

在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应

罗海峰, 齐鸿雁, 薛 凯, 王晓谊, 王 川, 张洪勋

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术研究室, 北京 100085)

摘要:应用普通细胞裂解法提取 3 株实验菌株(*Escherichia coli* DH 5 α , *Staphylococcus aureus* SA-1 和 *Agrobacterium tumefaciens* 13129)的基因组 DNA 和应用基于高盐和长时高热的细胞裂解法提取 7 种不同土壤样品中的微生物的基因组 DNA, 两组不同结构的引物 F₃₅₇GC, R₅₁₈(在正向引物的 5'端有 GC 发卡结构)和 F₃₅₇, R₅₁₈, 分别对实验菌株和土壤样品中微生物的 16S rRNA 基因 V3 区进行扩增, 均得到了目的片段。比较了不同引物扩增的 16S rDNA 片段在 DGGE 中的不同电泳行为, 结果表明, 含 GC 发卡结构的 PCR 扩增产物在 DGGE 中能够得到很好的分离, 而无 GC 发卡结构的 PCR 产物则不能在 DGGE 中获得满意分离。引入 GC 发卡结构, 使得对不同微生物的定性和分类更深入细致。

关键词:PCR-DGGE; 微生物多样性; GC 发卡结构

Influence of application of GC-clamp on study of soil microbial diversity by PCR-DGGE

LUO Hai-Feng, QI Hong-Yan, XUE Kai, WANG Xiao-Yi, WANG Chuan, ZHANG Hong-Xun (Environmental Biotechnology Lab., Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(10): 2170~2175.

Abstract: As a new DNA fingerprinting technique, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to analyze the microbial diversity in different environmental samples, which has given people new ideas of studying the microbial community in soil. This technique is based on the direct extraction of genomic DNA from soil samples, the amplification of 16S rRNA genes (V3 region) by using the specific primers and the separation of the PCR products by DGGE. Three strains (*Escherichia coli* DH 5 α , *Staphylococcus aureus* SA-1 and *Agrobacterium tumefaciens* 13129) and seven soils sampled in different places and different depths were used in this study to evaluate the influence of GC clamp on the result of bacterial diversity by PCR-DGGE. The genomic DNA of three strains and the soil samples were extracted by a traditional cell lysis method and a cell lysis method based on the high NaCl (1.5mol/L) and long-time high temperature (65°C for 2 hours) respectively. Then, 16S rDNA fragments (16S rRNA gene V3 region) were amplified by using two sets of specific primers F₃₅₇GC, R₅₁₈ with a GC clamp in 5' end of the forward primer and F₃₅₇, R₅₁₈ without a GC clamp. The PCR products amplified by two sets primers and separated by DGGE respectively. The results showed that the 16S rDNA fragments with a GC-clamp (amplified by

基金项目:国家“十五”科技攻关重点资助项目(2001BA903B)

收稿日期:2003-03-28; **修订日期:**2003-05-13

作者简介:罗海峰(1975~), 男, 陕西凤翔人, 博士生。主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail: luo2222@hotmail.com

Foundation item: The National Key Project of Science and Technology of the National 10 th Plan for five years

Received date: 2003-03-28; **Accepted date:** 2003-05-13

Biography: LUO Hai-Feng, Ph. D. candidate, research areas: molecular ecology of environmental microbial community.

primers F_{357} , R_{518}) could be clearly separated, but those DNA fragments without a GC-clamp (amplified by primers F_{357} , R_{518}) couldn't be separated well in DGGE. In conclusion, the GC-clamp was available for separation of PCR products of the microbial community in DGGE, and it is more helpful for identification and classification of the microbial community in environmental soil samples.

