

DNA 提取方法对盐环境放线菌多样性分析的影响

张娇^{1,2}, 夏占峰¹, 贺江舟^{1,2}, 孙红专¹, 张利莉^{1,2*}

¹塔里木大学, 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300

²塔里木大学生命科学学院, 阿拉尔 843300

摘要:【目的】研究 DNA 提取方法对盐环境中放线菌的 16S rDNA RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性) 多样性分析结果的影响。【方法】采用 CTAB-SDS 法、玻璃珠法和反复冻融法 3 种方法提取焉耆盐场土壤样品 DNA, 利用放线菌特异性引物扩增 16S rDNA 并分别构建文库。采用 *Hae* III 限制性内切酶对阳性克隆进行 RFLP 分析, 选取不同的克隆进行测序、比对并构建 16S rDNA 序列系统发育树。【结果】3 种 DNA 提取方法构建的 16S rDNA 克隆文库 OTUs- (Operational Taxonomic Unit) 数不同, 其中 CTAB-SDS 法获得 35 个 OTUs, 玻璃珠法获得 19 个 OTUs, 反复冻融法获得 14 个 OTUs。3 种方法中有 52% 的 OTUs 序列与已知可培养的放线菌或未发表的克隆子序列相似性较低, 可能代表着放线菌新的类群; 3 种方法得到的放线菌均分布于放线菌纲 (Actinobacteria) 的放线菌亚纲 (Actinobacteridae)、酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae) 和红色杆菌亚纲 (Rubrobacteridae)。【结论】DNA 提取方法是影响评价放线菌多样性的重要因素。本研究所采用的 DNA 提取方法各自存在一些优缺点, 因此评估盐环境中的微生物多样性时建议采用几种方法组合。而焉耆盐场这一盐环境可能存在丰富的放线菌物种多样性, 并蕴藏着新的分类单元有待进一步研究。

关键词: 盐环境, DNA 提取, 16S rDNA, 克隆文库, 放线菌多样性

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)07-0746-12

放线菌 (Actinomycetes) 是一类能产生抗生素、酶类等与人类密切相关的生物活性物质的微生物。极端环境中存在的放线菌因其特殊的遗传特性、生理功能, 以及独特的代谢产物而引起众多研究者的关注。盐环境属于典型的极端环境, 对盐环境放线菌的研究将为今后的理论研究提供参考材料, 也为我们了解微生物的进化打下基础。

目前, 实验室常用一些选择性培养基分离相关微生物, 而一些培养条件要求苛刻的微生物却很难

培养。因此, 对未培养微生物的研究不仅可以使人们了解其不可被培养的原因, 也可指导这些微生物资源的开发和利用。随着分子生物技术的不断完善和更新, 可以在 DNA 水平上直接揭示土壤的种群结构和环境的关系。当前, 应用研究土壤多样性的方法较多, 如 ARDRA, SSCP, RFLP 等, 这些方法的应用不但可以体现土壤物种的多样性、群落结构和功能、土壤物种的系统发生和分类等, 而且充分发挥了传统的纯培养方法不能替代的作用, 而 RFLP 这一

基金项目: 国家“973 项目”前期研究专项 (2010CB134505); 国家自然科学基金 (31060001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn

作者简介: 张娇 (1986—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事极端环境放线菌资源方面的研究。E-mail: lanjinglin2623@163.com

收稿日期: 2012-11-16; **修回日期:** 2013-01-18

技术由于其有特殊的优势,使得受到相关研究的青睐。

随着微生物生态学的发展,多种提取土壤样品 DNA 的方法陆续建立起来^[1]。目前从土壤样品中提取 DNA 的方法大体分为两类^[2]:(1)直接法^[3],直接从土壤中裂解微生物细胞;(2)间接法^[4],先对微生物细胞分离,再进行细胞裂解。

焉耆盐场位于新疆天山南麓焉耆盆地腹心,四周环山,形成了特殊的山间盆地,随着时间的积累,焉耆盐场的底部形成了独特的沉积物,对这些沉积物开展放线菌物种多样性的研究有助于进一步了解焉耆环境存在的天然微生物资源。目前有关盐环境物种多样性的报道较多,以盐环境为研究对象用不同 DNA 提取方法进行评价该环境的物种多样性尚未见相关报道。

本文采用基于 16S rDNA 的 RFLP 技术,评价 3 种总 DNA 提取方法对盐环境放线菌多样性检测结果的影响,以期建立适于 RFLP 技术应用于盐环境放线菌多样性研究的可靠的 DNA 提取方法,为盐环境微生物分子生态学的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集:2011 年 10 月,从新疆焉耆盐场(86°37'E,41°88'N)采集样品。取样深度为 5 - 30 cm,样品采集后装于无菌的样品盒中,运抵实验室后分别于 4℃ 和 -20℃ 保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、HaeIII 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;PCR 仪、凝胶成像分析系统购自美国 BIO-RAD 公司;离心机购自德国 Eppendorf 公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;超净工作台和培养箱购自上海博讯实业有限公司。

1.2 样品总 DNA 的提取和放线菌特异性序列的扩增

采用 CTAB-SDS 法^[5]、玻璃珠法^[6]和反复冻融法^[7]提取样品总 DNA。3 种方法均称取样品 5 g,经过磷酸缓冲液预处理,涡旋混匀后 7500 × g 离心

10 min。总 DNA 于 50 μL ddH₂O 中充分溶解。电泳检测上样量为 10 μL。采用放线菌特异性引物(S-20 和 A-19)进行放线菌 16S rDNA 部分序列 PCR 扩增^[8]。

1.3 克隆文库的构建^[9]

用 DNA 回收试剂盒回收纯化 PCR 扩增的目的条带。纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 连接,转化 *E. coli* DH5α。通过蓝白斑筛选,将白色克隆转接于 96 孔细胞培养板中,置于 -80℃ 冰箱中保藏。

