

文章编号: 1008-0244(2001)-01-94-05

PCR-RFLP 技术在环境地球化学研究中的应用及展望

梁小兵 万国江 黄荣贵

(中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

摘要 PCR-RFLP 技术为环境地球化学提供了一种新的研究方法和实验设计的新的思维方式。该方法具有所需样品量低、快速简便及特征性强等优点, 可广泛应用于物质的生物地球化学循环、环境过程的生物作用、生物多样性及有机物源判断等方面的研究。利用 PCR-RFLP 技术, 以环境中存在的 16S rRNA 为对象, 对环境生物的研究已广泛开展并取得了许多成果。展望未来研究成果, 将会在海洋及湖泊沉积物等自然环境中发现更多的、新的微生物种类; 将进一步阐明生物作用和物质循环的机理和过程; 进一步阐明自然环境中生物大分子的变化机理及其环境效应并找到判断沉积物有机物源的新方法。

关键词 PCR-RFLP 环境地球化学**中图分类号:** X142**文献标识码:** A

随着生物化学及分子生物学的发展, 各种新的方法广泛应用于许多其他学科的研究领域, 为这些学科的发展提供了新的研究方法和实验设计的新的思维方式。PCR-RFLP 技术^[1] 在环境地球化学方面的应用就是一个典型的方面。参与环境地球化学作用的生物种类和功能的鉴别是该学科急待解决的问题之一, PCR-RFLP 技术则是解决这一难题的有效方法。PCR (polymerase chain reaction) 指多聚酶链式反应, 是大量特异性 DNA (deoxyribonucleic acid) 片段扩增和目的基因筛选的一种有效方法。RFLP (restriction-fragment length polymorphisms) 指限制性片段长度多态性, 是研究生物进化和分化的有力工具, 因为它依据的是一个生物体的基因组的独特特征和能被某些限制性酶识别的特殊碱基序列的特有分布方式, 因此对生物种类的鉴别具有高度的专一性。PCR 和 RFLP 结合起来使用就形成了 PCR-RFLP 技术。在对特殊环境下参与环境地球化学过程的生物的研究基础上, 就能更深入地探讨多种地球化学过程和不同历史时期的生物多样性和生物进化途径。利用 PCR-RFLP 技术, 以环境

中存在的 16S rRNA 为对象, 对环境生物的研究已广泛开展并取得了重大成果。自然环境中的生物多样性及其在环境过程中的作用远没有被认识, 随着 PCR-RFLP 技术的应用, 将在这方面取得更多的研究成果。

1 方法简介

在海洋和湖泊等沉积环境中生长的生物体的 RNA (ribonucleic acid) 基因的克隆和测序能揭示生物的基因多样性, 通常选用 16S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 的基因进行 PCR 扩增和 RFLP 分析, 目的是鉴别生物多样性及其在环境地球化学过程中的作用。由于历史和技术的的原因, 大多利用 5S rRNA (~120 个核苷酸) 和 16S rRNA (~1600 个核苷酸) 进行以 rRNA 为基础的系统发生特征研究^[2]。16S rRNA 含有生物系统发生的信息, 在用寡聚核苷酸探针、基因克隆和测序、16S rRNA 的逆转录三种方法获得了它的大多数可用资料的背景下, 用于研究生物的系统发生倍受人们的关注, 由此也可以找到它和环境地球化学研究的结合点。PCR 技术能够快速特异地扩增任何希望的目的基因或 DNA 片段, 并很容易地使得皮克 (pg) 水平的起始物达到纳克 (ng) 水平的量。PCR 方法所使用的仪器是 PCR 扩增仪, 它的原理类似于天然 DNA 的复制。它由高温变性、低温退火及适温延伸等几个反应组成一个周期, 循

收稿日期: 2000-11-03; 修回日期: 2000-11-26

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 49773207) 和贵州省自然科学基金 (编号: 3090)

