

## 垃圾填埋场中厌氧真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增及鉴定

杭晓敏<sup>1\*</sup> 杨虹<sup>1</sup> Whiteby Corne<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(上海交通大学生命科学技术学院,上海 200240)

<sup>2</sup>(英国利物浦大学生物科学学院,Liverpool L69 7ZB)

**摘 要** 采用机械破壁法直接来自 7 个不同地区的垃圾填埋场滤液样本中提取真菌 DNA,应用真菌通用引物 NS1 和 NS8 扩增 18S rDNA(约 1800bp),多聚酶链式反应(PCR)产物的琼脂糖凝胶电泳结果表明所有的样本均得到了扩增;以 PCR 产物作为模板,采用厌氧真菌 *Chytridiomycetes* 科的专用引物 Chyt-719 和 Chyt-1553 进行二次 PCR 扩增(约 857bp),该阳性扩增产物克隆和测序结果首次表明在食草动物瘤胃中存在的厌氧真菌 *Chytridiomycetes* 也存在于垃圾填埋场中,且为 *Neocallimastix* 属。

**关键词** 垃圾填埋场,厌氧真菌,18S rDNA,PCR

**中图分类号** Q939.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0515-05

近年来,研究认为肠胃厌氧真菌在消化食草动物的饲料中起了重要的作用<sup>[1-4]</sup>,真菌能够独自承担所有植物细胞壁的消化且比细菌降解厚壁组织更有效从而削弱植物结构、降解纤维素和半纤维素。Orpin 等人<sup>[5]</sup>1988 年研究结果表明 *Chytridiomycetes* 科,包括 *Neocallimastix patricianum* 种的厌氧真菌已与厌氧降解纤维素细菌共进化而成为食草动物肠胃中最主要的纤维素酶生产菌。

厌氧降解需要复杂菌群,虽然类似于瘤胃中的厌氧降解纤维素真菌还未在其它厌氧环境如土壤、沉降池、垃圾填埋场等中发现,但是 Maule 等人<sup>[6]</sup>使用厌氧培养方法从垃圾样本中分离得到了两种形态和生理独特的厌氧降解纤维素真菌。很显然,真菌在土壤、沉降池和垃圾填埋场等厌氧生态系统中对于纤维素的厌氧降解同样承担着重要的角色,进一步研究以了解其潜在分布已非常重要。

垃圾填埋场为市政固体废物、部分工业废物、水和废水处理污泥以及废物的处理场所。有资料表明<sup>[7]</sup>填埋场中的主要生物降解物质为纤维素和半纤维素。与其它生态系统一样传统的分离培养技术远远不能检测其中的新型微生物。近来,研究人员已开始应用以核苷酸为基础的分子生物学方法研究环境微生物<sup>[6,8,9]</sup>,但绝大部分工作均集中于环境中细菌菌群的研究,鲜见于有关环境中厌氧真菌的报

道。

DNA 的测序以及数据库(RDP、GenBank)的建立为微生物学家研究环境生物多样性以及系统发育史提供了基础,而 18S rRNA 基因的研究和分析使真核生物之间的进化关系和特定环境下微生物种群的鉴定成为可能。18S rDNA 内含有可变区间,可用于研究和跟踪特定有机体和有机种群,18S rDNA 的分析可用来解决真菌的分类和进化问题。

本研究旨在利用垃圾填埋场滤液样本中的 18S rDNA 的 PCR 扩增、克隆和测序以测定垃圾填埋场中的厌氧真菌。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 参考菌株及样本采集

厌氧真菌 *Neocallimastix spp.* 为英国利物浦大学生物科学学院分子微生物组保藏菌株,实验用作 PCR 扩增反应阳性对照。

填埋场滤液样本取自英格兰西北地区 7 个传统市政垃圾填埋场,且每一取样点提供一个样本,编号为 A、B、C、D、E、F、G,由于样本采自填埋场滤液排放口,因此可代表每一填埋场的整体状态。样本一旦采集,立即进行处理。将 1L 样本于 27000r/min 下离心 40min,沉淀溶于 20mL 0.1mol/L  $K_2HPO_4$  中,此浓缩样本分装于 1.5 mL Eppendorf 管于 13000 r/min 下

