

污水处理系统中噬菌体的浓缩分离和宏基因组 DNA 的提取

赵红丽^a, 祁诗月^a, 张斐^a, 杨清香^{a,b}

(河南师范大学 a. 生命科学学院; b. 河南省高校资源微生物与功能分子重点实验室, 河南 新乡 453007)

摘要:以城市污水活性污泥为材料,经分级粗滤、超滤、等密度梯度离心等方法获得高纯度噬菌体悬液,常规 SDS 方法提取噬菌体 DNA. 荧光显微镜观察和计数表明浓缩液中噬菌体的纯度和丰度都显著提高;利用透射电镜对浓缩液进行观察,噬菌体的形态呈杆状、线状等多样;基因组提取结果显示,得到的 DNA 样品纯度高,大小介于 20~25 kb 之间,电泳条带清晰,整个泳道没有弥散现象;利用细菌通用引物对提取的噬菌体 DNA 进行 16S rDNA 扩增阴性,说明所得到的噬菌体纯度较高,没有细菌污染. 通过实验获得一种高效快捷的从污水处理系统中纯化浓缩噬菌体并进一步获得噬菌体宏基因组 DNA 的方法,同时为研究环境噬菌体生态分布、多样性组成奠定基础.

关键词:噬菌体;浓缩;宏基因组 DNA;活性污泥

中图分类号:Q939.9

文献标志码:A

噬菌体是一类能够侵染裂解细菌的病毒,分为两类,即裂解性噬菌体和溶源性噬菌体. 噬菌体吸附和注入宿主菌需要靠宿主菌表面专门的受体所介导如碳水化合物,蛋白质等^[1]. Lee 等发现 30~60% 从活性污泥中分离得到的细菌双层平板验证实验获得其噬菌体^[2]. 噬菌体在水环境中的丰度达到 $10^8 - 10^9$ 个·mL⁻¹^[3-4]. 噬菌体已经用于治理由丝状菌引起的发泡问题^[5]. 噬菌体在海洋生态系统中的高丰度表明噬菌体基因的多样性要比宿主菌大的多^[6-8]. 然而在自然环境中,可培养的宿主菌数目不到 1%,所以传统的二元培养的方法遗失大多数噬菌体^[9]. 近年来,高通量技术的发展使得环境中病毒宏基因组的研究成为可能^[10]. 噬菌体宏基因组的研究对于研究噬菌体的多样性具有重要意义^[11-16].

研究噬菌体多样性的第一步是获得高浓度、高纯度并且最好能够覆盖环境中所有噬菌体基因组的 DNA 样品. 传统的二元培养法,虽然很经典^[17-18],但是在提取病毒基因组的过程中往往会污染宿主菌的 DNA,导致提取的噬菌体纯度不高. 本研究利用活性污泥为样品,以活性污泥中宏基因组和环境噬菌体多样性为研究目的所研发的一套高效提取环境噬菌体基因组 DNA 的方法,为研究噬菌体的多样性奠定了坚实的基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 取样

分别从河南省新乡市的小尚庄污水处理厂 AO 和 A2O 工艺的曝气池以及骆驼湾城市污水处理厂 AO 工艺的曝气池中采取多点混合取样法,得到 3 个活性污泥泥水混合物样品,每个样品的体积大约为 20 L,分别命名为 PAOX, PAAO, PAOL.

收稿日期:2016-01-22;修回日期:2016-05-22.

基金项目:国家自然科学基金(NSFC 21477035);河南省杰出创新人才基金资助(144200510007).

第 1 作者简介:赵红丽(1990-),女,河南鹤壁人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为环境微生物,E-mail:oceanbingo@163.com.

