

微生物生态学研究方法的新进展

余利岩 姚天爵

(中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要:微生物生态学是研究微生物群体与其周围的生物和非生物环境条件相互作用关系的科学。近些年,在此领域的方法学上有许多新的进展。通过各种荧光染料对微生物进行直接染色或定量 PCR 的方法可进行微生物现存量的研究。测定整个群落的碱基组成和 DNA 的复杂性或者自然环境样品中直接扩增的 16S rDNA 的分析可估计出总的群落的遗传结构及其复杂性。在单个细胞水平上分析微生物群落结构多是采用 FISH(荧光原位杂交)的方法。

关键词:微生物生态学,微生物群体多样性,群落结构

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-089-05

微生物生态学是研究微生物群体与其周围的生物和非生物环境条件相互作用关系的科学,了解微生物群体的多样性是其中的一个重要任务。尽管目前深入研究的原核生物种类已超过四千种,但它远远不能反映出自然生态环境中原核生物的实际多样性。所谓生物多样性,即是指在一个集合群落中,众多不同类型生物的变化及它们之间相对的丰度^[1]。1987年之前,对生态系中微生物群体的多样性及群落结构的分析大多是将微生物进行分离培养,然后通过一般的生物化学的性状,或者特定的表现型来分析。而在遗传上,则只是使用 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)的方法。以上的方法都是局限在从固体平板培养基上分离到的微生物。随着对自然环境中微生物的原始生存状态的研究,越来越发现很难用常规的分​​离培养方法全面地估价其中微生物群体的多样性。荧光染料染色后在荧光显微镜下计数发现,一克土壤或沉积物中可能含有超过 10^{10} 个微生物。但在琼脂平板上能生长的微生物的相对比例只能占到土壤微生物总数的 0.1% ~ 1% 到 10%^[2]。近 10 年来,由于灵敏的荧光染料的开发,以分子生物学为基础的新技术的使用及各

种检测仪器的的发展,使人们对微生物群体多样性有了更科学更直接的认识,本文将主要介绍微生物生态学中微生物群体研究方面的新技术和新进展及其存在的问题和局限性。

1 微生物现存量的测定

1.1 荧光染料染色法 利用各种荧光染料,将细胞内存在的核酸蛋白质染色,而后在荧光显微镜下直接计数。由于该方法简单,直观,现在已得到广泛使用。DNA 特异的荧光染料如 AO(吖啶橙)和 DAPI(4',6-二联脒-2 吡啶苯)是使用最广泛的。现在,DAPI 已经成为计算环境样品中微生物总数的首选荧光染料。但是,由于 AO 和 DAPI 能将所有含 DNA 的细胞全部进行染色,因此二者不能用来测定细胞的原位代谢状态。目前,已开发和利用了一些能够区别活细胞和死细胞的荧光染料,如碘化丙锭、溴化乙锭,和 live/deadBac-light 等。它们是利用与细胞生理活性相关的一些细胞特征,如测定与细胞膜相关的特性或检测特定细胞组分的丰度。在荧光检测的仪器方面,最近也有了很大的进展,高敏感度的冷却及图像解析装置,已逐步广泛用于微生物现存量的分析。

1.2 PCR 测定方法 通过设计一些属或种特异 PCR 引物,用定量 PCR 的方法可检测和定量那些低丰度的不能培养的微生物。目前有两种定量 PCR 的方法可用于微生物群体多样性的研究。①最大可能数 PCR 的方法,这种 PCR 是用于筛选样品中稀释到几乎检测不到的极低浓度靶序列的存在,每个稀释度都需要进行多次重复。②竞争性定量 PCR 的方法,这种方法是在 PCR 反应以前,加入定量的已知序列的 DNA 作为竞争剂,在竞争性定量 PCR 中,竞争性 DNA 和靶 DNA 竞争同一引物和酶,并一起扩增,通过计算竞争性 DNA 最终量和起始量的比例,即可知靶 DNA 起始的量^[3]。前者,即最大可能数 PCR 是相对简单的,因为它不要求构建竞争性 DNA,但由于不同的稀释度和多次重复实验,使得这个方法显得十分繁琐。因此很难进行多个样品的同时分析,而且从本质上讲,这种方法并不精确。而竞争性定量 PCR 则具有这些方面的优势,一旦构建出竞争性 DNA,即可相当简便、快速、精确地分析多个样品。

