

基于 16S rDNA 不同靶序列对厌氧 ABR 反应器微生物多样性分析的影响

魏利¹, 马放¹, 王欣宇², 刘雅丽², 王丽娜², 李维国¹

(1. 哈尔滨工业大学市政环境与工程学院 水质保障与水资源可持续利用国家重点实验室 黑龙江省环境生物技术重点实验室, 哈尔滨 150090; 2. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 154500)

摘要: 在反硝化抑制硫酸盐还原菌的研究中, 探讨了不同引物扩增 16S rDNA 靶序列对厌氧 ABR 反应器的活性污泥 DGGE 图谱多样性的影响, 从反应器中提取污泥总 DNA, 以 4 对通用引物 341F/534R、968F/1401R、63F/534R、341F/926R 扩增 16S rDNA 序列, 对指纹图谱的分辨率和种群多样性进行分析. 研究表明, 采用 PBS 洗涤污泥和超声振荡有利于硫酸盐还原污泥总 DNA 提取; 不同引物 DGGE 图谱分析, 群落多样性存在显著的差异, 341F/534R 和 968F/1401R 的靶序列分离效果较好, 341F/926R 分离效果一般, 63F/534R 分离的效果最差. 341F/534R 的 DGGE 图谱中条带丰富, 多样性最好, 968F/1401R 的 DGGE 图谱次之, 341F/926R 的 DGGE 图谱条带一般, 63F/534R 图谱条带最少, 多样性也较差. 建议 DGGE 分析厌氧活性污泥样品时, 同时采用引物 341F/534R 和 968F/1401R 是比较适宜的.

关键词: DGGE; 16S rDNA; 厌氧污泥; 群落多样性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0776-05

Influence of Different 16S rDNA Target Sequence on Analysis of Microbial Diversity in Anaerobic ABR Reactor

WEI Li¹, MA Fang¹, WANG Xin-yu², LIU Ya-li², WANG Li-na², LI Wei-guo¹

(1. State Key Laboratory of Water Resource Utilization and Environmental Pollution Control, Key Laboratory for Environmental Biotechnology of Heilongjiang Province, School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In the study on denitrification inhibiting sulfate reducing bacterium, it was discussed for the influence of 16S rDNA target sequence from different primers on DGGE fingerprinting from the anaerobic active sludge diversity in ABR reactor. The sludge DNA in the reactor was isolated, four sets primers 341F/534R, 968F/1401R, 63F/534R, and 341F/926R was used to amplify 16S rDNA, and the resolution of DGGE fingerprinting, community diversity were analyzed. The result indicated that it was beneficial to the DNA extraction from sulfate reducing sludge by PBS washing sludge and sonic oscillation; by analysis of DGGE from different primers, there were obvious differences in community diversity. The target sequences from primers 341F/534R and 968F/1401R were isolated relatively well, that from primers 341F/926R was in common, and that from primers 63F/534R was the worst. The DGGE fingerprinting bands from primers 341F/534R were abundant with the best diversity, while that from 968F/1401R was not as well as the former, that from 341F/926R was in common, and that from 63F/534R was the least with worse diversity than the others. Primers 341F/534R and 968F/1401R are recommended to be used simultaneously to analyze anaerobic active sludge by DGGE.

Key words: DGGE; 16S rDNA; anaerobic sludge; community diversity

变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术是由 Fischer 等^[1]于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术. 1993 年 Muzyer 等^[2]首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究. 近年来 DGGE 被广泛用于油田污水^[3,4]、油泥、生物膜^[5]、土壤^[6]、生物反应器等环境样品的微生物多样性和种群动态演替研究. Cremonesi 等^[7]报道 DGGE 只能检测到微生物群落中数量上大于 1% 的种群, Vallaey 等^[8]发现 DGGE 并不能分离样品中所有的 DNA 片断. 应用 DGGE 指纹图谱分析环境样品时, 获得良好的分辨率和重现性

是重要的前提条件, 直接影响后续结果的分析. 影响 DGGE 的分辨率的因素很多, 主要来源于样品处理和电泳过程, 如 DNA (或 RNA) 提取效果、PCR 扩增效果、电泳时间、电泳温度、凝胶浓度、变性剂梯度、染色方法等. 应用 DGGE 分析时, 需要选择适宜的引物, 否则很难达到预期的效果. Watanabe 等^[9]报道利用不同的引物扩增 16S rDNA 靶序列在 DGGE 分析

收稿日期: 2007-04-13; 修订日期: 2007-06-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418505)

作者简介: 魏利 (1978 -), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物技术与工程, E-mail: weilihit@126.com

中的结果是不同的. 目前用于 DGGE 分析的引物主要是针对 16S rDNA 为靶基因的引物, 通过它的分析可以直接鉴定到属或种. 常用的引物是 341F/534R (V3 区)、968F/1401R (V6 ~ V8 区)、63F/534R (V1 ~ V3 区)、341F/926R (V3 ~ V5 区).

