

Application of the T-RFLP Technique in Microbial Communities Diversity Research*

Xin Sui^{1,2}, Shu Ding³, Shijie Han^{1#}, Naiwei Huang⁴, Fengying Ding¹

¹Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang

²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing

³Biological Science and Technology Department, Changchun University, Changchun

⁴Forestry Bureau of Changbai Mountains Protection and Development Area, Baihe

Email: xinsui_cool@126.com, #hansj@iae.cas.cn

Received: Aug. 11th, 2012; revised: Aug. 26th, 2012; accepted: Sep. 11th, 2012

Abstract: Soil microorganism plays an important role in recycling and transformation of material as well as has a close relationship with the type of forest types, soil physical and chemical. The microbial diversity can indicate the station of the forest environment, and play a key function in succession and restoration. Recently, more and more published papers focus on this area. The T-RFLP approach serves as a fast, efficient and reproducible tool. In this review, we introduced the principle and character of T-RFLP technique, analysis of the limitation and optimization method, demonstration the prospects for the development of the technology, in order to provide a scientific basis for future research in this area.

Keywords: Fungi; Bacterial; T-RFLP

T-RFLP 技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用*

隋 心^{1,2}, 丁 舒³, 韩士杰^{1#}, 黄乃伟⁴, 丁凤英¹

¹中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳

²中国科学院研究生院, 北京

³长春大学生物科学技术学院, 长春

⁴长白山保护开发区林业局, 白河

Email: xinsui_cool@126.com, #hansj@iae.cas.cn

收稿日期: 2012年8月11日; 修回日期: 2012年8月26日; 录用日期: 2012年9月11日

摘 要: 土壤微生物在物质循环转化中具有重要的作用, 与森林植被类型、土壤理化性质存在密切的关系。森林土壤微生物多样性及其变化在一定程度上反映了土壤环境的生产力和稳定性, 对森林演替, 土壤生境改善等有重要意义。末端限制性酶切片长度多态性分析(T-RFLP)技术具有快捷、高效和可重复性高等优点。本文简要介绍 T-RFLP 技术的原理和特点, 分析这一技术的局限性和优化方法。以及该技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用现状, 展望该技术的发展前景, 以期能为今后这一领域的研究提供科学依据。

关键词: 真菌; 细菌; T-RFLP

1. 引言

微生物在土壤养分循环和周转中具有重要的作

用, 是反应土壤性质的一个重要生物指标^[1]。土壤理化性质的改变会引起微生物群落结构的改变, 同时微生物的数量和群落组成也可以反应其对土壤理化性质的适应。土壤生境会受森林植被的影响, 而生境的

*资助信息中国科学院、国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划资助和国家自然科学基金(40930107)资助。

#通讯作者。

改变又会直接影响到土壤微生物群落结构和多样性,所以研究森林植物多样性与土壤微生物多样性之间的相互关系,对了解森林土壤生态及环境的变化等有积极作用^[2]。

传统的微生物群落分析方法主要是建立在微生物培养分离的基础上,通过对培养出的单一微生物进行显微观察和生理生化特性研究来认识群落结构。这种方法的优点在于可以直观的观察微生物的形态,可以分离出单一的纯菌种,但是由于土壤中微生物群落结构非常复杂、物种多样性极高,分离富集培养的方法不但费时费力,而且存在很多难以克服的问题:1)自然界中可培养的微生物不到总数的1%^[3],这就给客观认识环境中微生物的存在状况造成严重障碍。2)分离培养方法具有强烈的选择性,使培养得到的微生物在种类、数量和功能上都无法反映自然状态下微生物群落的真实情况^[4]。所以,研究不依赖传统方法的环境微生物群落分析方法显得极为重要。1986年 Pace等^[5]人利用核酸序列分析技术研究微生物的生态和进化以来,分子生物学技术已被广泛地应用于微生物群落分析,研究方法也层出不穷,包括变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)^[6],限制性酶切片长度多态性分析法(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)^[7,8],荧光原位杂交法(Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH)^[9]、克隆文库分析方法^[10]等。末端限制性酶切片长度多态性分析(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)技术是将 RFLP 技术和荧光标记技术相结合后发展的一种较先进的分子生态学方法,相对于其它分子生物学技术具有快速简便,分辨率高、重复性好,并且可以给出定量分析结果等优点,目前已广泛应用于各种微生物群落多样性研究中^[11,12],涉及湖泊^[13]、草地^[14]、湿地^[15]、石油^[16]、农田^[4]等各个领域。在森林土壤微生物多样性研究中的应用也日趋增多。因此,本研究将对 T-RFLP 技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用现状进行综述;并对这一技术的应用前景作出展望,以期在这一领域的研究提供科学依据。

