

微生物生态学一种新研究方法-T-RFLP 技术

王洪媛* 江晓路 管华诗 牟海津

(中国海洋大学海洋药物与食品研究所 青岛 266003)

摘要: T-RFLP 是建立在 PCR 基础之上一种新的微生物生态学研究方法。该方法克服了传统微生物培养方法的限制、应用快速、灵敏度高且输出定量的数据结果, 被广泛应用到菌种鉴定、群落对比分析、群落中系统发育种群多样性的评估等领域。目前我国仍没有关于此方法应用的相关报道, 但作为一种研究微生物群落特征的理想方法, T-RFLP 已经越来越受到相关研究人员的重视。该文主要介绍了该方法的基本原理、阐述了该方法的关键技术及其应用发展现状。

关键词: T-RFLP, 分子生物学技术, 微生物多样性

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0090-05

An Emerging Method for Characterizing Microbial Ecology-T-Rflp Technique

WANG Hong-Yuan* JIANG Xiao-Lu GUAN Hua-Shi MU Hai-Jin

(Marine Drug and Food Institute, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract: Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) is a recent molecular approach that can assess subtle genetic differences between strains as well as provide insight into the structure and function of microbial communities. This method overcomes the confinement of conventional culture-dependent methods and has both high sensitivity and throughput making it ideal for comparative analyses. Though there is still no application in our country, more and more investigators are highlighting it. In this article, the fundamental principle of this technique is introduced. The recent application and the development of this technique are also summed up.

Key words: T-RFLP, Molecular approach, Biodiversity.

末端限制性片段长度多态性 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP), 又称为 16S rRNA 基因的末端限制性片段 (Terminal Restriction Fragment TRF) 分析技术, 具有非常广阔的应用前景。该技术建立在 PCR 的基础之上, 已被成功的应用到了菌种鉴定、微生物群落的对比分析、微生物群落多样性及结构特征等领域。

1 T-RFLP 的基本原理

根据 16S rRNA 基因的保守区设计通用引物, 其中一个引物的 5' 端用荧光物质标记, 常用的荧光物质有 HEX、TET、6-FAM 等。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 产物用合适的限制性内切酶消化, 一般选用酶切位点为 4bp 的限制性内切酶。由于在不同细菌的扩增片段内存在核苷酸序列的差异, 酶切位点就会存在差异, 酶切后就会产生许多不同长度的限制性片段。消化产物用自动测序仪 (选用 genescan 功能) 进行检测, 只有末端带荧光标记的片段能被检测到, 而其它没有带荧光标记的片段则检测不到。这些

