

活性污泥高质量 RNA 快速提取方法研究

金敏, 赵祖国, 邱志刚, 王景峰, 陈照立, 谌志强, 李超, 王新为, 董彦, 李君文*

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所环境卫生与卫生工程研究室, 天津 300050)

摘要 通过比较 RNA 产量、纯度、降解程度、特定基因的扩增能力、微生物多样性等评价指标, 考察和探讨了 5 种不同 RNA 提取方法对活性污泥总 RNA 提取效果的影响并最终建立了一种快速、有效的活性污泥 RNA 提取方法, 即在 TENP 和 PBS 洗涤沉淀污泥的基础上, 分别采用溶菌酶和 TRIzol 裂解活性污泥细菌、氯仿去除细菌裂解液中的蛋白和大部分 DNA、异丙醇沉淀核酸和 DNase I 水解残留 DNA 后, 最后进一步用离心柱纯化 RNA。结果表明, 这种方法可以有效提取高质量的菌群 RNA, 不仅提取的 RNA 总量多(每 g 污泥可提取 169.6 μ g RNA)、纯度高、降解程度低、完整性好、具有丰富的生物多样性, 而且可同时进行 16S rRNA 和 *amoA* 基因的 RT-PCR 扩增反应; 与其它方法相比, 性价比高, 具有明显的优越性, 适用于活性污泥 RNA 的大量提取, 同时, T-RFLP 结果证明 RNA 提取方法对分析样品的微生物种类和丰度分析结果影响较大, 不同的 RNA 提取方法所获得的微生物群落基因多样性及其种类、丰度均不同。本研究建立了一种快速、有效的高质量 RNA 提取方法, 将在监测活性污泥菌群动态变化、菌群代谢功能学、微生物群落芯片等研究上具有重要意义。

关键词 活性污泥; RNA; 菌群; 提取; T-RFLP

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 0250-3301(2010)01-0260-06

Rapid Method to Extract High-Quality RNA from Activated Sludge

JIN Min, ZHAO Zu-guo, QIU Zhi-gang, WANG Jing-feng, CHEN Zhao-li, SHEN Zhi-qiang, LI Chao, WANG Xin-wei, DONG Yan, LI Jun-wen

(Department of Environmental Health and Engineering, Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract An effective and fast RNA isolation method of activated sludge was established and five different methods were compared based on RNA yield, purity, integrity, RT-PCR amplification of 16S rRNA genes and subsequent terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. That is, the precipitated activated sludge was washed with TENP and PBS buffer, followed by using lysozyme and TRIzol to direct lysis of microbial cells, chloroform to remove protein and most of the DNA from bacterial lysate, isopropanol to precipitate nucleic acid and DNase I to hydrolyze residual DNA. To further purify RNA, RNA purifying column was utilized. The results demonstrated that the extraction method, with the aid of TRIzol and RNA purification kit, can effectively extract high-quality RNA. It not only means low degradability and high quantity, purity and diversity, but also the genes of 16S rRNA and *amoA* can be amplified by RT-PCR. Compared with other methods, it showed great advantage of low cost and high efficiency and can be applied to RNA extraction of activated sludge in a large number. Furthermore, T-RFLP results indicated that the community composition as well as the abundance of individual members was affected by the kind of RNA extraction methods. This work established a rapid and effective method to extract high-quality RNA from activated sludge and would show great potential for monitoring microbial changes and studying metabolism and community array of activated sludge.

Key words activated sludge; RNA; bacterium community; extraction; T-RFLP

活性污泥群落芯片是一种基于系统寡核苷酸芯片而发展起来的新型基因芯片, 它由活性污泥代表细菌的特异性探针所组成, 通过分析不同活性污泥样品与群落芯片的杂交信号变化, 获得菌群变化的详细情况从而了解菌群分布与污泥功能之间的关系^[1]。其中, 为了及时监测和反映活性污泥菌群种类的动态变化, 必须获得高质量的活性污泥 RNA。但由于活性污泥具有高度的生物多样性且成分极其复杂, 不仅含有重金属、腐殖酸等有机污染物, 还存在大量核糖核酸酶(RNase), 因此从活性污泥中提取 RNA 存在一定难度。目前已报道的环境样品 RNA 提取方法主要是针对土壤、沉积物等^[2~9], 而活性污泥

