维普资讯 http://www.cqvip.com

PCR－DGGE技术及其在微生物生态学中的应用

张宝涛[1]，王立群[1*]，伍宁丰[2]，石鹏君[3]

（1.东北农业大学 生命科学学院 哈尔滨 150030；
2.中国农业科学院生物技术研究所，北京 100081；3.中国农业科学院饲料研究所，北京 100081）

摘要：现代分子生物学技术PCR－DGGE是一种分析微生物群落的有效工具，可以用于研究生态系统中微生物多样性和群落动态性。本文简要介绍了PCR－DGGE技术原理及其在微生物生态学领域的应用，并对该技术的局限性进行了评价。

关键词：PCR－DGGE，微生物生态学，现代分子生物学技术，微生物多样性，微生物群落动态性

中图分类号：Q938.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1672－5565(2006)－03－132－04

Application of PCR－DGGE in microbial ecology

ZHANG Bao－tao[1]，WANG Li－qun[1*]，WU Ning－feng[2]，SHI Peng－jun[3]

（*1. College of life science，Northeast Agricultural university，Harbin 150030 China；*
2. Biotechnology Research Institute Chinese Academy of agricultural Sciences. Beijing 100081 China；
3、Feed Research Institute，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100081，China）

Abstract：As a modern molecular technology，PCR－DGGE is a powerful tool for the analysis of microbial communities，which can be used to study the diversity and dynamics of microbial communities. The principle and the application of PCR－DGGE in microbial ecology is briefly introduced，while the limitations of this technique are evaluated in this paper.

Key Words：PCR－DGGE；microbial ecology；modern molecular technology

在微生物生态研究中，准确地分析测定微生物群体的类型和数量是非常重要的，因为微生物个体微小，结构简单，缺乏明显的外部特征，且难以依据生理生化特征进行分类鉴定。传统的微生物研究方法，如显微镜观察微生物形态、微生物计数、纯种分离纯化和生理生化反应存在很大的缺陷。研究证明，可分离培养土壤微生物种类仅占土壤微生物种类总数的0.1%～1%[1]，而且难以模拟其生长繁殖的真实条件。因此，传统的微生物培养和鉴定方法不足以反映微生物环境中的真实情况，需要其他技术来补充。

现代分子生物学技术能够揭示DNA序列遗传多态性，可以用于推断系统发育关系，并通过数据库比较，鉴定未知微生物，其中基于16S rRNA/DNA的分子生物学技术已被广泛应用。DNA指纹技术，又称多态性分析，例如变性梯度凝胶电泳(DGGE)[2]、温度梯度凝胶电泳(TGGE)[3]、单链构象多态性分析(SSCP)[4]、限制性片段长度多态性分析(RFLP)[5]、末端限制性片段长度多态性分析(T－RFLP)[5]，可以依据独特核酸物质的分离，提供微生物多样性的轮廓。

1　PCR－DGGE技术

1979年Fischer和Lerman首先提出了DGGE技术，并将其用于医学上基因点突变的检测。与传统的琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳相比，这项技术可以分辨只有一个碱基差异的基因序列。PCR－DGGE技术自1993年被引入微生物生态学领域以来[2]，在研究微生物多样性和种群差异上已成为一种重要工具，避免了传统微生物研究方法的局限性。

收稿日期：2005－10－24；**修回日期**：2005－10－29

作者简介：张宝涛(1980－)，男，山东人，硕士研究生，主要从事环境微生物和应用微生物的研究. E－mail：jonbob@126.com

*通讯作者：王立群，男，黑龙江省人，教授，主要从事应用微生物学研究。E－mail：Wangliqun2@163.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1　DGGE 技术的基本原理

DGGE 技术主要原理如图 1 所示，在碱基序列存在差异的 DNA 双链解链时需要不同的变性剂浓度，他们一旦解链，在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳行为将发生很大的变化。因此，将 PCR 扩增得到的等长 DNA 片段在含有变性剂梯度的凝胶中进行电泳，序列不同的 DNA 片段就会在各自相应的变性剂浓度下变性，发生空间构型的变化，导致电泳的速度急剧下降，以至停留在相应变性剂梯度凝胶中，染色后在凝胶上呈现为分开的条带，每个条带代表一个特定序列的 DNA 片段。在不同泳道中停留在相同位置的条带，一般可视为具有相同的 DNA 序列。

