

生物陶粒与生物活性炭上微生物群落结构的 PCR-SSCP 技术解析

刘小琳, 刘文君*

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 采用 PCR-SSCP(单链构象多态性)技术, 以 16S rRNA 基因的 V4-V5 区为靶对象, 分析用于饮用水处理的生物陶粒和生物活性炭上的微生物群落结构. 对生物陶粒和生物活性炭上的微生物分别进行超声波洗脱、R2A 和 LB 平板培养后提取基因组 DNA. 结果表明, 除生物活性炭超声波洗脱不能提取到 DNA 外, 其他处理均能提取到大小在 10 kb 以上的基因组 DNA, 但所提取的量有较大差异. 以提取的 DNA 为模板分别进行 PCR, 均能扩增到 408 bp 的基因片段. 这些片段经 λ 核酸外切酶消化处理后进行 SSCP 电泳. 结果显示, 超声波洗脱、R2A 和 LB 培养对试验结果影响不明显. 生物陶粒的微生物基因扩增片段 SSCP 图谱相同, 且只出现 1 条带. 测序后与基因组数据库对比, 结果显示其与 uncultured *Pseudomonas* sp. clone FTL201 16S rDNA (GenBank 登录号 AF509293.1) 片段同源率为 92%. 生物活性炭的微生物基因扩增片段 SSCP 图谱也相同, 但有 2 条带. 测序对比的结果表明, 这 2 个基因片段与 *Bacillus* sp. JH19 16S rDNA (GenBank 登录号 DQ232748.1) 片段和 *Bacterium* VA-S-11 16S rDNA (GenBank 登录号 AY395279.1) 片段的同源率分别为 100% 和 99%.

关键词: 生物陶粒; 生物活性炭; 微生物群落; 群落结构; 单链构象多态性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)04-0924-05

Microbial Community Structure in Bio-Ceramics and Biological Activated Carbon Analyzed by PCR-SSCP Technique

LIU Xiao-lin, LIU Wen-jun

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Analyses of microbial community structure in bio-ceramics (BC) and biological activated carbon (BAC), which widely used in drinking water treatment were performed by polymerase-chain-reaction-single-strand-conformation-polymorphism (PCR-SSCP) targeted eubacterial 16S ribosomal RNA gene. Microorganisms on bio-ceramics and biological activated carbon were detached by ultrasonic, culturing on R2A and LB agar, respectively, followed by genome DNA extracting. Results show that larger than 10 kb genome DNA could be extracted from all the samples except the BAC samples processed by ultrasonic. However, quantities of the extracted DNA were different. 408 bp gene fragments were observed after PCR using the extracted genome DNA as templates. These gene fragments were digested with lambda exonuclease followed by SSCP electrophoresis. Same SSCP profiles were observed between ultrasonic eluting, R2A and LB agar culturing. The identity of the segment from bio-ceramics with uncultured *Pseudomonas* sp. Clone FTL201 16S rDNA (GenBank, AF509293.1) fragment was 92%, and identities of the two segments from BAC with *Bacillus* sp. JH19 16S rDNA (GenBank, DQ232748.1) fragment and *Bacterium* VA-S-11 16S rDNA (GenBank, AY395279.1) fragment were 100% and 99%, respectively.

Key words: bio-ceramics; biological activated carbon; microbial community; community structure; single-strand-conformation-polymorphism (SSCP)

目前, 生物陶粒和生物活性炭正被广泛运用于饮用水的预处理和深度处理. 借助于陶粒和活性炭上微生物群体的新陈代谢活动, 可对水中的有机污染物^[1]、氨氮、亚硝酸盐及铁、锰等无机污染物进行初步去除; 减少水中消毒副产物前体物的量, 从而限制消毒副产物的生成.

虽然目前对利用微生物进行饮用水处理的方法及效果有比较多的研究, 但还未从微生物本身着手分析其种类、代谢途径及降解有机物、去除氨氮、铁、锰和消毒副产物前体物的机理. 本研究将以此为切入点, 采用 PCR-SSCP 技术, 解析生物陶粒与生物活

性炭上的微生物群落结构.

