

超声波破碎法提取活性污泥 DNA 及其 DGGE 分析

万晶晶, 张汝嘉, 邢德峰, 谢天卉, 赵丽华, 任南琪

(哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, E-mail: wjj_1984_1999@126.com)

摘 要: 为快速提取活性污泥中的微生物 DNA, 进一步应用于变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术分析其群落结构, 采用细胞超声波破碎法直接提取反应器活性污泥 DNA, 以 16S rRNA V3 区域通用引物进行 PCR 扩增, 随后利用 DGGE 技术对扩增产物的多样性进行评估。结果表明, 超声波破碎法可以快速地提取活性污泥 DNA, 用超声波破碎法提取到的活性污泥克服了 PCR 扩增困难的问题。在一定的超声波功率下, 超声时间对 DNA 产率、PCR 扩增效率和 DGGE 分析均有很大影响, 实验的最佳超声时间为 27 s。DGGE 分析表明, 用该法提取到的 DNA 种类较为丰富, 多样性较好, 种群强度最高能达到 0.7 OD, 能够进一步应用于群落结构分析。

关键词: 超声波破碎法; 活性污泥; DNA 提取; PCR; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0367-6234(2008)04-0559-04

DNA extraction of activated sludge by ultrasonic fragmentation for DGGE analyses

WAN Jing-jing, ZHANG Ru-jia, XING De-feng, XIE Tian-hui, ZHAO Li-hua, REN Nan-qi

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, E-mail: wjj_1984_1999@126.com)

Abstract: In order to quickly extract the microbial DNA from the activated sludge and apply it subsequently in community analyses by using denature gradient gel electrophoresis (DGGE) technology, DNA of the activated sludge from reactors was directly extracted by ultrasonic fragmentation, and 16S rRNA genes were amplified with a pair of universal primers of the 16S rRNA V3 region by polymerase chain reaction (PCR). The diversity of the amplification products was evaluated by DGGE. The results indicate that ultrasonic fragmentation can extract DNA from activated sludge quickly and the sludge extracted by ultrasonic fragmentation overcomes the difficulty of PCR amplification. Ultrasonic time has obvious influence on DNA yield, PCR amplification efficiency and DGGE profiles under constant power and the best time is 27 seconds. DGGE analysis indicates that the DNA from the activated sludge has high population diversity with the highest intensity of 0.7 OD, and has further application in the community analyses.

Key words: ultrasonic fragmentation; activated sludge; DNA extraction; PCR; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术是目前微生物群落结构和动态监测最为有效的工具之一^[1]。在利用 DGGE 分析污泥微生物群落结构时, 需要对其所有环节进行优化。其中, 能否准确有效地提

取出污泥的 DNA 已经成为影响后续实验能否成功的关键制约因素之一。目前, 提取 DNA 多采用液氮冻融法^[2]、酶法^[3]和玻璃研磨法^[4]等。这些方法很难提取活性污泥 DNA, 重现性较差。而且活性污泥 DNA 的提取过程中经常造成 DNA 的损失, 导致后续分析多样性降低。此外, 由于活性污泥成分复杂, 含有大量化学成分, 经常导致提取的污泥 DNA 很难被 PCR 扩增^[5,6]。因此, 研究一种

收稿日期: 2006-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470054)。

作者简介: 万晶晶 (1984—), 男, 硕士研究生;

任南琪 (1959—), 男, 教授, 博士生导师, 长江学者特聘教授。

有效的污泥 DNA 提取的方法有着重要的意义. 基于超声波破碎细胞提取微生物 DNA 具有操作简单、价格便宜的优点. 薛俊龙等^[7]发现超声波法能较好地提取大肠杆菌 DNA. 针对提取的活性污泥 DNA 很难被扩增的问题, 利用超声波提取其 DNA, 并对其进行 PCR 扩增检验, 然后对扩增产物进行 DGGE 分析, 证实超声波破碎法可以很好地提取活性污泥 DNA.

1 材料与方法

1.1 活性污泥样品

取至生物制氢连续流搅拌槽式反应器.

