

土壤微生物多样性研究的新方法

马 万 里

(内蒙古师范大学生物系, 生物多样性保护研究中心, 呼和浩特 010022)

Josquin Tibbits Mark Adams

(Forest Science Center, University of Melbourne, Creswick, VIC3363, Australia)

摘 要 传统的分离培养和鉴定土壤微生物方法所具有的困难性和局限性, 是造成难以深入了解土壤微生物生态学特性和多样性组成方面的主要障碍。本文运用分子生物学技术, 以澳大利亚两种主要森林类型的土壤微生物多样性研究为实例, 介绍了从土壤中直接提取土壤微生物 DNA 的方法以及末端限制性酶切片段长度多态性(T-RFLP)分析的基本原理和方法。作者认为, 用该方法提取的土壤真菌 DNA 的纯度高, 完全适合 PCR 扩增和 T-RFLP 分析的要求。T-RFLP 已成为国外深入研究土壤微生物多样性的理想方法之一。

关键词 土壤微生物多样性; 16S 核糖体 DNA; 真菌核糖体 DNA 的 ITS; T-RFLP 分析

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A

土壤是一个固、液、气三相组成的高度异质环境, 发育着丰富的微生物群落(主要有细菌、放线菌和真菌三大类)。它们参与土壤生物化学过程、有机物的分解转化、菌根的形成、与植物互利共生以及对生物多样性和生态系统功能的影响等, 在生态系统中起着举足轻重的作用^[1~3]。

虽然土壤微生物研究一直深受各国土壤学家和生态学家的关注, 但是, 长期以来土壤微生物的深入研究受限于手段落后已是不争的事实^[4~7]。比如: 对于土壤细菌认识, 人们通常是通过先分离细菌细胞再在培养基上培养、鉴定菌落的方法, 但事实上, 土壤中只有少部分细菌可以通过此方法得到, 而大部分细菌是极难培养成功的, 这使得许多土壤细菌包含的大量遗传信息难以被发现^[7,8]。土壤真菌和放线菌也是一样, 人们对它们的认识主要依赖于其地上的果实体或分生孢子的形态, 而现实中的许多真菌和放线菌的菌丝体在土壤中处于休眠或不活动状态, 用常规调查方法只能了解到其中的一小部分, 很难得到大多数种类的信息^[1,5,7~10]。所以, 方法的局限性, 造成了人们全面了解和深入研究土壤微生物多样性的主要障碍。

近些年来, 把分子生物学技术运用在土壤微生物生态学的研究, 使人们可以避免传统的分离培养过程, 通过 DNA 水平上的研究, 直接探讨土壤微生物

物的种群结构及其与环境的关系。只要各种微生物的靶核酸序列(即 DNA)存在, 即使含量低, 或者存在于复杂的混合物(如土壤中各类微生物的细胞提取液)中, 通过 PCR 技术也能够把它们扩增和检测出来。目前涌现出许多用于研究土壤微生物多样性和生态学的技术, 比如: ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), Sequencing, DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 和 T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 等。这些技术和方法的采用, 使得在土壤微生物多样性、微生物种群的结构和功能、土壤微生物的系统发生和分类、土壤微生物与污染土壤的相互作用及影响等多领域的研究上得以突破, 发挥了传统方法所不能替代的作用^[3~7]。

但是, 这些方法成功的首要问题是能否获得高质量和高纯度的 DNA、提取的 DNA 能否更好地代表土壤微生物群落的真实性和异质性, 而尽可能包含有大多数微生物的 DNA。所以, 一个能直接从土壤中提取微生物 DNA 的快速而高效的方法是迫切需要的。

本文采用的 DNA 提取方法是在文献[1, 10, 11]的基础上, 经改进后, 用于澳大利亚 Pine 森林和 Eucalyptus 森林土壤真菌 DNA 的提取和纯化。在对土

