

太湖地区典型菜地土壤微生物16S rDNA的 PCR-RFLP分析

滕齐辉¹ 曹 慧^{1*} 崔中利^{1,2} 王 英¹ 孙 波² 郝红涛² 李顺鹏¹

1 (南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

2 (中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘要: 土壤微生物多样性是土壤生态功能的基础, 但长期以来缺乏对高强度土地利用条件下的土壤微生物多样性的认识。作者采用间接法提取了江苏省太湖地区典型菜地土壤微生物的总DNA, 以细菌的通用引物27F和1492R扩增16S rDNA片段, 将扩增产物与T-载体酶连, 转化大肠杆菌, 建立土壤微生物16S rDNA克隆文库。PCR扩增基因文库中插入的16S rDNA外源片段, 用两种限制性内切酶*Hha* I和*Rsa* I 分别酶切, 获得该土壤173个克隆的酶切指纹图谱。结果表明, *Hha* I和*Rsa* I联合酶切产生了63个基因分型, 文库的覆盖度达76.30%, 单一酶切产生的基因分型少, 但文库的覆盖度高; 克隆文库中存在两种优势类群, 分别占总克隆的16%和12%。16S rDNA测序结果表明, 太湖地区菜地土壤细菌在分类方面主要属于 α -和 γ -变形杆菌亚门。以上结果为进一步研究太湖地区菜地土壤微生物生态功能提供了基础资料。

关键词: 土壤细菌多样性, 间接提取法, 16S rDNA克隆文库, RFLP分析

PCR-RFLP analysis of bacterial 16S rDNA from a typical garden soil in Taihu region

Qihui Teng¹, Hui Cao^{1*}, Zhongli Cui^{1,2}, Ying Wang¹, Bo Sun², Hongtao Hao², Shunpeng Li¹

1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008

Abstract: Soil microbial diversity provides basic function of a soil ecosystem. In this study, the total DNA of microorganisms was extracted by an indirect method from a typical garden soil of Taihu region, Jiangsu Province. The 16S rDNAs of the extracted DNA were amplified using bacterial universal primers 27F and 1492R. PCR products were ligated into the pMD 18-T Vector and transformed into *Escherichia coli* DH5 α to construct a 16S rDNA clone library of the soil microbes. A total of 173 clones from the library were screened and their 16S rDNA fragments were reamplified. The PCR products were digested by *Rsa* I and *Hha* I, respectively, and their fingerprints were analyzed. The results indicated that the library includes 63 *Hha* I and *Rsa* I restriction endonuclease types and the coverage (*C* value) of the clone library is 76.30%. The number of genotypes digested either by *Hha* I or *Rsa* I is only 40 and 27 although it has a high coverage. There were two main restriction types accounting for 16% and 12% of the total 16S rDNA clones, respectively. Phylogenetic analysis suggests that the dominant bacteria in this garden soil belong to α -proteobacteria and γ -proteobacteria.

Key words: soil bacterial diversity, indirect DNA extraction method, 16S rDNA clone library, RFLP

收稿日期: 2006-01-04; 接受日期: 2006-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(40371069)、中国科学院知识创新工程项目(KZCX3-SW-427)和中国博士后科学基金项目(2003033495)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: hcao@njau.edu.cn

土壤微生物群落结构是土壤生态功能的基础,它与土壤的化学性质、土壤团聚体的形成以及土壤污染物的降解等密切相关。传统的土壤微生物学研究主要通过测定土壤微生物生物量、土壤微生物活性或者采用平板培养的方法来反映土壤质量的变化。由于土壤中的微生物99%以上属于未培养的类群(Amann *et al.*, 1995; Ringelberg *et al.*, 1997),传统方法只能揭示部分土壤微生物的特征。采用分子生物学方法可以避开传统培养方法的局限性,大大丰富对土壤微生物多样性的认识,进而对于土壤微生物资源开发以及寻找敏感的土壤质量指标具有借鉴意义(叶姜瑜和罗固源, 2004)。

