微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(12):1585 - 1594; 4 December 2011
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用

贾仲君

中国科学院南京土壤研究所,土壤与农业可持续发展国家重点实验室,南京 210008

摘要:稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP(Stable isotope probing),是将复杂环境中微生物物种组成及其生理功能耦合分析的有力工具。微生物的体积在 μm 尺度,因此,自然环境中微生物群落在 μm 尺度下生理过程的发生、发展,其新陈代谢物质在环境中累积与消减的动力学变化规律,形成了微生物生理生态过程,决定了不同尺度下生态系统物质和能量的良性循环。利用稳定性同位素示踪复杂环境中微生物基因组 DNA,实现了单一微生物生理过程研究向微生物群落生理生态研究的转变,能在更高更复杂的整体水平上定向发掘重要微生物资源,推动微生物生理生态学和生物技术开发应用。本文重点探讨了 DNA-SIP 的技术原理、主要技术瓶颈及对策,初步展望了 DNA-SIP 为基础的环境微生物基因组学发展趋势。

关键词: 微生物生理生态学,稳定性同位素核酸探针技术,DNA-SIP,环境基因组学

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2011)12-1585-10

在纯培养体系中,组学技术可在基因组、转录组和蛋白组水平清楚阐释单一微生物菌株的重要生理过程。然而,特定微生物的生理代谢功能是与其它生物及自然环境长期相互作用的结果。因此,在群落水平研究微生物在复杂环境中重要生理过程的分子调控机制,能更为准确地认知微生物多样性形成的机制、驱动力及可能的演化方向。与纯培养体系相比,自然环境中微生物具有极其丰富的多样性,在整体水平上清楚认知复杂环境中微生物群落生理代谢过程的分子机制具有较大难度。例如,就微生物数量而言,现有技术条件下,每克土壤最多含有 100 亿个微生物细胞,而且绝大多数微生物目前难以培养[1]。从这些难以计数的微生物中,直接甄别复杂环境中微生物的物种组成及其生理功能,认知难培养微生物的作用,单就技术角度而言,在 20 年前也是难以想象的[2]。稳定性同位素核酸探针技术则能有效克服这一难点,在群落水平揭示复杂环境中重要微生物生理生态过程的分子机制。

稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP(DNA-based stable isotope probing),是采用稳定性同位素示踪复杂环境中微生物基因组 DNA 的分子生态学技术。2000 年英国 J. Colin Murrell 教授实验室采用 ^{13}C-甲醇培养森林土壤,成功获得 ^{13}C-DNA,发现甲基营养微生物以及酸性细菌具有同化甲醇的能力[3],开拓了稳定性同位素示踪环境微生物基因组 DNA 的研究领域。过去 10 年来,DNA-SIP 技术在微生物生态学和生物技术领域得到广泛关注和应用,是耦合微生物遗传多样性与代谢多样性最有力的工具之一。然而,DNA-SIP 技术仍处于一种定性描述阶段,有效分离稳定性同位素标记 DNA、定量

基金项目:国家自然科学基金委重大项目(41090281);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-BR-06,KSCX2-EW-G-16);科技部国际科技合作与交流项目(2010DFA22770)

作者简介:贾仲君(1974 -),男,山西霍州人,博士,研究员,主要从事土壤微生物研究。Tel: +86-25-86881311; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jia@issas.ac.cn

收稿日期:2011-05-05;修回日期:2011-07-04

判定其标记程度仍是主要技术难点[4]。本文重点探讨了稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 的原理、主要技术瓶颈、对策及其与新一代测序技术相结合的发展前景。

1 DNA-SIP 技术原理

DNA-SIP 技术的基本原理与 DNA 半保留复制实验类似[5],主要区别在于后者以纯菌为研究对象,证明子代 DNA 源于父代 DNA,而前者主要针对微生物群落,揭示复杂环境中参与标记底物代谢过程的微生物作用者。除磷以外,几乎所有具有生物学意义的元素均有 2 种或更多的稳定性同位素。一般而言,重同位素或轻同位素组成的化合物具有相同的物理化学和生物学特性,因此,微生物可利用稳定性重同位素生长繁殖。由于合成代谢是所有生命的基本特征之一,碳氮是生命的基本元素,采用稳定性同位素如^{13}C-标记底物培养环境样品,利用标记底物的环境微生物细胞不断分裂、生长、繁殖并合成^{13}C-DNA,提取环境微生物基因组总 DNA 并通过超高速密度梯度离心将^{13}C-DNA 与^{12}C-DNA 分离后,进一步采用分子生物学技术分析^{13}C-DNA,将能揭示复杂环境样品中同化了标记底物的微生物作用者,将特定的物质代谢过程与复杂的环境微生物群落物种组成直接耦合,在微生物群落水平,以^{13}C-物质代谢过程为导向,发掘重要功能基因,揭示复杂环境中微生物重要生理代谢过程的分子机制。

