

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):524-531; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

引物应用策略:基于 2 对古菌 16S rRNA 基因通用引物对环境样品古菌多样性分析

刘国辉^{1,3}, 吴后波^{2*}, 李翔², 颜文¹

¹中国科学院边缘海地质重点实验室,中国科学院南海海洋研究所,广州 510301

²中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室,广州 510301

³中国科学院研究生院,北京 100049

摘要:【目的】找到适宜的 16S rRNA 基因通用引物应用策略,应对复杂环境微生物多样性调查,尤其目前高速发展的高通量测序技术带来的巨大挑战。【方法】用 Oligocheck 软件分别将两对引物的古菌 16S rRNA 基因通用引物与 RDP (Ribosomal database project) 数据库中古菌 16S rRNA 基因序列进行匹配比对。用两对引物分别构建海洋沉积物样品的古菌 16S rRNA 基因文库。【结果】软件匹配结果显示引物 f109/r958 与目的基因的匹配程度高于引物 f21/r958。该结果与古菌 16S rRNA 基因文库 RFLP 分析、古菌多样性指数分析结果相吻合。数据还表明,2 对引物的综合文库能更好满足该沉积物样品的古菌多样性分析。【结论】选用与数据库中目的基因匹配性高的通用引物和多个引物的联合使用,可以有效提高环境样品微生物多样性调查的分辨率。

关键词: 古菌,古菌通用引物,16S rRNA 基因,环境样品,多样性分析

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0524-08

原核生物基因组至少含有 1 个或多个 16S rRNA 基因^[1]。16S rRNA 基因大小约 1.5 k 个碱基,大小适于系统发育学分析。16S rRNA 基因由保守区和可变区组成,保守区通常用来设计引物和探针,可变区在不同分类阶元上差异明显,主要用于系统发育学分析^[2]。16S rRNA 基因二级结构由多个臂环组成,包括多个功能域^[3],可提供更详细的分类信息。但是,随着非培养分子手段发展,尤其测序技术的革命,RDP (Ribosomal database project) 数据库数据呈指数增长,使得先前认为保守的引物变得

不再保守。一个合理的引物对于环境微生物多样性的分析至关重要,虽然单个碱基的错配可以通过降低退火温度来弥补^[4],但是同 1 个引物不同位置的错配可造成 PCR 结果 3 个数量级的差别^[5]。

本文采用 2 个调查环境样品古菌多样性常用的通用引物^[6-14],分析它们与 RDP 数据库中部分古菌 16S rRNA 基因序列的匹配率,结合这两对引物所构建海洋沉积物样品的 16S rRNA 基因文库的数据,检验计算机模拟匹配是否与 2 个古菌 16S rRNA 基因文库 RFLP 分析、古菌多样性指数分析以及古菌

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-211-03, KZCX2-YW-GJ03); 中国科学院南海海洋研究所创新领域前沿项目 (lyqy200312)

* 通信作者。E-mail: wuhoubu@scsio.ac.cn

作者简介: 刘国辉 (1982-), 男, 山东省烟台市人, 博士研究生, 主要从事海洋环境与分子微生物学研究。E-mail: wsw@scsio.ac.cn

收稿日期: 2010-10-29; **修回日期:** 2011-01-11

系统发育学分析结果相吻合。根据检验结果,提出 16S rRNA 基因通用引物应用策略,给以后环境样品微生物多样性研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 沉积物样品的采集:2007 年 8 月南海北部海洋观测开放航次的抓斗取样,采自海南岛东部近岸的 501 站位(18°59.995'N,110°41.835'E),水深 74 m,沉积物为黑色的砂质样品,采集后 -20℃ 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 扩增仪(Bio-Rad),DNA 回收纯化试剂盒(TAaKaRa),电泳仪(广州正一),内切酶(TaKaRa),凝胶成像仪(Bio-Rad),PMD18-T(TaKaRa),感受态 DH5 α (TaKaRa)。

