微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn
研究报告

MAY 20, 2009, 36(5): 652~657
© 2009 by Institute of Microbiology, CAS

脱氮硫杆菌特异引物/探针的设计和评价

赵阳国[1*] 王爱杰[2] 万春黎[2] 任南琪[2] 白 洁[1]

(1. 中国海洋大学 环境科学与工程学院 山东 青岛 266100)
(2. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要: 自脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)16S rRNA 基因 V3 可变区中发现一条 27 bp 的特异序列, 以该序列为反向引物, 对高效同步脱硫反硝化系统污泥 DNA 进行了温度梯度 PCR 扩增和基因文库构建, 结果证实了该引物的高度专一性。应用该探针在去离子甲酰胺和 NaCl 的浓度分别为 35%和 100 mmol/L, 杂交/洗脱温度为 48°C 条件下对污泥样品杂交得到较好的阳性结果, 软件分析表明脱氮硫杆菌在污泥中约占 15%。脱氮硫杆菌专一性引物/探针的提出, 将为不同生态环境中该种微生物的时空分布、结构动态以及实时定量等研究提供分子生物学工具。
关键词: 脱氮硫杆菌, 16S rRNA, 引物, FISH, 活性污泥

Design and Assessment of Species-specific Primer and Probe for *Thiobacillus denitrificans*

ZHAO Yang-Guo[1*] WANG Ai-Jie[2] WAN Chun-Li[2] REN Nan-Qi[2] BAI Jie[1]

(1. *College of Environmental Science and Engineering*, *Ocean University of China*, *Qingdao*, *Shandong* 266100, *China*)
(2. *School of Municipal and Environmental Engineering*, *Harbin Institute of Technology*, *Harbin*, *Heilongjiang* 150090, *China*)

Abstract: A species-specific oligonucleotide sequence was screened from the third variable domain of 16S rRNA gene of *Thiobacillus denitrificans*. It confirmed that the sequence had the high speciality by amplifying the activated sludge DNA in high simultaneous biological removal of sulfate and nitrate process and further determining the sequences of 16S rRNA gene clone library. The Cy3-labeled species-specific probe hybridized well with activated sludge and obtained good picture under the conditions of 48°C, 35% formamide deionized, and 100 mmol/L NaCl. ImageJ software demonstrated that *T. denitrificans* counted for 15% of bacteria in the sludge. The proposal of species-specific primer and probe for *T. denitrificans* would play an important role in disclosing its temporal and spatial distribution, structure dynamics and realtime quantity.

Keywords: *Thiobacillus denitrificans*, 16S rRNA, Primer, FISH, Activated sludge

脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)是废水同步脱硫反硝化处理工艺中的重要功能类群, 是微生物腐蚀和石油酸化生物防治中的主要生物菌剂, 因此, 对其数量和分布进行快速监测具有重要现实意义。16S rRNA 为靶序列的探针 Thio820 是针对 *T. ferrooxidans* 和 *T. thiooxidans* 而设计的, 该探针在揭示管道腐蚀行为过程中的起到了重要作用[1]。然而, 脱氮硫杆菌作为重要氮素循环微生物, 由于缺

基金项目: 国家自然科学基金(No. 50208006, 40801193)
* 通讯作者: Tel: 86-532-66786568; ✉ yg.zhao@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-10-21; 接受日期: 2008-12-31

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乏分子生态学工具而研究滞后。提出脱氮硫杆菌专一性 PCR 引物和探针, 已经成为微生物生态学和环境工程学的迫切要求[2,3]。

菌种专一性探针和引物在分析特殊功能微生物的空间分布和数量水平具有重要作用。如 γ-变形菌纲中的 *T. ferrooxidans* 和 *T. thiooxidans* 等由于在硫氧化过程中产生了大量的酸, 被认为是下水道腐蚀的主要原因, 而另一菌属 *Acidiphilium* 可能助长了这种腐蚀作用。探针杂交检测表明, *T. ferrooxidans* 主要出现于腐蚀区外周粘液层(pH>1.2), 而非内部酸形成区(pH 0.3~0.7)[1]。对产氢菌种 *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 的特异杂交, 表明该种群在乙醇型产氢反应器中广泛存在, 并且其数量波动与反应器产氢效率表现明显正相关[4]。