分子生物学方法与传统的微生物分离培养方法相比, 能更客观地反映微生物群落结构的本征. SSCP 技术是 Orita 等建立的^[2,3], 它是以前环境基因组信息为基础, 以核糖体小亚基 RNA 基因为靶对象从而实现分析群落结构的目的. 同其他分子生物学技术相比, SSCP 技术具有使用设备简单, 只需普通引物,

收稿日期: 2006-05-31; 修订日期: 2006-07-17

基金项目: 全国优秀博士论文基金项目(200243)

作者简介: 刘小琳(1974~), 女, 博士后, 主要研究方向为饮用水处理, E-mail: liuxiaolin@mail.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wjlou@mail.tsinghua.edu.cn

后续杂交不需变性处理等优点,在根际微生物群落结构分析^[3],自然生境微生物多样性调查^[4],有机肥沤制^[5]和反应器崩溃过程中^[6]微生物群落动力学等研究方面,SSCP 技术都表现出较强的应用潜力.近年来,这一技术也越来越多地应用于研究水中微生物群落结构^[7-9].本研究拟通过对 16S rDNA 的 PCR-SSCP 序列的比较分析,考察生物陶粒与生物活性炭上的微生物群落结构.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PCR 扩增仪为德国 Eppendorf 5332 型.电泳仪为北京六一仪器厂稳压稳流电泳仪 DYY-III 型,电泳槽为北京六一仪器厂垂直电泳槽 DYY-III-28B 型(带有冷水循环装置).超声仪器为昆山市超声仪器有限公司生产的 KQ-500B 型.丙烯酰胺、硝酸银、碳酸钠、甲醛等试剂均为国产分析纯产品.

1.2 样品采集

取自北京某水厂的生物陶粒和生物活性炭各 200 mL,分别加入 50 mL 无菌 PBS 缓冲液,放入超声清洗器超声处理 30 min.取 25 mL 超声清洗液,8 000 r/min 离心 5 min.采用细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒(上海博大泰克生物工程有限公司)按产品说明书提取基因组 DNA.分别记为 BC1 和 BAC1.

另外,再分别取 20 mL 生物陶粒和生物活性炭,各加入 5 mL 无菌 PBS 缓冲液,在旋涡振荡器上剧烈振荡 5 min,然后各取 2 mL 振荡液,分别接种于 R2A 和 LB 固体平板培养基.在 R2A 培养基上 28 °C 培养 3~5 d,在 LB 培养基上 37 °C 培养 1 d 后,用接种针挑取适量菌落接种于 2 mL 液体培养基,相同条件培养,然后 14 000 r/min 离心 1 min,收集菌体,提取基因组 DNA.分别记为:BC2,BC3 和 BAC2,BAC3.

1.3 引物选择及 PCR 扩增

基因扩增引物为:519f: 5'-CAGCAGCCGCGTAATAC-3' 和 926r: 5'-CCGTC AATTCCTTTGAGTTT-3'^[10],分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的 519~536 bp 和 907~926 bp.反向引物 926r 的 5'端采用磷酸化标记.北京赛百胜生物技术有限公司合成并标记.

PCR 采用宝生物工程(大连)有限公司的 *Taq* DNA 聚合酶,50 μ L 反应体系中分别包括 5 μ L 10 \times PCR buffer (plus 250 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺),4 μ L dNTP(各 250 μ mol \cdot L⁻¹),引物各 5 μ L(5 μ mol \cdot L⁻¹),*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L(5 U/ μ L),模板 5 μ L.反应程序为:94

°C 变性 5 min 后,接以 30 个循环,即 94 °C 变性 40 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s.循环完毕后 72 °C 延伸 10 min.取 5 μ L 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,并与 100 bp DNA marker(宝生物大连有限公司)比较确定分子大小.

