

SSCP 技术分析活性污泥微生物群落结构的条件优化及检验

王爱杰* 阚洪晶 于振国 任南琪 刘春爽 张运晴 赵阳国

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

摘要: 单链构象多态性(SSCP) 技术是一种分析环境微生物遗传多态性的有效方法, 具有快速、简便、灵敏等特点。但是, 该技术用于分析复杂环境微生物群落结构时需要有针对性地优化操作条件。本研究针对聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)胶浓度、上样缓冲液中去离子甲酰胺浓度、电泳温度、电泳时间等确定了 PCR-SSCP 技术的优化条件, 并以自养脱硫反硝化反应器启动期的活性污泥样品对此优化条件进行了检验, 证明了 16S rDNA V1~V3 区为靶对象时, 丙烯酰胺与甲叉的质量比 49:1, 质量分数 12%的聚丙烯酰胺凝胶, 上样缓冲液中去离子甲酰胺的体积分数 1/3, 在 4℃, 300 V, 电泳 18 h 是最优的操作条件, 可以获较理想的 SSCP 图谱。

关键词: 单链构象多态性, 条件优化, 检验, 微生物群落

Optimal Conditions and Validation of Single-strand Conformation Polymorphism Technology for the Analysis of Microbial Communities in Activated Sludge

WANG Ai-Jie* KAN Hong-Jing YU Zhen-Guo REN Nan-Qi LIU Chun-Shuang
ZHANG Yun-Qing ZHAO Yang-Guo

(School of Environmental and Municipal Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

Abstract: Single-Strand Conformation Polymorphism(SSCP) is an effect method for investigating environment microbial genetic polymorphism, with its characterization of rapidness, simplicity, and sensitivity. However, many factors can influence the results of SSCP in the analysis of complex environment samples, and its optimization is highly needed. In this paper, optimal PCR-SSCP conditions were discussed based on PAGE concentration, formamide deionized in denaturing loading buffer, electrophoresis time and temperature. The results showed that the optimal conditions were as follows: 16S rDNA V1~V3 was selected as the targeted gene, the ratio of acrylamide to N, N-dimethylacrylamide in 12% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)gel was 49:1, the ratio of formamide deionized in denaturing loading buffer was 1:3, running the SSCP gel at 300 V for 18 h (under 4℃). Aside from this, the validations using samples from a simultaneous desulfurification and denitrification bioreactor were conducted under this optimal conditions.

Keywords: Single-strand conformation polymorphism, Optimal conditions, Validation, Microbial community

单链构象多态性(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)技术是近年来发展起来的新的DNA标记技术,具有操作简单、无需特殊设备、快速、灵敏等特点。该技术最开始由日本科学家Orita于1989年建立^[1],即利用DNA单链构象具有多态性,在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时迁移率的不同来分析DNA单链中的基因突变。Lee等首先将SSCP技术应用于微生物群落组成的分析^[2]。目前,SSCP技术在突变检测上应用较多^[3-5]。但是,应用于环境样品微生物群落结构解析研究较少。作者在研究中发现该技术应用于环境微生物研究仍不够成熟,不同研究者报道的试验条件和结果差异较大^[6-8]。因此,本研究以自养脱硫反硝化工艺的活性污泥为例,探讨如何优化PCR-SSCP技术的操作条件,以期解析反应器的微生物群落结构与群落动态,从而指导工艺的运行调控提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

本试验活性污泥样品取自连续流运行的厌氧膨胀床反应器^[9],是一种废水碳(有机物)、氮(硝酸盐)、硫(硫酸盐)同步脱除并回收单质硫的工艺。反应器进水COD浓度 2000 mg/L,硫酸盐浓度 1000 mg/L,硝酸盐浓度 232.5 mg/L,水力停留时间在 10 h,进水pH值和碱度分别为 7.0~8.0 和 1000 mg/L。反应器连续流运行 35 d完成启动过程。此过程中,每 5 天取 1 次活性污泥。