1.4 克隆文库的检验及 RFLP 分析

对文库中的克隆用 M13 引物进行菌落 PCR,以检测插入子的正确性^[10],菌落 PCR 产物用 Hae III 酶切 8 h。将 RFLP 图谱中条带有差异的阳性克隆送测序。应用 RDP II 中的 Chimera Check 程序对所获得的克隆序列进行检查,以排除嵌合体。以 99.0% 相似性为标准划分不同的操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)^[11],采用 AnalyticRarefaction 软件(<http://www.uga.edu/strata/software>)绘制克隆文库的稀有度曲线(Rarefaction curve),以检验文库的代表性。使用软件 SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation)进行放线菌多样性指数分析。

1.5 系统发育分析

每个 OTU 选取一条代表序列,通过 BLAST 找到 GenBank 数据库中与之相近的已知放线菌类群的序列并下载。将 OTU 的代表序列和下载的序列用 MEGA5.0 软件进行多重比对,采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

2 结果

2.1 总 DNA 的提取及放线菌特异序列的扩增

琼脂糖凝胶电泳检测 3 种方法总 DNA 的提取效果,图 1 显示 CTAB-SDS 提取法有较亮的 DNA 条带,玻璃珠法和反复冻融法有较弱的条带。

以 3 种方法提取的总 DNA 为模板,用放线菌特异性引物(S-20, A-19)进行扩增,扩增目的片段大小为 640 bp(图 2)。

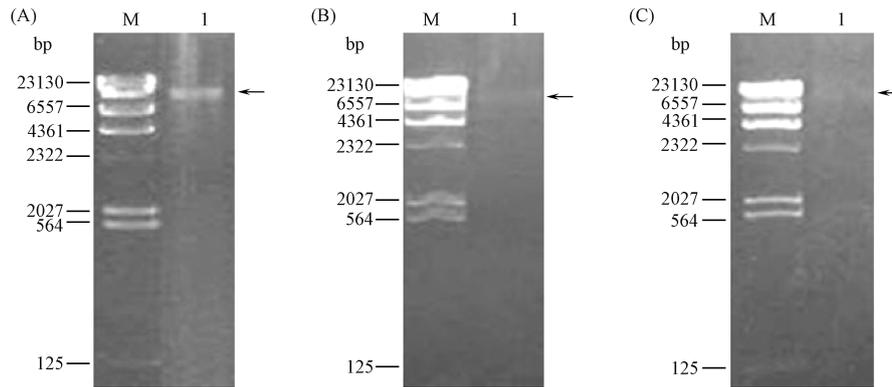


图 1. 3 种方法提取样品总 DNA 电泳图

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of DNA from samples using three methods. A: CTAB-SDS method; B: Glass bead method; C: Freezing and thawing method. M: DNA marker λ -Hind III digest.

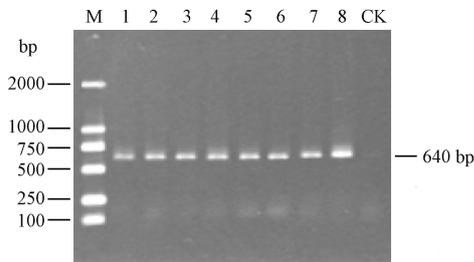


图 2. 放线菌特异性序列 PCR 扩增电泳检测结果

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DNA using primers S-20 and A-19 M, DNA marker DL2000; Lane 1-8, Partial 16S rDNA amplicons of samples; CK, Blank control.

2.2 克隆文库的构建

纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司) 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。蓝白斑筛选, 3 种方法各挑取 480 个白色克隆, 用 M13 引物进行菌落 PCR, 扩增克隆子的插入序列, 排除假阳性克隆。

2.3 克隆文库的检验及样品放线菌多样性指数分析

采用 *Hae* III 酶切菌落 PCR 产物, 得到酶切图谱

(图 3)。通过比较酶切图谱, 3 种方法分别挑选 69、53、55 个不同的克隆送测序。测序结果经过序列比对, 去除非放线菌序列, 分别归于 35 个 OTUs、19 个 OTUs、14 个 OTUs, 其 16S rDNA 序列在 GenBank 的注册号: KC112921-KC112988。使用软件 SPADE 分析放线菌多样性指数 (表 1)。结果可知, CTAB-SDS 法的物种最为丰富, 玻璃珠法次之, 反复冻融法最少。香农指数和辛普森指数也显示出 CTAB-SDS 法的放线菌物种多样性最高。采用稀有度统计方法分析 3 个文库的多样性, 从 Rarefaction curve (图 4) 可知 3 种方法的文库曲线均已达到平台缓期, 说明库容 (Library size) 已经涵盖该样点的绝大多数物种。

2.4 三种不同 DNA 提取方法揭示的焉耆盐场放线菌多样性

CTAB-SDS 法、玻璃珠法和反复冻融法获得的克隆经测序排除非放线菌克隆, 与 GenBank 数据库中已知序列比对分别属于 35 个 OTUs、19 个 OTUs、14 个 OTUs, 共同构建系统发育树 (图 5, 图 6, 图 7)。从系统发育树可以看出 3 种方法获得的序列代表的

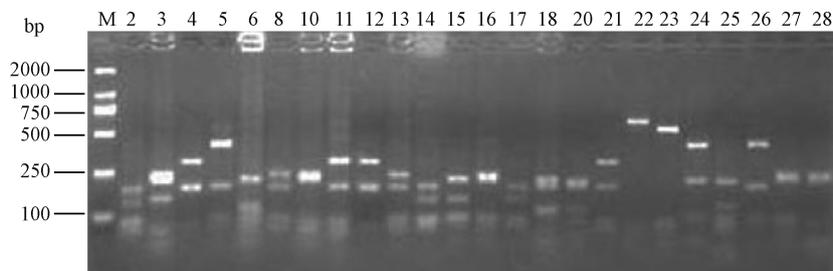


图 3. 部分克隆子插入片段的 *Hae* III 酶切电泳图

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of insert segment of clones digest by *Hae* III. M, DNA marker DL2000; Lane 2-28, Number of clones.

