

利用 qPCR 定量检测水体中猪源拟杆菌 特异性生物标记的研究

王显贵, 郭萍*, 田云龙, 朱昌雄, 张丽

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘要:以猪排泄物构建的污染水体为研究对象,通过寄主特异性引物识别水体中猪源拟杆菌 16S rRNA 基因的特异性基因标记(又称为特异性生物标记),并根据特异性生物标记的定量检测,确定粪便拟杆菌的污染量,以明确水体受猪场废水污染的程度。在比较 3 种不同 DNA 提取方法的基础上,选择并改进 CTAB 法,建立了一种适合提取水样中猪排泄物总 DNA 的改良 CTAB 法。3 对不同猪源寄主特异性引物的特异性验证结果表明,引物 3(Bac32F/Bac108R)的特异性好,检出下限在 $4.09\text{E}+02\sim 1.60\text{E}+03$ 拷贝数之间,更适用于水体中猪源拟杆菌属特异性生物标记的检测。不同混合污水中其他寄主来源的拟杆菌对猪源拟杆菌属特异性生物标记无影响,表明该方法可排除其他寄主来源拟杆菌的干扰,具有很好的特异性。

关键词:猪场废水;拟杆菌;特异性生物标记;实时荧光定量 PCR

中图分类号:X703.1 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)11-2302-07 doi:10.11654/jaes.2013.11.028

Quantification of Swine-specific *Bacteroidales* in Water Using qPCR

WANG Xian-gui, GUO Ping*, TIAN Yun-long, ZHU Chang-xiong, ZHANG Li

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: Application of *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers in the assessment of water pollution by swine wastewater was examined with quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR). An improved cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method was established for extracting total DNA from swine wastewater. Primer 3 (Bac32F/Bac108R) showed higher specificity and lower detection limit ($4.09\text{E}+02\sim 1.60\text{E}+03$ copies) than others, and could be used to assess water pollution from swine wastewater.

Keywords: swine wastewater; *Bacteroidales*; biomarker; qPCR

随着养殖业的迅速发展,畜禽养殖污染成为水体面源污染的重要污染源。畜禽粪污中含有大量的肠道微生物,其中包括多种病原微生物,直接威胁到饮用水的质量和安 全,因此对养殖业造成的水体污染进行有效控制和治理显得尤为重要。由于养殖业造成的水体污染多呈面源特征,缺乏对粪污来源的准确掌握和定位,使得目前的治理工作大多停留在见污治污的末端治理阶段,这在一定程度上增加了治污成本^[1]。微生物

溯源技术的出现为准确定位水体粪便污染来源和污染源头管理提供了可能。由于生存环境和饮食结构的不同,各宿主粪便中的指示微生物在基因上存在一定的差异,基于这种差异就可以判断不同污染的来源^[2]。已有研究结果证实不同宿主具有能够在水中被检测到不随时间变化的微生物群体特异性生物标记^[3]。肠道拟杆菌在粪便中数量多、严格厌氧、体外不易繁殖及检测过程不需纯培养,可直接据拟杆菌具有的宿主特异性生物标记设计引物,通过检测水体中拟杆菌生物标记的情况来判断粪便污染来源及污染程度而成为微生物溯源技术中的研究热点^[4-8]。Lamendella 等^[9]比较了拟杆菌属-普雷沃氏菌和产甲烷菌的特异性基因标记,利用不同的特异性引物检测验证不同的粪便

收稿日期:2013-03-28

基金项目:国家水体污染控制和治理科技重大专项湖泊主题巢湖项目(2013ZX0713-006)

作者简介:王显贵(1987—),男,河北玉田人,硕士研究生,主要从事环境微生物溯源方面的研究。E-mail:kdwxg1987@163.com

*通信作者:郭萍 E-mail:pingguo120@hotmail.com

来源,结果发现拟杆菌属-普雷沃氏菌基因标记的特异性、灵敏度更高。实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)以其灵敏性高、准确性好、特异性强、安全快速、能够对反应过程实现动态监测等特点已被国内外应用到环境检测方面^[10]。但目前利用荧光定量 PCR 检测水体寄主特异性拟杆菌生物标记的研究还相对较少。