收稿日期:2001-01-15,修回日期:2001-05-28。

\* 通讯作者。Tel:86-21-54743351;Fax:86-21-54743348;E-mail:xmhang@mail.sjtu.edu.cn

离心 5min, 沉淀于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保藏备用。

## 1.2 DNA 的提取与纯化

采用机械破壁法直接从垃圾填埋场样本中提取真菌 DNA, 具体操作步骤如下:

$-80^{\circ}\text{C}$  下保藏的浓缩样本解冻后加入  $200\mu\text{L}$  无菌超纯水。取适量样品液加入  $1.5\text{mL}$  Eppendorf 管中于  $13000\text{r}/\text{min}$  下离心 5min, 弃去上清液, 加入  $0.6\text{mL}$  的  $0.12\text{mol}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4/1\%$  SDS (pH8.0) 溶液和  $0.5\text{mL}$  的 phenol/chloroform/isoamyl (25:24:1 V/V/V, Sigma), 混匀, 将其转入  $2\text{mL}$  含  $0.5\text{g}$  陶瓷珠的 Hybaid™ 红色盖管中, 置于 Hybaid™ 破壁仪以  $6\text{m}/\text{s}$  破壁细胞 45s, 再于  $13000\text{r}/\text{min}$  下离心 5min, 将上清液转至另一洁净的 Eppendorf 管, 于其中加入 0.1 倍体积的  $5\text{mol}/\text{L}$  NaCl 和等体积的 30% PEG, 室温下放置过夜以沉淀 DNA, 于  $13000\text{r}/\text{min}$  下离心 5min, 弃上清液, 得到的沉淀 DNA 加入 70% 乙醇混匀, 于  $13000\text{r}/\text{min}$  下离心 5min, 弃上清液, 重复加入 70% 乙醇离心洗涤 2 次, 于  $37^{\circ}\text{C}$  下干燥 5min 以去除残留乙醇, 最后于其中加入无菌超纯水  $30\mu\text{L}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待用。

采用 Boehringer Mannheim 公司提供的试剂盒纯化提取的 DNA 样品, 于提取的 DNA 样品中加入 RNA 酶 (终浓度为  $5\mu\text{L}/\text{mL}$ ),  $37^{\circ}\text{C}$  下放置 30min, 再加入等量的 phenol/chloroform/isoamyl (24:10:1, V/V/V, Sigma) 纯化 DNA, 使其适于随后的 PCR 扩增。DNA 的提取及纯化均采用以下介绍的琼脂糖凝胶电泳法进行测定。

## 1.3 PCR 扩增

采用 GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 分析软件包中的 PILEUP 程序比较 GenBank 数据库中属于 *Chytridiomycetes* 科已知厌氧真菌的 18S rDNA 顺序, 由 PRETTY 程序 (GCG) 确定该真菌科 18S rDNA 的保守区间, 由此设计此类厌氧真菌科的专用引物对 Chyt-719 (GCACTTCATTGTGTGTACTG) 和 Chyt-1553 (GGATGAAACTCGTTGACTTC) 用于扩增样本中的厌氧真菌。

NS1 (GTACTCATATGCTTGCTCTC) 和 NS8 (TCCG-CAGGTTACCTACGGA) 为真菌 18S rDNA 的通用引物<sup>[10]</sup>, 实验以纯化的 DNA 样品经适度稀释后为模板, NS1 和 NS8 为引物进行 18S rDNA 的扩增。以 1 次 PCR 扩增产物经适度稀释后为模板, 以设计引物对 Chyt-719/Chyt-1553 进行 2 次 PCR 扩增。以上 2 次 PCR 均以  $50\mu\text{L}$  为标准反应进行, 其中含有:  $1.0\text{U}$  SuperTaq 酶 (HT Biotechnology, Cambridge, UK);  $5\mu\text{L}$ ,