江苏省太湖流域是中国人口密度最大、城市化水平最高、经济最为发达的地区之一。经济的快速发展也带来了一系列生态环境问题(谈明洪和吕昌河, 2005)。随着土地利用类型和结构的不断变化,尤其是水田面积的减少和菜地面积的增加,必然带来土壤生物学性质的改变,尤其是最为敏感的土壤微生物群落结构将会发生相应变化,这将影响到土壤生态系统的功能发挥和稳定。但目前这方面的研究鲜有人涉及。

本研究采用间接提取法从土壤样品中提取微生物总DNA,通过建立土壤微生物的16S rDNA克隆文库,分析了太湖流域典型菜地土壤的微生物群落结构特征,以期全面而深入地理解土壤微生物多样性以及揭示土地利用变化与生态环境效应之间的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

采样地点位于江苏省宜兴市洋溪镇。该地区为亚热带暖湿季风气候,年平均气温15.7℃,年平均降水量1,128.0 mm。土壤pH值5.45,有机质含量为29.2 g/kg,全N含量为1.96 g/kg,土壤含水量27.63%。

采样点土地利用的类型为菜地,种植大白菜(*Brassica rapa pekinensis*),利用年限30年以上。采样时间是2004年1月。采用五点采样法,用土壤采样器采集菜地中相邻5个地点的土壤样品,采集深度为0–15 cm,混合后用布袋封装带回,去除石块和植物根系后分为两部分,分别在4℃和–70℃冰箱中保存。用LB培养基对土壤细菌进行计数,细菌数量

为 5.26×10^7 cfu/克干土。

1.2 菌株、培养基与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存; pMD18-T Vector购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.); 氨苄青霉素(Amp)购自南京创瑞公司; PCR引物由上海博亚生物技术有限公司合成; DNA回收试剂盒购自V-gene Biotechnology Limited; 培养基配制参照Maniatis等(1982)的分子克隆方法。

1.3 土壤总DNA的提取与检测

采用间接法提取自然土壤总DNA,具体操作步骤参照黄婷婷等(2004)的方法。采用Maniatis等(1982)的紫外分光光度法定量土壤微生物总DNA进行。用0.75%的琼脂糖凝胶电泳检查提取DNA的质量和片段大小。

1.4 细菌16S rDNA片段的扩增与克隆文库的构建

合并3个重复提取的土壤总DNA,采用细菌通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3')直接扩增总DNA中的细菌16S rDNA片段。扩增反应体系: DNA (约50 ng/ μ L) 0.5 μ L, *Taq*聚合酶Buffer 2.5 μ L, dNTP(20 mmol/L) 2 μ L, 引物27F和引物1492R(25 pmol/ μ L)各0.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)2 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 补水至25 μ L。扩增10管重复,扩增产物均匀混合以消除单次扩增的偏向性。反应条件: 94℃变性5 min; 再接94℃30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 最后72℃延伸10 min。扩增产物用0.75%的琼脂糖凝胶电泳回收,通过TA克隆技术将扩增的16S rDNA片段转化到*E. coli* DH5 α 中,蓝白斑筛选挑取500个阳性克隆子,建立16S rDNA克隆文库,克隆文库通过Amp^r平板保藏。

1.5 RFLP分析

通过菌体PCR方法,用pMD 18-T载体通用引物(BcaBEST Primer RV-M: 5'-GAGCGGATAATTC-ACACAGG-3'与BcaBEST Primer M13-47: 5'-CGC CAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3')重新扩增200个阳性克隆子中插入的16S rDNA片段,将PCR产物分别用*Hha* I和*Rsa* I两种限制性内切酶消化(37℃, 1 h)。酶切DNA片段用2%的琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭染色和凝胶成像系统成像后,所得DNA带型图谱在GIS凝胶分析软件辅助下进行人工比较分析。以基因片段多态图谱为基础进行聚类,聚合

到一起的具有相同图谱的克隆需要用第2种限制性内切酶进行消化与电泳分离。当第二次所获得的基因图谱仍然相同时,则认为它们是相同的基因型。每一个基因型作为一个分类操作单位(OTU, Operational Taxonomic Unit) 或称为唯一基因型(夏北成等, 2001)。

1.6 群落结构计算方法(Hill *et al.*, 2003)

Shannon-Wiener 指数的计算公式为:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, \quad P_i = \frac{n_i}{N}$$

