

毕 玮,李 祥,刘恒蔚,等. 厌氧氨氧化功能微生物 PCR-DGGE 分析方法优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):110-112.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.026

厌氧氨氧化功能微生物 PCR-DGGE 分析方法优化

毕 玮¹, 李 祥², 刘恒蔚¹, 黄 勇², 袁 怡², 刘 忻²

(1. 苏州科技学院化学生物与材料工程学院, 江苏苏州 215009; 2. 苏州科技学院环境科学与工程学院, 江苏苏州 215009)

摘要:基于厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)开发的相关工艺在污水脱氮处理中具有重要作用;但 Anammox 微生物是一类目前尚不能分离和纯培养的微生物,分析其功能微生物的类型,对于研究其生物学机理并改良其工艺具有重要意义。本研究对变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)在 Anammox 微生物应用中的分析条件进行了优化,以提高 PCR-DGGE 的分析效果。结果表明,采用针对 16S rDNA V3 区的 GC-F341/R518 引物组合,PCR 最佳退火温度为 64 ℃;DGGE 电泳中,最佳上样量为 5~7 μL,最佳胶浓度为 8%,最佳电压/时间为 80 V/16 h。优化后的 PCR-DGGE 具有准确性高和灵敏度好的特点。

关键词:厌氧氨氧化;PCR-DGGE;微生物类型;条件优化

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0110-03

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)是指厌氧氨氧化细菌在厌氧条件下以羟胺和胍为中间产物,以 NH_4^+ 为电子供体、 NO_2^- 为电子受体,将 NH_4^+ 和 NO_2^- 转变为 N_2 的过程^[1]。该反应颠覆了人们对自然界氮素循环的传统认识。此前普遍认为通过异养反硝化即硝酸盐还原生成 N_2 ,是地表氮素生成 N_2 的唯一自然途径,而目前却发现 Anammox 反应的广泛存在。据估计由 AAOB 完成了海洋生态系统氮转化的 30%~50%^[2]。Anammox 过程在地表氮素循环,包括农业水体氮素循环中起着重要作用。基于 Anammox 过程研究者开发了多种污水处理工艺^[3-6]。与传统的硝化-反硝化工艺相比,优点在于不需要额外电子供体,同时也可使剩余污泥产量降至最低,从而节省大量污泥处置费用。厌氧氨氧化细菌(即 Anammox 菌)是一类不可培养的微生物类型,难以使用传统手段进行研究。目前共发现了包括 *Candidatus Kuenen stuttgartiensis*、*Candidatus Brocadia anammoxidans*、*Candidatus Anammoxoglobus sulfate* 在内的 5 个属 12 个种之多,而且不同的研究得到的优势种群不同^[7]。分析其功能微生物的类型,对于研究其生物学机理并改良其工艺具有重要意义。

PCR 结合变性梯度凝胶电泳(deaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术不但克服了传统的微生物培养方法的局限性,而且可以对微生物种群进行定性和定量,以及预测微生物种群的系统发育关系,成为研究环境微生物多样性的常用手段之一。其主要原理是序列不同的 DNA 双链解链所需的变性剂(尿素和甲酰胺)浓度也不同,在含梯度变性剂的凝胶电泳中,不同的 DNA 序列在不同的浓度处发生解链,导致空间构型改变,电泳速率急剧下降,从而停留在不同的位置,形

成条带分开的指纹图谱。为了提高 DGGE 的分辨率,可在引物的一端加上 1 个含 30~50 个碱基的“GC 夹板”(GC clamp)^[8]。理论上, DGGE 可以检测出只有 1 个碱基差异的 DNA 序列。但是 DGGE 效果受多种因素影响,特别是对于不同的引物和不同的样品,PCR-DGGE 分析的参数差别很大。例如使用不同引物在对厌氧污泥样本 PCR-DGGE 分析中^[5-6,9-15],聚丙烯酰胺凝胶浓度从 5%~10%、电泳电压从 75~200 V 均有使用。DGGE 的分辨率直接影响结果的准确性和可靠性,而分辨率又会受到电泳中的变性剂梯度范围、时间、电压以及上样量等因素影响;因此针对具体的样品类型和引物,需对 DGGE 试验各个关键参数进行优化,才能达到预期的效果。16S rDNA 是细菌系统分类研究中最常用的分子指纹,分子大小适中,在结构与功能上具有高度的保守性。基于 16S rDNA 的 V3 区是微生物种群分析最常采用的目标序列之一,在分子生态研究中有广泛的应用。

本研究基于 Anammox 微生物 16S rDNA 的 V3 区的 GC-F341/R518 引物组合,对 PCR 的退火温度和 DGGE 的时间/电压、胶的浓度以及上样量进行了优化,该结果对于 Anammox 反应相关微生物的分析具有参考意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 样品来自苏州科技学院环境生物技术研究所以亚硝酸盐型 Anammox 污泥。

