

工业化废水处理反应器污泥总 DNA 提取方法

张 苏 刘 春* 杨景亮 郭建博 李再兴

(河北科技大学环境科学与工程学院 石家庄 050018)

摘 要: 根据工业化废水处理反应器污泥特性,对常规的溶菌酶-SDS-酚/氯仿环境样品总 DNA 提取方法进行改进,增强样品预处理,强化细胞裂解,提高杂质去除效率,获得了一种工业化污泥总 DNA 提取的通用方法,并采用该方法对石家庄若干实际运行的工业化厌氧、好氧反应器的污泥样品进行了总 DNA 提取研究。结果表明,该方法对所选污泥样品均有效,具有普适性。提取的污泥总 DNA 杂质含量少,纯度高, A260/ A280 在 1.8 左右;提取效率较高,总 DNA 产率都在 0.7 mg/g 以上,最大产率可达 0.85 mg/g。所提取的污泥总 DNA 可以直接作为模板进行 PCR 反应,PCR 产物直接进行变性梯度凝胶电泳(DGGE),能够得到较好的 DGGE 谱图,表明该方法提取的污泥总 DNA 样品可满足后续分析研究的要求。

关键词: 工业化废水处理反应器, 厌氧/好氧污泥, 总 DNA, 提取方法

A Method for Total DNA Extraction of Sludge Samples from Full-scale Wastewater Treatment Bioreactors

ZHANG Su LIU Chun* YANG Jing-Liang GUO Jian-Bo LI Zai-Xing

(School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract: According to the characteristics of sludge samples from full-scale wastewater treatment bioreactors, the essential total DNA extraction method for most environmental samples, lysozyme-SDS-phenol/chloroform method, was modified to improve sample pretreatment, intensify cell lysis and enhance the efficiency of impurity removal. Obtain a general total DNA extraction method for industrial sludge samples. Such a method was applied for total DNA extraction of sludge samples from several running full-scale anaerobic or aerobic bioreactors in Shijiazhuang, China. The results indicated that the modified method was suitable for all the sludge samples in this study, showing the satisfying generality. The extracted total DNA of all sludge samples were pure, with about 1.8 of A260/ A280 ratio. The method was also efficient; with average total DNA yield of over 0.7 mg/g and maximum yield of 0.85 mg/g. Moreover, all the extracted total DNA samples could serve as templates directly to amplify 16S rDNA by PCR. The PCR products could be separated well by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the DGGE band patterns were clear enough to be used for further analysis. All these facts indicated that the total DNA extraction method provided in this study could meet the requirements of sludge samples research, from full-scale wastewater treatment bioreactors, using molecular biology technologies.

Keywords: Full-scale wastewater treatment bioreactor, Anaerobic/aerobic sludge, Total DNA, Extraction method

污泥是废水生物处理中微生物的主要存在形式,研究污泥中微生物群落结构和动态变化对于探讨和改善生物处理性能具有重要意义。分子生物学技术的迅速发展突破了传统分离培养技术的局限,为微生物群落研究提供了更为直接和可靠的手段,DGGE、FISH、RAPD 等分子生物学技术被广泛的应用于废水处理污泥样品微生物群落研究^[1-5]。研究表明,样品总 DNA 提取以及所提取总 DNA 质量是影响分子生物学技术应用于微生物群落研究的关键环节之一^[6,7]。

在污泥样品总 DNA 的提取方法中,污泥分散、细胞裂解和杂质去除是决定提取成败和 DNA 质量的核心步骤。在常规的提取方法中,污泥分散通常采用玻璃珠研磨法;细胞裂解的方法主要包括超声破碎法、反复冻融法、玻璃珠研磨法、煮沸法等;杂质去除多用酚/氯仿抽提法^[8,9]。目前常规的环境样品总 DNA 提取方法在土壤样品和实验室小型反应器污泥样品中应用较多^[10-13],针对实际运行的工业化废水处理反应器污泥样品总 DNA 提取方法的研究