式中, S 为 16S rDNA 的 RFLP 总类型数, n_i 为第 i 种 16S rDNA 的 RFLP 变异类型克隆数, N 为总克隆数。

Simpson 指数的计算公式为:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

Margalef 物种丰富度指数的计算公式为:

$$d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N}$$

式中, S 为群落中物种总数, 也即物种丰富度。

均匀度指数的计算公式为:

$$E = \frac{H'}{H_{\max}}$$

文库的库容(coverage)(Good, 1953)计算公式为:

$$C = 1 - \frac{nl}{N}$$

N 代表 16S rDNA 文库总克隆数, nl 代表在文库中仅出现一次的 OTU 的数量。

1.7 核酸序列注册登录号

19 个 16S rRNA 基因序列已经提交到 GenBank 数据库, 登录号为: DQ011835–DQ011837, DQ011839–DQ011843, DQ086464, DQ086465, DQ324427–DQ324434, DQ333892。

2 结果

2.1 土壤微生物总DNA的提取

环境样品总DNA的提取是微生物分子生态学研究中最基本的实验技术之一, 从环境中获得高质量的微生物DNA是进行后续实验的基础, 因此它必须真实而全面地反映环境微生物的多样性和丰度(Hurt *et al.*, 2001)。由于环境样品种类繁多、组成复杂、化学性质多变, 没有一种提取DNA的方法能够

适用于所有的环境样品。本文采用间接法提取土壤微生物总DNA。该法首先通过差速离心收集菌体细胞, 去除土壤中的大部分有机质和胶体物质, 克服此缺点。这样获得的微生物总DNA纯度高、片段大(>23 kb), 而且不经纯化可直接扩增, 对后续的实验非常有利。本实验中提取的微生物总DNA的电泳图谱见图1, DNA提取量为 $7.2 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ 干土, 吸光值 A260/A280 为 1.46 ± 0.06 。

2.2 克隆文库的库容Coverage (C)值

理论上, 克隆文库的库容表征样品中微生物种类的覆盖程度。当库容为100%时, 表明克隆文库包括了该环境样品中的所有微生物种类。很显然, 即使不考虑PCR的影响, 16S rDNA克隆文库都不能达到这一指标(Qiu *et al.*, 2001)。本研究通过间接提取的土壤总DNA建立的173个克隆的酶切指纹图谱, 文库的库容值为76.30%(见表1)。这表明库容值较大, 文库的覆盖程度较高, 文库具有较好的代表性; 而且生态多样性指数高, 生物多样性信息丰富。这反映出本文构建的克隆文库能比较真实代表该地区土壤微生物的多样性, 同时也说明通过间接法提取环境样品总DNA的丰富性并不比直接法低(Gabor *et al.*, 2003)。

通过表1还可以看出, 克隆文库的丰富度越高, 库容值越小, 即限制性酶切片多态性(RFLP)分析越精细, 反映出16S rDNA克隆文库的库容不足, 说明环境中有更多的微生物种类需要人们去分离、认识。

2.3 克隆文库中16S rDNA片段的RFLP 分析

通过建立土壤微生物16S rDNA克隆文库, 可以突破传统培养方法的局限性, 直接在分子水平上对微生物多样性进行分析。本研究通过PCR扩增插入到克隆子中的16S rDNA片段, 采用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种限制性内切酶消化插入扩增产物, 获得酶切指纹图谱来研究太湖地区典型菜地土壤细菌群落多样性。这两种酶皆为4碱基限制性内切酶, 酶切位点特异性高。 *Hha* I 的酶切位点是 GCG' C, *Rsa* I 的酶切位点是 GT' AC, 两种酶的酶切位点包括了 GC 和 AT 位点。在16S rDNA片段中酶切频率高, 酶切片段丰富, 在操纵分类单元 OTU 分类上精确有效(Moyer *et al.*, 1996)。

克隆文库经 *Rsa* I 酶和 *Hha* I 酶酶切产生的 RFLP 类型分布情况见图2–4。

Table 1 Diversity of restriction endonuclease types in 16S rDNA clone library

Fig. 4 The patterns and the proportion of 16S rDNA digested by *Hha* I and *Rsa* I