在反硝化抑制硫酸盐还原菌活性研究中, 向厌氧 ABR 反应器中投加硝酸盐, 抑制硫酸盐还原菌生长, 促进厌氧反硝化细菌的生长, 进而实现生态抑制. 本研究从厌氧生物反应器中获取活性污泥的 DNA, 以 4 对常用的引物进行 PCR 扩增, 通过变性梯度凝胶电泳技术获得 DGGE 指纹图谱, 探讨了不同引物对图谱分辨率和微生物种群多样性的影响, 从而筛选出适合厌氧活性污泥 DGGE 分析的最适引物.

1 材料与方法

1.1 污泥来源

污泥来源于厌氧 ABR 反应器, 污泥 COD 为 600 mg/L, Na₂SO₄ 为 900 mg/L, NaNO₃ 为 900 mg/L. 污泥取自代表性的 3 个单元格, 单元格 1 号为完全进行硫酸盐还原的污泥, 单元格 2 号为加硝酸盐初步实

现厌氧反硝化的污泥, 单元格 3 号为完全进行厌氧反硝化的污泥.

1.2 厌氧活性污泥 DNA 的提取和纯化

在厌氧 ABR 反应器中主要存在硫酸盐还原污泥和反硝化污泥, 其中硫酸盐还原污泥相对于反硝化污泥更加不易提取, 改良了污泥 DNA 的提取方法, 具体的操作方法为: ①将 1 mL 污泥振荡 5 min, 然后 3 000 r/min 离心, 留上清液; ②加入 2 倍体积的 10 × PBS 进行洗涤, 振荡 5 min, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液; ③加入 10 × PBS 缓冲液 100 μL, 然后超声 40 s; ④用华舜“DNA 小量细菌提取试剂盒”, 进行后续的 DNA 提取, 然后保存在 -20℃ 冰箱中.

1.3 不同引物的 PCR 体系和反应条件的优化

使用 MJ2000 型基因扩增仪, 以 4 对细菌 16S rDNA 的通用引物进行扩增 (见表 1), 引物由大连宝生物合成. PCR 反应体系 (20 μL) 如下: 10 × buffer 2.0 μL, 2.0 mmol/L dNTP 2 μL, 10 pmol/L 引物各 1 μL, Taq DNA 酶 0.3 μL, 模板 DNA 2.0 μL. PCR 扩增条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 52.0℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min, PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

表 1 16S rDNA 细菌 PCR 扩增引物

Table 1 16S rDNA universal primers of <i>Eubacteria</i>		
引物	序列(5'→3')	靶位点
63 F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	16S rDNA, 63 ~ 83
338 F	ACTCTACGGGAGGCAGCAG	16S rDNA, 338 ~ 357
341 F	CCTACGGGAGGCAGCAG	16S rDNA, 341 ~ 357
968 F	AACGCGAAGAACCTTAC	16S rDNA, 968 ~ 984
534 R	ATTACCGCGGCTGCTGG	16S rDNA, 508 ~ 534
926 R	CCGTCAATTC(A/C)TTTGA	16S rDNA, 904 ~ 926
1 401 R	GCGTGTGTACAAGACCC	16S rDNA, 1 395 ~ 1 401
GC clmap	CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGG	

1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 分析

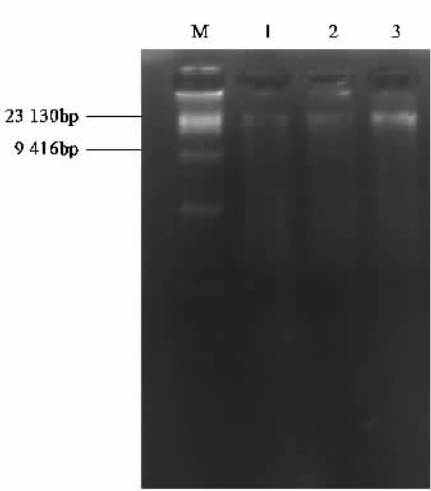
采用 Bio-Rad 公司 DcodeTM 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离. 使用梯度混合装置, 制备 6% ~ 12% 的聚丙烯酰胺凝胶, 338F/534R 引物的变性剂浓度从 30% ~ 60%, 968F/1401R、63F/534R、341F/926R 变性剂浓度为 40% ~ 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物). 上样量为纯化后的 PCR 样品 6 μL 和上样缓冲液 6 μL 混合后加入上样孔. 仪器温度设定为 60℃, 338F/534R 引物选择 150V 的电压下, 电泳时间 6 h, 其余 3 对引物 130 V 的电压下, 电泳时间 8 h. 电泳结束后, 将凝胶进行银染. 将染色后的凝胶用 UMAX Power Look 1 000 透射扫描仪扫描后保存.

