

# 可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究

高平平<sup>1</sup>, 赵立平<sup>2\*</sup>

(1. 山西大学生物工程实验室, 太原 030006; 2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

**摘要:** 活性污泥样品经液氮速冻、沸水浴融化、溶菌酶处理和 SDS 裂解后, 99% 以上细胞裂解。所提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测和荧光法浓度测定, 其片断大小在 20kb 左右, 产量可达  $1.756 \pm 0.1$  mg/g MLSS。样品  $ABS_{260nm}/ABS_{280nm}$  的比值为  $1.96 \pm 0.2$ 。以提取的总 DNA 为模板, 进行细菌核糖体小亚基 16S rDNA 基因 V3 区和多组分苯酚羟化酶大亚基基因(LmPHs)的 PCR 扩增, 均获得成功, 为活性污泥中微生物群落的分子生态学研究提供了一种简便、可靠的 DNA 提取方法。

**关键词:** 活性污泥; DNA 提取; PCR 扩增

## DNA Extraction from Activated Sludge for Molecular Community Analysis

GAO Ping-Ping<sup>1</sup>, ZHAO Li-Ping<sup>2</sup> (1. Shanxi Key Lab. of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(11): 2015~2019.

**Abstract:** A rapid and less instrument-dependent protocol for direct extraction of DNA from activated sludge sample was developed. To optimize the cell lysis step, four cell lysis treatments (Freeze-thaw, lysozyme, SDS, and thermal shock + lysozyme + SDS) were used to disrupt dispersed cells and release DNA. The efficiency of cell lysis was assessed microscopically after each treatment step. The quality and quantity of extracted DNA was determined by using both agarose gel electrophoresis and spectrophotometric measurement. PCR amplification for 16S rDNA and LmPHs (large subunit of phenol hydroxylase) were performed to determine if the DNA was of high enough quality for bacterial community structure and diversity analysis. Results showed that the combination of freeze-thaw, lysozyme incubation and SDS lysis was the most efficient one, leading to more than 99% cell disruption. Isolated DNA was over 20kb in size and DNA yield of  $1.756 \pm 0.1$  mg · g<sup>-1</sup> MLSS was achieved. The  $ABS_{260nm}/ABS_{280nm}$  of DNA sample was  $1.96 \pm 0.2$ , which indicated that the extracted DNA was essentially free from protein contaminants. The successful amplification of V3 region of 16S rDNA, and fragment of the large subunit of the phenol hydroxylase (LmPHs) further demonstrated that the DNA samples were free of inhibitors that interfere with PCR analysis. This protocol has potential for molecular microbial ecology work in activated sludge systems.

**Key words:** activated sludge; DNA extraction; PCR amplification

文章编号: 1000-0933(2002)11-2015-05 中图分类号: Q938.1 文献标识码: A

基金项目: 国家“863”高科技研究发展计划资助项目(SZ-03-01-04, 2001AA214131)

收稿日期: 2001-11-25; 修订日期: 2002-08-18

作者简介: 高平平(1957~), 女, 山西洪洞人, 博士。主要从事微生物分子生态学研究。

\* 通讯作者: 赵立平, E-mail: lpzhao@mail.sjtu.edu.cn

微生物分子生态学是通过分析样品中 DNA 分子的种类、数量等基因组信息来反映微生物细胞种类与种群比例等信息的。用这种方法对环境微生物多样性、群落结构及变化规律进行研究始于 20 世纪 80 年代中期,近年来在土壤、海洋、动物肠道等微生态系统的研究中得到快速发展,已成为最富于活力的生态学科前沿领域之一。由于摆脱了培养方法的局限性,直接对环境样品中的细菌基因组 DNA 组成状况进行分析评价,因此建立高效、可靠的 DNA 提取方法成为研究者关注的热点。有关从土壤、水体、海洋沉积中提取 DNA 的方法已得到较好发展<sup>[1,2]</sup>,但对从活性污泥中提取 DNA 的方法研究较少。

活性污泥是由许多细菌组成并通过胞外聚合物和离子桥作用形成的絮状结构,是生物方法处理工业和城市污水的主体。了解细菌区系和种群数量,认识细菌群落的稳定性和一些功能菌在有害物降解中的功能和作用对提高活性污泥处理效果具有重要意义。

