

DGGE 技术在土壤微生物群落研究中的应用

宋 洋,李柱刚

(黑龙江省农业科学院 生物技术研究所以/黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:现代分子生物学的变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术是土壤微生物群落研究的有效工具,它直接分离土壤微生物的 DNA 片段,比传统的培养方法更具明显的优势,已成为研究土壤微生物的重要手段之一。对 DGGE 技术的原理及其在土壤微生物群落研究中的应用情况、优点和局限性进行了介绍。

关键词: DGGE; 土壤微生物; 群落结构

中图分类号: Q938.1⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)07-0005-04

土壤中微生物群落结构对农业的健康、持续发展具有重要作用。它们积极参与土壤物质转化过程,在土壤形成、肥力演变、植物养分有效化和土壤结构形成与改良、有毒物质纯化及净化方面起着重要作用^[1]。由于土壤微生物的重要性,有关土壤微生物的群落结构及多样性研究受到广泛重视^[2]。但研究表明,土壤微生物中可用常规方法分离培养的微生物只占 0.1%~1.0%^[3]。因此,传统的微生物培养及鉴定方法不足以反映土壤环境中微生物的真实情况,需要现代分子生物学技术进行补充,如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)、单链构象多态性分析(SSCP)等技术,这些技术可以根据微生物的 DNA 序列遗传多态性,揭示出其群落结构及其多态性。

变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)是 20 世纪 80 年代初由 Lerman 等^[4]发明用于医学上检测 DNA 片段中点突变的一种电泳技术。Muyzer 等^[5]在 1993 年首次将其应用于微生物群落结构研究,并证明了

其在研究微生物多样性和种群差异上的优越性。此后,该技术被广泛应用于微生物分子生态学研究各个领域,如复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态、基因定位、表达调控的评价分析。而且 DGGE 可靠性强、重现性高、方便快捷,目前已发展成为研究微生物群落结构的重要分子生物学手段^[4,6],同时也成为研究土壤微生物多样性及种群演替的重要方法之一。

1 DGGE 技术

1.1 基本原理

DGGE 技术在普通的聚丙烯酰胺凝胶基础上,加入了变性剂(尿素和甲酰胺)梯度,根据其迁移行为决定于其分子大小和电荷的原理,能够把同样长度但序列不同的 DNA 片段区分开来。

一个特定的 DNA 片段由其特有的序列组成,其序列组成决定了其解链区域(melting domain)和解链行为(melting behavior)^[7-8]。不同的双链 DNA 片段因为其序列组成不一样,所以其解链区域及各解链区域的变性剂浓度也是不一样的。当它们进行 DGGE 时,一开始变性剂浓度比较小,不能使双链 DNA 片段最低的解链区域解链,此时 DNA 片段的迁移行为和在一般的聚丙烯酰胺凝胶中一样。然而一旦 DNA 片段迁移到一特定位置,其变性剂浓度刚好能使双链 DNA 片段最低的解链区域解链时,双链 DNA 片段最

收稿日期:2010-03-22

基金项目:黑龙江省科技厅国际合作重点资助项目(WB07A10)

第一作者简介:宋洋(1981-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,研究实习生,主要从事微生物菌群分析和分子育种研究。E-mail:achievement81@yahoo.com.cn。

通讯作者:李柱刚(1972-),男,黑龙江省庆安县人,博士,研究员,从事植物分子育种研究。E-mail:lizhugang@163.com。

低的解链区域立即发生解链。部分解链的 DNA 片段在胶中的迁移速率会急剧降低。因此,同样长度但序列不同的 DNA 片段会在胶中不同位置达到各自最低解链区域的变性剂浓度,因此它们会在胶中的不同位置发生部分解链导致迁移速率大大下降,从而在胶中被区分开来。然而,一旦变性剂浓度达到 DNA 片段最高的解链区域浓度时,DNA 片段会完全解链,成为单链 DNA 分子,此时它们又能在胶中继续迁移。因此如果不同 DNA 片段的序列差异发生在最高的解链区域时,这些片段就不能被区分开来。DNA 片段分离过程见图 1^[9]。在 DNA 片段的一端加入一段富含 GC 的 DNA 片段(GC 夹子,一般 30~50 个碱基对)可以解决这个问题。含有 GC 夹子的 DNA 片段最高的解链区域在 GC 夹子这一段序列处,它的解链温度很高,可以防止 DNA 片段在 DGGE 胶中完全解链。当加了 GC 夹子后,DNA 片段中基本上每个碱基处的序列差异都能被区分开^[10-11]。

