

# 生物技术在分子微生物生态学上的应用

陈海敏 陈声明

(浙江大学生命科学院 杭州 310029)

**关键词:** 生物技术, 微生物生态学, 种群

**中图分类号:** Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0436-04

分子生物学及其技术的发展和变革开辟了生态学研究的新途径。分子生物学与生态学交叉的研究,越来越引起人们的重视,于是分子生态学便应运而生了。而分子微生物生态学则为其中的重要分支,它是运用分子的方法和技术,在基因水平上估计种的个体丰度,查明种的变异情况以及探究群落中微生物间相互关系的科学。生物技术的应用,使我们不必培养微生物,而直接通过对环境中的遗传物质的研究来达到目的,它为微生物生态学的研究开辟了新的途径。

## 1 用于分子微生物生态学的主要生物技术

**1.1 核酸探针检测技术** 探针是能与特定核苷酸序列发生特异性互补的已知核酸片段,因而可检测样品中特定 DNA 序列存在与否。探针通常以一种有效的方式加以标记(放射性的和非放射性的),并且要求杂交的结果可被灵敏地检测。探针是经过特异性选择的。它的特性决定了它所能检测的微生物范围。例如 Roberts

(1987)等研究表明,从 DNA 制备 cDNA 探针更适合于种群鉴定,因为它不需要复杂的克隆程序,可与种内所有株系进行杂交,而比单拷贝基因探针有更高的灵敏度。用探针所检测到的保守区段越多表明为同一种或系统进化上相关的分类单元(同一种、属或界)。表型特异性的 cDNA 探针检测环境样品中某一特定表型的存在与否十分有用,例如,细菌中存在编码致病性,抗生素抗性和重金属抗性等同源基因,可采用这些同源基因 cDNA 探针来检测特定表型。近年来,单链 cDNA 和 RNA 探针亦已用于 *E. coli* 和 *Salmonella* spp. 等环境微生物的检测,比双链 cDNA 探针具有更高的灵敏度,背景更清晰,且杂交不需变性。

另一类广泛应用的是寡聚核苷酸探针,它们多由人工合成,一般为 30b 左右,具极高的灵敏度。目前很

---

收稿日期: 1998-09-21, 修回日期: 1999-07-21

据 rRNA 基因的多拷贝且高度保守 DNA 片段而设计的寡聚核苷酸探针,能粗略检测某一环境样品中细菌的大致种类,又能鉴定出特定种的存在。目前这类探针已用于检测环境样品中的 *E. coli*, *Listeria* spp., *Yersinia* spp. 及 *Mycobacterium avium* 等致病性细菌。

**1.2 DNA-DNA 杂交** 与基因探针不同, DNA-DNA 杂交包括整个基因组的重组。它提供了检测核苷酸序列相似性的一种通用方法。起源不同的两条 DNA 单链之间重组是难以配对的,最多不会超过 20% 的核苷酸之间会形成双链。因此, DNA 相似值被用来估计序列的相似程度。一般情况下,同一基因种内 DNA 相似值大约为 70%, 在这一阈值下,能划分特定的分类单元。研究表明, DNA-DNA 杂交对于种的水平上的分类是非常有用的,但不能用来测定种间或亲缘关系更远的细菌。该方法的限制因素是必须用可能相关的微生物属作为参照。

**1.3 rRNA 和 rRNA 基因序列分析** 确定一个分离物为一个分类单元,或证明属于一个新的分类单元,最可靠的方法是进行 rRNA 分析。rRNA 在所有微生物中功能和进化上是同源的。同源物种之间 rRNA 结构是相当保守的。核糖体序列 (rRNAs 或 rDNAs) 分析已成为研究微生物分类单元之间系统进化关系的最常用方法。