还比较少。

实际运行的工业化废水处理反应器,受处理废水水质和运行状态影响,污泥组分和结构复杂,杂质成分多,性状差异较大,对总 DNA 提取造成一定困难,不利于后续分子生物学技术手段的应用和研究。故本研究以常规溶菌酶-SDS-酚/氯仿提取方法为基础,建立适宜工业化废水处理反应器污泥特性的总 DNA 提取方法,并选取石家庄市若干实际运行的工业化厌氧、好氧反应器不同性状的污泥样品,开展总 DNA 提取研究,同时通过 PCR-DGGE 分析考察该方法所提取的总 DNA 样品对后续分子生物学技术应用的影响。

1 材料与方法

1.1 污泥样品

本研究中污泥样品取自中国石家庄华北制药总厂、威尔康制药公司、维可达制药公司等企业 and 城市污水处理厂实际运行的工业化反应器及实验室小试反应器。污泥样品性质如表 1 所示。

表 1 污泥样品性质
Table 1 The properties of sludge samples

样品编号 Sample number	处理废水 Wastewater-treating	好氧/厌氧 Aerobic/anaerobic	颗粒/絮状 Granular/floc	反应器规模 Bioreactor scale
1	青霉素	厌氧	颗粒	工业化
2	连霉素	厌氧	絮状	工业化
3	黏菌素	厌氧	颗粒	小试
4	维生素 B ₁₂ (V _{B12})	厌氧	颗粒	工业化
5	维生素 C(V _C)	厌氧	絮状	工业化
6	城市生活污水	厌氧	颗粒	工业化
7	城市生活污水	好氧	絮状	工业化

1.2 试剂和仪器

实验所用主要溶液包括:溶菌酶溶液(5 mg/mL)、6%SDS、蛋白酶 K(10 mg/mL)、5 mol/L NaCl、CTAB/NaCl (10 mol/L CTAB, 0.7 mol/L NaCl)、苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, V/V/V)、氯仿:异戊醇(24:1, V/V)、异丙醇(-20℃ 预冷)。

实验所用生化、化学试剂均购于赛百盛生物试剂公司。

实验所用主要仪器包括:SORVALL 公司

Biofuge Primo R 型冷冻离心机、上海天美有限公司 UV2600 型紫外分光光度计、北京六一仪器厂 DYY-6C 型电泳仪、美国 Applied Biosystems 公司 2720 型 PCR 仪、美国 Bio-Rad 公司 GelDocXR 型凝胶成像系统等。

1.3 污泥总 DNA 提取方法

(1) 样品预处理

样品分散:取污泥样品 5 mL,于 50 mL 离心管中。加入 3~4 粒玻璃珠(半径 2 mm~3 mm),研磨

1.5 min~3 min, 研磨时间因污泥絮体特性而异, 颗粒化污泥研磨时间最长。样品洗涤: 8000 r/min 离心 5 min, 加入 5 mL TE 缓冲液(Tris 100 mmol/L, EDTA 100 mmol/L, pH 8.0), 振荡混匀 2 min, 以上样品洗涤步骤重复 2 次。

(2) 细胞裂解

经过预处理的污泥样品, 加入 50 mg/mL 的溶菌酶, 终浓度为 5 mg/mL, 在恒温摇床上 37°C、225 r/min 条件下, 振荡 30 min; 将样品分装于 1.5 mL 离心管中, 每管 1 mL; 加入 6% SDS 200 μ L(终浓度为 1%), 轻轻颠倒混匀, 65°C 温育 3 h, 每 20 min 上下轻轻颠倒几次; 3 h 后将样品取出, 冷却至室温, 每管样品重新分装于 2 个 1.5 mL 离心管中, 加入 10 mg/mL 的蛋白酶 K 6 μ L, 55°C 温育 1 h; 每个离心管中加入 100 μ L 5 mol/L NaCl, 80 μ L CTAB/NaCl (10 mol/L CTAB, 0.7 mol/L NaCl), 65°C 温育 10 min。

(3) 总 DNA 的纯化

加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, *V/V/V*), 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, *V/V*), 上下颠倒混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 重复此步, 直到界面无蛋白。

(4) 总 DNA 收集

加入等体积的异丙醇, 于 -20°C 沉淀过夜。12000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 再加入 80% 乙醇 100 μ L 洗涤 DNA, 12000 r/min 离心 5 min, 重复 2 次, 开盖挥发掉残留乙醇; 加入 100 μ L 无菌水溶解。加入 1 μ L RNaseA 溶液, 37°C 温育 30 min。用紫外分光光度计测量核酸浓度和纯度。