通信作者:杨清香(1966-),女,河南洛阳人,河南师范大学教授,博士,E-mail:yangqx66@163.com

1.1.2 试剂配置

SM液(/L): NaCl 5.8 g, MgSO₄·7H₂O 2 g, 1 mol/L Tris-Cl(PH7.5) 50 mL; 2%(m/v)明胶溶液 5 mL; 透析液: 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-Cl(PH 8.0), 10 mmol/L MgCl₂. 所有试剂均在 1×10⁵ Pa 条件下灭菌 30 min.

1.2 方法

1.2.1 分级过滤和超滤浓缩

泥水混合物样品经磁力搅拌器搅拌打散 30 min 后, 逐步经 5 μm, 1 μm, 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤膜对污泥样品粗过滤, 粗过滤的污泥用 1×PBS 缓冲液洗脱三次, 将此滤液与初次滤液混合. 滤液经装有 100 kDa 超滤膜包(Millipore, 美国)的超滤装置(Millipore, 美国)浓缩富集, 20 L 污水样品超滤浓缩至终体积为 200 mL, 共浓缩 100 倍.

1.2.2 PEG8000(聚乙二醇)沉淀和氯化铯等密度梯度离心^[19]

在超滤浓缩液中加入 DNase I 和 RNase(Sigma, 美国)至其终浓度均为 1 μg/mL, 37 °C 水浴 30 min. 加入固体氯化钠至终浓度为 1 mol/L, 冰浴 1 h. 4 °C 11 000 g 离心 10 min, 测定上清总体积. 加入固体 PEG8000(Amersco, 美国)至终浓度为 10%, 混匀, 冰浴 1 h. 再次于 4 °C, 11 000 g 离心 10 min, 弃上清, 在噬菌体沉淀中加入适量 SM 液, 室温静置 1 h. 等体积氯仿抽提, 震荡混匀, 4 °C, 3000 g 离心 15 min, 取上清于干净的 1.5 mL 离心管中.

各氯化铯分级梯度(制备见表 1)与噬菌体悬浮液的体积比为 1:2. 使用超速离心机(Beckman, 美国), 转子型号为 SW28, 4 °C 87 000 g 离心 2 h. 离心后, 在离心管中出现蓝色条带的位置即为噬菌体悬液所处的位置. 吸出蓝色条带^[17]转移至已煮过的的半透膜中, 磁力搅拌器上透析. 透析后, 将噬菌体悬浮液转移至无菌的 1.5 mL 离心管中.

表 1 溶于 SM(10 mL)的 CsCl 分级梯度的制备

密度 $\rho/(g \cdot mL^{-1})$	CsCl/g	SM 液/mL	折射率/ η
1.45	6.00	8.50	1.3768
1.50	6.70	8.20	1.3815
1.70	9.50	7.50	1.3990

1.2.3 噬菌体基因组 DNA 的提取 蛋白酶 K 和 SDS(十二烷基磺酸钠)法提取噬菌体基因组 DNA^[19]

按照常规提取方法, 在透析过的噬菌体样品中加入 0.5 mol/L EDTA(PH 8.0)使其终浓度至 20 mmol/L. 加入蛋白酶 K(Merck, 德国)至其终浓度为 50 μg/mL, 加 SDS 至其质量分数为 0.5%, 缓慢上下翻转混匀. 将消化混合物 56 °C 孵育 1 h, 冷却至室温. 用等体积平衡酚氯仿抽提, 3000 g 离心 15 min, 吸取上清转移至另一干净的离心管中, 重复抽提 3 次. 在抽提物中加入预冷的 2 倍体积的无水乙醇, -20 °C 冰浴 2 h, 沉淀基因组 DNA. 12 000 g 离心 10 min, 去上清, 回收 DNA 沉淀. 用适量 TE(pH 7.6)溶解 DNA 沉淀, 4 °C 冰箱保存.

使用超微量分光光度计检测基因组 DNA 纯度, 利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对噬菌体基因组 DNA 进行细菌 16S rDNA 扩增, 检测提取的噬菌体基因组中是否污染细菌基因组 DNA 等, 并以此鉴定提取的噬菌体 DNA 纯度. 在电压 90 V, 90 min 条件下分别对基因组和扩增产物 DNA 进行 0.7% 和 1% 琼脂糖凝胶电泳并于凝胶成像系统中检测电泳结果.