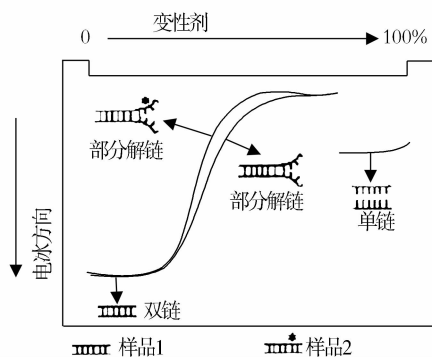


图 1 DGGE 对 DNA 片段的分离示意图

当用 DGGE 技术来研究微生物群落结构时,要结合 PCR(polymerase chain reaction)扩增技术,用 PCR 扩增的 16S rRNA 产物来反映微生物群落结构组成。通常根据 16S rRNA 基因中比较保守的碱基序列设计通用引物,其中一个引物的 5'端含有一段 GC 夹子,用来扩增微生物群落基因组总 DNA,扩增产物用于 DGGE 分析。

1.2 基本流程

DGGE 技术研究土壤微生物群落的基本流

程:(1)采集土壤样品;(2)土壤样品总 DNA 的提取与纯化;(3)纯化的总 DNA 进行 16S rDNA V3 区巢式 PCR 扩增;(4)DGGE 技术分离 PCR 产物;(5)DGGE 电泳条带的指纹图谱分析。

2 DGGE 技术在土壤微生物群落研究中的应用

土壤微生物是土壤环境中的重要组成部分,其中的群落结构及其变化在一定程度上影响了土壤的质量,所以对于土壤中微生物群落的研究,在土壤可持续利用及农业可持续发展方面起着重要作用。由于土壤环境复杂,运用传统的平板培养法等很难反映出土壤微生物的群落结构,DGGE 技术不依赖于微生物培养可以较大幅度地反映出其多样性,它的应用为研究土壤微生物群落结构提供了一个有效的方法。国内外的很多研究人员利用 DGGE 技术在土壤改良及土壤微生物变化规律、影响因素等方面开展了分析研究。

2.1 污染土壤微生物群落的研究

由于环境污染日趋严重,土壤及土壤中的微生物群落也受到了一定程度的影响。利用 DGGE 技术分析污染物对土壤微生物的多样性及变化规律的影响,可以提供土壤的污染程度,并为改良污染土壤提供理论依据。Fantroussi 等^[12]研究长期使用苯基尿类除草剂后农田土壤微生物的变化,结果表明,使用此除草剂后,土壤微生物多样性明显降低,使土壤中一些不可培养的微生物种群出现明显的消亡现象。贾建丽等^[13]基于 PCR-DGGE 技术,对中国不同区域环境下的油田区石油污染土壤微生物多态性进行评价,结果表明,土壤含油率通过制约微生物数量和活性而对总 DNA 产率产生影响。

2.2 作物根际土壤微生物群落的研究

植物根分泌出的无机物、有机物等是根际微生物的主要营养来源,这就使得根际微生物的数量和优势菌群随植物生育期的变化而变化,而根际微生物数量和菌群的变化也对根及植物的生长产生影响。分析根际微生物的变化规律,对建立

有利于作物生长的土壤环境具有重要意义。胡元森^[14]等用 DGGE 技术分析黄瓜连作土壤微生物群落演替规律,发现黄瓜根际细菌数量与其生长发育关系密切,而非根际细菌数量随黄瓜生长发育变化不大。黄瓜连作导致根际微生物数量显著变化可能与根分泌物在根部累积有关。孙晓棠等^[15]用巢式 PCR-DGGE 法研究番茄不同生育期根际微生物种群的动态变化,根际细菌种类和数量在初花期发生较为显著的变化,初果期根际群落多样性指数和物种丰度值都达到最高,微生物最丰富,是筛选拮抗菌的较好时期。而 Ma^[9]等应用 PCR-DGGE 技术探测灌木根际真菌,通过与加拿大萨斯喀彻温省土壤中的已知菌群作比较,验证这种方法的有效性,并发现了一种以前未观察到的灌木根际真菌——*Scutellospora Calospora*。

