

基于引物的湖泊沉积物氨氧化细菌 PCR 扩增策略比较

吴宇澄^{1,2}, 王建军¹, 吴庆龙^{1*}

(1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 2. 中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室, 南京 210008)

摘要: PCR 扩增是检测环境中 β -变形杆菌纲氨氧化细菌 (β -AOB) 群落的主要方法, 但是引物的敏感性和特异性对结果具有关键影响. 本研究首先比较了 2 组常用的 β -AOB 16S rRNA 基因引物, 结果显示, 在扩增一组不同性质湖泊沉积物样品时, β AMO 引物均获得明亮的单一条带, 但 CTO 引物则未能全部扩增. 克隆及序列分析证实, β AMO 引物扩增获得的序列均不属于 β -AOB 所在的 Nitrosomonadales 目, 而 CTO 引物扩增获得的序列来自 β -AOB 中的 *Nitrosomonas europaea*/"*Nitrosococcus mobilis*" 分支. 采用变性梯度凝胶电泳方法, 对 4 种不同引物组合 PCR 策略扩增所得产物进行分析, 发现以 β AMO 或 16S rRNA 通用引物结合 CTO 引物的巢式方案可以提高扩增的效率, 且 β -AOB 的群落轮廓与 CTO 引物直接扩增方案高度相似. 这些结果表明 β AMO 引物具有较高的敏感性但特异性较低, 而 CTO 引物则相反. 因此, 特定巢式扩增方案既可提高扩增的效率, 也能真实反映湖泊沉积物中 β -AOB 的群落轮廓, 是较为理想的 β -AOB 研究方法.

关键词: 氨氧化细菌; PCR; 引物; 变性梯度凝胶电泳; 沉积物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2178-06

Comparative Analysis of Primer-based PCR Strategies for Characterizing Ammonia-oxidizing Bacterial Communities in Lake Sediments

WU Yu-cheng^{1,2}, WANG Jian-jun¹, WU Qing-long¹

(1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography & Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: PCR-based techniques are commonly used to characterize ammonia-oxidizing bacterial (AOB) communities, but are subjected to the bias induced by PCR primers. In this study, the sensitivity and specificity of two pairs of primer were assessed based on a group of lake sediment samples. Compared to the low sensitivity of the CTO primer, the β AMO primer produced intensive single bands in all samples tested. However, the sequences retrieved from one of the samples by β AMO did not cluster with Nitrosomonadales, to which all β -AOB affiliate. In contrast, all sequences amplified with CTO fell within the *Nitrosomonas europaea*/"*Nitrosococcus mobilis*" lineage. Furthermore, the products of four approaches were subjected to denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and the patterns of the nested strategies with β AMO followed CTO or the universal primer of 16S rRNA gene followed CTO were highly similar to that of CTO amplification. These findings suggest that β AMO is not competent for characterizing the β -AOB communities due to the low specificity. The nested approaches with both selective and specific primers are the choice because they can amplify effectively and retrieve community composition of β -AOB in lake sediments.

Key words: ammonia-oxidizing bacteria (AOB); PCR; primer; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); sediment

分子生态学方法的广泛应用,使微生物生态学研究摆脱了对实验室培养方法的依赖,对于理解自然界中的微生物群落及其作用具有深远的意义^[1]. 在分子生态学方法中,PCR(聚合酶链式反应)可以对微生物特征分子(rRNA 基因或功能基因)进行选择复制,再通过指纹图谱或克隆分析获得特定微生物群落的多样性及功能信息,已经成为检测环境中微生物的主要方法之一. 但是,许多因素,如环境样品 DNA 提取的质量、PCR 引物的特异性(specificity,排除非目标序列的能力)和敏感性(sensitivity,对目标序列的识别力),会导致 PCR 过

程的偏差^[2],从而影响最终的结论.