与这些环境样品的特性不同, 不仅生物量大, 而且存在菌胶团, 因此这些方法并不太适用成分复杂的活性污泥。虽然目前也有少量活性污泥 RNA 提取方法的研究, 但操作仍然相对复杂或使用特殊的珠磨仪器^[10,11]。另外, 不同的提取方法获得的微生物群落基因多样性及其种类、丰度均不同^[12~14], 因此必须建立一种快速而有效、全面反映微生物多样性的活性污泥 RNA 提取方法。本研究采用不同原理破壁、不

收稿日期 2009-03-02 修订日期 2009-05-05

基金项目 国家自然科学基金项目(30771779)

作者简介 金敏(1977~), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为环境微生物, E-mail jiminzh@126.com

* 通讯联系人, E-mail junwen9999@hotmail.com

同方式纯化 RNA 的细菌 RNA 提取试剂盒或已报道方法,对活性污泥 RNA 提取方法进行了探讨,以期今后了解菌群分布与污泥功能关系并建立反映活性污泥菌群变化的活性污泥群落芯片研究奠定可靠的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 活性污泥

活性污泥样品取自天津市纪庄子污水处理厂污水处理池。

1.1.2 其它材料

Msp I 购自 NEB 公司;AMV、dNTP、DEPC、RNase 抑制剂、随机引物、DNase I、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;细菌 RNA 提取试剂盒分别购自 Omega、Invitrogen、中国某科技有限公司;TRIzol 购自中国全式金公司;Taq mixture、RNA 纯化试剂盒购自中国天根公司;SDS、溶菌酶购自 Sigma 公司;引物合成由 Invitrogen 公司完成。

1.2 RNA 的提取

1.2.1 样品的洗涤

取 10 mL 活性污泥于 15 mL 的灭菌离心管中离心 5 min (8 000 r/min, 4℃), 弃上清后, 向管内加入 3 g 灭菌玻璃珠 (直径 2 ~ 3 mm) 和适量 TENP (Tris 50 mmol/L, EDTA 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, PVP 1%), 将离心管管盖拧紧后置于旋涡混合器击打 5 min 以解絮凝并洗涤污泥除去腐殖酸, 离心 5 min (8 000 r/min, 4℃), 弃上清, 重复处理 1 次后, 用 PBS 洗涤污泥 1 次, 沉淀用于细胞裂解。

1.2.2 RNA 的提取和纯化

(1) Bodrossy 改进方法

参照 Bodrossy 等^[4]方法并进行适当调整。取一定量预处理后的污泥样品并加入溶菌酶 (20 mg/mL) 于 37℃ 作用 10 min 后, 加入 1 mL TRIzol, 漩涡振荡 5 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清加入 200 μ L 氯仿, 漩涡振荡 15 s 后, 室温放置 2 min 并于 10 000 r/min 离心 10 min; 取上清并加入等体积异丙醇, -20℃ 放置 20 min; 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 75% 乙醇洗涤沉淀后, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清并风干沉淀; 经少量 DEPC 处理水溶解核酸沉淀后, 加入 DNase I (RNase free) 30 U 和 RNase 抑制剂 40 U, 并于 37℃ 作用 15 min, 进一步采用 RNA 纯化试剂盒纯化 RNA。其中, 所有耗材都要经过 DEPC 处理及高压灭菌。

(2) 试剂盒方法

选择 Omega 公司的 E.Z.N.A 细菌 RNA 提取试剂盒、Invitrogen 公司的 PureLink™ Micro-to-Midi 细菌 RNA 提取试剂盒、中国某公司的 Intek™ 细菌总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 作为比较研究, 操作方法参见各试剂盒的说明书。此 3 种试剂盒 RNA 均采用 DNase I 水解 DNA 和离心柱纯化 RNA 的方法, 不同之处主要在于细菌裂解方式, 其中, Omega 公司的 E.Z.N.A 细菌 RNA 提取试剂盒主要采取溶菌酶、玻璃珠研磨和自配化学裂解液相结合的方法; Invitrogen 公司的 PureLink™ Micro-to-Midi 细菌 RNA 提取试剂盒主要采取溶菌酶、SDS 和自配化学裂解液相结合的方法; 而中国某公司的 Intek™ 细菌总 RNA 提取试剂盒只采用了溶菌酶和自配化学裂解液相结合的方法。