5S rRNA 包含了种的专一性的核苷酸特征决定了它可被用于物种的鉴定。例如,有学者在对美国黄石国家公园 91°C 温泉中微生物的研究中,对分离的 5S rRNA 与参考序列进行比较,较好的证明了它们的分类地位。它们是由三个优势种群所组成的微生物群落,其中之一是硫代谢有关的古细菌的一个分支,另两个是与栖热菌属有关的真细菌。对于冲洗滤池中真核和原核生物的 5S rRNA 研究表明,其优势种为海洋无脊椎动物 *Riftia pachyptila*, *Calyptogena magnificia*, *Solemnya velum* 以及硫杆菌。此外,还有运用这种方法检测新泽西州的矿区和南极砂岩中的弧菌和研究在实验室条件下难以培养的微生物的报道。

16S rRNA 可以说是当今研究得最透彻的分子之一,已有上百个物种的部分或全部 16S rRNA 序列已探明。16S rRNA 的分析使微生物学家对原核生物系统发育有了新的认识,导致了三界系统的出现;它也为物种之间亲缘关系的鉴定找到了更为迅速有效的手段。最

初,用逆转录酶测序法对 16S rRNA 测序,用该技术检测的微生物有瘤胃中的 *Fibrobacter*, *Lachnospira* 和土壤中的 *Streptomyces*。后来,采用寡 rRNA 探针直接进行原位杂交鉴定,这种方法可用于调查群落结构与功能之间的相互关系。现在也有 RT-PCR 扩增技术(逆转录酶-PCR)检测直接从环境样品中裂解抽提到的 rRNA。

现在, rDNA 序列分析中交替使用的方法是基因克隆和 PCR 扩增技术。通过传统的克隆方法,不管单链还是双链 DNA 均可被测序。与基因克隆相比, PCR 基因扩增技术显得更为简便迅速。从单菌落细胞中分离到的 DNA 即已足够用于基因扩增。PCR 扩增后的 rRNA 基因,用限制性内切酶酶切片段的电泳图谱分析,该法已被用于细菌鉴定。

双链 DNA 被克隆后测序或直接测序。这样,一旦从菌落中分离到 DNA 通过 PCR 扩增就可用于物种的分子鉴定,采用这一策略鉴定的微生物有嗜压深海菌,生长缓慢的致病菌 *Mycobacterium* 以及与 *Rickettsia* 和 *Ehrlichia* 相关的一种蛋白分解菌 *anaplasmas*。

**1.4 编码蛋白质的基因** 除了 rRNA 基因外,编码蛋白质的基因在很大程度上决定了一群微生物或一个物种的特征。通常通过 N-端氨基酸来推测一段 DNA 序列,以此作为鉴定基因库中相关基因的探针。从亚克隆中获得的序列显示了分类专一性靶序列的存在。它可用于 PCR 测定。这种方法在 *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis* 和 *Brucella* 等物种的研究中已有应用。

**1.5 分子流行病学的常用技术** (1) DNA 的限制性内切酶消化: DNA 上的一小段序列能被限制性内切酶识别,依靠这些小片段的数目和位置, DNA 被分割成大小不同的片段,然后通过简单的一维过程分离,这样复杂的类型即被检测,这一技术已被用于螺旋体属,钩端螺旋体属和其它一些细菌的检测。但这种方法对于一个给定分类单元类型的专一性并不是事先可预测的,必须依靠经验的积累。

(2) 限制性内切酶酶切片段长度多态性分析 (RFLP): RFLP 通过“指纹图谱”来检测分析基因组中内切酶限制性切点的变化,从而比较不同基因组之间的核苷酸差异。这种方法最常见的应用是用标记的 rRNA 探针进行核糖类型分析,该法已成功用于 *Brucella*, *Haemophilus*, *Legionella* 等物种的鉴定,

近年来将 RFLP 分析与 PCR 技术相结合,即 PCR-RFLP 法,用于流行病学检测,分群率很高,是流行病学研究的一种有效手段。此外, RAPD 和 AP-PCR (Arbitrary Primed PCR.) 两种方法均建立在随机引物对未知 DNA 区段扩增的基础上。随机引物反应用于多态性分析比其他方法更加快速、简便。因此它在研究不同菌株间的亲缘关系是十分有用的,有着良好的应用前景。

