

红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析

王岳坤^{1,2} 洪葵^{1*}

(¹中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101)

(²中国热带农业科学院橡胶研究所 儋州 571737)

摘 要 :从土壤中抽提微生物总 DNA ,直接扩增 16S rDNA V3 片段 ,应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和分子克隆技术分析 16S rDNA V3 片段的多态性 ,发现地域因素和红树品种都是影响土壤细菌群落结构的因素。通过对杯萼海桑土壤 16S rDNA V3 片段 PCR 产物两个 DGGE 条带进行分子克隆、序列测定和 Blast 分析 ,发现每个 DGGE 条带包含着许多不同的 16S rDNA V3 片段 ,并且其中多数为 NCBI 未收录的序列。这表明 DGGE 和克隆技术相结合的方法是研究土壤微生物群落结构的一种可行方法。

关键词 红树林土壤 ,16S rDNA ,DGGE

中图分类号 :Q938 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)02-0201-04

由于在实验室培养的菌种仅占自然界中细菌种类的极小部分 ,应用传统的微生物分离培养方法研究土壤微生物种群构成导致了严重的微生物多样性丢失。不经微生物分离培养步骤 ,直接从土壤中抽提总 DNA ,分析其中 16S rDNA 的序列多态性 ,以此反映微生物的种群构成 ,是近 10 年来逐步发展起来的方法。此研究方法有效克服了传统方法的缺点 ,它所揭示的土壤微生物种群结构更加复杂多样。

红树林是热带亚热带陆地与海洋潮间带的木本植物群落 ,具有重要的生态地位和宝贵的生物资源。海南清澜港红树林自然保护区的红树植物品种多 ,分布面积广 ,是研究红树林土壤微生物种群结构的理想地区。本实验在该红树林保护区采集了 19 种土壤样品 ,分别抽提土壤样品的总 DNA ,通过 PCR 扩增总 DNA 中的 16S rDNA V3 片段 ,运用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 PCR 产物中 16S rDNA V3 片段的多态性 ,并对其中一个土壤样品 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 凝胶条带回收 DNA ,并克隆、测序和 Blast 分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 :19 种红树林土壤样品取自海南清澜港红树林自然保护区头苑镇保护区管理站附近河口 ,坐标 19°27'N ,110°44'E ,采样深度 5~20cm ,取样

时间为 2003 年 7 月。每种土样采自不同红树植物的土壤。它们是 :①木榄 ;②木果楝 ;③桐花木 ;④红树 ;⑤海漆 ;⑥角果木 ;⑦海莲 ;⑧尖瓣卤蕨 ;⑨老鼠勒 ;⑩黄槿 ;⑪榄李 ;⑫杯萼海桑 ;⑬白骨壤 ;⑭大叶海桑 ;⑮海桑 ;⑯银叶树 ;⑰水黄皮 ;⑱卤蕨 ;⑲海芒果。根据采样地点之间的距离 ,19 种土样共分 6 个组(1~3 为 I 组 ,4~6 为 II 组 ,7~10 为 III 组 ,11~15 为 IV 组 ,16~18 为 V 组 ,19 为 VI 组) ,组内各土样采样地点之间距离小于 30m ,组间各土样采样点之间距离大于 100m。

1.1.2 主要试剂和引物 :试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 购自美国 Promega 公司 ,PCR Fragment Recovery Kit 购自 TaKaRa ,PCR 产物分离仪为美国 C. B. S. 公司生产的 DGGE-2001。PCR 引物^[1,2](338F-GC :5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCACCAGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' ,518R 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 提取 DNA

1.2.1 抽提土壤总 DNA :①取 20g 土壤 ,冷冻抽干过夜 ,然后将土壤转移至研钵中 ,加适量的液氮研磨 ,重复 3 次。②称取已研磨的土壤 5g 于三角瓶 ,加入 13.5mL 抽提缓冲液 ,按参考文献 [2,3] 的方法抽提土壤 DNA ,得到 DNA 粗提液 500 μ L。

1.2.2 纯化土壤总 DNA :①用 5mol/L NaCl 溶液调

基金项目 :863 海洋生物技术青年基金(2002AA628140)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-898-66984969 ;E-mail hongkui@scuta.edu.cn

作者简介 :王岳坤(1969-),男 ,广东普宁人 ,助理研究员 ,硕士 ,主要从事微生物分子生态学。Tel 86-898-23301554 ;E-mail :xwangky@126.com

收稿日期 :2004-08-12 ,修回日期 2005-01-04

整 DNA 粗提液的 NaCl 浓度至 0.7mol/L,加入 0.1 体积的 CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB,0.7mol/L NaCl),65℃水浴 20min。用氯仿/异戊醇(24:1)抽提,直至看不到界面的污染物质。加异丙醇沉淀 DNA,离心后用 100 μ L 无菌水溶解 DNA^[4]。②将得到的 DNA 溶液用 1% 琼脂糖凝胶电泳,将 6~23kb 的 DNA 条带用 PCR Fragment Recovery Kit 纯化土壤 DNA。

