

分子生物学技术及其在环境样品微生物分析中的应用

张 瑛^{1 3}, 阮晓红^{2 3}

- (1. 河海大学水文水资源与水利工程科学国家重点实验室, 江苏 南京 210098;
2. 教育部浅水湖泊综合治理与资源开发重点实验室, 江苏 南京 210098;
3. 河海大学环境科学与工程学院, 江苏 南京 210098)

摘要 综述了荧光原位杂交(FISH)、多聚酶链式反应(PCR)、DNA 克隆及 DNA 测序等分子生物学技术, 并将这些分子生物学技术应用到淡水水体底泥厌氧氨氧化菌(anammox 菌)和好氧氨氧化菌的原位检测中, 从底泥样品中鉴别出这两种细菌, 其中好氧氨氧化菌属于亚硝酸单胞菌属, 厌氧氨氧化菌属于 anammox 菌的 Brocadia 分支, 为进一步研究淡水环境中氮的微生物循环过程提供了一定的依据。

关键词 分子生物学; FISH; PCR; DNA 克隆; DNA 测序; anammox 菌

中图分类号 :Q938.1 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-198X(2005)03-0241-05

由于微生物过程的重要作用, 样品中微生物的检测和鉴定, 已成为对自然环境的污染控制和污水处理工艺优化的重要依据。但是在天然环境中, 一般很难形成微生物优势菌种, 菌种的多样性给传统的微生物培养技术带来了很大的困难, 而且培养过后的微生物往往会与原来样品中的有所偏离, 给检测和鉴定带来了偏差; 另外, 传统的培养方法耗时耗力, 且只对样品中存在的一小部分微生物有效, 如对于海水, 可以培养的微生物只占总数的 0.001%~0.1%, 在淡水水体或底泥中相对较多, 但也只占总数的 0.25%^[1]。此外, 有一些细菌的世代期很长, 而且很难进行分离。因此, 传统的微生物培养方法受到了极大的限制。为了解决这一难题, 越来越多的研究者开始运用分子生物学技术对环境样品中的微生物进行分析^[2~5]。分子生物学技术不仅节省了传统培养方法的时间, 提高了检测的灵敏度, 而且它们的运用能对环境样品中的微生物进行原位观察, 充分反映样品中原有的微生物组成情况, 能有效、快速地得到环境样品的微生物信息。

随着时间的推移, 分子生物学技术越来越成熟, 特异性越来越强, 如今已能检测特定微生物群落的动态变化和活性。分子生物学技术所得的研究成果正开始改变人们对微生物世界的观点^[6]。至今, 开发用于研究微生物群落的分子生物学技术主要是基于对核糖体 RNA 分子的小分子亚单元及基因的检测和分析(对于原核生物是 16S rRNA 和 rDNA 分子)^[7], 也有以特定的功能基因作为分子指标的, 如对好氧氨氧化菌进行检测的 *amoA* 基因, 对反硝化菌进行检测的 *nirS* 和 *nirK* 基因等。

1 分子生物学技术简介

1.1 荧光原位杂交(FISH)

FISH 技术的主要原理为: 将寡核苷酸探针用荧光染料标记, 再使之与固定在载玻片上的微生物样品杂交, 将未杂交的荧光探针洗去后, 用共聚焦激光扫描显微镜或普通荧光显微镜进行观察和摄像。早在十几年前, FISH 就开始被用于微生物的检测, 并成为了微生物学的一个突破^[8]。用这一方法可以避免细菌的培养, 清楚并方便地观察到样品中细菌的细胞数量和空间位置, 而且可以通过不同的寡核苷酸探针同时对不同类群的细菌在细胞水平上进行原位的定性定量分析和空间位置识别。

寡核苷酸探针是一段长度为 15~30 个碱基的基因片段^[9], 它容易渗透到目标细胞或组织中。通常在寡核苷酸探针的 5'端通过共价键与简单荧光染料分子链接。常用的荧光体有: 荧光素(fluorescein)、四甲基若丹明(tetramethylrhodamine)等, 但更多的研究者使用羧花青(如 Cy3 或 Cy5)^[10], 因为羧花青大大提高了 FISH 的灵敏度^[11]。