菌株都分布在放线菌纲中的 3 个亚纲:放线菌亚纲 (Actinobacteridae), 酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae) 和红色杆菌亚纲 (Rubrobacteridae)。3 种 DNA 提取方法获得的克隆数目中, CTAB-SDS 法获得的克隆数总类分布较广泛, 玻璃珠法和反复冻融法得到的克

隆数较少, 而玻璃珠法和反复冻融法获得的克隆属于稀有的物种。说明采用 3 种方法构建文库获得的克隆都各具特异的物种。而酸微菌亚纲和红色杆菌亚纲中的克隆并没有明显的差异, 说明这两个亚纲的物种分布较广 (表 2)。

表 1. 3 种 DNA 提取方法中放线菌多样性指数比较

Table 1. Comparison of actinobacterial diversity index of three kinds of DNA extraction methods

Methods	No. of OTUs	Species richness		Shanno index		Simpson index	
		ACE-1	95% CIs	Chao & Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
CTAB-SDS method	35	35.0	(35.0, 35.0)	3.351	(3.285, 3.417)	0.04252	(0.03771, 0.04734)
Glass bead method	19	19.0	(19.0, 19.0)	2.602	(2.505, 2.700)	0.10589	(0.06827, 0.14352)
Freezing and thawing method	14	14	(19.0, 19.0)	2.511	(2.455, 2.567)	0.09072	(0.08234, 0.09910)

CI: Confidence interval; ACE-1: A modified ACE for highly heterogeneous communities; MLE: maximum likelihood estimator; Chao & Shen: based on Horvitz-Thompson estimator and sample coverage method.

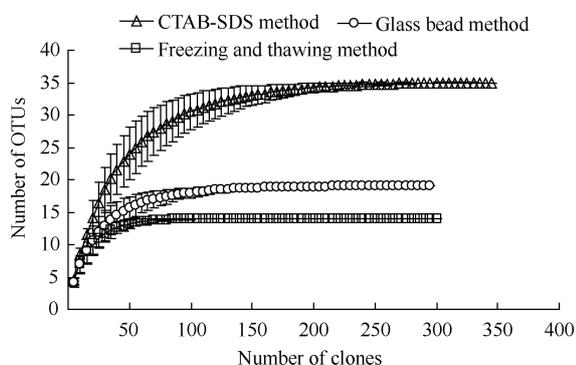


图 4. 3 种 DNA 提取方法中文库放线菌稀有度曲线

Figure 4. Rarefaction curve for three kinds of DNA extraction methods.

2.4.1 CTAB-SDS 法放线菌群落组成及系统发育多样性分析: CTAB-SDS 法中有 74.3% 的 OTUs 序列与已知可培养的放线菌或未发表的克隆子序列相似性小于 96%。获得的 35 个 OTUs 大多数分布于放线菌亚纲, 其中克隆序列 YJ-320 与 *Leifsonia kafniensis* (NR042669), YJ-439 与 *Microbacterium lacticum* (NR026160), YJ-165 与 *Myceligenans xiligouense* (NR029100), YJ-11 与 *Kineococcus xinjiangensis* (NR044522), YJ-40 与 *Gordonia polyisoprenivorans* (NR026500), YJ-246 与 *Rhodococcus qingshengii* (HQ824843), YJ-5 与 *Corynebacterium tuberculostearicum* (AJ439348), YJ-174 与 *Propionibacterium acnes* (JQ435685), YJ-470 与 *Friedmanniella lacustris* (NR028884) 与已知放线菌序列的相似性均为 99%, 而克隆序列 YJ-325, YJ-375, YJ-141, YJ-356, YJ-115, YJ-130, YJ-186, YJ-479 与 GenBank 中已知序列的相似性均低于 97%, 可能

是放线菌亚纲中的一个新属; YJ-276 属于酸微菌亚纲, 可能是其中一个新物种; YJ-43, YJ-133, YJ-329, YJ-414, YJ-466 中的克隆在酸微菌亚纲中单独成为一个分枝, 与有效发表的所有类群无较近的亲缘关系, 可能是潜在的新分类单元; YJ-38, YJ-204, YJ-19, YJ-156, YJ-193 中的克隆在红色杆菌亚纲中独立成一个分枝, 极有可能代表属以上的新类群; YJ-233, YJ-403, YJ-322 中的克隆与放线菌亚纲、酸微菌亚纲和红色杆菌亚纲中有效发表的类群差别较大, 有可能代表着新的分类单元 (图 5)。

2.4.2 玻璃珠法放线菌群落组成及系统发育多样性分析: 玻璃珠法中有 68.4% 的 OTUs 序列与已知可培养的放线菌或未发表的克隆子序列相似性小于 96%。19 个测序的克隆经过同源性分析, 结果显示该样点的克隆序列 YJ-474 与 *Cellulomonas bogoriensis* 同源性为 97%, YJ-74 与 *Leifsonia kafniensis* 同源性为 99%, YJ-59 与 *Kocuria rosea* 同源性为 99%, YJ-167 与 *Arthrobacter psychrolactophilus* 同源性为 98%, YJ-153 与 *Nocardioides iriomotensis* 同源性为 98%, YJ-337 与 *Streptomonospora alba* 同源性为 99%, 其他克隆序列与已知放线菌有效序列的相似性均低于 95%, YJ-53, YJ-94 在酸微菌亚纲中单独成为一个分枝, 可能是与酸微菌亚纲相似性较远的属或种; YJ-111, YJ-247, YJ-316 介于酸微菌亚纲与红色杆菌亚纲之间自展出一个分支, 说明这些克隆可能既有酸微菌亚纲的性质, 也有红色杆菌亚纲的特点; YJ-28, YJ-43, YJ-80 中获得的克隆与已知的类群相差较大, 可能代表着更高级的分类地位, 有待进一步的研究验证 (图 6)。