(3) Bodrossy 方法

参照文献[4]进行 RNA 的提取, 它主要是利用珠磨器和化学处理裂解细菌, 再以酚氯仿抽提纯化 RNA。

1.3 RNA 的提取效率及质量评价

1.3.1 RNA 的降解程度

所得 RNA 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察 RNA 产物的降解程度。

1.3.2 RNA 的纯度和含量

通过测定样品在 260 nm 和 280 nm 下的吸光度值并计算 $D_{260\text{ nm}}$ 与 $D_{280\text{ nm}}$ 的比值确定样品的纯度; RNA 含量按公式计算: RNA 含量 (ng/ μ L) = $40 \times D_{260\text{ nm}}$ 。

1.3.3 RT-PCR 扩增

选用 *amoA* 基因和 16S rRNA 为 PCR 扩增基因, 观察 rRNA 和 mRNA 的提取情况, 同时检查 RNA 中的酶抑制剂情况^[1,2]。其中, 反转录 (RT) 采用 20 μ L 体系并利用随机引物获得总 cDNA, 其中, 5 $\times$ AMV buffer 4 μ L; 随机引物 (10 pmol/ μ L) 1 μ L; dNTP (10 pmol/ μ L) 2 μ L; AMV (5 U/ μ L) 1 μ L; RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L; 模板 (RNA) 1 μ L; 其余为 DEPC 处理水。16S rRNA 基因所用引物为 8f (5'-AGAGTTTGAT-CCTGGCTCAG-3', 5' 标记羧基二乙酸荧光素) 和 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTTTRAGTTT-3'), *amoA* 基因所用引物为 1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGCT-3') 和 2R [5'-CCCCTC (G/T) G (G/C) AAAGCCTTCTTC-3'], 其 PCR 扩增均采用 50 μ L 体系, 反应体系为: cDNA 模板 2 μ L; Taq mixture 25 μ L; 引物各 1 μ L; 其余为双蒸水; PCR 条件为 94℃ 预变性 5 min, 然后进入 30 个循环

(94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 3 min),最后在 72℃ 下延伸 5 min. PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.3.4 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)分析

纯化后的 16S rRNA PCR 产物用 *Msp*I(NEB)消化,反应体系 20 μL,其中 *Msp*I 8U,10 × buffer 2 μL,DNA 200 ng.37℃ 下消化 2 h,然后升温至 65℃ 将酶灭活 10 min^[1].

取酶切产物在 ABI 310 遗传分析仪上进行毛细管电泳,获得每个样品的 T-RFLP 分析图谱.利用 Peak Scanner™1.0 软件将电泳结果与 DNA 片段长度标准进行对比,从而确定每个 T-RF 的长度和丰度.以片段大小 > 50 bp,峰高大于 50 荧光单位时视为有效数据.

2 结果与分析

2.1 RNA 产物的浓度和纯度

5 组总 RNA 产物的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、产率(每 g 污泥中的 RNA 量)和纯度($D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$)如表 1 所示.

由表 1 可知,经过预处理后的各实验组 RNA 纯度都较好,均在 1.8 左右,但产率却不相同,其中,Bodrossy 改进方法(4 组)与 Invitrogen 公司的试剂盒(1 组)提取的 RNA 产率相近,为最高值,其次是 Omega 公司试剂盒(3 组)而中国某公司的试剂盒(2 组)和 Bodrossy 方法(5 组)RNA 产率最低.不同试剂盒提取的核酸产量差别较大,这可能主要是由于它们对细菌的破壁处理方法不同,除试剂盒本身配带的裂解液外,1 组进一步采用溶菌酶处理和 SDS 化学裂解细菌,3 组进一步采用溶菌酶和玻璃珠的机械研磨破壁,而 2 组只采用溶菌酶进一步处理细菌,另外,不同试剂盒各自配带的离心柱对 RNA 的回收效率也影响 RNA 的最终产量.

