

PCR-DGGE 技术及其在植物微生态研究中的应用

刘琳 刘洋 宋末

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 植物中微生物种类较为丰富, 在植物微生态系统中发挥重要作用。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术作为研究微生物物种多样性和种群动态变化的分子检测工具之一, 广泛应用于植物微生物群落多样性和群落动态变化研究中。概述了 DGGE 技术的原理, 及其在植物微生物生态学中的应用以及在该领域研究中导致 DGGE 偏差的因素和相应解决方法, 对 DGGE 检测结果的分析提供参考, 为进一步研究植物微生物相互作用提供帮助。

关键词: 变性梯度凝胶电泳 微生物多样性 植物微生物生态学

Application of PCR-DGGE Technology in the Research of Micro-ecology of Plants

Liu Lin Liu Yang Song Wei

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract: The microorganism that is abundant in plant plays important roles in plant micro-ecology. As a fast and reliable molecular method, polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique has been proven to be a powerful tool for analyzing microbial diversity and microbial communities and their dynamics changes in plant micro-ecology. In this paper, the principle and application aspects in plant micro-ecology as well as main factors that can limit DGGE techniques for microbial ecology analysis were introduced. It is expected to provide basis for the analysis of the DGGE result and in the plant-microbial interaction research.

Key words: Denaturing gradient gel electrophoresis Microbial diversity Plant micro-ecology

近年来随着人们对环境问题的日益关注, 微生物生态学的发展十分迅速, 20 世纪 90 年代分子生物学技术的引入使其研究更加深入^[1]。传统分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%~10%^[2], 已远不能满足微生物生态学研究的需要。因此, 应用现代生物化学和分子生物学方法, 克服传统微生物生态学研究技术的局限性, 获取更加丰富的微生物多样性信息, 从而为推动当今微生物生态学研究的进一步发展具有重要意义。

在现代分子生物学技术中, 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术已经发展成为研究环境微生物群落组成及亲缘关

系的主要分子工具^[3,4], 广泛应用于比较微生物多样性和种群动态监视。目前 PCR-DGGE 技术已深入到各个研究领域, 广泛应用于研究湖泊^[5]、海洋^[6]、活性污泥^[7]、发酵食品^[8]及各种土壤^[9]等生态环境中的微生态研究中。近年来随着植物相关细菌研究的深入^[10], 微生物生态学的研究又深入到植物微生物生态学中的应用, 以及在该领域研究中的影响因素和解决方法, 以便为植物微生物相互作用的分析提供帮助。

植物微生物学是研究植物微生态系统的一门科学, 研究植物组织细胞内微生物的组成、功能、演

收稿日期: 2008-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770069), 教育部博士点专项科研基金项目(20060028001), 北京自然科学基金项目(5092004)

作者简介: 刘琳(1983-), 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学

通讯作者: 宋末(1943-), 研究员, 博士生导师; E-mail: songwei@mail.cnu.edu.cn

替,以及微生物之间和微生物与宿主之间相互关系的生命学科分支^[11]。植物中微生物种类也较为丰富,已有诸多研究表明植物的根、茎、叶、穗中存在大量与植物有某种相互关系的微生物^[12],在植物微生态系统中有着至关重要的作用。PCR-DGGE,PCRSSCP 和 PCR-RFLP 等分子生物学技术对植物中微生物多样性及其在生态系统中的作用的研究越来越受到重视。

1 变性梯度凝胶电泳(DGGE)原理

变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术在含有浓度线性递增的变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的聚丙烯酰胺凝胶电泳中对 PCR 产物分离,部分解链的双链 DNA 分子的电泳迁移率降低;而序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为,它们在凝胶的不同位置停止迁移从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段分离^[3]。

2 PCR-DGGE 技术在植物微生物生态学中的应用

DGGE 技术对微生物多样性的分析不依赖于微生物的培养过程,而是直接提取环境样品中总 DNA,包括样品中可培养微生物和不可培养微生物的总遗传信息,从而真实地反映了微生物群落的原始组成。

