

DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用

宫曼丽 任南琪* 邢德峰

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

摘 要 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和温度梯度凝胶电泳(TGGE)是近些年微生物分子生态学研究中的热点技术之一。由于 DGGE/TGGE 技术具有可靠性强、重现性高、方便快捷等优点,被广泛地应用于微生物群落多样性和动态性分析。文章对 DGGE/TGGE 技术原理与关键环节、局限性和应用前景进行了综述。

关键词 变性梯度凝胶电泳,温度梯度凝胶电泳,微生物多样性,微生物分子生态学

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)06-0845-04

在环境监测和废弃物综合治理过程中需要探明有关微生物学信息,因此揭示特定生境下的微生物群落的遗传多样性和动态性是研究的重要内容。目前自然界中只有极少部分微生物能够被分离和纯化,若以这极少部分的微生物来代表环境和处理系统中复杂的微生物群体将导致极大的误差^[1,2]。因此,用传统的微生物培养和鉴定方法不足以代表微环境中的真实情况。

基于 DNA 指纹技术的分子生物学研究手段,例如限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)^[3]、末端限制性片段长度多态性分析(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)^[3]、单链构象多态性分析(Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)^[4]等逐步被引入到环境微生物学研究中,已经将环境微生物领域研究带入一个革命性的新时代。变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)^[5,6]和温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)^[7]技术直接利用 DNA 及 RNA 对微生物遗传特性进行表征,不但避免了传统上耗时的菌种分离,更可进而鉴定出无法利用传统方法分离出来的菌种。这一技术所分析出的微生物群落多样性使我们能够快速、准确地鉴定自然生境或人工生境中的微生物个体,并进行复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态性、重要基因定位、表达及调控的评价分析。这终将有助于建立更完整的系统操作模式,提高生物处理系统的稳定性,推动和深化环境整治工作,合理利用环境资源。

1 DGGE/TGGE 的发展和原理

DGGE 技术是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术。它的分辨精度比琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳更高,可以检测到一个核苷酸水平的差异。1985 年 Muzyers 等^[8]首次在 DGGE 中使用“GC

夹板”和异源双链技术,使该技术日臻完善。1993 年 Muzyers 等^[6]首次将 DGGE 技术应用于分子微生物学研究领域,并证实了这种技术在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和种群差异方面具有独特的优越性。由于 DGGE 技术避免了分离纯化培养所造成的分析上的误差,通过指纹图谱直接再现群落结构,目前已经成为微生物群落遗传多样性和动态性分析的强有力工具。此外,基于相同原理,又相继出现了用温度梯度代替化学变性剂的温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE)^[9]、瞬时温度梯度凝胶电泳(Temporal Temperature Gradient Gel, TTGE)等技术。

DNA 分子双螺旋结构是由氢键和碱基的疏水作用共同作用的结果。温度、有机溶剂和 pH 等因素可以使氢键受到破坏,导致双链变性为单链。DGGE 技术检测核酸序列是通过不同序列的 DNA 片段在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化,导致电泳速度的急剧下降,最后在其相应的变性剂梯度位置停滞,经过染色后可以在凝胶上呈现为分散的条带。该技术可以分辨具有相同或相近分子量的目的片段序列差异,可以用于检测单一碱基的变化和遗传多样性以及 PCR 扩增 DNA 片段的多态性。TGGE 技术的基本原理与 DGGE 技术相似,含有高浓度甲醛和尿素的凝胶温度梯度呈线性增加,这样的温度梯度凝胶可以有效分离 PCR 产物及目的片段。TGGE 技术与化学变性剂形成梯度的 DGGE 技术相比,梯度形成更加便捷,重现性更强。

该技术主要包括以下步骤:①样品的采集;②样品总 DNA 提取及纯化;③样品 16S rDNA 片段的 PCR 扩增;④预实验(主要是对扩增出的 16S rDNA 片段的解链性质及所需的化学变性剂浓度范围或温度梯度范围进行分析);⑤制胶;⑥样品的 DGGE/TGGE 分析。下面以 DGGE 技术为例进行说明。