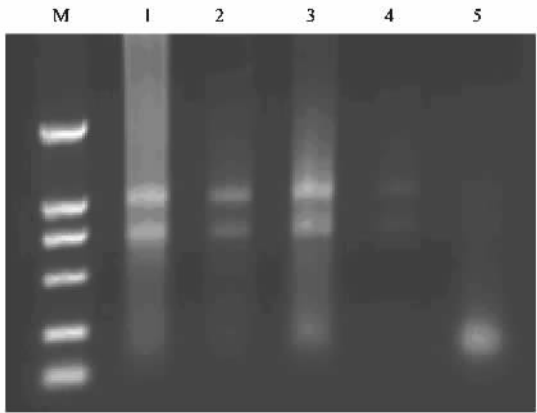
表 1 RNA 产物的浓度、产率和纯度

Table 1 Concentration, yield and purity of RNA products obtained with different isolation methods			
实验分组	浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	产率 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	纯度
1	84	168	1.826
2	39	78	1.838
3	58	116	1.820
4	84.8	169.6	1.886
5	40.6	81.2	1.821

2.2 RNA 降解程度

由图 1 可知,Bodrossy 方法提取的 RNA 几乎全

部降解,成为 100 bp 左右的小片段,而采用试剂盒或 Bodrossy 改进方法提取的 RNA 降解程度较少,23S 和 16S 条带均较亮.研究结果表明,样品的整个 RNA 提取时间尤其是 RNA 的纯化时间对 RNA 的降解程度影响最大.在本研究中,不同方法获得 RNA 的时间差别较大,且差异时间主要是由其 RNA 纯化方法决定的.其中,第 1 组、第 2 组、第 3 组大约耗费时间 1 h,第 4 组大约耗费 2 h,而第 5 组则需要 4~5 h.第 5 组采用的是传统的有机试剂抽提 RNA 的纯化手段,不仅 RNA 几乎全部降解,而且花费时间较长,操作复杂,而第 4 组对第 5 组方法进行改进,采用离心柱纯化 RNA, RNA 降解程度则明显降低,因此,对于活性污泥菌群的 RNA 纯化,宜采用离心柱式,而不宜采用传统有机试剂抽提和异丙醇沉淀.



1. 细菌 RNA 提取试剂盒(Invitrogen) 2. 改进的方法;
3. 细菌 RNA 提取试剂盒(Omega) 4. 细菌 RNA 提取试剂盒
(China) 5. Bodrossy 方法 M:DL2000(从上到下依次为:
2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp)

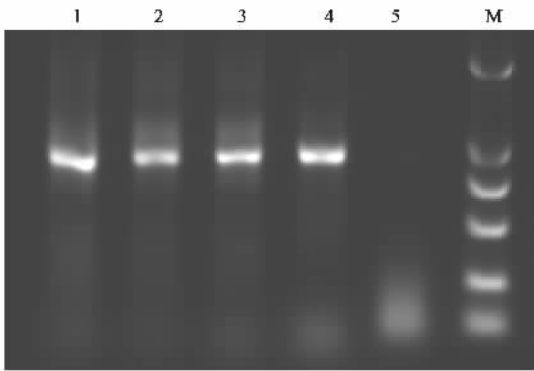
图 1 不同方法提取的 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RNA
extracted by different methods

2.3 RT-PCR 扩增

将 5 种方法提取的 RNA 分别进行 *amoA* 和 16S rRNA 基因的 RT-PCR 扩增.对于 16S rRNA 基因,除 Bodrossy 方法外,其它方法均扩增出了大小为 1 000 bp 左右的目的条带(图 2),而对于 *amoA* 基因,除 Bodrossy 方法和某国产试剂盒,其它方法均扩增出了大小为 500 bp 左右的目的条带(图 3).这表明 Bodrossy 方法提取的 RNA 不仅降解严重,而且无法进行目的基因的 PCR 扩增,而某国产试剂盒提取的 RNA 虽能扩增 rRNA,但可能由于提取的目的 mRNA 较少,因而也没有获得目的表达基因的 PCR 产物;其它方法获得的 RNA 完整性和纯度均较高,可直接

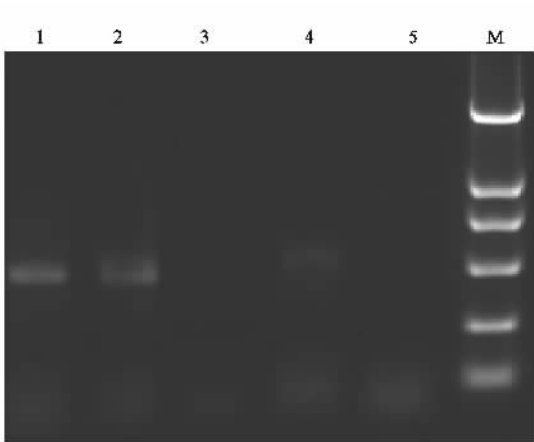
用于 rRNA 和 mRNA 的 RT-PCR 扩增,且获得的扩增产物在产量上无明显差别.



