

内参基因加标法定量土壤微生物目标基因绝对拷贝数

王行^{1,2} 曹萍麟¹ 张志剑^{2*}

(1. 国家高原湿地研究中心 西南林业大学 云南 昆明 650224)

(2. 浙江大学 环境科学研究所 环境与资源学院 浙江 杭州 310058)

摘要:【目的】通过荧光定量 PCR 技术对土壤微生物目标基因进行绝对定量,其定量结果的准确性容易受到 DNA 提取得率以及腐殖酸抑制性的影响。【方法】采用内参基因加标法,利用构建的突变质粒 DNA,对供试水稻土壤样品中的微生物 16S rRNA 目标基因的绝对拷贝数进行荧光定量 PCR 检测,用来表征该样品中细菌群落总体丰度。在定量前通过双向引物扩增方法验证突变质粒中的内参基因对供试土壤的特异性。【结果】不同水稻土壤样品的 DNA 提取量在样品间差异较大。通过内参基因加标法对 DNA 提取量进行校正,显著提高了 16S rRNA 基因绝对定量的精确度。不同水稻土壤样品间的变异系数为 17.8,与未加标处理相比降低了 66.7%。在此基础上,进一步通过内参基因加标法对土壤有机质和含水率均呈现典型空间特征差异的 6 处亚热带湿地土壤样品中的 16S rRNA 基因进行绝对定量。16S rRNA 基因绝对拷贝数与土壤微生物生物量碳具有显著的线性相关性($R^2=0.694$, $P<0.001$),表明内参校正后的 16S rRNA 基因绝对拷贝数可以准确反映单位质量土壤中微生物的丰度。【结论】内参基因加标法可以对 DNA 提取得率以及腐殖酸对 PCR 扩增的抑制性进行校正,从而提高绝对定量的准确性。基于内参基因加标法的目标基因绝对定量 PCR 检测,可作为土壤微生物生物量测量,以及微生物功能基因绝对丰度定量的一种核酸检测方法。

关键词: 土壤, 含水率, DNA 得率, 定量 PCR, 绝对定量, 内参基因, 腐殖酸抑制

The absolute PCR quantification of microbial target genes in soils using internal gene as standards

WANG Hang^{1,2} CAO Ping-Lin¹ ZHANG Zhi-Jian^{2*}

(1. National Plateau Wetlands Research Center, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

(2. Institute for Environmental Science, College of Environmental & Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: [Objective] Fluorescence quantitative PCR can absolutely or relatively quantify the target genes in soil samples. However, the accuracies of absolute quantification of target genes are influenced

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41373074), Yunnan Applied Basic Research Projects (No. 2015FD026)

*Corresponding author: Tel: 86-571-88982057; Fax: 86-571-88981719; E-mail: zhangzhijian@zju.edu.cn

Received: September 16, 2015; Accepted: November 02, 2015; Published online (www.cnki.net): November 10, 2015
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41373074), 云南省应用基础研究计划项目(No. 2015FD026)

*通讯作者: Tel: 86-571-88982057; Fax: 86-571-88981719; E-mail: zhangzhijian@zju.edu.cn

收稿日期: 2015-09-16; 接受日期: 2015-11-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-11-10

by DNA yields during DNA extraction and inhibition caused by co-extracted humic acids. **[Methods]** Using prepared mutated plasmid DNA, this paper quantified the 16S rRNA gene from one paddy soil by the methods of adding such plasmid containing mutated internal gene before DNA extraction. Two-way primers amplification showed that the added internal gene inserted in this mutated plasmid DNA was specific to studied soils when used as internal standards. **[Results]** The results showed that DNA yields varied greatly among these paddy soil samples, leading to incorrect results from absolute quantification. Using the mutated plasmid DNA, the precision of resulted data points has been improved significantly. It showed that the coefficient of variation for absolute 16S rRNA gene copies of these samples was 17.8, which was 66.7% lower than the values calculated for soil samples without internal gene correction. It indicates that added internal gene can correct the effects of varied DNA yields. Such tested methods were further used to quantify 16S rRNA gene from 6 wetland soils with great spatial and physico-chemical differences in soil organic matter contents and water moisture. The total bacterial abundance indicated by absolute 16S rRNA gene copies was linearly correlated ($R^2=0.694$, $P<0.001$) with soil microbial biomass carbon, demonstrating that after addition of internal standards, the quantified 16S rRNA gene copies can accurately reflect the absolute microbial abundance in soil samples. **[Conclusion]** The added internal gene can correct for DNA yields and the effects of inhibition of humic acids on PCR amplification. Using plasmid containing mutated internal gene as internal standards, this method, as a nucleic acid assay can be applied in soil ecology to quantify soil microbial biomass and absolute abundance of microbial functional genes.

Keywords: Soil, Water content, DNA yield, Quantitative PCR, Absolute quantification, Internal gene, Humic acids inhibition

荧光定量PCR技术(Quantitative real-time PCR, qPCR)可以对土壤微生物目标基因进行量化检测,从而反映某类微生物的群落数量丰度(如对16S rRNA基因或18S rRNA基因进行定量)或功能丰度(如对碳固定基因或氮硝化基因进行定量)。常用的定量检测方法主要分为相对定量和绝对定量两种^[1]。真核生物体内存在看家基因(House-keeping gene),这类基因在细胞体内的表达量受环境因素影响较小,因此在真核生物(如植物)细胞学的研究中,可通过目标基因拷贝数与看家基因拷贝数的比值来对真核生物不同处理之间的样本进行目标基因的相对定量研究^[2]。不同于真核生物细胞学的研究,环境样品微生物数量众多且成分复杂,不存在恒定的看家基因对目标基因进行标准化^[3]。目前针对土壤等环境样品微生物目标基因的相对定量,主要通过目标基因拷贝数与编码原核生物核糖体小亚基rRNA(16S rRNA基因)基因序列拷贝数的比值来表示(Target gene/16S rRNA)。然而利用16S rRNA基因拷贝数对目标基因进行相对表达量的计算受到