基于 16S rRNA 基因序列的系统发育学研究不断深入, 对分散于 α-、β-和 γ-变形菌纲的硫杆菌属(*Thiobacillus*)菌种又进行重新分类。目前, 硫杆菌属仅包含 β-变形菌纲中的 3 种硫杆菌, 分别为 *T. thioparus*、*T. denitrificans* 和 *T. aquaesulis*, 而其它硫杆菌被划分到其它属或重新建立起新属。*T. thioparus* ATCC8518 为属内典型菌种, 同 *T. denitrificans* NCIMB 9548 16S rRNA 具有 96.3%的相似性, 但仅有 22%至 29%DNA 杂交率[5]。这些种间差异为设计和应用以 16S rRNA 为靶位点的 PCR 引物和杂交探针奠定了理论基础。

本研究设计了脱氮硫杆菌在种级水平的专一性 PCR 引物/探针, 并对引物/探针的应用可行性进行了评价。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

土壤 DNA 提取试剂盒 PowerSoil DNA Isolations kit (Mobio, CA USA), *Ex Taq* DNA 聚合酶、dNTP (宝生物, 大连), PCR 引物 (Invitrogen, 上海), 胶回收或柱式 PCR 产物回收试剂盒 NucleoSpin® Extract Ⅱ (Macherey-Nagel, Germany), pMD19-T 载体 (宝生物, 大连), 电泳系统 Power Pac1000 (Bio-Rad, CA USA), GeneAmp® PCR system 2700 PCR 仪 (Applied Biosystems, CA USA), 激光共聚焦显微镜 (ZEISS, Germany), 分析软件 Sequencher 5.0 (Gene Codes, MI USA), DNAClub 1.5 (http://128.84.203.244), ImageJ 1.41 (http://rsbweb.nih.gov/ij/)。

1.2 引物/探针设计

自 GenBank 中下载引物/探针设计所需的 16S rRNA 基因序列, 包括脱氮硫杆菌的不同菌株 *T. denitrificans* NCIMB9548, *T. denitrificans* ATCC25259, 硫杆菌属内的其它典型菌种 *T. thioparus* ATCC8518, *T. aquaesulis*, 早先属于硫杆菌的其它典型菌种 *T. ferrooxidans* 和 *T. thiooxidans* 以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)等。采用 Clustal W[6]进行序列比对, 于 16S rRNA 基因高变区内选择约 20 bp~30 bp 脱氮硫杆菌的特异寡核苷酸片段, 选取的片段应尽量与非目标菌有更多的碱基差异, 以提高引物/探针的特异性和准确性。

采用 DNAClub 检测选取引物的 T_m 值、G+C 含量以及发夹结构等信息是否符合引物/探针设计的要求及条件。然后采用 RDP (Ribosomal database project)[7]中的 Probe match 在线检索程序, 进行在线模拟杂交, 以分析引物/探针的特异性。若检索结果中包含非目标菌株, 则需要在高变区内重新选择不同的寡核苷酸片段, 并对选择的片段继续进行特异性检测。

1.3 引物的评价

以 16S rRNA 基因通用引物 BSF8/20(5′-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3′)为正向引物, 以本研究设计的序列为反向引物, 对运行良好的脱硫反硝化污泥样品和纯菌 DNA 进行扩增检测, 以验证引物的特异性, 同时摸索采用该引物在定性检测污泥中脱氮硫杆菌时的最佳退火温度。

1.3.1 退火温度: 同步脱硫反硝化工艺的种泥取自哈尔滨双城护城河底泥, 在以硫代硫酸盐/硝酸盐为底物时运行状态良好, 能够检测到单质硫和氮气的生成, 极有可能在污泥中存在脱氮硫杆菌。采用梯度 PCR 技术, 退火温度分别选择 55°C、55.9°C、57°C、58.2°C、59.4°C、60.6°C 和 63°C, 其余条件及程序参照文献[8], 以污泥样品总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。对获得阳性结果的最高退火温度(T_{max})下的 PCR 产物纯化后构建 16S rRNA 基因文库, 并随机选择 5 个克隆进行测序, 通过 Blastn 程序和 Sequencher 软件对获得的序列进行比对验证, 检验其是否为脱氮硫杆菌。