* 联系人 E-mail: why-wanghongyuan@163.net

收稿日期: 2004-03-31, 修回日期: 2004-06-06

末端标记的片段就可以反映微生物群落组成情况,因为不同长度的末端限制性片段必然代表不同的细菌,也就是说一种末端限制性片段至少代表一种细菌。具体过程如图1所示。

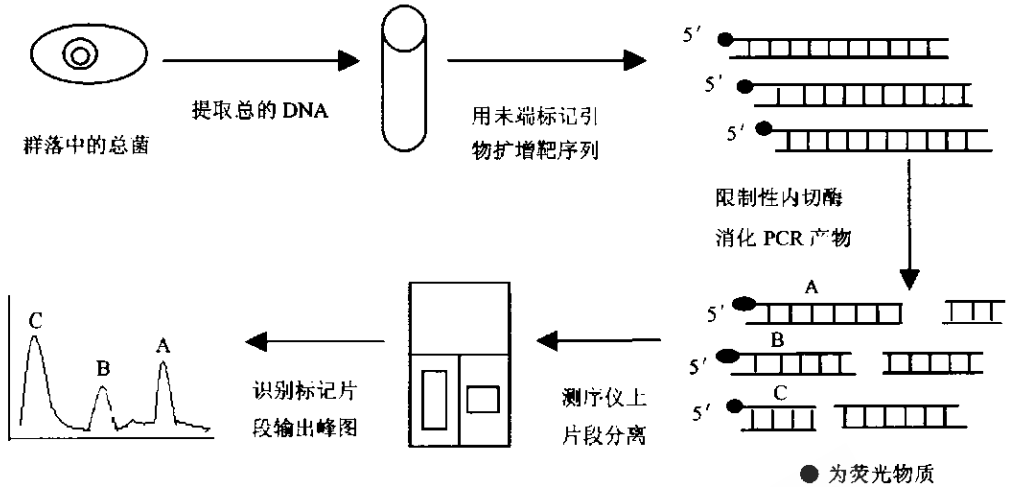


图1 末端限制性片段技术基本过程

末端限制性片段技术不但可以进行微生物种类的定性分析,还可以进行定量分析。在基因扫描的图谱上,每个峰的峰面积占总面积的百分数就代表了这个末端限制性片段的相对数量,即对应的限制性片段峰面积大,就说明末端限制性片段的相对数量大。但是仅对末端限制性片段而言,并不能说明这种末端限制性片段所代表的细菌的数量也一定大,这是因为细菌基因组上的16S rRNA基因是以多拷贝的形式存在,而且拷贝数也不尽相同(一般不超过10个拷贝)^[1]。尽管末端限制性片段是建立在PCR基础上,但是它的重复性好,平行样得到的峰也是几乎完全一样的,因此用它来进行定性和定量分析是可靠的^[2]。

2 实验影响因素

2.1 引物

为进行不同环境微生物群落的对比分析和微生物的多样性分析,在PCR过程中应该获得尽量多的基因序列,这主要是由所选择的引物的特异性决定。因此在进行引物的选择时,要考虑到引物的特异性。引物的特异性主要由以下几个因素决定:①上下游引物序列特异性;②每个引物的退火特异性;③上下游引物之间的序列长度。对微生物群落进行T-RFLP分析,可以先利用模型匹配程序,Pat Scan软件,模拟计算引物的特异性,这个程序还可以预测末端限制性片段长度。

选择引物不同,最终获得的T-RFLP图谱就会产生很大的差异,因为一对引物只能扩增一部分微生物的16S rDNA序列,只有选择特异性强的引物才能获得尽量多的唯一的末端片段长度。例如,若是所研究的天然微生物群落主要以细菌为主,那么采用细菌16S rRNA特异性扩增的引物,就能获得较完全的图谱。因为在大约1,500个细菌16S rRNA序列中能与46f杂交的占90%,能与536r杂交的占99%,因此以46f和536r作为引物,获得了较完全的T-RFLP图谱^[3]。对于以真菌为主的活性污泥,利用真菌特异性引物^[4]进行扩增研究微生物群落多样性,其结果比利用细菌特异性引物^[5]得到的结果更

接近于直接分析其中 rDNA 序列获得的多样性分析结果。也就是说, 由于活性污泥中的微生物群落多为真菌, 那么采用真菌特异性引物获得的结果要更贴近于真实情况。Tankai^[6]等分别采用了 T-RFLP 技术和 rDNA 克隆文库序列分析的方法研究南非金矿的矿下深水中古细菌群落的结构特征及不同生态环境下古细菌的系统发育状况。比较实验结果表明, 利用古细菌特异性引物进行 PCR 扩增后进行限制性酶消化, 最终获得的 T-RFLP 图谱分析结果与古细菌的 rDNA 克隆文库序列分析结果相一致。需要强调的是合适的引物对, 不仅要能够引导合成尽量多的 16S rDNA 序列, 还要考虑到合成的 PCR 产物具有合适的序列长度, 以获得尽量多的唯一末端片段。如, 341f-926r 引物对, 理论上能退火合成 RDP 数据库中 84.5% 的 16S rRNA 序列, 但由于生成的 PCR 产物的长度相对较短, 因此消化后获得唯一的末端片段很少^[7]。

2.2 限制性内切酶

对不同环境微生物群落进行对比分析和多样性分析, 要获得较完全的 T-RFLP 图谱, 即获得尽量多的唯一的末端限制性片段, 不仅要在 PCR 过程中获得尽量多和长的基因序列, 还要考虑到限制性内切酶的因素。选择合适的限制性内切酶会得到能良好反应真实环境微生物群落结构的结果。Marsh^[8]等对 RDP (Ribosomal Database Project) 内所有的完整核酸序列用不同的限制性内切酶进行消化, 得到了末端片段大小的频率分布图。从 *Hha*I 消化获得的频率分布图 (如图 2a) 得知从 1,195 个序列中得到了 340 个不同的片段大小, 因此仅根据末端限制性片段的大小, 就可以分辨出很大一部分数据库序列 (分辨率为 28.5%)。其中六个最保守的位置仅占数据库中所有序列的 15%。但从这里我们也可以获得这样一个结论, 就是不能仅从一个限制性酶消化的末端片段中获得完整的系统发育图谱。用 *Cvi*J 对整个数据库的序列进行消化, 从 1,199 个序列中获得了 154 个不同的片段大小, 6 个最保守的位置占数据库中整个序列的 56% (如图 2b, 横坐标表示末端片段大小, 纵坐标表示在数据库中的频率)。可以看出, 相比之下 *Hha*I 能更好的表述微生物多样性。因此为了获得可靠的实验结果, 在选择限制性内切酶时, 要考虑到限制性内切酶的酶切位点在核酸序列中所处的位置, 尽量避免使用酶切位点处在序列保守区的限制性内切酶。