氨氧化是氮循环的中心环节之一^[3]. 具有氨氧化能力的微生物包括古菌和细菌^[4],其中氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)因具有较近的系统发育关系,特别适宜采用 PCR 方法分析它们的

收稿日期: 2009-11-17; 修订日期: 2010-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(40730528); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418104); 中国博士后科学基金项目(20080431127, 200801382); 江苏省博士后科研资助计划项目(0702057C); 中国科学院王宽诚博士后工作奖励基金项目

作者简介: 吴宇澄(1977~), 男, 博士后, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: yucheng_wu@hotmail.com

* 通讯联系人, E-mail: qlwu@niglas.ac.cn

群落结构和多样性. 陆地和淡水环境中的 AOB 主要属于 β -变形杆菌亚纲(β -AOB), 目前使用的 β -AOB 16S rRNA 引物有 β AMO^[5] 和 CTO 等^[6]. 理论分析表明, β AMO 引物敏感性较高而 CTO 引物特异性较好^[7], 但它们在扩增中的效果, 以及对 β -AOB 群落结构的重现性, 仍然有待实验的证实.

湖泊沉积物可以为 AOB 提供适合的生存环境, 但湖泊沉积物中的有机质、盐分等物质将影响 DNA 的提取质量, 从而影响 PCR 扩增效果. 目前尚不了解 β AMO 及 CTO 引物对不同性质湖泊沉积物 β -AOB 16S rRNA 基因的扩增行为, 鉴于此, 本研究选取一组湖泊沉积物, 从实验角度分析 β AMO 和 CTO 引物的敏感性和特异性, 并基于群落指纹图谱

评价 4 种引物组合重现 β -AOB 群落结构的效果, 目的在于对 β -AOB 的 PCR 扩增进行优化, 从而为研究湖泊生态系统氨氧化细菌的群落结构提供坚实的方法学基础.

1 材料与方法

1.1 样本采集及化学分析

2007 年 8 月采集了青藏高原 9 个湖泊沉积物样本(表层 1 cm), 编号为 T1 ~ T9. 沉积物采集后立即置于车载冰箱保藏, 并尽快运至实验室, -20°C 保存. 采用常规方法分析沉积物理化性质^[8], 沉积物离子浓度的分析参照文献[9]进行. 各样点的基本情况与性质如表 1 所示.

表 1 采样点基本概况

Table 1 Location and properties of nine sediment samples in this study

样本编号	采样点位	经纬度	海拔 /m	总有机碳 /‰	Γ /‰	pH	阳离子浓度 ¹⁾ /mg·kg ⁻¹
T1	尕斯库勒湖	36°59'53.52"N, 100°36'10.80"E	3 211	20.1	2.0	7.8	174.9
T2	倒淌河	36°34'37.56"N, 100°44'42.00"E	3 206	4.6	0.5	7.0	31.4
T3	青海湖	36°37'44.76"N, 100°6'25.20"E	3 216	11.4	1.1	9.0	453.7
T4	茶卡盐湖	36°44'58.92"N, 99°4'45.48"E	3 068	20.1	2.0	8.4	7 764.5
T5	可鲁克湖	37°18'52.56"N, 96°53'58.92"E	2 818	58.3	5.8	7.7	81.4
T6	小柴旦湖	37°27'53.64"N, 95°33'28.08"E	3 195	46.2	4.6	8.6	3 070.8
T7	无名湖泊	32°55'42.60"N, 91°57'25.56"E	5 280	14.3	1.4	7.4	117.9
T8	无名水塘	32°40'17.76"N, 91°52'18.48"E	5 001	5.0	0.5	7.6	31.9
T9	纳木错	30°47'17.88"N, 90°58'32.16"E	4 734	69.7	6.7	8.2	63.8

1) 数值为 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^{+} 、 Si^{3+} 和 Sr^{2+} 这 10 种阳离子之和

1.2 沉积物 DNA 提取

称取 0.5 g 冷冻干燥的沉积物样品, 参考土壤提取方法^[10], 获得沉积物 DNA 粗提物. 经 PowerCleanTM DNA Clean-Up Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, USA) 试剂盒纯化, 并以 0.8% 琼脂糖电泳检验提取效率, 用于后续分析.