1.2.4 荧光显微镜计数

打散后的污泥样品, 0.45 μm 滤膜过滤, 稀释 104 倍. 取 7.2 mL 稀释污水, 加入 0.8 mL 的 Sybr Gold 染液(InvitrogenTM, 美国), 避光染色 10 min, 过滤至灭菌的 0.02 μm 无机滤膜(Whatman, 美国)上. 滤膜置于载玻片上荧光显微镜下(Olympus, Bx63, 日本)观察染色结果. 超滤浓缩后的样品进行相同荧光染色操作, 制片, 100 倍油镜染色观察.

1.2.5 透射电子显微镜观察

吸取透析过的噬菌体悬液 25 μL 滴于铜载网上, 将其放于室温静置 3~4 min, 用巴式吸管将铜载网上

的残留液体吸干后,用双蒸水清洗.用醋酸双氧铀对其染色 3~4 min 后,用吸管吸干残留在铜载网上的染色液,静置 20 min.加速电压 80 kv,利用透射电子显微镜(JEM-1400,日本)观察噬菌体形态.

2 结果

2.1 噬菌体的浓缩分离

对分级过滤和超滤浓缩后的污水浓缩液进行 Sybr Gold 染色,荧光显微镜下观察,以 PAOX 污水样品为例,结果如图 1 所示.图中针尖状的亮点即为噬菌体颗粒.超滤浓缩后的污水样品中噬菌体纯度高,密度高,且几乎不含杂质.如表 2 所示,在 0.23 mm^2 的视野面积下进行噬菌体丰度计数,污水浓缩液中噬菌体丰度达到 10^{10} 个/mL,是浓缩前的 70~80 倍.

污水样品名称	分级粗滤之后	超滤浓缩之后
PAOX	0.28	20.16
PAOL	0.32	23.04
PAAO	0.30	23.40

2.2 污水样品中噬菌体的电镜观察

利用透射电镜分别观察浓缩后以及氯化铯等密度梯度离心之后的污水样品中噬菌体的形态,以 PAOX 污水样品为例,结果见图 2,污水样品中存在着大小不同,形态不一的噬菌体.大部分噬菌体的形态呈现头尾型,即有头部和尾部两部分组成,不同噬菌体头部直径和尾部长短不同.



图1 荧光显微镜下超滤浓缩后的PAOX污泥样品噬菌体样品计数观察(Sybr Gold染色, $\times 1000$)

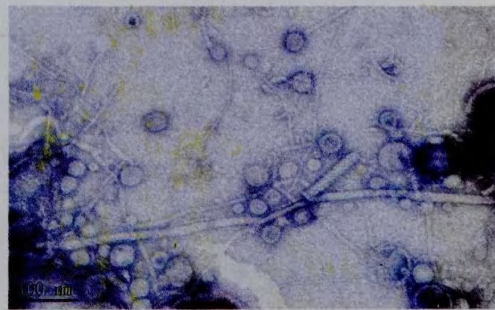


图2 透射电镜下浓缩后的PAOX污水样品中的噬菌体形态

2.3 污水样品中噬菌体的纯化

对浓缩后的污水样品进行氯化铯等密度梯度离心 2 h,结果见图 3,离心管在白光照射下,在 $\rho=1.45$ 与 $\rho=1.50$ 分级梯度的交界位置上可见一清晰的蓝色条带,该蓝色条带即为噬菌体悬液所处的位置,用吸管轻轻吸出该条带即为纯的噬菌体样品.