1.4 PCR 产物的 λ 核酸外切酶处理

λ 核酸外切酶能够很专一地降解双链 DNA 中 5'磷酸标记的链,从而使非标记的单链释放出来^[11].60 μ L 反应体系中包括, λ 核酸外切酶(5 U/ μ L)(New England Biolabs Inc1, USA)4 μ L;10 \times buffer 6 μ L;PCR 产物 50 μ L.37 °C 温浴 4 h,处理完毕后,72 °C 10 min 灭活 λ 核酸外切酶.

1.5 凝胶制备及 SSCP 图谱的获得

SSCP 电泳采用 5% 的聚丙烯酰胺(交联度 29:1, Sigma, USA),30 mL 凝胶中加入 10% 的过硫酸铵(Amresco)250 μ L, Termed(Applied Biosystems, USA)25 μ L,室温凝固 30 min 后,8 mA 恒流,预电泳 60 min. λ 核酸外切酶处理过的样品与等量上样缓冲液(体积分数 95% 的去离子甲酰胺,10 mmol \cdot L⁻¹ NaOH,20 mmol \cdot L⁻¹ EDTA,质量浓度 0.02% 溴酚蓝和 0.02% 二甲苯氰 FF)^[12]混合后,直接上样.4 °C 下,8 mA 恒流,5 h.电泳结束后,剥胶染色,银染按 Bassam^[13]的方法进行.

1.6 条带分离及克隆、测序

特异条带的回收按 Tebbe 等^[12]的方法进行.取回收的 DNA 10 μ L 为模板,以 519 f 和 926 r 为引物,采用同前体系和 PCR 程序分别进行扩增.取 5 μ L 产物进行琼脂糖电泳验证后,对 PCR 产物切胶纯化(纯化试剂盒,上海生工生物公司)后,按产品说明书与 T-载体(pMD-2182T,大连宝生物有限公司)连接、克隆.对转化子的筛选采用蓝白斑及 PCR 的方法.PCR 直接以白斑菌落为模板,采用能与 T-载体插入点两侧特异结合的 M13 通用引物进行检测.每条带选取 2~3 个克隆,同样以 M13 通用引物进行测序(3730, Applied Biosystems).测序由上海生工公司完成.通过 Blast 软件,将测序获得的序列与 GenBank 进行比对.

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 提取

核酸提取是整个 PCR-SSCP 技术的基础,能否获得具有代表性的核酸样品将决定后续分析的可靠性.本研究采用的是酶裂解细胞提取核酸的方法.超声波洗脱后直接提取基因组 DNA,从生物陶粒上可

提取少量 DNA (BC1), 而生物活性炭上却未提取到 (BAC1). 其原因可能是生物活性炭上吸附的有机物和金属离子较多, 经超声波和微生物细胞一起洗脱下来, 从而影响后续的基因组 DNA 提取. 经 R2A 平板培养后能提取较大量的基因组 DNA (BC2 和 BAC2), 其条带较亮. 用 LB 培养基培养后也分别能从生物陶粒和生物活性炭上提取到 DNA (BC3 和 BAC3), 但量相对较少. 所提取到的 DNA 大小均在 10 kb 以上, 无明显降解, 但提取的 DNA 量有较大差异. 如图 1 所示. 比较剧烈的提取方法, 如玻璃珠匀浆, 则容易将基因组 DNA 剪切成过小的片段. 从分析微生物群落结构来讲, DNA 提取质量的评价不能单从量和纯度来衡量, 更重要的是以多样性来衡量, 这样才能最大的反映环境微生物群落结构的本征^[14]. 正因为核酸提取的影响因素复杂, 以后需要根据具体的环境样品对基本提取方法进行修改和优化.