DNA-SIP 的技术核心是超高速密度梯度离心分离稳定性同位素标记和非标记 DNA。如图 1 所示,根据我们的经验,氯化铯介质中超高速离心后 2 个相邻梯度区带的浮力密度差为 0.004 – 0.006 g/mL。理论上,浮力密度差大于0.012 g/mL 的两种 DNA 离心后相隔一个区带,能被有效分离。因此,影响 DNA 浮力密度的两个因素是 DNA-SIP 技术的关键:(1)DNA 被稳定性重同位素标记的程度;(2)微生物基因组 GC 含量。如表 1 所示,理论计算表明,与自然丰度同位素(^{12}C^{14}N)组成的脱氧核糖核苷酸相比,稳定性重同位素^{13}C 取代轻同位素导致其分子量增加约 2.8% – 3.1%,浮力密度增加大约为0.051 g/mL;由于核苷酸分子中氮原子数远低于碳原子,^{15}N-标记仅导致 DNA 分子量增加约 0.62% – 1.51%,浮力密度约增加0.02 g/mL。需要注意的是,不同实验室中氯化铯介质的初始离心密度略有不同[5-6],理论计算的浮力密度增加值与实验值存在细微的差异[7-8]。其次,DNA 在氯化铯介质中的浮力密度与其 GC 含量呈正比[9],自然环境中蕴含着数量巨大、类型多样的微生物群落,其 GC 含量可能在 30% – 70%,甚至更大的区间变化。GC 含量 30% 和 70% 的 DNA 浮力密度之差可达 0.0392 g/mL,几乎是^{15}N-DNA 浮力密度增加量的两倍。一般情况下,环境样品中的目标微生物很难被重同位素 100% 标记。因此,DNA-SIP 实验必须设计一个非标记底物处理的对照实验,提高实验可信度。最近有研究者根据双苯酰亚胺与 DNA 嵌合,改变其浮力密度并提高 DNA 分离精度的原理[10],首先通过超高速密度梯度离心从环境微生物基因组总 DNA 中分离获得重浮力密度 DNA,进一步将其与双苯酰亚胺混合后进行二次离心,可有效去除重浮力密度梯度区带中高 GC 含量的非标记 DNA 污染,获得高质量^{15}N-DNA[11]。

表 1 基于 DNA 元素组成的稳定性同位素核酸探针技术示踪原理

Table 1 Elements that constitute nucleic acids and some properties that are important for SIP

Deoxyribonucleotide	Nucleotide unit					MW(^{12}C^{14}N)	Increase in MW/%	
	C	H	N	O	P		^{13}C	^{15}N
Deoxyadenylate, dAMP	10	14	5	6	1	331.2	3.019	1.510
Deoxyguanylate, dGMP	10	14	5	7	1	347.2	2.880	1.440
Deoxythymidylate, dTMP	10	15	2	8	1	322.2	3.104	0.621
Deoxycytidylate, dCMP	9	14	3	7	1	307.2	2.930	0.977

2 DNA-SIP 技术要点

DNA-SIP 包括 4 个主要步骤:标记底物培养环境样品;环境微生物基因组总 DNA 超高速密度梯度离心;不同浮力密度梯度区带中^{13}C-DNA 的富集程度鉴定;^{13}C-DNA 的下游分析。以土壤甲烷氧化过程为例,DNA-SIP 的具体技术路线如图 1 所示,采

用^{13}C-CH_4 培养土壤，土壤中氧化甲烷的微生物利用标记底物生长并合成^{13}C-DNA；提取土壤微生物基因组总 DNA，包括甲烷氧化微生物的^{13}C-DNA 和没有利用^{13}C 的微生物^{12}C-DNA，超高速离心后形成氯化铯密度梯度区带，获得由轻到重不同浮力密度 DNA；采用分子指纹图谱、荧光实时定量 PCR 等技术分析不同浮力密度 DNA 的微生物物种组成和数量，特别是比较^{13}C-CH_4 处理与^{12}C-CH_4 处理的重浮力密度 DNA，即可根据微生物群落结构的差异，明确鉴定^{13}C-DNA 在重浮力密度 DNA 中的富集程度；进一步对^{13}C-DNA 开展针对性的分子分析，揭示参与标记底物代谢过程的微生物群落。最近以^{15}N 和^{18}O 为基础的 DNA-SIP 技术也被成功应用于微生物生态研究[12-14]，但目前绝大多数研究采用^{13}C-底物，除非特别标注，本文以下内容中稳定性同位素特指^{13}C。

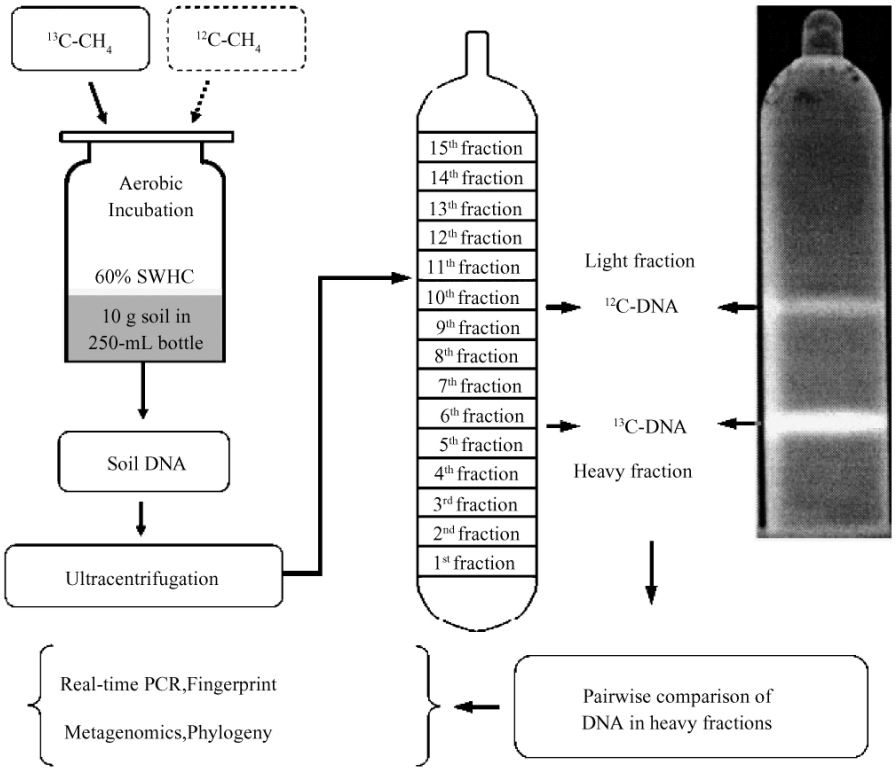

图 1 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 示意图[3]