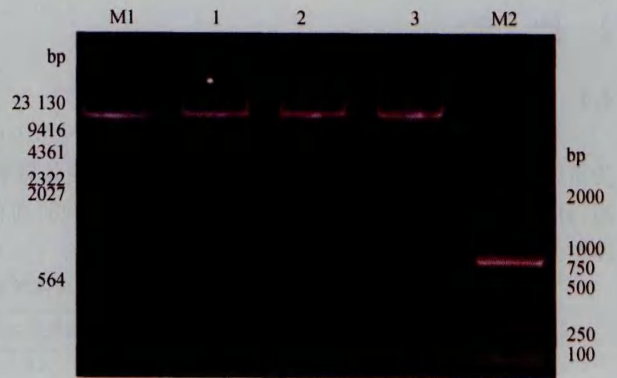
2.4 噬菌体基因组 DNA 的提取

常规 SDS 法提取噬菌体基因组,所得到的 DNA 样品通过超微量分光光度计检测纯度,结果见表 3.由表 3 可知, A_{260}/A_{280} 基本上都在 1.8~2.0 之间,表明纯度较高.3 个污水样品 PAOX, PAOL, PAAO 分别得到总量为 8.25, 4.01, 5.44 μg 的基因组 DNA. 琼脂糖凝胶电泳检测结果,见图 4.如图 4 所示,泳道 1, 2, 3 分别为 PAOX, PAOL, PAAO 3 个污水样品,3 个污水样品噬菌体基因组大小接近,介于 24~30 kb 之间,与文献中报道的大部分病毒的基因组 DNA 大小介于 30~60 kb 之间相一致^[20],条带单一,明亮,无拖尾弥散现象,说明 DNA 无降解且没有宿主菌污染.细菌通用引物 16S rDNA 基因扩增噬菌体基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳结果显示无条带出现,即 PCR 阴性,表明提取的噬菌体不包含细菌 DNA,纯度较高,可以用于噬菌体宏基因组测序分析.



交界位置 $\rho=1.50$ 与 $\rho=1.45$ 处所显示形成的的噬菌体蓝色条带.

图3 噬菌体样品在氯化铯等密度梯度离心中的分级



1为PAOX污水样品; 2为PAOL污水样品; 3为PAAO污水样品.

图4 所提取的噬菌体DNA样品在琼脂糖凝胶电泳中的检测结果

将此噬菌体 DNA 样品送往华大基因科技有限公司(武汉)进行宏基因组测序,结果显示污水样品中噬菌体丰度最高的是短尾噬菌体科,其次是长尾噬菌体科和肌尾噬菌体科.

表3 所提取的噬菌体宏基因组 DNA 样品在超微量分光光度计中检测结果

污水样品名称	A260/A280	DNA 浓度/(ng · ul ⁻¹)	体积/ μ L	DNA 总量/ μ g
PAOX	1.72	133	62	8.25
PAOL	1.85	43.6	92	4.01
PAAO	1.87	52.8	103	5.44

3 讨论

噬菌体只有衣壳和核酸组成,没有完整的细胞结构,因此其结构简单,分子微小,故可以采用过滤的方法对噬菌体进行纯化.分级粗滤可以依据微生物分子大小的不同,逐步去除污水处理系统中噬菌体以外的杂质.