FISH 常用的分子指标是 rRNA^[1,7],通常将它作为 FISH 检测的靶序列.大部分 FISH 探针的靶序列为 16S rRNA^[9],也有将 23S rRNA^[12]或 16S 和 23S 基因间隔区^[5]作为靶序列的.对每个分类水平,根据 rRNA 目标区域可设计寡核苷酸探针,进行种属特异性的鉴定.如今 Internet 上的公用数据库包括了绝大部分培养微生物的 16S rRNA 序列和许多直接从环境中得到的微生物 DNA 序列^[13].

典型的 FISH 实验过程一般包括 4 个步骤:样品的固定、杂交、未杂交探针的清洗以及标记细胞的观察^[14].

FISH 技术已在环境样品微生物分析中得到了较广泛的应用,如高效生物除磷(EBPR)反应器污泥中微生物群落的测定^[15]、anammox 菌多样性研究^[4]、anammox 菌的 rDNA 操纵子大片段 16S-23S 间区和 23S rRNA 特性研究^[5]、微生物体内转录质粒插入体研究(克隆-FISH)^[16]、FISH 与微量自动射线照相术研究活性污泥中微生物对基质的吸收特性^[17]等.

1.2 多聚酶链式反应(PCR)

PCR 技术是 1985 年美国 Cetus 公司的 Mullis 和 Saiki 等发明的一种基于在生物体外对特殊氨基酸进行扩增的引物延伸反应.它解决了环境样品中提取的 DNA 量通常过低而不能很好分析的难题,是分子生物学研究的重大突破之一^[18].它和 FISH 一样,也是一种无需微生物培养、简单、快速、灵敏的细菌检测技术.PCR 反应中,多聚酶是一种催化 DNA 或 RNA 形成和修复的生物高分子,常用的多聚酶是从嗜热细菌 *Thermus aquaticus* 分离的 Taq DNA 聚合酶,该酶在 95℃ 时也不会变性,在 65℃ 下可催化聚合反应.

PCR 反应过程中,向前和向后的引物(引物一般是约为 20 个核苷长的寡核苷酸)分别与待扩增的 DNA 模板(称为靶序列)的正链和负链的两端互补,将引物片断与待扩增的 DNA 片断混合并加热变性,然后退火,此时引物片断就和相应的 DNA 模板互补杂交,加入的底物 dNTPs 和 DNA 聚合酶进行 DNA 扩增.这是 PCR 反应一般程序(图 1)中的一个循环.经过若干循环后,DNA 的数量为 $(1 + X)^n$ (X 为反应平均效率, n 为循环次数).可见,PCR 的扩增效率是相当高的,它可以使一小段 DNA(通常少于 3 000 个碱基对)扩增 100 万倍,从而方便了微生物的鉴定.

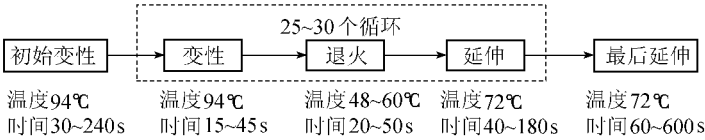


图 1 PCR 反应的一般程序

Fig.1 General procedures of PCR

经典 PCR 一般分为扩增和检测两个阶段,常用溴乙啶染色后的凝胶电泳作为定性检测手段,用荧光标记技术作为定量分析手段.从 PCR 技术发明至今,该技术已不断得到改进.除经典 PCR 以外,还开发出了反转录 PCR、反向 PCR、锚定 PCR、多重 PCR、PCR 芯片等^[19].随着电子技术的发展,这一技术必将有更好的前景.文献[20]总结了 PCR 及相关技术的应用情况.

1.3 DNA 克隆

环境样品微生物分析的一个较突出的问题是得不到足够的目标物质进行分析.譬如 10 L 生长到最大浓度的 *E. Coli* 培养菌只包含 7 mg DNA 多聚酶 I,许多其他蛋白质的量则更少.此外,微生物体内的蛋白质,能被纯化的部分几乎不到一半,真核细菌的蛋白质则更难得到,分子克隆技术的发展和运用克服了这一不足.