Fig. 1 A schematic diagram of DNA-based stable isotope probing procedure targeting methanotrophic bacteria. The labeled substrate of $^{13}CH_4$ is used for incubation of soil microcosm, in which the ^{13}C label will be incorporated into genomic DNA of active microbial population actively growing on the labeled substrate. After extraction of soil DNA, ^{13}C-DNA in heavy fractions can be seperated from ^{12}C-DNA in light fractions by isopycnic centrifugation. It is generally found that ^{13}C-DNA is often resolved in heavy DNA fraction-5, 6, and 7. Subsequently, the pairwise comparison of microbial community structures in heavy DNA fractions from $^{13}CH_4$-labeled microcosm and from $^{12}CH_4$-control microcosm will provide strong evidence for the enrichment of ^{13}C-DNA in heavy DNA fractions and linking methane oxidation process with taxonomic identity of active microorganisms in complex soil. The ultracentrifugation tube shows the separation of ^{12}C and ^{13}C DNA obtained from pure cultures[3]

2.1 标记底物培养环境样品

环境样品培养体系中，^{13}C-底物和代谢产物的动态变化规律是表征微生物生理生态过程及其强度的关键参数，也是判定环境样品中^{13}C-DNA 数量及丰度的重要参考。培养体系中外源^{13}C-底物越多，产生的目标微生物^{13}C-DNA 可能越多，标记程度越高。然而，原位研究微生物在自然环境的生理代谢过程要求样品尽可能保持原始状态，尽可能降低外来干扰。因此，理想的培养实验是采用最少的^{13}C-底物培养环境样品，得到最小量的、但超高速密度梯度离心能有效分离的^{13}C-DNA[15]。研究表明土壤氨氧化微生物同化0.7 μmol的^{13}C-CO_2 即可获得足够

量的^{13}C-DNA[16]，然而^{13}C-底物在环境中的转化规律远比纯培养体系复杂，目前技术条件下很难准确定量被微生物同化的^{13}C-底物数量及其与^{13}C-DNA之间的关系。此外，考虑到地球不同环境显著的生态位地理分异，巨大的微生物多样性和复杂的微生物生理代谢差异，很难将 DNA-SIP 培养条件标准化，如底物浓度、培养时间，培养温度等。因此，一般通过预备实验监测底物及其代谢产物的变化规律，针对不同实验目的，优化培养条件。此外，通过破坏性采样，比较不同培养时间下标记微生物的变化规律，也可以显著提高 DNA-SIP 可信度。

2.2 环境微生物基因组总 DNA 超高速密度梯度离心

如图 1 所示，利用超高速密度梯度离心技术即可将环境微生物基因组总 DNA 中的^{13}C-DNA 与^{12}C-DNA 有效分离。超高速离心所使用的最佳 DNA 量取决于：(1)单位质量环境微生物基因组总 DNA 中^{13}C-DNA 的比例及^{13}C 丰度；(2)超高速离心后^{13}C-DNA的最小检测限。目前在这两方面的研究报道较少，超高速离心最佳 DNA 用量也没有明确的标准，但常见的 DNA 用量为2.0 μg[8]。超高速离心结束后，用常规的取代法，用针穿刺离心试管底部，然后在试管顶部扎入另外一个针头并通过软管与蠕动泵相连，将水溶液或矿物油以固定流速注入离心试管内，在离心试管顶部形成固定的压力，使得超高速离心形成的不同浮力密度梯度区带中的氯化铯溶液以恒定的流速依次从试管底部流出并收集，获得不同浮力密度 DNA。我们的经验表明：超高速离心后，将试管内的离心溶液分层为 14－16 或 22－25 个不同浮力密度梯度区带，后者对实验结果没有明显改善，但极大地提高了分子分析工作量。此外，环境样品中^{13}C-DNA 含量通常较低，通过加入一定量的非目标微生物纯菌基因组^{13}C-DNA，可能提高^{13}C-DNA 的分离效率[17]。然而，已知的非目标^{13}C-DNA 作为载体促进环境样品中未知的目标^{13}C-DNA 的分离，仍需进一步的定性与定量评价。

此外，溴化乙锭 DNA 染色并超高速离心后，可在紫外下直接观察^{13}C-DNA 条带的位置，进一步采用常规穿刺法即可获得^{13}C-DNA 进行下游分析。已有研究表明，将 2.5 μg 纯菌^{12}C-DNA 与 0.7 或 1.9 μg的^{13}C-DNA 混合离心后，既可在紫外下观察到较为清晰的^{13}C-DNA 条带信号，而0.1 μg的^{13}C-DNA 则无法看到明显条带[6]。通常情况下^{13}C-DNA 占环境微生物基因组总 DNA 的比例较小，在紫外下很难看到^{13}C-DNA 形成一个明亮的条带，而且紫外照射对 DNA 具有不可修复的损伤作用，很可能严重影响后续^{13}C-DNA 分子分析。因此，目前溴化乙锭 DNA 染色获得^{13}C-DNA 的方法较少使用[6]。