Key words: PCR-DGGE; microbial diversity; GC-clamp

文章编号:1000-0933(2003)10-2170-06 中图分类号:Q938.S154.3 文献标识码:A

经典的平板培养分离方法研究土壤微生物多样性有很大的缺陷:具体表现为可分离出微生物种类只占土壤微生物种类总数的 0.1%~1%^[1],且这种分离培养方法不能很好地反映土壤微生物多样性的原始状态等^[2],因为许多“存活但不能培养”的微生物不能被分离和鉴定。分子生物学技术方法 PCR-DGGE^[3]自 1993 年被引入微生物生态学研究以来,在许多微生物实验室被用作分子工具来比较土壤微生物群落的多样性和种群动态监测。这种方法基于从土壤样品中直接提取出微生物群体的基因组 DNA 后,选择对大多数细菌的 16S rRNA 基因都能有效扩增的引物进行特异性的 PCR 扩增,然后对 PCR 产物运用 DGGE 进行分离和鉴定,从而得出土壤微生物群体多样性的信息。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术其主要原理基于在含有浓度线性递增的变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的聚丙烯酰胺凝胶电泳中,部分解链的双链 DNA 分子的电泳迁移率降低;而序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为,它们在凝胶的不同位置停止迁移^[4],从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段分离。由于各类微生物(如细菌和古细菌)的 16S rRNA 基因序列中可变区的碱基顺序相差较大,所以选择与可变区配对的引物扩增出的每种土壤微生物的 16S rRNA 基因的部分序列在电泳中得到分离,根据电泳条带的多寡和条带的位置、强度可以辨别出样品中微生物的种类和数量,分析土壤样品中微生物的多样性。

在使用 DGGE 进行微生物多样性研究中,关键在于对样品中所有微生物群体 16S rRNA 基因(16S rDNA 片断)进行有效地扩增,所以在 PCR 过程中选择合适的引物显得尤为重要:一方面,选择的引物必须能够对样品中的绝大多数微生物种类进行有效扩增,这样就能保证实验结果的全面性;另一方面,选择的引物在设计上必须要求所有在 PCR 过程中扩增出的微生物的 16S rDNA 片断在后续的 DGGE 分析中能够被完全分离,这样就有利于对单个微生物类群的 16S rDNA 片断的回收和测序,从而对之进行分类单元上的定性。本研究从实验的角度探讨了 PCR 反应的引物的设计,即在正向引物的 5'端是否添加 GC 发卡结构对 DGGE 实验结果的影响,为相关研究提供了理论依据和实验素材。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH 5 α ,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)SA-1 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)13129 均为实验室保存菌种。

1.1.2 土壤样品 土壤样品于 2002 年 9 月采集自河北省曲周县(中国农业大学土壤综合实验站)的农田和吉林省的普通农田。曲周实验站土壤属于典型的盐碱地土壤,分别在玉米田、棉花田和空白农田中选取样点,每个取样点又分 3 个取样小区,在距离地表 0~20cm 和 20~40cm 处分别取样,3 个小区中相同深度区域的土壤混匀后作为该取样点的样品(100g)。吉林的土壤样品使用同样的方法采集,取样点设在玉米田中,但只采集地表 0~20cm 的土壤。本研究共计 7 个样品依次标记为:1#(吉林玉米田土壤样品 0~20cm 土壤样品),2#(曲周玉米田 0~20cm 土壤样品),3#(曲周玉米田 20~40cm 土壤样品),4#(曲周棉花田 0~20cm 土壤样品),5#(曲周棉花田 20~40cm 土壤样品),6#(曲周空白田 0~20cm 土壤样品),7#(曲周空白田 20~40cm 土壤样品)。

1.1.3 仪器设备 实验用水浴锅为重庆银河试验仪器有限公司 CS510A 型水浴锅,离心机为上海安亭科学仪器厂的 TGL-16G-A 型冷冻离心机,分光光度计为上海第三分析仪器厂的 752C 紫外可见分光光度计,电泳仪为北京生化仪器厂生产的 DY~2W 型电泳仪。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与纯化

(1) 3 株菌株的基因组 DNA 提取 3 株实验菌株的基因组 DNA 的提取使用上海生工生物工程技术服务有限公司的基因组 DNA 纯化试剂盒(产品号:SK251),按照用户操作手册来进行。

(2) 土壤样品的基因组 DNA 提取 采用略加修改后化学裂解法^[5]直接从土壤样品中提取基因组 DNA。

①提取缓冲液 配比为 0.1mol/L 磷酸盐(pH 8.0),0.1mol/L EDTA,0.1mol/L Tris base (pH 8.0),1.5mol/L NaCl,1.0% CTAB。

②土壤样品处理 将 5 g 土壤加入 13.5ml 提取缓冲液和 50 μ l 蛋白 K(10mg/L),37℃下,225r/min 振荡 30min 后,加入 1.5ml 20% 的 SDS,65℃水浴 2h。

③基因组 DNA 的抽提 将上述土壤处理液以 2000~3000 (g)离心 5 min 后收集上清液,加入 1:1 的氯仿抽提上清液,9000 (g)离心 5 min 后在上清液中加入 1:1 的预冷的无水乙醇过夜沉淀 DNA,9000 (g)离心 5 min,用双蒸水或 TE 缓冲液溶解沉淀即为所得的基因组 DNA 粗提液。

