

功能基因芯片在土壤微生物生态研究中的应用

孙寓姣, 张惠淳

(北京师范大学 水科学研究院, 北京 100875)

摘要: 功能基因芯片是一项以编码各种微生物生理功能的基因为探针的前沿的微阵列技术, 这种技术可以对环境样品进行快速、敏感的高通量检测。近年来, 功能基因芯片日臻成熟, 并在土壤微生物生态的研究中得到重视和应用, 在有关各种生态系统中以及各种污染压力下的土壤微生物群落的结构和功能的研究中提供了大量信息。功能基因芯片的发展将有助于深入研究土壤微生物生态细节过程, 描述微生物群落的生态功能网络, 为预测微生物群落对环境压力的响应变化提供理论基础。

关键词: 基因芯片; 土壤微生物生态; 功能基因; 微生物群落

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-1683(2013)01-0093-04

Application of Functional Gene Arrays on Research of the Soil Micro-ecosystem

SUN Yujiao, ZHANG Huichun

(College of Water Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Functional Gene Array (FGA) is a cutting edge microarray technology for rapid, sensitive, and high throughput detection of environmental samples, which encodes the genes of physiological functions of all microorganisms as the probe. Recently, FGA has been developed to such a degree that it was applied in the researches on the ecology of soil microorganisms. This technology has offered great information about the structure and function of soil microorganism community under different ecological systems and pollution stresses. The development of FGA is beneficial to the understanding of the detailed microecological process and describing the ecological functional networks of microorganisms, which provides the theoretical basis for the prediction of response of microbial community to the environmental stress.

Key words: Functional Gene Array (FGA); soil micro-ecosystem; functional gene; microbial community

在自然生态系统中, 微生物群落各项物质循环与能量循环中发挥着重要作用。庞大的微生物数量及其错综复杂的功能网络使得微生物资源的研究和有效利用具有很大的挑战性。在实验室条件下很难模拟微生物群落的自然生境, 无法为微生物群落提供理想的生长环境, 传统培养富集技术只能提供有限的微生物群落信息, 而且实验周期较长。分子生物学技术则直接检测微生物的遗传物质基础——核酸, 极大地减轻了对培养方法的依赖, 由此显著促进了自然生境中微生物的监测和定性描述。功能基因芯片是新一代分子生物学检测技术, 通过成千上万密集排列的核酸探针能够在短时间内分析大量的核酸分子。大部分以核酸为检测对象的技术仅提供微生物的系统发育学信息, 而功能基因芯片的检测对象为微生物群落的功能基因。基因芯片技术作为无需培养的高通量检测技术, 解决了传统分子生物学

的低效率问题, 以特异性和高度灵敏性来保证检测结果的准确性, 而且可以定量检测目的基因。近十年来, 功能基因芯片的发展极大地促进了有关土壤微生物生态的活动和多样性的研究^[1]。土壤微生物有类群繁多、数量巨大、分布复杂、功能多样等特征^[2], 而且现今, 气候变化、工业化、城市化以及农业的发展对土壤生态系统产生不同程度的压力, 土壤微生物的分布和功能在不断地发生变化, 然而人们对此的了解还远远不足以预测微生物的演替充分利用微生物的功能, 因此功能基因芯片在土壤微生物生态的研究中也得到越来越广泛的关注。

1 功能基因芯片(微阵列)技术简介

1.1 功能基因芯片原理

基因芯片技术作为新一代的核酸杂交技术, 具有高密

收稿日期: 2012-11-21 修回日期: 2012-12-25 网络出版时间: 2013-01-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/13.1334.TV.20130124.1132.023.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目(51178048); 北京自然科学基金项目(8112014)

作者简介: 孙寓姣(1975-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 副教授, 博士, 主要从事环境生物技术、污染环境微生物学和分子微生物生态学等方面的研究。

E-mail: sunyujiao@bnu.edu.cn

度、平行分析、双色测定和低背景值等优势,非常适合于检测自然环境中的微生物^[3]。在此技术中,将大量核酸片段(寡核苷酸、cDNA、基因组 DNA)以预先设计的方式固定在载玻片、尼龙膜等载体上组成密集分子排列,再根据核酸互补杂交原理,与标记样品进行杂交;通过检测杂交信号的强弱,判断样品中靶分子的数量及组成^[4]。功能基因芯片是包含有功能基因序列的微阵列,这些功能基因编码微生物的生物化学功能的相关蛋白质。