2.3 不同浮力密度 DNA 中^{13}C-DNA 的富集分析

准确判定超高速离心后不同浮力密度 DNA 中^{13}C-DNA 的富集程度，是 DNA-SIP 的技术核心和难点。如图 1 所示，超高速离心后形成由轻到重不同浮力密度的氯化铯梯度区带溶液，聚乙二醇去除氯化铯后即可获得不同浮力密度 DNA。然而，即使采用纯菌^{12}C-DNA 离心，重浮力密度梯度区带中仍能检测到 0.7% 左右的 DNA[8]，表明 DNA-SIP 标记处理的重浮力密度 DNA 中同时含有^{13}C 和^{12}C-DNA。质谱分析不同浮力密度 DNA 的^{13}C 丰度，是鉴定^{13}C-DNA 富集程度的最有效方法。然而，复杂环境样品中目标微生物特别是难培养微生物生长缓慢，合成的^{13}C-DNA 通常仅占环境微生物基因组总 DNA 很少一部分，超高速离心后重浮力密度 DNA 通常在 ng 水平，不能满足质谱分析要求。也有研究将环境微生物基因组总 DNA 与^{13}C-葡萄糖混合后，测定^{13}C 的原子丰度并初步推测 DNA-SIP 技术的可信度[8]。经验表明，环境微生物基因组总 DNA 中^{13}C丰度达到 20%[3]，或者^{15}N 达到 50%[12]，即可从环境微生物基因组总 DNA 中将标记 DNA 有效分离。然而，实际操作中可能更为复杂，以 DNA-SIP 研究土壤硝化微生物为例，在^{13}C-DNA 高度富集的重浮力密度 DNA 中，氨氧化细菌仅占微生物总量的 20%[16]，表明离心前的环境微生物基因组总 DNA 中^{13}C-DNA 的比例极可能低于 20%，其^{13}C 原子丰度很难达到 20% 的预期值。目前，分子指纹图谱和荧光实时定量 PCR 是判定超高速离心后不同浮力密度 DNA 中^{13}C-DNA 富集程度的主要技术，但这些方法在不久的将来极可能被新一代测序技术取代[18]。

2.3.1 分子指纹图谱：

分子指纹图谱是目前判定不同浮力密度 DNA 中^{13}C-DNA 富集程度的最常用方法。获得不同浮力密度 DNA 后，选择古菌或细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增，利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和限制性酶切终端片段多态性(T-RFLP)分析其微生物群落组成。通常情况下，

对于^{12}C-对照处理，不同浮力密度 DNA 的微生物分子指纹图谱相对稳定；对于^{13}C-标记处理，由于^{13}C-DNA 进入重浮力密度梯度区带，其微生物群落结构与轻浮力密度梯度区带具有明显差异。如图 2-A 所示，^{13}C-$NaHCO_3$ 培养河流生物膜 6 周，提取总 DNA 进行超高速离心后，重浮力密度梯度区带 -7 中 DNA 的分子指纹图谱与轻浮力密度梯度区带-8 和 10 具有明显差异，这种差异可能是由于^{13}C-DNA 被离心至重浮力密度梯度区带后引起的。此外，通过比较^{12}C 对照处理和^{13}C 对照处理重浮力密度 DNA 的分子指纹图谱，也能初步推测^{13}C-DNA 的富集程度，有效判定 DNA-SIP 技术的准确性。

然而，分子指纹图谱界定 DNA-SIP 技术的可靠性具有一定局限性。首先，分子指纹谱图方法的灵敏度较低。环境样品中微生物通常数以亿计，DGGE 和 T-RFLP 只能检测环境中数量上占优势的主要微生物类群，而 DNA-SIP 研究的微生物通常在数量上不占优势。因此，目标微生物^{13}C-DNA 很难对复杂环境中微生物 DNA 总量以及整体微生物群落结构产生根本性影响，导致 DGGE 或 T-RFLP 分子指纹图谱发生明显变化。此外，超高速离心后，GC 含量差异较大的 DNA 将分布在离心试管内的不同位置，特别容易形成较为弥散的 DNA“拖尾”现象[19]，使得^{12}C-DNA 遍布于离心试管内不同浮力密度梯度区带[8]，尽管没有明确的实验证据，但是对于大多数 DNA-SIP 实验，我们推测重浮力密度 DNA 中含有较多的^{12}C-DNA，分子指纹图谱方法很难检测到数量上不占优势的标记微生物的变化。如图 2-B 所示，在20℃下^{13}C-$NaHCO_3$ 培养河流生物膜 6 周，提取总 DNA 进行超高速离心后，重浮力密度梯度区带 -7 中 DNA 的 DGGE 图谱与轻浮力密度梯度区带(8 和 10)几乎雷同，无法推测重浮力密度梯度区带 -7 的 DNA 中是否富集了大量^{13}C-DNA；其次，分子指纹图谱技术本身重复性较差，不同浮力密度 DNA 分子指纹图谱的微小差异也可能来源于分析误差，不能提供令人信服的^{13}C-DNA 富集证据；最后，我们的研究结果清楚表明功能基因的 DGGE 分析不能明确鉴别^{13}C-DNA 在离心试管内的准确位置[16]，如图 2-C 所示，采用$^{13}CO_2$ 或$^{12}CO_2$ 并加入适量外源铵态氮培养土壤样品 4 周，理论上 2 种处理土壤总 DNA 中的硝化微生物功能基因 *amo*A-DGGE 图谱应完全一致($^{13}CO_2$ 与$^{12}CO_2$)，但图中所示结果恰好相反，而且超高速离心后$^{13}CO_2$ 处理的重浮力密度 DNA 分子指纹图谱与离心前总 DNA 基本一致，表明特异的目标微生物功能基因多样性较低，其分子指纹图谱在不同浮力密度 DNA 中的变化规律很难准确界定^{13}C-DNA 的富集程度，然而，功能基因的数量变化规律可能是目前鉴定不同浮力密度 DNA 中^{13}C-DNA 富集程度及其在离心试管中准确位置的最佳策略。