1.3 β -AOB 16S rRNA 基因的 PCR 扩增方案

在 β AMO 和 CTO 引物的基础上, 设计 A、B、C、D 4 种扩增方案(表 2), 扩增 T1 ~ T9 中的 β -AOB 16S rRNA 基因片段. 其中, A、B 是直接扩增方案, C、D 是巢式 PCR 方案. 用于 DGGE 分析时, 还需以第一轮或第二轮获得的 PCR 产物为模板, 采用 DGGE 专用引物 341f-GC 和 518r 进行再次扩增(表 2). 本研究所使用的引物序列及扩增特性见表 3.

表 2 PCR 扩增方案

Table 2 Primer-based PCR strategies in this study

方案	第一轮 PCR 引物	第二轮 PCR 引物	DGGE 引物
A	β AMO-161f/ β AMO-1301r	—	341f-GC/518r
B	CTO-189f/CTO-654r	—	341f-GC/518r
C	β AMO-161f/ β AMO-1301r	CTO-189f/CTO-654r	341f-GC/518r
D	27f/1492r	CTO189f/CTO654r	341f-GC/518r

1.4 克隆文库构建与序列分析

对表 2 中 A 和 B 方案的 PCR 扩增产物进行克隆分析(pGEM T-Easy, Promega, USA). 经连接、转化、验证后, 随机选取阳性克隆委托测序(上海英骏). 获得的序列经去除载体和引物序列后, 采用

Chimera Check (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgi/chimera.cgi?su=SSU>) 排除可能的嵌合体序列. 对于 β AMO 引物扩增获得的序列, 采用 RDP Release 10(<http://rdp.cme.msu.edu/>) 中的 Classifier 功能确定其系统归属, 以 BLAST(<http://www.ncbi.nlm>

表 3 PCR 引物及特性

Table 3 Primers used in this study

引物	引物序列(5'-3')	特异性	片段大小	文献
β AMO-161f	TGGGGRATAACGCAYCGAAAG	β -AOB	约 1.1 kb	[5]
β AMO-1301r	AGACTCCGATCCGGACTACG			
CTO-189f	GGAGVAAAGTAGGGGATCG	β -AOB	435bp	[6]
CTO-654r	CTAGCYTTGTAGTTCAAACGC			
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	细菌	约 1.5kb	[11]
1492r	TACGGYTACCTTGTACGACTT			
341f-GC	GC clamp-CCTACGGG AGGCAGCAG	细菌	161bp	[12]
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG			

nih.gov/BLAST/) 搜索 GenBank 中最相似序列,用 ClustalX 1.81 进行多序列比对,并采用 Mega 4.0 软件^[13] 重建系统发育树(邻接法,1 000 次抽样 bootstrap 检验)。

1.5 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 分析

采用 DGGE 方法评价 4 种扩增方案对 β -AOB 群落结构的重现效果. 引物 341f-GC/518r 的扩增产物在 8% 的聚丙烯酰胺胶、30% ~ 60% 变性梯度、60 V 条件下电泳 18 h (DGGE-2001, C. B. S., USA). 电泳结束后,用核酸染料 Sybr Green I 染色 30 min, 用 GelDoc XR 凝胶成像系统 (BIO-RAD Laboratories, USA) 拍照. 采用 GelCompar II 软件 (Applied Maths, USA) 对 DGGE 图谱上的条带进行识别和数字化转换,并进行聚类分析 (Dice 距离, UPGMA 方法)。

