

综合应用 ITS 及 16S rDNA 进行环境微生物生态研究*

田扬捷 杨虹** 吴秀娟 李道棠

(上海交通大学生命科学与技术学院 上海 200240)

摘要: 提出并介绍一种研究微生物生态的新方法。该方法将克隆测序和 RISA 图谱技术有机结合。其技术关键是: PCR 扩增的目标片段包含全长 ITS 和部分 16S rDNA 片段, 既可利用 16S rDNA 进行系统发育分析, 又可测定 ITS 片段大小并与 RISA 图谱进行比对定位。分析过程简单经济, 易于操作, 普通分子生物实验室即可实现。

关键词: 微生物生态, 16S rDNA, RISA, 克隆, ITS

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0085-04

Application of Its and 16S Ribosomal DNA to Environmental Microbial Ecology

TIAN Yang-Jie YANG Hong** WU Xiu-Juan LI Dao-Tang

(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract: A new method was developed for the investigation of microbial ecology, which used the cloning/sequencing technique combined with RISA profiling. The method is effective, cheap and easy to use, which can be performed in most of the molecular biological laboratories.

Key words: Microbial ecology, 16S rDNA, RISA, Clone, ITS

环境微生物研究大多集中于其生化过程, 进行该过程的主体—微生物本身却常被忽略。了解微生物群落不同时空及环境污染梯度下的变化及种群变迁是现代微生物生态学研究的一项重要任务。

分子生物技术的发展使揭示微生物群落结构的手段日益丰富, 主要包括克隆测序和图谱概览 (profiling) 分析技术。克隆测序多以 16S rDNA 为对象, 测其碱基序列并与 GenBank 等数据库比对, 应用生物学软件分析可获得系统发育学信息。克隆测序一般比较费时且价格昂贵, 难以大规模应用。图谱概览分析则用于快速评估微生物多样性及不同环境的微生物群落变化^[1], 包括 SSCP、TGGE/DGGE 及 RISA 等技术。其中 RISA (ribosomal intergenic spacer analysis, 核糖体基因间隔序列分析) 以 ITS (16S ~ 23S rDNA intergenic transcribed sequences, 核糖体大小亚基基因间隔序列) 为研究对象, 该片段比 16S 和 23S rDNA 表现出更显著的序列尤其是长度特异性, 对微生物的 ITS 混合物进行电泳可产生群落特异性长度多态性图谱即 RISA 图谱。

本文综合应用 16S rDNA 克隆测序和 RISA 图谱技术设计并提出了一种新的分析方法, 可用于环境微生物生态学研究。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20377030)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20377030)