由于活性污泥细菌种类组成复杂且混杂有大量有毒物质,如何使所有细胞裂解、充分释放 DNA,有效去除杂质,得到可以进行分子生物学操作的高纯度 DNA 是研究活性污泥种群结构与功能关系的关键所在。为此,本文对国外报道的方法进行了改进<sup>[8]</sup>,建立了不需购置专用设备、细胞裂解完全、快速、简便的 DNA 提取方法,所得到的 DNA 可以满足分子生态学研究的需要。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 活性污泥来源和特点 活性污泥样品取自太原某焦化厂污水处理厂第 1 曝气池和第 2 曝气池(TJ1 和 TJ2),其中第 1 曝气池活性污泥为降解有害物的主体,对酚类化合物和氰化物的去除率分别为 99.1%~99.8%和 91.1%~98.2%,COD<sub>Cr</sub> 的去除率最高为 73.38%。样品采集后,1L 活性污泥进行悬浮物浓度(MLSS)测定,其它 4℃ 保存 1~2d 用于 DNA 提取。

1.1.2 菌株 DH5α (*E. coli.*)和芽孢杆菌 YK-IR (*Bacillus* sp)取自山西大学生物工程实验室菌种库。

1.1.3 回收细菌所用培养基 LB; dCGY 和 MP 培养基配方见参考文献<sup>[3]</sup>; 含酚焦化废水培养基(feed water medium, FWM)配制方法如下:取经调节池调节,尚待处理的焦化废水(TJ)1L;高速离心(10 000×g, 5 min)后,将上清液过滤除菌(0.22μm 细菌滤膜),测定生废水苯酚含量,用化学纯苯酚将 FWM 中的苯酚量调整到 300mg/L。将含有 1.8g 琼脂粉的三角瓶灭菌(121℃, 0.105 MPa, 25min),取 100ml 的无菌废水加入到灭菌的三角瓶中,微波炉加热溶解后倒平板。

1.2 方法

1.2.1 MLSS 测定 100ml 活性污泥用 0.45μm 玻璃纤维滤膜过滤,103~105℃ 烘干至恒重后称重。

1.2.2 活性污泥 DNA 提取 (1)解絮凝 置 5~10ml 活性污泥于 10ml 的灭菌离心管中离心 5min (8 000×g, 4℃),弃上清,沉淀(约 100mg)悬浮于 5ml 无菌水中。向管内加入 3g 灭菌玻璃珠(直径 2~3mm),将离心管盖拧紧后置于旋涡混合器击打 15min 去絮凝,离心 8min (8,000×g, 4℃),弃上清,沉淀用于细胞裂解。

(2)细胞裂解 冻融处理 向沉淀中加入 0.5ml 灭菌的 TENP 缓冲液(50mmol/L Tris-base, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 0.01g/ml 聚乙烯吡咯烷酮, pH10),悬浮后将菌液在液氮中冷冻 3min,沸水煮 2 min,重复 3 次后进行菌体离心(10min, 12 000×g, 4℃)。上清液快速置于冰上留用,沉淀用于进一步裂解。

溶菌酶处理和 SDS 裂解 将沉淀悬浮在 1.5ml 的溶菌酶溶液中(0.15mol/L NaCl, 0.1mol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 15 mg/ml 溶菌酶, pH 8),其中溶菌酶配制成 30 mg/ml 的母液, -20℃ 保存备用。37℃ 温浴 1h 后,向菌液中加入 1.5ml 10%SDS 溶液(0.1mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris-HCl, 10% SDS, pH 8),上下摇匀,待菌液变清后离心 10min(12 000×g, 4℃),取上清置于冰上留用。

(3)DNA 提取和纯化 收集两步的 DNA 上清液(3~3.5ml),用等体积的 Tris-饱和酚抽提 2 次、酚+氯仿和氯仿各抽提 1 次。用 40μl 的 3mol/L 乙酸铵和 3ml 无水乙醇沉淀 DNA, -20℃ 放置 30min 后离心(20min, 14 000×g, 4℃)。用 1ml 的 70%乙醇洗涤沉淀,离心 10min (10 000×g, 4℃)。DNA 沉淀真空干燥后,溶于 100μl 高纯水中,加 RnaseA3μl(10mg/ml), 37℃ 温浴 15~20min 消化 RNA,样品在 -20℃ 保存备用。