壤微生物多样性的分析时,采用最近几年发展起来的T-RFLP(末端限制性酶切片长度多态性)技术^[4, 12, 13]。

1 材料和方法

1.1 土壤样品

两种土壤样品,一种采于澳大利亚 Creswick 的松树林,另一种采于澳大利亚 Ash 山的桉树林。取 5~15 cm 层的土样,置于冰盒内待测。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取程序 (1) 1 g 土壤样品中加入 6 ml 提取液(0.5 mol L⁻¹葡糖醇, 15% 聚乙二醇 6000, 2% 焦碳酸二乙脂, 100 mmol L⁻¹ EDTA 和 50 mmol L⁻¹三羟甲基氨基甲烷, pH 8.0), 混合 5 min, 再加入 500 mg PVPP (聚乙烯吡咯烷酮), 100 ml 50 mg ml⁻¹溶菌酶(Lysozyme)和 100 ml 100~250 mg ml⁻¹β-glucanase(β-葡聚糖酶), 混合后放置冰上 2 h。(2) 加入细胞溶解提取液(3.8 ml 4% SDS, 100 mmol L⁻¹ EDTA, 50 μg ml⁻¹ k-蛋白酶和 50 mmol L⁻¹ Tris pH 8.0), 混合后放置冰上 16 h。(3) 离心 8 min (4℃, 5 000g, Beckman, J2Mc centrifuge), 上清液转到 30 ml 新管中; 加入 2 ml 洗液(50 mmol L⁻¹ Tris 和 100 mmol L⁻¹ EDTA), 充分混合后离心; 再用洗液重复一次。(4) 集中全部的上清液, 加入 3 mol L⁻¹ KOAc (醋酸钾) 调整浓度至 0.5 mol L⁻¹, 置冰上 2 h, 离心 12 min (4℃, 15 000 g)。(5) 留上清液, 加入两倍体积的 100% 乙醇, 放置 16 h (-20℃)。离心 12 min (4℃, 15 000 g), 将沉淀的 DNA 溶于 300 μl TE 缓冲液(10 mmol L⁻¹ Tris, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0)。

1.2.2 DNA 纯化 由于粗 DNA 样品中含有 RNA、蛋白质、糖类以及腐殖质等, 会影响 PCR 反应, 本文采用 CsCl (氯化铯) 和 KOAc (醋酸钾) 法来纯化粗 DNA^[2, 14]。

(1) 300 μl DNA 加入 0.3 g CsCl, 混合后放置 3 h, 离心 20 min (14 000 g, 室温)。(2) 收集上清液, 加入无菌水和冰异丙醇, $V_{\text{上清液}}: V_{\text{水}}: V_{\text{冰异丙醇}} = 1:4:3$, 混合后放置 15 min, 再离心 15 min, 沉淀的 DNA 溶于 500 μl TE 缓冲液。(3) 加入 100 μl 8 mol L⁻¹ KOAc 溶液, 放置 15 min, 离心 15 min (14 000 g, 室温), 收集上清液, 加入 0.6 体积冰异丙醇, 轻轻混合后置于冰上 10~20 min。离心 10 min, 沉淀的 DNA 用 70% 乙醇冲洗后, 溶于 500 μl 的 TE 缓冲液(pH 8.0)。

DNA 的纯度和产量可通过 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测, 结果如图 1。电泳显示 DNA 片段分子量大于 10 000 bp (basepair 碱基对), 表明已获得较大片段的土壤微生物 DNA。

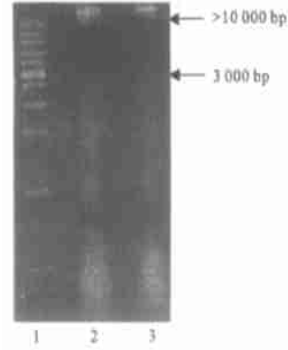


图 1 澳大利亚森林土壤中提取的土壤微生物 DNA

Fig. 1 Soil microbial DNA extracted from Pine and Eucalyptus forest soils

1 1kb 的分子量标记 2 桉树林土壤 3 松树林土壤

Line 1 1 kb ladder, Line 2 Eucalyptus forest in Mt. Ash,

Line 3 Pine forest in Creswick

1.2.3 PCR 扩增和目标 DNA 的确定 电泳(图 1)显示的 DNA 片段中还可能包含其它生物的 DNA, 如土壤中原生动物 DNA、细菌 DNA、高等植物根系以及昆虫 DNA^[1]。因此, 必须用专一的特异性探针或引物来验证获得的 DNA 中是否含有目标 DNA, 即真菌 DNA。