1.2 DNA 的提取

采用灭菌的移液管吸取活性污泥置于无菌的离心管中,并迅速插入冰中,样品直接用于基因组DNA的提取或存于-80℃冰箱中待用。提取DNA时,取 0.5 mL 活性污泥,以细菌基因组DNA小量提取试剂盒(上海华舜)按产品说明书提取总DNA,最后用 50 μL 2 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0~8.5)溶解纯化的DNA。

1.3 PCR 扩增

PCR扩增采用的引物,分别对应于*E. coli* 16S rRNA基因的 8 bp~27 bp和 533 bp~515 bp,引物基因序列为BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT

CAG-3; SRV3-2: 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCA-3^[2],反向引物SRV3-2的5'端采用磷酸标记,以上引物均由上海博亚生物技术有限公司合成并标记。PCR采用 50 μL反应体系于PE公司 9700 PCR仪上进行。50 μL反应体系中分别包括 10×Ex Taq buffer 5 μL, dNTP 4 μL, 引物各 1.5 μL, Ex Taq酶 0.25 μL, 10×BSA 0.5 μL, 模板DNA 1.5 μL。反应程序为: 94℃ 变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环,每个循环退火温度降低 0.2℃; 循环完毕后 72℃ 延伸 10 min。1%的琼脂糖监测后,置于 4℃ 中保存。

1.4 PCR 产物处理及纯化

λ核酸外切酶能够专一降解双链DNA中 5'磷酸标记的链,从而使非标记的单链释放出来^[10]。为降低微生物群落图谱的复杂性,提高条带与种群的对 应性,采用该酶将群落PCR产物磷酸标记的反意义链降解。本实验所用的λ核酸外切酶由Invitrogen(上海)合成并标记。50 μL反应体系中包括,λ核酸外切酶 20 U (New England Biolabs), 10×buffer 5 μL, PCR产物 40 μL。37℃ 温浴 2 h。酶解产物采用酚/氯仿纯化,醇沉过夜后,最终溶解于 20 μL ddH₂O中。

1.5 SSCP 图谱产生及分析

酶解产物(约 100 ng)10 μL与 5 μL上样缓冲液混合后,热变性后上样。采用 1×TBE缓冲液,聚丙烯酰胺电泳。电泳结束后,将聚丙烯酰胺凝胶从玻板上剥下,按Bassam等^[11]的方法进行银染。

选取含量较大或变化较大的条带按文献^[12]方法回收单链DNA,再扩增后克隆进T-载体(pMD18-T, 宝生物),每条带选取 5 个克隆进行测序分析。

将测得的序列通过RDP^[13]中的Sequence Match进行分类,继以软件Sequencher 5.0(Gene Codes)将相似性高于 95%的序列归为同一个OTU,将不同的OTU通过Blastn^[14]与数据库中的序列进行对比分析。

2 SSCP 技术条件的优化

本试验采用厌氧膨胀床反应器启动过程中第0、5、10、15天的泥样,提取DNA,PCR扩增,扩增样品后处理之后,为提高SSCP分析的检出率,我们对

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)胶浓度、上样缓冲液中去离子甲酰胺的浓度、SSCP 电泳温度进行了优化。除比较条件外,其它电泳条件一致,优化条件以及结果介绍如下。

2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)胶浓度

在研究微生物群落结构及系统发育学分析中,核糖体小亚基 RNA(SSU rRNA)基因由于其进化上的保守性以及操作上的简便性无疑是最理想的靶基因。在对微生物群落进行 SSCP 分析时, Lee 等人研究显示,由 V3 可变区设计的引物,无论对于革兰氏阴性菌还是革兰氏阳性菌都取得了很好的扩增效果^[2]。然而,200 bp 的 V3 区可能无法为系统发育分析