1.1.2 主要仪器与试剂 DNA 快速提取试剂盒购自 MPBIO 公司;NanoDrop2000 仪;ExTaq 酶购自 TaKaRa 公司;DGGE 电泳仪(AD0412LS-C50)、DGGE 电泳槽(DCode 型)、凝胶成像系统(Gel Doc™ XR⁺)购自美国伯乐公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取与 PCR-DGGE 分析 污泥取样后立即使用液氮研磨成干粉, -80 ℃ 保存备用。使用 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA,提取的 DNA 经 1% 琼脂糖电泳检测和 Nan-

收稿日期:2015-09-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:51478284);国家自然科学基金青年科学基金(编号:51408387)。

作者简介:毕 玮(1990—),男,硕士研究生,主要从事环境生物催化机理研究。E-mail:1012296010@qq.com。

通信作者:刘恒蔚,博士,副教授。E-mail:liuhw@mail.usts.edu.cn。

oDrop2000 仪定量并检测质量后使用。使用针对细菌 16S rRNA 基因 V3 可变区通用引物进行 PCR, 引物序列为: CGC-CCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTA CGGGAGGCAGCAG (即 GC - F341); ATTACCGCGGCTGCTGG (即 R518)。

PCR 扩增体系总体积为 30 μ L, 包括 15 ng 模板 DNA, ExTaq 酶 1.5 U, 10 μ mol/L 引物各 1.5 μ L, dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L) 3 μ L, ExTaq 酶 buffer 3 μ L, ddH₂O 补足至 30 μ L。PCR 扩增采用 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 根据设置的温度退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 共 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖电泳检测后, 按不同上样量均加入 15 μ L 上样缓冲液, 并使用 ddH₂O 补足至 25 μ L, 利用 DGGE 电泳仪和 DGGE 电泳槽在变性梯度为 45% ~ 65% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳 (100% 的变性剂浓度为体积分数 40% 甲酰胺和 7 mol/L 尿素)。参考乐晓萍等的银染方法^[16]进行染色。银染时凝胶在固定液 (含体积分数 10% 乙醇和 0.5% 的乙酸) 轻摇固定 10 min, 超纯水漂洗 1 min 后放入染色液 (含体积分数 2% 硝酸银) 中染色 15 min, 超纯水快速冲洗 2 次后放入显影液 (含体积分数 1.5% 氢氧化钠、体积分数 0.2% 甲醛) 中至显影清晰, 用超纯水冲去残余的显影液。银染结果通过凝胶成像系统照相分析。

1.2.2 PCR - DGGE 优化 (1) PCR 退火温度的优化: 退火温度从 61 ~ 66 $^{\circ}$ C 之间设置 6 个梯度, 梯度为 1 $^{\circ}$ C, PCR 产物通过 2.0% 琼脂糖电泳, 选择最合适的退火温度用于 PCR - DGGE 分析以及后续优化过程。(2) 电泳时间和电压的优化: 制备 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 设置 60、80、100、120 V 共 4 个电压梯度; 每隔 2 h 上样 1 次, 共上样 5 次, 即各设置 5 个时间梯度; 上样量为 4.0 μ L。在 60 $^{\circ}$ C 条件下对不同电压下分别进行不同时间进程的电泳试验, 以确定最佳的电压/时间组合。(3) 电泳上样量的优化: 配制总体积相同、但 PCR 扩增产物不同的上样体系, 上样量 (PCR 扩增产物) 为 1 ~ 10 μ L, 梯度 1 μ L。使用最适变性剂梯度和已确定的最佳电压/时间条件, 在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。(4) 凝胶浓度优化: 使用上述已确定的上样量、最佳电泳时间和电压组合, 分别配制浓度为 6%、8% 和 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, 根据电泳效果来确定最适合的胶浓度。

2 结果与分析

2.1 土壤基因组 DNA 的提取

提取的 Anammox 样品 DNA 经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果 (图 1) 表明, DNA 样品质量较好, 适合进行 PCR - DGGE 分析。

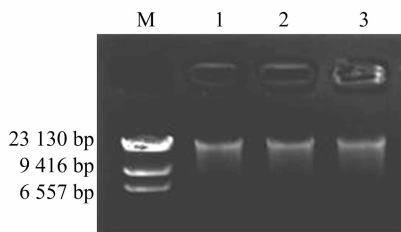


图1 Anammox 样品 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 PCR 扩增的退火温度优化

图 2 是 61 ~ 66 $^{\circ}$ C 不同退火温度下的 PCR 电泳结果。图 2 表明, 退火温度为 64 $^{\circ}$ C 时, 扩增效率高, 效果最好, 是本研究的最佳退火温度。电泳结果显示 PCR 产物大小与预计结果 (230 bp) 基本一致。