** 联系人 Tel: 021-54743342, E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2003-10-13, 修回日期: 2003-12-01

1 分析过程

1.1 分析流程

该方法的分析流程框图见图 1。

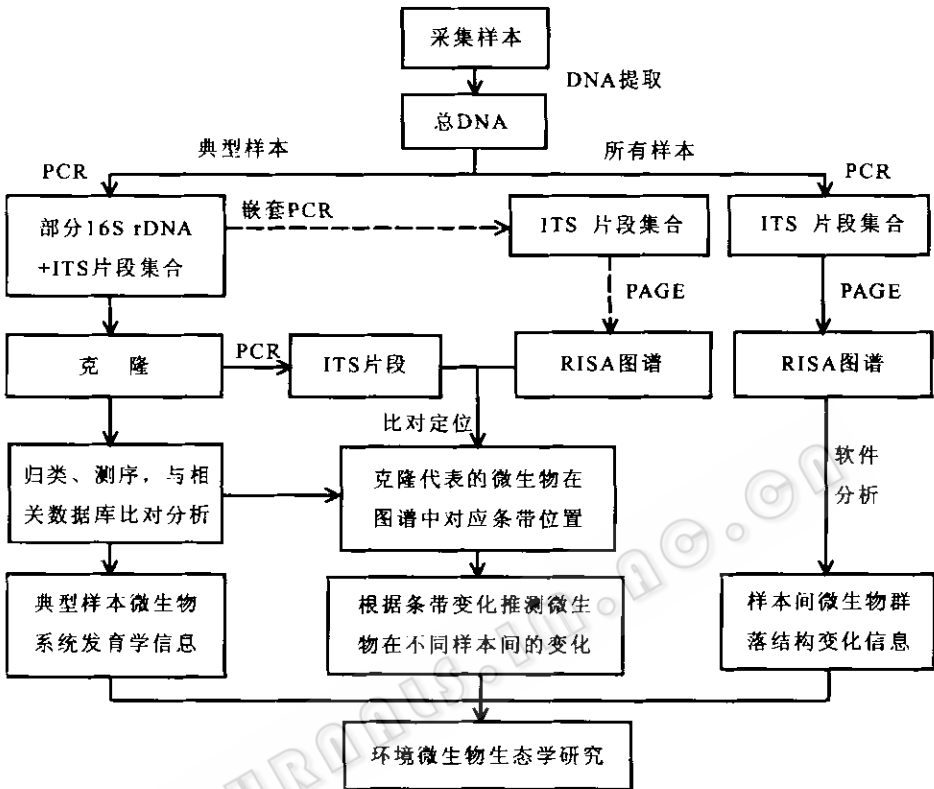


图 1 分析流程图

虚线步骤可省略, 用直接 PCR 产生的 RISA 图谱替代

1.2 分析内容

如图 1 所示, 该方法首先需在相关环境中采集不同环境污染梯度或时空分布的样本并提取各样本总 DNA。后继分析含 3 方面内容。

1.2.1 典型样本的克隆测序: 根据同步测定的理化污染指标或其它特征, 选择具典型意义的样本, 采用引物 S926f/L189r 进行 PCR 扩增^[2]。其靶片段不仅含全长 ITS, 而且还包括侧翼 16S rDNA (约 600 bp) 及 23S rDNA (约 190 bp)。建立克隆文库, 所有克隆进行 RFLP 归类分析后挑选代表性克隆, 对其插入片段所含 16S rDNA 测序。测得序列与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 可确定系统发育学地位, 并以从系统发育学角度与之最相近的已知菌为参考, 推测克隆所代表的微生物生理生化特征。这一分析过程不仅可揭示典型样本中的优势微生物及其组成比例, 还可运用生物学软件绘制系统发育树, 描述群落中微生物间的系统发育关系。

1.2.2 RISA 图谱概览分析: 为了比较样本间的微生物群落结构变化, 应用 ITS 引物 1406f/23Sr^[3] 对所有样品进行 PCR 扩增, 产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 可产生群落特异性图谱。这些由若干不同位置和亮度的条带组成的图谱反映了不同的

微生物群落结构。运用图谱分析软件如: Bionumerics 1.1、Gelcompar 4.0 或 Diversity Database 2.2.0 (BIO-RAD), 进行群落相似度聚类分析或多样性评估, 可获得微生物群落结构变化及其它有用信息。

1.2.3 建立已测序克隆与 RISA 图谱条带的联系: 对典型样品克隆文库中的已测序克隆用引物 1406f/23Sr 进行 ITS PCR 扩增, 并电泳检测其 ITS 片段的大小。将已测序克隆所含 ITS 片段大小与对应样本的 RISA 图谱进行比对, 可建立克隆与 RISA 图谱条带之间的联系。观察条带在不同样本 RISA 图谱间的变化, 即可推测克隆所代表的微生物在不同样本中的存在情况。该分析可以充分利用已测序克隆的微生物系统发育学信息。

1.3 PCR 引物及体系条件

为便于新方法的推广, 现将分析过程中采用的引物序列及 PCR 体系和温控条件推荐如下: (1) 引物: S926f: 5'-CT (C/T) AAA (G/T) GA ATT GAC GG-3' 和 L189r: 5'-TAC TGA GAT G (C/T) TT (A/C) A (G/A) TT C-3'; 1406f: 5'-TG (C/T) ACA CAC CGC CCG T-3' 和 23Sr: 5'-GGG TT (G/C/T) CCC CAT TC (A/G) G-3'。(2) PCR 体系及温控程序: 采用 50 μ L PCR 体系, 含 2 mmol/L Mg^{2+} 、200 μ mol/L dNTPs (each)、0.2 μ mol/L 引物 (each)、200 ng 模板 DNA、2.5 U *Taq* 酶。酶的投加采用热启动方式即 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后于 80 $^{\circ}$ C 加 *Taq* 酶。温度循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 47 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