2 结果与分析

2.1 厌氧污泥 DNA 的提取和 PCR 扩增

进行硫酸盐还原反应的污泥含有较高的硫酸盐、硫化物以及复杂的化学成分, 应用 PBS 缓冲液对污泥的洗涤有效地消除较高的背景值, 有利于后续的试剂盒的提取; 污泥中细菌的充分裂解是 DNA 提取的另一个重要的前提, Qiu 等^[10]的研究表明超声对细菌的裂解是一个很好方法, 试验确定适宜的超声时间为 40 s. 提取污泥 DNA 由图 1 所示, 3 个污泥样品的总 DNA 的大小约 20 kb, 可以直接用于 PCR 扩增, 4 对引物扩增产物的琼脂糖电泳结果如图 2 所示, 338F/534R 的片断为 200 bp 左右.

968F/1401R 为 450 bp 左右,63F/534R 为 510 bp 左右,341F/926R 为 630 bp 左右,扩增产物纯化后可以作为 DGGE 分析的样品.



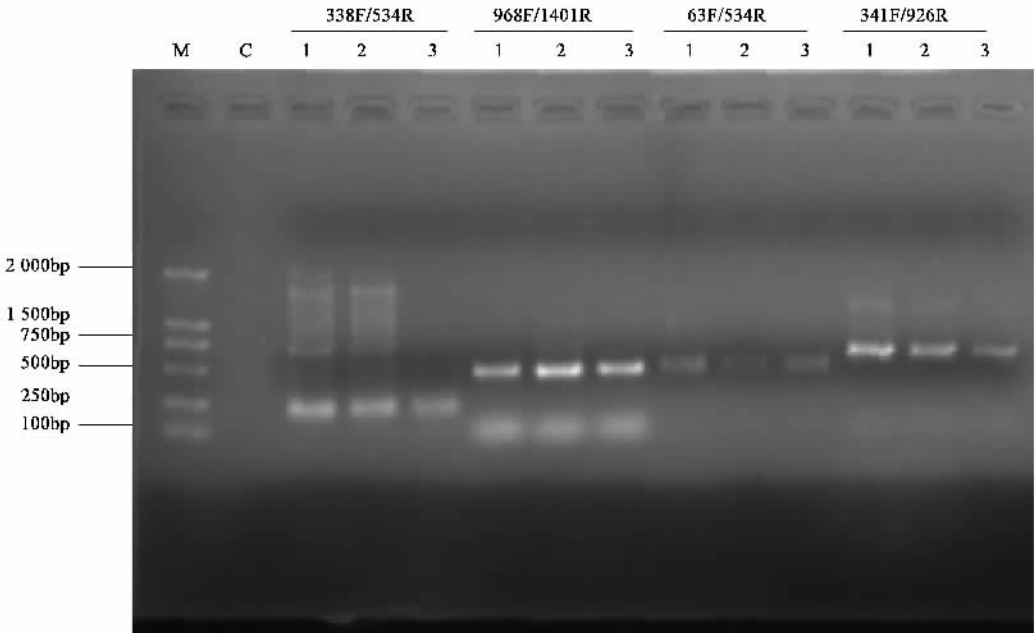
M: λ -Hind III; 样品: 1 号硫酸盐还原污泥; 2 号初步反硝化污泥; 3 号完全反硝化的污泥, 下同

图 1 厌氧污泥基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of sludge

2.2 群落动态变化与多样性分析

3 个单元格的污泥 DNA 模板分别以 4 对引物进行 PCR 扩增,获得的 DGGE 图谱如图 3 所示,不同引物呈现出较大差异,不同样品经过分离后呈现不同的指纹图谱,分离出的电泳条带数目不等,并且各个条带的信号强度不同.DGGE 的图谱中每个独立分离的条带通常是由同一个种属的细菌组成的,独立的条带被看作是一个操作分类单元 (operational taxonomy unit, OTU) 处理.在反应器运行过程中,不同时期的厌氧活性污泥微生物群落结构和种群数量不同.在演替过程中,既有原始种群的消亡,也有新种群的增强,也有始终处于优势的种群,种群的功能地位处于动态变化中,在图谱中存在共有的条带和特意性的条带.不同引物组合的 DGGE 图谱显示的群落动态也是不同的,引物 338F/534R 图谱的 1 号和 2 号相似性高,引物 968F/1401R 的图谱显示 2 号和 3 号相似性高.63F/534R 和 341F/926R 群落没有大的改变.由此可见采用不同引物对进行 DGGE 分析时,群落结构之间的相似性和动态是不一致的.



