

# 微生物分子生态技术：16S rRNA/DNA 方法

张 彤 方汉平

(香港大学土木工程系环境工程中心环境生物技术实验室 香港)

**摘要:** 综述了以 16S rRNA/DNA 为基础的分子生物学技术在环境微生物种群分析中的应用, 目的是使相关的科研人员能够对 16S rRNA/DNA 技术有一个比较完整的了解, 并可以开展初步的实验工作。主要内容包括: DNA 指纹技术、16S rDNA 文库的建立、DNA 测序及微生物分类鉴定(即系统发育树分析)、基因探针设计和测试、荧光原位杂交和核酸印迹杂交等。

**关键词:** 16S rRNA/DNA, DNA 指纹技术, 系统发育树, 荧光原位杂交, 核酸印迹杂交

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0097-05

对环境中微生物种群的类型和数量进行及时和准确的分析测定在微生物生态研究中十分重要, 传统的微生物分析测定方法, 包括显微镜微生物形态观察、选择性培养基计数、纯种分离和生理生化鉴定等, 在环境样品研究中都存在一定的缺陷。近年来, 人们运用微生物生物化学分类的一些生物标记, 包括呼吸链泛醌、脂肪酸和核酸, 来进行环境样品中的微生物种群分析。其中, 以 16S rRNA/DNA 为基础的分子生物学技术已成为普遍接受的方法<sup>[1,2]</sup>, 该技术主要利用不同微生物在 16S 核糖体 RNA (rRNA) 及其基因 (rDNA) 序列上的差异来进行微生物种类的鉴定和定量分析。本文主要介绍 16S rRNA/DNA 分子生物技术的基本方法(见图 1), 目的是使相关的科研人员能够对 16S rRNA/DNA 技术有一个比较完整的了解, 并可以开展初步的实验工作。

## 1 核酸提取与 PCR 扩增

核酸提取是整个 16S rRNA/DNA 技术的基础, 能否获得具有代表性的核酸样品将决定后续分析的可信性。核酸提取过程包括细胞破碎、杂质去除、溶剂萃取、沉淀分离和核酸纯化。用于破碎微生物细胞的方法有多种, 物理方法包括玻璃珠匀浆<sup>[3]</sup>, 超声波震荡<sup>[4]</sup>, 反复速冻-融化<sup>[5]</sup>, 匀浆器研磨<sup>[6]</sup>等。化学方法主要是采用表面活性剂和溶菌酶, 或两者并用。这些方法的破碎效率取决于许多因素, 如细胞壁结构、细胞大小、DNA 的分子量等。一般来说, 有芽胞、革兰氏阳性、个体小的细菌比无芽胞、革兰氏阴性、个体大的细菌难破碎; 比较温和的提取方法, 如反复速冻-融化和化学溶菌, 由于核酸提取不完全, 容易低估样品的微生物多样性; 而比较剧烈的提取方法, 如强

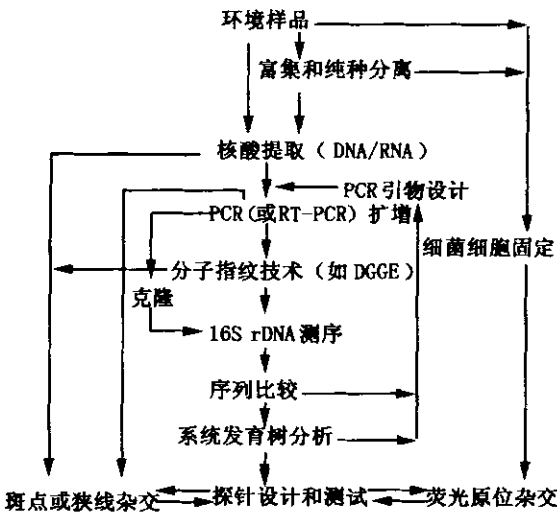


图1 以16S rDNA/RNA为基础的微生物分子生态技术

烈的玻璃珠匀浆和超声波震荡，则容易将基因组DNA剪切成过小的片段。正因为核酸提取的影响因素这样复杂，研究人员通常需要根据具体的环境样品对基本提取方法进行修改和优化。

环境样品中提取到的DNA量通常较低，为了获得能够用于后续分析的大量DNA，提取纯化后的16S rDNA需要进行多聚酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增。不同PCR反应中最为特异性的是引物对，目前已经有适用于不同分类单元的许多引物可用于16S rDNA特异性PCR扩增中。如果需从rRNA反转录出相应的DNA片段，则需要进行反转录PCR(RT-PCR)。