应用条件的限制,即要求所研究的目标基因主要来自于原核生物,土壤中的真核生物(如真菌)可以忽略不计,或者不同土壤样本间原核生物所占总微生物数量的百分比相同^[4]。

目前土壤样品中的目标基因丰度主要通过相对基因拷贝数来表示^[5],然而实现对某些目标基因的绝对定量仍然具有重要意义。在绝对定量的过程中,不同土壤样品之间、甚至同一样品多个重复之间DNA提取得率(DNA yields)的差异将显著影响目标基因绝对定量的结果^[6-8]。土壤含水率以及土壤质地是导致土壤DNA提取得率差异较大的主要原因。含水率差异影响细胞与土壤基质分离以及细胞裂解效率;而当土壤质地不同时(如粘土与沙土),DNA裂解液会吸附在粘土成分较高的土壤上而损失。对冷冻干燥及风干土壤进行DNA提取,也会遇到DNA提取得率的问题,并且研究表明风干土壤会显著降低微生物丰度^[9]。除此之外,裂解的DNA在分离、纯化等一系列随机因素下的损失,也是导致DNA提取产率差异的重要原因。另外,土壤微生物

基因组 DNA 的提取得率不同, 导致微生物的种群结构多样性具有明显差异^[10]。准确测定土壤样品中的微生物(细菌、真菌与古菌)群落数量丰度或者功能丰度, 对于了解各种微生物在土壤生态过程中所扮演的角色十分重要。

为解决不同土壤DNA得率差异对目标基因绝对拷贝数的影响, 国外开展了一系列研究。Möller等在波罗的海底泥蓝细菌(*Cyanobacteria*)基因组DNA的*luc*基因区域插入了一段37 bp大小的基因序列作为内参, 通过竞争性定量PCR反应, 对遗传标记的蓝细菌进行定量^[11]。Nurmi等^[12]通过加入一段外源基因序列, 用非竞争性内参照物法对核酸进行定量, 用于消除操作过程中产生的误差。另外将非竞争性内参DNA整合到细胞染色体中, 把含有该突变染色体的细胞加入到土壤样品中与土壤中内源性DNA一起抽提, 可以实现对咪唑1,9a-双加氧酶基因的定量^[13]。Park等^[3]将携带有PEGFP-N1质粒^[14]的大肠杆菌JM109细胞作为内参加入到土壤中, 通过qPCR法对目标基因的绝对拷贝数进行标准化。Daniell等构建了含有突变大肠杆菌DNA片段的质粒对土壤样品目标基因进行定量研究^[15]。综合以上研究发现, 前人所构建的竞争性及非竞争性内参基因主要针对特定的目标基因序列而专门设计, 内参基因的构建较为复杂。而Park等^[3]将含有内参基因质粒的大肠杆菌JM109细胞加入土壤中的方法解决了内参构建复杂性的问题, 然而加入的外源性大肠杆菌细胞中的某些基因可能与土壤本身内源性目标序列相互干扰, 增加了实验步骤, 因而可能导入新的误差。另外通过国内文献调研发现, 目前有研究利用内参基因实现纯培养微生物或真核细胞基因丰度的研究^[16-17]。在土壤生态学研究领域, 国内研究人员对环境样品目标基因进行绝对定量时, 少有通过加入内参基因的方法对数据进行校正, 而具体介绍内参加标法对土壤微生物目标基因绝对拷贝数进行定量的研究还未见报道。

本文利用英国詹姆斯·赫顿研究所(The James

Hutton Institute) T.J. Daniell 博士提供的大肠杆菌突变 DNA 环状质粒载体, 经线性化处理后作为内参, 选取 16S rRNA 基因作为目标基因进行绝对定量研究。16S rRNA 基因的绝对拷贝数可以用来反应一定质量土壤样品中细菌数量的绝对丰度。土壤样品选择成分较为复杂、含水率差异变化的淹水土壤, 包括 1 处人工耕作、季节性淹水的水稻土样品(农田生态系统)和 6 处天然型、次生型湿地土壤样品(湿地生态系统)。研究内参基因在未加标与加标条件下, 同一供试水稻土样品中 16S rRNA 基因绝对拷贝数在不同重复样品之间的差异性, 从而反应内参基因加标法结果的精确度。在评价内参基因加标法结果的基础上, 进一步选取具有典型空间特征的 6 处亚热带湿地土壤, 通过加标法对湿地土壤样品中的 16S rRNA 基因绝对拷贝数进行测定, 其定量结果与传统氯仿提取微生物生物量法进行比较, 进一步说明内参基因加标法结果的准确性。

1 材料与方法

1.1 土壤采样

水稻土采自杭州市余杭区长岗农场永建分场(30°18'52" N, 119°54'13.37" E), 为湖泊湿地沉积物发育而成的青紫泥粘土。采集 100 g 左右表层(0-5 cm)土壤样品后立即放入装有冰块的采样箱中, 于 2 h 内送至实验室并放置在 4 °C 保存, 保存期不超过一周, 样品含水率均值为 31.2%。称取一定量鲜土, 充分混匀后分为 5 份, 梯度加入双蒸水进行稀释, 使土壤含水率分别为 39.2%、47.2%、55.2%、63.2% 以及 71.2%, 加上原水稻土共 6 份样品。每份样品设置 3 个重复。

湿地土壤采自亚热带长三角浙江地区, 选取土壤有机质、含水率等具有显著空间差异的代表性天然型、次生型及湖/河滨带型湿地共 6 处: 嘉兴石臼漾湿地(SJ)、绍兴镜湖湿地(JH)、杭州西溪湿地(XX)、长兴包漾河湿地(BY)、德清下渚湖湿地(XZ)以及桐乡鸭塘湿地(YT)。采集湿地表层(0-5 cm)土壤, 每处湿地土壤设置 3 个重复, 共 18 个样品。