2 结果与讨论

2.1 沉积物性质差异

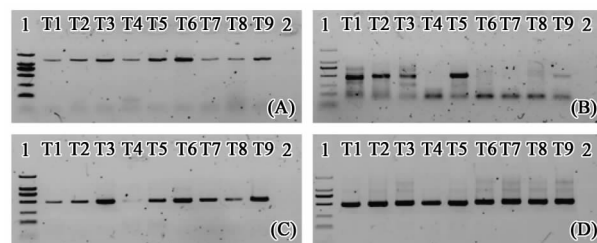
本研究涉及的 9 个湖泊,主要分布在青藏高原东北部,海拔差异较大. 更为重要的是,9 个沉积物样品中总有机碳成分从 4.6‰ ~ 69.7‰,最低的接近贫营养状态数值^[14],最高的达到重度富营养化湖泊的含量^[15]. 同样,阳离子浓度从 31.4 ~ 7 764.5 mg/kg,反映出样品盐度之间的巨大差异. 根据现有资料,这些湖泊中,可鲁克湖为淡水湖,纳木错为淡-微咸水湖,青海湖为微咸水湖,小柴旦、茶卡为盐湖^[16],具有十分明显的盐度梯度. 这些性质差异对于 PCR 扩增的影响,将直接决定 β -AOB 群落结构分析的效果和准确性。

2.2 β AMO 与 CTO 引物的敏感性

为比较引物的敏感性,首先采用 β AMO 与 CTO 引物对 T1 ~ T9 样本进行直接扩增(对应于表 2 中的 A 和 B 方案). 结果显示, β AMO 引物的敏感性较

高,所有样本均获得了预期中 1.1 kb 左右的单一条带[图 1(A)]. 但是,应用 CTO 引物,仅 T1、T2、T3 和 T5 这 4 个样本获得较强的扩增条带[图 1(B)],表现出较低的敏感性. 这可能是因为本研究中涉及的 9 个沉积物样品,有的来自高盐湖泊(T4、T6),有的有机质含量很高(T9),还有位于唐古拉山口附近的高海拔湖泊(T7、T8). 极端的理化性质将影响 DNA 的提取质量,并进而导致 PCR 扩增效率降低;加上近极端环境中, β -AOB 的丰度可能很低,也可能导致 16S rRNA 基因无法成功扩增。

如果增加一个选择性扩增步骤(如 β AMO 引物或 16S rRNA 通用引物,对应于表 2 中的 C 和 D 方案),再应用 CTO 引物进行 PCR 扩增,9 个样本均能得到 435 bp 大小的单一条带,PCR 结果明显改善[图 1(C)、1(D)]. β AMO 和 16S rRNA 通用引物具有较高的敏感性,其扩增产物消除了沉积物 DNA 中可能含有的抑制因素,如作为二轮 PCR 的模板,较易获得特异性扩增,这也为后续的 β -AOB 群落结构分析提供了基本的条件。



图中 1 为 DL2 000 相对分子质量标记,

2 为阴性对照,T1 ~ T9 代表样本号

图 1 4 种 PCR 引物策略(A ~ D)的扩增效果

Fig. 1 PCR amplification of nine lake sediment samples with four primer combinations (A-D, showed in Table 2)

2.3 β AMO 与 CTO 引物的特异性

为评价引物的特异性,对 β AMO 与 CTO 对 T1 样本扩增获得的产物进行 PCR 克隆,并随机挑取阳

性克隆测序,建立系统发育树(图2).对 β AMO而言,获得的6个序列虽然属于 β -变形杆菌亚纲,但并不处于 β -AOB所在的Nitrosomonadales目.而采用CTO引物获得的16个序列,均位于 β -AOB中的*Nitrosomonas europaea*/"*Nitrosococcus mobilis*"分支,这一分支主要存在于各种水体环境中,是典型的 β -AOB^[7].