提供更多的信息。因此我们采用 V1-V3 可变区为靶对象,长度约 500 bp。

本研究在 4 条件下的试验结果表明,选用 500 bp 的核酸片段,丙烯酰胺与甲叉丙烯酰胺的比例为 49:1 时,质量分数为 8% 的凝胶条带模糊,可读性很差(图 1-A)。质量分数为 12% 凝胶电泳所得图谱多样性较好,分辨率高,条带整齐(图 1-B)。质量分数为 16% 凝胶虽然能够分离一定数量的微生物类群,但是微生物群落多样性没有表现出来,由于胶浓度过大,反而导致很多条带无法分开(图 1-C)。可见,质量分数为 12% 的凝胶效果较好,该条件下产生的 SSCP 图谱条带较清晰,多样性丰富,可读性强,可用于同步脱硫反硝化系统污泥微生物群落结构分析。

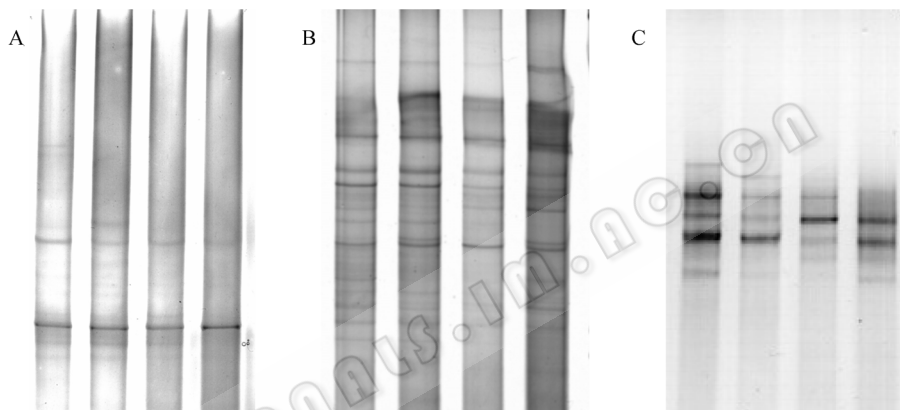


图 1 分别采用 8%、12% 和 16% 浓度的电泳图谱

Fig. 1 SSCP profile using PAGE gel of 8%, 12%, 16%

2.2 上样缓冲液中去离子甲酰胺的浓度

有资料表明^[15],凝胶中加入去离子甲酰胺有助于提高敏感性,适当浓度的去离子甲酰胺可以防止单链之间形成无效的退火,增强 SSCP 图谱的可读性,但是本研究发现,过高浓度的去离子甲酰胺会导致单链内部无法形成链内氢键,不能形成稳定的三维结构,进而导致 SSCP 图谱无法完成。

将去离子甲酰胺分别以 1:1、1:2 和 1:3 比例和上样缓冲液混合,再与样品混合后变性上样,在 4 的试验条件下电泳得到如图 2 的图谱。可见,去离子甲酰胺和上样缓冲液以 1:3(V/V) 比例进行 SSCP 分析时,条带分离效果好,条带整齐,清晰度高,多样性较高,有利于对图谱进行后续的测序分析。

2.3 温度

研究表明,保持凝胶内温度恒定是 SSCP 分析最

关键的因素^[16],温度有可能直接影响 DNA 分子内部稳定力的形成及其所决定的单链构象,从而影响差异碱基的检出。实际操作多在 4 (冰箱冷藏室)下进行。室温电泳同样适用于大多数情况,但温度条件较难控制,由于在电泳时,温度会升高,为确保电泳温度相对恒定,应减少凝胶厚度,降低电压,有效的空气冷却或循环水冷却等。当电压为 300 V,电泳时间均为 18 h 时,进行了 4 和 20 的对比试验,本试验在 4 时(图 3-A)获得了较 20 (图 3-B)电泳条件下条带整齐,分辨率高,可读性强的图谱。

因此,确定以下优化条件:丙烯酰胺与甲叉的比例 49:1,质量分数 12% 的聚丙烯酰胺凝胶,上样缓冲液中去离子甲酰胺的体积分数 1:3,在 4 , 300 V,电泳 18 h。