按照水稻土的采集、预处理方法进行样品制备,并测定含水率。6处湿地土壤的含水率均值分别为32.6%、35.1%、55.0%、54.5%、64.5%以及68.7%。详细的理化指标及水文特征参见之前的研究报告^[18]。简言之,6处湿地土壤样品中的有机质含量与土壤含水率显著正相关,SJ样品的有机质含量最低,而YT样品的有机质含量最高^[18]。

1.2 突变质粒 DNA 的制备

突变质粒 DNA 由英国詹姆斯·赫顿研究所(The James Hutton Institute)的 T.J. Daniell 博士提供。通过 PCR 原位突变法两步构建突变 DNA 片段:首先吸取 1 μL 大肠杆菌菌液作为模板,通过引物对 342Fmut (5'-CCTACGGGAGGCACGTCTGGGAATAT-3')和 E518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')进行第一轮普通 PCR 扩增;扩增后的 PCR 产物稀释 100 倍后取 1 μL 作为模板,利用引物对 Mut-F (5'-CCTACGGGAGGCACGTC-3')和 534Rmut (5'-ATTACCGCGGCTGGACCCACGGAGTTA-3')进行第二轮扩增。反应体系和反应模板见前人的研究报告^[15]。扩增后的突变 DNA 片段进行电泳、切胶回收,连接到 pGEM-T Easy 质粒载体,并导入 *Escherichia coli* DH10B 感受态细胞中,最后对含有突变 DNA 片段的质粒进行提取。该质粒中所含有的突变 DNA 片段可以通过引物对 Mut-F 和 Mut-R (5'-ATTACCGCGGCTGGACC-3')进行扩增。该对引物 3'末端的 4 个碱基分别是细菌 16S rRNA 基因特异性引物 E338 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 E518 末端 4 个碱基的互补序列。

由于质粒成环状,与土壤微生物基因组 DNA 的线性结构不同,因此对提取出来的质粒用 Promega 公司提供的 *Not*I 内切酶进行线性化酶切,使其与土壤 DNA 具有相似的分子特征。酶切后的线性化质粒用标准的乙醇纯化步骤进行纯化,用 NanoDrop 2000c 分光光度计测定浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$),并换算成拷贝数($\text{copies}/\mu\text{L}$)。将此线性化后的突变质粒作为土壤的内参加标物,该质粒中含有正确插入的突变大肠杆菌 DNA 片段作为内参基因。

1.3 突变质粒 DNA 特异性检测

利用 NCBI 数据库中的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)对突变质粒的测序结果进行序列比对分析,确定突变 DNA 片段与数据库中已知微生物物种的基因片段具有非同源性。用突变引物(Mut-F 和 Mut-R),对未加标的土壤 DNA 进行目标基因的普通 PCR 扩增,未扩增出任何 PCR 产物片段;进一步采用 16S rRNA 目标基因引物(E338 和 E518)对质粒中插入的突变 DNA 片段进行普通 PCR 扩增,未扩增出任何 PCR 产物片段。双向引物扩增实验表明,该突变质粒对供试土壤具有特异性,可以作为加标物进行后续目标基因的 qPCR 反应。25 μL 的普通 PCR 扩增反应体系包括:10 U/ μL 的 DNA 高保真聚合酶 0.25 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 0.5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTP 溶液 5 μL , 10 \times 高保真 Buffer 2.5 μL , 1.0 mg/mL 的牛血清蛋白(BSA)溶液 10 μL , DNA 模板 1.0 μL , 另外加入 5.25 μL DNA-free 水。

1.4 土壤 DNA 提取与内参加标

在提取 DNA 前为降低土壤异质性带来的误差,首次准确称取 1.00 g 土(水稻土与湿地土)于带刻度的 10 mL 试管中,用 PBS 缓冲液(pH 7.4,浓度为 0.2 mol/L)定容至 10 mL 后,充分混匀成土壤匀液,混匀后确保试管底部没有固体颗粒物残留。吸取 2 mL 匀液于 2 mL 离心管中(合 0.2 g 鲜土),12 000 r/min 离心 2 min,倒掉上清液。离心管中的土壤样品再用 PBS 洗涤 2 次后,用美国 MO BIO 公司的 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 对土壤 DNA 进行提取。对于内参基因加标法而言,按照同样的方法提取同样样品的 DNA。所不同的是,在土壤 DNA 提取前,每个样品中加入 10^9 拷贝的线性化突变质粒 DNA 作为加标内参。所有样品的 DNA 提取过程严格按照说明书中的标准操作步骤进行。提取的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳,以确保 DNA 条带完整并无明显拖带,然后用美国 Thermo 公司的 NanoDrop 2000c 分光光度计测定核酸浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)

以及 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 等指标。研究表明, DNA 条带断裂越厉害, 吸光率越高^[19], 测定出来的 DNA 浓度比实际浓度要大。因此确保只选取具有高质量的 DNA 样品用于下游操作。

1.5 目标基因与内参基因标准曲线的制备

用 16S rRNA 目标基因引物(E338 和 E518)对大肠杆菌模板进行普通 PCR 扩增, 扩增反应体系和反应条件如 1.3 小节。对 PCR 产物进行电泳并对目标基因条带切胶回收纯化(AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit)。纯化后的目标基因连接到 TaKaRa 公司的 pMD 19-T Simple 质粒载体上, 然后导入 *E. coli* DH5 α 大肠杆菌感受态细胞。挑取单克隆质粒并测序, 以确定质粒中插入的片段为目标基因片段。对含有目标基因的质粒与上述 1.2 小节构建的突变质粒通过一系列 10 倍梯度稀释后分别作为目标基因和内参基因的标准品, 用于 qPCR 反应过程中目标基因和内参基因标准曲线的绘制。