2 DGGE 技术的关键环节和系统优化

根据变性剂梯度方向的不同,DGGE 可分为:①垂直

基金项目:国家 973 项目(G2000026402);国家 863 计划(2003AA515030);黑龙江省自然科学基金攻关项目(GZ03C314)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-451-86282008 E-mail: jidx3@public.hr.hl.cn

作者简介:宫曼丽(1979-),女,黑龙江人,博士研究生,主要从事环境微生物学、生物制氢工程技术研究。E-mail: log66@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-03-04,修回日期:2004-04-15

DGGE 其变性剂梯度同电场方向垂直,常用的变性剂浓度梯度范围比较宽,如 0% ~ 100%, 20% ~ 70%。主要用于试验决定分离野生型和突变型的最佳变性剂梯度范围;②平行 DGGE 其变性剂的梯度同电场的方向平行,常用的变性剂浓度梯度范围则比较窄,以便更好的分离 DNA 片段。主要用于解链范围明确的 DNA 片段的检测。目前应用在环境微生物样品分析的主要是平行 DGGE。若使 DGGE 技术对 DNA 片段达到最佳的分离效果,必须了解与待测 DNA 片段相关的解链性质。选择适合检测该 DNA 片段的最理想的变性剂浓度范围以及电泳时间。

2.1 最佳变性剂梯度的选择

为使仅有一个碱基之差的不同 DNA 片段取得最佳的分离效果,可以用垂直变性梯度实验来选择所要研究的 DNA 片段的解链性质、变性剂浓度梯度。在垂直变性梯度电泳实验中,电泳方向与变性剂梯度线性增加方向垂直。加样孔是一个占胶板整个宽度的单一大孔(与梯度方向平行)。从低浓度变性剂的一侧进胶的 DNA 片段,由于未与变性剂发生作用, DNA 片段未解链, DNA 以双链分子形式迁移较远。DNA 片段在高浓度变性剂一侧进胶后在电泳过程中几乎不能移动,此时 DNA 分子已大部分解链,单链 DNA 分子在电场中停止运动。中等变性剂浓度导致 DNA 片段不同的解链程度,因此会停留在胶板的不同位置,观察到中等移动速率的 DNA 片段。电泳后经染色处理, DNA 片段经凝胶成像系统呈现出一条清晰的“S”型曲线。变性剂梯度范围应选在垂直实验曲线斜率较大的部分,这时多数分子处于部分变性状态,此时的位置相当于它所代表的解链区域的 T_m (解链温度)值,这使得落入低温解链区的不同分子达到最佳分离状态。这种电泳胶提供了有关 DNA 片段解链区数目及相对 T_m 值的信息。选择水平胶的条件可包括 T_m 左右约 10°C 的范围内, 10°C 相当于 30% 范围的变性剂。根据这些要点便可设计具有多个样品孔的平行变性梯度胶,在最佳条件下进行靶片段的分析。

2.2 最佳电泳时间和温度的确定

DGGE 系统要求在聚丙烯酰胺凝胶中对待测 DNA 片段进行电泳,电泳的温度要低于待测解链区域 T_m 值。对绝大多数天然的 DNA 片段 50 ~ 65°C 是比较适合的。最佳解链温度是由平行凝胶电泳实验确定的。变性剂梯度由胶板的顶端向底端线性增加,电泳方向平行于变性剂梯度变化方向。平行 DGGE 技术适用于多个样品的比较分析。样品分析之前,首先要将待测样品以恒定的时间间隔在同一块胶版上点样跑胶。根据 DNA 片段的分辨情况来确定电泳时间。电泳的时间长短与系统的电压密切相关,一般来讲采用低电压,则电泳时间要长一点,采用高电压则相反。DNA 片段为 200bp 左右,通常在电压为 150V 时,电泳 4h 可以达到良好的分离效果。