## 2 微生物多样性与DNA指纹技术

环境样品中的微生物DNA提取物通常是不同微生物的DNA混合物，经过PCR后，其产物是序列等长但不同源DNA片段的混合物。混合物中序列的多样性和不同序列的丰度在一定程度上反映了原始样品中微生物种群的多样性和不同物种的丰度。如果可以将这些序列等长但不同源DNA片段分离开，则可对样品中微生物群落的组成进行初步的分析。经过多年的研究，现在已经有多种DNA指纹技术，又称为多态性分析，可以用于上述DNA片段的分离，它们包括如变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)<sup>[1,7]</sup>，温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)<sup>[8]</sup>，单链构象多态性分析(Single Strain Conformation Polymorphism, SSCP)<sup>[9]</sup>，限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)<sup>[10]</sup>，末端限制性片段长度多态性分析(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)<sup>[10]</sup>等。

DGGE的原理是：在碱基序列上存在差异的不同DNA双链解链时需要不同的变性剂浓度，DNA双链一旦解链，其在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度将会急剧下降；因此，将PCR扩增得到的等长的DNA片段加入到含有变性剂梯度的凝胶中进行电泳，序列不同的DNA片段就会在各自相应的变性剂浓度下变性，发生空间构型的变化，导致电泳速度的急剧下降，以至停留在其相应的不同变性剂梯度位置，染色后可以在凝胶上呈现为分开的条带。每个条带代表一个特定序列的DNA片段。在不同泳道中停留在相同位置的条带，一般可视为具有相同的DNA序列。

为取得好的分离效果，通常在DNA片段上连接一段长度为30~50碱基富含GC的核苷酸序列，该序列被称为GC夹板(GC-clamp)，这样甚至可以分辨相差一个碱基的序列。DGGE技术快速简便、分离效果好，已经被广泛用于研究各种环境样品中的微生物，例如生物膜<sup>[11]</sup>、活性污泥<sup>[12]</sup>、土壤<sup>[13]</sup>、底泥<sup>[14]</sup>等。

尽管DGGE凝胶上的条带可以在回收后用于测序，以便进行更详尽的微生物分类分析，但研究者一般仅利用DGGE等技术进行微生物群落的初步分析，而用建立细菌

16S rDNA 文库的方法进行更为深入的分析。

### 3 16S rDNA 文库

目前,有多种试剂盒可以用于细菌 16S rDNA 文库的建立,如 pGEM-T 克隆试剂盒<sup>[15]</sup>和 TA 克隆试剂盒<sup>[11,12]</sup>。建立文库之后的工作是获取质粒中的 16S rDNA 序列,通常采用全细胞 PCR 扩增<sup>[17]</sup>或质粒提取方法<sup>[11,12]</sup>。全细胞 PCR 扩增是利用先前进行 PCR 扩增的引物对,或是靶位点位于“PCR 插入”两端的质粒上的引物对,直接挑取克隆单菌落中的细胞作为模板进行 PCR 反应,从而扩增并回收出质粒中插入的 16S rDNA 片段。质粒提取与全细胞 PCR 扩增相比,工作量较大,但提取到的质粒质量较好,一般不需进一步纯化就可以直接用于 DNA 测序,而全细胞 PCR 扩增得到的 PCR 产物通常需要纯化后才能用于测序。

为了使回收的序列具有代表性,通常需要选取至少 100 个左右的单菌落进行序列回收<sup>[11,17]</sup>。回收的序列最好全部进行测序,以便进行后续微生物分类分析。但有时限于测序费用,不能将回收的全部序列测序,则需要先进行筛选,剔除重复序列,仅将代表性的、丰度较大的序列测序。序列筛选一般采用前面提到的 DNA 指纹技术,例如 DGGE, RFLP, SSCP 等。

### 4 DNA 测序及微生物分类鉴定

对微生物 16S rDNA 进行测序时最好进行全长测序,尤其是所测序列将要用于探针设计和新物种确定时。另外,采用正反向引物对所测序列进行重复验证可以确保序列的准确性。但由于目前测序费用还比较高昂,因此许多研究者也采用测 16S rDNA 部分序列的方法进行微生物多样性分析和平行样品比较。研究表明,400~600 碱基的序列足以对环境中微生物的多样性和种群分类进行初步的估计<sup>[17]</sup>,但这样短的序列通常不能用于新物种鉴定和探针设计。