1. 细菌 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen) 2. 细菌 RNA 提取试剂盒 (China) 3. 细菌 RNA 提取试剂盒 (Omega) 4. 改进的方法; 5. Bodrossy 方法 M: DL2000 (从上到下依次为 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp)

图 2 不同方法提取 RNA 的 16S rRNA RT-PCR 结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of 16S rRNA RT-PCR products obtained with different isolation methods



1. 细菌 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen) 2. 改进的方法; 3. 细菌 RNA 提取试剂盒 (China) 4. 细菌 RNA 提取试剂盒 (Omega) 5. Bodrossy 方法 M: DL2000 (从上到下依次为: 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp)

图 3 不同方法提取 RNA 的 *amoA* 基因 RT-PCR 结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of *amoA* RT-PCR products obtained with different isolation methods

2.4 T-RFLP 分析

由图 4 和表 2 可见,活性污泥中的微生物种类较多,而且不同方法获得的多样性及其种类、丰度均不同.细菌 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen)、细菌 RNA 提取试剂盒 (中国某公司)、细菌 RNA 提取试剂盒 (Omega)、改进 Bodrossy 方法 (分别为 1 组、2 组、3 组和 4 组) 获得的有效 T-RF 分别为 46、37、42、42 个,且均主要分布 50 ~ 100、100 ~ 200、400 ~ 500 bp.

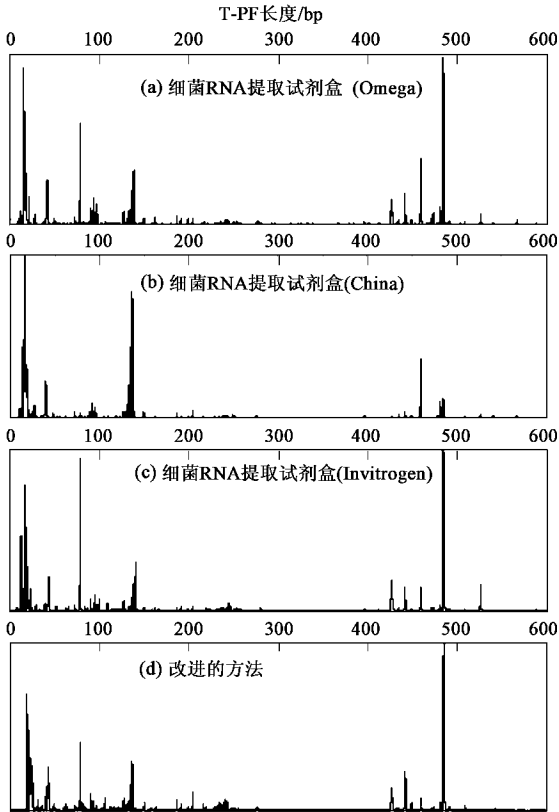


图 4 不同方法提取 RNA 的菌群 T-RFLP 检测图谱

Fig.4 Electropherograms of the bacterial community T-RFLP obtained with different isolation methods

3 讨论

活性污泥是一种十分复杂的环境样品,它是由细菌等微生物和原生动物、后生动物等微型动物组

表 2 不同 RNA 分离方法 T-RFLP 分析结果

实验分组	T-RF 大小分布比例/%				主要 T-RF 大小/bp	T-RF 数目/个
	50 ~ 100 bp	101 ~ 200 bp	401 ~ 500 bp	其它		
1	25	16	49	10	485	46
2	10	52	30	8	136	37
3	22	20	54	4	485	42
4	15	19	54	12	485	42

