

水环境细菌 16S rDNA 限制性片段长度 多型性及群落结构分析

李志岗 杨官品 朱艳红

(湖北大学生命科学系, 武汉 430062)

摘要: 用细菌 16S 核糖体 RNA 基因(rDNA)限制性片段长度多型性描述了水环境细菌群落结构。从环境水样中直接分离 DNA, 以细菌特异的引物扩增 16S rDNA, 构建质粒文库, 随机分离重组质粒, 用限制性内切酶消化获得 16S rDNA 基因型, 用基因型的种类及频率描述特定水体生境的细菌群落结构。该方法在分析水体隐含遗传多样性、揭示污染的生物学效应和评价水环境质量等方面具有重要的应用价值。

关键词: 16S 核糖体 RNA 基因; 限制性片段长度多态性; 细菌群落; 水环境

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)02-0111-05

近年来, DNA 序列差异及根据序列差异研制的各类分子标记系统广泛用于遗传学研究, 使在分子水平上研究细菌群落结构成为可能。根据已发表的众多 16S 核糖体 RNA 基因(rDNA)序列, 在不同分类层次上专一扩增细菌 16S rDNA 的若干对引物被设计出来^[1,2]。用它们扩增的 rDNA 序列已用于揭示土壤或水体隐含的细菌遗传多样性^[3,4]和追踪各类病原细菌^[5]。用它们扩增细菌纯培养物的 16S rDNA 并结合限制性内切酶消化, 获得的限制性片段长度多型性资料已广泛用于亲源关系分析^[6-8]。用细菌群落的多样性指示环境污染, 探索污染与细菌群落动态变化的关系等离不开对细菌群落结构的描述。本文报道了用 16S rDNA 限制性片段长度多型性描述水环境细菌群落结构的方法。

1 材料与方法

1.1 DNA 分离 武昌沙湖是一个污染较严重的湖泊, 工业废水和生活污水是主要的污染源, 主要污染物有各类重金属、酚等。在基本等距离的 50 个点上各取 100mL 从水面下 20—50cm 的湖水混合, 密封带回实验室并保存于 4℃。模板 DNA 分离在 24h 内进行。取 500μL 混合水样, 加入 1mL 0.2mol/L NaOH 混匀, 在沸水中煮 10min, 置冰与水混合物上 10min, 并重复一次; 加入 1mL 0.2mol/L HCl 混匀, 等体积分装于 10 只小塑料离心管, 于 -20℃ 保存备用。

收稿日期: 1998-06-20; 修改日期: 2000-07-30

基金项目: 武汉市科委晨光计划项目和湖北省自然科学基金资助

作者简介: 李志岗(1967—), 男, 山西省大同市人; 现在山西农业大学工作; 主要从事作物病理学的教学与研究

通讯作者: 杨官品 现在青岛海洋大学生命学院工作

1.2 16S rDNA 的 PCR 扩增 根据文献^[1,9,10]合成 PCR 引物(表 1),其中,1392R 为通用引物,而 68F 为细菌特有。同时,两引物进行了弱化设计(Degenerated design),N 代表 A、G、T 和 C 四种碱基,而 K 与 R 分别代表 G、T 和 A、G 碱基。两引物组合能扩增几乎所有细菌类群的 rDNA。反应体系含有 2 μ L 模板 DNA,1.5mol/L MgCl₂,0.25 μ mol/L 正反向引物,400 μ mol/L dNTP,1 单位 Taq DNA 聚合酶及 1 倍反应缓冲液(酶生产商提供)。循环条件为:95 $^{\circ}$ C 3min 接 94 $^{\circ}$ C 1min,53 $^{\circ}$ C 3min,72 $^{\circ}$ C 2min30 个循环,并在 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。该引物对专一扩增细菌的 16S 核糖体 RNA 基因,不能扩增其它生物的 rDNA。两引物 5' 端分别相当于 *E. coli* 16S rDNA 的 68 和 1392 位核苷酸,因此,PCR 产物长约 1339bp。PCR 产物如图 1 所示。

表 1 引物序列及其在 *E. coli* 16S rDNA 上的对应位置和扩增专一性

Tab.1 Primer sequences, their target sites in *E. coli* 16S rDNA and specificity

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	位置 Target position	专一性 Specificity
68F	TNANACATGCAATGCAKCG	16S, 68-86	细菌 Bacteria
1392R	ACGGGCGGTGTGTRC	16S, 1406-1392	通用 Universal

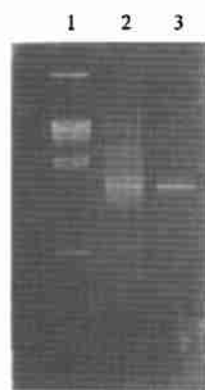


图 1 PCR 扩增的水环境细菌 rDNA, 2, 3 为用不同浓度模板获得的 PCR 产物, 1 为分子量标记

Fig. 1 PCR amplified water bacterial rDNA, lanes 2, 3 indicating rDNA amplified from templates at different concentrations, lane 1 molecular marker