1.6 目标基因与内参基因的 qPCR 反应

对加标土壤样品(水稻土以及湿地土壤)中的目标基因(16S rRNA 基因)和内参基因(突变 DNA 片段)分别进行 qPCR 反应。20 μ L 反应体系包括: 10 μ L Bestar™ Real-time PCR Master Mix SYBR Green (DBI, Germany), 10 μ mol/L 的上下游引物各 0.5 μ L, 0.5 g/L 的 BSA 溶液 8.0 μ L 以及加标 DNA 1.0 μ L 作为模板。qPCR 反应在美国 Bio-Rad 公司的 Bio-Rad CFX96 system 仪器上进行。对 16S rRNA 基因进行 qPCR 扩增的引物对为 E338 和 E518, 对内参基因进行 qPCR 扩增的引物对为 Mut-F 和 Mut-R。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 荧光获取温度设定为 72 $^{\circ}$ C。qPCR 产物的特异性通过溶解曲线以及琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.7 内参校正的目标基因绝对拷贝数的计算

内参校正的目标基因绝对拷贝数的计算参考 Park 等^[3]的研究, 并在此基础上有所改进。首先计算标准品中内参基因和目标基因的绝对拷贝数[计算公式分别见公式(1)和(2)]。然后分别以标准品中

内参基因和目标基因的 C_t 值为 x 轴, 对应标准品绝对拷贝数的 \log_{10} 值为 y 轴建立标准曲线, 进而得到土壤样品中内参基因和目标基因的绝对拷贝数。最后根据公式(3)计算得到内参基因标准化后样品中目标基因的绝对拷贝数。

目标基因绝对拷贝数(copies/ μ L)=[目标基因质粒 DNA 标准品浓度(g/ μ L)/插入目标基因片段后质粒的长度(bp) \times 660] \times 阿伏伽德罗常数 (1)

内参基因绝对拷贝数(copies/ μ L)=[突变质粒 DNA 标准品浓度(g/ μ L)/插入内参基因片段后质粒的长度(bp) \times 660] \times 阿伏伽德罗常数 (2)

内参校正的目标基因绝对拷贝数(copies/ μ L)=[目标基因绝对拷贝数(copies/ μ L)/内参基因绝对拷贝数(copies/ μ L)] \times 所有样品内参基因绝对拷贝数均值(copies/ μ L) (3)

1.8 腐殖酸对目标基因抑制系数的确定

在 DNA 提取过程中发现, 德清下渚湖湿地(XZ)土壤样品中提取的 DNA 颜色发黄, 表明 DNA 样品中可能存在少量腐殖酸。在对 XZ 样品中的目标基因进行 qPCR 绝对定量前, 对提取的 DNA 进行 100 倍稀释的处理操作。此外, 进一步对该样品中腐殖酸的抑制性进行检测。首先对该土壤中稀释后的 DNA 样品用 DNase I 酶处理, 得到仅含有腐殖酸而不含有 DNA (DNA-free)的土壤提取物。接着在该提取物中加入已知理论拷贝数的 16S rRNA 目标基因标准品, 通过 qPCR 反应计算得到目标基因的拷贝数, 通过该值与理论拷贝数的比来确定抑制系数。

2 结果与分析

2.1 水稻土 DNA 提取得率的差异

DNA 提取得率受土壤含水率影响。对 6 份(每份 3 个重复)完全相同仅含水率呈梯度变化的水稻土样品, 统一采用 PowerSoil® DNA Isolation Kit 试剂盒推荐的标准方法进行 DNA 提取操作。提取的 DNA 经过 NanoDrop 2000c 核酸检测后统一换算成单位土壤干基下的 DNA 浓度(图 1)。结果发现, 1#

水稻土样品(含水率为 31.2%)的提取量最低, 而 6# 水稻土样品(含水率为 71.2%)的提取量最高。1#–6# 样品之间以及每个样品 3 个重复之间的 DNA 检测浓度具有较大差异。由于 1#–6# 样品来自于同一水稻土, 因此结合方差分析的基本思想, 将 DNA 检测浓度的变异分为组内变异(Within-groups)和组间变异(Between-groups) (表 1)。组内变异(每个样品 3 个重复之间)代表 DNA 提取过程中受随机因素影响引起的 DNA 得率差异(如细胞与土壤基质分离过程、酚抽提对 DNA 的水溶性以及 DNA 在吸附与洗脱过程中的损失), 而组间变异(1#–6# 之间)代表随机变异和含水率差异(处理因素)所共同引起的 DNA 检测浓度差异。剔除随机变异影响后, 土壤含水率差异对 DNA 提取量的影响仍然较大, 组间均方达到 1 315 ($F=4.01$, $P=0.023$)。

当土壤含水率不同时, 土壤中微生物细胞的裂解效率、裂解液的回收率等受到不同程度的影响, 可能是导致 DNA 得率差异较大的原因之一^[6-8]。DNA 的提取得率不仅与土壤含水率有关, 还与土壤类型以及提取方法密切相关^[15]。不同于纯培养物,

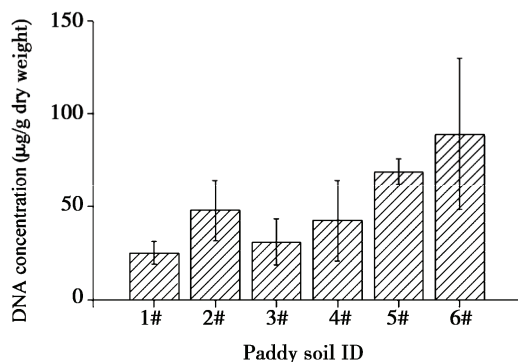


图 1 水稻土样品 DNA 检测浓度值

Figure 1 DNA yields from paddy soils

注: 1#–6# 分别代表含水率为 31.2%, 39.2%, 47.2%, 55.2%, 63.2% 以及 71.2% 的同一水稻土样品; DNA 含量以土壤干基表示; 误差线代表 3 个重复样品之间的标准差。

Note: 1#–6# represent the identical soils with only varied water contents, i.e., 31.2%, 39.2%, 47.2%, 55.2%, 63.2%, and 71.2%, respectively; The DNA yields are normalized to dry soil mass; The error bar indicates The standard deviations of three replicates for each sample.