1.2 两对古菌通用引物计算机模拟匹配

用 ReverseComplement 软件对两对引物的反向引物的进行处理,然后用 Oligocheck 软件(<http://www.bioinformatics-toolkit.org>)将引物序列与 RDP 数据库中部分古菌 16S rRNA 基因序列进行比对,得到这 2 对通用引物与 RDP 数据库中古菌 16S rRNA 基因序列的匹配率,这 2 对古菌通用引物的详细信息见表 1。

表 1 2 对古菌 16S rRNA 通用引物的详细信息

Table 1 particular information of two archaea

16S rRNA universal primers

Primers	Primer sequences(5'→3')	Reference
21f	TTCCGGTTGATCYGCCGGA	[6]
958r	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	[6]
109f	ACKGCTCAGTAACACGT	[7]

K = G or T, M = A or C, Y = C or T

1.3 DNA 的提取和纯化

沉积物总 DNA 的提取,在 zhou 等的^[15]基础上改进。取 2 g 沉积物样品,加入 6 mL DNA 提取缓冲液[100 mmol/L Tris-HCL (pH = 8.0), 100 mmol/L Na₂-EDTA (pH = 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 0.5% CTAB, 1% PVPP, 100 mmol/L Na₃PO₄ 和 200 mg/L 蛋白酶 K],涡旋 3 min 后,在摇床水浴振荡 30 min (37℃, 225 r/min),加入溶菌酶(终浓度 1 g/L)后振荡 30 min,然后加入 1 mL 20% SDS 经 60℃ 水浴 300 min, 6000 × g 离心 10 min,将上清液移入新的离心管。沉淀重复抽提 2 次,收集 3 次上清液于同一离心管中,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混匀,9000 × g 离心 25 min,将上层水相移入新的

离心管,再加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),9000 × g 离心 25 min,将上层水相移入新的离心管。加入 0.6 倍体积异丙醇,于 -20℃ 沉淀 60 min。在 4℃, 9000 × g 离心 25 min,弃上清,沉淀用 70% 的乙醇洗 2 次,吹干。溶解于 100 μ L TE 溶液。琼脂糖电泳切胶回收,试剂盒纯化。

1.4 PCR 扩增

50 μ L PCR 反应体系:25 μ L Extaq,顺反引物各 2 μ L,模板 1 μ L,用双蒸水补足至 50 μ L。PCR 条件:95℃ 3 min,94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,25 个循环,72℃ 延伸 10 min。扩增完毕后采用 Reconditioning PCR^[16]:取十分之一的 16S rDNA PCR 产物为模板,用与上次 PCR 扩增相同的反应体系进行 3 个循环扩增。

1.5 16S rDNA 文库的构建和 RFLP 分析

将 Reconditioning PCR 得到的扩增产物克隆到 T-Vector,转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞里,进行蓝白斑筛选,通过菌落 PCR 的方法筛选阳性克隆子。每个文库各选择 150 个阳性克隆子用于分析。扩增的插入片段用 *Hea*III 内切酶进行酶切,用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测,分析酶切后条带的谱型,对不同的谱型进行分类统计并将序列送深圳华大公司测序。

1.6 2 对引物的古菌 16S rRNA 基因文库多样性和系统发育学分析

1.6.1 文库多样性分析:将测序结果提交到 RDP II 数据库,在线进行嵌合体检验(Chimera-Check),剔除明显具有嵌合体特征的序列。将得到的序列相似性大于 97% 为一个可操作分类单元(Operational Taxonomic Units OTUs)。计算样品多样性指数^[17]:香浓-威纳指数(Shannon-Wiener H')、辛普森指数(Simpson D)、均匀度指数(J)和 Chao1 指数。文库稀释曲线(rarefaction Curve)分析由 Mothur 软件(<http://www.mothur.org>)完成。

1.6.2 文库系统发育学分析:用 BLAST 程序将所有序列在 NCBI 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)中比对,得到相似性最高的序列并保存。将序列提交到 Greengenes 数据库分类平台(<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>),根据输出结果选择最佳分类模式,选取最佳分类模式中各分枝序列为对照。选用一株已知的细菌为外群,用 ClustalX (Version 1.8)将以上全部序列比对以及剪切,用 MEGA4.1 构建系统发育树,采用 Neighbor-