1.4 总 DNA 样品的 PCR 扩增

以污泥样品总 DNA 为模板, 以细菌和古菌的 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增。引物序列为: BSF338(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 BSR534(5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'), GC 夹序列为: 5'-CGCCC GCCGCGCCCCGCGCCCGT CCCGCCGCCCCGCCCCG-3'^[14]。PCR 反应条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 65°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s, 每个循环退火温度降低 0.5°C, 直至 55°C, 20 个循环; 然后 94°C 变性 1 min; 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s, 15 个循环; 72°C 最终延伸 8 min。PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

污泥样品总 DNA 的 PCR 产物采用 Bio-Rad 变性梯度凝胶电泳(DGGE)仪进行分析。制备 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度范围为 30%~60%(100% 的变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺混合物)。电泳条件为: 60°C, 60 V 电压下, 电泳 12 h。电泳结果经 EB 染色后用 Bio-Rad 凝胶成像系统观察并用 Quantity One 软件进行分析。

2 结果及讨论

2.1 工业化废水处理反应器污泥样品总 DNA 提取策略

实际运行的工业化废水处理反应器污泥与实验室小试反应器污泥组成和性状的差异, 对总 DNA 的提取造成了干扰。本研究中应用文献报道^[15-17]的实验室小型反应器污泥总 DNA 提取方法提取工业化废水处理反应器污泥总 DNA, 均未取得满意的提取结果。因此, 针对工业化废水处理反应器污泥样品特性, 本研究对常规“溶菌酶-SDS-酚/氯仿抽提”方法进行改进, 通过加强污泥分散效果、强化细胞裂解和高效去除蛋白质及多糖等成分等策略, 实现工业化反应器污泥样品总 DNA 的有效提取。

分散预处理: 强化污泥样品的研磨效果, 使污泥更好地分散, 特别是针对颗粒化程度高的污泥样品, 可以适当延长研磨时间; 对于污泥样品内含有的杂质成分, 采用 TE 缓冲溶液重复洗涤, 消除杂质干扰, 减小对后续步骤的影响^[18]。强化细胞裂解: 与常规溶菌酶-SDS-酚/氯仿法相比, 延长 SDS 作用时间, 并且每 20 min 上下混匀 1 次, 使 SDS 与细胞更充分的接触, 增强 SDS 细胞裂解的作用效果。杂质去除: 加入蛋白酶 K, 去除和总 DNA 结合的蛋白; 本方法中增加 CTAB/NaCl, 去除提取产物中的多糖, 使所提取的总 DNA 利于分离; 用苯酚, 氯仿, 异戊醇纯化, 进一步消除蛋白的干扰。

2.2 污泥总 DNA 样品纯度及产率

本研究中, 所有污泥样品所提取的总 DNA 纯度和浓度采用紫外-可见分光光度计检测, 其中纯度以 A_{260}/A_{280} 作为指标, 测得总 DNA 样品浓度后计算产率。各污泥样品总 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 比值和产率(1 g 湿重污泥中的总 DNA 提取量)如表 2 所示。可以看到, 本研究提取方法所得总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8 左右, 说明总 DNA 样品中

表 2 污泥样品总 DNA 样品纯度和产率 Table 2 Yield and purity of DNA products of different samples								
污泥样品 Sludge samples	1	2	3	4	5	6	7	
纯度 Purity (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	1.7933	1.8122	1.7823	1.8024	1.8275	1.8067	1.7945	
产率 Yield (mg/g)	0.7034	0.7453	0.6983	0.8505	0.8266	0.805	0.8343	

杂质含量低, DNA 纯度较高。同时, 所有污泥样品的总 DNA 产率都在 0.7 mg/g 以上, 最大产率可达 0.85 mg/g, 说明该方法对污泥样品总 DNA 的提取效率较高。