表 1 DNA 检测浓度变异分析
Table 1 Variation analysis for DNA concentration

变异来源 Source of variation	均方差 Mean square deviation
组间变异 Within-groups	
随机变异 Random variation	436
组内变异 Between-groups	
随机变异 Random variation	436
不同含水率处理导致的变异 Soil water-induced variation	1 315

土壤中含有的基质及各种复杂成分将影响 DNA 得率, 并影响样品之间的提取误差。前人研究比较了两份泥炭土样品, 通过加标法发现其加标基因的回收率分别为 2.61% 和 8.19%^[15]。而对 3 份河流底泥样品进行 DNA 提取, 其加标回收率分别为 14.9%, 28.3% 和 2.4%^[20], 样品间误差较大。这些土壤样品的共同特征是有机质含量高、土壤含水率差异大, 并且基质成分复杂。除不同类型土壤之间 DNA 得率的差异外, 即使同一样品的不同重复采用统一的方法提取 DNA, 由于受到各种随机因素的影响, 其 DNA 得率也会有较大差异^[15]。本研究表明, 由随机因素所引起的 DNA 得率差异为 436 (组间均方), 同土壤水分梯度变化所引起 DNA 得率差异共同决定了不同样品中 DNA 的提取得率。可见, 在通过 *qPCR* 技术对目标基因进行绝对定量时, 需要考虑 DNA 在提取过程中的各种损失, 这对含水率相差较大的淹水土壤尤为重要。在 *qPCR* 之前, 通过提高 DNA 得率的方法可以间接提高目标基因绝对定量的准确性, 然而得率的提高往往意味着 DNA 条带断裂的增加以及样品纯度的降低。为解决此问题, 前人有通过多次提取同一土壤中 DNA 的方法来提高提取效率, 通过多次提取有效避免了在一次提取过程中由于过度机械震荡对 DNA 完整性的破坏^[9]。我们的研究与前人的研究结果^[3,10,15,20]均表明, 土壤样品 DNA 提取过程具有较大的随机性。可见, 需要通过内参加标的方法实现对目标基因绝对拷贝

数的准确估计。

2.2 内参加标法计算水稻土 16S rRNA 基因目标基因绝对拷贝数

分别对未加标水稻土(图 2A)和加标水稻土(图 2B)提取的 DNA 进行 16S rRNA 基因的 *qPCR* 反应。通过内参加标法计算目标基因绝对拷贝数的方法参见公式 3。定量结果表明, 目标基因扩增效率 *E* 为 105.6%, 标准曲线 $R^2=0.998$; 内参基因扩增效率 *E* 为 98.2%, 标准曲线 $R^2=0.995$ 。内参基因和目标基因标准品的基因扩增效率及线性化相关系数 R^2 均在文献报道的范围内。另外, 加入线性化内参基因后进行 DNA 提取, 内参的回收率为 22%–79%, 变化范围较大, 表明不同样品在 DNA 提取过程中发生了不同程度的损失。

未加标水稻土 16S rRNA 目标基因绝对拷贝数在 1#–6#样品之间差异较大, 标准误差为 7.32×10^{10} copies/g, 变异系数为 53.4 (图 2A)。结合图 1 的结果, 对于 DNA 检测浓度较高的样品(5#和 6#), 相应计算出来的目标基因绝对拷贝数也较大, 表明 DNA 提取得率是影响绝对定量结果的关键因素。采用内参基因对目标基因进行标准化后, 6 份

水稻土样品标准误差为 2.54×10^{10} copies/g, 变异系数为 17.8, 变异系数降低了 66.7%, 从而显著提高了目标基因绝对定量数值的精确度。利用方差分析的基本思想, 将目标基因绝对拷贝数的总体变异分为组内变异和组间变异。内参加标法计算的数值与未加标相比, 代表随机误差的组内变异降低了 87.3%, 而组间变异中由水分差异引起的变异降低了 86.4%。

内参加标法在 *qPCR* 定量研究领域具有广泛的应用。如前人在对土壤指示动物的研究过程中, 在土壤动物样品 DNA 提取前加入突变 DNA 质粒作为内参基因, 实现了对弹尾虫(*Folsomia candida*)绝对丰度的准确估计^[21], 计算得到的基因绝对拷贝数可以作为评估弹尾虫实际生物量和生长情况的重要指标。Hoffmann 等将寄主木虱(*Diaphorina citri*)的无翼调控基因(*wg*)作为内参基因, 通过对沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)的表面蛋白基因(*wsp*)进行 *qPCR* 反应, 准确定量了寄主体内沃尔巴克氏体的种群数量丰度^[22]。这些研究多集中在真核生物细胞或原核生物的纯培养物, 本研究表明内参基因加标法同样适用于环境样品中目标基因的检测。