(3) 质粒指纹图谱分析:类似的生物技术也已用于染色体外的遗传因子质粒的研究。质粒的大小和数目随物种的不同有所差异。质粒数是相对稳定的,它可用于区分同一物种的不同菌株。该技术已广泛用于葡萄球菌、耶尔森菌、军团菌及淋球菌等多种细菌的流行病学调查。另外,还有用该技术研究小猪消化道中的乳酸菌的报道。

研究表明,该技术的特异性与噬菌体分型相当或更高,明显优于血清学,生化分型和药敏试验,具有简单稳定、分析周期短等优点,可用于多种病原菌感染引起的疾病的流行病学调查。

(4) 低分子量 RNA 分布图:这种方法为 tRNA (75-90 个核苷酸) 和 5S rRNA (105-120 个核苷酸) 的双相电泳分离。这些分子的长度差异是可测的,其中隐含的一些专一性特征已被用 *Hyphomicrobium* 和 *Pseudomonas* 等物种的鉴定,浮游真菌和支原体中 5S rRNA 要明显比正常 5S rRNA 要小,这利于将这些菌从自然样品中区分开来。虽然这一方法的潜力尚未完全开发出来,但高分辨率凝胶能将近 60 种 tRNAs 按大小分离出来,为它提供了一种有效的鉴定工具。

## 2 生物技术在种群结构鉴定中的应用

分子技术的应用,使纯培养的鉴定有了长足的发展,却不足以阐明自然种群的结构。为了研究群落中微生物的多样性,可采取不同的方法。

**2.1 自然样品中特殊标记细胞的直接鉴定** 近年来研究发现,标记的寡核苷酸探针可穿透经甲醛固定的微生物的细胞壁,与细胞内特定的靶序列进行杂交,从而开辟了直接鉴定微生物细胞基因型的方法。显然这一方法成败的关键在于胞内 rRNA-rDNA 复合物的形成,每个细胞中一般存在着上千个 rRNA 拷贝,其中包含了大量的分类专一性信息,其中主要是 16S rDNA 探针。

虽然尚缺乏广泛的研究,但是利用界、属、种专一性探针分辨混合培养物中的细胞类型的可行性已充分显示。系统发育株被证明在种和亚种的水平上扩大了分类单元的范围。这一方法的应用使寄主组织中的专性内共生和致病胞内微生物的直接检测可能性增大,以通用探针或专一性探针作用细胞百分率来估计混合样品中特殊微生物的相对含量。不同荧光染料标记的多种探针使用,使一个样品中多种细胞类型同时鉴定成为可能。

这一方法面临的问题是:环境样品的自身强荧光背景,靶生物的数量少,靶细胞的染色强度低。通过发展信号放大系统,以便迅速筛选许多显微视眼并对阳性反应进行自动记录。这样或许可以解决这一问题。

**2.2 从自然样品中抽提细胞** 鉴定环境样品中最直接先进的方法是直接进行菌落杂交。然而,能被培养的微生物是有限的,因此,直接从自然样品中抽提细胞,再从中提取核酸。但从复杂样品如瘤胃、污水、土壤等中几乎不能抽提到细菌,这是由于细菌与环境物质(粘土、金属离子、附属物、低聚糖等)之间存在吸附和诱捕等相互作用。从土壤中抽提细胞最成功的方法也最多只能得到 30% 左右的细胞,但这一数量已足以提供关于分离部位的较为满意的细菌状况。

在一种新方法中,采用荧光标记的 16S rRNA 寡核苷酸探针与流式细胞计量仪相结合来分析微生物个体。系统发育株的应用,拓展了这种方法用于在系统发育水平上收集、鉴定和计量细胞的潜力。探针的使用被限制在探针最初获得的那些细胞类型,更为复杂的分子技术使它用于新种鉴定成为可能,其前提是成功的裂解细胞,包括一系列酶促和机械处理。