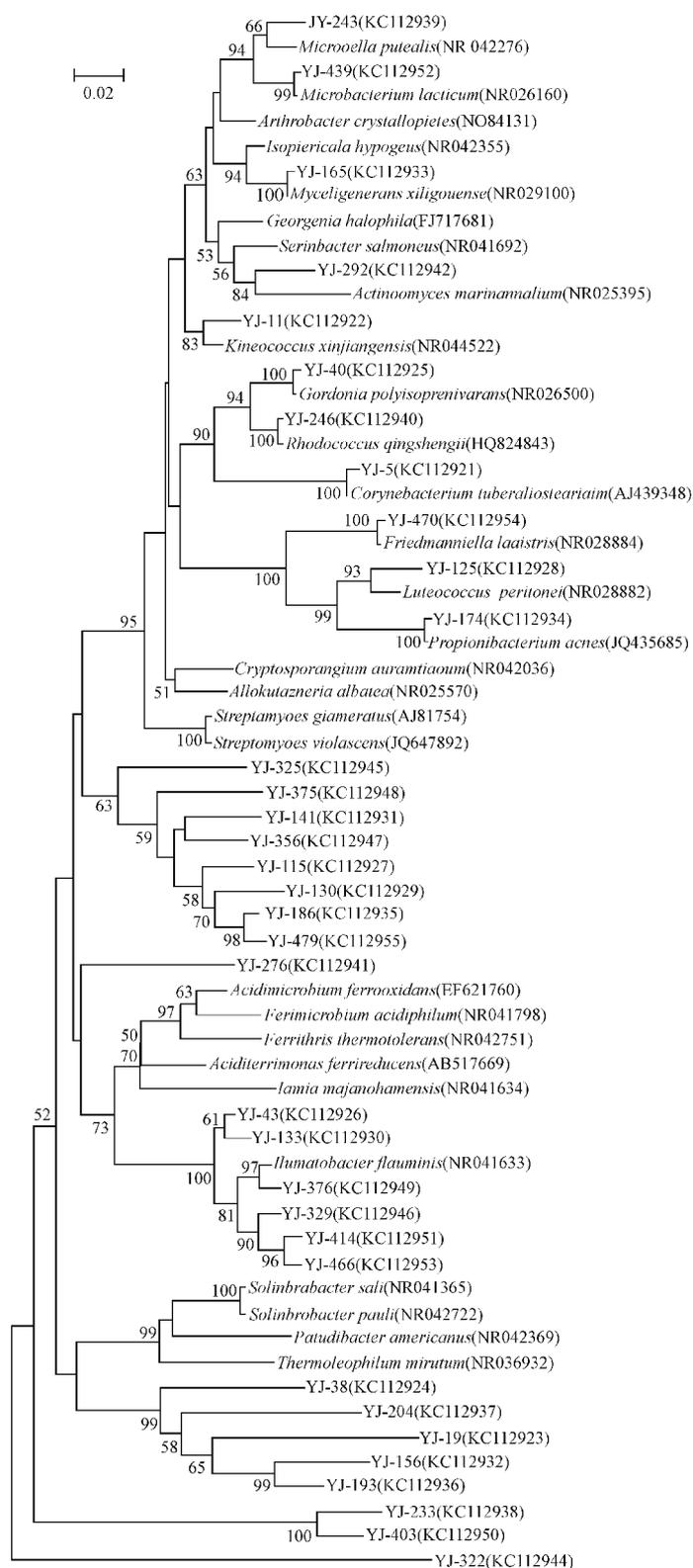


图 5. CTAB-SDS 法克隆序列与放线菌相关物种构建的以 16S rDNA 为基础的系统发育树

Figure 5. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among acinobacterial 16S rDNA partial sequences obtained from the CTAB-SDS method and their closely related sequences downloaded from GenBank. All of bootstrap values over 50 are shown based on neighbour-joining analyses of 1000 resamples data sets. Bar, 0.02 sequence divergence.