Purkhold等^[7]通过*in silico*分析,从理论上证明在 β -AOB 16S rRNA 基因引物中, β AMO 的特异性最低,CTO 特异性最高. β AMO 作为早期设计的引物^[5],当时AOB的16S rRNA 基因序列资料还有限,因此存在着较多的错配,导致特异性较低.实际应用

中,甚至有 β AMO 扩增获得的所有93个序列均非AOB的极端例子^[17].因此,在研究环境中的 β -AOB群落时, β AMO 不宜作为特异性引物使用.尽管CTO引物也存在着一些扩增的偏好性^[17],甚至在某些样本上也能获得非 β -AOB序列^[18],但因其特异性较高,已成为目前最为常用的 β -AOB引物.不过本研究中,CTO引物未能成功扩增所有的样本,限制了它的直接应用.如果将 β AMO 作为筛选引物,以CTO作第二轮扩增,可望提高环境样本 β -AOB群落检测的特异性和敏感性.但是,引入一个选择性扩增步骤是否会影响 β -AOB群落结构,还需要进行更为深入的研究.

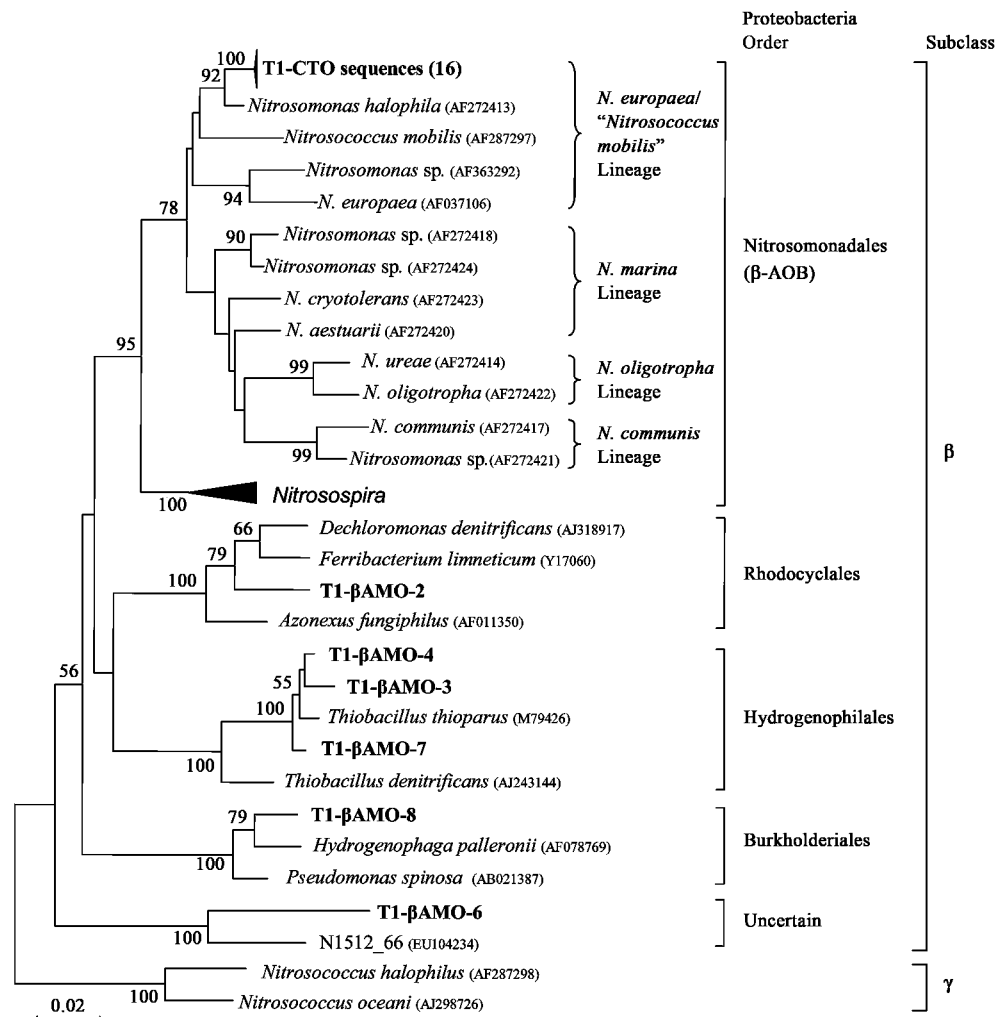


图2 β AMO 与 CTO 引物扩增序列的系统发育树

Fig. 2 Distance-based phylogenetic trees of β AMO and CTO amplified products

2.4 不同 PCR 引物扩增方案对 β -AOB 群落结构的影响

PCR 扩增中常存在各种偏差.巢式扩增尽管可以提高 PCR 扩增的敏感性,但由于增加一个筛选步

骤,可能会导致最终群落结构偏离真实情况. DGGE 方法可以比较不同引物方案下 β -AOB 群落结构的差异,从而判断 PCR 偏差范围,为 PCR 方案的选择提供依据.