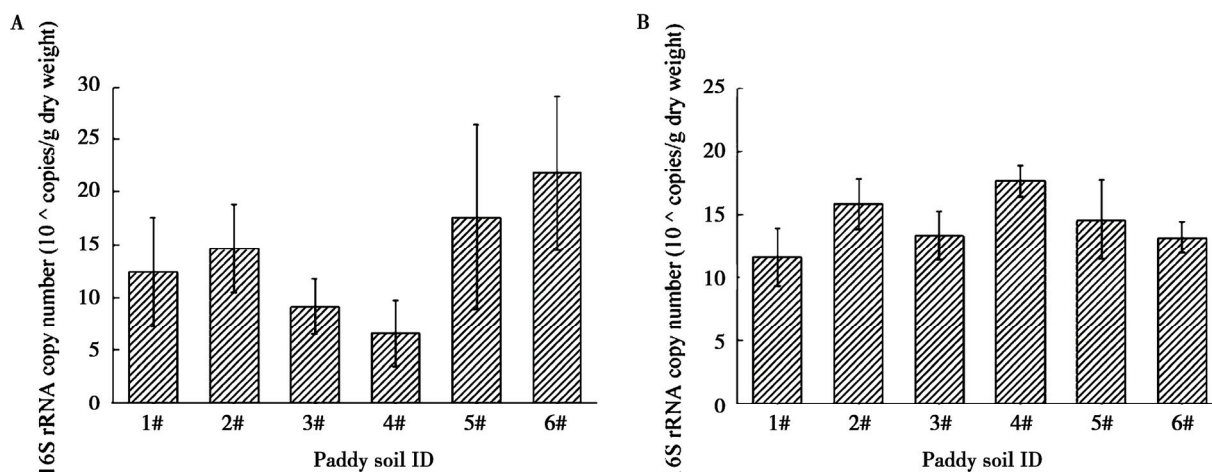


图 2 水稻土 16S rRNA 基因绝对拷贝数

Figure 2 The quantified 16S rRNA absolute gene copies for paddy soils

注: A 为未加标水稻土样品, B 为加标水稻土样品。1#–6#: 含水率为 31.2%, 39.2%, 47.2%, 55.2%, 63.2% 以及 71.2% 的同一水稻土样品; 16S rRNA 基因拷贝数含量以土壤干基表示; 误差线代表 3 个重复样品之间的标准差。

Note: A: Paddy soils without added mutated plasmid as internal standards; B: Paddy soils with added mutated plasmid as internal standards. 1#–6#: The identical soils with only varied water contents, i.e., 31.2%, 39.2%, 47.2%, 55.2%, 63.2%, and 71.2%, respectively; The DNA yields are normalized to dry soil mass; The error bar indicates the standard deviations of three replicates for each sample.

2.3 内参加标法准确定量湿地土壤 16S rRNA 目标基因

通过分析同一水稻土壤样品, 内参基因加标法显著提高了目标基因绝对定量的精确度。其中, 土壤含水率不同是导致 DNA 提取得率差异的关键因素之一。在此基础上, 我们利用内参基因加标法对 6 处湿地土壤样品中的 16S rRNA 基因绝对拷贝数进行测定, 通过 16S rRNA 基因绝对拷贝数来反应单位质量(干基)土壤中细菌种群数量的丰度(图 3)。研究表明, SJ、JH 以及 XX 等湿地土壤中细菌种群数量的绝对丰度较低, 而 BY、XZ 以及 YT 等湿地土壤中细菌种群数量的绝对丰度较高, 且 6 处湿地差异显著($P<0.05$, ANOVA)。微生物数量的差异反映了湿地土壤典型营养水平以及生态功能利用方式之间的差异性。YT 和 XZ 湿地是典型的水产品(如贝类和甲鱼等)与禽类(如鸭子)养殖湿地, 土壤的富营养程度最高; BY 为湖滨湿地, 周围常驻居民点附近氮磷等物质排放进入河道导致水体局部富营养化。相比而言, XX、JH 以及 SJ 等湿地为典型的保护区恢复性湿地。SJ 为淹水性水稻土湿地, 有机质和氮磷等营养物质在 6 处湿地中均为最低^[18]。

XZ 样品中提取的微生物基因组 DNA 颜色发黄, 表明 DNA 样品中可能存在少量腐殖酸。通过研究腐殖酸对 *qPCR* 反应的抑制性发现, XZ 样品中目标基因 *qPCR* 的实际扩增效率为 81%。假定 *qPCR* 反应的实际扩增效率可达到 100%, 此处对应的抑制系数理论值为 0.19。一般情况下, 可以通过 DNA 提取过程中的纯化步骤以及对 DNA 样品的梯度稀释, 最大限度的去除腐殖酸对 PCR 反应的抑制效应。然而当土壤中存在的腐殖酸无法有效去除时(如 XZ 样品), 可以通过计算腐殖酸抑制系数的方法来实现准确定量。*qPCR* 对土壤等复杂环境样品中基因的定量, 存在诸多误差。同一样品、不同批次的或不同人员开展相同的实验, 所得到的结果也会存在较大差异。因此在操作过程中, 需要尽量满足实验条件的一致性, 最大限度的减少随机误差和系统误差的发生。在规范实验的基础上, 通过本文

介绍的内参基因加标法, 腐殖酸对目标基因的抑制性也可以得到有效校正, 即当腐殖酸对目标基因与内参基因同时产生抑制性时, 目标基因绝对拷贝数的标准化过程[参见公式(3)]可以实现对腐殖酸抑制的校正。Lindberg 等^[23]对湖泊沉积物中采集的 50 个土壤样品进行内参基因的 *qPCR* 检测, 发现其中有 3 个样品的内参基因受到明显的抑制, 抑制系数为 0.15–0.34; 而另外一个样品中加入的内参基因没有扩增。在提取 DNA 的过程中他们发现, 同 XZ 土壤样品, 这些样品 DNA 提取物的颜色普遍泛黄, 表明其中存在腐殖酸等抑制成分。由于不同土壤样品中提取出的腐殖酸对 PCR 反应具有不同程度的抑制作用, 因此 Lindberg^[23]强调了在环境样品中加入内参来校正腐殖酸对目标基因抑制作用的必要性。实验过程中为实现更加精确的定量, 可以分别计算目标基因和内参基因的腐殖酸抑制系数, 并结合内参加标法一起使用。而在预实验时, 采用腐殖