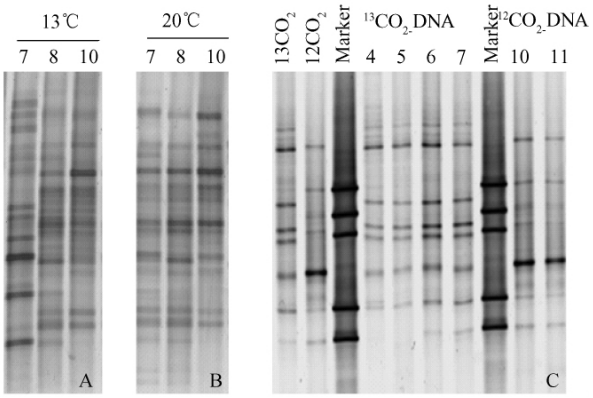

图 2 分子指纹图谱 DGGE 分析不同浮力密度 DNA 中微生物的组成变化规律

Fig. 2 DGGE fingerprints of 16S rRNA genes from DNA-SIP microcosms of stream biofilms incubated at 13℃ (A), 20℃ (B), and of bacterial *amo*A genes (C) from DNA-SIP microcosms of agricultural soil. The heavy DNA fractions refer to 4, 5, 6, and 7, while the light DNA fractions are indicated by 8, 9, 10 and 11. SIP microcosms of stream biofilm is incubated with ^{13}C-$NaHCO_3$ for 6 weeks (Sharon Avrahami, unpublished data), and $^{13}CO_2$ is used for soil microcosm incubation (Jia and Conrad, unpublished data). $^{13}CO_2$ and $^{12}CO_2$ represent DGGE fingerprints of bacterial *amo*A genes from total DNA extracts of labeled and control treatment, respectively. $^{13}CO_2$-DNA and $^{12}CO_2$-DNA indicate DGGE fingerprints of bacterial *amo*A genes from heavy DNA fractions of labeled treatment and light DNA fractions of control treatment, respectively.

2.3.2 荧光实时定量 PCR：荧光实时定量 PCR 可能是目前准确判定不同浮力密度 DNA 中^{13}C-DNA 富集程度的最佳策略。其基本思路是：超高速离心后，标记处理环境样品中的目标微生物^{13}C-DNA 将在试管下部重浮力密度梯度区带中相对富集，利用特异的 16S rRNA 或功能基因，通过定量分析目标微生物在不同浮力密度 DNA 中的数量变化规律，并与对照处理样品相比，根据目标微生物在不同浮力密度梯度区带中的位移，即可判定^{13}C-DNA 的富集

程度。如图3所示,利用$^{13}CO_2$或$^{12}CO_2$并加入适量外源铵态氮培养土壤,提取土壤微生物基因组总DNA并超高速离心后,对不同浮力密度DNA中的氨氧化细菌功能基因*amo*A进行定量分析,结果表明,$^{13}CO_2$处理土壤在浮力密度较重的DNA中检测出大量的*amo*A基因,而$^{12}CO_2$处理*amo*A基因主要富集于浮力密度较轻的DNA中,这一结果清楚表明氨氧化细菌基因组DNA被成功标记并得到有效分离[16]。理论上,采用目标微生物特异的任何标靶基因进行荧光实时定量PCR分析都能得到类似结果。

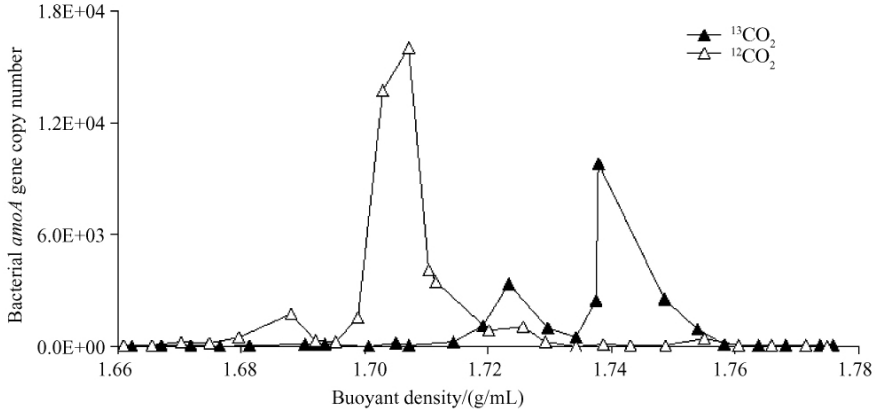

图3 荧光实时定量PCR分析不同浮力密度DNA中标记微生物的数量变化规律[16]

Fig. 3 Distribution of bacterial *amo*A gene copy numbers across the buoyant density of the DNA isolated from soil microcosms incubated with $^{13}CO_2$ or $^{12}CO_2$[16].