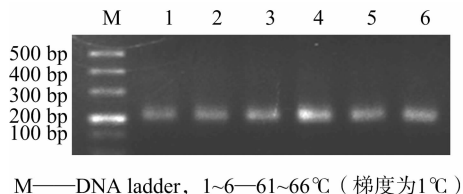


图2 不同退火温度 PCR 扩增结果

2.3 电泳时间和电压的优化

本试验在预试中使用了 200 V 电压进行 DGGE 电泳, 结果发现, 该电压下条带有弥散严重, 分离效果较差, 因此选择在低电压区进行优化。通过比较 120 V (图 3 - A)、100 V (图 3 - B)、80 V (图 3 - C) 和 60 V (图 3 - D) 的电泳结果说明, 电压高低对条带的分离效果影响较为明显, 随着电压降低, 弥散减弱, 且条带数增加, 条带更为清晰锐利。在 80 V (图 3 - C) 和 60 V (图 3 - D) 之间差异不大, 均能得到数目较多且清晰锐利的条带。随着电泳时间延长, 条带分离更加明显, 易于区分, 在 80 V 电压时, 多数条带在 16 h 时分离效果最好, 延长电泳时间变化不明显, 与 60 V 的电压时 18 h 的电泳效果基本一致。鉴于此, 选择 80 V/16 h 作为最佳的电压/时间组合。

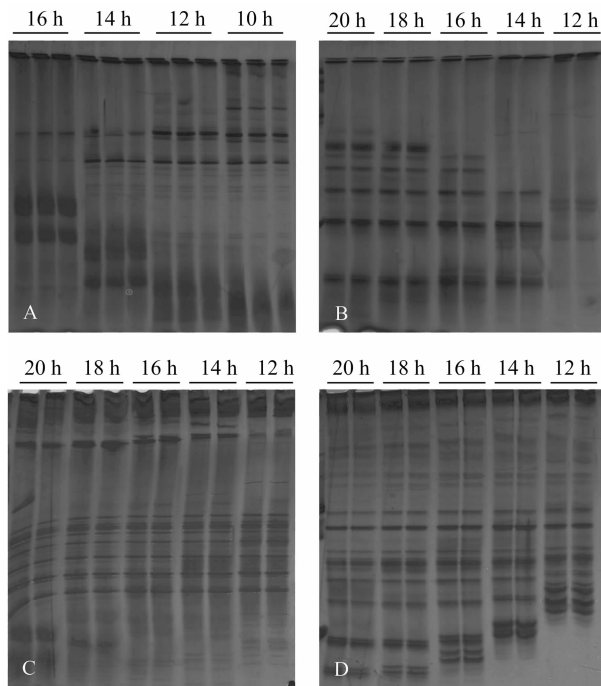
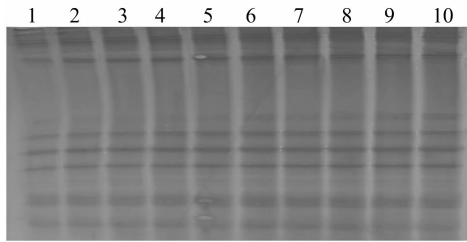


图3 不同电压对 PCR-DGGE 电泳效果的影响

2.4 电泳上样量的优化

从图 4 可以看出上样量对 DGGE 图谱也有着重要的影响。上样量过少, 部分条带不清晰, 染色后可见的条带数偏少; 上样量过多, 则图谱的背景过重, 不利于后续的分析。考

考虑到二者的平衡,在 Anammox 微生物的 PCR - DGGE 分析中选择 5 ~ 7 μL 的上样量效果最好。

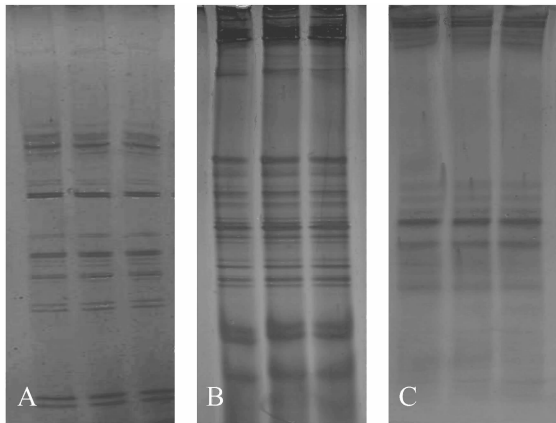


1~10 分别为 1~10 μL , 梯度为 1 μL

图4 不同上样量对 PCR-DGGE 效果的影响

2.5 凝胶浓度优化

本试验通过 3 种不同浓度的凝胶 [分别是 6% (图 5 - A)、8% (图 5 - B)、10% (图 5 - C)] 来判断最佳的凝胶浓度。从图 5 的 3 个浓度对比可以看出,8% 凝胶的分离度最好,条带清晰锐利,为最佳凝胶浓度选择。



