

分子生态学方法在微生物多样性研究中的应用

张晓君 冯清平 白玲

(兰州大学生物系 兰州 730000)

关键词 分子生态学, 微生物多样性, 16S rRNA

分类号 Q78 **文献标识码** C **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-68-70

现代的核酸技术正在给生物学的研究带来新的革命,它使人们对于生命现象的研究更为深入,成为揭示生物科学规律的有力手段。自1985年Pace等以核酸测序技术研究微生物的生态和进化问题以来^[1],对微生物多样性的研究进入了一个新阶段。以往对微生物的认识基于对微生物的培养和纯种分离技术,而在自然环境中的微生物99.5%~99.9%的种类至今尚是不可培养的^[2],成为正确认识微生物生态系的严重障碍。分子生态学技术的应用克服了培养技术的限制,对样品进行客观的分析,更精确地揭示微生物种类和遗传的多样性。因此,该技术与经典和现代的分离技术的结合将会使我们以更直接的方法研究环境,使环境物理化学的变化所引起的微生物生态系的自然波动能为人所了解,进而可以被人类所控制。

目前,分子生态学技术在微生物多样性方面的研究主要集中在以下几个方面:

1 以16S rRNA序列的比较发现新的微生物

不同的微生物rRNA基因序列在某些位点会以不同的几率发生突变,但是它们又具有高度的保守性。形象地说,它可作为生物进化史的计时器,它们的序列的相似程度可以反映出它们的系统发育关系(Phylogenetic relationship)。

1985年,Pace等第一次试图通过rRNA确定环境样品中的微生物。他们直接从混合样品中提取出5S rRNA分子,并通过电泳将属于不同种微生物的5S rRNA进行了分离,分别测定它们的序列,就可排定它们的系统发育位置(Phylogenetic placement)。这一工作作为微生物生态学的研究打开了一个新视野^[1]。但是,5S rRNA相对过小,携带信息量少,对5S rRNA的分离仅限于研究比较简单的生态系统。随后开展了16S

rRNA分子的研究。16S rRNA分子大约有1500个核苷酸,当其全序列或大部分序列(至少大于1000个核苷酸)被分析时,可以得到有关系统发育关系的充足信息。

以rRNA研究微生物系统发育关系的基本步骤是^[3]:(1)样品中总DNA的提取;(2)建立DNA文库;(3)以16S rRNA探针杂交法来筛选含rDNA的克隆;(4)测序;(5)序列的比较分析。

PCR技术发明后,这一费时费力的方法得到简化,利用PCR技术对混合的DNA样品进行选择性的扩增,以混合的扩增产物建立的基因文库中包含有确定的16S rRNA片段,对这些片段可进行快速的测序。另一途径是以16S rRNA反转录cDNA,建立cDNA文库,或者在反转录结束后,加入一个rDNA专一性引物进行扩增,然后克隆测序^[4]。一般地讲,从rRNA着手优于从DNA着手。因为,一方面rRNA分子尺寸较小,易于提取,另一方面利用rRNA时可以得到更多的模板(有代谢活性的细胞内存在较多的核糖体,因而也有大量的rRNA)。

目前,利用此项技术已对众多的生态样品进行了研究,并且发现了许多新种。尤其令人瞩目的是,Woese以该技术发现一类在系统发育上与其它细菌差异很大的微生物——古细菌^[5],促成了“三域(Three Domain)”学说的提出,把各类生物划分为三个域:古生物(Archaea)、真细菌(Eubacteria)和真核生物(Eucarya)。

2 以探针和杂交技术研究微生物的多样性

可以根据研究对象的rDNA序列或rDNA序列数据库中的信息设计探针,依据研究的目的使设计的探针具有一定的专一性,即可用于后续的研究。利用探针

1997-12-23收稿, 1998-03-23修回

可以在四个层次上对特定微生物在环境中的存在、分布和丰度等情况进行研究。这四个层次是^[3]:

(1) 直接在环境样品上进行原位 (in situ) 杂交。通过原位杂交不仅可以测定不可培养微生物的形态特征及丰度,而且可以在原位分析它们的空间分布和动态。

(2) 与富集分离的菌落进行全细胞杂交。在单细胞水平上的全细胞杂交可以提供比点渍杂交更为详尽的信息。最初是以放射性标记的 rRNA 靶探针用于以显微镜鉴定单个的微生物细胞^[6]。后来,荧光标记的 rRNA 探针与外荧光 (epifluorescence) 显微镜结合也可应用于检测单个细胞。近来,以荧光标记的 rRNA 靶探针与流式细胞计 (Flow Cytometry) 可对混合的微生物种群进行自动分析^[7]。

(3) 与从环境样品中提取出的 DNA 或 rRNA 进行数量点渍杂交 (quantitative dot blot)。特定 16S rRNA 相对于总 16S rRNA 的数量可通过以通用型或专一性探针与直接从样品中分离的总核苷酸进行杂交而获得。其相对丰度可以用与专一性探针和通用型探针杂交的残余放射性强度之比来表示。最初,这一方法用于检测牛瘤胃中的种群变化^[8]。当放射性标记的探针用于点渍测定时,具有很低丰度 (0.1%~1%) 的 rRNA 序列也可被定量。但是, rRNA 的丰度不能直接用于表示某类微生物细胞数的多少,因为不同种生物细胞内有不同数量的核糖体 (介于 $10^3 \sim 10^5$ 之间), 甚至同一种细胞内在不同时间核糖体数也不同。然而, rRNA 的丰度可以代表特定种群的相对生理活性。这对于研究生态系统功能多样性有重要意义。

(4) 与 rDNA 的扩增产物或 rRNA 的反转录产物 (cDNA) 进行点渍或瑟填 (Southern) 杂交。尽管 PCR 技术的参与使复杂的微生物生态系的分析相对简化,但测序过程仍然相当费时费力。因而,许多研究者尽量地减少测定的克隆数,即使测定几百个克隆,可能也未能测定该样品中总数的 1%。利用探针和杂交技术可以克服这一缺陷。微生物的 rRNA 序列在亚种、种、属、群和界的水平上有不同的信号序列^[9], 根据这些信号可以设计一些寡核苷酸探针,并以这些探针来测定特定信号,以此作为常规分析方法而不必进行测序。目前常用的这一类探针有: 古细菌、真细菌和真核生物三域专一性探针, 革兰氏阴性的硫还原细菌专一性探针, 区分泉古

细菌和真古细菌 (*Crenarchaeota* 和 *Euryarchaeota*) 的专一性探针, 以及更低级的 (如属、种、亚种等) 专一性探针。在对一个环境样品的多样性的研究中, 使用这一类探针并通过点渍杂交^[10] 和全细胞杂交方法^[11] 就可得到有关微生物多样性的更全面的信息。当然, 应首先使用三域专一性探针, 并根据所获得的信息依次选用更为专一的探针。但这一方法也存在缺陷, 因为目前群专一性探针完全建立在可培养微生物的测序基础之上, 而可培养微生物可能仅代表着真正的微生物及其序列多样性的很小一部分。但可以相信, 这一状况会随着 rDNA 序列公共数据库的不断完善而得以改变。

3 直接对 rDNA 进行扩增和分析

对环境样品总 DNA 进行 PCR 扩增, 根据扩增产物的分析结果推断该环境样品的微生物多样性。这一技术的可靠性依赖于两个基本要求: (1) 用于扩增的总 DNA 必须能代表样品中的遗传多样性的实际情况。环境样品中总 DNA 的分离方法有两种, 一种是从混合的样品中分离出细胞, 然后抽提总 DNA^[12]; 另一种是以机械破碎的方法直接裂解样品中的微生物细胞, 释放总 DNA^[13]。根据许多学者的研究结果, 后一种方法提取的总 DNA 更接近于样品中的自然情况。(2) 对环境样品中的各种 rDNA 进行无差异的扩增。只有进行无差异扩增, 才能保证扩增产物的多态性可以真实地反映样品中的 rDNA 的多态性。Pace^[14] 等和 Liesack^[15] 等分别对如何减少差异扩增, 更真实地以扩增产物的分析来表示自然样品中的多样性情况进行了论述。

