

镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析

段学军^{1,2}, 闵航¹

(1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; 2. 中原工学院, 郑州 450007)

摘要:采用现代分子生物学技术, 避开传统的分离培养过程, 探讨重金属镉污染条件下稻田土壤微生物种群的基因多样性. 经过直接从土壤中抽提总 DNA, 并对总 DNA 中 16S rDNA 及其中 V3 可变区序列作 PCR 扩增, 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析等, 对镉胁迫下稻田土壤总 DNA 微生物种类分布进行了初步的研究, 发现不同浓度镉胁迫下稻田土壤间的菌种有明显差异, DGGE 技术可以用于污染环境微生物多样性研究. 同时对 DGGE 分子指纹图谱的生物信息学分析作了初步尝试, 为污染环境下土壤微生物多样性研究提供了新的实验方法与依据.

关键词:镉胁迫; 稻田土壤; 基因多样性; DGGE 分子指纹

中图分类号: X171.1; S154.36 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)05-0122-05

Diversity of Microbial Genes in Paddy Soil Stressed by Cadmium Using DGGE

DUAN Xue-jun^{1,2}, MIN Hang¹

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Zhongyuan Institute of Technology, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: Variations of diversity of microbial genes in submerged paddy soil stressed by heavy metal cadmium were studied using modern molecular biotechnology which includes directly extracting total DNA from paddy soil, amplifying 16S rDNA and their V3 variable region by PCR, the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Two methods for extraction and purification of microbial DNA were compared. Bacterial communities were quantified by analyzing the DGGE band patterns. The genetic clusters and correlative comparison of bacterial communities were analyzed based on the DGGE finger print. The results showed that there are some significant differences between bacterial communities in paddy soils treated with different concentrations of cadmium. The information about effect of cadmium on microbial population based on molecular biological techniques are conformed with that from traditional methods, but that obtained about variations of microbial genes in paddy soil is much more than results based on the latter methods. It could provide a new way and foundation to research microbial gene diversity in contaminated environment.

Key words: cadmium stress; submerged paddy soil; diversity of microbial gene; DGGE

随着人们对重金属胁迫下的土壤微生物变化的了解日渐加深, 应用微生物学指标评价重金属污染土壤的质量已成为当今土壤环境生物学的一个热点^[1,2]. 但由于自然环境中微生物原始生存状态的复杂性, 发现越来越难以用常规的分离培养方法全面地评估其中微生物群体的多样性. 据认为自然环境中的微生物 90% ~ 99.9% 的种类至今尚是不可培养的, 已是正确认识环境微生物生态系的严重障碍^[3]. 随着分子生物学新技术向环境科学领域的不断渗透, 不经过传统培养, 直接从土壤中抽取总 DNA, 利用微生物遗传多样性及区系变化来进行污染物环境风险的评价, 正在被广泛采用^[4,5]. 通过这种实验技术, 可有效地避免在传统富集、培养、分离、研究过程中造成微生物多样性的丢失, 种群构成发生变化等弊病, 能够更直接更可靠地反映土壤微生物的原始组成情况^[2]. 然而, 国内类似研究还比

较匮乏, 而对于不同重金属污染胁迫对淹水条件下稻田土壤微生物多样性指数分析的系统研究鲜见报道.

本研究选取不同镉浓度处理黄棕稻田土壤, 通过土壤微生物总 DNA 提取、PCR 扩增及变性梯度凝胶(DGGE)电泳, 获得土壤微生物 16s rDNA V3 序列分布, 对镉胁迫下的稻田土壤微生物基因多样性变化进行了生物信息学分析. 本研究可为应用分子生物学手段研究和评估污染条件下土壤微生物分子生态多样性, 确定稻田土壤重金属污染影响指标提供理论依据与技术方法.

收稿日期: 2003-11-09; 修订日期: 2004-02-08

基金项目: 国家科技部社会公益研究专项资金项目(177-2-3)

作者简介: 段学军(1969~), 男, 山西祁县人, 讲师, 在读博士, 主要从事土壤与环境微生物学的研究.