M: λ Hind-III DNA Marker

图 1 基因组 DNA 提取结果

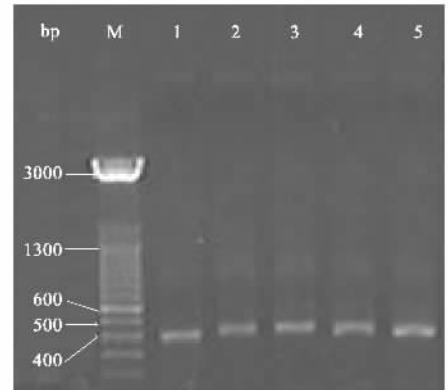
Fig. 1 Genome DNA extracting result

2.2 PCR 结果

PCR 扩增是造成微生物群落真实结构与 SSCP 图谱脱离的重要环节之一, 所以应尽量减少循环次数及采用合适的退火温度, 以降低对部分微生物的无效放大作用. 退火温度决定 PCR 特异性与产量. 温度高特异性强, 但过高则引物不能与模板牢固结合, DNA 扩增效率下降; 温度低产量高, 但过低可造成引物与模板错配, 非特异性产物增加. 在引物的选择方面, Schmalenberger 等^[16]以纯培养为对象, 对扩增 V2~V3、V4~V5 及 V6~V8 区的 3 对引物的特异性进行了研究. 结果表明, 若只分析群落的组成而非对群落中的特异功能群落进行监测, 可选择 V4~V5 区作为靶位点; 可减少 1 条带中包含多个操作分类单元的可能性.

本研究采用 30 个循环和 50 °C 退火, 所选择的引物扩增 16S rDNA V4~V5 区^[16]. 分别以 BC1, BC2,

BC3, BAC2, BAC3 为模板进行 PCR 扩增. 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 证实每一标本都扩增出目的基因, 其 DNA 片段分子量为 408 bp, 如图 2.



泳道 M 为 100 bp DNA 分子标准; 泳道 1~3 以 BC1~3 为模板的 PCR 扩增产物; 泳道 4~5 以 BAC2~3 为模板的 PCR 扩增产物

图 2 PCR 结果

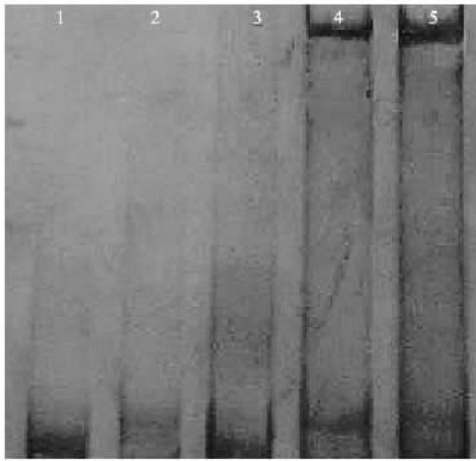
Fig. 2 PCR results

2.3 SSCP 电泳图谱及分析

SSCP 电泳是依据单链 DNA 分子立体构象的不同来实现电泳分离的. 获得单链 DNA 分子的方法有 2 种, 一种是热变性, 另一种是去除反意义链. 热变性是分子生物学研究中经常采用的 DNA 变性手段, 但为了提高变性的效果和均一性, 往往需要添加化学变性剂. 甲酰胺是常用的变性剂, 既能降低双链 DNA 熔链温度 (T_m), 同时能提高完全变性的频率^[16]. 高浓度甲酰胺 (95%) 可使双链 DNA 熔链温度下降 60 °C. 变性不彻底或变性后的 DNA 未及时骤冷, 将导致单链 DNA 复性成双链 DNA. 因此, 可在热变性前向样品中加入变性剂, 以确保 DNA 链的完全解离与伸展. 1 个 DNA 样品经热变性处理后, 在 SSCP 图谱上往往显示为 3 条带, 其中 2 条为 DNA 解开的 2 条单链, 另 1 条为未解开的 DNA 双链. 这种图谱被称为异源双链 SSCP 图谱. 异源双链 SSCP 图谱往往条带较多, 且往往出现 1 个 DNA 片段显示几条带和 1 条带里包含几个 DNA 片段的现象. 给后续的分析带来巨大的麻烦. 而将双链 DNA 的反意义链去除使之变为单链 DNA, 不仅可以提高 SSCP 的灵敏度, 还可以提高 SSCP 分析长片段 DNA 的能力.