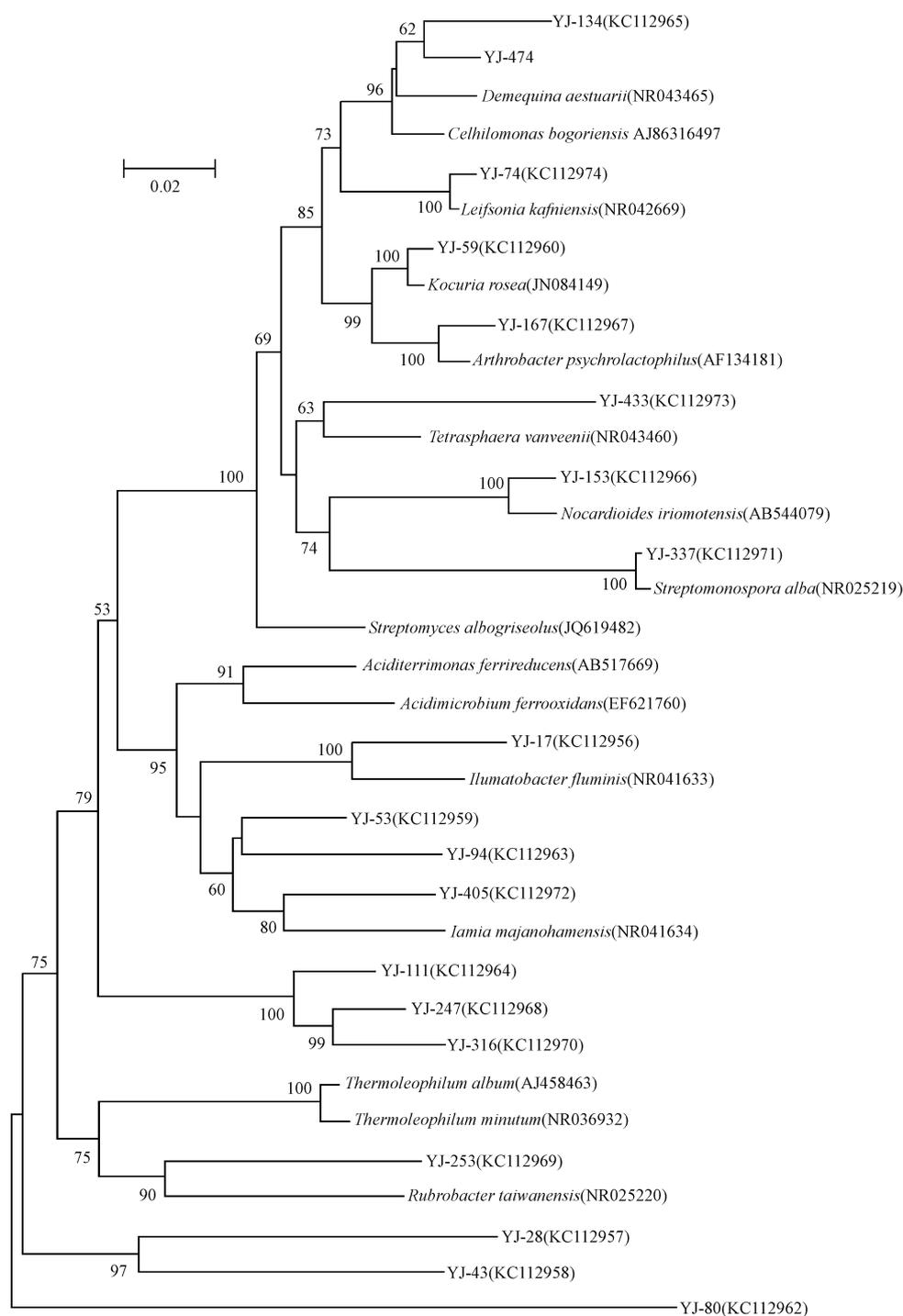


图 6. 玻璃珠法克隆序列与放线菌相关物种构建的以 16S rDNA 为基础的系统发育树

Figure 6. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among actinobacterial 16S rDNA partial sequences obtained from the glass bead method and their closely related sequences downloaded from GenBank. All of bootstrap values over 50 are shown based on neighbour-joining analyses of 1000 resamples data sets. Bar, 0.02 sequence divergence.

2.4.3 反复冻融法放线菌群落组成及系统发育多样性分析;反复冻融法中有 85.7% 的 OTUs 序列与

已知可培养的放线菌或未发表的克隆子序列相似性小于 96%。将获得的 14 个测序克隆进行同源性分

析,结果展示该样点的克隆序列 YJ-98 与 *Demequina salsinemoris* 同源性为 97%, 克隆序列 YJ-99 与 *Actinopolyspora salina* 同源性为 99%; YJ-63、YJ-98 克隆序列与已知放线菌有效序列的相似性均低于 95%, 极有可能是一个新属的类群; 红色杆菌亚纲中克隆序列 YJ-418 和 YJ-93, YJ-116, YJ-82, YJ-50, YJ-

95 中的克隆单独成为一个分支, 可能代表着红色杆菌亚纲中的新属或更高一级的物种; YJ-127, YJ-408 中的克隆与放线菌亚纲, 酸微菌亚纲和红色杆菌亚纲无较近的亲缘关系, 单独成为一个分支, 这可能代表着新的分类单元, 见图 7。