2.1 植物微生物群落多样性的研究

植物内生细菌作为植物微生态系统的重要组成部分,通过 PCR-DGGE 技术也已经证实了多种植物中都含有丰富的内生细菌。Sessitsch 等^[13]用末端限制性片段长度多态性分析、变性梯度凝胶电泳等技术研究了正常与缺乏光照条件下 3 个马铃薯品种内生细菌多样性。结果表明,马铃薯(*Solanum tuberosum* cv Desirée)内生细菌种群很丰富包含了 α -、 β -、 γ -变形杆菌(α -、 β -、 γ -*Proteobacteria*),高 GC 革兰氏阳性细菌,CFB 菌群(*Flexibacter/Cytophaga/Bacteroides*)及浮霉菌目(Planctomycetales)的类群。Garbeva 等^[14]用 PCR-DGGE 评价了马铃薯内生种群多样性,监测自然种群多样性的动态变化。本研究组近年来探索了应用 16S rDNA 文库和 PCR-DGGE 等非培养方法和传统培养方法相结合研究水稻(*Oryza sativa* L.)根内生细菌群落多样性^[15],为水稻种子际微生物的研究奠定了基础。但目前种子际的

研究远落后于根际的研究,然而在根际方面的研究将会促进对种子际的了解^[16]。新近已通过构建 16S rDNA 克隆文库和 PCR-DGGE 的方式对水稻种子内生细菌和种子际固有细菌群落多样性进行了研究,结果表明种子际固有细菌中不仅有变形杆菌、芽孢杆菌、类芽孢杆菌,还含有部分放线菌等,说明水稻种子内生细菌具有一定的多样性(数据尚未发表)。

2.2 群落动态变化的研究

根际是一个特别的微区域,不同作物的根际有其特定的微生物群落,是同一作物在不同生育时期和营养状态下,其根际微生物数量也呈现一定的动态变化^[17,18]。DGGE 作为最为有效的分离复杂细菌群体中 16S rRNA 扩增产物的方法,适用于研究根际微生物群体。Yang 等^[19]用 PCR-DGGE 获得的 16S rDNA 来分析根际细菌群体结构。定殖于没有任何症状且已感染根系中的细菌群体结构与定殖于健康植物的细菌群体结构有明显的不同。

胡元森等^[20]用 PCR-DGGE 技术分析黄瓜根际土壤未培养优势菌群的变化来研究黄瓜根际主要微生物类群在不同生育期的变化。结果表明,根际微生物的数量一般是由栽种时开始升高,到花期或盛果期时达到最高峰,生长后期有下降趋势,根际微生物数量比同时期的对照要高。黄瓜生长对某些种群数量分布有一定影响,特别是在黄瓜生长前期,根际细菌数量变化显著,在花期表现尤其明显。揭示黄瓜花期生长对根际微生物的影响可能较大,也说明这些类群微生物可能是对黄瓜花期生长起特殊作用的未培养微生物。文景芝等^[21]采用 DGGE 研究不同施肥条件下设施黄瓜根际微生物群落结构多样性。结果发现单施有机肥最有利于根际真菌和放线菌的生长繁殖,对于根际亚硝酸细菌、硝化细菌的生长繁殖也具有一定的促进作用,根际细菌多样性指数和均匀度指数均较高。

3 引起 DGGE 偏差的因素及解决方法

3.1 PCR 引物的选择

DGGE 只能分离较小的片段(<500 bp),对于大片的分离效率低,因此给引物设计和系统发育分析带来一定困难。为了便于电泳的分析,提高分辨率,引物的 5'端有一个 40 bp 左右的发夹结构。在用 16S rDNA PCR-DGGE 等非培养方法研究植物微

生态环境细菌种群多样性时,提取的植物基因组 DNA 包含植物和细菌 DNA,在扩增细菌 16S rDNA 要排除植物叶绿体 16S rDNA 和线粒体 18S rDNA 的干扰,因此需要找到能够扩增细菌 16S rDNA 的特异性引物。本研究组新近的研究已成功选取了最适引物成功扩增得到了水稻根内生细菌 16S rDNA^[15],同样采用该对引物也成功扩增得到了水稻种子内生细菌和种子际固有细菌 16S rDNA,为后续准确的分析细菌群落多样性提供了保障。

3.2 环境样品中总 DNA 提取

高效地提取环境样品中细菌的 DNA 是研究的关键。样品的预处理、细胞裂解、DNA 沉淀等都会引起菌种的 DNA 量的获得。在样品 DNA 提取的同时萃取到植物组织中的化合物以及样品中某些细菌破壁时间等因素的影响可能会限制 PCR。