2. T-RFLP 技术简介

T-RFLP 技术以分子生物学的原理为基础,综合运用了 PCR 技术、DNA 限制性酶切技术、荧光标记技术和 DNA 序列自动分析技术,在 DNA 水平上通过

对特定核酸片段长度多态性的测定来分析比较微生物群落结构和功能,对一个生物群体的特定基因进行定性和定量测定。它的技术原理如图 1,在引物的一端标记上荧光,常用的荧光物质有 HEX、TXT、6-FAM 等。然后进行 PCR 扩增,对 PCR 产物用可以识别 4 个碱基的限制性内切酶进行酶切,酶切后的产物用 DNA 测序仪进行分析,通过扫描,得到含有荧光标记片段的 PCR 产物长度(Terminal Restriction Fragment, T-RF),而没有标记荧光的片段没有办法识别,所以没有显示,图谱中波峰的多少表明了群落的复杂程度,峰面积的大小代表该片段的丰度,最后通过分析,揭示样品种类、数量和种群大小等信息,从而解析群落结构、功能及动态变化。从原理上讲,微生物群落中任何具有特异性的 DNA 片段都可以作为目标分析序列,包括微生物核糖体小亚基(SSU)16S rRNA(原核生物)和 ITS rRNA(真核生物)的基因序列^[17],以及一些保守的功能基因序列等。此技术的优点是可以检测微生物群落中较少的种群。另外,系统发生分类也可以通过末端片段的大小推断出来。本技术的局限主要是假末端限制性片段的形成,它可能导致对微生物多样性的过多估计。引物和限制酶的选择对于准确评估生物多样性也是很重要的。

3. T-RFLP 技术分析微生物群落的步骤及局限性分析

3.1. 土壤 DNA 的提取

土壤总 DNA 的提取是 T-RFLP 技术的关键之一。DNA 提取应尽可能的提取土壤样品中所有的完整的

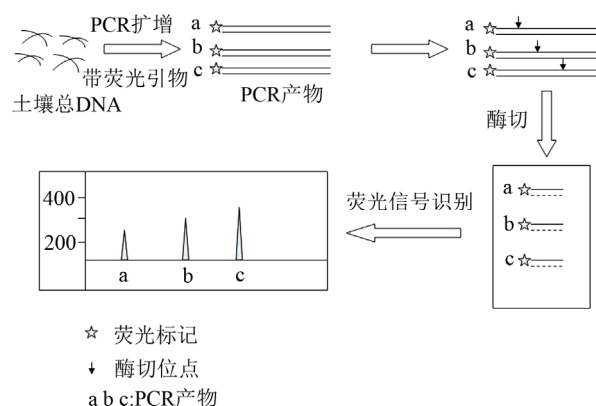


Figure 1. Principle of T-RFLP method to analyze microbial community
图 1. T-RFLP 分析微生物群落的工作原理

DNA, 尽可能完整的代表土壤中的真实情况。关于土壤总 DNA 的提取方法已经有很多的研究和报道, 主要有以下几种: 溶菌酶或蛋白酶 K 法、SDS 法、SDS 和蛋白酶 K 法、SDS-CTAB 法、液氮处理和冻融法以及以上方法的结合运用和商品试剂盒提取等。由于实际操作中很难提取土壤中所有的微生物 DNA, 所以必须根据实验目的来选取 DNA 的提取方法。例如, 如果要重点研究土壤微生物中的群落和种类, 则尽可能的提取土壤中的微生物 DNA; 如果重点要研究微生物中占优势的微生物种群大小以及功能, 则应该考虑 DNA 的完整性。所以应根据研究目的和样品等实际情况, 对微生物群落总 DNA 的提取方法进行优化, 找出最适宜的 DNA 提取方法, 保证后续的 T-RFLP 的准确性。