真菌核糖体(Ribosomal) DNA 的 ITS 区域(Internal transcribed spacers 内转录间隔区)是一个非常重要的目标区域, 用真菌特异性引物进行的 PCR 扩增, 可以用作真菌的定性、真菌的生物多样性、分子生态学和真菌系统学等方面的研究^[3, 5, 9, 10]。本文用到的一对特异性引物是 ITS1 和 ITS4^[10, 11]。

PCR 反应体系 40 μl, 最终浓度为: 0.2 mmol L⁻¹ dNTP, 0.5 mmol L⁻¹ ITS1 和 ITS4 引物, 2 mmol L⁻¹ MgCl₂, 75 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 g L⁻¹ Tween 20, 20 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1U Taq 酶, 加 1:40 DNA 样品。PCR 循环: 85℃ 下热启动, 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min (共 35 个循环); 72℃ 再延伸 10 min。

1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 反应产物, 结果见图 2, 表明从真菌 rDNA ITS 区域扩增所得的 PCR 产物大小范围是 850~950 bp, 是真菌的目标 rDNA 片段。

1.3 T-RFLP 及其基本原理

土壤细菌的 16S 核糖体 DNA 和真菌核糖体

DNA 的 ITS 区域都是研究土壤微生物多样性非常重要的目标区域^[3-5,7]。T-RFLP 就是根据样品中的这些目标区域 DNA 序列的不同或变化, 进行 PCR 扩增后得到目标 DNA 片段, 酶切后将会产生不同长度的限制性片段。由于 T-RFLP 方法是把目标 DNA 片段的一个末端(通常是 5' 端)用荧光引物标记, 这样在酶切后, 分析的目标只限于有荧光标记的末端限制性片段上。酶切后产生长度不等的末端限制性长度片段在单一泳道上分离, 并经 ABI 自动测序仪上检测和计算后, 输出末端限制性片段的大小和强度图。泳道上分离的酶带越多, 或测序仪上输出不同的波峰越多, 则表明微生物种类越多。通过比较不同样品间的异同, 该方法能为评估土壤微生物多样性提供更敏感的数量化基础。

同时, 通过 ABI 自动测序仪对任何一末端限制性片段的测序, 并与 Internet 中的数据库的数据进行比较分析, 可以来确定其系统分类地位^[7,15]。

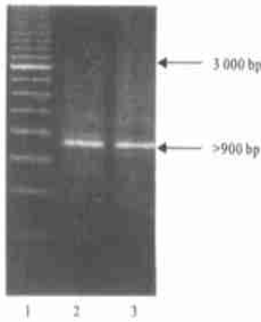


图2 两种森林土壤中真菌 rDNA ITS 区域 PCR 扩增产物
Fig. 2 PCR amplification products of ITS with soil fungal rDNA as template from Pine and Eucalyptus forest soils
1 1 kb 的分子量标记 2 桉树林土壤 3 松树林土壤
Line 1 1 kb ladder. 2 Eucalyptus forest in Mt. Ash and, 3 Pine forest in Creswick