第一作者简介: 梁小兵 (1963—), 男, 博士研究生, 从事生物化学和环境地球化学的研究工作

环进行^[3]。PCR 需要 DNA 合成的引物,通常可以在实验室自己合成或从许多厂商处购得。环境地球化学研究中扩增的 DNA 片段通常具有限制性片段长度多态性的特征,如 16S rRNA、18S rRNA 基因等^[4~7]。测定 RFLP 的方法有以下两种:1. 限制性片段的长度分布图象。分离提取 DNA,通过 PCR 扩增目的 DNA 片段,再用适当的限制性内切酶将其酶解,将限制酶切产物与分子量标准物一起在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶上电泳,结果在紫外灯下进行观察拍照,对应点表示限制性片段的大小及位置。2. 限制性酶切产物与探针杂交的放射自显影。通过 DNA 探针与特异碱基序列相结合进行检测,再用放射自显影或免疫荧光进行观察^[8]。

2 环境地球化学方面的应用

2.1 物质循环

在环境中进行着 C、N、P、S 等元素的生物地球化学循环,这些元素的组合反映了区域范围生态环境演化的基本特点^[9]。同时,这些元素也是生命物质的组成元素。它们所构成的核酸、蛋白质及其水解产物核苷酸、氨基酸通过生物细胞释放到环境中,参与元素的地球化学循环。湖泊沉积物中既存在无机碳酸盐的溶蚀和结晶,又存在生物残骸的分解和转化。来源于流域生物碎屑、水体浮游和底栖生物残骸、底栖微生物组织的有机碳,在沉积物中参与各种生物化学和地球化学作用,是活泼的生物地球化学要素。N、P 循环是影响湖泊水质的重要因素,湖泊沉积物中有大量含 N、P 的核酸和蛋白质等生命物质,占有有机 N、P 的很大部分并且极易发生变化。硫循环对环境地球化学研究问题的解决具有重要意义,表现在对酸雨的归宿和潜在的环境效应、沉积物中硫酸盐的还原作用机理和清除机制以及早期大气氧的演化历史^[10~11] 等方面的研究工作。因此,需要开展对 C、N、P、S 循环中的含这些元素的生化物质的研究工作,而 PCR-RFLP 技术则是很好的研究手段。通过分离提取自然环境中残留的 DNA,选定合适的 RFLP 片段,经过 PCR 的扩增,结合其他研究手段,可以鉴定出该核酸的生物来源和生物种类。生物是 C、N、P、S 的主要来源和循环变化的控制和参与者,通过生物及其残留生化物质就可寻找 C、N、P、S 循环的变化规律。例如,湖泊沉积物和土壤中进行着各种形态的氮的转化,是

N 循环的组成部分,有微生物参与的硝化-反硝化作用的研究越来越受人们重视,人们对有关环境条件和微生物的研究作了很多工作^[12~13]。PCR-RFLP 是研究硝化-反硝化作用中微生物群落的很好的、新颖的方法,各种硝化-反硝化作用的微生物都有供扩增的特征 DNA 片段,是 PCR-RFLP 技术应用的先决条件。该手段的介入有利于阐明这一过程中微生物的作用机理及 N 循环的过程。在 N 循环过程中,一氧化二氮还原是脱氮途径的最后一步,由一氧化二氮还原酶催化。Scala 等人运用 PCR 技术对海洋沉积物中该酶的基因进行了扩增研究,用 CAMP-Nos661F 和 CAMP-Nos1773R 为引物,扩增 ~1000bp 的一氧化二氮还原酶基因,研究结果提示了脱氮微生物群落受地理分布的限制^[14]。因此,PCR-RFLP 技术作为研究元素地球化学循环的一种新的手段,在环境中的 DNA 的 RFLP 分析的基础上,可探讨 C、N、P、S 的来源、变化途径、生物控制因素和环境效应。