M: DL 2 000

图 2 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

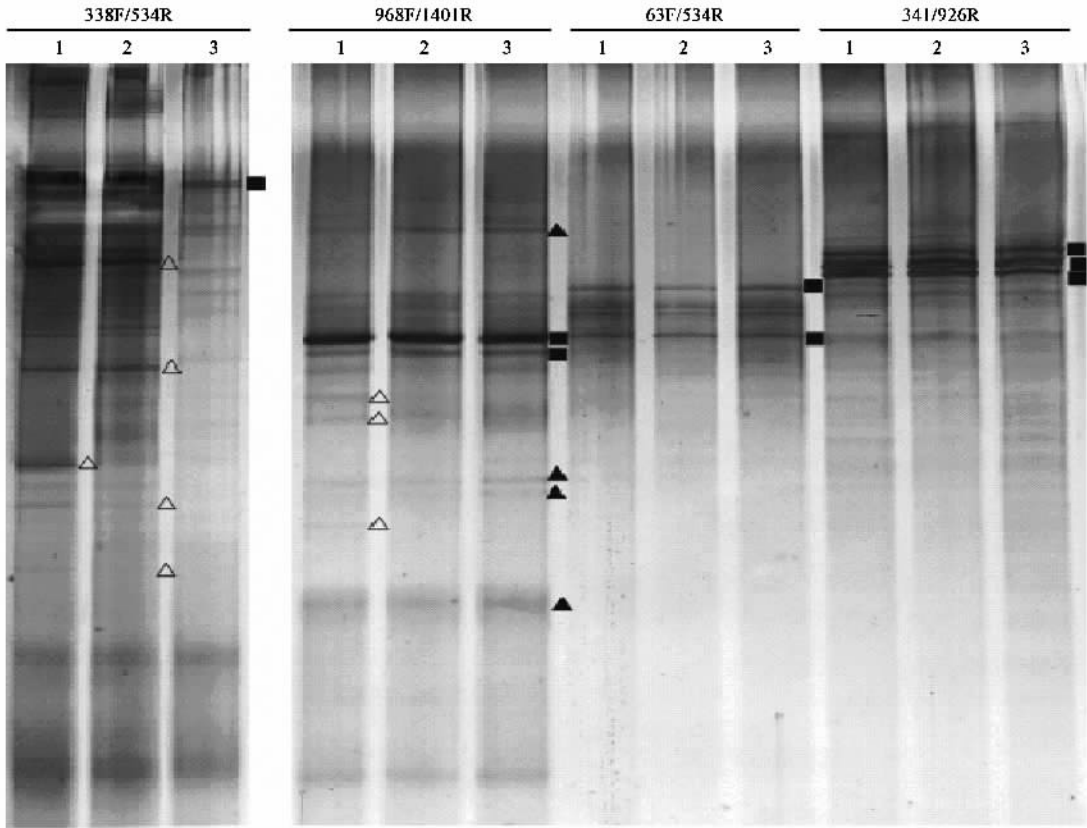
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

DGGE 可以很好地鉴别复杂的 16S rDNA 样品,条带的多少可以反映出群落的多样性,条带信号强弱,可以反映相对的数量.因此可以根据指纹信息确定不同活性污泥中所含有的微生物 OTU 和数量关系,得出微生物多样性的信息.不同引物扩增的靶序

列得到的微生物多样性是不同的,338F/534R 的 DGGE 图谱中条带丰富,多样性最好,968F/1401R 的 DGGE 图谱次之,341F/926R 的 DGGE 图谱条带较少,多样性也较差,63F/534R 图谱条带最少,多样性相对最差.比较 1 号样品的微生物多样性,发现

338F/534R图谱的多样性可达 20 个 OTU, 968F/1401R 的图谱为 14 个 OTU, 341F/926R 的图谱为 8 个 OTU, 63F/534R 的图谱为 7 条; 同样比较 3 号样品的微生物多样性时发现, 338F/534R 的图谱的多样性可达 13 个

OTU; 968F/1401R 引物图谱相对最好为 15 个 OTU; 341F/926R 的图谱的为 8 个 OTU, 63F/534R 的图谱为 7 条, 可见, 在进行 DGGE 分析时, 采用不同的 16S rDNA 靶序列获得的结果存在显著差异.