1.3 PCR 产物的克隆 用 TA 克隆方法构建水环境细菌 16S 核糖体 RNA 基因文库^[11]。向每管 PCR 反应产物再加入 2 μ L 含 1 单位 Taq 聚合酶的一倍反应缓冲液,充分混匀后于 72 $^{\circ}$ C 继续保温 30min,集中各管反应产物,立即用苯酚、氯仿抽提,沉淀 DNA,并溶于水中备用。pUC19 质粒用 Sma I 酶切,加上 T 尾用做克隆载体。在 100 μ L 加尾反应体系中含有 5 μ g 质粒 DNA,5mmol/L dATP,3.75mmol/L MgCl₂,5 单位 Taq 聚合酶及一倍的反应缓冲液,混合物在 75 $^{\circ}$ C 保温 2h,立即用苯酚、氯仿抽提,沉淀 DNA,并溶于水中备用。将扩增并加 A 的 rDNA 与加 T 的载体按 2:1 摩尔比混合,保持 DNA 总量在 300ng 左右,在 T4 连接酶作用下,于 16 $^{\circ}$ C 连接 24h 以上,转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。

1.4 重组质粒的限制性内切酶酶切分析 在获得的重组子中,随机选取 100 个左右,小量抽提重组质粒,用 4 碱基限制性内切酶 HinfI 消化重组质粒,2% 琼脂糖凝胶电泳,获得限制性片段长度多型性图谱,也就是 16S rDNA 基因型。载体多克隆区两边的部分与 rDNA 的两端在酶切后连在一起,成为 rDNA 限制性片段的一部分,而载体的其它酶切片段是相同的,并可当作内源分子量标记。rDNA 的某些极小片段由于极难获得清晰的带纹,在分析时被忽略。

1.5 统计分析 用 Shannon 氏信息指数 $H = -\sum f_x \cdot \log f_x$ 来计量水环境细菌群落的整体遗传多样性,其中 f_x 是第 x 种 rDNA 基因型的频率^[12]。用 $\mu = (f_x - f_y) / [f_x \cdot (1 - f_x) / n_x + f_y \cdot (1 - f_y) / n_y]$ 计算 μ

值,用 μ 检验判定任意两基因型间频率差异的显著程度,其中, f_x 、 f_y 分别为第 x 和 y 基因型的频率, n_x 、 n_y 分别为第 x 和 y 基因型的数量。

2 结果与分析

2.1 水环境细菌 16SrDNA 限制性片段长度多样性 PCR 能等效扩增各类细菌的

rDNA,而克隆和重组子选择是完全随机的,因此,作者认为分离的 rDNA 能代表水环境细菌 16S 核糖体 RNA 群体。本研究中共分析了 89 个含细菌 16S rDNA 的重组质粒。共发现 13 种细菌 rDNA 基因型(图 2)。由于分析的重组质粒数不很大,采用了逐级拼接的方法来归并不同的基因型,即在同一块凝胶上主要用肉眼找出不同的基因型,对不肯定的类型再电泳确证,而不同凝胶上的基因型,完全用电泳判定。同时,借助分子量标记,计算了各种带的分子量^[13],以进一步判定和归并各个基因型,当把长度差异在 50bp 以内的带归于同种长度时,结果与拼接法完全一致,这说明在比较不同的细菌群落时,或当分析的样品较多时,可以仅凭分子量计算划分基因型或整和不同的数据。各基因型及它们的频率列于表 2。发现各基因型的频率分布变化较大,在 13 种基因型中,有 2 种的频率超过 0.1,而其它的基因型频率较低,有 1 种仅出现一次。最高和最低的频率分别为 0.225 和 0.011,所有基因型频率间差异都没有达到显著水平。这说明本研究分析的水环境中不存在主要的细菌类群,没有单一优势种。遗传多样性指数为 1.029。

2.2 水环境细菌群落结构 与高等植物群落结构的描述方法类似,用基因型类型数,各类型的频率,遗传多样性指数等参数来决定水环境细菌群落的结构,所不同的是回避了种的分类和鉴定,而直接在基因层次上分析细菌群落结构,而且,克服了绝大多数细菌无法获得纯培养的困难。细菌等微生物适应着这些污染严重的人工生境及一些自然极端生境。在分子水平上描述环境细菌群落结构是分析隐含在环境中,但不能以个体为单位,用分类方法研究的遗传多样性和探讨这样的多样性与环境质量关系的基础。事实上,细菌 16SrDNA 已作为分子标记,用于揭示细菌种群的遗传多样性,描述新种等,在环境科学中获得了广泛的应用。由于水环境细菌种类多,变异丰富,16SrDNA 单一酶的限制性片段长度多态性是反映水体细菌遗传变异和群落结构较合理的层次,可望在分析水环境隐含遗传多样性、揭示污染的生物学效应和环境质量评价等环境科学研究上获得广泛的应用。

2.3 模板 DNA 分离方法的优化 从操作角度考虑,模板 DNA 分离方法越简单越好。在 LB 培养基上培养水环境细菌,随机获得一批菌落,用溶菌酶和 SDS 处理,能使所有细