本研究以畜禽养殖污染的猪场废水为研究对象,在已有文献报道的研究基础上建立一种利用 qPCR 技术,快速定量检测受污染水体中猪源拟杆菌特异性生物标记的方法,为进一步利用 qPCR 技术定量检测环境水体中猪场来源的污染积累研究资料。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:液氮、氯仿/异戊醇(24:1)、乙醇、醋酸钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、异硫氰酸胍、异丙醇,均为国产分析纯,十二烷基磺酸钠(ICN,USA),十六烷基三甲基溴化铵(Amresco,USA),琼脂糖(Biowest, Spain),0.22 μm 微孔滤膜(Millipore,USA),Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit 土壤总 DNA 提取试剂盒(Mobio,USA),粪便总 DNA 提取试剂盒(百泰克生物技术有限公司,北京),引物合成(三博远志,北京),SsoFast™ EvaGreen® Supermix(Bio-Rad,USA)。

主要仪器:核酸蛋白质分析仪 Ultraspec 6300 pro (GE,USA),高速离心机(Sigma,Germany),凝胶成像系统(Bio-Rad,USA),PCR 仪(Bio-Rad,USA),CFX96 real-time PCR 仪(Bio-Rad,USA),电泳装置(Bio-Rad,USA)。

1.2 样品采集

猪场粪水样品:取自北京顺义和北京大兴某规模化养猪场。废水样品用灭菌的采样瓶采集,低温保存,24 h 内将样品运回实验室进行处理。

牛粪便和鸡粪便样品:取自中国农业大学西校区养殖场。样品用灭菌的采样瓶采集,低温保存,24 h 内将样品运回实验室于-70℃冰箱保存备用。

人粪便样品:北京大兴农村某公厕。取样和保存方法同牛粪便和鸡粪便。

1.3 样品预处理及总基因组提取

猪场粪水预处理:采用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤一定量的猪场粪水,将过滤得到的滤膜用液氮研磨,研磨所得的粉末移到 1.5 mL 离心管,进行 DNA 的提取。

粪便样品预处理:各取一定质量(1 g)粪便样品

用液氮研磨,将研磨所得粉末转移到 1.5 mL 离心管中,进行 DNA 提取。

土壤总 DNA 提取试剂盒法:选用美国 Mobio 公司生产的 Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit,具体实验步骤参考说明书。

粪便总 DNA 提取试剂盒法:选用北京百泰克生物技术有限公司生产的粪便总 DNA 提取试剂盒,具体实验步骤参考说明书。

改良 CTAB 法^[11]:在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL TENP 缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,20 mmol·L⁻¹ EDTA,100 mmol·L⁻¹ NaCl,0.01 g·mL⁻¹ PVPP,pH 10),涡旋混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,重复以上步骤,直到上清液清澈透明后,留沉淀;向沉淀中加入 500 μL 的 2×CTAB 提取液(1.4 mol·L⁻¹ NaCl,0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl,0.02 mol·L⁻¹ EDTA,2% CTAB,2% PVPP),加入 20% SDS 至终浓度为 2%,50 μL 异硫氰酸胍洗液,混匀后 65℃水浴 1.5 h,每隔 15 min 摇匀一次。水浴结束后,置冰上冷却 5 min,加等体积氯仿/异戊醇,轻轻混匀后,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,将上清液转移至新的离心管中;用等体积氯仿/异戊醇再抽提一次,取上清液转移到新的离心管中,加入 0.1 倍体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc 和 0.6 倍体积的异丙醇,-20℃静置 30 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;弃上清液,加入 1 mL 的 70%乙醇洗涤沉淀,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,去上清液,于空气中自然晾干,待离心管中液体挥发至无酒精味;沉淀溶解于 30 μL ddH₂O 中,-20℃保存。

1.4 猪源拟杆菌特异性生物标记的 PCR 扩增

据已有研究报道^[12-13],合成了 3 对引物(表 1)。反应体系及扩增程序如下,PCR 产物用 2%(W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测。

引物 1,25 μL 反应体系:10×PCR Buffer(Mg²⁺ plus) 2.5 μL ,dNTPs(10 mmol·L⁻¹)2 μL ,Taq 酶(5 U· μL^{-1})0.25 μL ,ddH₂O 17.25 μL ,引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL ,模板 1 μL ;扩增程序:预变性 95℃,5 min;变性 95℃,30 s,退火 62℃,30 s,延伸 72℃,30 s,35 个循环;72℃延伸 5 min。