1 材料与amp;方法

1.1 供试土壤

本研究所用土壤为采自中国农科院江西国家黄棕土肥力与肥料效益监测基地的发育于第四纪红粘土母质的黄棕稻田土。取回风干,过 3 mm 筛,充分混匀后备用。

1.2 试验设计与实施

试验采用 20 cm × 30 cm 塑料桶,每盆装土 2.6 kg,加水使土壤保持淹水状态,置于 28 °C 恒温培养两周,进行微生物特别是厌氧微生物的复壮。试验用试剂为分析纯 CdCl₂·5H₂O(北京二环化学试剂厂)。试验设 7 个处理,分别为 0、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0、50.0 mg/kg (Cd²⁺/土)。每处理 3 次重复。Cd²⁺以溶液形式分别按各自用量加入土样中,充分搅拌混匀,继续培养。分别在培养第 1 与第 4 周时取样,土壤样品混和后置于 -20 °C 冰箱保存供提取土壤 DNA 用。整个过程中,随时补加水,使水位始终保持高于土壤 1~2 cm,以模拟水田环境。

1.3 土壤总 DNA 的提取

方法(1):取 5 g 土壤样品(湿重)于 30 mL 离心管中,加入 10 mL 0.1 mol/L pH8.0 的磷酸钠缓冲液,加 50 mg 溶菌酶及少量细小玻璃粉,混匀,37 °C 水浴 15 min。冰浴冷却并混匀后,加 600 μL 20% SDS,以液氮冷却,于 60 °C 水浴保温 30 min。重复冷冻/解冻步骤 2 次。再加等体积的饱和酚(pH8.0),混匀。室温下 10 000 r/min 离心 5 min,取上层水相,加等体积的氯仿:异戊醇溶液(24:1);室温下离心 10 000 r/min,5 min,收集上层水相(视情况重复抽提 1 次),加 2 倍体积的 100% 冰乙醇, -20 °C 下保持 60 min。10 000 r/min 离心 10 min,去上清液,沉淀物用 70% 的冰乙醇清洗,空气中干燥,加 1~1.5 mL 无菌 TE 缓冲液(pH8.0)溶解沉淀物。总 DNA 粗提物纯化用上海申能博彩生物科技有限公司的 3S DNA 纯化试剂盒,具体步骤参见说明。

方法(2):取 5 g 湿土,加 0.1 mol/L pH8.0 磷酸钠缓冲液 5 mL,加细玻璃珠于室温下振荡 5 min,加溶菌酶 25 mg,使终浓度为 2.5 mg/mL,室温下振荡 15 min,然后置于 4 °C 下放置 30 min。加 600 μL 20% SDS 处理 15 min,分装,每个 1.5 mL E_p 管装 0.5 mL,然后加等体积饱和酚抽提。12 000 r/min 离心 15 min,移取上清液至新的 E_p 管,并加等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提 3 次;12 000 r/min 离心 15 min,取上清,加预冷无水乙醇于 -20 °C 放置 2 h;

12 000 r/min 离心 15 min,DNA 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次,去乙醇后于 37 °C 干燥。每管加适量 TE 缓冲液垂悬,合并于一管(终体积为 1 000 μL),加 CsCl₂ 1 g,并在室温下静置 3 h;14 000 r/min 离心 20 min,取上清液,加 4 mL 去离子水、3 mL 冷异丙醇(需分装计量后进行),室温下静置 15 min。14 000 r/min 离心 15 min,干燥,沉淀定容于 1 000 μL TE,加入 200 μL 8 mol/L KAc 溶液,室温放置 15 min。14 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加 600 μL 冷异丙醇,混匀,置室温下放置 5 min。14 000 r/min 离心 15 min,DNA 沉淀用 70% 乙醇清洗,离心、干燥,定容于 200 μL TE 缓冲液中。

1.4 PCR 扩增

参照文献并加以改进后进行^[6,7]。扩增反应体积 50 μL^[8]:10 × PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μL, dNTP 2 μL, 上下游引物各 1.5 μL, 模板 DNA 1 μL, Taq 酶 (10 000 U/mL) 0.5 μL, 重蒸水 34.5 μL。

反应条件为:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环, PCR 反应在 PTC-200 型热循环仪上进行。反应结束后取 5 μL 反应液在 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测^[9]。