反意义链的去除有 2 种方法, 一种方法是用 λ 核酸外切酶将 5' 磷酸标记的反意义链水解掉^[8]; 另一种方法是通过链霉亲和素将生物素标记的反意义链钓取出去^[17,18].

本研究得到的 SSCP 图谱如图 3 所示. 以 BC1,



泳道 1~3 以 BC1~3 为模板的 PCR 扩增产物经 λ -核酸外切酶处理后的样品;泳道 4~5 以 BAC2~3 为模板的 PCR 扩增产物经 λ -核酸外切酶处理后的样品

图 3 生物陶粒和生物活性炭上微生物群落 SSCP 图谱

Fig.3 SSCP profiles of microbial community on BC and BAC

BC2, BC3 为模板的 PCR 产物经 λ 核酸外切酶消化后,电泳均只出现 1 条带;扩增自 BAC1 和 BAC2 的 PCR 产物经相同处理后,电泳出现 2 条带.将 SSCP 电泳分离得到的条带切胶回收,再次 PCR,转入 T-载体后测序.测序结果提交基因组数据库进行 blast 对比.结果显示生物陶粒上的微生物 DNA 扩增片段与 uncultrued *Pseudomonas* sp. Clone FTL201 16S rDNA (GenBank 登录号 AF509293.1) 片段的同源性为 92%;生物活性炭上的 2 个微生物扩增片段与 *Bacillus* sp. JH19 16S rDNA (GenBank 登录号 DQ232748.1) 片段和 *Bacterium* VA-S-11 16S rDNA (GenBank 登录号 AY395279.1) 片段的同源性分别为 100% 和 99%.采用 Phylip 3.65 软件 NJ(邻位相连)法对扩增分离到的 3 个片段及其相近序列构建系统进化树,结果如图 4.假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 和芽胞杆菌 *Bacillus* sp. 对环境中有毒物质的降解作用已有较多文献报道^[19~21].本研究的试验结果为生物陶粒和生物活性炭在饮用水处理中所起的作用提供了一个佐证,但其具体的降解途径及机理还需进一步研究,以利于采用基因工程的手段改造菌株用于饮用水处理.

总之,SSCP 技术在微生物群落组成结构及动态分析中的应用正越来越受到研究者的重视.但 SSCP 图谱与群落实际结构符合程度有待提高,这主要是由基因组 DNA 提取方法和 PCR 选择性放大造成的偏差.类似的现象在变性梯度凝胶电泳分析中也出现过^[22].所以用现代分子生物学技术结合传统的培

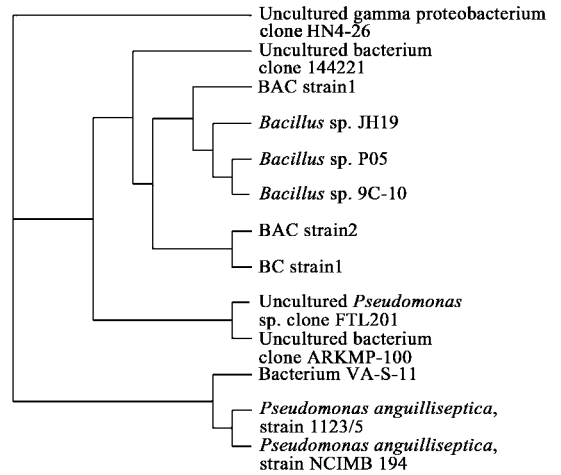


图 4 PCR-SSCP 分离得到的 3 个片段与相近序列 NJ 法构建的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the 3 segments from PCR-SSCP and similar sequences in GenBank constructed by neighbor-joining method

养纯化法在分析复杂的微生物群落结构时可能结果更为准确.在本文的后续研究中,将选择其他引物,以期使试验结果能尽量真实地反映样品中微生物群落结构的本征.