有了微生物 16S rDNA 序列,不论是全长还是部分,都可以提交到 GenBank 采用 BLAST 程序与已知序列进行相似性分析。Gen Bank 将按照与测得序列的相似性高低列出已知序列名单、相似性程度以及这些序列相对应的微生物种类,但更为精确的微生物分类还取决于系统发育分析 (phylogenetic analysis)。

系统发育分析,就是根据能反映微生物亲缘关系的生物大分子(如 16S rDNA、ATP 酶基因)的序列同源性,计算不同物种之间的遗传距离,然后采用聚类分析等方法,将微生物进行分类,并将结果用系统发育树 (phylogenetic tree) 表示。计算菌属、菌种之间的遗传距离可以采用不同方法,如 Jukes-Cantor 方法。在计算遗传距离之后,构建进化树时有许多种方法,其中以 Neighbor Join 法最为常用。在进行系统发育树分析时常用到的一些软件包括 MEGA 2.1<sup>[18]</sup>和 ARB<sup>[19]</sup>。

### 5 基因探针设计及测试

虽然上述从核酸提取到 PCR、克隆、测序和系统发育分析的技术路线,可以给出详细的微生物种群分析结果,但费时费力,不能对目标种群进行原位和实时的检测,而且由于核酸提取和 PCR 过程中存在的偏差,上述实验结果也有可能存在错误。因此还需要根据测序和系统发育分析的结果进行 DNA 探针设计,将其施用于原系统,以验

证测序分析的结果。

所谓基因探针是一段特异性的 DNA 单链，通常长度为 15 到 30 个碱基，并可根据碱基互补的原理与待测样品中的互补序列在特定条件下结合（称为杂交），杂交前这段序列被标记上一些可检测的物质（如放射性同位素、荧光染料、或催化特异性反应的酶），然后就可利用与目标基因结合的基因探针上的放射性信号或荧光信号识别样品中的目标核酸，如 16S rRNA。

利用 ARB 软件可以十分方便地进行针对 16S rRNA 的基因探针设计，但仍然需要研究者根据一些基本规律和经验确定究竟选择哪一段序列作为探针。最基本的原则是要兼顾特异性、敏感性、是否易到达靶位点以及靶位点的开放性。一般来说，探针序列越短，越容易到达靶位点并与之结合，但短的序列特异性较差。

选取探针序列后，通常需要用阳性和阴性参照菌对探针的特异性和使用条件进行测试。阳性参照菌应含有与探针序列完全匹配的 16S rRNA，阴性参照菌应含有与探针序列存在一个或两个碱基差异的 16S rRNA。根据在一系列不同杂交条件下（盐浓度、温度、甲酰胺浓度）阳性和阴性参照菌的杂交结果，选择阳性菌给出阳性结果同时阴性菌给出阴性结果的杂交条件作为探针的特异性使用条件。如果找不到阳性菌，通常需要用进行更为复杂的测试。

鉴于 16S rRNA 探针的日益增多，一些研究者提议对探针的命名进行标准化，同时建立有关探针的数据库<sup>[20]</sup>。

## 6 荧光原位杂交

荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH）是将基因探针用荧光染料标记，再使之与固定在载玻片上的微生物样品杂交，将未杂交的荧光探针洗去后用普通荧光显微镜或是共聚焦激光扫描显微镜进行观察和摄像。采用这一技术可以同时对不同类群的细菌在细胞水平上进行原位的定性定量分析和空间位置标示<sup>[2]</sup>。

尽管实验操作过程相对简单，但影响 FISH 分析结果的因素极其复杂。首先是样品的固定，理想的固定应是最大限度地保存细菌内的 RNA，使细菌细胞壁具有良好的通透性，同时保持细胞形态的完整。目前使用的化学固定剂有沉淀固定剂（如甲醇、乙醇和丙酮等）和交联固定剂（如甲醛和多聚甲醛等），两类固定剂可以单独使用或混合使用。对大多数革兰氏阴性细菌来说，3%~4% 的交联固定剂就足够了，但对革兰氏阳性细菌，需要使用 50% 乙醇等其他处理手段。其他影响因素还包括细菌细胞壁渗透性的差异、细菌 16S rRNA 含量的多少，细菌自发荧光的干扰、杂交位点在 16S rRNA 的二级和三级空间结构上的位置等等。