2 微生物群落结构的分析

2.1 DNA 熔解(解链)及复性分析 通过测定整个群落的碱基组成和 DNA 的复杂性可估计出总的群落遗传结构及其复杂性。分析 DNA 的熔解曲线可以得到碱基组成的 G+C 百分比^[4]。在限定条件下,测定溶液中剪切的或热失活 DNA 的复性动力学可以测定 DNA 序列的复杂性^[5]。在合适的条件(如阴离子浓度、温度、片段长度及浓度)下,DNA 复性速度依赖于同源 DNA 的浓度。单链 DNA 的复性遵循二次动力学反应,其中复性速率 K 和同源 DNA 浓度的平方成正比。对于一个恒定的 DNA 浓度来讲,复性速率是 DNA 多样性的倒数。Britten 和 Dohne 引入了 $Cot_{1/2}$ 这个术语来表示基因组的大小, C_0 表示实验开始时,单链 DNA 中碱基对的原始摩尔浓度, $t_{1/2}$ 表示半数 DNA 复性发生时所需要的时间,它是以秒为单位的($Cot_{1/2} = K^{-1}$)。他们证实从一个种中分离所得到的 DNA,在没有 DNA 重复序列存在时,它的 $Cot_{1/2}$ 值和这个种的基因组的大小成正比。从环境中抽提所得到的 DNA 是各种不同类型微生物 DNA 的混合物,其比例也有着很大的差异。群体 DNA 的复性曲线有一个平缓的坡度,而不是理想的二级反应曲线,当微生物类型的数量和它们之间同源性升高时,总反应将偏离理想的二级动力学。在一些情况下,当这个速率是一些不同的反应常数相互叠加的函数时, $Cot_{1/2}$ 则没有任何精确的意义。但不管怎样,它提供了 DNA 复杂性的资料。目前,已将 $Cot_{1/2}$ 作为多样性的指标,它是测定群落总的遗传复杂性的方法之一,它反映了群落中信息的量以及这些量是如何分布的。

2.2 以 PCR 为基础的 rRNA 及 rDNA 的分析 rDNA 由于具有在细胞中相对稳定,并且同时含

有保守序列及高变序列等优点,十几年来,一直作为微生物系统分类的一个重要指标。现在,人们可不经分离培养微生物,直接从自然环境样品中提取 DNA,用和 16S rDNA 保守区相互补的一套引物扩增出全长的 16S rDNA^[6]。从环境中抽提 DNA 的质量是 PCR 成功与否的一个关键步骤。提取的效率低或者样品中其它物质的干扰,都会使实验结果发生偏差^[7]。因此使用这个方法检测自然环境中的微生物群落时,就在考虑下列问题:①共抽提的污染物对 PCR 扩增的抑制作用;②不同的扩增效率;③人为构造的 PCR 产物的形成;④污染的 DNA;⑤由于核糖核酸操纵子的异源化而引起的 PCR 产物嵌合分子的存在,都将会影响到微生物的多样性的测定。