(3) 土壤样品的基因组 DNA 纯化 由于各个土壤样品中含有不同程度腐殖质杂质,而低量的腐殖质是 PCR 扩增反应的抑制剂,使得 PCR 反应得不到任何产物^[6]。因此,在 PCR 反应之前,必须对土壤样品的基因组 DNA 粗提液进行纯化。各土壤样品的基因组 DNA 粗提液采用上海生工生物工程技术服务有限公司的玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒(产品号:SK111),按照操作说明对其进行纯化。

1.2.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

(1) 16S rRNA 基因 V3 区的引物 将纯化后的基因组 DNA 作为聚合酶链反应(PCR)的模板,使用 Applied Biosystem 的 Gene Amp PCR system 2700 型基因扩增仪,采用两组对大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对^[3]:组合 1(F₃₅₇GC 和 R₅₁₈)和组合 2(F₃₅₇和 R₅₁₈)。引物组合 1 和组合 2 的差别在于反向引物相同,正向引物相差一个富含 GC 的 40bp 的 GC 发卡结构,组合 1 的正向引物含有此 GC 发卡结构,而组合 2 则无。它们各自序列分别为:F₃₅₇, (5'-CC TAC GGG AGG CAG CAG-3'),R₅₁₈, (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'),GC 发卡结构, (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GCA CGG GGG G-3')。引物组合 1 扩增产物片段长度约为 230bp,而组合 2 约为 190bp。

(2) PCR 反应体系 100 μ l 的 PCR 反应体系组成如下:100 ng 的模板、30 p mol 每种引物、200 μ mol/L dNTPs(每种 10mmol/L)、10 μ l 的 10 $\times$ PCR buffer(without MgCl₂)、1.5mmol/L 的 MgCl₂、5U 的 Pfu DNA 聚合酶、800ng 的牛血清白蛋白 BSA 和适量的双蒸水补足 100 μ l。

(3) PCR 反应条件 PCR 反应采用降落 PCR 策略^[7],即:预变性条件为 94℃ 5min,前 20 个循环为 94℃ 1min,65~55℃ 1min 和 72℃ 3min(其中每个循环后复性温度下降 0.5℃),后 10 个循环为 94℃ 1min,55℃ 1min 和 72℃ 3min,最后在 72℃下延伸 7min。PCR 反应的产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离。

①变性胶的制备 使用梯度胶制备装置,根据实验需要,制备变性剂浓度从 0% 到 100%,20% 到 80% 的 10% 的聚丙烯酰胺凝胶垂直胶,其中变性剂的浓度从胶的左向右依次递增。制备变性剂浓度从 30% 到 50% 的 10% 的聚丙烯酰胺凝胶平行胶,其中变性剂的浓度从胶的上向下依次递增。

②加样,电泳及染色 待胶完全凝固后,加入含有 10% 的加样缓冲液的 PCR 样品 20~25 μ l。在 120V 的电压下,60℃电泳 5h。电泳完毕后,将凝胶在 EB 中染色 20~30min。

③照相及观察 将染色后的凝胶用 YLN-2000 凝胶影像分析系统(北京亚力恩机电技术研究所)分析,观察每个样品的电泳条带并拍照。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离后的 PCR 产物的电泳条带的分析 观察各个样品经变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离后的电泳图谱照片,以 PCR 产物电泳条带能否被完全分离开来确定不同结构引物对 DGGE 的影响。

2 结果与讨论

2.1 实验菌株的不同 PCR 产物的 DGGE 垂直胶分离

将 3 种实验菌株用两种不同引物组合扩增出的 PCR 产物用变性剂浓度从 0% 到 100% 的垂直胶进行分离,分离的图谱见图 1。

由图 1 可以看出,3 种实验菌株的引物组合 1 的 PCR 产物的混合物在垂直变性胶中可以得到很好的分离,表现为 3 条完全分开的电泳条带;而它们的引物组合 2 的 PCR 产物混合物在垂直变性胶中不能得到很好分离,在电泳中因为具有相似的电泳行为而聚集在一起而不能被分离。