用。

**1.2.3 活性污泥回收菌的获得和基因组 DNA 提取** 100 $\mu$ l 解絮凝的活性污泥样品分别在 LB、dCGY、MP 和 FWM 培养基上涂板培养(1~3d, 28 C)。用 5ml 无菌水洗涤平板,回收菌落。回收混合菌的基因组 DNA 提取方法按文献<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 DNA 浓度测定和电泳检测** DNA 浓度测定用 DyNA Quant<sup>TM</sup>200 荧光仪(Hoefer),同时用含有 EB(1.5 $\mu$ g/ml)的琼脂糖凝胶进行电泳检测,UVP-GDS8000 凝胶成像系统(Ultra-Violet Product Ltd)纪录结果。

**1.2.5 DNA 纯度检测** 测定 DNA 样品在 260nm 和 280nm 的吸光值(UV-VIS7501 紫外/可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司)计算  $ABS_{260nm}/ABS_{280nm}$  的比值确定样品纯度。

**1.2.6 完整细胞的显微计数** 采用文献<sup>[6]</sup>方法。

**1.2.7 16S rDNA 和 LmPHs 扩增** 16S rDNA 和 LmPHs 扩增参照 Watanabe 等方法<sup>[3]</sup>。引物 P2(5'-ATTACCGcgCTgCTgg-3')和 P3 (5'-CgCCCgCCgCgCgCgggCggggCgggggCACggggggCCTACgggAggCAgCAg-3',含有 40 个 GC 夹子)被用于活性污泥细菌 16S rDNA V3 区(相应于大肠杆菌基因组上第 341~534 碱基)的扩增。PHE1 (5'-CgCCCgCCgCgCgCgggCggggCgggggCACggggggCgATCgACgAgCTgCgCCA-3',40 个 GC 夹子)和 PHE2(5'-gTTggTCAgCACgTACTCgAAGgAgAA-3')用于多组分苯酚羟化酶大亚基(LmPHs)基因的扩增。

两种扩增的反应体系和条件一致,25 $\mu$ l 的反应体系中含有 2 $\mu$ l dNTP(2.5mM),2.5 $\mu$ l 10 $\times$ Buffer,2 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(25mM)和 0.5 $\mu$ l Tag 酶(5u/ $\mu$ l)。引物量为 12.5 p mol,DNA 模板量 60ng。

**扩增条件** 94 C 预变形 7 min,75 C 加入 Tag 酶。94 C 变形 1min,65 C 退火 1min,72 C 延伸 2min,扩增 2 个循环;根据以上变形、退火和延伸参数继续进行每 2 个循环的扩增,但在第 2 个循环中退火温度降低 1 C,直至温度达到 55 C;94 C 变形 1min,55 C 退火 1min,72 C 延伸 2min,扩增 20 个循环,最后 72 C 终延伸 10min。

扩增在 MiniCycler<sup>TM</sup>(MJ Research Inc)上进行,PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,PCR 试剂购自 Promega 公司。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同裂解方法的有效性评价

对环境微生物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。而三者的获得是建立在对细胞完全裂解和 DNA 充分释放的基础上。对细胞进行裂解的方法已经报道的涉及到以下一个或多个步骤:溶菌酶、蛋白酶 K 和 EDTA 处理菌体,煮沸、SDS 和 SGS 裂解细胞,对细胞进行冻融、煮沸、超声波破碎和 Mini-beater 击打,微波热处理和研钵研磨等<sup>[5]</sup>。方法不一,细胞裂解程度各异。Ogram 等<sup>[6]</sup>用 SDS 裂解和 bead-mill 均质相结合的方法对海洋和淡水沉积物中的微生物细胞进行裂解并进行显微计数,发现有 90%的细胞被裂解。Tsai 等<sup>[1]</sup>对沉积层和底土(subsoil)的微生物样品用 EDTA 和溶菌酶处理后再进行 3 次冻融处理,95%细胞被裂解。Picard 等<sup>[7]</sup>用超声波和微波热处理的方法重复处理 3 次链霉菌孢子,裂解率达 100%。

采用冻融+溶菌酶+SDS(F+L+S)相结合的方法对活性污泥细胞进行裂解,并用纯菌 DH5 $\alpha$ (G)和 YK1R(G<sup>+</sup>)作为对照。同时对每种样品再分别进行冻融、溶菌酶、SDS 单一裂解处理。对处理后的样品中的完整细胞进行镜检计数。