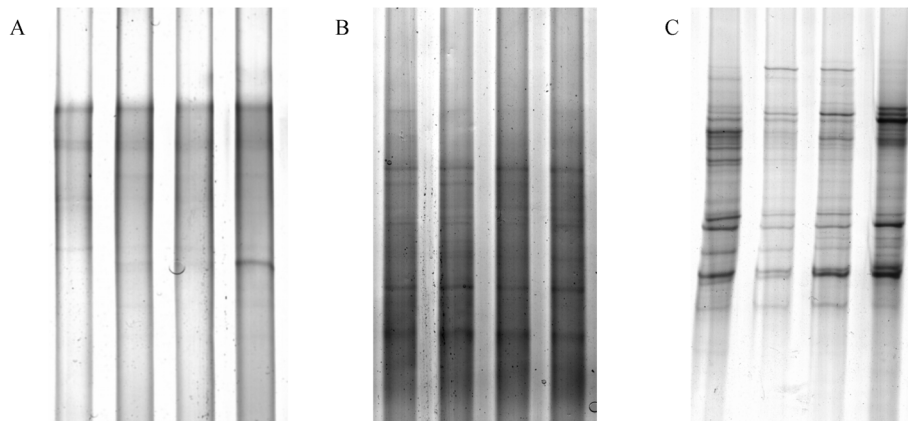


图2 去离子甲酰胺比例采用 1:1、1:2 和 1:3 比例作图
Fig. 2 SSCP profile using formamide deionized gradient of 1:1, 1:2 and 1:3