$10\times$  buffer ( $100\text{mmol}/\text{L}$  Tris/HCl, pH8.8;  $15\text{mmol}/\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $500\text{mmol}/\text{L}$  KCl; 1% Triton X-100),  $100\mu\text{mol}/\text{L}$  dNTPs, 引物 1 和引物 2 各为  $0.2\mu\text{mol}/\text{L}$ , 最后于其中加入 2 滴矿物油 (Sigma)。将配好的 PCR 反应混合物置于 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480 PCR 系统中进行基因 PCR 扩增, 其扩增参数为:  $94^{\circ}\text{C}$ , 5min, 循环 1 次;  $94^{\circ}\text{C}$ , 1min;  $60^{\circ}\text{C}$ , 1min;  $72^{\circ}\text{C}$ , 1min 15s; 以上参数循环 35 次; 最后以  $72^{\circ}\text{C}$ , 10min 循环 1 次结束。

PCR 产物采用含  $0.3\mu\text{g}/\text{mL}$  溴乙锭的 0.8% (W/V) 琼脂糖凝胶在  $1\times$  TAE 缓冲液中进行电泳测定。紫外灯下观察 DNA 谱带, pBR322 DNA/Alw44I/MvaI (MBI Fermentas) 用作 DNA 分子量标准。

## 1.4 克隆和测序

采用 PROMEGA-QIAquick PCR 试剂盒纯化 2 次 PCR 产物, 以去除反应物中的聚合酶、核苷酸、引物和盐类。根据操作说明将纯化后的适量 DNA 片段连接至 pGEM-T (Promega) 载体上, 重组质粒转化至 JM109 宿主细胞中, 使用选择性 LB 琼脂 (LabM, Amersham, England) 平板筛选含重组质粒的白色克隆,  $1\text{L}$  LB 琼脂 (pH7.5) 配方为:  $10\text{g}$  bacto tryptone,  $5\text{g}$  bacto yeast extract,  $10\text{g}$  NaCl,  $15\text{g}$  琼脂, 另加入 X-Gal ( $50\text{mg}/\text{mL}$ ) 和 ampicillin ( $50\mu\text{g}/\text{mL}$ )。将筛选获得的含重组质粒的克隆接种于  $10\text{mL}$  LB 母液 (含  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin) 中, 应用 Qiagen 质粒制备试剂盒提取质粒, ABI 373A 自动 DNA 测序仪测序, 其顺序的相似性可在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库中使用 BLAST 工具进行比较。

## 2 实验结果

### 2.1 样本中 DNA 的提取

采用机械破壁法可直接由样本中提取 DNA, 见图 1。由图 1 可知, 在提取 DNA 的同时也得到了大量的 RNA, 且 RNA 量比 DNA 多, 为有助于随后的 PCR 扩增, 本实验采用 Boehringer Mannheim 公司提供的试剂盒提纯提取的 DNA 样品 (结果未显示), 经适度稀释后足以进行随后的 PCR 扩增反应。

### 2.2 PCR 扩增

以纯化的样本 DNA 为模板直接应用厌氧真菌特异引物很难实施一步 PCR 扩增, 这主要因为样本中所要测定的特定厌氧真菌含量很少所致, 由此对于所有的样本均采用二次 PCR 技术以测定样本中的特定真菌。由图 2 知以 NS1 和 NS8 为引物对于所有的 7 个样本均得到了扩增, 其扩增片段约为  $1800\text{bp}$ 。

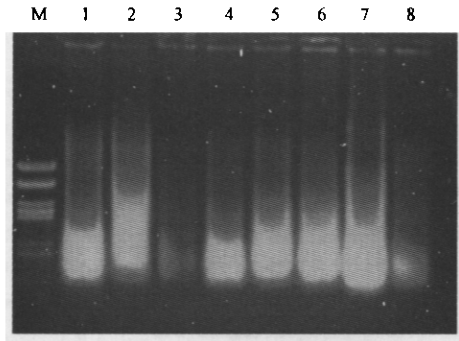


图1 机械破壁法提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig.1 Gel electrophoresis of DNA extraction from landfill leachate samples by using bead beating method  
M. Marker, pBR 322; 1. *Neocallimastix* spp.; 2~8. Landfill leachate samples A~G, respectively