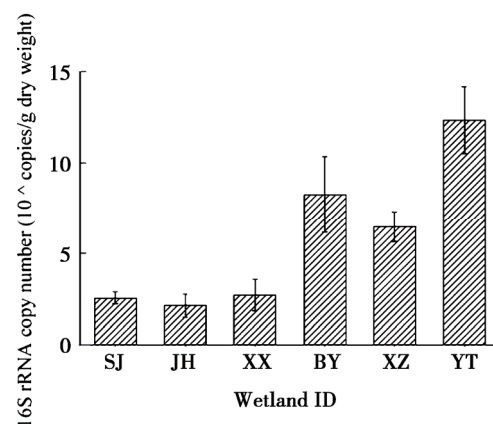


图 3 6 处加标湿地土壤 16S rRNA 基因绝对拷贝数

Figure 3 The quantified 16S rRNA absolute gene copies from six wetland soils by the methods of adding plasmid containing mutated internal gene before DNA extraction

注: 六处湿地土壤样品的含水率分别为 32.6%, 35.1%, 55.0%, 54.5%, 64.5% 以及 68.7%; 目标基因含量以土壤干基表示; 误差线代表 3 个重复之间的标准差; 其中, XZ 提取的 DNA 样品稀释 100 倍后进行 *qPCR* 试验。

Note: The water contents for these soils are 32.6%, 35.1%, 55.0%, 54.5%, 64.5%, and 68.7%, respectively; Gene copies are normalized to dry soil mass; The error bar indicates the standard deviations of three replicates for each wetland soil sample; The extracted DNA sample from XZ is diluted by 100 times before *qPCR* reactions.

酸去除效果较好的试剂盒、对样品进行必要的稀释以及评价土壤的腐殖酸抑制性,能够减少腐殖酸对结果准确性的影响。

16S rRNA基因绝对拷贝数可以反映土壤中微生物生物量的丰度。通过氯仿熏蒸浸提—水浴法^[24],本文进一步对6处湿地土壤进行微生物生物量碳的测定,得到的数据与16S rRNA基因绝对拷贝数进行Pearson线性相关分析(图4),从而考察内参基因加标法结果的准确性。研究表明,内参校正的16S rRNA基因拷贝数与微生物生物量碳两者具有极显著的正相关关系($R^2=0.694$, $P<0.001$)。未加标(图4A)与加标样品(图4B)拟合的线性方程斜率与截距较为一致,但加标样品拟合的相关系数明显高于未加标样品。比较发现,通过加标法计算的16S rRNA基因绝对拷贝数可以更加准确的反应土壤样品中微生物生物量的多少。

对于成分复杂的土壤样品,尽管经过纯化与浓缩,得到的DNA样品仍然含有一定量的腐殖酸与其共存,进而在后续 $qPCR$ 过程中抑制酶的活性。需要注意的是,不同环境样品引入的干扰可能不同,导

致不同类型土壤定量结果之间的可比性有待进一步探究。比如,森林土壤DNA样品中残留的腐殖酸组分很可能与湿地土壤不同,导致不同腐殖酸组分对内参基因与目标基因抑制程度的差异。因此在 $qPCR$ 反应前,最大限度的降低DNA样品中腐殖酸的含量具有十分重要的意义。本研究表明,内参基因加标法完全可以实现对DNA得率的矫正,而针对同类型土壤之间的比较(存在相似的腐殖酸组分),该方法对腐殖酸抑制性的矫正也具有明显效果。

目前常用的土壤微生物量检测方法主要包括传统平板计数、氯仿熏蒸法以及底物诱导呼吸法等方法。通过内参校正的16S rRNA基因或18S rRNA基因绝对拷贝数可以分别用来反映单位土壤中细菌和真菌种群数量的丰度大小,作为土壤微生物生物量测量的一种核酸检测方法。除此之外,内参基因加标法还可以对微生物功能基因进行校正,实现对微生物功能丰度的绝对定量。作为 $qPCR$ 相对定量方法的重要补充,基于内参基因加标法的目标基因 $qPCR$ 绝对定量检测适合于含水率变化导致DNA得率差异大的淹水土壤样品。

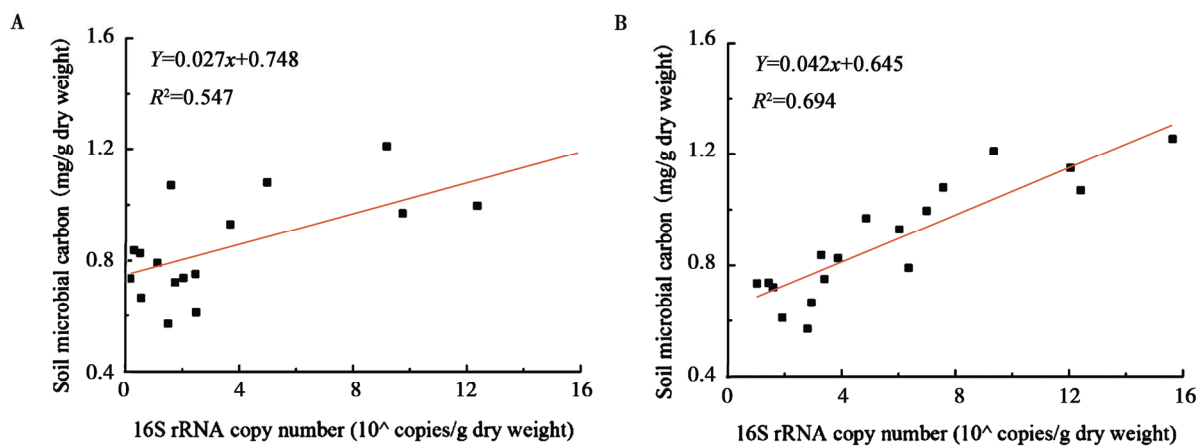


图4 16S rRNA基因绝对拷贝数与土壤微生物生物量碳的线性相关性

Figure 4 The liner correlations between 16S rRNA absolute gene copies and soil microbial biomass carbon

注: A 为未加标湿地土壤样品, B 为加标湿地土壤样品; 所分析样品来自6处湿地。

Note: A: Wetland soils without added mutated plasmid as internal standards, B: Wetland soils with added mutated plasmid as internal standards; Samples are from six studied wetlands.