一般来说, 所选择的限制性内切酶的酶切位点都为 4bp, 而且通常选择两种限制性内切酶进行消化。研究表明^[7], 依次对 PCR 产物消化获得的 T-RFLP 图谱能更好的解释微生物群落结构特征及其种群多样性。

为提高 T-RFLP 进行群落分析的效率, 了解限制性位点在 16S rDNA 中的分布和末端限制性片段大小与基因型 (phylogeny) 的关系是十分必要的。Marsh^[9]等建立了一个 T-RFLP 分析程序 (T-RFLP analysis program TAP), 该分析程序结合了最新版本的 RDP, 包括带有模型检索运算法则的系统发育树。

Marsh^[10]等利用 TAP 对第 7 版 RDP 中的 1,663 个近乎完全的序列, 以 27F 作为荧光标记引物, 以 *Tsp*EI 作为限制性酶进行消化, 获得 1,200 个末端限制性片段, 而其中有 349 个唯一的末端片段大小。也就是说通过这一引物与限制性酶的组合, 目前数据库中 29% 的基因型能够确定。TAP 为研究者选择最佳的引物与限制性酶结合进行群落分析研究, 提供了一个快捷的途径。

2.3 其他的影响因素

由于 T-RFLP 技术涉及到群落 DNA 的提取和进行目标基因的 PCR 扩增, 因此 DNA

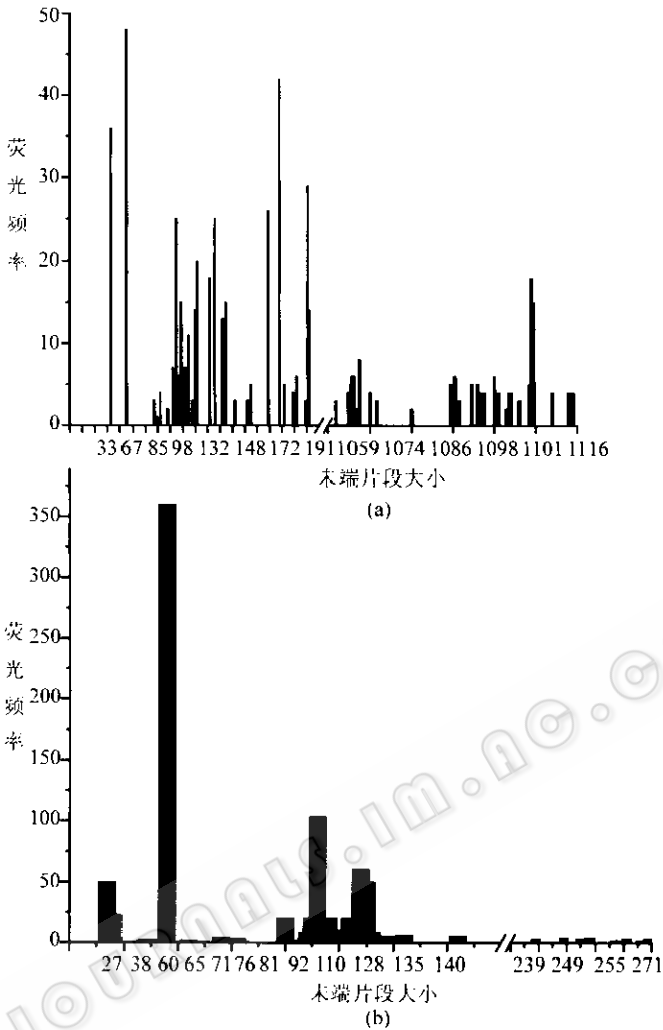


图2 消化数据库序列获得的5'末端片段大小及其分布频率
(a)表示用 *Hha*I 消化数据库序列后获得的末端片段大小及其分布频率
(b)表示用 *Cvi*II 消化数据库序列后获得的末端片段大小及其分布频率

的提取效率及 PCR 扩增的效率就会影响到实验的结果分析。DNA 提取过程中细胞壁裂解以及 PCR 的扩增都具有一定的倾向性，很容易造成对自然 rRNA 丰度的错误估计。因此对生态环境的多样性和丰度的研究做结论时，需要很谨慎并需考虑周全。但有研究表明^[2]，PCR 的退火温度及循环次数在一定范围内的变化都不会影响到天然菌群 T-RFLP 图谱的定量定性分析，这在一定程度上确保了实验的稳定性和可重复性。