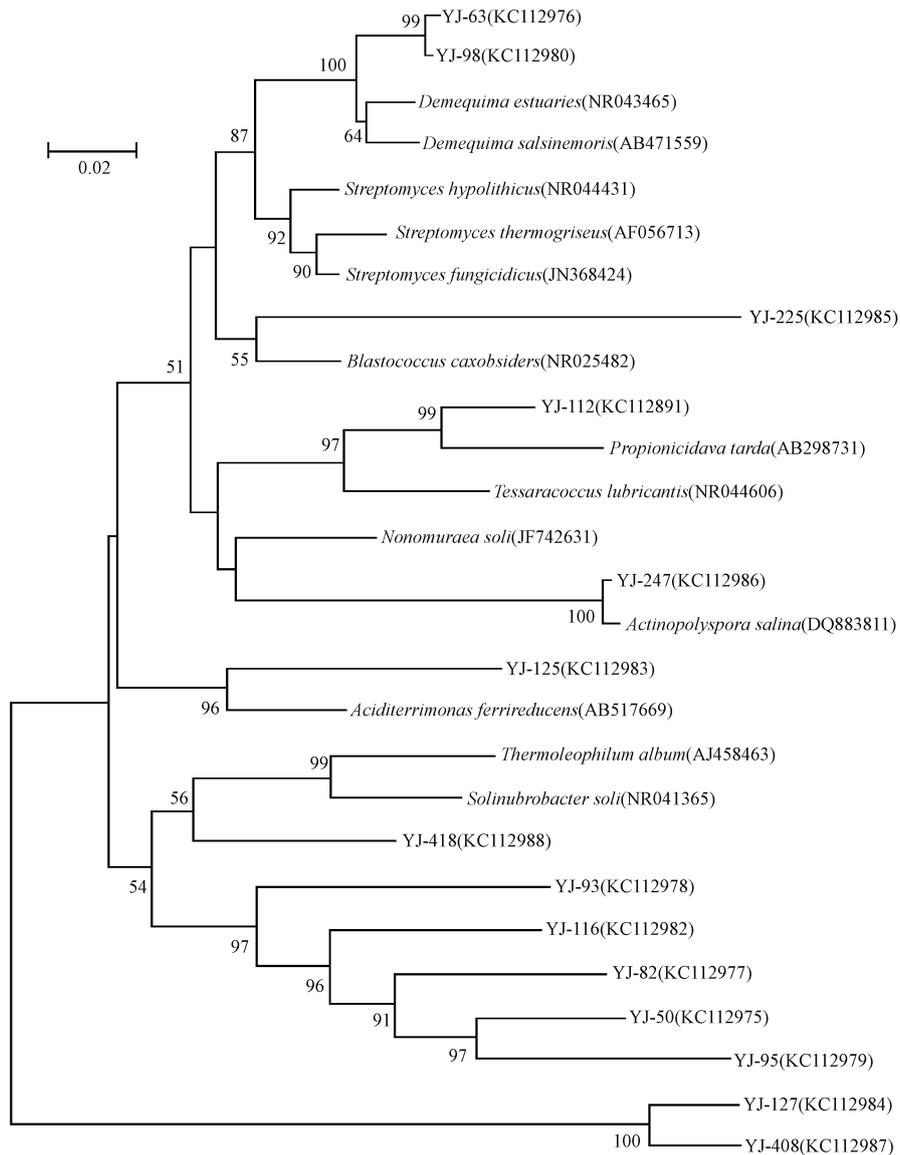


图 7. 反复冻融法克隆序列与放线菌相关物种构建的以 16S rDNA 为基础的系统发育树

Figure 7. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among acinobacterial 16S rDNA partial sequences obtained from repeated freezing and thawing method and their closely related sequences downloaded from GenBank. All of bootstrap values over 50 are shown based on neighbour-joining analyses of 1000 resamples data sets. Bar, 0.02 sequence divergence.

表 2. 3 种方法获得的克隆在放线菌纲中的分布

Table 2. Three methods for cloning in Actinobacteria of the distribution

Sub class	Sub order	CTAB-SDS method		Glass bead method		Freezing and thawing method	
		Number of clones	Rate/%	Number of clones	Rate/%	Number of clones	Rate/%
Actinobacteridae	Streptomycetaceae	69	19.44	94	31.02	54	17.88
	Propionibacteriaceae	15	4.22	44	14.52	65	21.52
	Microbacteriaceae	23	6.48	40	13.20	-	-
	Iamiaceae	6	1.69	10	3.30	-	-
	Microbacteriaceae	35	9.86	-	-	-	-
	Pseudonocardiaceae	22	6.19	-	-	-	-
	Corynebacteriaceae	5	1.41	-	-	-	-
	Cryptosporangiaceae	5	1.41	-	-	-	-
	Nocardiaceae	8	2.25	-	-	-	-
	Beutenbergiaceae	7	1.97	-	-	-	-
	Actinopolysporaceae	19	5.35	-	-	-	-
	Kineococcaceae	8	2.25	-	-	-	-
	Promicromonospora	5	1.41	-	-	-	-
	Actinomycetaceae	-	-	-	-	3	0.99
	Nocardiodaceae	-	-	7	2.31	-	-
	Demequinaceae	-	-	32	10.56	27	8.94
	Nocardopsaceae	-	-	10	3.30	-	-
	Intrasporangiaceae	-	-	16	5.28	-	-
	Cellulomonadaceae	-	-	12	3.96	-	-
	Geodermatophilaceae	-	-	-	-	12	3.97
Acidimicrobidae	Acidimicrobiaceae	86	24.23	44	14.52	11	3.64
	Solirubrobacteraceae	21	6.48	4	1.32	45	14.90
Rubrobacteridae	Thermoleophilaceae	5	1.41	34	11.22	52	17.22
	Patulibacteraceae	10	2.82	-	-	-	-

2.5 三种 DNA 提取方法对 16S rDNA 文库物种多样性的影响

综合考虑获得物种的种类,分析不同方法获得的放线菌多样性。链霉菌属 (*Streptomyces*)、酸极端单胞菌属 (*Aciditerrimonas*) 和嗜热油菌属 (*Thermoleophilum*) 在 3 种方法中都有得到相应的克隆,说明这类物种在此环境中较活跃,易于获得;利夫森氏菌属 (*Leifsonia*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、*Ilumatobacter* 和 *Iamia* 在 CTAB-SDS 法和玻璃珠法中均可获得,而在反复冻融法中并未获得相关克隆,说明 CTAB-SDS 法揭示的物种多样性高,尽管玻璃珠法和反复冻融法获得的物种较少,但这两种方法也获得 CTAB-SDS 法所没有揭示的物种。深入研究 3 种方法获得的克隆序列,对理解放线菌物种多样性无疑具有重要意义(表 3)。

3 讨论

1994 年, Moyer 等^[12]首次将 RFLP 技术应用到微生物多样性和群落结构研究中后,人们则广泛运用这种环境中不同生物个体或种群之间 DNA 片段酶切位点差异的特点,揭示微生物多样性和群落结构^[13]。Inceoglu 等^[14]研究表明总 DNA 提取方法对土壤环境微生物多样性克隆文库的结果有重要影响,本研究也再次验证了这一观点。

微生物分子生态学研究的关键技术之一就是如何高效地提取总 DNA。Nathalie^[15]等建议在裂解生物细胞前,采用磷酸缓冲液进行土壤样品预处理,有助于去除胞外游离 DNA、无机物和有机物的干扰。因此,本文在提取总 DNA 时采用此法并获得较好的结果。

表 3. DNA 提取方法对 16S rDNA 文库放线菌多样性的影响

Table 3. The effect of DNA extraction on 16S rDNA gene library Actinobacterial diversity