1.4 酶切

完成真菌 DNA 的提取、纯化和扩增 ITS 片段后, 需要对扩增的产物进行酶切。(1) 纯化: 150 μ l PCR 产物加入 15 μ l 3 mol L⁻¹ 醋酸钠和 350 μ l 100% 乙醇, -20 $^{\circ}$ C 冷冻 20~30 min; 离心 20 min(4 $^{\circ}$ C, 1400 r min⁻¹), 用 70% 乙醇冲洗晾干, 保存于 25 μ l TE 溶液。(2) 用限制性内切酶酶解: *Hha*I, *Rsa*I 和 *Msp*I 是常用的三种内切酶, 本文采用 *Rsa*I 来完成酶解。反应液总体积 20 μ l(5 μ l PCR 产物, 1.5 μ l *Rsa*I, 2 μ l 缓冲液, 0.5 μ l BSA 和 11 μ l 超纯水); 酶解 3~4 h(37 $^{\circ}$ C)。

1.5 电泳及 ABI 自动化测序仪检测

电泳上样(5 μ l): 2 μ l 酶解样品, 混合 3 μ l 的 2 \times

染液(其中含 0.5 μ l 的 ABI 的 TAMRA 2500)。94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 置于冰上 5 min, 6% 聚丙烯酰胺胶电泳, 并连接 ABI 自动化测序仪(1350 V)。

1.6 输出结果

经 ABI 自动测序仪检测和计算(ABI 提供的 GeneScan 2.1 软件), 不同的末端限制性片段的大小和强度将以图表形式输出(见图 3)。图例显示了某种土壤细菌群落所有 16S rDNA 片段在一定范围内(50~600 bp)的 T-RFLP 结果, 大约有 75 个 DNA 末端限制性片段被检测出。横坐标代表 DNA 片段(带)的分子量大小(单位 bp), 纵坐标是带的强弱程度。其中图 3A 表示土壤群落细菌 16S rDNA 在特异性引物(引物的 5' 端有荧光标记)作用下和 *Hha*I 酶解后的 T-RFLP, 所有 DNA 片段的大小范围从 50 到 600 bp。图 3B 是图 3A 中某一个局部放大后的展现。在这小范围内(200~235 bp), 至少看到有 16 个终端片段, 说明了 T-RFLP 分析能力的精细。

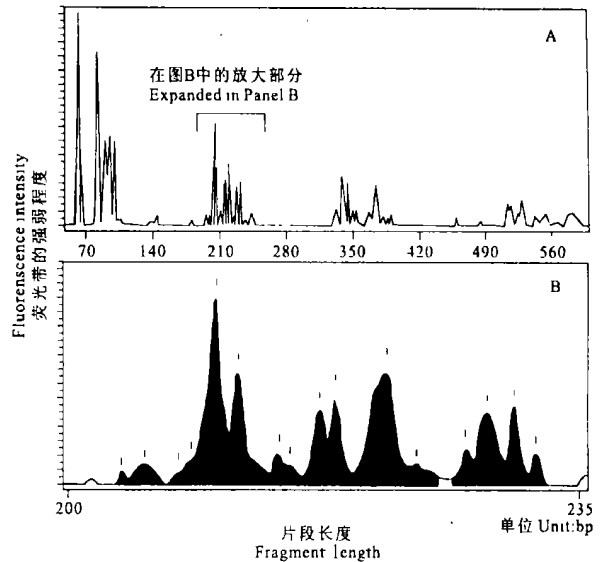


图3 某种土壤微生物群落的 T-RFLP 分析图例^[7]

Fig. 3 T-RFLP analysis of a soil bacterial community^[7]

2 结论

从澳大利亚两种森林土壤中所提取真菌 DNA 的研究表明, 该方法提取的真菌 DNA 片段长度较大(900 bp), 是比较理想的 DNA 样品, 是 T-RFLP 分析、DNA 测序以及用其它分子生物学手段研究真菌的系统进化、种属分类以及亲缘关系等的重要基础。同时, 由于它避免了传统方法获取真菌多样性的局限性, 能更全面地反映土壤中真菌的真实面貌。