分子克隆的主要技术要点是:将目标 DNA 片断插入一段自复制的 DNA 分子(克隆载体)中,而后目标 DNA 片断就和载体复制在一起,将这个携带着目标 DNA 片断的载体在宿主细胞(如 *E. Coli* 或酵母菌)中克隆后就可产生大量的被插入的目标 DNA 片断.

1.4 DNA 测序及序列分析

常用的 DNA 测序方法是自动荧光 DNA 测序.先将 DNA 的 4 个碱基用不同颜色的染料着色,再将这些染料加在 4 个脱氧核苷的终端,从而使所有的 DNA 片断以染料标记的终端结束.这些 DNA 片断接着在聚丙烯酰胺凝胶上被分离,而荧光则被激光激发后得到探测.

DNA 测序与 PCR 类似,采用高温使 DNA 双链变性,引物被退火后得到延伸.这一方法的优点在于它可以进行多轮测序反应而不需要加入新的酶,就像 PCR 反应一样,而且,只要使用标准质粒 mini-preps 就能够

得到足够的用于测序反应的 DNA。Taq DNA 多聚酶也是 DNA 测序反应中常用的酶,它能使染料标记的 DNA 终端分布更加均匀,具有较高的测序准确度。

DNA 测序中使用的模板主要是克隆载体和 PCR 扩增 DNA 两种,前者主要包括单链抗菌素载体、双链质粒载体、Phagemid 载体(含有单链抗菌素复制源的双链质粒)等;后者主要包括单链 PCR 扩增产物和双链 PCR 扩增产物。当模板是 PCR 扩增 DNA 时,必须保证过量的引物在测序前得到清除,否则会影响测序结果。引物的去除可通过很多方法实现,如从琼脂电泳切胶回收法、酚—氯仿—乙醇法以及商品化的微柱纯化法^[21]等。

DNA 测序后一个重要的步骤就是序列的分析,只有经过准确和合理的序列分析才能最终鉴定目标微生物。目前,可以进行 DNA 序列分析的工具很多,最常用的有以下几种:

- a. 序列数据的获得。可以通过 Entrez(由美国国家生物技术信息中心开发)、SRS(由欧洲生物信息学院开发)、DBGET/LinkDB(由日本 Kyoto 大学和东京大学人类基因组中心开发)等网络数据资源得到有关的序列信息。
- b. 数据库查询和序列的排列(alignment)。数据库查询的软件或网络资源较多,一般常用 BLAST 进行查询。对目标序列进行查询的同时也能对序列进行初步的排列,为后面的系统发育分析提供基础。
- c. 系统发育分析(Phylogenetic analysis)。系统发育分析是确定微生物在发育过程中种属关系的一种手段,其主要方法包括直接创建方法(基于距离评分方法)、树查找方法(简约法和最大可能性法)等。系统发育分析的原理及方法见文献[22]。

2 分子生物学技术的应用

采用 FISH、PCR、DNA 克隆、DNA 测序和序列分析等技术,对采自江苏省新沂河、苏州市城市河道和东太湖等不同生境条件的水体底泥样品进行了好氧和厌氧氨氧化菌的原位检测。

2.1 底泥样品

研究采集了 6 个底泥样品,其特性见表 1。

表 1 实验底泥样品特性
Table 1 Characteristics of sediment samples used in the experiment

水体性质	样品名	取样地点	水温/℃	$\rho(\text{DO})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	pH 值	表观现象	水生环境
一般污水通道	XYR1	新沂河(岸边)	11.1	3.85	7.1	土黄色	能见到鲫科鱼类和水葱
	XYR2	新沂河(中心)	11.1	0.19	6.6		能见到鲫科鱼类和野生芦苇
城市河道	SZR1	东园小河	16.4	0.00	7.1	黑臭	有水花生生长
	SZR2	南园河	16.4	1.82	6.2		无水生植物
湖体	TL1	东太湖	12.8	10.61	7.5	暗黄色	较清洁水域,有黄花苒菜、眼子菜、金鱼藻和伊乐藻等水生植物
	TL2		12.8	10.43	9.0		