功能基因芯片可分为功能分类基因芯片和基因表达芯片,前者的目的主要是研究菌群是否具有某些涉及特定反应过程的基因,可知微生物群落的潜在功能,杂交靶标是菌群 DNA 的 PCR 产物;而后者用于研究这些特定功能基因的生理活性及其基因真实表达的情况,需提取环境样品的 mRNA,其杂交靶标是菌群 cDNA 的 PCR 产物^[5]。

1.2 功能基因芯片探针、杂交及数据分析

制作功能基因阵列的基因探针必须根据具体所要研究的问题进行认真选择。制备功能基因探针的方法有 3 种:(1)用专一性引物从纯培养物的基因组 DNA 中扩增所需的基因片段或以载体特异性引物从含所需基因的载体质粒上扩增;(2)通过 PCR 从自然环境中获取所需基因片段;(3)使用寡核苷酸探针,根据数据库中的功能序列信息设计并合成较长的(50~70 个碱基)寡核苷酸探针,固化在阵列上。

为了与固定的探针杂交,待测基因(DNA 或 mRNA)要经 PCR、逆转录、末端标记等操作,成为标记有荧光染料或同位素的核酸分子。杂交后每个斑点信号强度通过计算机进行处理得到大量信息,并进行后续的数据分析工作。数据分析一般遵循的技术路线为生物多样性分析、群落组成和结构分析、与环境因子的相关性分析,以分子生态网络的建立。在生物多样性分析中,要根据检测到的基因数量计算出各项多样性指数,如丰度、均匀度,多样性等等,同时要把不同样品中特殊的、唯一的以及共有的基因找出来;在群落组成和结构分析中,可利用的方法有方差分析、聚类分析、除趋势对应分析(Detrended Correspondence Analysis, DCA)、响应比分析等多种方法;群落及环境之间的关系分析中,可通过典范对应分析、矩阵相关分析、方差分解分析(VPA)等方法进行研究;建立分子生态网络目的是为了更清楚地揭示微生物功能基因和相关群落之间的关系^[6]。

1.3 功能基因芯片发展

最初,功能基因芯片由 89 个 PCR 扩增探针组成,可以检测到纯培养物的 nirS, nirK, amoA 和 pmoA 等四种功能基因。后来出现的多种功能基因芯片则以关于微生物特定功能过程的基因为目标,如氮循环^[7-9],甲烷氧化菌^[10]等等。近几年功能基因芯片已发展成为有数千个甚至数万个探针的综合性芯片,可同时检测数万个功能基因,涉及到碳、氮等各个循环、金属还原和有机物降解等各种微生态功能。其中最具代表性的功能基因芯片是美国俄克拉荷马大学环境基因组学研究院 Zhou 等^[11-13]开发出的 Geochip,这种综合性高通量功能基因芯片通过数万个探针提供有关功能基因的超大量信息,目前发展到了 Geochip 4.0 版本^[13]。Geochip 系列芯片被用于包括土壤、水生态系统等各种环境的微生态研

究中,已充分证明此技术的适用性和发展前景。然而,功能基因芯片也存在有待进一步解决的问题:(1)要发展强有力的软件工具来设计特异性探针,以应对测序技术得到的大量序列信息;(2)面对环境样品中复杂多样的微生物资源,需要新方法、新策略来不断改善基因芯片的敏感性和定量准确性。

2 功能基因芯片在土壤微生态研究中的应用

功能基因芯片从功能基因的视角探索土壤微生物在不同生态类型中和不同环境压力下的分布及规律,以及土壤微生物在污染物处理、降解和土壤修复等方面的作用和机理,并深入了解碳、氮等营养物质在土壤微生态系统中循环、转化作用机理。由此可见,功能基因芯片为土壤微生态研究提供了全新的强有力的技术分析工具,有助于更高效地利用土壤微生物对污染环境进行综合治理,或利用生物技术改造微生物,增强对外源污染物的降解和转化,同时为开发利用微生物资源维持陆地生态系统的稳定性提供了理论基础。