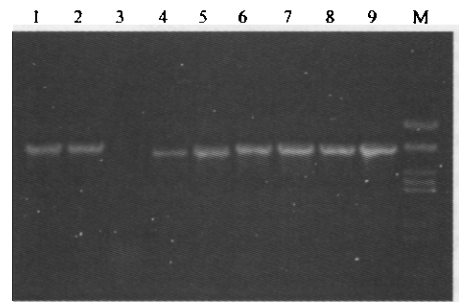


图2 一次 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig.2 PCR amplification of template DNA from landfill leachate samples with NS1/NS8.

M. Marker, pBR 322; 1. *Neocallimastix* spp. as positive; 2. Sample A; 3. superpure water as negative; 4~9. Sample B~G, respectively

二次 PCR 扩增结果(图 3)表明,阳性对照厌氧真菌 *Neocallimastix* spp. 获得了 2 次 PCR 扩增,表明引物对 Chy-719 和 Chy-1553 适于厌氧真菌 PCR 的扩增,且所有的样本也得到了扩增(约 875bp)。

### 2.3 克隆和测序

选一代表性的二次 PCR 阳性扩增产物克隆、测

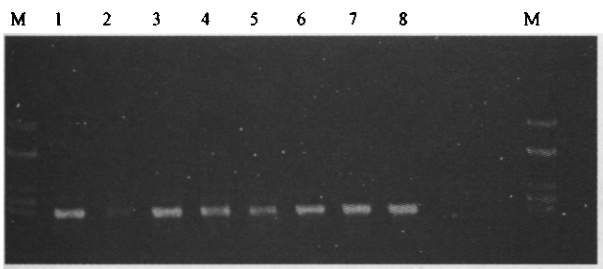


图3 二次 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig.3 "Nested" PCR amplified result with primers Chyt-719/Chyt-1553

M. Marker, pBR 322; 1. *Neocallimastix* spp. as positive; 2~8. Sample A~G, respectively

序,其顺序结果与 GenBank 数据库比较结果表明,该 18S rDNA 片段顺序与数据库中的厌氧真菌 *Neocallimastix* spp. (accession No. M59761) 具有 99% 的相似性(见图 4),与 *Neocallimastix frontalis* (accession No. X80341) 也具有 99% 的相似性,该结果首次表明在食草动物瘤胃中存在的厌氧真菌同样存在于垃圾填埋场滤液中,且为 *Neocallimastix* 属。

### 3 讨论

18S rDNA 的分析为研究和鉴定特定环境样本中的微生物种群及多样性提供了可能,从环境样本中获得的特定的 18S rDNA 的测序对微生物生态和微生物种群的研究提供了便利。另外随着数据库(RDP、GenBank)的建立和发展,也促进了以 DNA 为基础的分子生物学方法用于研究环境样本中微生物种群的多样性和特异性,以及环境与种群进化的关系。

本研究采用真菌 18S rDNA 的通用引物 NS1 和 NS8<sup>[10]</sup> 进行垃圾填埋场滤液样本中真菌 18S rRNA 基因的扩增(约 1800bp,见图 2),因为该基因中含有足够的碱基顺序信息可用来进行遗传信息分析,但是该基因区也为样本中所有真核生物包括植物的基因区,为避免该基因区扩增引来的误差,实验采用了二次 PCR 技术,即采用由通用引物(NS1 和 NS8)产生的 PCR 产物作为模板,由厌氧真菌专用引物对 Chyt-719 和 Chyt-1553 进行二次 PCR 扩增,由以上结果可知,二次 PCR 得到了满意的结果。因此本研究采用的分子生物学方法测定环境样本中的厌氧真菌是快捷和有效的。