引物 2,反应体系同引物 1。扩增程序:预变性 95℃,5 min;变性 95℃,30 s,退火 60℃,30 s,延伸 72℃,30 s,35 个循环;72℃延伸 5 min。

引物 3,反应体系和扩增程序同引物 2。

1.5 PCR 产物测序比对验证引物特异性

将 PCR 产物连接到 pEASY-T1(全式金)载体

表 1 试验所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

序号	引物名称	引物序列(5'—3')	退火温度/℃	目的片段/bp	参考文献
1	Bac41F	TACAGGCTTAACACATGCAAGTCG	62	145	[12]
	PS183R	CTCATACGGTATTAATCCGCCTTT			
2	Bac32F	AACGCTAGCTACAGGCTTAAC	60	129	[13]
	Bac108R	CGGGCTATTCTGACTATGGG			
3	Bac41F	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	60	116	[13]
	Bac163R	ACCTCATACGGTATTAATCCGC			

上,以 M13 通用引物进行测序,测序结果利用 DNA-MAN6.0 进行拼接,结果在 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上比对分析。

1.6 猪源拟杆菌特异性生物标记的 qPCR 扩增

所用引物为表 1 所述 3 对引物,15 μL 反应体系:2×SsoFast™ EvaGreen® Supermix(Bio-Rad)7.5 μL,引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.15 μL,模板 1.5 μL,加 ddH₂O 至 15 μL。

引物 1 扩增程序:预变性 95 ℃,10 min;变性 95 ℃,5 s,退火延伸 62 ℃,1 min,40 个循环;溶解曲线 65~95 ℃。

引物 2 扩增程序:预变性 95 ℃,10 min;变性 95 ℃,15 s,退火延伸 60 ℃,1 min,40 个循环;溶解曲线 65~95 ℃。

引物 3 反应条件同引物 2。

1.7 标准曲线制作及扩增效率确定

标准曲线制作:利用 3 对特异性引物对基因组 DNA 扩增后,将目标产物切胶回收,连接到 pEASY-T1 载体上,转化 DH5α 感受态细胞,利用含有氨苄青霉素的平板筛选阳性重组子,挑取阳性克隆,提取质粒 DNA。测定提取质粒 DNA 的浓度,计算目的片段拷贝数;质粒原液进行 10 倍梯度稀释,标准品梯度一般选择 5~7 个梯度,将选择的质粒稀释液作为模板进行荧光定量 PCR,绘制标准曲线。一般认为相关系数(R^2)需大于 0.98,越接近 1,结果可信度越高。

扩增效率的确定:扩增效率(E)是通过标准曲线的斜率(Slope)来确定的,两者符合 $E=10^{(-1/\text{Slope})}-1$,如果一个反应的标准曲线的斜率为-3.32,则该反应的扩增效率(E)为 100%。一般认为扩增效率(E)在 90%~110%是可接受的,而 E 值越接近 1,越理想。本研究所涉及 qPCR 反应扩增效率(E)都在 91%~110%之间,标准曲线的斜率(Slope)在-3.56~-3.10 之间,相关系数(R^2)均大于 0.98,符合 qPCR 对相关参数的要求。

2 结果与分析

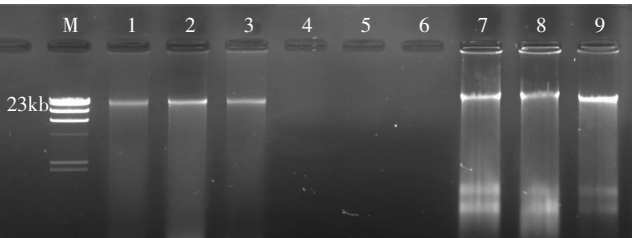
2.1 总 DNA 提取结果

2.1.1 猪场废水总 DNA 提取效果比较

以猪场粪水原液为材料,用 3 种不同方法提取总 DNA,每种方法设 3 次重复,结果(表 2 和图 1)表明,土壤总 DNA 提取试剂盒未能从样品中提取出总 DNA,改良 CTAB 法和粪便总 DNA 提取试剂盒的效果较好,片段大小在 23 kb 左右,提取过程无明显降解现象。粪便总 DNA 提取试剂盒提取的量高于改良

表 2 3 种方法提取的猪场粪水总 DNA 浓度和纯度
Table 2 The concentrations and quality of total DNA extracted from piggery wastewater by 3 different methods