然而,采用特异引物的荧光实时定量PCR也具有一定的局限性,特别是标记微生物数量少,多样性高的条件下。例如,采用^{13}C-葡萄糖培养土壤样品,微生物葡萄糖代谢过程中产生大量的^{13}C-次生代谢产物,导致众多的不同微生物类群被^{13}C标记,很难采用单一的功能基因或16S rRNA基因特异引物,同时研究众多目标微生物在不同浮力密度DNA中的分布规律,新一代高通量测序技术则能有效应对这一技术难题[18]。此外,据估算90%-99%以上的环境微生物无法在实验室得到分离,绝大多数功能微生物在自然原位条件下的生理代谢途径仍不清楚。因此,我们无法得知哪一种微生物可能利用稳定性同位素标记底物,进而设计特异的功能引物,选择性地定量目标微生物,明确其在不同浮力密度DNA中的分布规律,准确判定^{13}C-DNA的富集程度及DNA-SIP技术可靠性。

2.4 ^{13}C-DNA分子分析

通过超高速离心分离、分子指纹图谱或荧光实时定量PCR分析获得明确无疑的^{13}C-DNA后,目前大多数研究采用16S rRNA基因通用引物扩增^{13}C-DNA,建立细菌或古菌16S rRNA基因克隆文库,构建遗传系统发育树,揭示同化了稳定性重同位素的环境微生物群落。此外,尽管目前大多数条件下DNA-SIP仅能获得少量甚至微量的^{13}C-DNA,借助目前较为成熟的全基因组扩增技术[20],以^{13}C-DNA为模板,可获得大量基因组DNA,构建大片段载体的环境基因组学文库,进而利用新一代测序技术,揭示前所未知的难培养微生物作用者,定向发掘重要的微生物基因资源[21]。

3 DNA-SIP技术应用与展望

自2000年首次报道以来,DNA-SIP技术在地球关键元素生物地球化学循环与污染物微生物降解研究中得到了广泛关注,是研究复杂环境中微生物生理生态过程分子机制的重要手段[22]。例如,森林土壤和湖泊底泥中单碳化合物(如甲烷)的微生物生理代谢过程[3,23],污染物微生物降解过程[24],微生物介导的土壤物质与能量循环过程[25,26]以及植物光合产物的微生物同化利用过程[27-28]。近年来,随着DNA-SIP技术的逐渐成熟,其应用领域也不断拓展,在肠道微生物生理生态过程与健康医学[29],微生物重要功能基因发掘[30],生物活性物质高通量筛选以及活性生物催化剂合成[31]等方面具有重要应用前景。

新一代测序手段能有效克服DNA-SIP的内在

技术瓶颈，极大提高超高速离心后 ^{13}C-DNA 的检测灵敏度。其基本思路是：超高速离心后，利用微生物 16S rRNA 基因通用引物，通过新一代测序技术分析由轻到重不同浮力密度 DNA 微生物物种组成的变化规律，通过与对照处理相比，同化了标记底物的目标微生物 ^{13}C-DNA 由于浮力密度增加而迁移至重浮力密度梯度区带，并在重浮力密度 DNA 中高度富集。传统的分子指纹图谱如 DGGE 和克隆文库检测限低、工作量大，获得的微生物 DNA 序列通常低于 100 条，很难在微生物群落整体水平检测特异的目标微生物变化规律，新一代 454 测序技术每次分析可获得大约 100 万 16S rRNA 基因序列，即使同时分析 100 个样品，每个样品的序列仍可高达 10000 条，将传统分子指纹图谱的检测限提高 100 倍之多，显著增强了重浮力密度 DNA 中 ^{13}C-标记微生物 DNA 序列的检测灵敏度。如图 4 所示，针对我国华北平原典型潮土，采用 DNA-SIP 技术培养河南封丘农田土壤，提取土壤微生物基因组总 DNA 并超高速离心获得不同浮力密度 DNA。利用 16S rRNA 基因通用引物，以微生物群落整体为研究对象，通过新一代 454 测序分析不同浮力密度 DNA 中硝化微生物群落的相对丰度变化规律，发现在 $^{13}CO_2$-标记处理的重浮力密度 DNA 中，氨氧化细菌 AOB、泉古菌和亚硝酸氧化细菌 NOB 占所有微生物的比例分别为 17.5%、7.4% 和 42.1%，然而，$^{13}CO_2 + C_2H_2$ 对照处理中，由于乙炔抑制了氨氧化过程，土壤硝化微生物无法同化 $^{13}CO_2$ 自养生长，重浮力密度 DNA 中 AOB、泉古菌和 NOB 占所有微生物的比例仅为 0、0.11% 和 0.07%，这一结果清楚表明土壤硝化微生物基因组 DNA 被标记并在重浮力密度 DNA 中高度富集，而且在硝化作用缺失条件下，单一的 $^{13}CO_2$ 培养并不能将硝化微生物基因组 DNA 标记，明确揭示了复杂土壤环境中硝化微生物群落化能无机自养生理生长的代谢特征[18]。此外，$^{13}CO_2$-标记处理的轻浮力密度 DNA 中几乎检测不到 AOB 和 NOB 的 16S rRNA 基因序列，表明几乎所有的土壤 AOB 和 NOB 被深度标记并迁移到了重浮力密度梯度区带 DNA 中。然而，绝大多数泉古菌序列仍处于 ^{12}C-DNA 所处的轻浮力密度梯度区带中，表明古菌生长缓慢，仅有少量古菌被深度标记并在重浮力密度 DNA 中富集。需要注意的是，$^{13}CO_2$-标记处理的重浮力密度 DNA 中，硝化微生物群落的 16S rRNA 基因序列占全部微生物 16S rRNA 基因序列最高仅为 53%[18]，表明在硝化微生物 ^{13}C-DNA 高度富集的重浮力密度梯度区带，非标记的 ^{12}C-DNA 污染仍可能高达 47% 之多，远高于基于荧光实时定量 PCR 的 0.7%[8]。