目前,计算机程序预测解链性质,节省了对目标 DNA 片段的分析所占用的大量时间。这些程序以寡核苷酸溶解性的研究及解链理论为基础,可模拟和任何已知序列 DNA 解

链温度有关的解链行为、最佳凝胶电泳时间及任何碱基改变对解链图象产生的预期影响。可用 WinMelt/MacMelt(<http://www.medprobe.com/es/melt.html>), TGGE-STAR(<http://www.charite.de/bioinf/tgge/>)和 Poland analysis(<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>)等软件进行分析。

2.3 “GC 夹板”技术

由于 DNA 分子中的 G、C 碱基对要比 A、T 碱基对结合得牢固,因此 G、C 含量高的区域具有较高的解链温度。基于这一原理,“GC 夹板”(GC-clamp)技术是将一段长度为 30 ~ 50bp 富含 G、C 的 DNA 碱基片段附加到双链的一端以形成一个人工高温解链区。这样, DNA 片段的原有部分就处在低温解链区从而可以实现更好的分离。常规的 DGGE/TGGE 电泳技术对于长度超过 500bp 的 DNA 片段的序列变化情况,只能有 50% 的检出率^[8]。应用“GC 夹板”技术可使检出率提高到 100%^[8,10]。表 1 中列出了常用的“GC 夹板”碱基片段。

表 1 常用的“GC 夹板”碱基片段

| Table 1 Oligonucleotide base fragments used for GC clamp | |
|--|------------|
| Sequence (5'→3') | References |
| CGCCCGCCCGCGCGCGGGGGGGGGCGGGGACGGGGG | 11, 12, 13 |
| CGCCCGCCCGCGCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCG | 14, 15, 16 |
| CGCCCGCCCGCGCCCGCGCCCGTCCGCGCCCGCCCGCGCG | 17 |

DGGE/TGGE 电泳技术中,“GC 夹板”技术的引入方式主要有两种:一种是应用含有“GC 夹板”的特定引物进行 PCR 扩增,此方法要使用校对功能的聚合酶(Proof reading polymerase)以防止引入人为突变。另一种是在 PCR 反应中加入“GC 夹板”;“GC 夹板”在此反应中充当接头或夹式引物。

2.4 染色和测序

核酸电泳后需要进行染色才能呈现出带型和指纹图谱,最常用的是溴化乙锭染色法和银染法。由于聚丙烯酰胺对溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)具有熄灭作用,因此导致灵敏度大为降低,人为缩小了微生物多态性,导致分析误差。同时 EB 是强致变剂,不利于身体健康。银染法是通过银离子(Ag^+)可与核酸形成稳定的复合物,再使用还原剂如甲醛使银离子(Ag^+)还原成银颗粒,可把核酸电泳带染成黑褐色,其灵敏度比 EB 高 200 倍,是目前最灵敏的方法。但银染法,不易回收 DNA,无法进行后续的杂交分析。近年来,相继出现了 SYBR Gold, SYBR Green I 和 SYBR Green II 等新一代荧光核酸凝胶染料^[18],这类染料的背景极低,可以帮助更好的观察微量的条带。致突变性远低于 EB 数倍甚至数十倍,几乎具有银染的超高灵敏度。由于该染料渗透入凝胶的速度极快,无须脱色,因此使染色过程更加简便,节省时间。虽然这种染料价格比较昂贵,但还是一类具有良好应用前景的荧光染料。显色后,凝胶上的条带可以在回收后用于测序,也可直接进行凝胶的杂交分析。