## 7 核酸印迹杂交

核酸印迹杂交（Blot hybridization）是从核酸混合液中检测特定核酸分子的传统方法。其原理是，双链的核酸分子在某些理化因素作用下解开双链，而在条件恢复后又可依碱基配对规律与探针形成双链结构。根据检测样品的不同又被分为 DNA 印迹杂交和 RNA 印迹杂交。在 16S rDNA/RNA 技术中最常用到的是 RNA 印迹杂交。

RNA 印迹杂交可以用来定量测得特定微生物种群 16S rRNA 在总 rRNA 中的比例。首先将从环境样品中抽提纯化的 rRNA 固定和支持膜上，然后用带有荧光标记、酶或是

放射性同位素标记的探针进行杂交。用放射性同位素标记的探针需要用放射自显影来检测其在膜上的信号；而如果是用生物素等非同位素方法标记的探针则需要用相应的免疫组织化学的方法进行检测。检测出的标记物的量可以用来表示与探针结合的靶 rRNA 的量，特定微生物 rRNA 的相对量可以用其探针信号与普通探针信号的比值表示，并由此得到目标微生物在样品中的丰度。

尽管 rRNA 的相对量可以代表相应种群的相对生理活性，但并不能直接转换为细胞数的相对量，因为不同细菌的细胞中 rRNA 的含量可以有很大差异，从每个细胞含  $10^3$  到  $10^5$  个 rRNA 分子不等。即使是同一菌株，细胞内 rRNA 含量也会随细胞所处的生长期的不同而变化，至少可以相差一个数量级。

核酸印迹杂交技术的集成化正在使分子生物学技术发生着一场革命，这就是基因芯片技术。基因芯片；又称 DNA 芯片或 DNA 阵列 (DNA array)，是成千上万的网格状密集排列的基因探针。这样就可以通过已知碱基顺序的 DNA 片段，来结合被标记的具有碱基互补序列的 DNA 或 RNA，从而确定其相应的类别，并由此推断环境样品中微生物的类群。尽管目前针对 16S rRNA 的基因芯片还处在基础研究阶段<sup>[21]</sup>，但随着 16S rRNA/DNA 技术的广泛应用，这类产品的市场化是必然的趋势。

上述以 16S rDNA/RNA 为基础的分子生物学技术正日益成为微生物种群分析的重要手段，但在应用这些技术时必须清楚地认识到它们存在的局限性和偏差，例如核酸提取的效率和 PCR 中的问题等，在对分析结果进行解释和推论时需要充分考虑这些因素。另外，16S rDNA/RNA 为基础的分子生物学技术并不能替代其他的微生物生态技术，如纯种分离、电镜镜检、脂肪酸测定、生理生化检定等，只能是与其他技术互为补充。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang T, Fang H H P. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 399 ~ 405.
- [2] Wagner M, Amann R, Lemmer H, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1520 ~ 1525.
- [3] Bruce K D, Hiron W D, Hobman J L, *et al.* *Appl Environ Microbiol* 1992, **58**: 3413 ~ 3416.
- [4] Picard C, Ponsornet C, Paget E, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2717 ~ 2722.
- [5] Erb R W, Wagner-Döbler I. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 4065 ~ 4073.
- [6] Voloskiouk T, Robb E J, Nazar R N. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 3972 ~ 3976.
- [7] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 2676 ~ 2680.
- [8] Andreas F, Arthur W, Robert L, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **30**: 137 ~ 145.
- [9] James E M, Stach, S B, Justin P C, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **36**: 139 ~ 151.
- [10] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4516 ~ 4522.
- [11] Zhang T, Fang H H P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 437 ~ 440.
- [12] Fang H H P, Zhang T, Liu Y. *Wat Res*, 2002, **36**: 3211 ~ 3218.
- [13] Maarit N R, Heiskanen I, Wallenius K, *et al.* *J Microbiol Met.* 2001, **45**: 155 ~ 165.
- [14] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 340 ~ 346.
- [15] Darby A C, Birkle L M, Turner S L, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **36**: 43 ~ 50.
- [16] Gillian C, Baker S G, Don A C, *et al.* *FEMS Microbiol Let*, 2001, **200**: 103 ~ 109.
- [17] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Syutsubo K, *et al.* *Microbiol*, 1998, **144**: 2655 ~ 2665.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolution genetics analysis, version 10, Pennsylvania State University, Philadelphia, 1993.
- [19] Strunk O, Ludwig W. ARB software program package, 1997.
- [20] Alm E W, Oerther D B, Larsen N, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3557 ~ 3559.
- [21] Guschin D Y, Mobarry B K, Proudnikov D, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 2397 ~ 2402.