2 分析方法的特点和讨论

因为引物 S926f/L189r 产生的 PCR 产物也含全长 ITS 片段, 具有长度多态性, 为进一步简化分析方法, 我们曾尝试直接采用 S926f/L189r 产生 RISA 图谱。但试验发现, 由于以 S926f/L189r 为引物 PCR 产物的片段大小在 950 ~ 2,290 bp 之间, 超出了普通 PAGE 的分离范围, 即使用 3.5% 的 PAGE 也很难有效分离。

每个文库中所有克隆的外源插入片段来自样本总 DNA 以 S926f/L189r 为引物产生的 PCR 混合物, 对该混合物用引物 1406f/23Sr 进行 ITS PCR 扩增 (嵌套-PCR), 产物进行 PAGE 可产生由所有 ITS 条带组成的 RISA 图谱。笔者多次试验发现, 嵌套 PCR 与直接 PCR 产生的 RISA 图谱相似度 > 90%, 因此可以将嵌套 PCR 的步骤省略 (图 1 虚线部分), 而用直接 PCR 产生的图谱替代。

应用 RISA 图谱可分析环境样本间的微生物群落结构变化, 通过克隆测序可详细了解典型样本的微生物信息。本方法采用的引物 S926f/L189r 其扩增片段不仅含全长 ITS 而且包括侧翼 16S rDNA (约 600 bp), 扩增的 DNA 片段包含来自 ITS 的长度信息和 16S rDNA 序列的微生物系统发育信息。以该 DNA 片段为纽带, 可以建立微生物与图谱条带间的联系。观察条带在图谱间的变化, 可粗略推测这些微生物在不同环境中的存在情况。

当前, 克隆测序结合 TGGE/DGGE 图谱进行分析^[4,5]已经较多地应用于微生物生态研究。与之相比, 本文提出的克隆测序结合 RISA 图谱分析方法有以下优点: (1) 简单经济。只需使用 PAGE 就可产生 RISA 图谱。PAGE 属于普通分子生物学实验室的标准装备, 国内早已生产, 价格非常便宜。而 SSCP、TGGE/DGGE 图谱则需专门的设备, 依赖进口, 价格昂贵。(2) 易操作。TGGE/DGGE 的实验条件较难控制, 变性凝胶的制备和温控程序均需要长时间的摸索才能找到最适条件, 而且待分离的 PCR 产物必须用带有

“GC 夹”的特殊引物来扩增。本方法所采用的 PCR 引物均为普通引物,只要熟练掌握 PAGE 的基本实验技巧就可获得理想的实验效果。

同时,该方法的一些不足之处也是不能忽视的。如普通 PAGE 只能分离大小相差十几个 bp 的 DNA 片段,对于差别小到几个甚至一个 bp 的 DNA 片段则很难分辨。因此该方法在精度上受到一定限制。

新方法主要依靠 ITS 的长度多态性来分辨不同微生物群落, TGGE/DGGE 则是基于 16S rRNA 高变区(如 V3 区)的碱基序列不同,这两种方法具有一定的互补性。

3 展望

综上所述,尽管本文提出的新方法存在某些缺点,但多方面的优点也是显而易见的。该方法曾用于上海老港垃圾填埋场地下水微生物生态研究(国家自然科学基金: No.20377030),并取得较好的效果。预期在以后的环境微生物生态学研究中,该方法还会得到进一步完善和广泛使用。

参考文献

- [1] 田扬捷, 杨虹, 李道棠, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (4): 32 ~ 35.
- [2] Yu Z, Mohn W W. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (4): 1565 ~ 1574.
- [3] Fisher M M, Triplett E W. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (10): 4630 ~ 4636.
- [4] Røling W F M, Breukelen B M, Braster M, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (10): 4919 ~ 4929.
- [5] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (10): 5142 ~ 5150.