1.2 活性污泥 DNA 的提取

1) 样品的清洗: 取 1~2 mL 活性污泥加入 5 mL 离心管中, 用无菌纯水混匀振荡污泥, 8000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 如此反复 3 次, 样品均调整到湿重 0.2 g

2) 超声: 污泥中加入 200 μL 的 TE 液 (250 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0)、50 mmol/L EDTA、20%蔗糖溶液) 后混匀, 静置 1 min 后, 用超声仪 (VCX130PB, Sonic) 破碎细胞. 为了分析超声时间对 DNA 提取的影响, 在超声功率为 50 Hz 的条件下, 分别设置超声时间为 9 s, 18 s, 27 s, 36 s, 45 s; 全部超声在冰浴上进行. 超声后样品在 4 $\times$ 12000 r/min 离心 3 min, 吸取上清液至另一 1.5 mL 离心管中.

3) 醇沉: 加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉 2 h 12000 r/min 离心 5 min, 然后吸掉上清液. 加入 60 μL 的 TE 液, 然后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中保存.

1.3 DNA 质量浓度和纯度的测定

用紫外分光光度仪 (Beckman DU800) 测定 DNA 粗提液的浓度. 将 2 μL DNA 提取液用 TE 液稀释至 100 μL , 重复 5 次取其平均值. 根据公式: $[\text{dDNA}] = 50 \times \text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数}$, 计算 DNA 的质量浓度 (单位为 $\mu\text{g/mL}$), 换算出每克湿泥提取 DNA 的量. 可以通过测定 260 nm/230 nm (DNA 腐植酸 + RNA) 和 260 nm/280 nm (DNA/蛋白质) 的比值来检测 DNA 的纯度.

1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

用 16S rRNA 基因 V3 区域通用引物对提取的 DNA 样品进行扩增. 上游引物为 5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 下游引物为 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'; 扩增片段长度为 200 bp 的片段. 25 μL 的 PCR 反应体系组成如下: 10 ng 模板、0.5 μL 正反向引物、2 μL dNTPs (每

种 10 mmol/L)、2.25 μL 的 10 $\times$ PCR buffer (MgCl_2)、0.125 μL 的 *r*-Taq 聚合酶 (TaKaRa), 用无菌纯水补齐到 25 μL . PCR 反应条件: 采用梯度 PCR 优化策略扩增, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 30 min. PCR 反应的产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5 DGGE 分析

采用 DcodeTM 的基因突变检测系统 (Bio-Rad), 制备 6% 到 12% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 30% 到 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物), 取 PCR 样品 5 μL 和 10 $\times$ 加样缓冲液混合后加入上样孔. 在 200 V 的电压下, 60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 4 h. 电泳结束后, 将凝胶进行银染. 将染色后的凝胶用 Powerbook1000 (UMAX) 透射扫描仪进行扫描, 获取胶图. 然后利用 Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics) 软件分析 DGGE 的指纹图谱.

2 结果与讨论

2.1 DNA 含量分析

活性污泥在超声破胞后释放出大分子物质, 通过醇沉进一步浓缩核酸. 由于没有经过纯化步骤, 从 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 值和 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值中可以看出, 提取到的 DNA 粗提液纯度较低, 含有大量的腐殖质、RNA 和蛋白质 (表 1). 不同超声时间获得的 DNA 纯度差异较小, 但每克湿泥提取到的 DNA 量差异较大. 超声 27 s 时提取的 DNA 量最大为 105.29 $\mu\text{g/g}$, 超声时间大于和小于 27 s 时, 提取的 DNA 量均降低. 由此可见, 用该超声法可以有效地提取污泥 DNA, 但在一定的功率下 (本试验采用 50 Hz), 超声时间对提取效率有很大影响. 但是, 活性污泥中发酵细菌含有大量的内含物杂质, 在细菌破胞时与核酸物质一同释放, 因此,

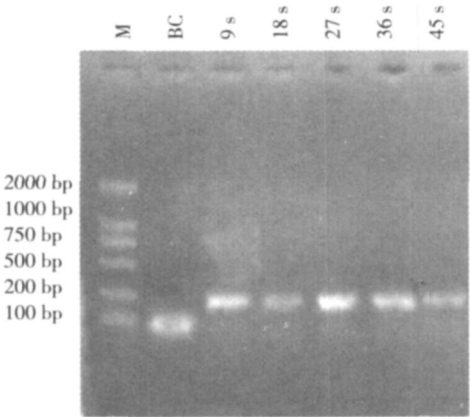
表 1 不同超声时间提取 DNA 的含量测定

项目	超声时间 / s				
	9	18	27	36	45
OD_{230}	0.22	0.25	0.32	0.21	0.01
OD_{260}	0.09	0.10	0.14	0.101	0.11
OD_{280}	0.09	0.10	0.14	0.10	0.10
$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$	0.43	0.41	0.44	0.49	0.50
$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$	1.00	0.99	1.02	1.02	1.04
$\rho(\text{DNA})(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	233.25	256.00	350.95	252.50	262.50
DNA 量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	69.98	76.80	105.29	75.75	78.75

单纯用超声波法提取 DNA 纯度一定会减低,可根据具体情况进行进一步纯化.