2.2 生物作用

生物作用在环境地球化学过程中非常重要,硫酸盐的还原、甲烷的产生和消耗等都是生物作用的结果。生物作用的主体是微生物,PCR-RFLP 技术是研究微生物种类及功能的有效手段,具有传统微生物分离培养法所无法达到的优点。对不同环境条件下 RFLP 的鉴定,有助于对生物作用过程的阐明。例如 Hinrichs 等人用 PCR-RFLP 技术对海洋沉积物中甲烷循环进行研究,发现了甲烷循环的新途径和参与循环的新的微生物种类。虽然这类微生物并没有被分离出来或得到纯培养,但用这种分子生物学的手段已能证明它们的存在,这也展示了 PCR-RFLP 技术在沉积物的生物作用方面的优势及应用前景^[15]。海洋和湖泊沉积物中的硫酸盐还原作用是在硫酸盐还原菌的作用下进行的,硫酸盐还原菌的种类很多,至今仍不能获得所有这些菌种的纯培养菌株,给硫酸盐还原作用的研究带来困难。硫酸盐还原菌(SBR)在湖泊的硫循环中起重要的作用,有机质可通过硫酸盐还原菌的降解作用来形成硫化氢,然后和 Fe^{2+} 结合而固定在沉积物中,这种发生在湖泊沉积物中 SO_4^{2-} 的变化具有重要的环境意义^[16~18]。在这一研究领域中,对硫酸盐还原菌在沉积物中不同深度的空间分布和种类的鉴定是关键,用传统的微生物培养方法,难

度大而且不能获得所有种类的纯培养,但在实验室合成硫酸盐还原菌的特征性引物,通过 PCR 扩增沉积物中残存的 DNA 的限制性片段,经过 RFLP 的鉴定,就可轻易了解硫酸盐还原菌的状况。在这方面的研究中硫酸盐还原菌的 SBR385 基因片段是可选用的片段之一。因此,运用 PCR-RFLP 技术可以不通过培养硫酸盐还原菌而直接用沉积物中残存的 DNA 研究硫酸盐还原的生物作用过程。

2.3 有机物源的鉴定

有机物来源常常是环境地球化学研究中需要解决而又难以解决的难题。河流和湖泊沉积物中的有机物源的鉴定可用于指示流域的侵蚀作用。水生生物和陆生生物以及植物和微生物的 DNA 和 RNA 有显著的差异,而 RFLP 能有效地反映出这种差异,并且容易进行实验操作。对 RFLP 的鉴定是区分有机物源的有效而又精确的方法。有两种方法可供有机物源的鉴定参考,一种是在对沉积物中 DNA 和 RNA 定量的基础上^[19],分离出不同的核酸谱带,用 PCR-RFLP 技术对它的生物来源进行鉴定,以确定有机物源;另一种方法是根据生物 DNA 片段的多态性,采用不同的引物,扩增并鉴定不同来源的 DNA。对沉积物中 DNA 和 RNA 的分离提取及定量则是对有机物源进一步定量的关键。例如,自养生物含有叶绿体 DNA,异养生物则没有;真核生物包括植物的 DNA 能转录出核不均一 RNA (hnRNA),这有别于原核生物。植物类脂物与细菌、藻类的类脂物在组成和分布特征上有明显的差异,反映在 DNA 上也有明显的差异。厌氧条件下生活的微生物主要是原始细菌^[20,21],选取编码原始细菌 16S rRNA 的特征性 DNA 片段作为扩增对象,采用特征性的合成引物(如 Ar20F: TTCCG-GTTGATCCYGCCRG 和 Ar958R: YCCG-GCGTTGAMTCCAATT),可对其进行鉴定。因此,选取其中一个或几个 DNA 片段,进行多态性的研究就可判断湖泊沉积物的有机来源。

2.4 生物多样性

Carl Woese 通过比较核糖体 RNA (rRNA) 顺序,建立了以分子顺序为基础的种系发生树,它可将所有的生物联系起来并重建生命的历史^[22]。自然环境中的各种生物 DNA 和 RNA 都具有特征性的片段或者说同类片段对不同生物具有多态性,生物死亡后将其体内的 DNA 和 RNA 释放