3.2. PCR 反应及优化

PCR 是 T-RFLP 分析的关键, 在扩增过程中需要选择合适的引物和确定最佳条件。对于细菌或古菌, 根据其 16S rDNA 上的某些保守区域来设计通用型引物, 可以用来扩增环境样品中大部分真细菌和古菌。对于真核微生物, 相应的分类进化分子标记是 18S rDNA, 同样可以设计出扩增群落中大部分真菌的通用引物。另外, 根据编码一些蛋白质氨基酸残基的 DNA 序列具有高度保守特异性, 也可以设计 PCR 的引物。具体操作上, 对于复杂的微生物群落, 选择不同引物扩增得到的目标序列的回收率可能会有差异^[18], 从而影响最终对群落结构的解析。为了尽可能降低因引物效率和特异性差异带来的影响, 在引物设计时应使用相应的计算机算法来分析。

PCR 扩增反应是整个过程中的最关键步骤之一。只有对土壤样品中的各种微生物的目的片段进行无差异的高效扩增, 才能保证扩增产物的多态性可以真实地反映样品中的微生物 DNA 多态性。影响 PCR 扩增反应的因素也很多, 包括模板 DNA 的浓度和纯度、PCR 反应体系、Taq 酶的种类和浓度、退火温度、循环次数, PCR 反应程序等等^[19-21], 要通过各种优化来确定最适宜的反应体系和反应条件。

3.3. 扩增产物的限制性酶切

对 PCR 扩增得到的产物进行纯化, 以防止残留的带荧光标记的引物对后续分析和检测造成干扰。通常

选用识别 4 个碱基识别位点的内切酶进行酶切。不同限制性内切酶种类对 T-RFLP 图谱会产生显著的影响。通过不同实验表明, 分析细菌 16S rDNA 多态性时, HhaI, RsaI, 以及 BstUI 这 3 种限制性内切酶最为有效, 可产生数量最多的末端限制性片段^[22]。扩增不同区域, 同一种酶切后 T-RFs 变化较大; 同一个区域, 选择不同的内切酶, 产生的 T-RFs 数目也有显著的差别。值得指出是, 不同限制性内切酶可以引入程度不同的“假带”(Pseudo-T-RFs)。所以, 不应简单地认为能够产生数量最多的末端限制性片段的酶就是最优的^[23]。所以, 在 T-RFLP 分析时也应注意限制性内切酶的优化选择。

3.4. T-RFLP 技术的局限性及改进方案

T-RFLP 的优点在于它可以不依赖于培养, 同时检测多种群落的组成。然而, 这种方法并不能检出样品中的全部群落。主要的限制因素: 1) T-RFLP 是基于 PCR 扩增的技术, 因此就摆脱不了这类技术共同的缺陷, 例如 PCR 扩增中引物存在偏好性, 扩增所得到的产物并没有完全包括样品中的类群, 造成分析结果难以准确反映自然群落的多样性以及物种间的相对丰度信息^[24,25]; 2) 共迁移现象, 同一位置的片段所代表的种类并不是单一的某一类, 一条 T-RF 带可能代表几种菌, 造成对群落多样性的低估; 3) T-RFLP 技术无法像 DGGE 那样对图谱进行杂交或直接克隆测序分析, 而且单酶切的 TRF 片段在数据库中匹配不够精确, 无法鉴定至种甚至属水平; 4) 在如何对大量的 T-RFLP 数据进行处理和统计学分析, 以挖掘出其中的群落结构信息方面, 很多理论和技术上的问题仍处于摸索阶段。

为解决上述局限性, 需要根据研究目的、样品、环境条件等对 T-RFLP 分析的各个步骤进行优化, 一般采用与克隆、测序方法相结合, 精确了解每个 T-RF 所代表的微生物种类; 利用多种酶对 PCR 扩增产物分别进行酶切, 将多个 T-RFLP 图谱进行综合分析; 利用毛细管电泳技术, 提高分辨率^[26]等等。

3.5. T-RFLP 技术与其它方法的比较

近些年来, 国内外研究学者利用 T-RFLP 技术开展了大量的微生物群落结构方面的研究: 袁三青利用

T-RFLP 技术分析了油藏微生物的多样性, 与构建基因文库和 DGGE 技术相比, 展示了更高的灵敏度^[16]。Eschenhagena 研究了处理生活污水的强化生物除磷工艺中活性污泥微生物群落结构, 发现两种运行方式下活性污泥中的微生物群落结构有明显差异, 而用 FISH 技术却未发现差异^[27]。Marsh 研究一个实验规模的生物反应器的活性污泥中真核微生物群落, 发现 T-RFLP 要比 DGGE 分辨率更高, 非常适合用于对微生物群落多样性进行快速、灵敏的分析评价^[28]。