用于 16S rDNA 的 PCR 扩增反应的引物为一对通用引物^[7]。其序列如下:正向引物 BSF8/20, 5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3' (*E. coli* 对应位置为 8-27);反向引物 BSRI541/20:5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3' (*E. coli* 对应位置为 1541-1522)。用于 DGGE 电泳的 PCR 扩增产物的引物序列为:338F:5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3';518R:5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (正向引物的 5' 端连接 GC 环主要是为了增加 DNA 双链解链区的数量)^[10]。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和染色

参照 Muzer 等人^[11]方法,PCR 产物加入到质量浓度 10% 聚丙烯酰胺凝胶中,凝胶的变性范围为 40%~65%。利用 Bio-Rad 公司的 Dcode System 电泳仪,在 60 °C、150 V、采用 1 × TAE Buffer 电泳 330 min。电泳结束后,采用改进的硝酸银染色法染色^[12]:用固定液(10% 冰醋酸)固定胶片 20 min 后,用 1% 硝酸浸泡 10 min。再用去离子水浸洗胶片 3 次以洗去胶片表面的硝酸。将洗后的胶片浸泡在染色液(含 0.2% 硝酸银和 50 μL 甲醛的混合液中

20 min,然后取出胶片,在去离子水中浸洗 10s,立即浸泡在显影液(含 2.5%无水碳酸钠和 25 μ L 甲醛的混合液)中,缓慢地摇晃直至条带完全显现.将胶片置于中止液(0.5 mol/L EDTA-Na₂)中浸泡 10 min,再用去离子水浸洗胶片 3 次,拎出后进行胶封.

1.6 指纹图谱生物信息学分析

本文选择 Jaccard 指数计算各样品间的相似性指数^[13],其计算公式如下:

$$C_j = j / (a + b - j)$$

式中, C_j 为 Jaccard 指数, j 为 2 个样品间共有种数, a 、 b 分别为 2 样品各自种数.

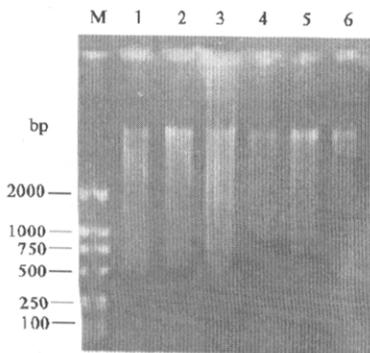
DGGE 指纹图谱分析借助于天能 GIS 凝胶成像系统进行条带判读,进行迁移率、强度、面积计算,并绘制泳道间遗传图,同时应用 PhyTools 软件计算样品间的相似指数.

2 结果与讨论

2.1 不经培养土壤微生物总 DNA 的提取与纯化

土壤中总 DNA 代表了土壤中整个细菌区系的基因组成,所以其提取与纯化是利用 DGGE 指纹分析进行基因多样性研究的关键,产率的高低直接影响着结果分析的准确性^[14].本文采用 2 种方法对各处理土样的微生物总 DNA 进行了提取与纯化,将各土壤样品抽提所得 DNA TE 溶液经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,分别出现清晰条带(图 1)表明已获得较长片段的土壤微生物的总 DNA.2 种方法都可以达到对土壤 DNA 的有效提取效果,方法一较为省时,而方法二则较为经济.

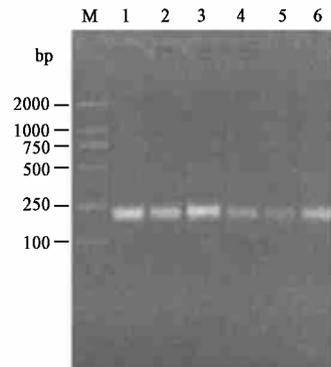
2.2 从总 DNA 中扩增 16S rDNA 片段



1~3:第1种提取方法 4~6:第2种提取方法
图 1 2 种方法所提取土壤总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agrose gel electrophoresis of total DNA extracted from soil by two methods
1~3:the first extract method;
4~6:the second extract method

由于土壤中含有大量的腐殖质成分,在提取纯化过程中无法完全去除,以其直接作为模板会使 PCR 扩增时 DNA 产率较低,很难得到理想片断.本研究采用稀释模板及 nest-PCR 方法加以解决.方法 1 所得土壤样品总 DNA,经 10 倍稀释后作为模板可用一般 PCR 进行扩增,获得特异 16S rDNA V3 区扩增片段,大小在 240bp 左右.方法 2 所得土壤样品总 DNA,以 338F/518R 为引物直接扩增无法获得扩增产物,须通过 nest-PCR,即以所提取土壤总 DNA 为模板,以 BSF/BSR 为引物扩增出 16S rDNA 全长后,再以其作为模板,以 338F/518R 为引物进行 2 次 PCR 扩增,方可得到(图 2).



