

# 土壤微生物 PCR 及分子杂交检测\*

丁志勇 许崇任\*\*

(北京大学生命科学学院环境生物学及生态学系 北京 100871)

**关键词** PCR, 分子杂交, 苏云金芽孢杆菌, 检测

**分类号** S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0381-84

PCR 技术在环境微生物的检测方面已得到越来越广泛的应用, Steffan 等<sup>[1]</sup>利用 PCR 技术检测土壤中的转基因细菌, 后来用于检测土壤中不可培养的微生物<sup>[2]</sup>, 跟踪环境中的特定细菌或 DNA<sup>[3]</sup>, 揭示土壤生态系统的基因多样性<sup>[4]</sup>等。

利用 PCR 技术来检测环境中的微生物, 关键的问题是环境样品中 DNA 的抽提和纯化。来自环境的样品含有非常复杂的成分<sup>[5]</sup>, 有些对 PCR 有抑制作用的杂质会一直伴随 DNA 的抽提过程而难以除去, 而且 DNA 还可以被黏土等吸附而降低产量<sup>[5]</sup>。从土壤或沉积物中提取 DNA 的现有方法可以分为两类<sup>[6]</sup>, 一是在土壤中直接裂解微生物体, 再提取 DNA<sup>[7]</sup>。另一类是先将微生物菌体与土壤颗粒分开, 再提取 DNA<sup>[8]</sup>。目前土壤中 DNA 样品的纯化有密度梯度离心法<sup>[1]</sup>、凝胶过滤法<sup>[7]</sup>和琼脂糖凝胶电泳纯化法<sup>[9]</sup>等。

本实验总结国外已有的技术, 选用接种到土壤中的苏云金芽孢杆菌作为检测对象, 以 PCR 扩增其特异的杀虫晶体蛋白基因(简称杀虫基因), 改善并建立起一套方便快捷、灵敏度较高的 PCR 及分子杂交检测方法, 可应用于苏云金芽孢杆菌的环境生态学研究以及转基因微生物的安全性评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和试剂

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)HD-1 来自中国科学院动物研究所, 特异引物来自中国农业科学院生物技术中心, PCR 试剂盒购自华美公司, 光敏生物素标记分子杂交检测试剂盒购自军事医学科学院, 使用的土壤样品取自浙江省嘉兴市稻田中, 该稻田用于试验转基因微生物。

### 1.2 土壤的接种

以无菌操作取 0.5g 土样加入无菌离心管中, HD-1 经活化一次后, 培养至 10h, 以  $10^{-1}$ ~ $10^{-15}$  系列稀释, 使用  $10^{-4}$ ~ $10^{-8}$  稀释度, 分别取 10 $\mu$ L 菌液加入含土壤的离心管中, 将土样于 30 $^{\circ}$ C 温箱中温育 2h, 再进行土壤中总 DNA 的抽提。抽提前用改进的最大可能数法(MPN)计算添加到土壤的细菌数<sup>[10]</sup>。

### 1.3 总 DNA 抽提

纯培养菌体的总 DNA 抽提参考 Ausubel 的方法<sup>[11]</sup>。土壤微生物总 DNA 的抽提方法是对 Tsai 和 Olson 的方法<sup>[7]</sup>做了部分修改, 操作过程如下: 取 0.5g 土样(湿重)加入 1.5mL 离心管, 用 100mmol/L 的磷酸缓冲液(pH8.0)洗 3~4 次, 每管加入 0.4mL 溶菌酶液(150mmol/L NaCl, 100mmol/L EDTA, 溶菌酶 20mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 保温 2h, 每隔 20~30min 摇动一次。保温结束后, 加入 0.4mL 10% 的 SDS 缓冲液

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39470135)

\*\* 通讯作者

收稿日期:1997-10-24, 修回日期:1998-02-11

(100mmol/L NaCl, 500mmol/L Tris-HCl, pH8.0, SDS 10%), 在室温放置 5min, 加入 0.4mL 7.5mol/L 的  $\text{NH}_4\text{Ac}$  至终浓度 2.5mol/L, 充分震荡, 6000g 离心 10min, 取上清液至新管中, 加入两倍体积的 95% 冰乙醇,  $-20^\circ\text{C}$  过夜, 10000g 离心 10min, 用 70% 的乙醇洗, 重悬于  $20\mu\text{L}$  TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-Cl, pH8.0, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 中。