3 DGGE/TGGE 技术在微生物分子生态学中的应用

息,从而解决了传统方法的片面性,在分析环境微生物群落多样性和动态性方面迅速得到了应用。DGGE 技术已经被广泛用于活性污泥^[19,20]、生物膜^[21]、土壤^[22]、底泥^[16]等环境样品中的微生物多样性检测、微生物鉴定、微生物变异以及种群演替等方面的研究。Donner 等^[23]对动态变化的浮游变化层中的群落结构的演替过程进行了追踪。试验表明纤维素酶和脂酶的活性变化与不同取样点水样中细菌的 16S rDNA 片段 PCR 扩增产物的 DGGE 谱图具有高度的一致性。Santegoeds 等^[24]利用微生物传感器和 PCR-DGGE 技术相结合,对生物膜形成过程中微生物种群的变化情况进行了分析。DGGE 谱图中逐渐增加的条带表明,经过定向的生物演替作用,微生物种类在生物膜中渐渐丰富起来。Teske^[25]采用 DGGE 法分析了硫酸盐还原菌在时空分布的变化。通过利用寡核苷酸探针与 DGGE 产物的杂交表明,硫酸盐还原菌可在缺氧和微好氧条件下存活。Rowan^[26]采用生物滴滤反应器和生物滤池处理同种废水,运用 DGGE 考察了不同反应器中的氨氧化细菌菌群的组成。虽然不同形式反应器或是同一反应器的不同位置中的氨氧化细菌菌群组成不同,但是主要种群是不依赖反应器的形式或是在反应器中所处的位置不同而改变的,也正是这些主要种群在整个处理过程中发挥着重要的作用。此外,DGGE/TGGE 技术还在监测功能基因的表达、rDNA 编码基因微小异源性差异检测、克隆文库筛选等方面都有很好的应用。

4 DGGE/TGGE 技术应用的局限性

理论上,只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等足够精细,DGGE/TGGE 技术对于 DNA 片段的分辨率可以达到一个碱基差异水平。但是,Nallaey 等^[27]发现 DGGE 法并不能对样品中所有的 DNA 片段进行分离。Muyzer 等^[6]指出 DGGE 法只能对微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群进行分析。此外,不同的 DGGE/TGGE 实验条件很可能导致不同的带型谱图。这无疑对序列信息的探针设计和系统发育分析都有一定的影响。

待测样品的预处理过程是 DGGE/TGGE 技术能否发挥效能的关键步骤。这一步骤也是实验误差的主要来源。很多因素都会影响样品 DNA 的提取过程,比如,待测细胞是否充分裂解;一些抑制 DNA 降解的物质是否完全去除等。此外,在 PCR 扩增过程中,如何避免优先扩增,使所有模板以均等的几率被扩增,基因组的大小、引物的设计以及扩增程序的选择均对扩增后 DNA 片段的质量和数量有很大的影响。这些都间接影响 DGGE/TGGE 的分析结果。

另外,基于 16S rDNA 扩增的 DGGE/TGGE 法以及克隆技术在分析微生物种群差异方面,如果细菌存在多个 rDNA 操纵子,或者利用简并性引物在 PCR 中获得的双链 DNA 片段,则可能夸大种群差异和扩大群落的多态性。此外,DGGE/TGGE 技术不能提供有关微生物活性的信息。

5 展望

尽管 DGGE/TGGE 技术具有以上局限性,但其重现性强、

可靠性高、速度快、能够弥补传统方法分析微生物群落的不足,已成为现代微生物学领域一种重要研究手段。在国内 DGGE/TGGE 技术在微生物分子生态学中的应用还处于起步阶段,借助于标记基因的 PCR 扩增技术以及 rRNA 和 mRNA 为靶序列,DGGE/TGGE 技术能够再现微生物群落多样性,获得微生物在时间和空间上的动态信息。由分子生物技术所测得的微生物种类及其数目可用于建立更完整的微生物种群动力学模式,可提高污染物处理的稳定性及提供处理效率不佳时的解决方法。因此,充分了解 DGGE/TGGE 技术的基础背景和局限性,结合其他分子生物学技术是诊断和评价复杂微生物群落的种群结构及其动态学最有前景的技术手段。