2.2 1#土壤样品 PCR 产物的 DGGE 垂直胶分离

将 1#土壤样品的不同引物组合扩增出的 PCR 产物用变性剂浓度从 20% 到 80% 的垂直胶进行分离,分离的图谱如图 2 表示。

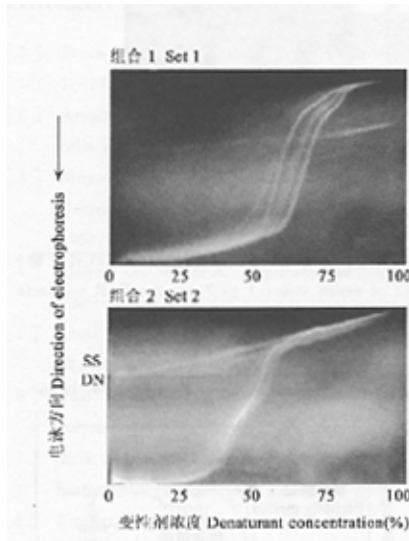


图 1 3 种实验菌株的引物组合 1 和组合 2 PCR 产物混合物的垂直变性胶的分离图谱

Fig.1 Perpendicular DGGE profile of mixture of PCR products amplified by primers set1 and set2 of three strains

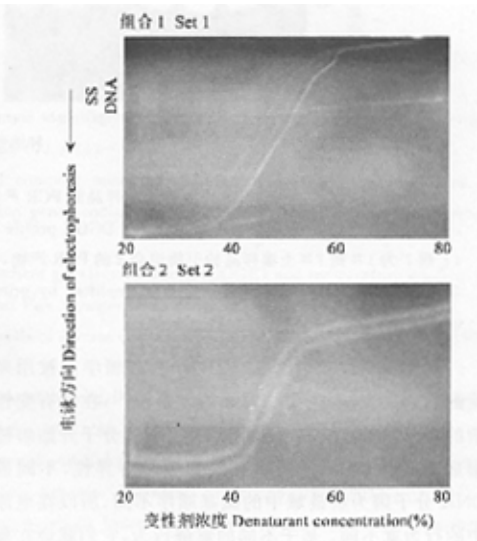


图 2 1#土壤样品引物组合 1 和组合 2 PCR 产物的垂直变性胶的分离图谱

Fig. 2 Perpendicular DGGE profile of PCR products amplified by primers set1 and set2 of 1# soil

由图 2 可以看出,1#土壤样品引物组合 1 的 PCR 产物在垂直变性胶中可以得到很好的分离,表现为 5 条分开的电泳条带(图示不清楚),说明在 1#土壤样品中至少有 5 种不同的 16S rRNA 的基因片段在 PCR 中被有效扩增出来;而该土壤样品引物组合 2 的 PCR 产物中虽然同样含有几种不同的 16S rRNA 的基因片段,在变性胶电泳中因为这些 16S rRNA 的基因片段完全解链而成为两条单链 DNA,从而使得几种微生物的 16S rRNA 的基因片段不能得到有效分离。

2.3 不同土壤样品 PCR 产物的 DGGE 平行胶分离

将 7 种不同土壤的微生物群体基因组 DNA 作为模板,分别用两种不同的引物进行 PCR 扩增,均可以得到 PCR 产物。将此 PCR 产物用变性剂浓度为 30% 到 50% 的平行变性胶进行分离,实验结果如图 3 所示。

由图 3 可知,在 DGGE 的平行胶中也具有与垂直胶类似的情况,几种不同土壤样品的引物组合 1 的 PCR 产物即带有 GC 发卡结构的 PCR 产物在 DGGE 中能被有效分离(图 3 右),而这些土壤样品的引物组合 2 的 PCR 产物也即无 GC 发卡结构的 PCR 产物在 DGGE 中不能被有效分离(图 3 左)。

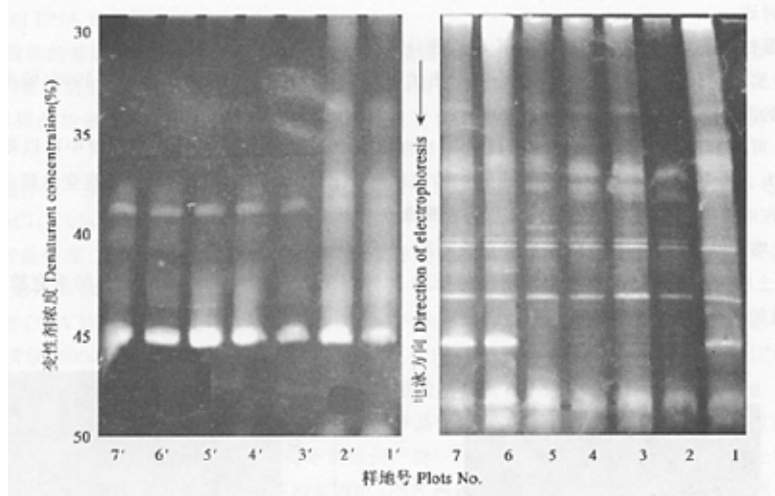


图 3 7 种土壤样品的 PCR 产物的 DGGE 平行胶分离图谱

Fig. 3 Paralleled DGGE profile of PCR products of seven soils

(1'到 7'为 1#到 7#土壤样品的引物组合 2 的 PCR 产物, 1 到 7 为 1#到 7#土壤样品的引物组合 1 的 PCR 产物)
(Labels: 1' to 7' are the PCR products amplified by primers set2 of seven soils; 1 to 7 are the PCR products amplified by primers set1 of seven soils)