Joining 建树方法, 建树结果进行 Bootstrap1000 次系统检验。将所得到的古菌 16S rRNA 基因片段提交到 GenBank 数据库, 序列登录号码: HM171830 至 HM171889。

2 结果和分析

2.1 计算机模拟匹配结果

表 2 2 对引物分别与 RDP II 数据库中序列匹配百分率

Table 2 Match percentage of two pieces of primers with RDP archaeal database

Mismatch [*]	Primer f21/r958 match percentage			Primer f109/r958 match percentage		
	Archaea	Euryarchaeota	Crenarchaeota	Archaea	Euryarchaeota	Crenarchaeota
0	13.7	8.7	35.3	33.7	38.7	20.0
1	39.2	32.5	67.4	66.9	59.5	87.5
2	47.3	39.8	79.4	89	87	94.4
3	55.2	48.4	83.8	93.5	91.8	98.1

mismatch^{*} is the number of base mismatch between primers and sequences of RDP archaeal 16S rRNA gene

2.2 2 种引物的古菌 16S rRNA 基因文库序列数据分析结果

f21/r958 引物的 16S rRNA 基因文库 *Hea* III 酶切得到 39 种带型, f109/r958 引物的 16S rRNA 基因文库中得到 56 种带型。这说明 f109/r958 引物能得到更多的古菌多样性, 这与计算机软件模拟的结果吻合。除去测序失败的克隆子序列和疑似嵌合体的序列, f21/r958 引物扩增的 16S rRNA 基因文库最后得到 138 个有效克隆子, f109/r958 引物扩增的 16S rRNA 基因文库最后得到 129 个有效的克隆子。

将所选择的 2 对引物与 RDP II 数据库中部分古菌 16S rRNA 基因序列比对发现, 引物 f109/r958 与数据库中古菌 16S rRNA 基因序列的匹配程度在 0-3 的错配限度下普遍高于引物 f21/r958 (表 2), 仅在错配限度 0 时, 泉域古菌全匹配率少于引物 f21/r958。计算机模拟结果显示, 引物 f109/r958 可能得到比引物 f21/r958 更丰富的古菌多样性。

f109/r958 文库香浓-威纳指数 (H')、辛普森指数 (D')、均匀度指数 (J)、Chao1 指数多样性均高于 f21/r958 文库, 这与计算机模拟匹配结果吻合。f21/r958 和 f109/r958 综合文库多样性均多于 f21/r958 和 f109/r958 单个文库 (表 3)。从 3 个稀释曲线的分析结果可以看出, 3 个文库稀释曲线都随着古菌克隆子取样数增多斜率变小, 趋近水平 (图 1)。但是, 结合稀释曲线的趋势和 OTUs 的数目分析, f109/r958 文库稀释曲线比 f21/r958 文库稀释曲线更能反映环境样品古菌多样性, 这与计算机模拟匹配结果符合。

表 3 3 个文库的多样性指数

Table 3 Diversity index of three clone libraries

Clone library	Clones	OTUs	I/D	H'	J	Chao1
f21/r958 library	138	21	0.023	2.70	0.85	29
f109/r958 library	129	38	0.032	3.40	0.86	46
f21/r958 + f109/r958 library	267	54	0.045	3.46	0.87	64

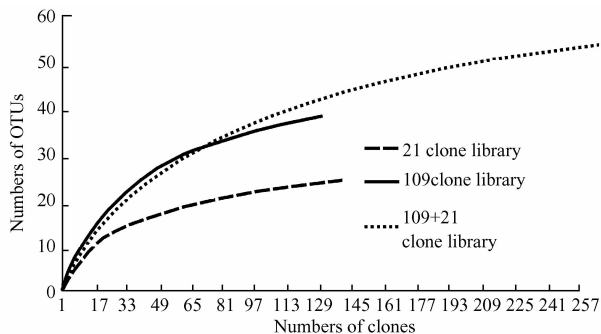


图 1 3 个文库的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction Curve of three clone library.