到环境中,而经历了一定的时间变化后,环境(如湖泊沉积物)对这类物质仍有一定的保留。运用 PCR-RFLP 技术对一定时期的 DNA 和 RNA 进行研究,就可复原这一时期的生物多样性。Palmer 指出沉积物环境中的微生物圈作用过程还未经多少研究,很大程度上是由于方法学上的困难^[23]。PCR-RFLP 提供了一个很好的方法来研究微生物圈的作用及生物多样性。沉积环境中微生物的分离、培养是研究微生物圈和微生物多样性的难题之一,而传统的方法很难解决这一难题,但用 PCR-RFLP 技术在没有检出或获得微生物纯培养的情况下,通过沉积环境中的 DNA 和 RNA 就可判断释放它们的微生物的多样性,而且,所需样品量仅仅是皮克级的。通过特征 DNA 片段的 PCR 扩增,结合 DNA 的测序技术,就可构建生物系统发生树,研究生物多样性和系统发生关系,这方面的研究技术已得到广泛应用^[15,22,24,25]。选择 16S rRNA 的基因作为扩增对象,采用 PCR-RFLP 技术对环境样品中微生物群落的分析方法是一种非常有效的手段。Schwieger 等人用 PCR 结合 DNA 的单链结构多态性(SSCP)的分析,能够清晰地区分同一块土地上生长的两种植物的根际微生物群落^[26]。Widmer 等人采用 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 技术和 DNA 测序相结合的方案,对与生态、经济和人类健康有重要功能的假单胞菌进行研究,结果表明这是分析假单胞菌种群结构和寻找分类学证据的有力手段^[27]。Lueders 等人用小亚基(SSU) rRNA 基因进行 PCR 扩增,对扩增物作末端限制性长度多态性(T-RFLP)分析,发现原始细菌在灌溉后水稻土的连续还原过程中,具有相对稳定的原始细菌群落结构^[28]。我们课题组的工作是在某一环境样品(如湖泊沉积物和黄土等)定年的基础上,研究一定历史时期的生物多样性和生物进化关系。

采用 PCR-RFLP 技术对生物群落结构的研究,在一定时标下,用不同的样品,就可研究生物多样性和生物进化关系。这是一种行之有效而又有待发展的方法。

3 应用展望

生物圈是环境的重要组成部分,环境地球化学的研究离不开对环境中生命物质的研究。新的生物技术向环境地球化学研究领域的渗透,能有

效地促进该领域研究问题的解决。PCR-RFLP 技术已经在这一领域应用并取得了一些创新性的研究成果, Summons 认为分子生物学的技术和有机地球化学结合为微生物生态学提供了一种新的手段^[29]。PCR-RFLP 技术的应用能从以下几方面促进环境地球化学的发展: 第一, 将有更多的、新的微生物在海洋和湖泊沉积物等自然环境中被发现。微生物种类之多、分布之广, 远没有被人类认识, 特别是生活在一些特殊环境(如深层的海洋和湖泊沉积物)中的微生物的多样性, 会逐步被揭示出来; 第二, 更明确和深入地揭示一些物质

的地球化学循环过程。生物作用是物质循环的一个不可分割的重要方面, 新技术的应用将会进一步地阐明生物作用和物质循环的机理和过程; 第三, 将进一步阐明自然环境中生物大分子的变化机理及其环境效应并找到判断沉积物有机物源的新方法。自然环境中生物大分子的检出极限的提高和所需纯样品量的减少, 为环境中生物大分子的研究工作提供了基本的研究条件, 在此基础上可以运用更多的生物化学和分子生物学方法进行自然环境中残存生物大分子的研究, 以探讨与此相关的多种环境过程。