限制性内切酶的消化特异性以及消化过程的彻底性对确保 T-RFLP 方法的可靠性十分重要。为监测实验过程中消化的特异性和彻底性，可以在样品 DNA 中加入具有特定序列的基因作为特异性的扩增模板，另加入带有特殊荧光标记的引物进行扩增，所得到的产物在与样品的 PCR 产物共同用限制性酶消化之后，很容易从混杂的末端限制性片断中分辨出来，从而可以确定消化是否彻底以及消化的特异性。

3 T-RFLP 技术的应用

T-RFLP 技术具有 3 个明显的优势：①序列数据库具有直接的参考意义，也就是说，

从消化产物中获得的所有的末端片段大小,可以与越来越丰富的序列数据库中的末端片段相对比,从而可以做系统发育的推断。②核酸测序技术要比 DGGE 或者 SSCP 所依赖的电泳系统获得的结果更为可靠。③T-RFLP 的毛细管凝胶电泳分析更为快速,而且结果是以数据的形式输出。T-RFLP 技术的这 3 个明显的优势使其成为必然成为一种理想的群落对比分析的方法。该技术目前已被成功的应用到了菌种的鉴定^[9]、各种微生物群落的比较分析、微生物群落多样性及结构特征的研究等方面。

Liu^[7]等利用 T-RFLP 技术研究了活性污泥、生物反应器内污泥、含沙水层以及白蚁内脏中微生物种群的多样性,结果表明, T-RFLP 是评估复杂微生物群落多样性、比较不同生态环境下微生物群落多样性及结构的快速有效的方法。Clement^[12]等也是利用 T-RFLP 技术分析了 3 种不同的细菌群落,包括鹿肠道、沙地以及被污染沙地中的微生物群落。实验结果很清晰的表明了这 3 种菌落的不同,且根据末端片段的大小检测出了 25 种不同的核酸类型。作为一种研究微生物群落特征的理想方法,近几年来 T-RFLP 技术的发展十分迅速,关于其应用的报道达到了近百篇。其中 Kaplan^[13]等利用 T-RFLP 技术,研究了饲喂小鼠嗜酸乳酸菌 NCFM 的过程中 NCFM 的动力学,以及肠道菌群结构的变化情况。Barkovskii^[14]等利用 T-RFLP 技术,研究了自然环境的变化对微生物群落的影响。Lueders^[15]等利用 T-RFLP 技术研究了在稻田土壤灌溉之后,古细菌群落结构的变化情况。

4 总结

末端限制性片段长度多态性是一种新兴的研究微生物多态性的分子生物学技术。该技术是建立在 PCR 的基础之上,克服了传统微生物培养方法的限制、应用快速、具有很高的灵敏度,且输出定量的数据结果。作为研究微生物群落特征的理想方法,该技术已经越来越受到研究微生物多样性人员的重视。

参考文献

- [1] Fogel C B, Collins C R, Li J, *et al.* *Microbiology Ecology*, 1999, **38**: 93 ~ 113.
- [2] Lueders T, Friedrich M W. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69** (1): 320 ~ 326.
- [3] Brunk C F, Avanniss A E, Brunk C A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 872 ~ 879.
- [4] Marsh L J, Liu W T, Forney T L, *et al.* *Water Science Technology*, 1998, **37**: 455 ~ 460.
- [5] Liu W T, Marsh T L, Forney L J. *Water Science Technology*, 1998, **37**: 417 ~ 422.
- [6] Ken T, Duane P M, Mary D, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67** (12): 5750 ~ 5760.
- [7] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 4516 ~ 4522.
- [8] Marsh T L. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, **2**: 323 ~ 327.
- [9] Marsh T L, Sacman P, Cole J, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66** (8): 3616 ~ 3620.
- [10] Maidak B L, Cole J R, Parder C T, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**: 171 ~ 173.
- [11] Avanniss A E, Jones K, Holtzman A, *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*. 1996, **34**: 98 ~ 102.
- [12] Clement B G, Kehl L E, DeBord K L, *et al.* *Journal of Microbiology Methods* 1998, **31** (2): 135 ~ 142.
- [13] Kaplan C W, Astaire J C, Sanders M E, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67** (4): 1935 ~ 1939.
- [14] Barkovskii A L, Fukui H. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **56**: 93 ~ 105.
- [15] Lueders T, Friedrich M. *Applied Environment Microbiology*, 2000, **66** (7): 2732 ~ 2742.