参 考 文 献

- [1] Ward D M, Bateson M M, Weller R, et al. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv Microb Ecol*, 1992, **12**: 219 - 286.
- [2] Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, **37**: 463 - 464.
- [3] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4516 - 4522.
- [4] Stach J M, Bathe S, Clapp J, et al. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **36**: 139 - 151.
- [5] Zhang T, Fang H P. Digitization of DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnology Letters*, 2000, **22**: 399 - 405.
- [6] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695 - 700.
- [7] Felske A, Wolterink A, Lis R, et al. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **30**: 137 - 145.
- [8] Myers R M, Fischer S G, Lerman L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 3131 - 3145.
- [9] Riesner D, Henco K, Steger G. Temperature gradient gel electrophoresis: a method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. *Advances in Electrophoresis*, 1991, **4**: 169 - 250.
- [10] Sheffield V C, Cox D R, Myers R M. Attachment of a 40bp G + C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 232 - 236.

- [11] Reuzinger N K , Farnleitner A , Wandl G , *et al.* Molecular biological methods(DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment. *Wat Sci Technol* , 2003 , **47** (11) : 165 – 172.
- [12] Ueno Y , Haruta S , Ishii M , *et al.* Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2001 , **57** : 65 – 73.
- [13] Haruta S , Cui Z , Huang Z , *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2002 , **59** : 529 – 534.
- [14] Hannen E J , Mooij W , Agterveld M P , *et al.* Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system : qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** (6) : 2478 – 2484.
- [15] Hannen E J , Zwart G , Agterveld M P , *et al.* Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** (2) : 795 – 801.
- [16] Ferris M J , Muyzer G , Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 340 – 346.
- [17] Cocolin L , Manzano M , Cantoni C , *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** (11) : 5113 – 5121.
- [18] Akkermans A D , Elsas J D , Bruijn F J. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht , Netherlands : Kluwer Academic Publishers , 1997 , 1 – 29.
- [19] Liu W T , Chan O C , Fang H P. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Wat Res* , 2002 , **36** : 3203 – 3210.
- [20] Fang H P , Zhang T , Liy Y. Characterization of an acetate-degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen. *Wat Res* , 2002 , **36** : 3211 – 3218.
- [21] Zhang T , Fang H P. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2001 , **57** : 437 – 440.
- [22] Donnell G O , Görres H E. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* , 1999 , **10** : 225 – 229.
- [23] Donner G , Schwarz K , Hoppe H G , *et al.* Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Arch Hydrobiol Spec Issues Advanc Limnol* , 1996 , **48** : 7 – 14.
- [24] Santegoeds C M , Muyzer G , Beer D. Successional processes in a bacterial biofilm determined with microsensors and molecular techniques. In : Proceedings Part I of the ' International Symposium Environmental Bio-technology ' Ostend. Belgium : Ghent University Publishers , 1997 , 77 – 82.
- [25] Teske A , Sigalevich P , Cohen Y , *et al.* Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 4210 – 4215.
- [26] Rowan A K , Snape J R , Fearnside D , *et al.* Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol Ecol* , 2003 , **43** : 195 – 206.
- [27] Vallaeys T , Topp E , Muyzer G , *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol Ecol* , 1997 , **24** : 279 – 285.

Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Temperature Gradient Gel Electrophoresis in Microbial Molecular Ecology

GONG Man-Li REN Nan-Qi* XING De-Feng

(School of Municipal and Environmental Engineering , Harbin Institute of Technology , Harbin 150090 , China)

Abstract : In recent years , denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) are well-established molecular tools in microbial molecular ecology that allows the study of diversity and dynamics of microbial communities. The technique is reliable , reproducible rapid and inexpensive. Here , the principle , the limitations and potentials application of DGGE/TGGE techniques are introduced in this paper.

Key words : DGGE , TGGE , Microbial diversity , Microbial molecular ecology

Foundation items : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(G2000026402) ; Chinese National Program for High Technology Research and Development(2003AA515030) ; Hei Longjiang Natural Science Foundation Program(GZ03C314)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-451-86282008 ; E-mail : jidx3@public.hr.hl.cn

Received date : 03-04-2004