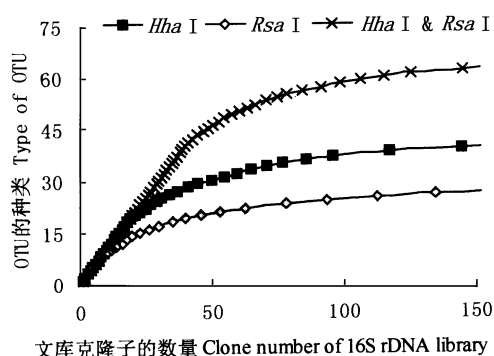


图5 克隆文库的种系型丰度趋势线

Fig. 5 Phylotypic richness curves of clone libraries

Hha I 酶酶切分型后, 总共产生了40种类型(图2), 其中有3种类型所占比例较高, 分别为16%、16%和13%。*Rsa* I 酶酶切分型后, 总共产生了27种类型(图3), 有5种类型占的比例高, 分别为22%、13%、11%、9%和9%。通过两种酶酶切分型后共产生了63种类型(图4), 只有2种类型所占比例较高, 分别为16%和12%, 这2种类型为克隆文库的优势类型。

针对某一种酶酶切, *Hha* I 酶对16S rDNA片段酶切位点较*Rsa* I 酶丰富, 而且酶切分型的种类丰富, 甚至可以对某一类细菌直接分类, 所以*Hha* I 酶较*Rsa* I 酶在对该文库中细菌16S rDNA片段酶切图谱分析更准确有效。一部分克隆子中插入的16S rDNA片段经*Rsa* I 酶酶切分型后图谱相同, 再经*Hha* I 酶酶切分型后又产生图谱差异, 随机挑取一个克隆子为酶切分型代表, 测定16S rDNA片段全序列, 登录NCBI网站通过Blast软件在线比对确定其种属分类地位。系统发育树图中的克隆子L50与L135中插入的16S rDNA片段经*Rsa* I 酶酶切, 酶切指纹图谱相同; 再经*Hha* I 酶酶切后, 产生的酶切指纹图谱不同, 而且其同缘关系相差较远。说明用两种酶进行酶切对细菌16S rDNA分类更准确。从图5可以看出, 用两种酶分别对克隆文库16S rDNA酶切比单独用任何一种酶酶切得到的种类多、丰富度高, 说明在限制性酶酶切分型方面用两种酶或多种酶酶切分型更丰富, 对群落分类更详细 (Moyer *et al.*, 1996)。

OTU种类与clone数量的比值(*O/C*比值)可以反映克隆文库的丰富度。夏北成等(2001)研究了不同

生态环境下的微生物的克隆文库, 其*O/C*比值范围为0.26–0.97。本实验的菜地土壤环境中克隆文库*O/C*比值为0.36, 数值较低。这一结果显示, 长期种植蔬菜可能会降低土壤细菌群落多样性, 这与通过传统培养技术研究的设施农业菜地土壤微生物种类少是一致的(尹睿等, 2004)。

2.4 序列测定与系统发育树构建

通过分析酶切图谱, 从各代表性的OTU中随机挑取1个克隆子进行测序, 测序克隆共19个, 测定的16S rDNA插入片段长度介于800–1,500 bp之间。测定序列已全部提交NCBI数据库, 利用NCBI ClustalX软件包构建细菌系统发育树(见图6)。

从系统发育树中我们可以看出, 此文库代表的细菌类群在 α -、 β -、 γ -变形杆菌亚门以及厚壁菌门中皆有分布, 具有丰富的多样性。文库中挑取的L50和L135克隆子分别代表了文库中占16%和12%的优势OTU种类, 它们也分布在 γ -、 α -变形杆菌亚门。其余测序克隆子在 γ -、 α -变形杆菌亚门中也有分布, 其中 γ -变形杆菌亚门占大部分。近年来在亚洲其他国家的菜地土壤中, 也发现了 γ -变形杆菌亚门的某些新种(Xie & Yokota, 2005), 所以 γ -变形杆菌可能是菜地土壤的优势菌群。此外, 文库中还发现了一些与未培养微生物同缘关系很近的克隆, 这是一类目前认识不足的微生物类群, 可能与特殊的微环境有关。