用直接从环境样品中抽提的 DNA 作为模板,通过 PCR 扩增出的 rDNA 序列是一个异源混合物。在测序和/或杂交之前,必须将这些 16S rDNA 基因分离。将基因克隆到 *E. coli* 中是最广泛使用的一种分离 PCR 扩增产生的长度一致、序列不同的产物的一种方法。目前多使用 pGEM-T 载体的方法将 PCR 产物直接克隆,建立文库^[8]。使用放射性或非放射性标记的通用测序引物和 16S rDNA 内部的引物可进行 16S rDNA 基因的测序^[9]。比较 16S rDNA 基因序列分析所得结果的准确性,在很大程度上依赖于资料库中 16S rDNA 的基因序列的质量。从环境样品中所得到的 16S rDNA 的基因,由于和已知的序列具有较低的相似性,很难估计它们之间的系统进化关系。这样就产生了下列疑问,如是否环境中的序列代表着不能培养的新的微生物;或者,是否由于许多能培养的微生物 16S rDNA 序列质量较低(如公布的序列中有很多模棱两可的碱基)而影响了分析结果,导致不能将环境中的序列划归为已知的种群。目前已公布的可培养微生物以及环境克隆的全长或部分 16S rDNA 及 23S rDNA 序列达 10,000 种左右,但它们只占预测的微生物中很小的一部分。尽管如此,由于 16S rDNA 及 23S rDNA 的序列,每年都以很快的速度补充到 Genbank 中去,这使得微生物工作者能够比较方便地利用这一数据库进行微生物群体多样性的研究。

2.3 其它的分析方法的进展

PCR-RFLP 方法用于分析微生物群落结构时,可将 PCR 的引物中的一条用荧光染料标记,而另一条不标记。PCR 反应后用适当的限制性内切酶酶切,然后进行琼脂糖或者聚丙烯酰胺凝胶电泳分离片段,根据片段的大小不同以及标记片段种类和数量的不同,评价微生物的群落结构及多样性^[10]。

最近,用来检测基因中点突变的变性梯度凝胶电泳法(DGGE)也被用来进行微生物群体多样性的分析^[11]。DNA 双螺旋的部分解离,将会使它在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的移动速度显著下降,而双螺旋部分解离的条件又是由 DNA 碱基序列所决定的。因此即使是大小相同,但序列有差异的 DNA 片段,也可在变性剂(尿素和甲酰胺)梯度凝胶中电泳,根据部分解离的条件不同,在胶中移动度不同而得到分离。这种变性梯度还可通过物理的温度变化而形成,称之为 TGGE。

分子指纹方法,如 RFLP,ARDRA(amplified ribosomal DNA-restriction analysis)等高度敏感的方法,可以在群落水平上提供可信的基因型的信息。这些方法在检测微生物群体中特异种群和估价微生物分离株和基因克隆的多样性时是简单易行的。然而,对复杂微生物群落进行的 DNA 分析,如果直接用这些分辨率过高的方法,得到的信息量将会太大,不利于分析。低分辨率的方法如 DNA 复性,以及敏感的 DGGE 方法,则有利于监测群落水平上的变化。DNA 复性与 DGGE 联合使用,可提供总的多样性及群落结构变化的资料。已证实 DGGE 方法在区别不同种群的最初调查以及数量上占优势群落的鉴定中是尤其有用的,这种方法可允许多个样品快速初筛,由此提供有关群体变化和差异的信息。

3 单个细胞水平上的分析

在单个细胞水平上分析微生物群落结构多是采用 FISH(荧光原位杂交)的方法。在活性细胞中有 10,000 个核糖体,从而含有高浓度的 16S 和 23S rDNA 分子,因此用荧光标记的以 rDNA 为靶点的寡核苷酸探针,可用于原位鉴定单个细胞。根据那些所公布的序列,可以直接设计以 rDNA 为靶点的寡核苷酸探针(化学合成的、单链的、较短的 DNA 分子,通常为 15~25 个核苷酸),这些探针可以定位在不同分类等级如种、属、科、目、纲甚至是门的 rDNA 分子的特征位置。