3 结论

土壤等环境样品微生物基因组 DNA 在提取过程中容易受到许多随机因素的影响, 导致不同样品之间实际提取的 DNA 数量具有较大差异。在土壤 DNA 提取前加入特异性基因作为内参加标物, 加标后的 DNA 与土壤内源性 DNA 一同提取, 并分别进行内参基因和目标基因的 *qPCR* 检测, 可以有效校正 DNA 提取量对目标基因绝对定量的影响。对于含水率差异变化大、土壤有机质含量高的湿地土壤样品而言, 内参基因加标法可以实现目标基因绝对拷贝数的准确定量。

本文所采用的突变质粒对于绝大多数土壤微生物目标基因具有特异性, 不仅可以对土壤中的 16S rRNA 基因或 18S rRNA 基因绝对拷贝数进行定量, 作为土壤微生物生物量测定的一种核酸检测方法, 还可以实现对微生物功能基因丰度的绝对定量, 作为 *qPCR* 相对定量方法的重要补充。

参考文献

- [1] Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2005, 5(2): 209-219
- [2] Robert C, McGraw S, Massicotte L, et al. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos[J]. Biology of Reproduction, 2002, 67(5): 1465-1472
- [3] Park JW, Crowley DE. Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE[J]. BioTechniques, 2005, 38(4): 579-586
- [4] Zhang J, Zhang HW, Zhang CG. Real-time fluorescent quantitative PCR and its application in microbial ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(6): 1445-1450 (in Chinese)
张晶, 张惠文, 张成刚. 实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1445-1450
- [5] Dymond JS. Explanatory chapter: quantitative PCR[J]. Methods in Enzymology, 2013, 529: 279-289
- [6] Giles M, Morley N, Baggs EM, et al. Soil nitrate reducing processes-drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 407
- [7] Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 4715-4724
- [8] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322
- [9] Guo Y, Wu YC, Lin XG, et al. Three successive extractions reduce quantification bias of microbial communities associated with incomplete DNA recovery in soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(7): 894-901 (in Chinese)
- 郭贇, 吴宇澄, 林先贵, 等. 3次连续重复提取 DNA 能较好反映土壤微生物丰度[J]. 微生物学报, 2012, 52(7): 894-901
- [10] Delmont TO, Robe P, Cecillon S, et al. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(4): 1315-1324
- [11] Möller A, Jansson JK. Quantification of genetically tagged cyanobacteria in Baltic Sea sediment by competitive PCR[J]. BioTechniques, 1997, 22(3): 512-518
- [12] Nurmi J, Kiviniemi M, Kujanpää M, et al. High-throughput genetic analysis using time-resolved fluorometry and closed-tube detection[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 299(2): 211-217
- [13] Widada J, Nojiri H, Kasuga K, et al. Quantification of the carbazole 1,9a-dioxygenase gene by real-time competitive PCR combined with co-extraction of internal standards[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 202(1): 51-57
- [14] Tsien RY. The green fluorescent protein[J]. Annual Review of Biochemistry, 1998, 67(1): 509-544
- [15] Daniell TJ, Davidson J, Alexander CJ, et al. Improved real-time PCR estimation of gene copy number in soil extracts using an artificial reference[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 91(1): 38-44
- [16] Yuan W, Wan HJ, Yang YJ. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2012, 47(4): 427-436 (in Chinese)
袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择[J]. 植物学报, 2012, 47(4): 427-436
- [17] Zhao WJ, Xu J, Bao QH, et al. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR[J]. Microbiology China, 2010, 37(12): 1825-1829 (in Chinese)
赵文静, 徐洁, 包秋华, 等. 实时荧光定量 PCR 中内参基因的选择[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1825-1829
- [18] Wang H, Zhang ZJ, Li JJ, et al. Characteristics of phosphorus cycling between sediment of the wetlands and water under warming in simulated wetland habitat[J]. Wetland Science, 2011, 9(4): 345-354 (in Chinese)
王行, 张志剑, 李津津, 等. 模拟湿地生境升温条件下湿地底泥——水体磷元素循环特征[J]. 湿地科学, 2011, 9(4): 345-354
- [19] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 6578-6583
- [20] Mumy KL, Findlay RH. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(2): 259-268
- [21] Hou LB, Yanagisawa Y, Yachi S, et al. Biomass estimation of the terrestrial ecotoxicological species *Folsomia candida* (Collembola) using a real-time polymerase chain reaction[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 101(1): 59-63
- [22] Hoffmann M, Coy MR, Pelz-Stelinski KS. *Wolbachia* infection density in populations of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae)[J]. Environmental Entomology, 2014, 43(5): 1215-1222
- [23] Lindberg E, Albrechtsen HJ, Jacobsen CS. Inhibition of real-time PCR in DNA extracts from aquifer sediment[J]. Geomicrobiology Journal, 2007, 24(3/4): 343-352
- [24] Chen G, Liu YY, Yan HY, et al. A method for measuring microbial biomass C in waterlogged soil: chloroform fumigation extraction-water bath method[J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(6): 981-988 (in Chinese)
陈果, 刘岳燕, 姚槐应, 等. 一种测定淹水土壤中微生物生物量碳的方法: 液氯熏蒸浸提——水浴法[J]. 土壤学报, 2006, 43(6): 981-988