参 考 文 献

- [1] 宋思扬等主编, 生物技术概论. 北京: 科学出版社, 1999, 254 ~ 265.
- [2] G. J. Olsen et al., Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology*, 1986, 40: 337 ~ 365.
- [3] 叶 寅, 核酸序列测定—实验室指南. 北京: 科学出版社, 1995, 142 ~ 167.
- [4] M. D. Kane et al., Monitoring the Enrichment and Isolation of Sulfate-reducing Bacteria by Using Oligonucleotide Hybridization Probes Designed from Environmental Derived 16S rRNA Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 682 ~ 686.
- [5] V. Farrelly et al., Effect of Genome Size and *rrn* Gene Copy Number on PCR Amplification of 16S rRNA Genes from a Mixture of Bacteria Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 2798 ~ 2801.
- [6] M. T. Suzuki and S. J. Giovannoni., Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixture of 16S rRNA Genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 625 ~ 630.
- [7] Seung Yeo Moon-van der Staay et al., Abundance and Diversity of Pymnesiophytes in the Picoplankton Community from the Equatorial Pacific Ocean Inferred from 18S rDNA Sequences. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45: 98 ~ 109.
- [8] 李永明, 实用分子生物学方法手册. 科学出版社, 1998, 208 ~ 213.
- [9] 万国江、白占国、王浩然和黄荣贵, 洱海近代沉积物中碳—氮—硫—磷的地球化学记录. *地球化学*, 2000, 29: 189 ~ 197.
- [10] A. Paytan, Sulfate Clues for the Early History of Atmospheric Oxygen. *Science*, 2000, 28: 626 ~ 627.
- [11] D. E. Canfield et al., The Archean Sulfur Cycle and the Early History of Atmospheric Oxygen. *Science*, 2000, 28: 658 ~ 661.
- [12] 万 曦、万国江、黄荣贵和 M. Snozzi, 微生物脱氮作用及对中间产物的抑制. *植物营养与肥料学报*, 2000, 6(2): 227 ~ 232.
- [13] Wan Xi, Wan Guojiang and M. Snozzi, Microbiological Denitrification and Denitrifying Active of *Paracoccus* Denitrificans. *Chinese Journal of Geochemistry*, 2000, 19(2): 186 ~ 192.
- [14] D. Scala and L. J. Kerkhof, Diversity of Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Genes in Continental Shelf Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1681 ~ 1687.
- [15] K. U. Hinrichs et al., Methane-consuming Archaeobacteria in Marine Sediments. *Nature*, 1999, 398: 802 ~ 805.
- [16] 梁小兵、万国江, 硫循环的酶促反应机制及湖泊环境效应. *地质地球化学*, 2000, 28(4): 33 ~ 36.
- [17] Wan Xi, Wan Guojiang, Huang Ronggui and Pu Yong, Biogeochemical mechanism of postdepositional remobilization of Fe-Mn in Lake Aha, China. *Chinese Geographical Science*, 1997, 7(4): 368 ~ 374.
- [18] Jorgensen B. B., Processes at the sediment—water interface, In: *The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions*, (ed. Bolin B. and Cook R. B.), Scope 21, Wiley, 1983, 477 ~ 509.
- [19] A. Dellanno et al., Pelagic-Benthic Coupling of Nucleic Acids in an Abyssal Location of the Northeastern Atlantic Ocean.

Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 4451 ~ 4457.

- [20] 中国科学院地球化学研究所编, 高等地球化学. 北京: 科学出版社, 1998. 329 ~ 433.
- [21] 古德温·默塞尔著, 西北农业大学译, 植物生物化学导论. 陕西: 天则出版社, 1988. 380 ~ 403.
- [22] N. R. Pace. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, 1997, 276: 734 ~ 740.
- [23] M. A. Palmer, 淡水沉积物中的生物多样性和生态系统过程. *AMBIO—人类环境杂志*, 1997, 26(8): 563 ~ 569.
- [24] Seung Yeo Moon-van der Staay, Georg W. M. Van der Staay, Laure Guillou and Daniel Vaultot, Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18s rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45(1): 98 ~ 109.
- [25] Grace C. Y. Wang and Yue Wang, Frequency of formation of Chimeric molecules as a consequences of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4645 ~ 4650.
- [26] F. Schwieger and C. Tebbe, A New Approach to Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4870 ~ 4876.
- [27] F. Widmer et al., A High Selective PCR Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in Environmental Sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2545 ~ 2553.
- [28] T. Lueders and M. Friedrich, Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2732 ~ 2742.
- [29] R. Summons, Molecular probing of deep secrets. *Nature*, 1999, 398: 752 ~ 753.

EXPECTATION AND APPLICATION OF PCR-RFLP IN ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY

Liang Xiaobing Wan Guojiang Huang Ronggui

(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002)

Abstract

Application of PCR-RFLP technique in environmental geochemistry provides a new research method, as well as a manner of thinking in experimental design. The method has many advantages such as low sample requirement, faster performance and convenience. It can be widely applied in the study of biogeochemical cycle of substances, biological effects in environmental processes, biological diversity and identification of the sources of organic substances. By using the PCR-RFLP technique, environmental biology, which takes 16S rRNA in the environment as research object, has been studied and many results have been achieved. Prospects of the future research are: more and unknown microorganisms will be discovered in natural environments such as oceans and lakes, ulterior mechanism and processes of biological effects and substantial cycle and ulterior change mechanism of biological macromolecules in natural environments will be enucleated, and a new method to identify the origin of organic substances.

Key words: PCR-RFLP; environmental geochemistry