et al.* Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen[J]. **Microbiology Letters**, 2002, **208**: 1 – 7.
- [23] van der Maarel M J, Artz R. R, Haanstra R, *et al.* Association of marine *Archaea* with the digestive tracts of two marine fish species[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, **64**:2 894 – 2 898.
- [24] Marsh T L, Saxman P, Cole J, *et al.* Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web – based research tool for microbial community analysis[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, **66**(8):3 616 – 3 620.
- [25] Hiorns W D, Hastings R C, Head I M, *et al.* Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia – oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment[J]. **Microbiology**, 1995, **141**:2 793 – 2 800.
- [26] Marsh T L. Terminal restriction fragment length polymorphism(T – RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 1999, **2**:323 – 327.
- [27] Franklin R B, Garland J L, Bolster C H, *et al.* Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, **67**(2):702 – 712.
- [28] Lukow T, Dunfield P F, Liesack W. Use of the T – RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non – transgenic potato plants [J]. **Microbiology Ecology**, 2000, **32**:241 – 247.
- [29] Fiksdal L, Make J S, LaCroix S J, *et al.* Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1985, **49**:148 – 150.
- [30] Resnick I G, Levin M A. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1981, **42**:433 – 438.
- [31] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities[J]. **Appl Environ Microbiol**, **67**(1),190 – 197.
- [32] Ranjard L, Poly F, Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture – independent molecular techniques: application to soil environment[J]. **Res Microbiol**, 2000, **151**:167 – 177.

(本文编辑 张培新)