2.1 利用功能基因芯片探讨不同生态系统中土壤的微生态过程

功能基因芯片在森林生态系统、草地生态系统,农业生态系统等各种不同生态系统的土壤微生态研究中都得到了应用。He 等^[14]结合功能基因芯片和焦磷酸测序技术检测二氧化碳增加压力下的草地土壤微生物群落变化,发现在二氧化碳增加压力下有关活性碳降解、固碳、固氮以及磷释放的基因数量都有所增加,而对有关甲烷代谢和难降解性碳降解的基因没有显著影响,而且土壤微生物群落结构和代谢潜力与土壤的碳氮含量、植物生产力密切相关。这样的结果表明二氧化碳的增加改变了微生物群落的结构和组成,微生物群落的结构和功能的改变会进一步对碳的流动产生影响。Zhang 等^[15]研究了四川亚高山带森林中土地利用和覆盖对土壤微生物有机碳降解基因多样性的影响,其中所用的功能基因阵列包含代表 123 个功能基因的 1 961 个探针。研究表明,在一些土地利用类型场地中功能基因数量与基因多样性指数与土壤有机碳的增加呈正相关。Berthrong 等^[16]用功能基因芯片 Geochip 2.0 (> 24 000 个探针,可以同时检测数千个基因,包括碳循环的相关基因)来比较土壤微生物和生物地理化学功能如何响应不同的土地利用类型,结果表明,草地向森林的转变使土壤的碳氮储存量发生了变化:桉树的种植减少了与氮化和固氮作用相关的功能基因、碳聚合物降解相关的基因和几丁质酶功能基因的丰度。另外, Zhou 等^[17]同样利用 Geochip 2.0 研究了森林土壤的微生物群落空间分布模式,结果证明了物种-区域关系适用于微生物群落的分布。Reeve 等^[18]收集了不同管理措施下农业生态系统的土壤样品,利用功能基因芯片探讨土壤功能和微生物群落多样性之间的关系。这些工作都把环境压力、土壤特性、植被等相关因素与土壤微生物群落的分布和功能紧密地联系了起来。还有涉及到极端生态系统的研究, Yergeau 等^[19]首次利用包含 24 243 个寡核苷酸探针(10 000 多个与氮、碳、硫和磷循环和有机污染物降解相关的功能基因)的功能基因芯片研究了不同纬度上的南极土壤微生物群落变化,探讨了

生态系统中影响碳氮循环的环境因素。

大部分的研究都是检测从土壤样品提取的 DNA,但还有一些研究把目标转向了 mRNA。Bodrossy 等^[20]用甲烷氧化菌的功能基因芯片对垃圾堆肥土壤进行了 DNA 以及 mRNA 的基因检测,发现一些从 mRNA 中检测到的基因在 DNA 的检测中却未出现,这说明基于 mRNA 的基因诊断检测可以为微生物群落结构和功能补充更多信息。McGrath 等^[21]构建了一个基于 mRNA 的环境功能基因芯片(Environmental functional gene microarray, EFGA),用于检测不同的 N₂O 通量条件下农田土壤中的微生物群落活动状态。检测结果显示,109 个基因表达状况在高产 N₂O 和低产 N₂O 的条件下有明显的不同,证明功能基因芯片在环境微生物基因表达检测方面的适用性,其应用有助于利用微生物使 N₂O 释放最少,以便最大程度地为农作物保留土壤中的氮素。

此外,大多数的微生物多样性研究集中在种群水平上的丰度和数量,少数学者关注了微生物群落之间的相互关系。对于数量巨大,多样的微生物群落,定义其复杂的网络结构是一项非常具有挑战性的任务,而高通量功能基因芯片的应用可以使这一领域的研究成为可能。Zhou 等^[22]通过研究提供了一个基于随机矩阵理论(random matrix theory, RMT)的概念框架,利用功能基因芯片获取了不同二氧化碳浓度下土壤样品中的数据,通过 RMT 方法从数据中自动识别分子网络,结果表明功能基因的分子生态网络在不同二氧化碳浓度下有明显的不同,功能基因网络的拓扑结构与土壤的地理化学参数有关。