2.2 提取 DNA 的 PCR 扩增

为了检验提取 DNA 能否通过 PCR 扩增获得目的基因.以等量的污泥 DNA 作为模板,用 16S rRNA 基因 V3 区域通用引物对提取的 DNA 样品进行扩增. PCR 反应的产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果如图 1 所示.从图中可看出扩增条带特异性较好,超声破碎细胞提取 DNA 可以通过 PCR 扩增获得目的基因片段,并用于后续实验.可见,DNA 粗提液中即使含有一些杂质,也没有对 PCR 扩增产生干扰.而通常利用其他方法提取 DNA 后,进行粗提液的纯化,也无法获得 PCR 扩增产物,这可能是由于在超声过程中使其中蛋白质发生变性,从而并没有对 PCR 过程产生影响.对扩增 PCR 条带的亮度进行对比,发现超声 27 s 的样品信号最强,而超声 45 s 的条带最弱.可见,超声时间对细菌 DNA 的多样性和扩增效率均有一定的影响.



M: DL2000 相对分子质量标准; BC: 空白对照

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

2.3 用 DGGE 对提取 DNA 多样性的分析

对微生物群落进行准确分析在很大程度上依赖于提取 DNA 的质量、产量和多样性,因此判断一种提取 DNA 方法是否有效,就要看这种方法提取的 DNA 是否能充分反映活性污泥中的种群多样性,是否有利于后续的实验.为分析不同超声时间对提取活性污泥 DNA 多样性的影响,采用 DGGE 技术对 PCR 产物进行了多样性的分析. DGGE 指纹图谱的条带越丰富说明群落多样性越大,条带信号越强,表示该种 DNA 的细菌数量越多^[8].因此,可以根据指纹信息确定活性污泥中所含有的微生物的数量关系,得出微生物多样性的信息.

DGGE 图谱显示 PCR 产物得到了很好的分离,利用超声波破碎法提取的 DNA 可以应用于群落分析(图 2). 5 个样品呈现了相似的图谱,但是还是存在一些低丰度的差异.图 2“ $\triangleright$ ”和“ $\triangleleft$ ”标记的条带为 27 s 样品与其他样品的一些差异条带.超声时间为 27 s 所得的样品的条带数量和信号明显优于其他的超声时间所得的样品条带.这种现象可能是由于超声时间太短会导致细胞破碎不充分,污泥中一些数量较少的稀有细菌没有释放出核酸物质,而超声时间太长则对提取的 DNA 也有一定的破坏作用,导致无法获得完整的 PCR 扩增片段.利用 Gel - Pro Analyze 对图谱进行分析,发现条带最多的第 3 泳道条带达到 27 条,条带最少的第 1 泳道条带也有 19 条之多(图 2). 超声时间为 27 s 的样品中种群强度最高能达到 0.7 OD(见图 3). 这说明不同超声时间提取的 DNA 反映的种群多样性有明显的差异.如果一些功能菌群在群落中是处于低丰度水平,必须对 DNA 的提取进行优化.所以,在利用超声波破碎法提取污泥 DNA 后进行 DGGE 群落分析时,必须根据样品种类和样品量对超声条件进行优化,以期获得理想的效果.

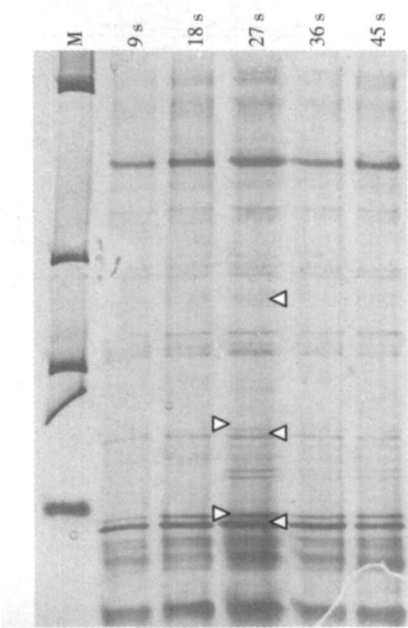


图 2 污泥样品的 DGGE 分离图谱

3 结 论

1) 超声波破碎法提取活性污泥 DNA 操作简单、价格低廉,而且克服了 PCR 扩增困难的问题.利用 DGGE 分析表明用该法提取到的 DNA 种类较为丰富,多样性较好,有利于后续的活性污泥种

群结构分析.