#### 1.4 粗提 DNA 纯化方法

1.4.1 Sephadex G200 和 G150 凝胶过滤: 凝胶过滤纯化参考 Tsai 的方法<sup>[7]</sup>。

1.4.2 低熔点琼脂糖凝胶电泳: 参考 Tiedje 的方法<sup>[9]</sup>。

#### 1.5 PCR 扩增

参考试剂盒说明, 循环条件如下:  $94^\circ\text{C}$  变性 50s,  $46^\circ\text{C}$  退火 60s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 120s, 共进行 35 个循环, 最后一轮延伸延长至 300s。循环结束后, 以 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 结果。

#### 1.6 Southern 杂交

Southern 杂交参考文献[11]。将苏云金芽孢杆菌的杀虫基因片段用光敏生物素标记做探针, 标记方法参考试剂盒说明。

## 2 结果

### 2.1 总 DNA 纯化

使用 Sephadex G200 和 G150 凝胶过滤纯化, 将  $50\mu\text{L}$  粗提土壤 DNA 上样后离心, 第一次能收集到  $40\sim 50\mu\text{L}$  DNA 溶液, 第二次离心后又收集到  $40\sim 50\mu\text{L}$  DNA 溶液, 经电泳检查, 前  $50\mu\text{L}$  离心液的 DNA 浓度是第二次离心液的 10 倍, 但用  $1\mu\text{L}$  作模版, 第一次离心液不能进行 PCR 反应, 第二次离心液能进行 PCR 反应。这个现象说明第一个  $50\mu\text{L}$  离心液虽含有较多的模版 DNA, 但同时含有较多的杂质。第二个  $50\mu\text{L}$  离心液虽含有较少的模版 DNA, 但由于抑制 PCR 反应的主要杂质腐质酸大部分已在第一次离心时除去, 所以 PCR 能够进行。

使用低熔点琼脂糖凝胶纯化时, 在紫外灯下可见暗绿色的杂质迁移速度较快, 与 DNA 分开。当总 DNA 条带迁移到合适位置, 切出尽量小的含 DNA 的胶条。在  $65^\circ\text{C}$  融化后取  $1\mu\text{L}$  直接作模版能够进行 PCR 反应。

### 2.2 PCR 及 Southern 杂交检测

使用一对特异引物扩增 HD-菌株的杀虫基因片段, 大小为 900bp 左右。采用上述低熔点胶纯化方法, 取  $1\mu\text{L}$  纯化 DNA 做模版, 可以从每克添加 220 个菌体的土样中扩增出目的条带 (如图 1), 使用 Southern 杂交证明是特异扩增。另外还有几个条带, 属于土壤中 DNA 的非目的扩增, 它们在 Southern 杂交中没有杂交信号。从不添加 HD-1 菌株的土壤中不能扩出 900bp 的目的条带, 只有一些非目的扩增。上述土样经平板检测, 非目标细菌均在  $10^9$  个/克以上。使用不经纯化的 DNA 样品, 即使每克土样加入  $10^8$  个 HD-1 菌体, PCR 反应也不能进行 (没有显示电泳结果)。

## 3 讨论

土壤微生物 PCR 检测中的关键是检测的灵敏度。在本实验条件下, PCR 检测可以对每克土壤所含的  $2.2 \times 10^2$  个菌体产生反应。

PCR 方法对土壤中的可显微观察、但不可培养的微生物也是一种强有力的检测方法。由于土壤中微生物真正可以培养出来的只有很小一部分 (0.1% ~ 10%)<sup>[12]</sup>, 很多微生物无法用平板来检测<sup>[3]</sup>, 如果使用不需培养过程的 PCR 检测方法, 就更显出其检测优势。PCR 方法还可检测到土壤中裸露的 DNA, 这些 DNA 吸附于土壤颗粒上而免于被降解, 保留着其生物活性<sup>[14]</sup>。土壤微生物 PCR 检测方法的建立和完善对研究环境中的微生物有重要的意义。