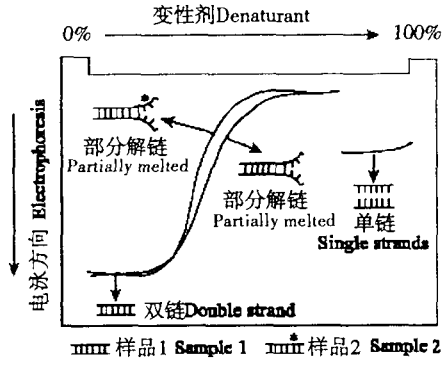

图 1　DGGE 对 DNA 片段的分离示意图[9]

Fig 1 profile of separation of DNA fragments by DGGE[9]

为了使仅有一个碱基之差的不同分子取得最好的分离效果，通常在 DNA 片段上连接一段长度为 30～50bp 富含 GC 的核苷酸序列，该序列被称为 GC 夹板（GC－clamp）。由于 GC 含量高，所以 GC 夹板自身配对成一种特殊的稳定结构，在一般情况下难以拆分，若将 GC 夹板连接于双链分子的一端就会使该分子难以完全解链为两条单链 DNA。在利用 PCR－DGGE 技术对土壤微生物多样性的研究[7] 中，在正向引物 5'加 GC 夹板后，PCR 产物在含有变性剂的电泳胶中难以完全解链而保持部分解链，被完全分离出来，而无 GC 夹板的 PCR 产物会在含有某个梯度变性剂的电泳胶中解链为两条单链，而单链 DNA 在 DGGE 中的电泳行为取决于 DNA 分子的大小，与 DNA 的碱基序列无关，因此相同长度的此类 PCR 产物具有相同的电泳行为，在 DGGE 中不能被完全分开。

1.2　PCR－DGGE 技术工作流程

PCR－DGGE 技术工作流程如图 2 所示。其中从环境样品中提取和纯化 DNA 是最关键的技术问题之一，因为样品中含有非常复杂的成分，尤其是土壤中的多酚类物质在提取过程中难以被除去，直接影响后续的 PCR 扩增。另外，PCR 扩增目的 DNA 片段过程中，不同纯度和保真性的 DNA 聚合酶对 DGGE 条带数目产生至关重要的影响。若使 DGGE 技术对 DNA 片段达到最佳分离效果，必须把握住 DGGE 的关键环节，优化它的反应系统。

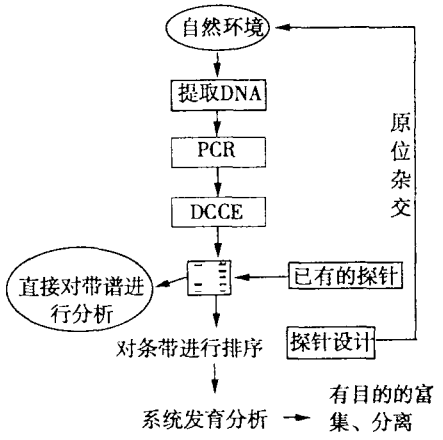

图 2　PCR－DGGE 工作流程示意图

Fig 2　flow profile of PCR－DGGE

2　PCR－DGGE 技术在微生物生态学中的应用

随着对微生物资源认识的加深，人们逐渐意识到研究为数众多、难以培养的微生物的重要性。PCR－DGGE 技术由于克服了传统微生物研究方法的局限性，能够被用来探索海洋、湖泊、沸泉、根际、土壤、污泥等生境中的微生物资源，因此它在分析环境中微生物多样性和群落动态性等方面得到广泛应用。

2.1　分析微生物多样性

PCR－DGGE 图谱可用于确定环境微生物群落中优势类群或独特种群的遗传多样性，在某些情况下为了得到更详细的信息，可通过 DGGE 指纹与分类单元特定的寡核苷酸探针杂交或对切下的 DGGE 条带序列分析来进一步鉴定菌落成员。王岳坤[15] 等从红树林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。而 Ma[9] 等应用 PCR－DGGE 技术探测灌木根际真菌，通

维普资讯 http://www.cqvip.com

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*。若PCR-DGGE技术与其他分子生物学方法结合,则更能实际准确地揭示微生物群落的结构和功能,指导人们更好地认识自然规律。