从表 1 可知,用冻融、溶菌酶和 SDS 相结合的方法处理活性污泥样品最为有效,它可使 99%以上的细胞裂解。对 YK-1R 和 DH5 $\alpha$  的裂解率亦可达 95%~100%。但用单一方法对样品进行裂解,都不能达到使细胞完全裂解的目的。冻沸法反复处理 3 次,活性污泥样品中仍有 72.7% $\pm$ 5.0%的完整细胞。溶菌酶处理 1h,样品中完整细胞率高达 81.5% $\pm$ 5.2%。用 10%SDS 处理活性污泥样品,仍有 11.7% $\pm$ 3.2%的完整细胞被检测到。数据趋势在 DH5 $\alpha$  和 YK-1R 中也可看到。

表 1 4 种裂解方法处理活性污泥样品后完整细胞的镜检计数结果(%,平均值±标准差)

样品 Sample	未处理 Untreated	冻沸处理 Freeze-thaw, F	溶菌酶处理 Lysozyme, L	SDS 裂解 SDS lysis, S	冻沸+溶菌酶+SDS F+L+S
活性污泥 Activated sludge	100	72.7±5.0	81.5±5.2	11.7±3.2	1±0.3%
DH5α	100	69.7±4.3	75.5±3.6	9.8±4.2	0
YK-1R	100	91.3±2.8	88.7±1.3	14.8±2.8	4.6±0.3

2.2 获得的活性污泥 DNA 质量评价

2.2.1 浓度测定和电泳检测 提取过程中应用了 Picard 等<sup>[7]</sup>从土壤中提取 DNA 时建立的 TNEP 缓冲液,其中 Tris 和 EDTA 被用于保护提取的 DNA 免受溶液中 DNA 酶的攻击,NaCl 可使溶液保持较好的解絮凝状态,而聚乙烯吡咯烷酮(PVP)则有效地吸附样品中的腐植酸和酚类混合物。同时 Bourrain 等<sup>[8]</sup>在活性污泥 DNA 提取中应用的溶菌酶和 SDS 溶液系统也被采用。

对从 TJ1 提取的 3 个活性污泥 DNA 样品进行浓度测定和电泳检测,检测量分别为 10ng、20ng 和 30ng,用 10ng 的 DNA 标准样品做对照。从图 1 可知,10ng 的样品表现为一条清晰的条带,其亮度与 10ng 的标准样品 DNA 条带亮度一致(2~3),20ng 和 30ng 样品在胶上表现为一条清晰的条带且随着检测量的增加其条带亮度逐渐增强(4~5)。

DNA 样品中蛋白质杂质对 PCR 扩增、克隆、测序、基因文库的建立等分子遗传操作有干扰作用。核酸分子在 260nm 处有最大吸收值,蛋白质的最大吸收值在 280nm 处,利用这一特性,可以鉴定 DNA 纯度。 $ABS_{260nm}/ABS_{280nm} \geq 1.8$ ,DNA 样品的纯度较好。对提取的活性污泥 DNA 样品进行检测,比值为 1.96±0.2。

用该方法提取的 DNA 产量可达 1.756±0.1 mg/g MLSS。

2.2.2 16S rDNA 和 LmPHs 扩增 rRNA 分子在进化上高度保守,是一种很好的度量生物进化关系的分子钟。细菌核糖体小亚基 16S rRNA 分子约为 1 500bp,包含有可用于细菌系统发育和进化研究的足量信息<sup>[9]</sup>。利用 16S RNA 保守序列设计特异性引物,对其多变区或全长进行扩增和序列分析,最早用于细菌分类、鉴定、起源和进化等方面的研究,近年来在微生物多样性、种群结构和区系变化等研究领域得到广泛应用。由于环境样品的复杂性,提取的 DNA 是否可用于 PCR 扩增成为分子生物学方法研究环境微生物多样性的一个重要前提。

用 TJ1 和 TJ2 活性污泥 DNA 做模板,以 P2 和 P3 为引物对两个曝气池的活性污泥细菌种群和它们在 dCGY、MP 和 FWM 培养基上的回收菌的 16S rDNA V3 区(193bp)进行扩增,用 4μl 的 PCR 产物进行检测。从图 2 可知,除 NC 以外(L10),一条大小为 240bp 左右的条带在 8 个样品中都被扩增出来。

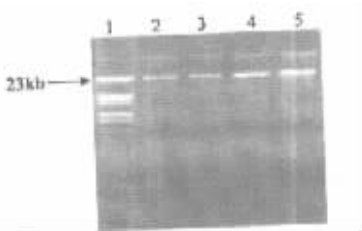


图 1 活性污泥基因组 DNA 的凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel (1%) electrophoresis of DNA extracted from activated sludge. Lanes: 1, 200ng Hind III-digested λ DNA marker; 2; 10ng standard DNA; 3-5: 10ng, 20ng and 30ng of activated sludge DNA