3 讨论

土壤微生物总DNA的间接提取方法在未培养微生物的分子生物学实验方面体现出优势, 由于土壤生态系统的复杂性, 某些细菌可能与土壤颗粒结合紧密, 在离心去除土壤颗粒的同时, 可能也会丢失一部分土壤微生物类群。目前提取土壤总DNA的方法很多, 针对不同土壤类型和土壤性质采用的方法也不相同: 如腐殖质较丰富的土壤, 采用间接提取方法; 土壤酸、碱性高而且比较贫瘠的土壤, 采用原位裂解方法。没有一种普适的土壤微生物总DNA提取方法, 这就使得不同的研究构建的土壤微生物基因文库之间缺少严格的可比性。

本研究采用PCR-RFLP方法分析了太湖地区典型菜地土壤细菌多样性。克隆文库的库容值较高, 表明构建的克隆文库能够比较完整地反映土壤微

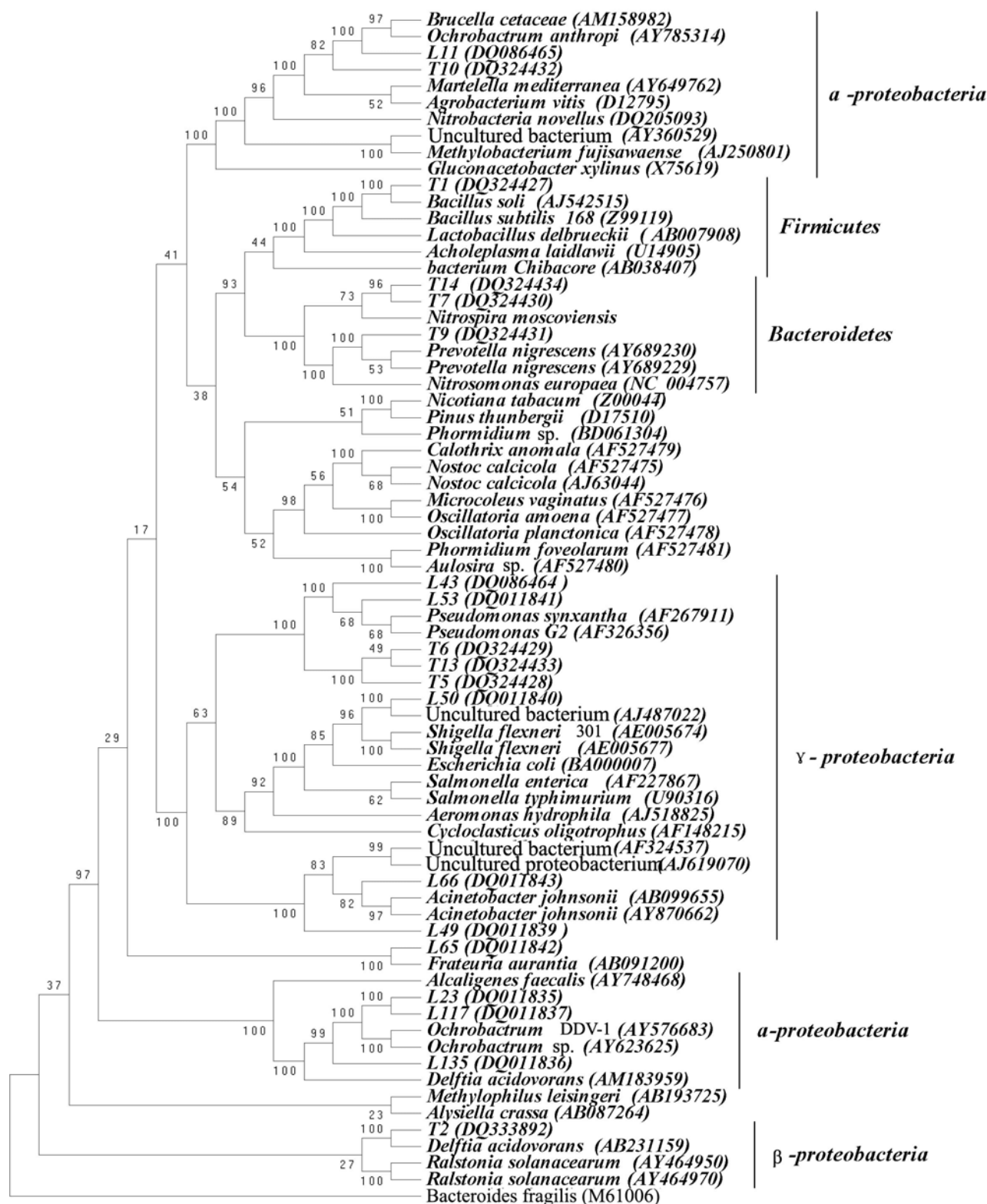


图6 基于16S rDNA序列的土壤微生物系统发育树

Fig. 6 A dendrogram of soil microbe based on 16S rDNA sequencing

生物群落组成。此外,从测序和比对的结果可以看出,文库中还包括厚壁菌门等微生物类群,而这类细菌细胞壁较厚,通过物理方法一般较难裂解,表明本研究中采用的提取与裂解方法比较有效。

通过对该文库研究发现,太湖流域典型菜地土壤细菌群落中有两种优势类群,与其他环境样品相比细菌多样性较低,这可能是由于长期而大量地使用化肥或农药,或者存在连作障碍因子,限制了土壤某些细菌的生长(Ekumdayo, 2003),同时刺激了其他种类细菌的生长并促使其成为优势种类,使得土壤细菌种类减少(胡元森等, 2006)。此推断有待于更进一步的验证。

由于该文库是以细菌通用引物扩增16S rDNA片段转化构建16S rDNA克隆文库,仅反映环境中细菌群落结构,对土壤中其他微生物类群(如真菌、放线菌等)还不能全面认识,需要通过其他的特异性引物或标记来更全面地认识环境中的微生物类群。

参考文献

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143–169.
- Ekundayo EO (2003) Effect of common pesticides used in the Niger delta basin of southern Nigeria on soil microbial populations. *Environmental Monitoring and Assessment*, **89**, 35–41.
- Gabor EM, Devries EJ, Janssen DB (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, **44**, 153–163.
- Good IL (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, **40**, 237–264.
- Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**, 1–11.
- Hu YS (胡元森), Liu YF (刘亚峰), Wu K (吴坤), Dou HJ (窦会娟), Jia XC (贾新成) (2006) Variation of microbial community structure in relation to successive cucumber cropping soil. *Chinese Journal of Soil Science* (土壤通报), **37**, 126–129. (in Chinese with English abstract)