1.3 16S rDNA V3 片段 PCR 扩增

PCR 体系:无菌双蒸水 30.7 μ L,10 \times PCR 缓冲液(含 MgCl₂) 5.0 μ L,4 \times dNTP 混合物(2.5mmol/L) 4.0 μ L,引物 338 F-GC(10pmol/ μ L) 2.0 μ L,引物 518 R(10pmol/ μ L) 2.0 μ L,模板 DNA(1 \times 10⁻³ pmol/ μ L) 1.0 μ L,BSA(2%) 5.0 μ L,Taq DNA 聚合酶 2 U。PCR 反应条件参考文献[25]进行。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,切出 200~250bp 的条带放置于 2.0mL 离心管中,加入 0.6mL NaI 溶液,65℃水浴 15min,凝胶完全融化后,用试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 进行回收。

1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

应用 DGGE-2001 仪器分离 PCR 产物。使用 6.5% 丙烯酰胺凝胶(37.5:1),电泳缓冲液为 1 \times TAE,变性梯度 20%~70%,PCR 纯化产物 7 μ L+6 \times Loading buffer 2 μ L。电压 200V,60℃,电泳 2.5h,银染^[6]。摄影后切出 12 号样品 A、B 两个条带,放置于 1.5 μ L 离心管。

1.5 基因克隆和序列分析

①从 DGGE 条带中回收 DNA:加 100 μ L 洗脱缓冲液(0.5mol/L 乙酸铵,10mmol/L 乙酸镁,1mmol/L EDTA,0.1% SDS)于放有 DGGE 条带的离心管,37℃水浴 5h;12000r/min 离心 10min,取上清液^[7];用试剂盒回收 DNA。②以纯化物为模板,按 1.3 节所述方法进行 PCR 扩增并纯化 PCR 产物。③将 PCR 纯化物用 TaKaRa pMD18-T Vector 进行克隆,得到文库 A 和文库 B。④从文库 A 中挑取 13 个克隆子,从文库 B 挑出 9 个克隆子,由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

将含两端引物(去除 G-C 夹)的 16S rDNA V3 高变区克隆子序列,通过 NCBI 查找比对(Blast 分析),选取与克隆子序列最相似的 1 个 GenBank 收录序列,用 DNAMAN 3.0 软件分析克隆子序列与 GenBank 收录序列的相似性、空位数和每空位碱基数量。

2 结果

2.1 土壤总 DNA 直接抽提

将土壤总 DNA 抽提物用 1% 的琼脂糖凝胶进行

电泳,发现 1~4 号、16~19 号总 DNA 抽提物主要在 6~23kb 范围出现条带,而 5~13 号总 DNA 抽提物在 2~50kb 范围出现条带,并且所有总 DNA 抽提物在点样孔都残留部分 DNA。为获得比较真实反映微生物种群多样性的总 DNA,将凝胶中所有 6kb 以上的 DNA 条带、残存在点样孔中的 DNA 全部回收。

2.2 16S rDNA 片段的扩增

将土壤总 DNA 纯化物的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,发现所有以总 DNA 纯化物为模板的 PCR 反应都获得特异性扩增片段,长度在 200~250bp。

2.3 DGGE 分离 16S rDNA V3 片段 PCR 产物

应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3 片段 PCR 产物,可以看到分离为若干条带,但不同土壤样品的 16S rDNA V3 片段 PCR 产物出现的带型有一定差别(图 1、图 2)。

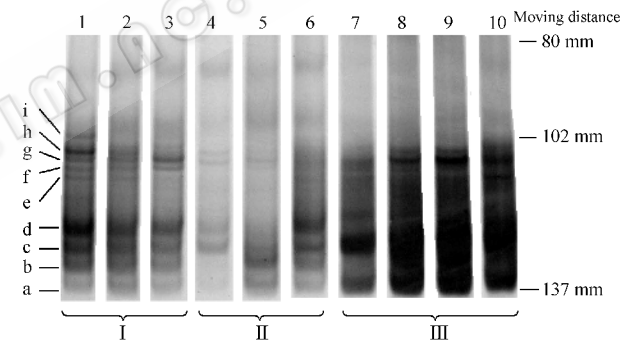


图 1 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析

Fig.1 DGGE analysis of 16S rDNA V3 fragments PCR products amplified from soil-DNA extracts

1. *Bruguiera gymnorhiza* soil;
2. *Xylocarpus granatum* soil;
3. *Aegiceras cormiculatum* soil;
4. *Rhizophora apiculata* soil;
5. *Excoecaria agallocha* soil;
6. *Ceriops tagal* soil;
7. *Bruguiera sexangula* soil;
8. *Acrostichum speciosum* soil;
9. *Acanthus ilicifolius* soil;
10. *Hibiscus tiliaceus* soil.