2.3 影响土壤微生物多样性的研究

土壤中的微生物是敏感群体,周围环境发生变化时就可能对其产生一定程度的影响。探讨周围环境对微生物多样性造成的损失与伤害,可以为保护土壤微生物多样性提供方法。王岳坤等^[16]从红树林中 19 种不同红树植物的土壤中抽提微生物总 DNA,直接扩增 16S rDNA V3 片段,应用 DGGE 技术和分子克隆技术分析 16S rDNA V3 片段的多态性,发现地域因素和红树品种都是影响土壤微生物群落结构的因素。Allision Mccaing 利用 DGGE 方法对 3 种类型草地的细菌多样性进行了比较,同时也对没改进的和经过改进的草地土壤用克隆方法进行了比较^[17]。结果表明,通过对图谱进行分析确实揭示出了 3 种草地类型中的细菌群体结构的差异,改进了的草地样品中的细菌多样性比没改进的草地样品低,半改进的草地样品中细菌与其它 2 个草地样品相比,具有较少的多样性和较低的组内变化。

3 DGGE 技术的优点与局限性

DGGE 技术的优点是:其可直接对提取的土壤样品总 DNA 进行微生物多样性分析,比传统培养方法提供更多的菌群信息;若 PCR 产物发生

突变,DGGE 检出率可达 100%,分辨率可达到 1 个碱基;几乎可检出所有突变,无须对引物标记;可将突变体同野生型进行比较分析;检测片段最长可达 1 kb,但最适范围为 100~500 bp。

与其它技术一样 DGGE 技术也存在一定局限性。Muyzer 等^[18]指出 DGGE 技术只能对微生物群落中数量大于 1% 的优势种群进行分析,还不能完整地反映复杂环境中微生物的群落。DGGE 检测的 DNA 片段长度范围以 200~500 bp 为好,超出此范围的片段分离效果较差;不能完全保证将有序列差异的 DNA 片段分开,从而出现序列不同的 DNA 共迁移现象。此外,由于 DGGE 还不能提供微生物完整、真实的群落情况,在其检测的基础上往往需结合杂交技术或核酸测序分析才能更详尽地反映微生物群落复杂性。

4 展望

DGGE 技术作为土壤微生物快速分析的重要手段,再辅以杂交技术或核酸测序分析技术,能够更深入地揭示土壤微生物群落的多样性。随着 DGGE 技术在土壤微生物评价方面的广泛应用,研究人员将对其不断改进和完善,使其在土壤、活性淤泥、底泥等材料中微生物群落结构、多样性及演替规律等方面的研究过程中发挥更大的作用,也为人类更近一步认识微生物提供可靠的理论依据,从而能够更好地开发和利用有益的微生物资源。

参考文献:

- [1] 郝文英. 中国农业百科全书:土壤卷[M]. 北京:农业出版社,1996:385-400.
- [2] 焦晓丹,吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展[J]. 土壤通报,2004,35(6):789-792.
- [3] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems [J]. Symp Soc Gene Microbial, 1987, 41: 1-17.
- [4] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 127-141.

- [5] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695-700.
- [6] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 317-322.
- [7] Fischer S G, Lerman L S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels; correspondence with melting theory [J]. Proc National Acad Sciences USA, 1983, 80(6): 1579-1583.
- [8] Lerman L S, Fischer S G, Hurley I, et al. Sequence-determined DNA separations [J]. Annu Rev Biophys Bioeng, 1984, 13: 399-423.
- [9] Ma W K, Siciliano S D, Germida J J. PCR - DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 1589-1597.
- [10] Myers R M, Fischer S G, Lerman L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13 (9): 3131-3145.
- [11] Myers R M, Fischer S G, Maniatis T, et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(9): 3111-3129.
- [12] Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, et al. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 982-988.
- [13] 贾建丽, 李广贺, 张旭, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的石油污染土壤微生物多态性 [J]. 清华大学学报 (自然科学版) 2005(9): 1217-1220.
- [14] 胡元森, 吴坤, 李翠香, 等. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响 II—基于 DGGE 方法对微生物种群的变化分析 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2267-2273.
- [15] 孙晓棠, 王燕, 龙良鲲. 番茄根际微生物种群动态变化及多样性 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1744 -1749.
- [16] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 的产物 DGGE 分析 [J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 201-204.
- [17] Allison E, Mccaing L, Anne G, et al. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4554-4559.
- [18] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 340-346.

Application of DGGE in Soil Microorganism

SONG Yang, LI Zhu-gang

(Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Based on modern molecular technology, DGGE is a powerful tool for the analysis to understand community structure of soil microorganism, which can directly separating DNA clips. It has obvious advantages and it is one of the most useful research methods in soil microorganism. In this paper, the principle and the application of DGGE in soil microorganism were briefly introduced, while the advantages and limitations of this technique were also evaluated.

Key words: DGGE; soil microorganism; community structure

欢 迎 投 稿