- Huang TT (黄婷婷), Cao H (曹慧), Wang XX (王兴祥) (2004) An efficient method for DNA extraction from soil micro-organism. *Soil* (土壤), **36**, 662–666. (in Chinese with English abstract)
- Hurt RA, Qiu XY, Wu LY (2001) Simultaneous recovery of RNA and DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4495–4503.
- Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. pp440–468. New York
- Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC (1996) A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 2501–2507.
- Qiu XY, Wu LY, Huang HS (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 880–887.
- Ringelberg DB, Sutton S, White DC (1997) Biomass bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**, 371–377.
- Tan MH (谈明洪), Lv CH (吕昌河) (2005) Urban land expansion and farmland loss in China. *Journal of Natural Resources* (自然资源学报), **20**, 52–58. (in Chinese with English abstract)
- Xia BC (夏北成), Zhou J, Tiedje JM (2001) Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **21**, 574–578. (in Chinese with English abstract)
- Xie CH, Yokota A (2005) *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 753–756.
- Ye JY (叶姜瑜), Luo GY (罗固源) (2004) Progress in the biodiversity of nonculturable microorganisms and microbial molecular ecology. *Microbiology* (微生物学通报), **31**, 111–115. (in Chinese with English abstract)
- Yin R (尹睿), Zhang HY (张华勇), Huang JF (黄锦法), Lin XG (林先贵), Wang JH (王俊华), Cao ZH (曹志洪) (2004) Comparison of microbiological properties between soils of rice-wheat rotation and vegetable cultivation. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报), **10**, 57–62. (in Chinese with English abstract)