采用 A、B、C、D 等 4 种 PCR 扩增方案(表 2), 对 T1 和 T5 样本的 PCR 产物作 DGGE 分析, 结果如图 3 所示. 由图 3(a)可见, A 方案和 B、C、D 方案所得群落结构差异较大, 这与 2.2 节中 β AMO 引物特异性分析结果一致. B 方案是 CTO 引物直接扩增的结果, 理论上认为应该最接近于真实的

群落结构, 因此可以作为 $\bar{i}$ 的标准. 在 B、C、D 方案中, 优势条带基本相似, 群落结构的聚类分析[图 3(b)]也清楚地表明, 3 种方案获得的群落结构相似度较大. 这表明, C、D 中尽管增加了一个选择性步骤, 但并未明显改变 β -AOB 的群落结构.

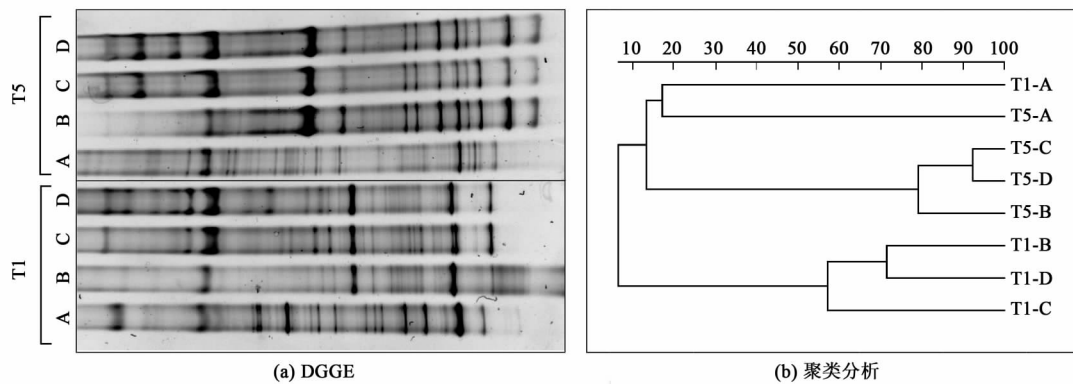


图 3 4 种扩增策略对 β -AOB 群落结构的影响比较

Fig. 3 Comparison of β -AOB community structures recovered by the four PCR strategies

3 结论

PCR 引物的选择对于环境中微生物的检测有着重要的影响. 本研究表明, 2 种常用的 β -AOB 扩增引物 β AMO 和 CTO 具有不同的特性, β AMO 的敏感性高而特异性低, CTO 的敏感性低而特异性高. 以细菌 16S rRNA 通用引物或 β AMO 作为第一轮引物, CTO 作为第二轮引物的巢式 PCR 方案可以提高扩增的敏感性, 所获指纹图谱能够反映 β -AOB 群落的真实结构, 因而可用于研究特殊湖泊沉积物样品中 β -AOB 的群落结构和多样性.