2.2 利用功能基因芯片探讨污染压力下的土壤微生态

应用功能基因分类芯片研究污染土壤的生物降解、生物修复等过程,在群落和基因的水平上对微生物进行动态检测,为提高修复降解效率提供可借鉴的理论基础。

Liang 等^[23]利用功能基因芯片对位于中国东北的油田土壤进行原位检测,考察不同石油污染压力下的土壤微生物群落多样性。研究结果反映了不同污染压力下的功能基因的响应关系,功能基因的丰度和多样性随着污染浓度的增加下降,含油量和土壤有效氮对微生物功能基因影响最大。钟毅等^[24]以中国大庆油田典型污染场地土壤为研究对象,利用基因芯片技术分析在石油污染、调节氮磷营养、种植植物(紫花苜蓿、高羊茅和羊草)等不同微生态环境下的土壤微生物群落结构特征。此外,Rhee 等^[25]为了有效地监测生物降解微生物种群,开发了基于 50-mer 寡核苷酸探针的功能基因微阵列,应用到多环芳烃和苯-甲苯-乙苯-二甲苯污染土壤和未污染土壤分析,证明此技术具有有望成为专一、灵敏和可量化的工具来揭示污染环境样品中微生物群落和生物降解基因的动态,但其检测灵敏度仍需进一步改善。Zhang 等^[26]通过功能基因芯片 Geochip 进行了多环芳烃污染土壤中微生物功能基因的研究,微生物的多环芳烃相关基因与多环芳烃的浓度之间的关系有助于阐明不同污染浓度下功能基因的动态机理。研究表明,虽然污染浓度对整体的微生物群落产生负面压力,但个别的多环芳烃相关降解基因随着污染浓度的增加活动更加活跃,说明一些特定的微生物群

落在相应的环境压力下存活率更高。

功能基因芯片应用于污染土壤研究的优势在于:可以提供生物修复降解相关的关键基因和其他生理功能基因的动态信息,在找出引起这种动态变化的驱动力的同时,微观地把微生物在降解修复中所发挥的功能与其他生物化学功能相联系,从而描绘在污染压力下的微生物功能网络。

3 前景展望

功能基因芯片是将生物学、物理学、化学及计算机科学汇集于一体的新型高通量微阵列技术,因其对功能基因的针对性而得到越来越多的关注。从功能基因角度探讨微生物群落,可以深入了解微生物在各个营养物质循环与能量循环中所发挥的功能,探讨在不同宏观环境和污染压力下微生物功能的改变,追查致使微生物群落的功能和分布发生变化的关键因子,为更有效地利用微生物资源提供支持。未来,在利用功能基因芯片进行土壤微生态的研究中,应在以下两个方面深入。

(1) 结合 mRNA 的检测,研究微生物群落的状态及真实的生理活动。因为检测 DNA 得到的信息中包括来自无活性细胞的功能基因,因此要结合对 mRNA 的检测,得到功能基因真实得到表达的信息来补充。土壤样品中的核酸提取及纯化本身就需要较高的要求,对样品前处理的技术也要越加完善。对 DNA 和 mRNA 的共同关注有利于得到土壤微生态系统的更加全面真实的信息。

(2) 重视微生态细节过程,预测微生态在环境压力下的响应。现今的生态模型只是把微生物群落看作是一个黑匣子,假定生物地理化学变化与微生物群落的丰度和功能没有显著的相关性,因此一般会忽视微生态的细节过程。通过功能基因芯片获取的微生物群落结构和功能的信息可以打开这个黑匣子,将信息整合为看得见的微生物群落生态网络,用于预测各种环境压力下的微生态响应。

参考文献(References):

- [1] Gaspar T, Erin MG, Chris AF, et al. Oligonucleotide Microarray for the Study of Functional Gene Diversity in the Nitrogen Cycle in the Environment [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (2): 1159-1171.
- [2] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 4-12. (YAO Huaiying, HUANG Changyong. Soil Microecology and Laboratory Technology[M]. Beijing: Science Press, 2006: 4-12. (in Chinese))
- [3] 周集中, 多罗西亚 K. 汤普森, 徐鹰, 等. 微生物功能基因组学[M]. 北京: 化学工业出版社. 2007: 334-343. (ZHOU Jizhong, Dorothea K. Thompson, XU Ying, et al. Microbial Functional Genomics [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 334-343. (in Chinese))
- [4] Van Elsas JD, Boersma FGH. A Review of Molecular Methods to Study the Microbiota of Soil and the Mycosphere [J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(2): 77-87.
- [5] 金敏, 李君文. 基因芯片技术在环境微生物群落研究中的应用 [J]. 微生物学通报, 2008, 25(9): 1466-1471. (JIN Min, LI Junwen. Microarray Application in Environmental Microbial Com-