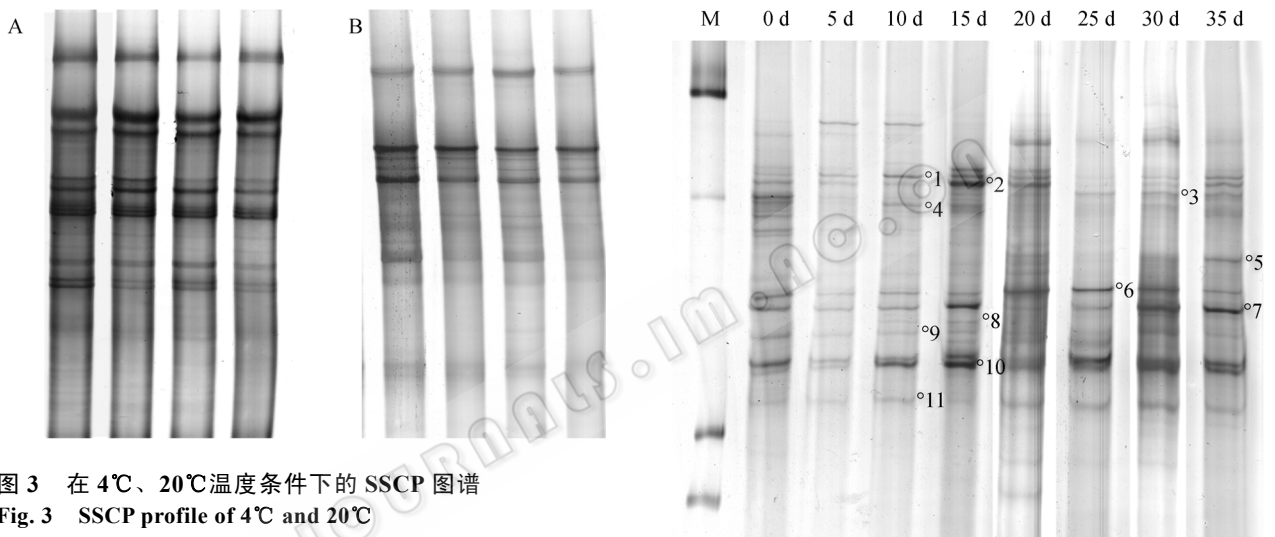


图3 在 4°C、20°C 温度条件下的 SSCP 图谱
Fig. 3 SSCP profile of 4°C and 20°C

3 操作条件优化后的检验

采用上述优化条件,分析厌氧膨胀床同步脱硫反硝化反应器启动过程中微生物群落结构及其群落动态。反应器启动过程中,每隔 5 d 监测污泥中微生物群落状态。真菌菌微生物种群动态 SSCP 图谱如图 4。同时,对图 2 中的显著性条带 1~11 进行回收,再扩增并克隆后,每个条带随机选取 1~4 个转化子进行测序,长度约 500 bp,共测得 32 条序列,采用 Sequencher 5.0 比对 32 条序列,设置最小匹配 95%,最小重叠 100 bp,得到 23 个不同的操作分类单元 (Operational Taxonomy Unit, OTU);由于对图谱中的主要条带均进行了克隆测序分析,其多样性能够代表反应器的微生物种群结构。23 个 OTU 通过 Blastn 比较结果见表 1。

图4 反应器启动过程中微生物群落 SSCP 图谱
Fig. 4 SSCP profile of microbial community in the set-up period of the reactor

结合图 4 和表 1 可以看出,在反应器的启动过程中,微生物群落发生了剧烈演替,反应器运行到第 15 天时,*Anaerolinea*、*Bizionia*、*Ochrobactrum*、*Bradyrhizobium*、*Pseudomonas*、*Roseivirga*、*Sulfurospirillum* 得到富集。到第 30 天,*Anaerolinea*、*Bradyrhizobium*、*Pseudomonas*、*Roseivirga*、*Sulfurospirillum* 得到富集。到第 35 天,*Anaerolinea*、*Bizionia*、*Ochrobactrum*、*Bradyrhizobium*、*Pseudomonas* 消失,而 *Desulfomicrobium* 和 *Paracoccus* 出现并富集。随着反应器的运行,以 *Desulfomicrobium* 和 *Paracoccus* 为代表菌属的硫酸盐还原、硝酸盐还原硫化物氧化等功能微生物类群逐渐富集。

表1 通过 Blastn 和 Sequence Match 对 23 个 OTU 进行相似性检索结果
Table 1 Retrieve results of 23 OTUs by Blastn and Sequence Match

OTU	条带序号 (Band no.)	相似菌株, GenBank 登录号, 相似性 (Most similar sequence, GenBank No, similarity)	最相近菌属 (Most similar genus)
1	B1-3,4	Uncultured Chloroflexi bacterium AY211661, 95%	<i>Anaerolinea</i>
2	B2-1	Uncultured anaerobic bacterium AY953215, 99%	<i>Bizionia</i>
3	B2-2	<i>Ochrobactrum anthropi</i> AY776289, 99%	<i>Ochrobactrum</i>
4	B2-3	<i>Bradyrhizobium afipiaefelis</i> AY548800, 99%	<i>Bradyrhizobium</i>
5	B3-1,2	<i>Paracoccus yeeii</i> AY014172, 97%	<i>Paracoccus</i>
6	B3-3,4	<i>Anaerolinea thermophila</i> AB046413, 90%	<i>Anaerolinea</i>
7	B3-5	Uncultured bacterium DQ443988, 93%	<i>Aminobacterium</i>
8	B4-1	<i>Pseudomonas</i> sp. DQ219371, 97%	<i>Pseudomonas</i>
9	B4-4	Uncultured anaerobic bacterium AY953210, 97%	<i>Bizionia</i>
10	B4-5	Uncultured anaerobic bacterium AY953215, 99%	<i>Bizionia</i>
11	B5-1,4,5	<i>Desulfomicrobium apsheronum</i> DAU64865, 98%	<i>Desulfomicrobium</i>
12	B6-3	Uncultured anaerobic bacterium AY953215, 98%	<i>Bizionia</i>
13	B7-1,3,4	Uncultured soil bacterium AY221602, 98%	<i>Propionibacterium</i>
14	B7-2	Uncultured anaerobic bacterium AY953151 99%	<i>Aminobacterium</i>
15	B8-1	Unidentified eubacterium UEA229182, 97%	<i>Roseivirga</i>
16	B8-3	Uncultured <i>Sulfurospirillum</i> sp. AY780560, 96%	<i>Sulfurospirillum</i>
17	B8-5	Uncultured bacterium AY548942, 99%	<i>Anaerolinea</i>
18	B9-3	<i>Brevundimonas</i> sp. DQ406733, 95%	<i>Brevundimonas</i>
19	B9-5	Uncultured anaerobic bacterium AY953151, 96%	<i>Synergistes</i>
20	B10-1,2	Uncultured bacterium AB240460, 98%	<i>Sulfurovum</i>
21	B10-3,5	Uncultured epsilon proteobacterium AY261811, 99%	<i>Sulfurovum</i>
22	B11-1,5	Uncultured <i>Campylobacteraceae</i> bacterium DQ507155, 95%	<i>Sulfurovum</i>
23	B11-4	Uncultured epsilon proteobacterium DQ295703, 99%	<i>Sulfurovum</i>