最近几年,荧光原位杂交领域有着令人惊喜的进展,大大提高了环境中微小的微生物细胞的原位鉴定的灵敏度,Tyramide System Amplification(TSA)和辣根过氧化物酶标记的寡核苷酸联用^[12]能够使荧光强度至少增加一个数量级。用荧光标记的寡核苷酸探针比用生物素标记的核苷酸探针更为简便易行。在水样品中用 Cy3(Carhocyaninedye)标记的寡核苷酸比用 TSA 的方法可检测出更多的细胞。同时,如果用可阻止蛋白质的合成和 RNA 降解的抗生素如氯霉素处理水样品,可以检测出含有较少 16S rDNA 靶点的细胞^[13]。由于新的群特异性探针的发展,目前利用 FISH 的方法,使用一套群特异的寡核苷酸探针可进行单个细胞的快速分类^[14]。这些实验同时也证明 FISH 方法和传统的培养分离不仅是不矛盾的,而且是相互补充的。

Chen 等^[15]指出原位逆转录的方法具有鉴别微生物遗传多样性和活性的潜力,因为某些功能基因在细胞中 mRNA 的含量不高,直接用 FISH 的方法是不可能检出的。为了能分析细胞内特定基因可采用原位 PCR 的方法,即在细胞内进行 PCR,使目的片段扩增,然后用 FISH 法检测这些靶序列,或者在 PCR 时直接掺入标记的核苷酸,从而直接检测。用这种方法可以检测出基因组中单拷贝的基因,但这项技术的质量取决于 rRNA 或 mRNA 在引物特定结合位点上逆转录的起始,以及标记的核苷酸在最终合成的 cDNA 中的掺入。它要求聚合酶大分子能够进入细胞,并且不在非特异性结合的引物或内部引发位点起始转录,以避免产生背景信号,以后的发展将证实这些方法是否能在复杂的环境或临床样品中特定基因和基因产物的原位鉴定上。尽管 FISH 的方法已有很大的进展,但也还存在着一些问题。以后灵敏度的提高、新的探针标记方法及高强度荧光染料の開発,各种检测仪器的更新改进,细胞固定和透过处理方法优化都是必要的。

以过去的群落结构分析为基础,今后将对以功能基因为基础的群落结构进行分析,特别要通过研究功能基因在自然环境中的表达调节,以弄清微生物在环境中的真实的状态。在进行这些微观解析的同时,也应该进一步了解物理的、化学的环境因子,以及高等生物与微生物之间的相互关系。相信,随着各种方法学的进一步完善,我们将会逐渐了解到自然生态环境中微生物群体多样性及实际的生存状态。

参 考 文 献

- [1] talas R M. Diversity of Microbial communities. In: Marshall K C ed. *Advances in Microbial Ecology*. Vol. Plenum. New York, 1984, 1~47.
- [2] Feagi A, Torsvik V L, Goksoyr J. *Soil Biol Biochem*, 1977, 9: 105~112.
- [3] Suuki M T, Giovannoni S J. *Appl Environ. Microbiol.*, 1966, 62: 625~630.
- [4] Ritz K, Griffiths B S, Torsvik V L, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 149: 151~156.
- [5] Britten R J, Kohne D E. *Science*, 1968, 161: 529~540.
- [6] Weisburg W G, Barmas S M, Pelletier D, et al. *J Bacteriol*, 1991, 173: 697~703.
- [7] Leff L G, Dana J R, Shimkets L J, et al. *Appl Environ. Microbiol*, 1995, 61: 1141~1143.
- [8] Bomeman J, Skroch P W, O'Sullivan K M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1935~1943.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory MAnnual*, 2nd ed. Cold spring Harbor, Ny : Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- [10] Nassar A, Darrasse A, Lemaitre M, *et al.* Appl Environ Microbiol. 1996, **62**:2228~35.
- [11] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**:340~346.
- [12] Schonhuber W, Fuchs B, Juretschko S, *et al.* Appl Environ Microbiol. 1997, **63**:3268~3273.
- [13] Ouverney C C, Fuhrman J A. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**:2735~2740.
- [14] Erhart R, Bradford D, Seviour E M, *et al.* Syst Appl Microbiol, 1997, **20**:310~318.
- [15] Chen F, Gonzalez J M, Dustman W A, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, **63**:4907~4913.