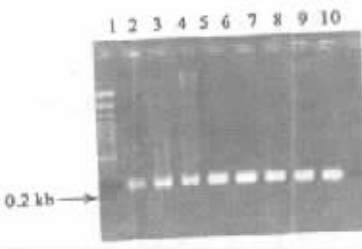


图 2 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物的凝胶电泳图谱  
Fig.2 Agarose gel (1.5%) electrophoresis of PCR amplified 16S rRNA(V3) gene. Lanes: 1, 100bp ladder; 2, amplified products of activated sludge sample from TJ1; 3~5, amplified products of recovered colonies from TJ1 on dCGY, MP and FWM media; 6, amplified products of activated sludge from TJ2; 7~9, amplified products of recovered colonies of TJ2 on dCGY, MP and FWM media; 10, negative control

在活性污泥的研究中,用 PCR 方法对降解途径中的一些代谢调控酶的功能基因进行扩增是检测环境中以这些酶为代谢途径的降解菌存在,了解细菌降解机理的一个重要手段。对提取的 DNA 样品进行 LmPHs 扩增是因为多亚基苯酚羟化酶被认为是大多数环境细菌进行酚代谢的一种主要酶类,用引物 PHE1 和 PHE2 扩增的 209bp 片断编码的多肽则对酶的催化能力有着重要影响。Watanabe 等<sup>[3]</sup>将活性污泥在 dCGY 和 MP500 两种培养基培养,并对 27 个克隆进行 LmPHs 扩增,结果显示 LmPHs 基因在 17 个克隆中被检测到,根据碱基序列的不同,又可将 17 个克隆分为 3 种类型。

对 TJ1 活性污泥及它在 dCGY、MP、FWM 和 LB 培养基回收的混合菌的 DNA 进行 LmPHs 片段扩增。结果显示,5 种样品的 DNA 中都有 LmPHs 扩增出来(图 3),表明无论是活性污泥还是其回收的混合菌中,都有以多组分苯酚羟化酶为代谢途径的降酚菌存在。

3 结论

建立了一种快速、有效的从活性污泥提取 DNA 的方法。它无需购置专用仪器,整个过程可在 4~5h 内完成。提取的 DNA 可用于 16s rDNA 和功能基因扩增,为用分子方法分析和监测活性污泥细菌种群结构、微生物多样性和功能菌的代谢途径等提供了可行的技术方法。

参考文献

[1] Tsai Y L, Park M J, Olson B H, *et al.* Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1991, (57): 1070~1074.

[2] Rochelle P A, Fry J C, Parkes R J, *et al.* DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol Lett.*, 1992, 59~65.

[3] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, *et al.* Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1998, **64** (11): 4396~4402.

[4] Zhao L P(赵立平), Xiao H(肖虹), Li Y Q(李艳琴), *et al.* ERIC-PCR as a new tool for quick identification of environmental bacteria. *Chin. J. Appl. Enviorn. Biol.* (in Chinese)(应用与环境生物学报), 1999, **5**(Suppl): 30~33.

[5] More M I, Herrick J B, Silva M C, *et al.* Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1994, **60**: 1572~1580.

[6] Ogram A, Sayler G S, barkey T, *et al.* The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbial.*, 1987, **7**: 57~66.

[7] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, *et al.* Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1992, **58**: 2717~2722.

[8] Bourrain M, Achouak W, Urbain V, *et al.* DNA extraction from activated sludges. *Current Microbiology*, 1999, **38**: 315~319.

[9] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59** (1): 143~169.

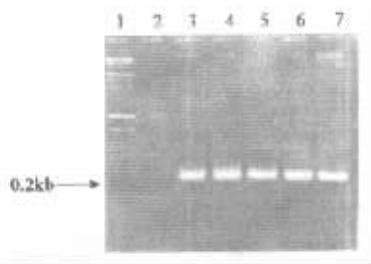


图 3 LmPHs-PCR 扩增产物的凝胶电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel (1.5%) electrophoresis of PCR amplified LmPHs gene. Lanes: 1, 100bp Ladder; 2: negative control; 3, amplified products of activated sludge from TJ1; 4~7, amplified products of recovered colonies from TJ1 on LB, dCGY, MP and FWM media