3 结论

(1) 生物陶粒和生物活性炭上的微生物分别经超声波清洗、R2A 和 LB 平板培养后提取核酸.除超声波清洗生物活性炭不能提取到基因组 DNA 外,其余处理均能获得大小 10 kb 的核酸.本研究提取基因组 DNA 采用的是温和的溶菌酶裂解细胞的方法.可能由于核酸提取不完全,低估了样品的微生物多样性.

(2) 引物对 PCR-SSCP 技术的实验结果影响较大.本文参考前人的研究成果选择针对 16S rRNA 基因 V4~V5 区域的引物对,原本预计减少在 SSCP 图谱中出现 1 条带中包含多个可操作分类单元的现象,却可能在一定程度上影响了样品中微生物多样性的表现.

(3) SSCP 电泳图谱及 DNA 测序表明:生物陶粒上的 1 种微生物最可能是 uncultrued *Pseudomonas* sp. clone FTL201;生物活性炭上的 2 种微生物最可能是 *Bacillus* sp. JH19 和 *Bacterium* VA-S-11.

参考文献:

- [1] Hu J Y, Wang Z S, NG W J, et al. The effect of water treatment processes on the biological stability of potable water [J]. Water Research, 1999, 33(11): 2587 ~ 2592.

- [2] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1989, **86**(8): 2766 ~ 2770.
- [3] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction [J]. Genomics, 1989, **5**(4): 874 ~ 879.
- [4] Schmalenberger A, Tebbe C C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies [J]. Molecular Ecology, 2003, **12**: 251 ~ 262.
- [5] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**: 3112 ~ 3120.
- [6] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small subunit rRNA genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**: 930 ~ 936.
- [7] Brettar I, Labrenz M, Flavier S, *et al.* Identification of a *thiomicrospira denitrificans*-like epsilonproteobacterium as a catalyst for autotrophic denitrification in the central Baltic sea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**: 1364 ~ 1372.
- [8] Eichler S, Christen R, Höltje C, *et al.* Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16s rRNA gene fingerprinting [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**: 1858 ~ 1872.
- [9] Valentin K, Mehl H, Medlin L. Picoplankton culture assessment using single strand conformation polymorphism and partial 18S sequencing [J]. Journal of Plankton Research, 2005, **27**(11): 1149 ~ 1154.
- [10] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**: 4870 ~ 4876.
- [11] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, *et al.* The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease [J]. Nucleic Acids Research, 2003, **31**: 1585 ~ 1596.
- [12] Tebbe C C, Schmalenberger A, Peters S, *et al.* Single-strand-conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications [M]. U K Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001. 161 ~ 175.
- [13] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1991, **196**: 80 ~ 83.
- [14] Stach J E M, Bathe S, Clapp J P, *et al.* PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, **36**: 139 ~ 151.
- [15] Bonner G, Klibanov A M. Structural stability of DNA in nonaqueous solvents [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, **68**(3): 339 ~ 344.
- [16] Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe C C. Effect of primers hybridizing to evolutionarily conserved regions or the small subunits rRNA gene in PCR-based microbial community analysis and genetic profiling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**: 3557 ~ 3563.
- [17] Scheinert P, Krause R, U Ullmann U, *et al.* Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer [J]. Journal of Microbiological Methods, 1996, **26**: 103 ~ 117.
- [18] Binder T, Berg T, Siegert W, *et al.* PCR-SSCP: Nonradioisotopic detection with biotinylated primers and strep avidin alkaline phosphatase conjugate [J]. Biotechniques, 1995, **18**(5): 780 ~ 781.
- [19] 仪美芹, 王开运, 姜兴印, 等. 微生物降解农药的研究进展 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, **33**(4): 519 ~ 524.
- [20] Mandelbaum R T, Allan D L, Wackett L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**(2): 1451 ~ 1457.
- [21] Chaudhry G R, Ali A N, Wheeler W B. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**: 288 ~ 293.
- [22] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, *et al.* A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis [J]. Biotechnology Letters, 2001, **23**(15): 1205 ~ 1208.