例如从长岛南部,加勒比海和 Sargasso 海地区分离到的群落的不同浮游细菌凝结物的总 DNA 杂交表现出惊人的相似性(20%~50%);而 Bermuda 附近珊瑚岛湖中群落的浮游细菌凝结物的 DNA 则表现出低相似性(低于 10%)。虽然这种方法不能用于鉴定和计量物种的组成,但它提供了一种直接检测群落随时间和空间季节性变化的简单且迅速有效的方法。

**2.3 从自然样品中直接抽提核酸** 在该方法中,细胞分离这一步骤被免去,而是通过强烈的机械方法直接裂解环境样品中的细胞,再从中直接抽提核酸。从环境

样品中直接分离核酸面临的主要问题是:水环境中核酸浓度很低;土壤样品中生命和非生命物质大量存在,吸附在砂和粘土中的DNA难以被分离;而且分离到的核酸成分复杂,要获得高纯度的DNA相当费时;还有,分离到的DNA有一部分来自死的或半死状态的细胞。近年来,常用凝胶电泳从土壤样品中分离DNA,而不用CsCl密度梯度离心。凝胶电泳更为迅速,许多样品可同时被提取。有一点可以肯定从土壤中直接抽提核酸要比先抽提细胞再从中分离核酸所得的核酸量要多得多。

从预先分离的生命物质中或直接裂解抽提获得的核酸可用前述方法分析。大量DNA和rRNA可被对应于特定分类单元的rDNA探针或特定基因的DNA探针检测。混合培养物中物种的检测和计数主要的差别是基因库的增殖,需要对群落中个体成员的基因进行分离和检测。随着可利用的基因序列的增加,将来的研究是更多地 在菌落水平上应用PCR引物去扩增基因,然后加以检测。而传统的限制性酶切消化分析将被用于那些缺乏PCR引物的基因分析。

环境中还存在我们尚不知晓的“新的”微生物种,但通过传统的方法却不能分离甚至检测,这对于微生物学家来说是一个严峻的挑战。存在专一性探针靶位点的新序列可以被检测,并通常作为系统发育株用微生物方法来检测未知微生物。流式细胞计量仪通常被用于富集细胞,随后对这些细胞进行化学分类,生化,形态以及超微结构的调查。有关未培养微生物的最密切地亲缘关系的信息将提示我们怎样在实验室条件下对它们进行培养。这对于我们更好的利用自然界的微生物资源是十分有益的。

## 参 考 文 献

- [1] Antoon D L, Akkermans, Blais J D V *et al.* "Molecular Microbial Ecology Manual." Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London United Kingdom (1995)
- [2] Amann R I, Binder B J, Olson R J *et al.* Appl. Environ. Microbiol, 1990, 56:1919~1925.
- [3] Amann R I, Ludwig Scheifer K-H. Microbiol. Rev. 1995, 59:143.
- [4] Erko Stackebrandt. Molecular Microbial Ecology.
- [5] Giovannoni S J, Brischgi T B, Moyer C I *et al.* Nature, 1990, 345:60~62.
- [6] Lee S, Fuhrman J A. Appl. Environ. Microbiol, 1990, 56:739~746.
- [7] Olsen G J, Woese C R, Overlook R. J. Bacterial, 1994, 176, 1:1-6.
- [8] PAUL E A, CLARK F E. "Soil Microbiology and Biochemistry (second edition)". Academic Press. SanDiego/London/Boston/NewYork/Sydney/Tokyo/Toronto (1996).
- [9] Sayler G S, Layton A C. Ann. Rev. Microbiol, 1990, 44:625~648.
- [10] Totsvik V, Goksoyr J, Daae F L. Appl. Environ. Microbiol, 1990, 56:782~787.
- [11] Ward D M, Weller R, Bateson M M. Nature, 1990, 345:63~65.
- [12] Welsh J, McClellang M. Nucleic. Acids Res., 1990, 18:7213.
- [13] 胡稳奇, 张志光. 微生物学通报, 1995, 22(6): 371~374.
- [14] 林万明, 阚劲松, 宋欣明等. 微生物学通报, 1992, 19(5): 316~317.
- [15] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>