■为始终处于优势的种群; △为出现后逐级减弱种群; ▲为出现后逐级增强种群

图 3 不同引物扩增样品的 DGGE 分离图谱

Fig. 3 DGGE profile of PCR amplified products with different primers

DGGE 在分离片断大小为 200 ~ 500 bp 时效果较好, 所以引物 338F/534R 和 968F/1401R 获得的 16S rDNA 靶序列更容易分离. 虽然 338F/534R 的分离效果较好, 但是由于靶序列只有 200 bp 左右, 通常切胶回收测序的结果只能鉴定到属, 系统发育分类信息缺乏, 对于工艺系统中个别优势的种很难区分, 然而微生物多样性较为丰富. 968F/1401R 的靶序列为 450 bp 左右, 分类信息相对更为丰富, 能够鉴定到种, 能有效地确定工艺中的优势种, 多样性相对差一些. 在实际的工程应用中, 可以根据研究目的选择靶序列, 如果对于分类水平要求较高的, 可以选择 968F/1401R. 如果想获得更全面的实验结果最好同时进行 338F/534R 和 968F/1401R 的 DGGE 分析. 合理的选择样品的靶序列, 是成功进行 DGGE 分析的重要前提. 此外, 在分析微生物群落动态和多样性时, 引物的通用性是最重要的. 近几年发现一少部分

种属的细菌, 在 16S rDNA 的保守区域通常发生一定的变化, Watanabe 等^[11]引入了一些兼并性较好的稀有碱基, 获得了较好的效果. 目前, 进行复杂样品的特异种属细菌快速检测和功能基因的动态分析, 拓展了 DGGE 分析的研究领域. 可以根据研究的需要特意合成各种基因的引物, 在反硝化抑制硫酸盐还原菌的研究中, 针对厌氧 ABR 反应器, 可以进一步开展, 如氢化酶基因 (NiFe)^[12] 研究硫酸盐还原菌群动态变化, 亚硝酸还原酶基因^[13] 研究反硝化细菌的种群演替情况. 当选择了适宜的靶序列后, 同时对电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等因素进行考察, 才能获得较好的分离结果.

3 结论

(1) 在厌氧污泥的 DNA 提取过程中, 采用 PBS 缓冲液和超声振荡有利于硫酸盐还原污泥 DNA 的

提取.

(2)以 16S rDNA 为靶序列的 4 对引物对群落多样性和动态演替分析有显著影响.

(3)厌氧污泥 DGGE 图谱多样性研究中, 338F/534R 和 968F/1401R 的靶序列分辨率较好, 图谱中条带丰富, 多样性较好; 341F/926R 的靶序列分辨率一般, 63F/534R 图谱中条带最少, 多样性也最差. 建议同时采用引物 338F/534R 和 968F/1401R 进行多样性分析是比较适宜的.

参考文献:

- [1] Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, *et al.* Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, **37**: 463-464.
- [2] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rDNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695-700.
- [3] 余跃惠, 张学礼, 张凡, 等. 大港孔店油田水驱油藏微生物群落的分子分析[J]. *微生物学报*, 2005, **45**(3): 329-334.
- [4] 余跃惠, 张凡, 向廷生, 等. PCR-DGGE 方法分析原油储层微生物群落结构及种群多样性[J]. *生态学报*, 2005, **2**(25): 237-242.
- [5] Anthony G O D, Heike E G. 16S rDNA methods in soil microbiology [J]. *Curr Opin Biotech*, 1999, **10**: 225-229.
- [6] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rDNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community [J]. *Appl Envir Microbiol*, 1996, **62**: 340-346.
- [7] Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, *et al.* Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations [J]. *Biotechniques*, 1997, **22**: 326-330.
- [8] Vallaes T, Topp E, Muyzer G, *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **24**: 279-285.
- [9] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. *J Microbiol Methods*, 2001, **44**: 253-262.
- [10] Qiu X L, Wu H H, McDonel P E, *et al.* Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rDNA gene-based cloning [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 880-887.
- [11] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. *J Microbiol Methods*, 2001, **44**: 253-262.
- [12] Wawer C, Muyzer G. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of (NiFe) hydrogenase gene fragments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 2203-2210.
- [13] Sharma S, Aneja M K, Mayer J, *et al.* Diversity of Transcripts of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) in Rhizospheres of Grain Legumes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(4): 2001-2007.