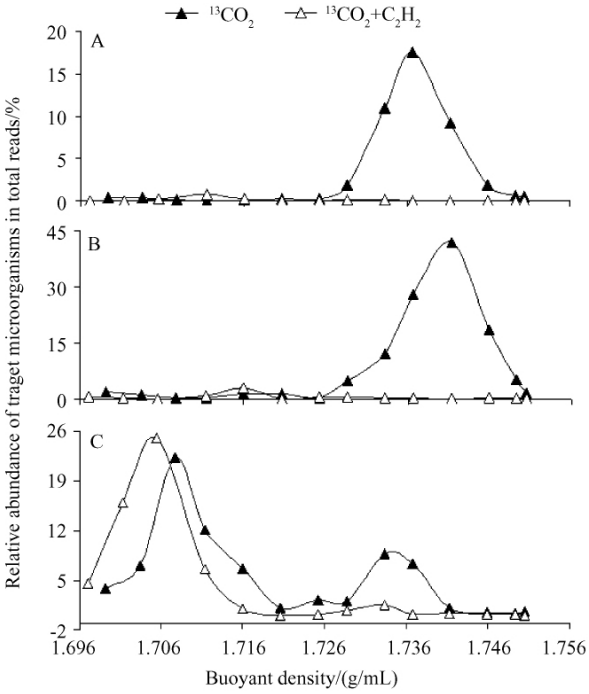

图 4 新一代高通量测序分析不同浮力密度 DNA 中的氨氧化细菌(a)、亚硝酸氧化细菌(b)和难培养泉古菌(c)占全部微生物的比例[18]

Fig. 4 Relative frequency of the 16S rRNA gene sequence reads affiliated with ammonia-oxidizing bacteria (a), nitrite-oxidizing bacteria (b) and uncultured crenarchaeota (c) across the entire buoyant density gradient of the fractionated DNA from the $^{13}CO_2$-treated soil after incubation for 28 days with or without 100 Pa acetylene. The abundance is expressed as the percentage of the targeted sequence reads to the total 16S rRNA gene reads in each DNA gradient fraction[18].

环境基因组学以复杂环境中全部微生物遗传信息为研究对象，通过重构微生物的代谢途径，在整体水平系统描述不同微生物在复杂环境的生理过程及其相互影响的分子遗传机制。这一思路超越了传统的单一菌株生理生化、遗传和演化规律的分子调控机理研究，技术上具有更大难度、应用上前景更加广阔、理论上极可能产生重大突破。然而，迄今尚未有研究能够通过测序将环境中不同微生物的全部基因组直接拼接，较为成功的环境基因组学研究大都集中于微生物群落复杂性较低的极端环境[32]或海洋[33-34]。

此外,针对环境基因组的统计学算法和分析软件远远滞后于新一代测序技术的发展,考虑到自然环境中微生物极其丰富的多样性,在可预见的5年内,即便对于国际大型测序机构,似乎也无法在群落水平整体破译复杂土壤环境中微生物全基因组信息,即使成功,单纯的数量信息和序列组成也无法真实反映其功能意义,具有明确科学问题或应用导向的新一代高通量测序将是环境基因组学的研究重点。

DNA-SIP能有效克服环境微生物基因组学的内在技术瓶颈,极大降低环境微生物群落的复杂度,显著提高其科学研究与应用开发价值。利用稳定性同位素标记的底物,定向发掘复杂环境中微生物群落的生理代谢功能,进一步回收标记的微生物群落DNA开展环境基因组学研究,将能够极大地降低环境中微生物群落的复杂度,由简单到复杂地研究微生物群落的作用以及作用的微生物群落。DNA-SIP为基础的环境基因组技术核心是:获得明确无疑的环境微生物群落标记基因组^{13}C-DNA,直接进行高通量测序,或者利用^{13}C-DNA构建大片段克隆文库,通过基于功能或序列筛选的策略定向发掘具有重要微生物学意义或生物技术应用前景的功能基因。利用这一技术,研究者在森林土壤发现了甲烷氧化细菌的关键功能基因完整操纵子*pmo*CAB[35]。此外,目前技术条件下,绝大多数微生物无法在实验室分离培养,其生理生态功能及遗传代谢路径尚未可知,DNA-SIP为基础的环境基因组学可能是目前研究难培养微生物生理代谢分子机制的最有力工具。例如,研究者最近利用五种不同的^{13}C-单碳底物培养湖泊底泥样品,获得^{13}C-DNA后,规避大片段文库构建,直接采用鸟枪法测序技术,发现了一种新的甲胺利用微生物,并组装获得了其全基因组信息[23]。随着新一代测序技术的快速发展,利用稳定性同位素标记的功能基因,进一步优化并人工合成具有重要应用前景的新基因[36],发展基于DNA-SIP的合成环境基因组学(Synthetic Metagenomics)[31],开展生物活性物质高通量筛选、新型生物催化剂合成以及污染物微生物高效降解等研究,将是未来重要的学科生长点与技术发展方向。

参考文献

[1] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J, Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309(5739): 1387-1390.

[2] Schmidt, TM, The maturing of microbial ecology. *International Microbiology*, 2006(9): 217-223.

[3] Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770): 646-649.

[4] 贾仲君. 第七章-稳定性同位素技术的应用. //林先贵. 土壤微生物研究原理与方法. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2010. 294-321.

[5] Meselson M, Stahl FW. The replication of DNA in *Escherichia Coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1958, 44(7): 671-682.

[6] Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, Friedrich MW, Murrell JC. DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 860-866.

[7] Cupples AM, Shaffer EA, Chee-Sanford JC, Sims GK. DNA buoyant density shifts during ^{15}N-DNA stable isotope probing. *Microbiological Research*, 2007, 162(4): 328-334.

[8] Lueders, T, Manefield M, Friedrich MW. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 73-78.

[9] Schildkraut CL. Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from buoyant density in CsCl. *Journal of Molecular Biology*, 1962, 4(6): 430-443.