2.3 2 古菌 16S rRNA 基因文库系统发育学分析结果

将 2 个文库得到的 16S rRNA 基因序列输入 Greengenes 古菌数据库进行分类, 根据输出结果, 发现 Hugenholtz 分类模式可以将所得环境样品古菌更好地分类。从 Hugenholtz 分类系统中选取所有典型分枝中序列作为外群来构建系统发育树, 系统发育树在宏观上分为泉域古菌 (图 2) 和广域古菌 (图 3) 2 大分支。其中 f21/r958 文库与 f109/r958 文库中泉域古菌为优势菌分别占文库克隆子总量的 95.7% 和 82.2%, Hugenholtz 分类系统输出数据显

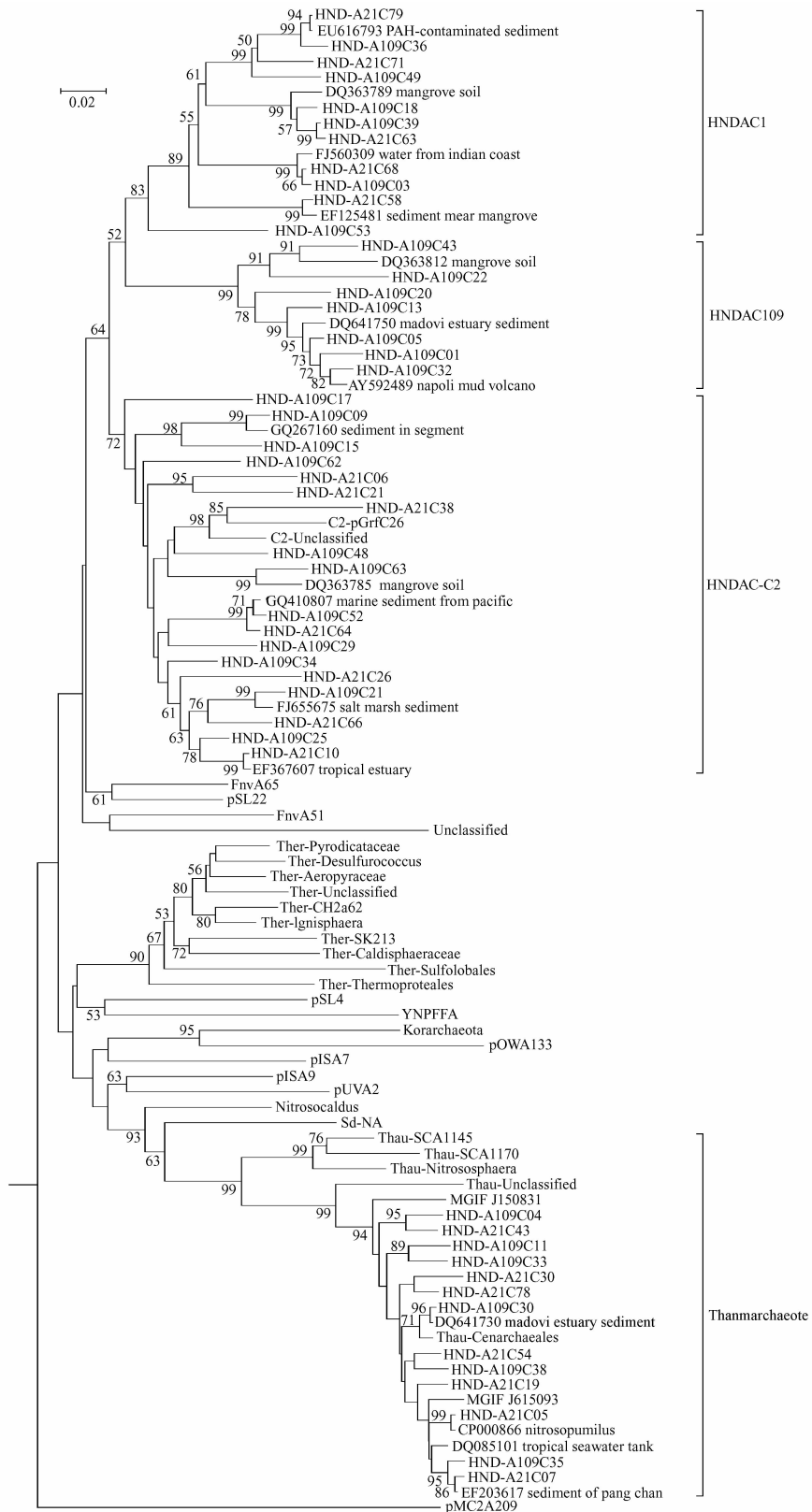


图 2 海南岛东部沉积物泉古菌 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of crenarchaeota 16S rRNA gene from the sediment of eastern Hainan island. The numbers at the nodes indicate the bootstrap value. Bootstrap value > 50%. Bar, 2% indicates the genetic distance in the NJ tree. "HND-AXXXCXX" is sequence name in this paper.