以上污泥样品提取总 DNA 的纯度和产率结果说明, 对本研究中所选不同性质的工业化废水处理反应器污泥样品, 该提取方法均可以得到较好的污

泥总 DNA 样品, 说明本方法对污泥样品具有很好的普适性。

所提取污泥样品总 DNA 采用琼脂糖凝胶电泳检测, 部分样品电泳图谱如图 1 所示。可以看到, 污泥样品的总 DNA 大小均在 23 kb 左右, 无明显脱尾和 RNA 干扰现象。从电泳结果同样可以看到, 本方法对不同污泥样品总 DNA 具有较好的提取效果。

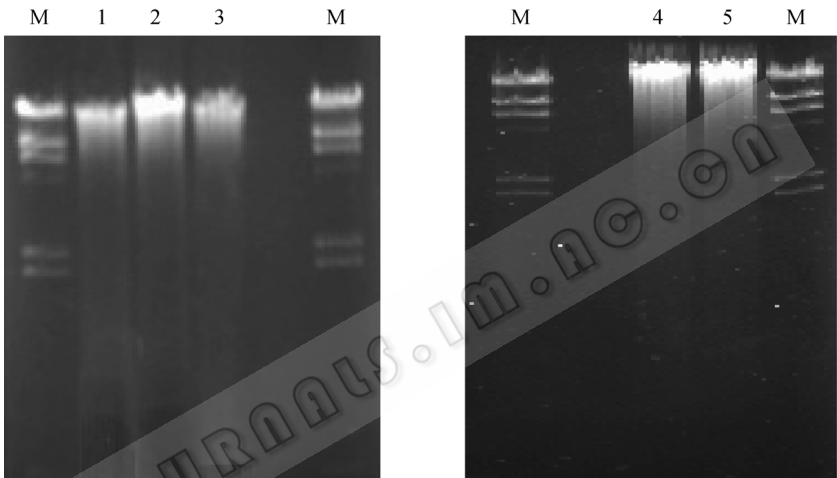


图 1 部分污泥样品总 DNA 琼脂糖电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA of some sludge samples

注: 样品 No.1~No.5 见表 1
Note: The samples No.1~No.5 list in Table 1

2.3 污泥样品总 DNA 的 PCR 扩增

有研究表明, 总 DNA 提取方法对微生物多样性研究中 PCR-DGGE 分析结果有重要影响^[19]。为了考察污泥总 DNA 提取样品对后续分子生物学技术应用的影响, 本研究以所有污泥总 DNA 样品为模板, 进行了 PCR 扩增反应。部分 PCR 产物琼脂糖电泳图谱如图 2 所示。可以看到, 所有污泥总 DNA 样品的 PCR 产物大小均在 200 bp 左右, 没有非特异性条带。研究表明, DNA 纯度是影响 PCR 成功的关键^[7], 因此, 图 2 所示的 PCR 产物结果进一步说明, 本提取方法所得到的总 DNA 纯度高, 不含 PCR 反应抑制物, 可满足后续的分子生物学技术应用的要求。

为进一步考察本提取方法在工业化废水处理反应器污泥微生物群落研究中应用的可靠性, 本研究

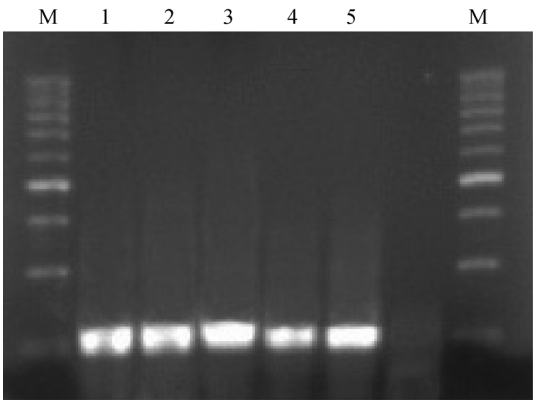


图 2 部分总 DNA 样品 PCR 产物琼脂糖电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of some total DNA samples
注: 样品 No.1~No.5 见表 1
Note: The samples No.1~No.5 list in Table 1

对所有污泥总 DNA 样品的 PCR 产物进行 DGGE 电泳分析, 部分样品(No.2、No.3)PCR 产物的 DGGE 图谱如图 3 所示。可以看到, PCR 扩增产物中不同的 16S rDNA 片段在 DGGE 胶中可以较好地分离, 得到的 DGGE 图谱可以满足微生物群落分析的要求。因此, 从以上 PCR-DGGE 实验结果可以看出, 本研究中污泥总 DNA 提取方法可以应用于污泥微生物群落分析和研究中, 不会对后续分子生物学技术手段的应用造成影响。