[10] Karlovsky P, Decock A. Buoyant density of DNA Hoechst-33258 (Bisbenzimide) complexes in CsCl gradients-Hoechst-33258 binds to single AT base-pairs. *Analytical Biochemistry*, 1991, 194(1): 192-197.

[11] Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu S-F, Nelson TA. Stable isotope probing with ^{15}N achieved by disentangling the effects of genome G + C content and isotope enrichment on DNA density. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3189-3195.

[12] Cadisch G, Espana M, Causey R, Richter M, Shaw E, Morgan JAW, Rahn C, Bending GD. Technical considerations for the use of ^{15}N-DNA stable-isotope probing for functional microbial activity in soils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19(11): 1424-1428.

[13] Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu S-F, Nelson TA. Stable isotope probing with $^{15}N_2$ reveals novel noncultivated diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3196-3204.

[14] Schwartz E, Characterization of growing microorganisms in soil by stable isotope probing with $H_2^{18}O$. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2541-2546.

[15] Chen Y, Murrell JC. When metagenomics meets stable-isotope probing: progress and perspectives. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(4): 157-163.

[16] Jia Z, Conrad R. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658-1671.

[17] Gallagher E, McGuinness L, Phelps C, Young LY, Kerkhof LJ. ^{13}C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5192-5196.

[18] Xia W, Zhang C, Zeng X, Feng Y, Weng J, Lin X, Zhu J, Xiong Z, Xu J, Cai Z, Jia Z. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226-1236.

[19] Hutchens E, Radajewski S, Dumont MG, McDonald IR, Murrell JC. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(2): 111-120.

[20] Neufeld JD, Chen Y, Dumont MG, Murrell JC. Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1526-1535.

[21] Dumont MG, Murrell JC. Stable isotope probing-linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 499-504.

[22] Murrell JC, Whiteley AS. Stable isotope probing and related technologies. Washington D. C.: ASM Press. 2011.

[23] Kalyuzhnaya MG, Lapidus A, Ivanova N, Copeland AC, McHardy AC, Szeto E, Salamov A, Grigoriev IV, Suciu D, Levine SR, Markowitz VM, Rigoutsos I, Tringe SG, Bruce DC, Richardson PM, Lidstrom ME, Chistoserdova L. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. *Nature Biotechology*, 2008, 26(9): 1029-1034.

[24] Madsen EL. The use of stable isotope probing techniques in bioreactor and field studies on bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(1): 92-97.

[25] Feng Y, Lin X, Zhu J, Jia Z. A phototrophy-driven microbial food web in a rice soil. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(2): 301-311.

[26] Lueders T, Wagner B, Claus P, Friedrich MW. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 60-72.

[27] Prosser JI, Rangel-Castro JI, Killham K. Studying plant-microbe interactions using stable isotope technologies. *Current Opinion in Biotechnolog*, 2006, 17(1): 98-102.

[28] Haichar FE, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T, Achouak W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2008, 2(12): 1221-1230.

[29] Kovatcheva-Datchary P, Egert M, Maathuis A, Rajilić-Stojanović M, De Graaf AA, Smidt H, De Vos WM, Venema K. Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an in vitro model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 914-926.

[30] Sul WJ, Park J, Quensen JF, III, Rodrigues JLM, Seliger L, Tsoi TV, Zylstra GJ, Tiedje JM. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5501-5506.

[31] Moussard H, Smith TJ, Murrell JC, DNA Stable Isotope Probing and Gene Mining. // Murrell JC, Whiteley AS, Eds. Stable isotope probing and related technologies. Washington D. C.: ASM Press, 2011, p259-278.

[32] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428(6978): 37-43.

[33] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y-H, Smith HO. Environmental henome dhotgun dequencing of the dargasso dea. *Science*, 2004, 304(5667): 66-74.

[34] DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science*, 2006, 311(5760): 496-503.

[35] Dumont MG, Radajewski SM, Miguez CB, McDonald IR, Murrell CJ. Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1240-1250.

[36] Bayer TS, Widmaier DM, Temme K, Mirsky EA, Santi DV, Voigt CA.. Synthesis of methyl halides from biomass using engineered microbes. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(18): 6508-6515.

Principle and application of DNA-based stable isotope probing—A review

Zhongjun Jia

State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract: Microbial communities are the engines that drive the global biogeochemical cycle of carbon and nitrogen essential for life on Earth. However, microorganisms have evolved as a result of complex interactions with other organisms and environments. Deciphering the metabolism of microorganisms at the community level in nature will be crucial for a better understanding of the mechanisms that lead to the enormous divergence of microbial ecophysiology. Due to the immense number of uncultivated microbial species and the complexity of microbial communities, delineating community metabolism proves a virtually insurmountable hurdle. By tracing the heavy isotope flow of key elements such as carbon and nitrogen, DNA-based stable isotope probing (DNA-SIP) can provide unequivocal evidence for substrate assimilation by microorganisms in complex environments. The essential prerequisite for a successful DNA-SIP is the identification, with confidence, of isotopically enriched ^{13}C-DNA, of which the amount is generally too low to allow the direct measurement of ^{13}C atom percent of nucleic acid. The methodological considerations for obtaining unambiguous DNA highly enriched in heavy isotope are presented with emphasis on next-generation sequencing technology and metagenomics.

Keywords: microbial ecophysiology, DNA-SIP, metagenomics, next-generation sequencing technology

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Major Program from the National Science Fundation of China (41090281), by the Knowledge Innovation Programs of the Chinese Academy of Sciences (KZCX2-YW-BR-06, KSCX2-EW-G-16) and by the Ministry of Science and Technology of China (2010DFA22770)

* Corresponding author. Tel: +86-25-86881311; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jia@issas.ac.cn

Received: 5 May 2011/Revised: 3 July 2011