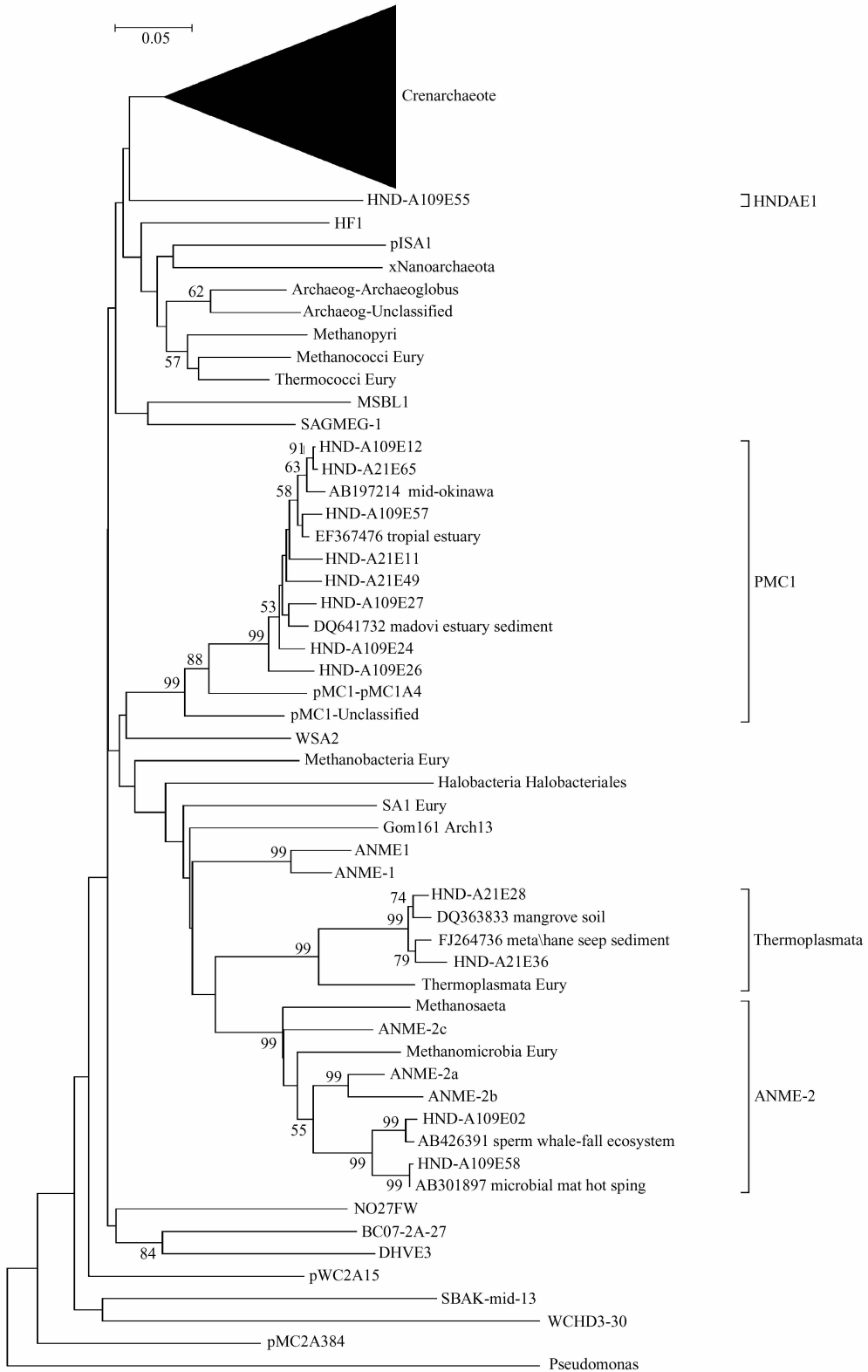


图3 海南岛东部沉积物广古菌 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of euryarchaeota 16S rRNA gene from the sediment of eastern Hainan island. The numbers at the nodes indicate the bootstrap value. Bootstrap value >50%. Bar, 5% indicates the genetic distance in the NJ tree. "HND-AXXXEXX" is sequence name in this paper.