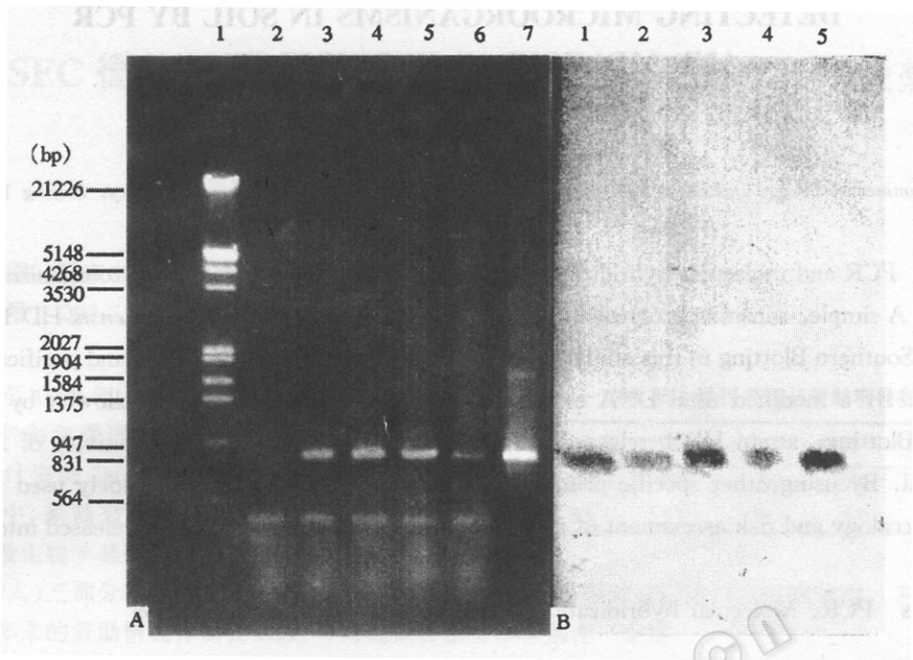


图 1 土壤中苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因的 PCR 扩增及 Southern 杂交图谱

A; PCR 扩增。1.  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*RI; 2. 不添加 HD-1 菌株的土壤; 3. 添加  $2.2 \times 10^2$  菌体/g; 4. 添加  $2.2 \times 10^3$  菌体/g; 5. 添加  $2.2 \times 10^4$  菌体/g; 6. 添加  $2.2 \times 10^5$  菌体/g; 7. HD-1 菌株纯培养。  
B. Southern Blotting。1. 添加  $2.2 \times 10^2$  菌体/g; 2. 添加  $2.2 \times 10^3$  菌体/g; 3. 添加  $2.2 \times 10^4$  菌体/g; 4. 添加  $2.2 \times 10^5$  菌体/g; 5. HD-1 菌株纯培养。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Steffan R J, Atlas R M. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2185~2191.
- [ 2 ] Ward D M, Weller R, Bateson M M. *Nature* (London), 1990, **345**: 63~65.
- [ 3 ] Degrange V, Bardin R. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 2093~2098.
- [ 4 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. *Microbial Rev*, 1995, **59**: 143~169.
- [ 5 ] Orgram A V, Sauler G S, Gustine D *et al.* *Environ Sci Technol*, 1987, **22**: 982~984.
- [ 6 ] Leffl G, Dana J R, McArthur V *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **59**: 1141~1143.
- [ 7 ] Tsai Y L, Olson B H. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 1070~1074.
- [ 8 ] Jacobsen C S, Rasmussen O F. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2458~2462.
- [ 9 ] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316~322.
- [ 10 ] Carvalhal M L C, Oliveira M S, Alterthum F. *J Microbil Meth*, 1991, **14**: 165~170.
- [ 11 ] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. New York: Jonh Wiley and Sons, 1995.
- [ 12 ] Borneman J, Nienhuis J. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1935~1943.
- [ 13 ] Byrd J J, Colwell R R. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **55**: 1301~1304.
- [ 14 ] Lorenz M G, Wackernagel M. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **53**: 2945~2952.

# DETECTING MICROORGANISMS IN SOIL BY PCR AND MOLECULAR HYBRIDIZATION

Ding Zhiyong Xu Chongren

(Environmental Biology and Ecology Department, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** PCR and molecular hybridization provide new methods to detect microorganisms in environment. A simple, sensitive protocol was developed to detect *Bacillus thuringiensis* HD-1 in soil by PCR and Southern Blotting in this study. Methods of extracting DNA from soil and purification were compared. By a modified total DNA extraction from soil and purification, followed by PCR and Southern Blotting, strain HD-1 released into soil can be detected with a sensitivity of  $2.2 \times 10^2$  cells/g soil. By using other specific primers, this detection protocol can be widely used in the research of ecology and risk assessment of genetically engineered microorganisms released into environment.

**Key words** PCR, Molecular hybridization, *Bacillus thuringiensis*, Detection

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39470135)

## 《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

- 顾问 (Advisor) 张树政
- 主编 (Editors-in-Chief) 李季伦
- 副主编 (Associate Editor-in-Chief) 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全
- 编委 (Members of the Board)
  - 王修垣 邓子新 田波 刘志恒 朱庆裴
  - 孙志浩 李焕姿 陈世平 陈永青 杨苏声
  - 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民 钱世钧
  - 诸葛健 徐怀恕 翟中和 谭华荣
- 编辑 (Editor) 戈苏国 刘玉方