1.3.2 引物特异性检测: 分别以污泥样品 DNA、非目标菌株发酵产酸细菌 3-1F、Yuan-3、W7、B49 和硫酸盐还原菌 F28-1 的 DNA 为模板, 以获得阳性结

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

果的最高退火温度(T_{max})为退火温度，进行 PCR 扩增，检测引物的特异性。

1.4 探针的评价及应用

在进行荧光原位杂交(FISH)实验中，对杂交结果影响较大的主要因素为杂交/洗脱温度、去离子甲酰胺浓度和 NaCl 浓度。杂交过程中加入的去离子甲酰胺可以降低探针的杂交温度，理论上甲酰胺的浓度每升高 1%可降低杂交温度 0.61°C，参照文献[9]，将去离子甲酰胺和 NaCl 的浓度分别固定为 35%和 100 mmol/L，选择杂交/洗脱温度为 42°C、46°C、48°C 和 52°C，以 FITC 标记的 EUB338 和 Cy3 标记的脱氮硫杆菌探针对污泥样品进行双杂交，根据杂交结果，选择最适合的杂交温度。杂交结果应用激光共聚焦显微镜观察并照相，采用 Image J 软件计算脱氮硫杆菌的比例。

2 结果

2.1 引物/探针设计

经重复比对和检索分析，自 16S rRNA 基因高可变的 V3 区，对应于脱氮硫杆菌 NCIMB 9548 (GenBank 登录号：AJ243144) 16S rRNA 的 446 bp ~ 472 bp，发现一条长度为 27 bp 序列，该序列同本属最相近菌株 *T. thioparus* ATCC8518 有 3 个碱基差异，同其它菌株差异更大，将该探针命名为 Thi-d，其序列为：5′-TGCTGGTACCGTCATTAGCACACGATG-3′(图 1)。DNAClub 评价其 PCR 退火温度为 59°C，而探针的杂交温度为 62°C，这两个温度对下一步的探针特异性验证和杂交温度的选择具有重要指导意义。Probe match 检索均表明，在 690149 条 16S rRNA 基因序列中，与探针序列完全杂交的分离菌种只有脱氮硫杆菌，另外还有 4 个未培养的硫杆菌；当允许 1 个碱基错配时，分离菌种也是脱氮硫杆菌，另有 80 个未培养硫杆菌；允许 2 个碱基错配时，分离菌种为脱氮硫杆菌、细菌 PE03-7G2(AB127721)和硫杆菌 E4IPC-4828 (DQ133427)，另外有 134 个未培养的 β-变形菌(表 1)。

2.2 引物的评价

采用 16S rRNA 基因正向引物 BSR8/20 和脱氮硫杆菌特异反向引物 Thi-d，对污泥样品 DNA 进行梯度 PCR 扩增，结果如图 2，获得阳性结果的最高退火温度(T_{max})为 57°C。以 57°C 为退火温度，PCR 扩增污泥样品 DNA 及其它非目标菌株的结果如图