2.2 厌氧氨氧化菌的检测结果

采用 anammox 菌特异性探针 AMX368^[23]对所采集的 6 个底泥样品进行 anammox 菌的原位检测,结果表明,只有在新沂河底泥样品 XYR1 和 XYR2 中观察到了具有环状形态(anammox 菌区别于其他细菌的特殊形态)的目标细胞(图 2),其余底泥样品中均未发现目标细胞。系统发育分析表明,样品 XYR2 中存在属于 Brocadia 分支的 anammox 菌。

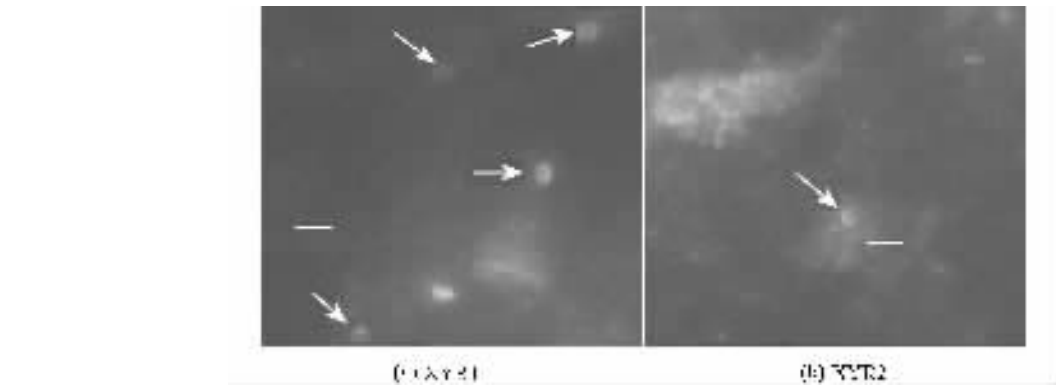


图 2 样品 XYR1 和 XYR2 的落射荧光显微图像
Fig.2 Epifluorescence images of samples XYR1 and XYR2

2.3 好氧氨氧化菌的检测结果

在确认新沂河样品 XYR2 中确实存在 *anammox* 菌之后,对其分离后的 DNA 再通过引物对 *amoA*-1R(氨单氧酶亚单元 A 向前引物)和 *amoA*-2R(氨单氧酶亚单元 A 向后引物)扩增后,对得到的 PCR 产物用 PCR1.2 TOPO载体进行了克隆,然后,对挑选出的白色菌落 DNA 进行分离,对其进行消化后,用凝胶电泳检查并选择进行测序的克隆 DNA。共对样品 XYR2 的 4 个 *amoA* 基因进行了测序。对于这些 *amoA* 序列转化成蛋白质后的序列进行系统发育分析后,发现该样品中存在好氧氨氧化菌,并且属于亚硝酸单胞菌属。

3 结 语

分子生物学技术在环境科学中的地位及其应用前景日益显现。笔者在对淡水水体底泥样品进行好氧和厌氧氨氧化菌的原位检测中,发现新沂河底泥中含有 *anammox* 菌,同时发现好氧和厌氧氨氧化菌在底泥环境中可以共存。研究结果为进一步研究淡水生态系统中的厌氧氨氧化过程、自然环境中氮的转化及水环境污染控制新途径提供了一定的基础。

参考文献:

- [1] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 143—169.
- [2] KOWALCHUK G A, STEPHEN J, DE BOER W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S ribosomal DNA fragment[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1489—1497.
- [3] STEPHEN J R, MCCAIG A E, SMITH Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia oxidizing bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 4147—4154.
- [4] SCHMID M, TWACHTMANN U, KLEIN M, et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation[J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23: 93—106.
- [5] SCHMID M, SCHMITZ-ESSER S, JETTEN M S M, et al. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and *in situ* detection[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(7): 450—459.
- [6] HUGENHOLTZ P, GOEBEL B M, PACE N R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. J Bacteriol, 1998, 180: 4765—4774.
- [7] DABERT P, DELGENES J P, MOLETTA R, et al. Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics[J]. Environmental Science & Bio/Technology, 2002, 1: 39—49.
- [8] AMANN R I, KRUMHOLZ L, STAHL D A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology[J]. J Bacteriol, 1990, 172: 762—770.
- [9] AMANN R, FUCHS B M, BEHRENS S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12: 231—236.
- [10] SOUTHWICK P L, ERNST L A, TAURIELLO E W, et al. Cyanine dye labeling reagents — carboxymethylindocyanine succinimidyl esters [J]. Cytometry, 1990, 11: 418—430.
- [11] GLÖCKNER F O, AMANN R, ALFREIDER A, et al. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria[J]. System Appl Microbiol, 1996, 19: 403—406.
- [12] MANZ W, AMANN R, LUDWIG W, et al. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions[J]. Syst Appl Microbiol, 1992, 15: 593—600.
- [13] VAN DE PEER Y, DE RIJK P, WUYTS L, et al. The European small subunit ribosomal RNA database[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 175—176.
- [14] AMANN R I. *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes[A]. In: AKKERMAN A D L, Van ELsas D J, De BRUIJN F J. Molecular Microbial Ecology Manual[C]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 1—15.
- [15] CROSETTI G R, HUGENHOLTZ P, BOND P L, et al. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 1175—1182.
- [16] SCHRAMM A, FUCHS B M, NIELSEN J L, et al. Fluorescence *in situ* hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe

- validation and screening of clone libraries[J]. *Environmental Microbiology* 2002 4(11) :713—720.
- [17] ANDREASEN K ,NIELSEN P H. Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge[J]. *Applied and Environmental Microbiolgy* ,1997 9 3662—3668.
- [18] 罗志良. PCR 技术的新进展及应用[J]. 周口师专学报 ,1994 ,11(4) 52—66.
- [19] 徐祖元 ,包其郁 ,牛宇欣. PCR 产物直接测序技术中影响因素的研究[J]. *遗传* 2002 24(5) :548—550.
- [20] 崔雨新 ,王小明. 分子生物学技术在环境生物学中的应用[J]. *自然杂志* ,1999 21(5) :295—301.
- [21] 张为民 ,张安世. PCR 技术简介及其应用[J]. *河南教育学院学报(自然科学版)* 2002 11(3) 65—67.
- [22] LUDWIG W ,STRUNK D ,KLUGBAUER S et al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis[J]. *Electrophoresis* ,1998 , 19 554—568.
- [23] SCHMID M ,WALSH K ,WEBB R et al. *Candidatus “ Scalindua brodae ”* sp. nov. , *Candidatus “ Scalindua wagneri ”* sp. nov. , two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. *Syst Appl Microbiol* 2003 26 529—538.

Molecular biological techniques and their application to analysis of microorganism in environmental samples

ZHANG Ying^{1 3} , RUAN Xiao-hong^{2 3}

(1. *State Key Laboratory of Hydrology-Water Resources*

and Hydraulic Engineering , Hohai Univ. , Nanjing 210098 , China ;

2. Key Laboratory for Integrated Regulation and Resources Exploration on Shallow Lake ,

Ministry of Education , Nanjing 210098 , China ;

3. College of Environmental Science and Engineering , Hohai Univ. , Nanjing 210098 , China)

Abstract :Molecular biological techniques have been widely used because of their advantages of convenience , rapidity , high accuracy , etc. Some of these techniques , such as Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) , Polymerase Chain Reaction (PCR) , DNA cloning and DNA sequencing , were reviewed. These techniques were applied to the *in situ* detection of anaerobic and aerobic ammonium oxidation bacteria in freshwater sediment samples , and the two kinds of bacteria were both detected out. The test result shows that the molecular biological techniques are powerful tools for correctly analyzing microorganism in complex environmental samples , which can provide some basis for further study on nitrogen cycle in fresh water ecosystem.

Key words :molecular biology ; Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) ; Polymerase Chain Reaction (PCR) ; DNA cloning ; DNA sequencing ; anammox bacterium