示 HNDAC1、HNDAC109、HNDAC-C2 和 *Thaumarchaeota* 这 4 个分枝属于泉域古菌门(图 2)。*Thermoplasmata*、HNDAE1、PMC1 和并且 ANME-2 这 4 个分支归属于广域古菌门(图 3)。其中 HNDAC1、HNDAC109、HNDAC-C2 这 3 个分枝归类为 C2 这个分枝。在 Hugenholtz 分类系统 C2 分枝中的 2 个亚分枝(C2-unclassified 和 C2-PGrC26)中各选取序列,构建系统发育树的结果显示这 2 个亚分枝序列都在 HNDAC-C2 这个分枝内,由此可以推侧

HNDAC1 和 HNDAC109 这 2 个分枝在 Hugenholtz 分类系统中可能是以前未归类新的分枝。HNDAC109、HNDAE1 和 ANME-2 这 3 个分枝仅在 f109/r958 文库文库中被探测,*Thermoplasmata* 仅在 f21/r958 文库中被探测(见表 4)。引物 f21/r958 文库得到古菌 Hugenholtz 分类系统中 5 个分枝,其中 3 个为泉域古菌,2 个为广域古菌;引物 f109/r958 文库得到 7 个分枝,其中 4 个为泉域古菌,3 个为广域古菌。

表 4 Hugenholtz 分类系统下 3 个文库克隆子和 OTUs 统计表

Table 4 Clone and OTUs number of three library in taxonomy system of Hugenholtz

Clone library		HNDAC1	HNDAC109	HNDAC-C2	Thaumarchaeota	HNDAE1	PMC1	Thermoplasmata	ANME-2	Total
21 library	clones	32	0	31	69	0	4	2	0	138
	OTUs	5	0	7	7	0	3	2	0	24
109 library	clones	23	18	28	37	1	17	0	5	129
	OTUs	6	7	11	6	1	5	0	2	38
21 + 109 library	clones	55	18	59	106	1	21	2	5	267
	OTUs	8	7	17	10	1	7	2	2	54

3 讨论

近几十年,随着分子生物学的发展,分子生态学研究者逐渐发现仅用一种引物很难全面分析复杂环境中微生物多样性,但很少有研究者用多种不同引物进行定量分析^[13]。本研究所用 2 对古菌通用引物是环境样品古菌多样性调查常用引物,其中 f21/r958 多用于海水和海洋沉积物样品调查^[6-9],f109/r958 常见于淡水和土壤古菌多样性研究^[19]。也有研究者用单一引物对海洋和淡水环境古菌多样性进行分析^[12],很少有学者将这两对引物用于同一环境样品古菌多样性分析。目前,仅意大利学者用 T-RFLP 方法将 f21/r958 和 f109/r915 用于深海沉积物古菌多样性的比较研究^[13],发现 f109/r915 得到更多的多样性结果,这个结论与本文的结果类似。用多序列比对软件 ClustalX (Version 1.8) 查看两个文库所得到的引物部分序列片段与引物序列之间的差异,发现两个文库所有序列都未发生非特异性扩增,f109/r958 文库所有序列 109 - 125 碱基都与 f109 引物序列吻合。这说明 PCR 过程中,同引物匹配和非匹配序列之间的竞争性,导致非匹配的序列