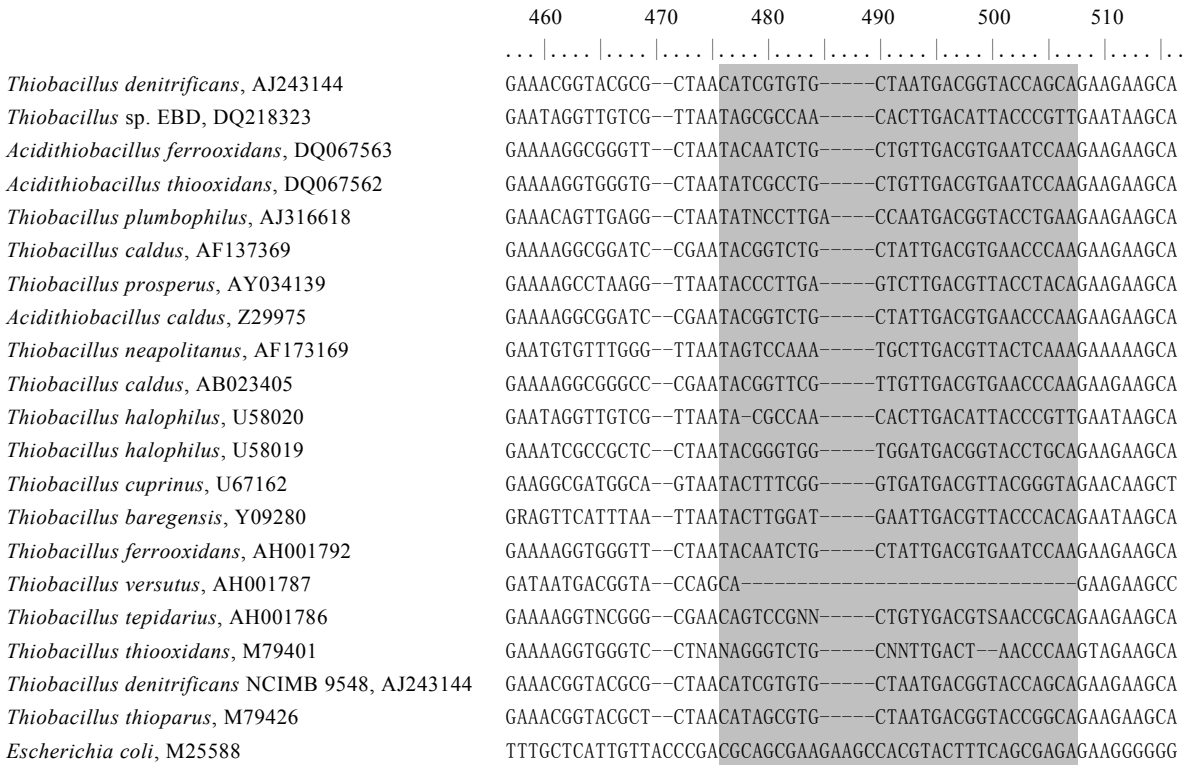

图 1 硫杆菌属及外族细菌 16S rRNA 序列比对

Fig. 1 Alignment of 16S rRNA gene sequences of *Thiobacillus* spp. and other bacteria

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 脱氮硫杆菌探针特异性检索
Table 1 Specific retrieve of 16S rRNA targeted probe of *Thiobacillus denitrificans*

容许错配数 Mismatch (bp)	0	1	2	3
总杂交数量 Total hybridization (strain)	5	81	137	217
硫杆菌所占数量 *Thiobacillus* spp. (strain)	5	81	134	211

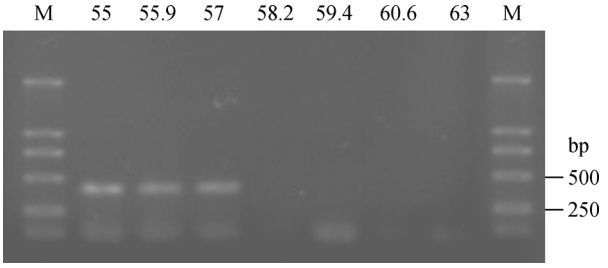

图 2 温度梯度 PCR 扩增结果
Fig. 2 Temperature gradient amplification of activated sludge
Note: M: DNA marker; 55, 55.9, 57, 58.2, 59.4, 60.6 and 63 are the different annealing temperature (°C).

3 所示，只有污泥样品得到阳性结果，而其它非目标菌株均为阴性。

对 PCR 扩增污泥样品得到的产物，构建文库后随机挑取 5 个阳性克隆进行测序。每个克隆均得到 482 bp 序列(GenBank 登录号:FJ480827~FJ480831)，Blastn 检测表明同脱氮硫杆菌 NCIMB 9548 的序列相似最高，为 95%，其余均为未培养的 β-变形细菌。这说明，采用该引物进行 PCR 扩增时，退火温度(T_{max})为 57°C 时可得到较满意的结果。

2.3 探针的评价及应用条件

采用 Cy3 标记的 Thi-d 和 FITC 标记的 EUB338 对同步脱硫反硝化系统污泥进行 FISH 杂交，结果

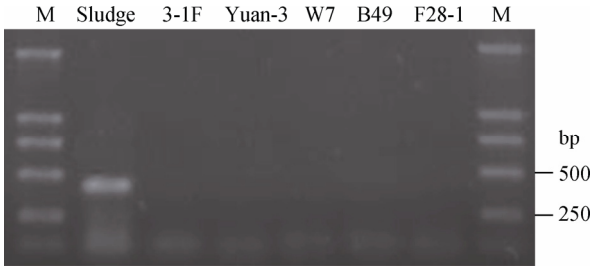

图 3 引物的特异性检测
Fig. 3 The specific assessment of the primer at annealing temperature 57°C
Note: M: DNA size marker; Sludge, 3-1F, Yuan-3, W7, B49 and F28-1 at top of figure are target (sludge) or non-target bacteria.