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 最初在医学上被用来检测基因突变, 其主要原理如图 4 所示^[8], 在含有变性剂的聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 双链 DNA 分子开始解链形成解链域, 该解链域具有碱基顺序特异性, 不同的 DNA 分子因为解链域中的碱基顺序不同, 所以在电泳中的行为就不同。基于不同的解链行为, 它们就会在凝胶的不同位置停止迁移, 从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段得到分离。

GC 发卡结构是一个富含 GC 碱基的序列, 由于高的 GC 含量, 所以自身配对而成为一种特殊的稳定结构, 在一般情况下难以被拆分。将 GC 发卡结构连接于 DNA 双链分子的一端, 使得该 DNA 就难以完全解链成为两条单链 DNA, 在用 PCR-DGGE 对土壤微生物多样性研究中, 在正向引物的 5' 端加 GC 发卡结构后, 就使得扩增出的 PCR 产物在含有变性剂的电泳胶中难以完全解链而保持部分解链, 从而使得这些 PCR 产物在 DGGE 中能被完全分离。而无发卡结构的 PCR 产物会在含有变性剂的电泳胶的某个梯度以上完全解链成为两条单链, 而单链 DNA 在 DGGE 中的电泳行为取决于 DNA 分子的大小, 与 DNA 的碱基顺序无关, 所以所有长度相同的此类 PCR 产物会在 DGGE 中解链成长度相同的单链 DNA, 它们具有相似的电泳行为, 所以在 DGGE 中不能被完全分开。

在使用 PCR-DGGE 对土壤微生物的多样性研究中, 最为重要且关键的一步在于对 DGGE 分离后的条带进行碱基测序, 获得碱基序列信息后和国际标准的基因库进行比对, 从而对每个条带所代表的微生物种类进行定性。目前的测序有下述两种情形: (1) 条带代表的 DNA 片断的 PCR 产物的直接测序; (2) 对条带

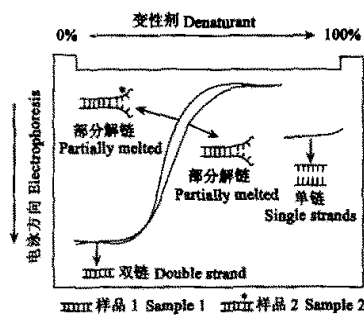


图 4 DGGE 对 DNA 片断的分离示意图^[8]

Fig. 4 profile of separation of DNA fragments by DGGE^[8]

代表的 DNA 片断克隆后进行测序。无论采用何种测序方式,都必须建立在对土壤样品的 PCR 产物在 DGGE 中被完全分离的基础上,在 DGGE 分离后的一个个单一的条带被用作测序的对象,经重新的 PCR 扩增后就可测序。如果在 DGGE 中的分离效果不好,很多条带不能完全分开,将使后续工作受到了限制。

3 结论

使用 PCR-DGGE 方法对环境样品(如土壤)中的微生物多样性进行研究时,在 PCR 过程中,在正向引物的 5' 端添加 GC 发卡结构后,PCR 的扩增产物将在 DGGE 电泳胶中会部分解链,这样环境样品(如土壤)中的不同微生物扩增出的 DNA 片断能够被完全分离,这些分离的 DNA 片断可以作为相应微生物的信息资料,为后续的进一步研究(如克隆测序,序列鉴定等)提供了可靠的实验基础。说明 GC 发卡结构在使用 PCR-DGGE 对环境样品(如土壤)中的微生物多样性进行研究时是非常必要的。

References:

- [1] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp. Soc. Gene Microbiol.*, 1987, **41**: 1~17.
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59** (1): 143~169.
- [3] Muyzer, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 695~700.
- [4] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology. *Antoni Van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 127~141.
- [5] Zhou J, Mary B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 316~322.
- [6] Tsai Y L, Betty H O. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**: 2292~2295.
- [7] Erik J, van H, Gabriel Z, et al. Changes in Bacterial and Eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 795~801.
- [8] Fischer S G, Lerman L S. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels; correspondence with melting theory. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 1983, **80**: 1579~1583.