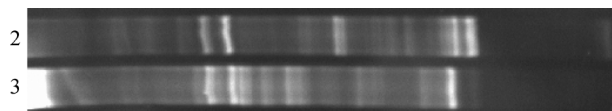


图 3 污泥样品 2、3 的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profiles of sludge sample 2 and 3

注: 样品 No.2 和 No.3 见表 1

Note: The samples No.2 和 No.3 in Table 1

3 结论

(1) 通过加强污泥分散效果、强化细胞裂解和高效去除杂质等策略, 获得改进的污泥总 DNA 提取方法, 该方法对本研究所选取的工业化废水处理反应器污泥样品均有效, 具有较好的普适性。

(2) 该方法所提取的所有污泥样品总 DNA 纯度高, 含杂质量少, A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8 左右; 同时, 提取效率较高, 所有污泥样品的总 DNA 产率都在 0.7 mg/g 以上, 最大产率可达 0.85 mg/g。

(3) 该方法所提取的所有污泥样品总 DNA 可以直接进行 PCR 扩增反应以及 DGGE 分析, 可以满足后续分子生物学技术的应用和污泥微生物群落研究的要求。

参 考 文 献

- [1] 邢 薇, 左剑恶, 孙寓皎. 利用 FISH 和 DGGE 对产甲烷颗粒污泥中微生物种群的研究. 环境科学, 2006, 27(11): 2268–2272.
- [2] 刘新春, 吴成强, 张 昱, 等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析. 生态学报, 2005, 25(4): 242–248.
- [3] Collins G. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up psychrophilic anaerobic digester treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 4(6): 159–170.
- [4] 叶姜瑜, 罗固源, 吉芳英, 等. 污水生物处理功能微生物

物的多样性. 重庆大学学报, 2005, 28(1): 119–123.

- [5] Buzzini AP, Sakamoto IK, Varesche MB, *et al.* Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 168–176.
- [6] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, *et al.* Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(9): 2717–2722.
- [7] Stach J, Bathe S, Clapp JP, *et al.* PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36(23): 139–151.
- [8] 郑雪松, 李道棠, 杨 虹. 不同破壁方法对活性污泥总 DNA 提取效果的影响. 上海交通大学学报, 2004, 5: 815–818.
- [9] 苏俊峰, 马 放, 侯 宁, 等. 活性污泥总 DNA 不同提取方法的比较. 生态环境, 2007, 16(1): 47–49.
- [10] 魏志琴, 曾秀敏, 宋培勇. 土壤微生物 DNA 提取方法研究进展. 遵义师范学院学报, 2006, 8(4): 53–57.
- [11] 姜淑梅, 张 龙, 戴世鲲, 等. 一种简单有效的用于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. 生物技术, 2007, 18(1): 40–43.
- [12] 陈 岭, 明镇寰. 消化池中氨氧化细菌 amoA 基因的检测及其多样性研究. 浙江大学学报, 2004, 31(5): 555–560.
- [13] 向少能, 陈 琳, 何晓丽, 等. 水体微生物多样性 PCR-DGGE 分析方法的比较. 重庆工学院学报, 2007, 21(7): 74–77.
- [14] 邢德峰, 任南琪, 宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性. 环境科学, 2005, 26(2): 172–177.
- [15] 饶志明, 赵有玺, 李 辉, 等. 太湖流域土壤微生物基因组 DNA 分离纯化及其质粒文库的初步构建. 应用与环境生物学报, 2004, 10(6): 774–777.
- [16] 王 峰, 傅以钢, 夏四清. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点. 环境科学, 2004, 25(6): 74–79.
- [17] 熊开容, 张智明, 张 敏. 活性污泥总 DNA 提取方法的研究. 生物技术, 2005, 15(4): 43–45.
- [18] Guthrie JN, Moriarty DJW, Blackall LL. DNA extraction from coral reef sediment bacteria for the polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 43: 1–7.
- [19] Julla RL, Chrtstlane E, Kara J, *et al.* Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(10): 1607–1614.