成的生态系统与胶体物质结合所形成的絮状体颗粒,因此,活性污泥具有菌群结构多样、菌群功能复杂等特点. 为了研究活性污泥菌群分布与功能的关系以及环境因素改变对其微生物生态的影响,了解活性污泥群落结构及其动态变化,获得与活性污泥状态与功能息息相关的关键微生物或活性污泥性能评价的指示微生物具有十分重要的意义. 目前有关活性污泥菌群研究所采用的分子生物学手段几乎都是基于 DNA 水平的^[16~18],虽能反映微生物群落的多样性,但由于死细菌 DNA 降解速度较慢,因而采用 DNA 进行 16S rDNA 基因扩增仍然可能扩增出死细菌的相关产物,因此不能及时反馈活性污泥细菌多样性的动态变化. 由于 RNA 具有快速降解性,死亡细菌的 RNA 在其菌体死后可快速降解,因此基于 RNA 研究活性污泥微生物群落更能准确而敏感的揭示活性污泥细菌多样性及其变化,更适于监测活性污泥的群落变化,研究污泥菌群分布与功能的关系. 另外,随着活性污泥细菌的功能学研究日益收到重视,如何获得完整而高质量的 mRNA 成为其关键.

有关活性污泥 DNA 提取的报道较多^[19~22],但活性污泥 RNA 提取方法报道较少,这主要是由于活性污泥成分极其复杂,不仅含有重金属、腐殖酸等有机污染物,还大量存在 RNase、RNA 反转录酶抑制剂等,另外,与真核生物不同,细菌 mRNA 的半衰期短,仅 1~3 min(哺乳类动物 mRNA 的半衰期为 4~6 h)^[23]. 黎秋华等^[10]建立了一种经济的活性污泥 RNA 提取方法,但操作仍然相对复杂,而 Yu 等^[11]虽然建立了一种可同时提取活性污泥 DNA 和 RNA 的技术,但需要珠磨器等特殊仪器. 目前,环境样品 RNA 的提取研究主要针对土壤,如 Hurt 等^[2]首先利用液氮研磨和化学处理等方法裂解细菌,再利用 RNA/DNA 分离系统(Qiagen)建立了一种可以同时提取土壤 DNA 和 RNA 的方法;Burgmann 等^[3]则建立了利

用珠磨器和化学处理裂解细菌,再以酚氯仿抽提纯化 RNA 的土壤 RNA 提取方法;Ogram 等^[5]利用反复冻融和化学裂解相结合裂解细菌,再以酚氯仿抽提纯化土壤细菌 RNA. 不同的方法利用不同的原理裂解细菌,因此其裂解细菌的种类具有一定选择性和偏向性并最终影响微生物多样性分布,如 Sessitsch 等^[12]提取了土壤 RNA 并通过 T-RFLP 比较了不同方法的微生物多样性分布,结果表明提取方法对菌群多样性的影响较大;而 Picard 等^[13]的研究表明也土壤微生物总 DNA 提取方法不同,其微生物细胞裂解程度也不同,并明显影响微生物多样性的检测结果. 因此,有必要选择一种操作相对简单、能够代表活性污泥菌群分布和功能的活性污泥 RNA 提取方法.

本研究结果表明,利用不同手段破壁的 3 种试剂盒虽然在 RNA 产量上差异较大,但操作时间、RNA 完整性、16S rRNA 目的基因扩增方面无明显差异. 而 Bodrossy 建立的 RNA 提取方法采用的是传统的核酸抽提和 RNA 纯化方法,虽然获得核酸量大,但几乎全部被降解,不能扩增出目的基因,而且操作相对复杂,周期长. 因此,本研究以 Bodrossy 建立的 RNA 提取方法为基础,对其进行了适度修改:采用溶菌酶、TRIzol 和氯仿结合进行细胞的裂解和抽提不仅可有效破壁,而且经简单的离心分离就可直接除去大部分 DNA;采用离心柱纯化 RNA,不仅明显减少操作时间,而且获得的 RNA 在产量、性能、微生物多样性等方面均较好. 另外,该方法最大优点在于样品的处理不受样品所含菌量的限制(一般试剂盒只能提取 10⁹ 个细菌/样品),可一次大量处理样品. 同时,本研究的结果证明 RNA 提取方法对所获得的微生物种类和丰度影响较大,不同的提取方法获得的微生物群落基因多样性及其种类、丰度均不同. 表 3 为各种提取方法的比较结果,可以看出,本研究建立的活性污泥 RNA 提取方法(4 组),在各方面均获