A、B 和 C 分别为 6%、8% 和 10% 胶浓度,各 3 个泳道 (3 次重复)

图5 不同凝胶浓度对 PCR-DGGE 效果的影响

3 讨论

DGGE 技术被广泛用于分析环境样本微生物群落的生物多样性,适合调查种群的时空变化,并可以通过对目的条带进行序列分析来鉴定群落组成。理想的 PCR 引物和 DGGE 分析条件应适合探测更多的微生物类型。例如王宁等对厌氧颗粒污泥 PCR - DGGE 分析进行优化,发现古菌和细菌在 80 V/10 h 的电泳条件下均能得到分离效果较好的 DGGE 图谱^[17]。而本研究结果说明对于 Anammox 活性污泥,采用 GC - F341/R518 通用引物,PCR 最佳退火温度为 64 $^{\circ}\text{C}$;变性剂浓度为 45% ~ 65% 的聚丙烯酰胺凝胶中进行 DGGE 电泳的最佳上样量为 5 ~ 7 μL ,胶浓度为 8%,最佳电压/时间为 80 V/16 h。由于本研究采用针对 16S rDNA 的 V3 区的特异引物,对于环境样本的不同微生物种类将具有更广泛的适用性。

PCR 和电泳是 PCR - DGGE 分析的 2 个最关键环节,本试验研究表明适当提高退火温度有利于减少非特异性扩增,上样量的多少与胶浓度的大小也对 DGGE 的分辨率有重要影响。此外,与一般的 PCR 对模板 DNA 要求低不同,本研究中还发现 DNA 质量对 PCR 影响较大,且 PCR 扩增质量显著影响 DGGE 的分辨率。

参考文献:

- [1] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. *Nature*, 1999, 400 (6743): 446 - 449.
- [2] Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, et al. N_2 production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica [J]. *Nature*, 2003, 422 (6932): 606 - 608.
- [3] Van Dongen U, Jetten M S, van Loosdrecht M C. The SHARON - Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater [J]. *Water Science and Technology*, 2001, 44 (1): 153 - 160.
- [4] Despland L M, Clark M W, Vancov T, et al. Nutrient removal and microbial communities' development in a young unplanted constructed wetland using BauxsolTM pellets to treat wastewater [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 484: 167 - 175.
- [5] Liang Y, Li D, Zhang X, et al. Stability and nitrite - oxidizing bacteria community structure in different high - rate CANON reactors [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 189 - 194.
- [6] Zhong Y M, Jia X S. Simultaneous ANAMMOX and denitrification (SAD) process in batch tests [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29 (1): 51 - 61.
- [7] Ding S, Zheng P, Lu H, et al. Ecological characteristics of anaerobic ammonia oxidizing bacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (5): 1841 - 1849.
- [8] Strathdee F, Free A. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): methods and protocols [M] // Makovet S. *DNA Electrophoresis*. New York: Humana Press, 2013: 145 - 157.
- [9] Vipindas P V, Anas A, Jasmin C, et al. Bacterial domination over Archaea in ammonia oxidation in a monsoon - driven tropical estuary [J]. *Microb Ecol*, 2015, 69 (3): 544 - 553.
- [10] Kawagoshi Y, Fujisaki K, Tomoshige Y, et al. Temperature effect on nitrogen removal performance and bacterial community in culture of marine anammox bacteria derived from sea - based waste disposal site [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113 (4): 515 - 520.
- [11] Sonthiphand P, Neufeld J D. Evaluating primers for profiling anaerobic ammonia oxidizing bacteria within freshwater environments [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e57242.
- [12] Zekker I, Rikmann E, Tenno T, et al. Anammox enrichment from reject water on blank biofilm carriers and carriers containing nitrifying biomass: operation of two moving bed biofilm reactors (MBBR) [J]. *Biodegradation*, 2012, 23 (4): 547 - 560.
- [13] Xiao Y, Zeng G M, Yang Z H, et al. Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR - DGGE [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (2): 496 - 505.
- [14] Gabarró J, Ganigué R, Gich F, et al. Effect of temperature on AOB activity of a partial nitrification SBR treating landfill leachate with extremely high nitrogen concentration [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 126: 283 - 289.
- [15] 于洁. 可降解纤维素的微生物菌群筛选及其性质初探 [D]. 天津: 天津理工大学, 2010.
- [16] 乐晓萍, 杜鹏, 张钦宪, 等. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术改良 [J]. *河南医科大学学报*, 2001, 36 (4): 395 - 396.
- [17] 王宁, 刘永红, 李佳凤, 等. 厌氧颗粒污泥 PCR - DGGE 图谱的优化研究 [J]. *中国沼气*, 2014 (3): 8 - 13.