1~3:nest PCR 4~6:普通 PCR

图 2 以土壤总 DNA 为模板扩增的 16S rDNA V3 可变区片断琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agrose gel electrophoresis of V3 variable region on 16S rDNA amplified from soil

1~3:by nest PCR;4~6:by PCR

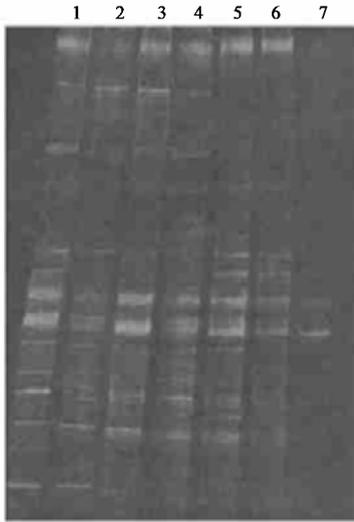
2.3 DGGE 指纹图谱分析

通过对不同浓度镉处理的稻田土壤 16S rDNA V3 可变区片断进行 DGGE 指纹图谱分析,结果显示在镉处理初期,不同浓度镉胁迫下的稻田土壤微生物区系的基因条带出现较明显的差别.与对照土壤相比,低浓度镉胁迫时,各条带变化不大,数量稍有增加,但仍有 3 个条带亮度变暗或消失.表明稻田土壤中绝大多数微生物对低浓度镉有一定的耐受性,基本不受影响,甚至对某些微生物类群具有一定的刺激作用,有新增条带出现,而个别种群对镉胁迫较为敏感,种群数量大大降低,达到 DGGE 分辨率下限,致使谱带变暗甚至消失.随着土壤中镉浓度的增加,对土壤中微生物基因多样性的影响也逐渐增强,到土壤镉浓度为 5 mg/kg 时,整个泳道条带出现明显差别.至 50 mg/kg 时,已有大量条带消失,表明镉对稻田土壤微生物种群有明显的毒害作用.随着处理时间的延长,到第 4 周时,这种影响有减少的趋

势,主要是由于重金属元素在土壤中的活性或有效性会随其存在的时间而发生变化,交换态 Cd 会随时间的延续而逐渐减小,到其基本完成形态的转换时(21 ~ 35d)达到稳定^[15].这种镉有效性的变化强烈影响土壤微生物基因多样性的变化,各处理土壤中占优势的菌种仍普遍存在,但不同泳道之间条带的亮度变化明显,表明土壤中微生物的数量存在着一个随镉胁迫加强而变化的现象.值得注意的是土壤处理第 4 周,镉浓度为 1 mg/kg 的土壤新增 3 条条带,为对照土壤所没有,提示可以某些特征性微生物的出现作为稻田土壤受镉胁迫的指示菌,有关特征微生物的测序鉴定工作正在进行中.

2.4 DGGE 指纹图谱的生物信息学分析

将图 3 和图 4 泳道合并(图 4 中的 1,2,3,4,5,6 和 7 分别改定为 8,9,10,11,12,13 和 14),通过



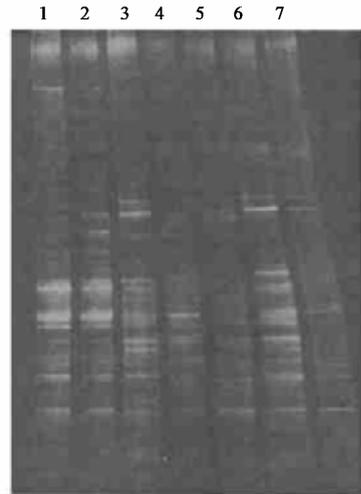
1. ck; 2. 0.5 mg/kg; 3. 1.0 mg/kg; 4. 3.0 mg/kg;
5. 5.0 mg/kg; 6. 10.0 mg/kg; 7. 50.0 mg/kg