参考文献:

- [1] Lau S C K, Liu W T. Recent advances in molecular techniques for the detection of phylogenetic markers and functional genes in microbial communities [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, **275** (2): 183-190.
- [2] Von Wintzingerode F, Göbel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis [J]. FEMS Microbiol Rev, 1997, **21** (3): 213-229.
- [3] Gruber N, Galloway J N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle [J]. Nature, 2008, **451** (7176): 293-296.
- [4] Francis C A, Beman J M, Kuypers M M M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation [J]. ISME J, 2007, **1** (1): 19-27.
- [5] McCaig A E, Embley T M, Prosser J I. Molecular analysis of

enrichment cultures of marine ammonia oxidisers [J]. FEMS Microbiol Lett, 1994, **120** (3): 363-367.

- [6] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63** (4): 1489-1497.
- [7] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, **66** (12): 5368-5382.
- [8] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. 106-163.
- [9] Wang J J, Wu Y C, Jiang H C, *et al.* High beta diversity of bacteria in the shallow terrestrial subsurface [J]. Environ Microbiol, 2008, **10** (10): 2537-2549.
- [10] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62** (2): 316-322.
- [11] Caffrey J M, Bano N, Kalanetra K, *et al.* Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia [J]. ISME J, 2007, **1** (7): 660-662.
- [12] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, **59** (3): 695-700.

- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**(8): 1596-1599.
- [14] Herrmann M, Saunders A M, Schramm A. Effect of lake trophic status and rooted macrophytes on community composition and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(10): 3127-3136.
- [15] 王丽芳,熊永强,吴丰昌,等. 滇池的富营养化过程:来自结合态脂肪酸 $C_{16:0}$ $\delta^{13}C$ 的证据[J]. *湖泊科学*, 2009, **21**(4): 456-464.
- [16] 王苏民,窦鸿身. 中国湖泊志[M]. 北京:科学出版社, 1998. 398-502.
- [17] Junier P, Kim O S, Hadas O, *et al.* PCR primer selectivity and phylogenetic specificity evaluated using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in environmental samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(16): 5231-5236.
- [18] 邢鹏,孔繁翔,陈开宁,等. 生态修复水生植物根际氨氧化细菌的研究[J]. *环境科学*, 2008, **29**(8): 2154-2159.

欢迎订阅 2011 年《环境科学》

《环境科学》创刊于 1976 年,由中国科学院主管,中国科学院生态环境研究中心主办,是我国环境科学学科中最早创刊的学术性期刊。

《环境科学》自创刊以来,始终坚持“防治污染,改善生态,促进发展,造福人民”的宗旨,报道我国环境科学领域内具有创新性高水平,有重要意义的基础研究和应用研究成果,以及反映控制污染,清洁生产和生态环境建设等可持续发展的战略思想、理论和实用技术等。

《环境科学》在国内外公开发行,并在国内外科技界有较大影响,被国内外一些重要检索系统收录,如美国医学索引 MEDLINE;美国化学文摘 CA;俄罗斯文摘杂志 AJ;美国生物学文摘预评 BP;美国医学索引 IM;日本科学技术情报中心数据库 JICST;英国动物学记录 ZR;剑桥科学文摘(CSA):Environmental Sciences;剑桥科学文摘(CSA):Pollution Abstracts;剑桥科学文摘(CAS):Life Sciences Abstracts 等;国内的检索系统有中国科技论文统计与引文数据库(CSTPCD);中文科技期刊数据库(维普);中国期刊全文数据库(CNKI);数字化期刊全文数据库(万方);中国科学引文数据库(CSCD);中国生物学文摘等。

全国各地邮局均可订阅,如有漏订的读者可直接与编辑部联系,办理补订手续。

《环境科学》2011 年为大 16 开本,70 元/册,全年 12 期。

国内统一刊号:CN11-1895/X 国际标准刊号:ISSN 0250-3301

国外发行代号:M 205 国内邮发代号:2-821

编辑部地址:北京市海淀区双清路 18 号(2871 信箱) 邮编:100085

电话:010-62941102;传真:010-62849343;E-mail:hjlx@rcees.ac.cn;网址:www.hjlx.ac.cn