样品总 rDNA 的扩增产物常用的分析方法有: (1) 克隆扩增产物, 然后测序。(2) 扩增产物以变形梯度胶进行电泳分离, 直接显示 rDNA 多样性, 或以各类专一性探针进行杂交鉴定各类微生物的存在及其多样性^[16]。(3) 扩增产物的 RFLP 分析。

4 其它方法

(1) 测定样品中总 DNA 的变性、复性特性, 并以 Cot 1/2 值表示基因组的大小或复杂度。Torsvik 等研究了挪威等地的森林土壤样品, 他们从样品中提取总 DNA, 然后在高压下将 DNA 剪切成 420kD 的片段, 测定热变性复性过程, 得到 Cot 1/2 值。结果显示该样品的基因多样性相当于一般土壤细菌平均基因组大小的 4000 倍。这个数字是用一般分离法得到的基因多样性的 200 倍, 说明这种方法在多样性的研究上有其优越

性^[2]。

(2) 脂肪酸甲酯(Fatty acid methyl ester, FAME)分析。Amy^[17]等研究了 *Pseudomonas sp.* 和其它一些具有相同表型的纯培养物,发现 FAME 分析结果与 rRNA 及 rDNA 分析结果具有良好的一致性。FAME 分析法为种内关系的建立提供了一个快速而可靠的方法。但是,不同属甚至不同科的微生物的 FAME 有可能出现重叠,因此在区分关系较远的微生物的应用上出现一些困难,然而以 FAME 的多样性来表示一个不太复杂的生态系统的微生物多样性仍有一定的参考价值。

人类的生存与发展离不开生物的多样性。近年来对生物多样性的重要性的认识已有了很大提高。但是,人们似乎更关注的是动植物的多样性,而对在生物-地球-化学循环中起着重要作用的微生物的多样性认识不够,这为更好地认识和改造我们的生存环境带来了障碍。在我们生存的地球上仍蕴藏着未发现的微生物的巨大多样性,分子生态学技术使研究微生物多样性的方法更为直接。通过对微生物生态系的组成,不同个体间的空间关系和种群功能间的相互关系的原位测定,不仅对于理解随处可见的共生关系,而且对于理解许多生物-地球-化学循环(在其中往往并非单一物种,而是由多种微生物组成的复合体在催化许多转化过程)都是非常重要的。可以预见,微生物环境生态学的研究将为我们展示一个革命性的前景。

参 考 文 献

[1] Lane D J, Stahl D A, Olsen G J *et al.* J Bacteriol, 1985, 163:75~81.

- [2] Torsvik R, Goksoyr J, Daae F L. Appl Environ Microbiol, 1990, 56:782~787.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Microbiol Reviews, 1995, 59:143~169.
- [4] Amann R I, Stromley J, Devereux R *et al.* Appl Environ Microbiol, 1992, 58:614~623.
- [5] Woese C R, Fox G E. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74:5088~5090.
- [6] Amann R I, Krumholz L, Stahl D A. J Bacteriol, 1990, 172:762~770.
- [7] Wallner G, Amann R I, Beisker W. Cytometry, 1993, 14:136~143.
- [8] Stahl D A, Flesher B, Mansfield H R *et al.* Appl Environ Microbiol, 1988, 54:1079~1084.
- [9] Woese C R, Stackebrandt E, Macke T J *et al.* Syst Appl Microbiol, 1985, 6:143~151.
- [10] Raskin L, Poulsen L K, Noguera D R *et al.* Appl Environ Microbiol, 1994, 60:1241~1248.
- [11] Wagner M, Amann R I, Lemmer H *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, 59:1520~1525.
- [12] Holben W E, Jansson J K, Chelm B K *et al.* Appl Environ Microbiol, 1988, 54:703~711.
- [13] Steffan R J, Goksoyr J, Boj A K *et al.* Appl Environ Microbiol, 1988, 54:2908~2915.
- [14] Reysenbach A L, Giver L J, Wickham G S *et al.* Appl Environ Microbiol, 1992, 58:3417~3418.
- [15] Stackebrandt E, Liesack W, Goebel B M. FASEB J, 1993, 7:232~236.
- [16] Muyzer G, Waal E, Uitterlinden A G. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:695~700.
- [17] Haldeman D L, Amy P S. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:933~935.