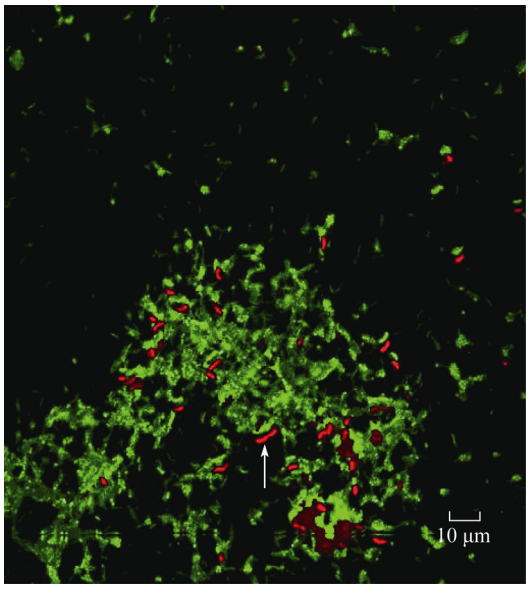

图 4 脱氮硫杆菌探针 Thi-d(Cy3，红色，箭头所示)和真细菌探针 EUB338(FITC，绿色)双杂交结果
Fig. 4 Fluorescent *in situ* hybridization with *Thiobacillus denitrificans*-special probe Thi-d(Cy3, red, arrow) and bacteria probe EUB338 (FITC, green)

表明 52°C 时未得到杂交信号，而 42°C 和 46°C 红色信号过强，无法区别菌体形态，48°C 时杂交结果见图 4。从图中清晰可辨短杆状的脱氮硫杆菌，软件分析表明，脱氮硫杆菌约占真细菌总量的 15%。这为该系统良好的运行状态提供了生物学依据。

3 讨论

3.1 脱氮硫杆菌引物/探针的专一性

在参考菌株数量不足的情况下，FISH 杂交结果具有不确定性，无法准确评价探针的专一性和敏感性。而采用 PCR 扩增并结合克隆测序的方法也可以达到对引物/探针进行选择性评价的目的。有研究在进行 FISH 探针筛选过程中，也采用了类似的策略[10]。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

该探针的专一性源于杂交区域的高可变性, V3区是 16S rRNA 基因中变异性最高的区域, 即使在种一级水平, 也可能存在差异, 这是本研究在探针选择时的理论依据。正因如此, 虽然同步脱硫反硝化系统中微生物存在较高的多样性, 采用这一引物构建的基因文库序列差异很小(<2%), 而且同这些序列相似最高的菌株均为脱氮硫杆菌, 该结果与探针模拟杂交检索结果相一致。然而, 由于当前获得的脱氮硫杆菌较少, 以现有序列为依据设计的探针, 可能存在专一性过强而代表性不够的缺陷。可先对所研究的样品建立 16S rRNA 基因克隆文库, 分析微生物群落尤其是脱氮硫杆菌的多样性, 根据大量样品中的脱氮硫杆菌序列设计引物/探针, 以进一步验证探针的代表性。

利用该引物对农田土壤和啤酒废水处理反应器进行 PCR 检测时, 设定退火温度为 55°C 时, 得到的阳性条带经测序分析也均同脱氮硫杆菌具有最高的相似性[11], 这表明, 该引物具有很强的选择性, 即使在较低退火温度下, 也能够保持其专一性。

Thi-d 位于脱氮硫杆菌 NCIMB 9548 (GenBank 登录号：AJ243144) 16S rRNA 的 446 bp~472 bp, 可以分别与真细菌通用引物 8F 或 341F 形成引物对, 当与 341F 构成引物对时, PCR 产物理论长度为 142 bp, 非常适合采用荧光定量 PCR 对不同生态环境中的脱氮硫杆菌进行绝对定量分析。