总之, T-RFLP 法优越性在于: 酶切片段中仅有一端的片段长度被测定, 每一种长度的末端片段至少可以代表一种微生物的基因型, 因此可以直接给出群落中微生物群落组成的最小估计值。其缺点是: 由于仅有一端片段长度被分析, 这样很多有用的信息会丢失, 不适于分析非常复杂的微生物群落。由于每种方法都有其自己的有点, 但又有其不足之处, 所以在实际操作过程中, 往往需要将两种以上的方法联合起来使用, 以便于互相取长补短, 或进行比较, 前人用过的组合有: RFLP + T-RFLP; DGGE + T-RFLP; 克隆、测序 + T-RFLP; 传统的微生物培养技术 + T-RFLP 等。

4. T-RFLP 技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用现状

森林土壤微生物多样性分析, 是近 10 年来才发展起来的一个领域。目前, 相关报道逐渐增多, 研究领域也不再局限于热带、亚热带地区。研究的主要内容是利用一些传统方法和分子生物学技术来分析优势种群或微生物多样性与林型、土壤养分、土壤酶活、土壤水分以及季节变化的关系。在微生物多样性研究中, T-RFLP 技术被研究者们广泛应用, 这一技术主要应用于分析森林土壤中细菌和真菌的群落多样性以及在森林生态系统演替过程中微生物群落的变化。主要包括以下一些方面: 1) 群落结构的研究。主要是分析不同林型土壤的群落分布情况, Curlevski 等^[29]通过 T-RFLP 与克隆相结合, 分析了澳大利亚热带雨林向原生树种更替过程中微生物的变化, 验证了单一种植乡土树种的会显著改变土壤真菌的群落结构。Korkama 等^[30]选用 ITS1-F/ITS2 研究了挪威云杉林真菌的多样性。马万里等^[31]应用 T-RFLP 技术分析了澳

大利亚 Creswick 的松树林和澳大利亚 Ash 山的桉树林, 通过实验证明, T-RFLP 技术比 DGGE, SSCP 或 ARDRA 等方法有更强的分析能力。Rich^[32]研究了相邻的草地和森林的土壤的反硝化细菌的群落变化, 结果表明, 草地和森林反硝化细菌的群落结构差异很明显; 2) 气候变化与微生物群落多样性之间的关系。周慧^[33]利用 T-RFLP 和基因芯片法分析了云南高黎贡山自然保护区土壤微生物多样性研究, 根据分析结果显示, 海拔 2000 m 左右的森林土壤细菌多样性普遍高于其它海拔和植被的样地, 样地内细菌多样性与可培养微生物数量显著相关。由此推测出土壤细菌与海拔引起的温湿环境变化及地上植被类型有关; 3) 自然修复与森林演替。王金成^[34]利用 T-RFLP 技术研究了黄土高原子午岭天然油松林土壤微生物的变化, 结果显示: 天然油松林的演替导致土壤环境的变化造成土壤微生物群落结构组成的发生显著变化。总之, T-RFLP 技术在森林土壤微生物多样性研究中应用的例子还有很多, 这一方法在不断地改进, 在多样性分析中与其他方法相结合能够获得更加全面的分析微生物的多样性, 使得到的结果最大程度的反应原位群落结构。

5. 发展前景

森林土壤微生物多样性的研究是森林土壤微生物研究的一个重要分支。多样化的程度与林型, 季节变化, 土壤理化性质, 土壤酶活, 土壤水分都存在着一定的关系。微生物作为一种灵敏的生物指标, 分析其多样性与上述指标的相关性, 在森林演替、退化、功能性微生物的筛选方面都有重要的意义。T-RFLP 技术作为这一领域研究中的一种快捷、有效、重复性高的分子生物学工具, 虽存在一定的局限性, 但在森林土壤微生物多样性分析中发挥着重大作用。因此, 在未来的研究中, 应该将 T-RFLP 技术不断改进, 更好的应用于这个领域。相关领域的研究者应该致力于探究出适合于不同林型、不同土壤的 DNA 提取方法, 寻找更为适合真菌多样性分析的引物, 以更好地研究森林微生态系统。此外, 在研究中应该将其与其他技术手段相结合, 不断优化相关技术, 发现新方法; 系统全面的分析森林土壤微生物的多样性。进而结合其他有关森林土壤微生物的研究, 不断地推进森林土壤