3.3 PCR 扩增的偏差

有些因素可能会导致 PCR 扩增产生偏差,如模板浓度^[22]、循环数^[23]。Bonnet 等^[23]研究了 PCR 循环数对 16S rDNA 文库的影响。通过盖度(Coverage)计算、规划(projections)和统计分析表明,16 个循环和 25 个循环所构建的 rDNA 文库不同,25 个循环的 rDNA 文库减少了多样性。所以提出用于系统多样性分析研究尽可能减少 PCR 循环数。罗海峰等^[24]利用 DGGE 比较了 *Taq* DNA 聚合酶、*Tsg* DNA 聚合酶和 *Pfu* DNA 聚合酶对 PCR 扩增产物的忠实性,结果以 *Pfu* DNA 聚合酶的扩增效果最好。

3.4 DGGE 技术相关实验条件

理论上讲,只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间和电压等足够精细,DGGE/TGGE 技术对于 DNA 片段的分辨率就可以达到一个碱基差异水平。但是,Sekiguchi 等^[25]发现 DGGE 法单条带并不总代表单一菌株。Muyzer 等^[26]指出 DGGE 法只能对微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群进行分析。此外,不同的 DGGE/TGGE 实验条件很可能导致不同的带型谱图,如选用不同的染料染色等。

4 展望

植物有益细菌对植物生长的促生作用及在农业生产中的应用潜力越来越明显,已成为当前植物微生物学科中的重要研究对象。分子生物学方法为植物内生和根际细菌、植物种子际细菌多样性的研究开辟了一条新的途径,可使人们更全面地了解植

物微生态系统中微生物多样性及其物种组成。作为分子生物学的重要手段之一,PCR-DGGE 尽管存在着缺陷,但它具备的显著优点使得人们对复杂微生态系统、对微生物群落动态变化的研究成为可能。充分了解该技术的基础背景和局限性,结合其他分子生物学技术如酶学技术、荧光原位杂交技术等,是诊断和评价复杂微生物群落的种群结构、动态学及群落结构关系最有前景的技术手段。因此,将 PCR-DGGE 等非培养方法灵活使用并和传统的培养方法协同结合必会有助于将植物微生态学领域的研究引向深入。

参考文献

- 1 Ronald M, Richard B. *Microbial Ecology* (4th ed), 1997.
- 2 Amann RI, et al. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143~169.
- 3 Muyzer G, Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127~141.
- 4 Muyzer G. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(3): 317~322.
- 5 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 生物多样性, 2006, 14(4): 345~351.
- 6 张振冬, 王淑芬, 曹宇峰. 海洋环境科学, 2008, 27(3): 297~300.
- 7 殷峻, 陈英旭, 刘和. 环境科学, 2004, 25(6): 11~15.
- 8 贾月梅, 等. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 167~171.
- 9 马万里. 土壤学报, 2004, 41(1): 103~107.
- 10 Samuel SG. *Plant-associated Bacteria*. Netherlands: Springer, 2006, 1~56.
- 11 梅汝鸿. 中国微生态学杂志, 1991, 3(2): 94~96.
- 12 冯永君. 自然杂志, 2001, 23(5): 249~252.
- 13 Sessitsch A, et al. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 39: 23~32.
- 14 Garbeva P, et al. *Microb Ecol*, 2001, 41: 369~383.
- 15 Sun L, et al. *Microb Ecol*, 2008, 55: 415~424.
- 16 Nelson EB. *Ann Rev Phytopathol*, 2004, 42: 271~309.
- 17 Normander B, Prosser JJ. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4372~4377.
- 18 Duineveld BM, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 172~178.
- 19 Yang CH, Crowley DE. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(1): 345~351.
- 20 胡元森, 等. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1521~1526.
- 21 文景芝, 李刚, 张齐凤, 等. 中国蔬菜, 2007, (12): 11~14.
- 22 Chandler DP, et al. *Mol Ecol*, 1997, 6(5): 475~482.
- 23 Regis Bonnet AS, Joel Dore, Glenn RG, et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52: 757~763.
- 24 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋. 不同 DNA 聚合酶对 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性的影响. 第五届微生物生态学术研讨会会议论文, 2003, 41~47.
- 25 Sekiguchi H, et al. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 1205~1208.
- 26 Muyzer G, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695~700.