图 3 不同浓度镉处理土壤 1 周时 16S rDNA 片段 DGGE 分析结果

Fig.3 DGGE Analytical result of 16S rDNA fragments from the tested soil treated with different concentration of Cd²⁺ after 1 week

GIS 凝胶成像系统对 DGGE 指纹图谱进行生物信息学分析,绘制出不同浓度镉处理土壤之间的遗传簇关系(图 5).图 5 由各泳道间条带所代表的遗传簇异同,表示了不同浓度镉胁迫下稻田土壤微生物之间的基因多样性亲缘关系.由图 5 可见,泳道 1、2、3、4、9、10 归于一簇,表明低浓度镉胁迫对稻田土壤微生物影响较小,其种群差异不明显,基因多样性较为一致,随着镉浓度的增大,基因多样性差异明显,镉浓度为 3 ~ 5 mg/kg 的土壤归为一簇;由于处

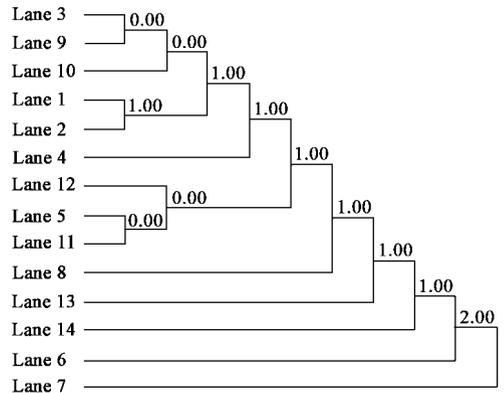
理浓度和时间的不同,6、7 与 13、14 泳道与其它泳道间基因多样性出现较大距离.这与先前报道的利用传统方法进行的镉胁迫对稻田土壤微生物种群数量及生物活性的影响研究结果相一致^[16-18],表明细菌种群数量与基因多样性之间有一定的相关性.



1. ck; 2. 0.5 mg/kg; 3. 1.0 mg/kg; 4. 3.0 mg/kg;
5. 5.0 mg/kg; 6. 10.0 mg/kg; 7. 50.0 mg/kg

图 4 不同浓度镉处理土壤 4 周时 16S rDNA 片段 DGGE 分析结果

Fig.4 DGGE Analytical result of 16S rDNA fragments from the tested soil treated with different concentration of Cd²⁺ after 4 weeks



Lane 1 ~ 7 : sampling after 1 week

Lane 8 ~ 14 : sampling after 4 weeks

图 5 基于不同浓度镉处理土壤 16S rDNA DGGE 电泳图谱泳道间的遗传簇关系

Fig.5 Cluster analysis of DGGE profile of amplified 16S rDNA fragments from soil treated with different concentration of cadmium

β 多样性是指不同群落间物种组成的差异,相似性指数是测度生境 β 多样性的最简便方法, Jaccard 指数越小,说明不同样品间或某个环境梯度间共有种越少,β 多样性越大.利用分析软件将指纹图谱中条带类型转换成二进制格式分析,并计算各

处理样品间的相似指数(表 1、表 2),结果表明土壤处理 1 周后,各处理与对照间相似指数呈现一个由低到高,然后急剧降低的趋势,土壤全镉浓度为 50 mg/kg 时与对照的相似指数仅为 47.62%,与低浓度镉对土壤细菌种群数量有一定的刺激作用,胁迫增强时转而抑制的研究结果相吻合(另文发表),随着处理时间的延长,有效镉浓度逐渐降低并趋于稳定,到土壤处理第 4 周时,刺激与抑制作用减弱,相似指数回升,土壤全镉浓度为 50 mg/kg 时已达 75%。相似指数的分析可以作为一个判断稻田土壤重金属镉污染程度的基因多样性指标。

表 1 不同浓度镉处理土壤 1 周后微生物区系的

Jaccard 指数相似性/ %

Table 1 Correlative comparison of bacterial communities in soil treated with different concentrations of cadmium after 1 week/ %