Sub-class	Sub order	Family	Genus	CTAB-SDS		Glass bead		Freezing and	
				method		method		thawing method	
					Similarity/%		Similarity/%		Similarity/%
Actinobacteridae	Corynebacterineae	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	+	99	-	-	-	-
		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	+	99	-	-	-	-
			<i>Gordonia</i>	+	99	-	-	-	-
	Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	+	90	+	82	+	87
	Kineococcineae	Kineococcaceae	<i>Kineococcus</i>	+	99	-	-	-	-
			<i>Luteococcus</i>	+	93	-	-	-	-
			<i>Propioniciclava</i>	+	99	-	-	+	95
	Propionibacterineae	Propionibacteriaceae	<i>Tessaracoccus</i>	-	-	-	-	+	81
			<i>Friedmanniella</i>	+	99	-	-	-	-
			<i>Nocardioidea</i>	-	-	+	98	-	-
	Micrococcineae	Promicromonosporaceae	<i>Isoptericola</i>	+	88	-	-	-	-
			<i>Beutenbergiella</i>	+	94	-	-	-	-
		Microbacteriaceae	<i>Georgenia</i>	+	89	-	-	-	-
			<i>Leifsonia</i>	+	99	+	99	-	-
			<i>Microbacterium</i>	+	99	-	-	-	-
		Micrococcaceae	<i>Microcella</i>	+	98	-	-	-	-
			<i>Arthrobacter</i>	+	88	+	98	-	-
			<i>Kocuria</i>	-	-	+	99	-	-
			<i>Demequina</i>	-	-	+	96	+	97
			<i>Myceligenans</i>	+	99	-	-	-	-
<i>Tetrasphaera</i>	-		-	+	93	-	-		
<i>Cellulomonas</i>	-		-	+	97	-	-		
Frankineae	Cryptosporangiaceae	<i>Cryptosporangium</i>	+	89	-	-	-	-	
	Geodermatophilaceae	<i>Blastococcus</i>	-	-	-	-	+	89	
	Pseudonocardineae	Pseudonocardaceae	<i>Allokutzneria</i>	+	89	-	-	-	-
Actinomycineae	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>	+	82	-	-	-	-	
		<i>Streptomonospora</i>	-	-	+	99	-	-	
	Streptosporangiaceae	<i>Nonomuraea</i>	-	-	-	-	+	81	
Actinopolysporineae	Actinopolysporaceae	<i>Actinopolyspora</i>	-	-	-	-	+	99	
		<i>Ilumatobacter</i>	+	97	+	94	-	-	
		<i>Ferrimicrobium</i>	+	88	-	-	-	-	
Acidimicrobidae	Acidimicrobineae	Acidimicrobiaceae	<i>Ferrithrix</i>	+	89	-	-	-	-
			<i>Aciditerrimonas</i>	+	90	+	94	+	93
			<i>Acidimicrobium</i>	+	81	+	91	-	-
		Iamiaceae	<i>Iamia</i>	+	91	+	93	-	-
Rubrobacteridae	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>	+	85	-	-	+	84
		Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i>	+	89	-	-	-	-
	Rubrobacterineae	Rubrobacteraceae	<i>Rubrobacter</i>	-	-	+	89	-	-
	Thermoleophilales	Thermoleophilaceae	<i>Thermoleophilum</i>	+	87	+	86	+	84

+ : Families and genus detected; - : Families and genus undetected.

本研究采用的 3 种提取总 DNA 的方法,CTAB-SDS 法是一种提取盐环境 DNA 有效方法,获得的物种多样性最多。可能是因为 CTAB 是一种阳离子去垢剂,能够在高离子强度下与蛋白质和多聚糖形成沉淀,有利于 DNA 的分离;而 SDS 是一种阴离子去

垢剂,能够与膜蛋白的疏水部分结合,导致细胞膜破裂,并破坏膜蛋白内部的非共价键,使蛋白质变性而使其与 DNA 分离。因此,这两种去垢剂均可将细胞壁和细胞膜完全破碎,很好地释放其中的 DNA;其次,玻璃珠法被证明在理论上破壁效果较好,但在本

研究中未获得较好的结果,可能尚需进一步摸索玻璃珠直径和数量等相关参数。而冻融法效果最差,得到的物种种类最少,可能是由于盐环境中的微生物在细胞内形成聚羟基丁酸(PHB)等物质^[16],增加了细胞应对反复冻融破坏的能力,导致 DNA 不能充分释放。因此,应用免培养方法来评价盐环境中微生物多样性时,仅用一种 DNA 提取方法来评价环境样品的微生物多样性,可能会低估该环境的微生物的种类和数量。建议采用几种方法组合,选择出适合不同样品的最佳提取方案,尽可能“无偏地”地得到所有物种的 DNA,更好地反映环境中的微生物多样性。

综合上述 3 种 DNA 提取方法,从放线菌多样性角度分析,焉耆盐场存在丰富的放线菌物种资源,3 种方法共获得 68 个 OTUs,包括类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、*Serinibacte*、隐孢囊菌属(*Cryptosporangium*)、异库兹涅尔氏菌属(*Allokutzneria*)、铁微菌属(*Ferrimicrobium*)、*Patulibacter* 的克隆等,对于这些克隆序列所代表的尚未培养的微生物是否具有特殊的代谢产物或功能基因,需要进一步研究。到目前为止,关于盐环境物种多样性的报道已有很多^[17],但无论是免培养还是可培养所得物种大多分布于放线菌亚纲。

本研究获得能产生高活性肽类抗生素^[18]的考克氏菌属(*Kocuria*)克隆;可降解四环素^[19]等烃类污染土壤的戈登氏菌属(*Gordonia*)克隆以及可高效降解苯酚^[20]的节杆菌属(*Arthrobacters*)的大量克隆。而一些分类不详的克隆与能降解环境污染物的放线菌具有较高的相似性,目前已有研究者将去甲基醌菌属(*Demequina*)、东方大分子与细胞所菌属(*Iamia*)和红球菌属(*Rhodococcus*)等被定义为海洋特有放线菌,这些克隆在焉耆盐场中被发现,说明这些物种可能不仅是海洋环境特有,在一些盐环境中也有分布。这一结果对提高人们认识这些微生物的分布有所帮助,并在一定程度上反映了塔里木盆地是古地中海消退后逐渐形成的事实。

免培养分析获得了通常在岩石中才被发现的且能氧化金属硫化物酸微菌属(*Acidimicrobium*)的相应序列,揭示出酸微菌亚纲(*Acidimicrobidae*)中存在大量未知的放线菌新类群,而目前在盐环境中并未获得其纯培养,进一步说明分离培养工作任重道远。3 种方法构建的克隆文库中 52% 以上的 OTUs