微生物的研究深度, 扩大这一领域的研究范围, 并将研究成果应用到实际中去。

6. 致谢

中国科学院、国家外国专家局创新团队国际合作伙伴计划资助(Research Supported by the CAS/SAFEA International Partnership Program for Creative Research Teams)和国家自然科学基金(40930107)项目资助。特此感谢。

参考文献 (References)

- [1] E. A. Stockdale, P. Brookes. Detection and quantification of the soil microbial biomass—Impacts on the management of agricultural soils. *The Journal of Agricultural Science*, 2006, 144(4): 285-302.
- [2] M. Waldrop, T. Balsler and M. Firestone. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(13): 1837-1846.
- [3] F. Skinner, P. Jones and J. Mollison. A comparison of a direct and a plate-counting technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 1952, 6(3-4): 261.
- [4] R. I. Amann, W. Ludwig and K. H. Schleifer. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143-169.
- [5] N. R. Pace. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734-740.
- [6] S. Rölleke, et al. Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(1): 107-114.
- [7] S. G. Acinas, F. Rodríguez-Valera and C. Pedrós-Alió. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *Fems Microbiology Ecology*, 1997, 24(1): 27-40.
- [8] E. Llobet-Brossa, R. Rosselló-Mora and R. Amann. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2691-2696.
- [9] X. Wu, R. Conrad. Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stress at two different temperatures. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(6): 355-362.
- [10] M. Zarei, et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, 2010, 158(8): 2757-2765.
- [11] T. Lukow, P. F. Dunfield and W. Liesack. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *Fems Microbiology Ecology*, 2000, 32(3): 241-247.
- [12] C. Winderl, et al. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(3): 792-801.
- [13] 宋洪宁等. 环境因素对东平湖沉积物细菌群落结构的影响[J]. *微生物学报*, 2010, 8: 1065-1071.
- [14] S. Malchair, et al. Diversity-function relationship of ammonia-oxidizing bacteria in soils among functional groups of grassland species under climate warming. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(1): 15-23.
- [15] J. L. Faulwetter, et al. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 2009, 35(6): 987-1004.
- [16] 袁三青, et al. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2): 290-294.
- [17] 卢莉琼, 徐亚同, 梁俊. 分子生物学方法在微生物多样性及微生物生态研究中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(6): 826-830.
- [18] D. Gordon, S. Giovannoni. Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific Oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1171-1177.
- [19] F. V. Wintzingerode, U. B. Göbel and E. Stackebrandt. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 21(3): 213-229.
- [20] M. Krsek, E. Wellington. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 39(1): 1-16.
- [21] A. M. Osborn, E. R. B. Moore and K. N. Timmis. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(1): 39-50.
- [22] G. Braker, et al. Community structure of denitrifiers, Bacteria, and Archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1893-1901.
- [23] M. Egert, M. W. Friedrich. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2555-2562.
- [24] I. Head, J. Saunders and R. Pickup. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 1998, 35(1): 1-21.
- [25] V. Farrelly, F. A. Rainey and E. Stackebrandt. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(7): 2798-2801.
- [26] J. E. M. Watts, et al. Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(11): 710-719.
- [27] M. Eschenhagen, M. Schuppler and I. Röske. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Research*, 2003, 37(13): 3224-3232.
- [28] T. L. Marsh, et al. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Water Science and Technology*, 1998, 37(4): 455-460.
- [29] N. J. A. Curlevski, et al. Converting Australian tropical rainforest to native *Araucariaceae* plantations alters soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(1): 14-20.
- [30] T. Korkama, A. Pakkanen and T. Pennanen. Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist*, 2006, 171(4): 815-824.
- [31] 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法[J]. *土壤学报*, 2004, 41(1): 103-107.
- [32] J. Rich, et al. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5974-5982.
- [33] 周慧. 云南高黎贡山自然保护区土壤微生物多样性研究[D]. 湖南农业大学, 2008.
- [34] 王金成. 黄土高原子午岭天然油松林土壤微生物生态学研究[D]. 陕西师范大学, 2010.