4 结论

本研究针对 PCR-SSCP 技术分析活性污泥微生物群落需考虑的电泳温度、交联度、片段长度等关键因素, 对操作条件进行了优化, 并以自养脱硫反硝化反应器启动期的活性污泥样品作为检验目标, 确定了以下优化条件: 以 16S rDNA V1~V3 区为靶对象, 丙烯酰胺与甲叉的质量比 49:1, 质量分数 12% 的聚丙烯酰胺凝胶, 上样缓冲液中去离子甲酰胺的体积分数 1/3, 4, 300 V, 电泳 18 h。在此条件下可以得到多样性高、可读性强、分辨率好的 SSCP 图谱。对图谱进行后续测序分析, 发现优化的 SSCP 技术可以快速、简便地获得功能微生物及其与非功能微生物之间关系的有效信息, 这对于指导工艺运行条具有重要的理论价值和指导意义。

参考文献

[1] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as

singlestrand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(8): 2766-2770.

- [2] Lee DH, Zo YG, Kim SJ. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(9): 3112-3120.
- [3] Kim BJ, Lee KH, Park BN, *et al.* Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by nested PCR-linked single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**(7): 2610-2617.
- [4] Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, *et al.* Genomic mutations in the kat G, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis*, 2000, **80**(1): 47-56.
- [5] Tournel G, Cauffiez C, Billaut-Laden I, *et al.* Molecular analysis of the CYP2F1 gene: Identification of a frequent non-functional allelic variant. *Mutation Research*, 2007, **617**(1-2): 79-89.
- [6] Zhang CL, Wang YH, Chen H, *et al.* Enhance the effi-

- ciency of single-strand conformation polymorphism analysis by short polyacrylamide gel and modified silver staining. *Analytical Biochemistry*, 2007, **365**(2): 86–287.
- [7] 杨志惠, 周 斌, 贾 静, 等. PCR-SSCP 分析参数的研究. 泸州医学院学报, 2005, **28**(5): 391–393.
- [8] 魏太云, 林含新, 谢联辉. PCR-SSCP 分析条件的优化. 福建农林大学学报, 2002, **31**(1): 22–25.
- [9] Wang AJ, Liu CS, Ren NQ, *et al.* Feasibility of an innovative integrated process of simultaneous desulfurization and denitrification for high strength wastewater. *Journal of harbin institute of technology*. In press.
- [10] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, *et al.* The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(6): 1585–1596.
- [11] Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, **196**(1): 80–83.
- [12] Schmalenberger A, Tebbe CC. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol Ecol*, 2003, **12**(1): 251–262.
- [13] Cole JR, Chai B, Marsh TL, *et al.* The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(1): 442–443.
- [14] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(17): 3389–3402.
- [15] Yap EPH, Mcgee JO. Non-isotopic single-strand conformation polymorphism(SSCP) analysis of PCR products. PCR technology: current innovations. CRC Press, 1994, pp. 165–177.
- [16] Kodama Y, Ha LT, Watanabe K. *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**: 827–831.



稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 $S E$ 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。