序列与有效发表的所有放线菌类群相似性小于 96%,部分克隆序列在放线菌门系统发育树中处于亚纲的分类地位。说明焉耆盐场作为一种独特的微生物生态系统,可能存在属、科甚至亚纲级分类单元的放线菌新类群,有进一步研究的价值。

由于目前大量的微生物并未获得纯培养,而该盐场日渐干涸,一旦该环境消失或改变,其中的放线菌也随之灭亡。因此,对特殊盐环境放线菌资源的保护和利用具有紧迫性,而免培养获得的物种多样性可以指导我们有针对性地改良或优化分离培养基,以期发掘更多潜在的放线菌资源,对微生物资源的开发和利用起到重要的推动作用。

参考文献

- [1] Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM, Simonet P. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 39(4): 183-190.
- [2] Ogram A, Sayler GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7(2): 57-66.
- [3] Holben WE, Jansson JK, Chelm BK, Tiedje JM. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(3): 703-711.
- [4] Courtois S, Frostegard A, Goransson P, Depret G, Jeannin P, Simonet P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(7), 431-439.
- [5] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [6] Frostegard A, Courtois S, Ramiisse V, Clerc S, Bernillon D, Gall LF, Jeannin P, Nesme X, Simonet P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5409-5420.
- [7] Cullen DW, Hirsch PR. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol Biochem*, 1998, 30(8/9): 983-993.
- [8] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 828-841.

- [9] Jiang HC, Dong HL, Zhang GX, Yu BS, Chapman LR, Fields MW. Microbial diversity and sediment of Lake Chaka, an athalassoha-line Lake in Northwest China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3832-384.
- [10] Tu Y, Zhu W, Lu C. Bacterial 16S rDNA sequence analysis of Siberian tiger faecal flora. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(5): 671-674. (in Chinese)
图雅,朱伟云,陆承平. 东北虎粪细菌区系的 16S rRNA 基因序列分析. *微生物学报*, 2005, 45(5): 671-674.
- [11] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [12] Moyer CL, Dobbs FC, Karl DM. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(3): 871-879.
- [13] Xia Z, Guan T, Ruan J, Huang Y, Zhang L. Studies on the actinobacterial diversity in aiding lake sediments. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1023-1031. (in Chinese)
夏占峰,关统伟,阮继生,黄英,张利莉. 艾丁湖沉积物放线菌多样性. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1023-1031.
- [14] Inceoglu O, Hoogwout EF, Hill P, Van Elsas JD. Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3378-3382.
- [15] Fortin N, Beaumier D, Lee K, Greer CW. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(2): 181-183.
- [16] Dai J, Gao Y, Liu Y, Xu D, Cheng X, Peng H. Isolation and characterization of a novel *Pseudomonas* sp. SCH17 with high PHB production. *Microbiology China*, 2011, 38(5): 635-640. (in Chinese)
戴君,高毅,刘洋,徐德聪,程香,彭惠. 一株新型高产 PHB 假单胞菌 SCH17 的分离和特征分析. *微生物学通报*, 2011, 38(5): 635-640.
- [17] Jia X, He J, Guan T, Sun H, Xia Z, Zhang L. Actinobacterial diversity of a soil sample from Hong jing zi in Xinjiang by using culture-independent method. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 606-613. (in Chinese)
贾晓宇,贺江舟,关统伟,孙红专,夏占峰,张利莉. 新疆红井子盐碱土壤非培养放线菌多样性. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 606-613.
- [18] OMahony T, Rekhif N, Cavadini C, Fitzgerald GF. The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90(1): 106-114.
- [19] Liu L, Li XW, Liu SJ, Liu ZP. Isolation and identification of a PAHs-degrading strain *Gordonia* sp. He4 and its dynamics during bioremediation of phenanthrene polluted soil. *Environmental Science*, 2007, 28(3): 617-622.
- [20] Jiang Y, Zhao K, Chen H. Isolation and identification a strain of *arthrobacter* sp. LZP08X and its phenol-degrading characters. *Biotechnology*, 2007, 17(1): 63-66. (in Chinese)
蒋永荣,赵凯鹏,陈欢. 节杆菌菌株 LZP08X 的分离鉴定及其降解苯酚特性. *生物技术*, 2007, 17(1): 63-66.

Evaluation outcome of actinobacteria diversity in saline environment influenced by different DNA extraction methods

Jiao Zhang^{1,2}, Zhanfeng Xia¹, Jiangzhou He^{1,2}, Hongzhuan Sun¹, Lili Zhang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar 843300, China

²College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China

Abstract: [**Objective**] To evaluate the influence of DNA extraction methods on the actinobacteria diversity analysis in saline environment via 16S rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. [**Methods**] CTAB-SDS method, glass bead beating method and repeated freezing and thawing method were used to extract total DNA in soil samples from the Yanqi Salten. The 16S rDNA clone libraries were constructed by using the purified 16S rDNA PCR amplicons to transform the *E. coli* DH5 α . The transformants in the library were further analyzed by RFLP. The unique 16S rDNA clones were sequenced and further used for phylogenetic analysis. [**Results**] Different Operational Taxonomic Units (OTU) were obtained from DNA extracts and total 35 OTUs were obtained from CTAB-SDS method, 19 OTUs from glass bead beating method and 14 OTUs from repeated freezing and thawing methods. Up to 52% OTUs in the three libraries constructed displayed lower similarity with the published sequence, perhaps representing novel taxons. The total OTUs belong to Actinobacteridae, Acidimicrobidae and Rubrobacteridae subclasses. [**Conclusion**] DNA extraction methods influence the actinobacterial diversity. Each of the DNA extraction method in our study has some drawbacks and biases, so it is better to use combined DNA extracts from different DNA methods to evaluate the microbial diversity in salty environments.

Keywords: saline environment, DNA extraction, 16S rDNA, clone library, actinobacteria

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Special Phphase Project on Basic Research of the National Department of Science and Technology (2010CB134505) and by the National Natural Science Foundation of China (1060001)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn

Received: 16 November 2012/Revised: 18 January 2013