表 3 活性污泥 RNA 提取方法综合评价

Table 3 Comprehensive evaluation of RNA isolation methods from activated sludge								
分组	评价指标							
	产率 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	降解 程度 ¹⁾	PCR ²⁾		$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	T-RF /个	时间 /h	成本 (元/样本)
			16S	<i>amoA</i>				
1	168	+ -	+	+	1.826	46	1	50
2	78	+ -	+	-	1.838	37	1	25
3	116	+ -	+	+	1.820	42	1	32
4	169.6	+ -	+	+	1.886	42	2	25
5	81.2	+ + +	-	-	1.821	-	4 ~ 5	12

1)“+ -”略有降解;“+ + +”严重降解;2)“+”能扩增出目的基因;“-”不能扩增出目的基因

得较好效果,适用于活性污泥 RNA 的大量提取。

4 结论

建立了一种高质量 RNA 快速、有效提取方法,该方法提取的 RNA 不仅纯度高、产率大、降解程度低、获得微生物种类丰富,而且还可以进行 rRNA 和 mRNA 的 RT-PCR 扩增。该方法可用于活性污泥菌群动态分析、细菌功能学研究,将为下一步构建 16S rRNA 文库和制备活性污泥群落芯片奠定基础。

参考文献:

- [1] 金敏,李君文. 基因芯片技术在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1466-1471.
- [2] Hurt R A, Qiu X, Wu L, *et al.* Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4495-4503.
- [3] Burgmann H, Widmer F, Sigler W V, *et al.* mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(4): 1928-1935.
- [4] Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Konrad-Koszler M, *et al.* mRNA-based parallel detection of active methanotroph populations by use of a diagnostic microarray[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(2): 1672-1676.
- [5] Ogram A, Sun W, Brockman F J, *et al.* Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(2): 763-768.
- [6] Fleming J T, Yao W H, Saylor G S. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3698-3706.
- [7] Cho J C, Tiedje J M. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(12): 5448-5456.
- [8] Zoetendal E G, Booijink C C, Klaassens E S, *et al.* Isolation of RNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 954-959.
- [9] Tsai Y L, Park M J, Olson B H. Rapid Method for Direct Extraction of mRNA from Seeded Soils[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(3): 765-768.
- [10] 黎秋华,李平,陈忠正,等. 活性污泥高质量总 RNA 提取的一种有效方法[J]. 陕西科技大学学报, 2008, 26(4): 69-73.
- [11] Yu Z, Mohn W. Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 45: 269-272.
- [12] Sessitsch A, Gyamfi S, Stralis-Pavese N, *et al.* RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols[J]. J Microbiol Methods, 2002, 51(2): 171-179.
- [13] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, *et al.* Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(9): 2717-2722.
- [14] 李鹏,毕学军,汝少国. DNA 提取方法对活性污泥微生物多样性 PCR-DGGE 检测的影响[J]. 安全与环境学报, 2007, 7(2): 53-57.
- [15] Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [16] 赵继红,何淑英,李继香,等. PCR-DGGE 分析啤酒废水生物处理工艺的微生物区系[J]. 环境科学, 2008, 29(10): 2950-2955.
- [17] Ki D, Park J, Lee J, *et al.* Microbial diversity and population dynamics of activated sludge microbial communities participating in electricity generation in microbial fuel cells[J]. Water Sci Technol, 2008, 58(11): 2195-2201.
- [18] Kraigher B, Kosjek T, Heath E, *et al.* Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors[J]. Water Res, 2008, 42(17): 4578-4588.
- [19] Otawa K, Lee S H, Yamazoe A, *et al.* Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes[J]. Microb Ecol, 2007, 53(1): 143-152.
- [20] Shan G, Jin W, Lam E K, *et al.* Purification of total DNA extracted from activated sludge[J]. J Environ Sci, 2008, 20(1): 80-87.
- [21] Purohit H J, Kapley A, Moharikar A A, *et al.* A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants[J]. J Microbiol Methods, 2003, 52(3): 315-323.
- [22] Bourrain M, Achouak W, Urbain V, *et al.* DNA extraction from activated sludges[J]. Curr Microbiol, 1999, 38(6): 315-319.
- [23] Belasco J G, Nilsson G, von Gabain A, *et al.* The stability of *E. coli* gene transcripts is dependent on determinants localized to specific mRNA segments[J]. Cell, 1986, 46(2): 245-251.