单位体积污水中噬菌体丰度较低,不足以使噬菌体被 PEG8000 沉淀,文献中大多采用离心的方法浓缩污水样品中的病毒,直接对病毒的基因组 DNA 进行提取^[21-22],很少采用分级过滤和超滤浓缩的方法,且所提取的样品中病毒基因组 DNA 得率较低.由图 1,表 2 可知,分级过滤可以逐步去除不同分子大小的杂质,避免了滤膜堵塞而导致噬菌体丰度降低等问题的出现.超滤浓缩可以使单位体积污水样品中噬菌体丰度提高 70~80 倍,使得 PEG8000 沉淀噬菌体效果显著,为后续噬菌体基因组 DNA 的成功提取奠定基础.本实验采用了文献中已证实洗脱效果较好的 1×PBS 缓冲液对污水中的活性污泥进行洗脱三次的办法^[23],以最大限度富集污水样品中噬菌体.氯化铯等密度梯度离心依据密度差异,将噬菌体与细胞碎片和细菌分离开,从而获得纯度更高的噬菌体悬液.对于提取纯株噬菌体基因组或者其他更高要求的噬菌体基因组,可以考虑对噬菌体悬液进行二次超滤,并将超速离心时间延长至 24 h,以去除噬菌体悬液中裸露的 DNA 或 RNA.此外,值得注意的是氯化铯等密度梯度离心步骤获得的噬菌体悬液仍具有生物学活性可以将其用于其他实验如透射电镜观察噬菌体形态,双层平板培养法分离筛选有活性的噬菌体等.高纯度的噬菌体基因组样品的获得,充分验证了分级粗滤和氯化铯等密度梯度离心的方法去除细菌等其他杂质的高效性;同时高质量噬菌体基因组 DNA 的获得表明超滤浓缩效果显著.

采用传统的 0.02 μ m 滤膜过滤的方法滤膜不仅容易堵塞,而且一旦堵塞噬菌体通过滤膜孔径受阻,降低噬菌体的丰度.有些分子直径较小的噬菌体可以直接穿过 0.02 μ m 滤膜,不能得到有效的富集.同时 0.02 μ m 滤膜过滤的方法只适用于小体积污水样品中噬菌体的收集及噬菌体的形态观察,因此具有一定的局限性.分级粗滤可以依据微生物分子量大小的不同梯度进行杂质的去除,降低滤膜堵塞使噬菌体通过受阻

的概率. 浓缩过程大大减小原污水样品的体积, 因此适用于对大规模污水样品中的噬菌体进行浓缩和分离. 浓缩过程采用的是 100 kDa 分子量的滤膜, 其滤膜对应孔径远远小于 $0.02 \mu\text{m}$ 因此分子直径较小的噬菌体能够得到进一步的富集, 所以能够保留更多的噬菌体, 提高富集噬菌体的多样性.

分级离心的方法, 可以实现在较低的离心速度时去除污水中的细菌等杂质, 较高的离心速度时富集沉淀噬菌体的过程. 但是该方法对于大规模污水样品中噬菌体的浓缩存在工作量大的局限性, 本实验方法不仅采用浓缩步骤提高噬菌体丰度, 而且氯化铯等密度梯度离心步骤可以将噬菌体颗粒与污水样品中裸露的噬菌体 DNA 和 RNA 分离开, 进一步提高噬菌体的丰度和纯度.

通过分级粗滤、超滤浓缩、氯化铯等密度梯度离心等方法获得的高纯度噬菌体悬液, 可以用于电镜观察噬菌体形态以及对噬菌体进行分离培养等. 该方法的建立为噬菌体基因组的提取以及宏基因组研究奠定基础, 同时使噬菌体其他方面的研究成为可能. 送往华大基因科技有限公司(武汉)的宏基因组结果显示, 污水样品中病毒大部分都是噬菌体, 在科水平上, 噬菌体的种类主要是短尾噬菌体科, 长尾噬菌体科和肌尾噬菌体科.