2.2 监测微生物群落动态性

PCR-DGGE技术可同时分析多份样品,监测某些生境中微生物群落结构及其在时间或空间上的动态变化,因此,他已成为研究微生物群落动态的一种重要手段。Renouf[10]等利用该方法鉴定乳酸菌并监测酿造过程中该菌的群落动态变化,发现依据特异性引物PCR扩增的rpoB基因片段可以避免基因异质性问题,并能清楚地揭示微生物群落的动态变化。Van Elass[11]等依据真菌特异性引物PCR扩增18S rDNA片段,并利用PCR-DGGE技术来研究土壤微生态系统中真菌群落动态变化,发现真菌*Trichoderma harziznum*的孢子和少孢节丛孢(*Arthrobotrys oligospora*)的菌丝片段引入土壤后分别存留14天和2个月,在含有DBT石油处理的淤泥肥土中,专一性真菌带随培养时间被逐渐选择出来,未被处理的土壤则没有这种作用。

此外,PCR-DGGE技术还有助于发现新的微生物物种,Santegoeds[12]等利用该技术对美国黄石公园一温泉中菌藻进行了不同的富集培养,监测到了以往利用纯培养和其他分子生物学技术均没有发现的10个好氧化能合成细菌类群的基因。

3 PCR-DGGE技术的局限性

尽管在环境微生物学中PCR-DGGE技术是一种被普遍接受的研究微生物群落的复杂性和行为的分子生物学工具,但该技术也有一定的局限性。第一,利用DGGE分离的PCR产物,一般要求DNA长度在500bp以下[13],否则DGGE的分辨率会下降,而判断微生物所属的系统类群,要求分析的16S rDNA片段长度至少达到500bp[14]。但是,对某些真菌而言,这项技术可以分析较长的18srDNA片段。第二,DGGE指纹通常显示微生物群落中的优势种群,Muyzer[2]等指出此法只能对菌体数量大于总菌量1%的菌群进行分析。第三,每种菌可能含有1~15个数目不等的rRNA基因[15],这可能导致自然群落中细菌的数量被过多地估计,因此许多研究者提出以rpoB基因代替16S rDNA作为鉴定细菌多样性的分子标记[16],这样可以避免某些种类16S rDNA拷贝间的异质性问题及异源双链分子的检出。第四,扩增的PCR产物在DGGE图谱中可能出现同一条带中含有不同种类的细菌[17],具有不同序列的共迁移问题对从单条带中得到清晰的序列来说是一个问题。另外,PCR-DGGE技术不能提供在某一生境中微生物群落的真实图景,也无法直接同微生物的生理相结合,因此需要结合FISH和微电极测量技术等方法以便更详尽地分析微生物群落的复杂性。

4 结语

人类利用微生物的历史悠久,现代生物技术的发展很大程度上得益于微生物学的进步。作为环境分子生物学的重要手段之一,PCR-DGGE技术具有可靠、快速、易操作等特点,能克服传统微生物研究方法的不足,重现微生物多样性,提供微生物在时间和空间上的动态变化。另外这种技术存在的缺陷,可以通过其他生物学技术来弥补,如末端标记的荧光PCR和区内标准可以用于检测稀少菌落成员和精确比较样品之间的差异。因此,PCR-DGGE技术与其他生物技术相结合,将能更实际地反映微生物群落的结构、功能和动态变化,提供微生物的空间分布、群落演替、原位生理等信息,促进人们对微生物生态的认识,为微生物资源的开发利用提供理性指导。

参考文献(References):

[1] Brock T D. The study of microorganisms in situ: progress and problems [J]. Symp Soc Gene Microbial, 1987, 41: 1-17.

[2] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction amplified gene encoding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695-700.

[3] Felske A, Wolterink A, Lis R, et al. Searching for predominant soil bacterial: 16S rDNA cloning versus strain cultivation[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1999, 30: 137-145.

[4] Stach J M, Bathe S, Clapp J, et al. PCR-SSCP comparision of 16 S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 36: 139-151.

[5] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Appl Microbiol, 1997, 63: 4516-4522.