目前, T-RFLP 分析在比较不同土壤微生物群落的多样性、比较种群的相对丰富度和群落结构、鉴定群落中的特定微生物和探讨土壤微生物间的系统发育和亲缘关系方面发挥着重要的作用^[6, 7, 12]。从文中介绍可以看出, T-RFLP 分析优点明显。不仅在对系统进化或确定分类地位的研究中, 根据所得的末端限制性片段的序列与日益丰富的数据库中的序列直接进行比较, 结论可靠, 而且, 基于核酸测序技术的运用, 要比 DGGE, SSCP 或 ARDRA 等方法有更强的分析能力, 通过用限制性内切酶得到的土壤群落 DNA 终端片段可以小到 1 bp, 并且能被仪器检测和数字化输出, 大大减少分析时的人为误差。因此, 我们相信, 随着该方法的进一步完善和相关仪器的普及, 对大规模普查各类土壤微生物群落的组成、分布, 以及快速寻找目的微生物等研究具有重要的意义, 并将发挥更大的作用。

致谢 感谢美国 Michigan 州立大学微生物学系和微生物生态研究中心 Terence L. Marsh 博士提供了工作建议和有关资料。

参考文献

- [1] Elsas J D van, Smalla K. Extraction of microbial community DNA from soils. *In*: Akkermans A D L, van Elsas J D, de Bruijn F J. eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, 1995
- [2] Elsas J D van, Duarte G F, Rosado A S, *et al.* Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *Jour. Microbial. Methods*, 1998, 32: 133~ 154
- [3] Horton T R, Bruns T D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black box. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 1 855~ 1 871
- [4] Ogram A. Discussion soil molecular microbial ecology at age 20: Methodological challenges for the future. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1 499~ 1 504
- [5] Bridge Paul, Brian Spooner. Soil fungi: Diversity and detection. *Plant and Soil*, 2001, 232: 147~ 154
- [6] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R L. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2 943~ 2 950
- [7] Tiedje J M, Asuming Brempong S, Nüsslein K, *et al.* Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13: 1 109~ 1 122
- [8] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, 345: 63~ 65
- [9] Glen M, Tommerup I C, Bougher N L, *et al.* Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forests and plantations. *Mycol. Res.*, 2001, 105 (2): 138~ 149
- [10] Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycol. Res.*, 2000, 104(9): 1 027~ 1 032
- [11] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, *et al.* PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25: 303~ 307
- [12] Kits C L. Terminal restriction fragment patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest Microbiol.*, 2001, 2: 17~ 25
- [13] Marsh T L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2: 323~ 327
- [14] Duarte G F, Rosado A S, Seldin L, *et al.* Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *J. Microbiological Methods*, 1998, 32: 21~ 29
- [15] Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G. The RDP(Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28: 173~ 174

A NEW METHOD FOR RESEARCH ON SOIL MICROBIAL DIVERSITY

Ma Wanli

(Department of Biology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Josquin Tibbits Mark Adams

(Forest Science Center, University of Melbourne, Creswick, VIC 3363, Australia)

Abstract The inability to culture most microbe from soil samples is a fundamental obstacle to understanding soil microbial ecology and diversity. Therefore, amplification of DNA from soil and a rapid, preferable DNA extraction method involving necessary purification is needed for rapid and thorough analysis of microbial diversity in environmental samples. The method extracting fungi DNA that is applicable to two kinds of forest soil types in Australia is developed in this research, and result showed that extracted DNA purity and size is reasonable and suitable for PCR amplification. At the same time, a framework for soil microbial diversity analysis with T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism), a recent molecular approach that can be used to assess subtle genetic differences between DNA samples as well as provide insight into the structure and function of microbial communities in soils, is presented here. Generally, PCR amplification of extracted DNA sample from soil is conducted by using a set of fluorescent tagged specific primers of the bacterial 16S rDNA or ITS of fungal rDNA, and then products are digested with a four-base restriction endonuclease, as maximizing the resulting number of terminal fragments. Finally the entire terminal fragments are detected and sized by the ABI automated sequencer. The technique has both high sensitivity and throughput making it an ideal choice for comparative community analyses.

Key words Soil microbial diversity; 16S ribosomal DNA; ITS of ribosomal DNA; T-RFLP