参考文献

- [1] Marks T, Sharp R. Bacteriophages and biotechnology: a review[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2000, 75: 6-17.
- [2] Lee S H, Onuki M, Satoh H, et al. Isolation, characterization of bacteriophages specific to *Microlunatus phosphovorus* and their application for rapid host detection[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42: 259-264.
- [3] Weinbauer M G. Ecology of prokaryotic viruses[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28: 127-181.
- [4] Otawa K, Lee S H, Yamazoe A, et al. Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes [J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53: 143-152.
- [5] Rohwer F. Global phage diversity[J]. *Cell*, 2003, 113(2): 141.
- [6] Mei Liu, Jason J Gill, Ry Young, et al. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13754-13767.
- [7] Jiang S, Fu W, Chu W, et al. The vertical distribution and diversity of marine bacteriophage at a station off Southern, California[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 45: 399-410.
- [8] Rohwer F, Edward s R. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage[J]. *Bacteriol*, 2002, 184: 4529-4535.
- [9] Aziz R K, Dwivedi B, Akhter S, et al. Multidimensional metrics for estimating phage abundance, distribution, gene density, and sequence coverage in metagenomes[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 381-394.
- [10] Alhamlan F S, Ederer M M, Brown C J, et al. Metagenomics-based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92: 183-188.
- [11] Larissa C P, Erin J C, Stephen J, et al. Census of the Viral Metagenome within an Activated Sludge Microbial Assemblage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2673-2677.
- [12] Bibby K, Viau E, Peccia J. Viral metagenome analysis to guide human pathogen monitoring in environmental samples[J]. *Applied Microbiology*, 2011, 52: 386-392.
- [13] Williamson S J, Rusch D B, Yooseph S, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples[J]. *PLS ONE*, 2008, 3(1): e1456.
- [14] Kristensen D M, Mushegian A R, Dolja V V, et al. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics[J]. *Trends Microbiology*, 2010, 18: 11-19.
- [15] Mokili J L, Rohwer F, Dutilh B E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery[J]. *Current Opinion in Virology*, 2012, 2: 63-77.
- [16] Welkin H P, Charles A B, Daniel A R, et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity[J]. *ELife*, 2015, 4: e06416.
- [17] Tiong G A w, Adina H, Joan B R. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 210: 15-21.
- [18] Alhamlan F S, Ederer M M, Brown C J, et al. Metagenomics-based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92: 183-188.
- [19] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[K]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [20] Jiang S, Steward G, Jellison R, et al. Abundance, Distribution, and Diversity of Viruses in Alkaline, Hypersaline Mono Lake, California[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 47: 9-17.
- [21] Hamza I A, Jurzik L, Uberla K, et al. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples[J]. *Int J Hyg*

Environ Health,2011,214:424-436.

[22] Leland D S, Ginocchio C C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology[J]. Clin Microbiol Rev,2007,20:49-78.

[23] Wu Qinglong, Liu Wen-Tso. Determination of virus abundance, diversity and distribution in a municipal wastewater treatment plant[J]. Water Research,2009,43:1101-1109.

Concentration Separation and Metagenomic DNA Extraction of Bacteriophages from a Sewage Treatment System

ZHAO Hongli^a, QI Shiyue^a, ZHANG Fei^a, YANG Qingxiang^{a,b}

(a. College of Life Sciences; b. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In this study, activated sludge from a municipal sewage treatment system were collected and used as samples. Bacteriophages suspension with high purity were obtained after a series of filters and elution, concentration, cesium chloride gradient centrifugation and dialysis, etc. Genomic DNA was extracted by using a Proteinase K and SDS method. Observation results under a fluorescence microscope indicated that the purity and abundance of phage suspensions were significantly increased after concentration. The purified bacteriophages were very diverse under a transmission electron microscopy including morphologies of rod, filiform, etc. The obtained bacteriophages genomic DNA each had a high purity that only one clear band was present on the electrophoresis gel with a size of 20–25 kb without any dispersion. The negative PCR detection results by using 16S rDNA universal primers confirmed that the obtained bacteriophages genomic DNA had no contamination by bacterial DNA. A quick and effective method is developed for separating and concentrating bacteriophages, purifying metagenomic bacteriophages DNA from activated sludge from a municipal wastewater treatment system by experiment. The obtained bacteriophage samples can be further used for bacteriophage isolation, observation and cultivation. The obtained bacteriophage genomic DNA samples can be used for metagenomic analysis and bacteriophage composition and their ecological distribution study.

Keywords: bacteriophages; concentration; metagenomic DNA; activated sludge