- munity Research[J]. *Microbiology*, 2008, 25(9): 1466-1471. (in Chinese)
- [6] He Zhili, Joy D Van N, Jizhong Z. Applications of Functional Gene Microarrays for Profiling Microbial Communities[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 460-466.
- [7] ZHOU Jizhong, YE Deng, FENG Luo, et al. Functional Molecular Ecological Networks [J]. *MBio*, 2010, 1(4): e00169 e00110.
- [8] Grieg F. S, Bethany D. J, et al. Development and Testing of a DNA Macroarray to Assess Nitrogenase (nifH) Gene Diversity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1455-1465.
- [9] Cyril B, Geoffroy G, Carine GL, et al. Microarray-based Detection and Typing of the Rhizobium Nodulation gene nodC: Potential of DNA Arrays to Diagnose Biological Functions of Interest [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12): 8042-8048.
- [10] Levente B, Nancy S. J, Colin M, et al. Development and Validation of a Diagnostic Microbial Microarray for Methanotrophs [J]. *Environ Microbiol*, 2003, 5(7): 566-582.
- [11] He Z, Gentry T J, Schadt CW, et al. GeoChip: A Comprehensive Microarray for Investigating Biogeochemical, Ecological and Environmental Processes [J]. *The ISME Journal*, 2007, 1: 67-77.
- [12] He Zhili, Deng Y, Hemme, C. L, et al. GeoChip 3.0 as a High Throughput Tool for Analyzing Microbial Community Structure, Composition and functional Activity [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4: 1167-1179.
- [13] He Z, Deng Y, Zhou J. Development of Functional Gene Microarrays for Microbial Community Analysis [J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2012, 23(1): 49-55.
- [14] He Z, Xu M, Deng Y, et al. Metagenomic Analysis Reveals a Marked Divergence in the Structure of Belowground Microbial Communities at Elevated CO₂ [J]. *Ecol Lett*, 2010, 13(5): 564-575.
- [15] ZHANG Y, ZHANG X, LIU X, et al. Microarray-based Analysis of Changes in Diversity of Microbial Genes Involved in Organic Carbon Decomposition Following Land Use/Cover Changes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 266(2): 144-151.
- [16] Berthrong ST, Schadt CW, Pineiro G, et al. Afforestation Alters the Composition of Functional Genes in Soil and Biogeochemical Processes in South American Grasslands [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(19): 6240-6248.
- [17] Zhou J, Kang S, Schadt CW, et al. Spatial Scaling of Functional Gene Diversity Across Various Microbial Taxa [J]. *PNAS*, 2008, 105(22): 7768-7773.
- [18] Reeve JR, Schadt CW, Carpenter-Boggs L, et al. Effects of Soil Type and Farm Management on Soil Ecological Functional Genes and Microbial Activities [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4: 1099-1107.
- [19] Yergeau E, Kang S, He Z, et al. Functional Microarray Analysis of Nitrogen and Carbon Cycling Genes Across an Antarctic Latitudinal Transect [J]. *The ISME Journal*, 2007, 1: 163-179.
- [20] Bodrossy L, Stralis Pavese N, Konrad Kozsler M, et al. MRNA-based Parallel Detection of Active Methanotroph Populations by Use of a Diagnostic Microarray [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(2): 1672-1676.
- [21] McGrath KC, Mondav R, Sintrajaya R, et al. Development of an Environmental Functional Gene Microarray for Soil Microbial Communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(21): 7161-7170.
- [22] Zhou Jizhong, Ye Deng, Feng Luo, et al. Functional Molecular Ecological Networks [J]. *mBio*, 2010, 1(4): e00169 e00110.
- [23] Liang Yuting, Li Guanghe, Joy D. V, et al. Microarray-based Analysis of Microbial Functional Diversity along an Oil Contamination Gradient in Oil Field [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 70(2): 324-333.
- [24] 钟毅, 张旭, 梁玉婷, 等. 基于基因芯片技术的石油污染土壤微生物群落结构 [J]. *清华大学学报*, 2010, 50(9): 1396-1399. (ZHONG Yi, ZHANG Xu, LIANG Yuting, et al. Microbial Community Structure in Oil Contaminated Soil Using the GeoChip Technique [J]. *J Tsinghua Univ (Sci & Tech)*, 2010, 50(9): 1396-1399. (in Chinese))
- [25] Rhee Sung Keun, Liu Xueduan, Wu Liyou, et al. Detection of Genes Involved in Biodegradation and Biotransformation in Microbial Communities by Using 50-mer Oligonucleotide Microarrays [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4303-4317.
- [26] Zhang Zhenyi, Zhao Xuan, Liang Yuting, et al. Microbial Functional Genes Reveal Selection of Microbial Community by PAHs in Polluted soils [J]. *Environ Chem Lett*, 2012, 6 published online.