从 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱发现在 I 组、III 组、IV 组、V 组和 VI 组土样中,除 12 号土样外,同组土样的 DGGE 图谱有很大的相似性,不同组土样的 DGGE 图谱有较大的差异性,可见地域因素是影响土壤细菌种群构成的重要因素。II 组 3 种土样的 DGGE 图谱表现较大的差异,12 号土样与 IV 组其它土样的 DGGE 图谱也表现较大差异,由此可见红树品种是影响土壤细菌种群构成的另一重要因素。

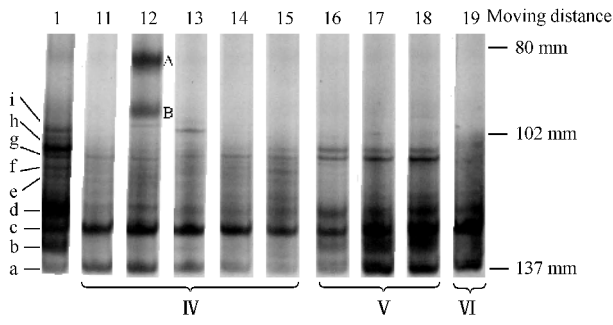


图2 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析

Fig.2 DGGE analysis of 16S rDNA V3 fragments PCR products amplified from soil-DNA extracts

1. *Bruguiera gymnorrhiza* soil; 11. *Lumnitzera racemosa* soil; 12. *Sonneratia alba* soil; 13. *Avicennia marina* soil; 14. *Sonneratia ovata* soil; 15. *Sonneratia caseolaris* soil; 16. *Heritiera littoralis* soil; 17. *Pongamia pinnata* soil; 18. *Acrostichum aureum* soil; 19. *Cerbera manghas* soil.

表1 测序克隆序列与其 GenBank 最相似序列的比对结果

Table 1 Alignment of sequenced clone to its most-similar GenBank sequence

Sequenced clones	Length of 16S rDNA V3 fragments/bp	GenBank accession number	Aligned site in GenBank sequence	Similarity rate/%	Number of inserted (+) or dropped (-) nucleotides in each gap in sequenced fragment	Source of the most similar GenBank sequence
A-1	195	AF286031	345 ~ 539	90	0	Uncultured bacterium
A-2	195	AF432743	304 ~ 484	88	+ 14	Uncultured bacterium
A-3	197	AF223299	309 ~ 504	92	+ 2, - 1	Uncultured gamma proteobacterium
A-4	194	AF420337	347 ~ 542	87	- 2	Uncultured proteobacterium
A-5	195	AY082461	316 ~ 511	89	- 1	Uncultured delta proteobacterium
A-6	195	AJ292682	316 ~ 494	83	+ 15	Uncultured eubacterium
A-7	193	AY013671	1 ~ 193	92	0	Uncultured bacterium
A-8	193	AF445112	292 ~ 484	93	0	Uncultured bacterium
A-9	195	AJ012598	323 ~ 517	88	0	Sulfate - reducing bacterium
A-10	195	AF286031	345 ~ 539	90	0	Uncultured bacterium
A-11	195	AF286031	345 ~ 539	90	0	Uncultured bacterium
A-12	172	U96446	179 ~ 350	97	- 1	<i>Navicula salinicola</i>
A-13	167	AF423206	320 ~ 486	92	0	Uncultured bacterium
B-1	195	AF365479	300 ~ 494	94	0	Uncultured bacterium
B-2	166	AJ496448	300 ~ 486	92	- 3, - 17, - 1	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
B-3	171	AJ347768	329 ~ 498	88	+ 1	Uncultured division OP11 bacterium
B-4	170	AF005750	324 ~ 493	95	0	Uncultured bacterium
B-5	170	AF234144	305 ~ 474	91	0	Uncultured bacterium
B-6	170	AF365839	321 ~ 489	94	+ 1	Uncultured bacterium
B-7	169	AY307924	301 ~ 469	100	0	<i>Aminobacter</i> sp.
B-8	169	AF431534	301 ~ 469	97	0	Uncultured actinobacterium
B-9	169	AF432689	299 ~ 467	95	0	Uncultured bacterium

3 讨论

红树植物在生长过程中不断从土壤中吸收 SO_4^{2-} 并以硫化物的形式累积于体内,其枯枝落叶归还土壤后,经微生物作用产生 H_2S 等致酸物质,使土壤呈酸性^[8],所以土壤的理化性质与红树林群落的凋落物数量有很大关系。尽管不同红树品种由于耐盐和耐水淹能力不同从海到陆呈带状分布,但在具体区域不同树种混杂一起。海潮的冲击,使植物凋落物具有较大移动性,所以同一区域土壤其理化