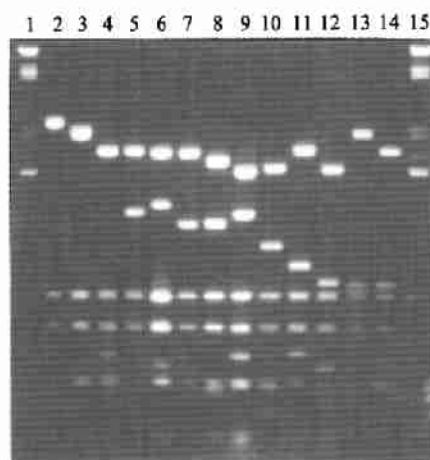


图 2 水环境细菌 16SrDNA 基因型,
1,15 为分子量标记

Fig.2 Bacterial 16S rDNA genotypes (Hinf I restriction pattern) in aquatic environment

菌裂解,由此总结出差速离心-溶菌酶-SDS 处理法分离水样总 DNA^[11]。该方法克服了已有方法繁复冗长、费用昂贵的缺点,但不适用于较干净、细菌少、无法沉淀出细菌的样品。为使模板 DNA 分离方法适用于所有环境水样,曾尝试了碱煮法,即在 NaOH 溶液中裂解细菌体。该方法也能使所有细菌裂解,释放出单链 DNA。另外,直接处理能收集到的各种环境水样,都能直接用于 PCR 反应,因此,这是一种最简洁的模板 DNA 分离方法。已报道该法能裂解酵母细胞和真菌孢子^[14,15],相信该法能用于分离水环境样品中各种细菌的 DNA。由于 PCR 的选择性,少量其它生物的 DNA 不影响分析。

表 2 水环境细菌 16S rDNA 基因型及其频率

Tab. 2 16S rDNA genotypes and their frequencies of aquatic bacteria

16S rDNA 基因型 16S rDNA genotypes	基因型频率 Frequencies	16S rDNA 基因型 16S rDNA genotypes	基因型频率 Frequencies
2 *	0.067	11	0.090
3	0.045	12	0.067
4	0.225	13	0.011
5	0.124	14	0.022
6	0.056	重组质粒数	
7	0.056	Plasmid recombinants	89
8	0.090	多样性指数	
9	0.079	Diversity index	1.029
10	0.067		

注:编号与图二编号一致 The numbers are in accordance with those in Fig. 2

参考文献:

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiology Reviews*. 1995, **59**:143—169
- [2] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, *et al.* Design and examination of useful bacterium specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**:795—799
- [3] Field K G, Gordon D, Wright T, *et al.* Diversity and depth specific distribution of SAR 11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**:63—70
- [4] Wise M G, McArther J V, Shimkets L J. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: Confirmation of novel taxa [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**:1505—1514
- [5] Collins M D, East A K. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins [J]. *J. of Appl. Microbiol.*, 1998, **84**:5—17
- [6] Laguerre G, Allard M R, Revoy F, *et al.* Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**:56—63
- [7] Brunel B, Givaudan A, Lanois A *et al.* Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**:574—580
- [8] 谭志远, 陈文新. 根瘤菌新类群的全细胞蛋白电泳及 16S rDNA 全序列分析[J]. 应用与环境生物学报, 1998, **4**: 65—69
- [9] Britschgi T B, Giovannoni S. Analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA cloning and sequencing [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**:1707—1713
- [10] Lane D J, Field K G, Olsen G J, *et al.* Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis

- [J]. *Methods Enzymol.*, 1998, **167**:138—144
- [11] 杨官品,朱艳红. 土壤细菌基因资源的直接分离:16S 核糖体 RNA 基因模式[J]. 湖北大学学报,1998,4:383—385
- [12] Yang G P, Saghai Maroof M A, Zhang Q F, *et al.* Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice [J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1994, **245**:178—194
- [13] Southern E M. Measurement of DNA length by gel electrophoresis [J]. *Anal. Biochem.*, 1979, **100**:319—323
- [14] Wang H, Kohalmi S E, *et al.* An improved method for polymerase chain reaction using whole yeast cells [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, **237**:145—146
- [15] Redecker D, Thierfelder H, *et al.* Restriction analysis of PCR - amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomals [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**:1756—1761

THE RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISM OF BACTERIAL 16S rDNA RESTRICTION FRAGMENT LENGTH AND COMMUNITY STRUCTURE OF AQUATIC BACTERIA

LI Zhi-gang, YANG Guan-pin and ZHU Yan-hong

(*Department of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062*)

Abstract: In this study, a technique describing aquatic bacterial community structure has been developed by using restriction fragment length polymorphism of 16S ribosomal RNA gene (rDNA). The technique includes isolation of DNA directly from lake - water, amplification of rDNA using bacteria - specific primers, construction of plasmid library and digestion of randomly extracted recombinant plasmids with restriction endonuclease. The structure of bacterial community is determined using rDNA genotypes and their frequencies. This method has potentials in analyzing hidden genetic diversity of aquatic environments, tracing biological effectiveness of pollutants and evaluating environmental quality.

Key words: 16S ribosomal RNA gene; Restriction fragment length polymorphism; Bacterial community; Aquatic environment