3.2 应用该探针分析脱氮硫杆菌的时空分布

在各种生态环境中, 脱氮硫杆菌与硫酸盐还原菌的生态学关系是人们关注的焦点。在两段式或一体式同步脱硫反硝化系统中, 二者在空间上的分布或时间上的递承关系已经得到初步研究[12]。结果表明, 脱氮硫杆菌与硫酸盐还原菌能够共存于颗粒污泥外层, 脱氮硫杆菌通过氧化而抑制硫化物的积累[13]。本研究中, 杂交对象为完全混合型污泥, 可清晰显示脱氮硫杆菌类群在污泥中的均匀分布情况; 另外, 还可以通过对不同时间点的污泥杂交, 展示其数量波动及演替趋势, 根据分析结果及时调整反应器的运行参数, 以使其处于最佳状态。故此, 该探针的应用将对反应器的调控和运行具有重要的指导意义。

采用夹层平板法, 王爱杰等[14]自 FISH 杂交呈现阳性的同步脱硫反硝化系统中, 分离出了高效硫化物氧化、硝酸盐还原的脱氮硫杆菌, 在培养试管底部观察到大量淡黄色硫粉。这说明, 在该系统中确实存在脱氮硫杆菌, FISH 杂交存在客观基础。在此基础之上, 当去离子甲酰胺和 NaCl 的浓度固定时, 通过升高杂交温度, 可以提高对该类微生物杂交的特异性。在选用 Thi-d 探针对脱氮硫杆菌进行定向监测时, 杂交液中去离子甲酰胺和 NaCl 的浓度分别为 35%和 100 mmol/L, 杂交/洗脱温度为 48°C 的条件下, 可以得到满意的结果, 同时也证明该探针具有较好的选择性。

参 考 文 献

[1] Hernandez M, Marchand EA, Roberts DJ, *et al*. In-situ assessment of active *Thiobacillus* species in corroding concrete sewers using fluorescent RNA probes. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2002, **49**(4): 274–286.

[2] Garcia-de-Lomas J, Corzo A, Carmen Portillo M, *et al*. Nitrate stimulation of indigenous nitrate-reducing, sulfide-oxidising bacterial community in wastewater anaerobic biofilms. *Water Res*, 2007, **41**(14): 3121–3131.

[3] Dou J, Liu X, Hu Z. Anaerobic BTEX degradation in soil bioaugmented with mixed consortia under nitrate reducing conditions. *J Environ Sci* (China), 2008, **20**(5): 585–592.

[4] Ren N, Xing D, Rittmann BE, *et al*. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(5): 1112–1125.

[5] Kelly DP, Wood AP. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(2): 547–550.

[6] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(22): 4673–4680.

[7] Cole JR, Chai B, Farris RJ, *et al*. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(Database issue): 169–172.

[8] 赵阳国, 任南琪, 赵秋实, 等. 快速筛检活性污泥中硫酸盐还原菌的新方法. 哈尔滨工业大学学报, 2007, **39**(4): 571–575.

[9] Zhao Y, Wang A, Ren N, *et al*. Impacts of alkalinity drops on shifting of functional sulfate-reducers in a sulfate-reducing bioreactor characterized by FISH. *Chin J Chem Eng*, 2007, **15**(2): 276–280.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[10] Mahmoud KK, McNeely D, Elwood C, *et al*. Design and performance of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for detection of members of the genus *Bdellovibrio* by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(22): 7488−7493.
[11] 张 颖, 吴忆宁, 任南琪. 污泥膨胀对 SMBR 系统脱氮性能影响的试验研究. 中国给水排水, 2007, **23**(5): 65−68.
[12] 王爱杰, 杜大仲, 任南琪, 等. 脱氮硫杆菌在废水脱硫、脱氮处理工艺中的应用. 哈尔滨工业大学学报, 2004, **36**(4): 423−425.
[13] Chen C, Ren N, Wang A, *et al*. Microbial community of granules in expanded granular sludge bed reactor for simultaneous biological removal of sulfate, nitrate and lactate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(6): 1071−1077.
[14] 王爱杰, 万春黎, 任南琪, 等. 一株同步脱氮脱硫菌的分离鉴定及其代谢特征. 哈尔滨工业大学学报, 2008, **40**(4): 536−539.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿，本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al*.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点，斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp*14 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1−3.
[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al*. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514−36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.
[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115−120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: …… 基金资助(No.)
*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:
收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.693)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net