2.4 克隆子序列的 Blast 分析

对 12 号土样 16S rDNA V3 片段 PCR 产物 DGGE 凝胶 DNA 条带 A 和 B 进行克隆,分别挑取 13、9 个白色单菌落进行 DNA 测序和 Blast 分析(表 1),发现:(1)克隆子 A-1、A-10、A-11 的序列完全相同,与 GenBank 的收录序列 AF286031 的相似率达 90%,所以这 3 个克隆子都是同一种未培养细菌的 16S rDNA V3 片段。(2)在测序的 20 个不同序列中,只有克隆子 B-7 与 NCBI 收录序列 AY307924(来源于 *Aminobacter* sp.)的相似率达 100%,可见 12 号土样 DGGE 凝胶 DNA 条带 A 和 B 的克隆子绝大多数为未培养细菌的 16S rDNA V3 片段。

性质和细菌群落有一定的相似性,而在海潮没有淹没并且不同品种红树植物混杂程度不高的区域,土壤的理化性质和细菌群落因不同红树品种而异。本实验 4、5、6、12 号土壤样品由于采样点不被海潮淹没并且周围红树植物距离较远,所以土壤细菌种群构成有较大的差异。

利用 DGGE 分离 PCR 产物,一般要求 PCR 产物的 DNA 长度在 500bp 以下,否则 DGGE 的分辨率下降,而判断微生物所属的系统类群,要求分析的 16S rDNA 片段长度至少达到 500bp^[9]。目前多数研究都

是扩增土壤细菌 16S rDNA 相对于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 16S rDNA 338 ~ 518bp 的片段或者 968 ~ 1401bp 的片段^[10,11]。Nakatsu 等^[10]发现:16S rDNA 338 ~ 518bp 片段的 DGGE 图谱和 16S rDNA 968 ~ 1401bp 片段的 DGGE 图谱所反映的细菌多样性有一定的差异。目前没有具体的资料证明选用 16S rDNA 哪个片段作为靶标比较可靠,但是选择 16S rDNA 968 ~ 1401bp 片段作为靶标,因为分析 DNA 长度接近于 500bp,它所代表的细菌的分类地位基本可以确定,所以它能提供更加完善的细菌种群信息。

利用 DGGE 分离 16S rDNA 的 PCR 产物,从梯度凝胶 DNA 条带的数量、条带中 DNA 浓度及条带的分布来分析土壤细菌的群落特征,是一种快速研究土壤微生物群落的方法。尽管分子克隆是分离 DNA 最有效的方法,但如果不经 DGGE 直接通过分子克隆分离以土壤总 DNA 为模板的 PCR 产物,就必须通过大量的 DNA 测序来获得土壤总 DNA 的信息,不仅需要投入大量人力,而且实验费用成倍增加。因此,先运用 DGGE 对 PCR 产物初步分离,获得大致的土壤细菌群落特征后,再对部分目标条带进行分子克隆和测序,可能是比较可行的途径。

参 考 文 献

[1] 陈 灏,唐小树,林 洁,等. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究. 微生物学报, 2002, 42 (4):478 - 483.

- [2] 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 coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59 (3): 695 - 700.
- [3] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 97 - 101.
- [4] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998, 37 - 40.
- [5] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, *et al.* Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(11): 4396 - 4402.
- [6] Heuer H, Hartung K, Wieland G, *et al.* Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16s rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 1045 - 1049.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [8] 龚子同, 张效补. 中国的红树林与酸性硫酸盐土. 土壤学报, 1994, 31(1): 86 - 93.
- [9] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriology*, 1998, 180(18): 4765 - 4774.
- [10] Nakatsu C H, Torsvik V, Vreas L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J*, 2000, 64: 1382 - 1388.
- [11] Smalla K, Wieland G, Buchner A, *et al.* Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4742 - 4751.

Mangrove soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment polymerase chain reaction products

WANG Yue-kun^{1,2} HONG Kui^{1*}

(¹ Institute of Tropical Biological Sciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agroecological Science, Haikou 571101, China)

(² Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agroecological Science, Danzhou 571737, China)

Abstract: The 16S rDNA V3 fragment polymerase chain reaction products amplified from mangrove soil-DNA extracts were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by clone technology. Regional factors and mangrove species were found to influence the soil microbe community. Two DNA slices separated on denaturing gradient gel from *Sonneratia alba* soil sample were recovered and the recovered DNA were used to establish two clone libraries. Some clones were sequenced and each sequence was compared with all nucleotide sequences in GenBank database. Most cloned sequences were found not in GenBank database. These results suggest that DGGE followed by clone technique is a practicable protocol to research the complex community of soil microbe.

Key words: Mangrove soil, 16S rDNA, DGGE