很难被检测得到,从而降低了环境样品古菌多样性的分辨率。所以,根据 RDP 数据库实时更新的序列数据,结合生物信息学方法设计更加全面、高效的引物尤为重要^[18]。f21/r958 文库中 47% 的 OTUs 序列 109 - 125 碱基与 f109 引物有一个以上的碱基错配,这说明引物 f109/r958 无法获得 f21/r958 文库部分古菌的多样性。所以,两对引物联合用于环境样品研究,才能更好满足该沉积物样品的古菌多样性分析需要。另外,除了引物与环境微生物 16S rRNA 基因匹配性以外,PCR 扩增过程中的效率和还受引物的退火温度、引物二级结构、引物序列的长度、G + C 的含量以及环境样品本身特异性的影响。只有综合考虑这些因素,才能应对调查复杂环境微生物多样性的挑战。

参考文献

- [1] Silvia G Acinas, Luisa A Marcelino, Vanja Klepac-Ceraj, Martin F Polz. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 2629-2635.
- [2] Lane D, Pace B, Olsen GJ, Stahl D, Sogin M, Pace N.

- Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1985, 82:6955-6959.
- [3] Teng LJ, Hsueh PR, Huang YH, Tsai JC. Identification of *Bacteroides thetaiotaomicron* on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 1727-1730.]
- [4] Ishii K, Fukui M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:3753-3755.
- [5] Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real time PCR; the 16S rRNA example. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (5) : 1660-1663.
- [6] Delong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1992, 89:5685-5689.
- [7] Grosskopf R, Janssen P, Liesack W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64:960-969.
- [8] Winter C, Moeseneder MM, Herndl GJ, Weinbauer MG. Relationship of geographic distance, depth, temperature, and viruses with prokaryotic communities in the eastern tropical Atlantic Ocean. *Microbial Ecology*, 2008, 56: 383-389.
- [9] Collins G, O'Connor L, Mahony T, Gieseke A, Beer D, O'Flaherty V. Distribution, localization, and phylogeny of abundant populations of Crenarchaeota in anaerobic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:7523-7527.
- [10] Kim BS, Oh HM, Kang H, Chun J. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43:144-151.
- [11] Yan B, Hong K, Yu ZN. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. *The Journal of Microbiology*, 2006, 44:566-571.
- [12] Galand PE, Lovejoy C, Vincent WF. Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 2006, 44:115-126.
- [13] Luna GM, Stumm K, Pusceddu A, Danovaro R. Archaeal diversity in deep-sea sediments estimated by means of different terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) protocols. *Current microbiology*, 2009, 59:356-361.
- [14] Kieft TL, McCuddy SM, Onstott TC. Geochemically generated, energy-rich substrates and indigenous microorganisms in deep, ancient groundwater. *Geomicrobiology Journal*, 2005, 22:325-335.
- [15] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:316-322.
- [16] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30:2083-2088.
- [17] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43:1-11.
- [18] Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, 2009, 4 (10) : e7401. doi: 10.1371/journal.pone.0007401.
- [19] Chan CO, Claus P, Casper P, Ulrich A, Lueders T, Conrad R. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic Archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environmental Microbiology*, 2005, 7: 1139-1149.

A series of excellent strategy to analyze environmental sample archaeal diversity

Guohui Liu^{1,3}, Houbo Wu^{2*}, Xiang Li², Wen Yan¹

¹Key Lab of Marginal Sea Geology, South China Sea Institute and Guangzhou Institute of Geochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

²Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

³Graduate school of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [**Objective**] Finding a series of archaeal 16S rRNA gene universal primer applied strategies to detect complex microbial diversity in environmental samples, especially with rapidly development of next generation sequencing technology challenge. [**Methods**] We used Oligocheck soft to simulate two pairs of archaeal 16S rRNA gene universal primers with RDP (Ribosomal database project) database 16S rRNA gene sequences matching percentage. In succession, the sediment sample was constructed for two clone libraries by using two pairs of archaeal 16S rRNA gene universal primers. [**Results**] The soft simulation matched percentage result suggests that primer f109/r958 is better than primer f21/r958. This result is consistent with RFLP and diversity index analyses by two clone libraries. [**Conclusion**] Multi-primers and properly primer are used to recovery environmental microbiology diversity, which will be advanced in environmental microbial resolution.

Keywords: Archaea, Archaeal universal primer, 16S rRNA gene, Environmental sample, diversity analyses

(本文责编: 张晓丽)