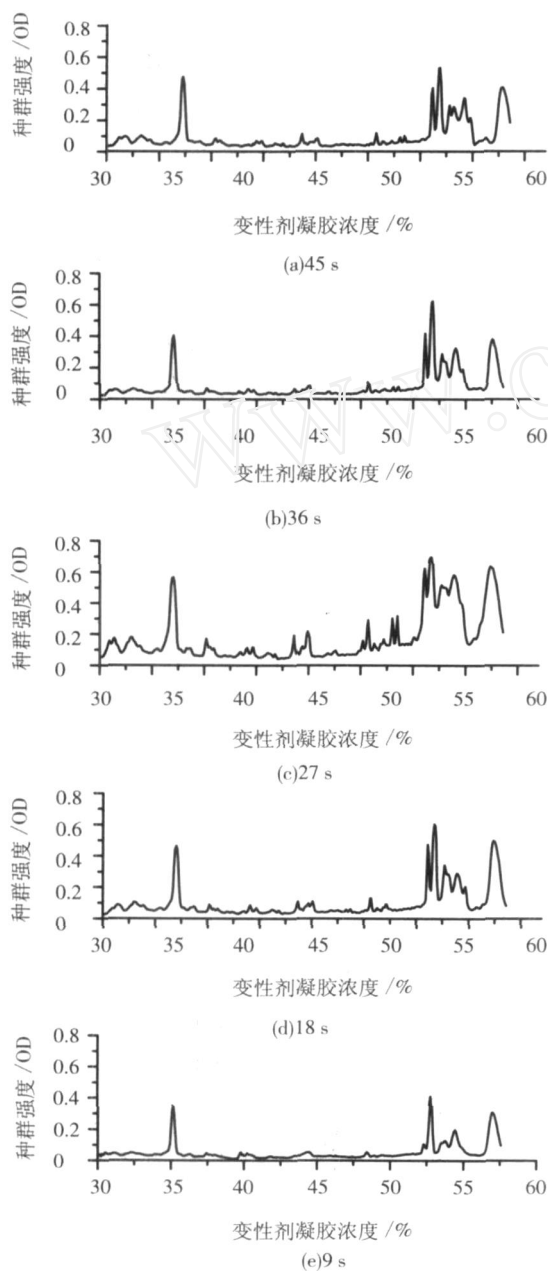


图 3 不同超声时间 DGGE分离效果

2)不同的超声时间也对 DNA 产率、PCR 扩增效率和群落多样性分析有显著影响. 对于不同的污泥样品, 需要根据实际情况对超声条件进行优化.

参考文献:

- [1] XNG D, REN N, GONG M, *et al* Succession of bacterial community structure in biohydrogen producing reactors monitored using denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Sci in China (Ser C)*, 2005, 48 (2): 155 - 162
- [2] LEE Y K, KM H W, LU C L, *et al* A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extra cellular materials [J]. *J Microbiol Meth*, 2003, 52: 245 - 250
- [3] BOURRA N M, ACHOUAK W, URBA N V, *et al* DNA extraction from activated sludges [J]. *Curr Microbiol*, 1999, 38: 315 - 319
- [4] OH E T, SO J S A rapid method for RNA preparation from Gram - positive bacteria [J]. *J Microbiol Meth*, 2003, 52: 395 - 398
- [5] JACKSON C R, HARPER J P, W LLOUGHBY D, *et al* A simple efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4993 - 4995
- [6] MILLER D N, BRYANT J E, MADSEN E L, *et al* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 4715 - 4724
- [7] 薛俊龙, 王采先, 詹丽娥, 等. 两种物理方法破碎大肠杆菌比较试验 [J]. *山西农业科学*, 2005, 33 (4): 77 - 79
- [8] 邢德峰, 任南琪, 宋业颖, 等. DG - DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性 [J]. *生态学报*, 2005, 25 (7): 1818 - 1823

(编辑 刘 彤)