本研究的目的是测定垃圾填埋场中是否存在厌氧真菌 *Chytridiomycetes*,结果表明垃圾填埋场中确实存在此类真菌,但一些实验的失败,特别是沉降池样本中未能得到同样的二次 PCR 扩增、以及直接从瘤胃 DNA 样本中获得以厌氧真菌专用引物对 Chyt-719 和 Chyt-1553 得到的一次 PCR 扩增却未能在垃圾填埋场滤液 DNA 样本中实现,且多次实验均致失败(结果未显示)。这表明垃圾填埋场中的厌氧真菌少于食草动物瘤胃中的厌氧真菌,因此将来不仅要测定垃圾填埋场中的厌氧真菌,还要测定其含量以了解其在填埋场中的降解纤维素的作用,进一步的实验可研究填埋场中的厌氧真菌 *Chytridiomycetes* 与食草动物瘤胃中的厌氧真菌的相似性及异同点,如果其与瘤胃中的厌氧真菌不同,则主要由于填埋场中的特定环境导致了特定的进化种群。

```

Query: 1   gcacttcattgtgtactgggatctaggacttttactttgaaaaaattagagtgtta 60
          |||
Sbjct: 676 gcacttcattgtgtactgggatctaggacttttactttgaaaaaattagagtgtta 735
Query: 61   aagcaggcttatgctgaatacattagcatggaataatagaataggactttggttctatt 120
          |||
Sbjct: 736 aagcaggcttatgctgaatacattagcatggaataatagaataggactttggttctatt 795
Query: 121  ttgttggttcttaggaccaagtaatgattaataggatagttggggcattagatttta 180
          |||
Sbjct: 796 ttgttggttcttaggaccaagtaatgattaataggatagttggggcattagatttta 855
Query: 181  attgtcagaggtaaacctcttagattatgaagactaacctctcgcgaagcattgcca 240
          |||
Sbjct: 856 attgtcagaggtaaacctcttagattatgaagactaacctctcgcgaagcattgcca 915
Query: 241  aggatgttttcattaatcaagaacgaaagttagggatcgaagaacgatcagataccgctg 300
          |||
Sbjct: 916 aggatgttttcattaatcaagaacgaaagttagggatcgaagaacgatcagataccgctg 975
Query: 301  tagtottaaccataaaactatgccgactagggatcggacgacgtttamtattgactcgtt 360
          |||
Sbjct: 976 tagtottaaccataaaactatgccgactagggatcggacgacgtttamtattgactcgtt 1035
Query: 361  cggcaccttatgagaaatcaagtttttgggttcgggggagtatggtcgaaggctga 420
          |||
Sbjct: 1036 cggcaccttatgagaaatcaagtttttgggttcgggggagtatggtcgaaggctga 1095
Query: 421  aacttaaaggaattgacggaagggcaccaccaggagtgagcctgaggcttaattgact 480
          |||
Sbjct: 1096 aacttaaaggaattgacggaagggcaccaccaggagtgagcctgaggcttaattgact 1155
Query: 481  caacacggggaacttaccagatccagacatagtaaggattgacagattgagagctctt 540
          |||
Sbjct: 1156 caacacggggaacttaccagatccagacatagtaaggattgacagattgagagctctt 1215
Query: 541  cttgattotatgggtggtgcatggccgttcttagttggtgagtgatttgtctggtt 600
          |||
Sbjct: 1216 cttgattotatgggtggtgcatggccgttcttagttggtgagtgatttgtctggtt 1275
Query: 601  aattccgataacgaacgagaccttaacctgctaaatagttacggaatattttattcgtg 660
          |||
Sbjct: 1276 aattccgataacgaacgagaccttaacctgctaaatagttacggaatattttattcgtg 1335
Query: 661  gtttaacttcttagaggactatagatttttaotatggaagtttgaggcaataacagg 720
          |||
Sbjct: 1336 gtttaacttcttagaggactatagatttttaotatggaagtttgaggcaataacagg 1395
Query: 721  tctgtgatgccottggatgttctggccgcacgcgctacactgatgaagtaacagagt 780
          |||
Sbjct: 1396 tctgtgatgccotttagatgttctggccgcacgcgctacactgatgaagtaacagagt 1455
Query: 781  ttcattcc 787
          |||
Sbjct: 1456 ttcattcc 1462