(下转第142页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

可见在家禽上要研究有经济重要性的基因,它的前题是必须构建一张能覆盖整个家禽基因组的、完整的、具有高分辨率的鸡基因图谱[12]。但由于家禽基因组连锁图谱不完善,研究者提出了双尾及梯度连锁分析法并对这一方法进行了检验。其基础是当两个 DNA 混合样品进行比较时,某一条带强度的变化是由于带频率的变化引起的,不同的带频率则与编码所分析的数量性状的等位基因频率存在相关,这种相关(无论正相关还是负相关)可以解释为两位点间的连锁关系。利用双尾分析和梯度分析法成功地对家禽的一些 QTLs 位点与 DNA 标记之间的关系进行了连锁分析。

3 DNA 标记的其它应用

传统的基因导人育种方案是通过一系列的回交来进行,这一过程既消耗时间,又需要大量资金。而利用 DNA 标记可以加快这一育种进展,降低回交代数。通过分析受体和供体的带型特征,在对回交后代或 F2 代选择时,保留具有受体特征带型的个体,达到固定导人基因并剔除不利基因的目的。杂种优势与亲本品系间的遗传距离多数情况下呈正相关。DNA 指纹可以分析个体及亲本品系间的遗传距离,从而也能应用 DNA 标记来辅助预测品系间及个体间的杂种优势。目前对于 DNA 标记在家禽遗传育种中其它领域的应用研究仍在进行,并给人们展示一个广阔的前景,将给家禽的育种进展带来新的飞越。

参考文献(References):

[1] 秦国庆,常洪.藏山羊 RAPD 及 RFLP 标记的初步研究[J].西南农业大学学报,1998,26(1):17-20.

[2] 任军.EAPD 技术研究[J].Animal Biotochnology,1998,6(1)24-28.

[3] 焦蜂,楼程富.RAPD 技术应用中的一些问题及对策[J].西北农业学报,2000,9(4):98-102.

[4] 陈永久,张亚平.随机扩增多态 DNA 影响的因素的研究[J].动物学研究,1997,18(2):221-227.

[5] Williams J G K, Kubelik a r, Livak K J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res,1990, 18:6351-6335.

[6] Garcia E. Jamilena M. Alvarez J I. et al. Genetics relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits [J]. Theor Apple Genet,1998,96:878-885.

[7] 汪小全,邹喻平,张大明,等.RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,1997,39(2):954-962.

[8] 黄海根,孟安明,齐顺章,等.DNA 指纹图带与鸡的遗传相关分析[J].遗传,1998,20(3):13-15.

[9] 毛国祥.随机扩增多态 DNA(RAPD)技术在鹅育种中的应用[J].生物学通报,2002,36(2):18-22.

[10] 刘娣.鸡品种随机引物扩增 DNA 的研究[J].东北农业大学学报,1999,30(4):349-354.

[11] 秦树璨,吴常信.随机多态 DNA(RAPD)技术在农业上的应用[J].北京农业大学学报,1995,21(增刊):106-113.

[12] 张德水,陈受宜.DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用[J].生物学通报,1998,(5):64-69.

(上接第 134 页)

[6] Fischer S G, Lenman L S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory[J]. Pro Natl Acad Sci, 1983, 80: 1579-1583.

[7] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等.在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应[J].生态学报,2003,23(10):2170-2175.

[8] 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.

[9] Ma W K, Siciliano S D, Germida J J. PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils [J]. Soil Biology&Biochemistry,2005,37:1589-1597.

[10] Renouf V, Claisse D, Miot-Sertier C, et al. Lactic bacterial evolution during winemaking: Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis[J]. Food Microbiology,2005,23:136-145.

[11] Van Elsas J D, Duarte G F, Keijizer-Wolters A, et al. Analysis of the dynamics of the fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. J Microbiol Methods,2000,43:133-151.

[12] Santegoeds C M, Nold S, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacterial from a hot spring cyanobacterial mat[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(11):3922-3928.

[13] Myers R M, Fisher S G, De Lerman L S, et al. Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Nucleic Acid Res, 1985,13(9):3131-3145.

[14] Hugenhdtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of cuture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. J Bacteriology,1998,180(18):4765-4774.

[15] Klapponbach J A, Saxman P R, Cole J R, et al. The ribosomal RNA operon copy number database[J]. Nucleic Acids Res,2001,29:181-184.

[16] Da Mota F F, Gomes E A, Rosado A S. Use of analysis for identification of nitrogen-fixing Paenibacillus Species as an alternative to the 16S rRNA gene[J]. Letters in Applied Microbiology,2004,39:34-40.

[17] Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status[J]. Appl Environ Microbiol,2000,66(1):345-551.