	1	2	3	4	5	6	7
1	100	78.26	86.96	95.00	76.19	60.00	47.62
2	78.26	100	91.30	90.48	80.95	57.14	52.38
3	86.96	91.30	100	82.61	73.91	52.17	47.83
4	95.00	90.48	82.61	100	89.47	63.16	57.89
5	76.19	80.95	73.91	89.47	100	70.59	64.71
6	60.00	57.14	52.17	63.16	70.59	100	91.67
7	47.62	52.38	47.83	57.89	64.71	91.67	100

表 2 不同浓度镉处理 4 周后土壤微生物区系的

Jaccard 指数相似性/ %

Table 2 Correlative comparison of bacterial communities in soil treated with different concentrations of cadmium after 4 weeks/ %

	1	2	3	4	5	6	7
1	100	91.30	91.30	80.95	80.95	76.19	75.00
2	91.30	100	100	73.91	73.91	69.57	71.43
3	91.30	100	100	73.91	73.91	69.57	67.22
4	80.95	73.91	73.91	100	100	94.12	82.35
5	80.95	73.91	73.91	100	100	94.12	82.35
6	76.19	69.57	69.57	94.12	94.12	100	87.50
7	75.00	71.43	67.22	82.35	82.35	87.50	100

3 结论

不经培养,从土壤中直接抽提微生物的总 DNA,由于避免了在培养过程中的筛选和富集作用,能够更直接地反映土壤中微生物多样性及种群分布情况。本方法用于研究污染环境下的土壤微生物生态多样性研究,较之传统培养过程更快也更准确,对于全面掌握污染环境微生物生态的变化具有重要意义。同时,新方法的引用,进一步丰富了稻田土壤的重金属环境质量指标,为通过基因多样性变化评估稻田土壤重金属镉污染程度提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 杨元根. 用土壤微生物方法评价重金属 Cu 的毒性及其时间效应[J]. 自然科学进展, 2001, 11(3): 243 ~ 249.
- [2] Rutlr Anne Sandaa, Vigdis Torsvik Øivind Enger, Daae Fride Lise, Tonje Castberg. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(2): 237 ~ 251.
- [3] 张晓君, 冯清平, 白玲. 分子生态学方法在微生物多样性研究中的应用[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 68 ~ 70.
- [4] Bert E, Kristin M, Friedrich V W, et al. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2814 ~ 2821.
- [5] Konopka A, Zakharaova T, Willy V, et al. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S Rdna genefingerprints and community-level physiological profiles[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 982 ~ 988.
- [6] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R.E. 金斯敦. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, et al. Bacteria Identification by PCR-Based Techniques[M]. Chapter 10, Microbial Genome Methods. CRC Press, 1996. 167 ~ 173.
- [8] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences[J]. Molecular Microbial Ecology Manual, 1995, 33(1): 1 ~ 11.
- [9] Nalin R, Simonet P. Rhodanobacter lindaniclasticus gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium[J]. Journal of System Bacteriology, 1999, 49(1): 19 ~ 23.
- [10] Øvreas L, Forney L, Daëe F L. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 3367 ~ 3373.
- [11] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 695 ~ 700.
- [12] Bassam B J, Caetano-Anollés G. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Annual Biochemistry, 1991, 196: 80 ~ 83.
- [13] Whittaker R H. Evolution and measurement of species diversity [J]. Taxon, 1972, 21: 213 ~ 251.
- [14] 杨瑞馥. 从土壤中分离 DNA 的研究进展[J]. 微生物免疫学进展, 2000, 28(2): 57 ~ 62.
- [15] Wong S C, Li, X D, Zhang G, Qi S H, Min Y S. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China[J]. Environmental Pollution, 2002, 119: 33 ~ 44.
- [16] 夏增禄主编. 中国土壤环境容量[M]. 北京: 地震出版社, 1992.
- [17] 龚平. 重金属对土壤微生物的生态效应[J]. 应用生态学报, 1997, 8(2): 218 ~ 224.
- [18] Hattori H. Influence of heavy metals on soil microbial activities [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1992, 38: 93 ~ 100.