```

图 4 18S rDNA 中 787bp 测序片段与 GenBank 数据库比较

Fig.4 The alignment of sequencing result with known sequences in GenBank

```

Alignments
> gi|168743|gb|M59761.1|NEORR18S Neocallimastix sp. LM-2 18S ribosomal RNA gene partial sequence
Length = 1717
Score = 1536 bits (775), Expect = 0.0
Identities = 784/787 (99%)
Strand = Plus/Plus

```

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Bauchop T, Mountfort D O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in the absence and presence of rumen methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981, **42**(6):1103 ~ 1110
- [ 2 ] Windam W R, Akin D E. Rumen fungi and forage fiber degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, **48**:473 ~ 476
- [ 3 ] Mountfor D O. The rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 1987, **46**(4):401 ~ 408
- [ 4 ] Theodorou M K, Gill M, Kingspooner C Beever D E. Enumeration of anaerobic *Chytridiomycetes* as thallus-forming units novel method for quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**:1073 ~ 1078
- [ 5 ] Orpin C G, Joblin K N. The rumen anaerobic fungi. In *The Rumen Microbial Ecosystem*. Edited by P. N. Hobson. Elsevier Applied Science, London. 1988, pp. 129 ~ 150
- [ 6 ] Maule A, Luton P, Sharp R. A microbiological and chemical study of the Brogborough Test Cells. ETSUB/LF/00200/REP. Energy Technology Support Unit, Department of Trade and Industry, Oxfordshire, England. 1994
- [ 7 ] Barlaz M A. Microbial studies of landfills and anaerobic refuse decomposition. In *Manual of Environmental Microbiology*, Edited by C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach and M. V. Walter, Washington DC: American Society for Microbiology. 1997
- [ 8 ] Raskin L, Poulsen L K, Noguera D R, Rittmann B E, Stahl D A. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**:1241 ~ 1248
- [ 9 ] Daly K, Sharp R J, McCarthy A J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology*, 2000, **146**:1693 ~ 1705
- [ 10 ] White T J, Bruns T, Lee S *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In *PCR Protocols*, Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, Academic Press, San Diego, Calif., 1990, pp. 315 ~ 322

## PCR Amplification of Anaerobic Fungal 18S rDNA from Landfill Sites

HANG Xiao-Min<sup>1\*</sup> YANG Hong<sup>1</sup> Whitby Corne<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

<sup>2</sup> (School of Biological Science, The University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK)

**Abstract** Nucleic acid based techniques are widely used to characterize microbial communities in environmental samples. In this study, seven landfill leachates were tested for the presence of 18S rRNA genes from anaerobic fungi from the family *Chytridiomycetes*. A nested Polymerase Chain Reaction (PCR) strategy was employed to amplify the 18S rRNA gene region of *Chytridiomycetous* fungi from landfill sites samples. All of the PCR products from landfill leachates amplified with the first primer pair NS1/NS8 and the second primer pair Chyt-719/Chyt-1553 were subjected to agarose gel electrophoresis to show seven samples containing fungi from the family *Chytridiomycetes*. One of the positive results was then selected for cloning and sequencing of the PCR product to confirm the identity of the amplified DNA. The molecular data presented here reveals for the first time that *Chytridiomycetous* fungi associated with the anaerobic rumen environment are also present in landfill sites.

**Key words** landfill, anaerobic fungi, 18S rDNA, PCR

Received: January 15, 2001

\* Corresponding author. Tel: 86-21-54743351; Fax: 86-21-54743348; E-mail: xhang@mail.sjtu.edu.cn