DNA 提取方法	样品编号	DNA 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	A_{260}/A_{280}
改良 CTAB 法	1	92.8	2.01
	2	108.8	2.03
	3	102.4	1.97
土壤总 DNA 提取试剂盒	4	2.9	1.48
	5	3.1	1.37
	6	3.3	1.56
粪便总 DNA 提取试剂盒	7	177.5	1.38
	8	166.2	1.54
	9	187.1	1.75



M. DNA Marker, 1~3 为改良 CTAB 法, 4~6 为土壤总 DNA 提取试剂盒, 7~9 为粪便总 DNA 提取试剂盒

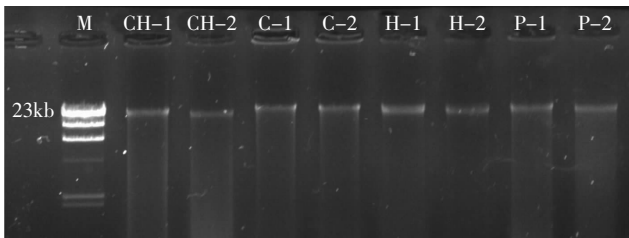
图 1 3 种方法提取猪场粪水 DNA 琼脂糖电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from piggery wastewater by 3 different methods

CTAB 法,约为 1.5 倍,但改良 CTAB 法提取的总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值相对较高,提取的总 DNA 纯度比粪便总 DNA 提取试剂盒好。为降低干扰因素,在后续实验中,采用改良 CTAB 法进行总 DNA 提取。

2.1.2 不同来源粪水总 DNA 提取结果

分别以猪场粪水、牛粪便、鸡粪便和人粪便为材料,利用改良 CTAB 法提取各样品总 DNA,各样品 2 次重复,结果(图 2)表明,改良 CTAB 法均能从各样品中提取总 DNA,且总 DNA 质量和纯度可满足后续实验要求。



M. DNA Marker, P-1 和 P-2 为猪场废水总 DNA, H-1 和 H-2 为人粪便总 DNA, C-1 和 C-2 为牛粪便总 DNA, CH-1 和 CH-2 为鸡粪便总 DNA

图 2 4 种样品总 DNA 琼脂糖电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from 4 different samples of pig

2.2 不同引物特异性验证

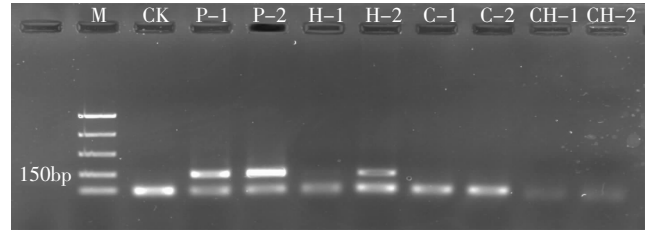
对不同粪便总 DNA 进行 PCR 扩增、PCR 产物测序和 qPCR 检测,以验证 3 对引物的特异性。

2.2.1 不同寄主来源总 DNA 引物特异性验证

为降低杂质对 PCR 的影响,分别将提取的各样品基因组 DNA 稀释 10 倍作为模板,按 1.4 中的 3 对引物、体系和扩增程序进行扩增,3 对引物的扩增结果见图 3~图 5。结果表明,CK、CH-1 和 CH-2 没有目的条带出现,P-1 和 P-2 样品均有目的条带出现,且片段大小与文献所述大小一致(表 1),说明 3 对引物都能对猪场废水中拟杆菌总基因组进行扩增,但引物 1 在对 H-1 和 H-2 扩增中有目的条带出现,引物 2 在对 C-2 扩增中有目的条带出现,引物 3 在对其他样品进行扩增中未见明显扩增产物,故引物 3 的特异性好于引物 1 和引物 2。

2.2.2 特异性基因标记测序结果比对

按 1.5 所述步骤,引物 1 扩增产物测序结果为:5'-CTCATACGGTATTAATCCGCCTTTTCGACGGGCTATCCCGTGGACAGGGGAAGGTTGCATACGCGTTACTCA CCCGTGCGCCGGTTCGCCATCAAATTTAGCAAGCTAA ATTCATGCTGCCCCGCGACTTGCATGTGTTAAGCCT



M. DNA Marker, CK 为未加模板的空白对照, P-1 和 P-2 为猪场废水总 DNA, H-1 和 H-2 为人粪便总 DNA, C-1 和 C-2 为牛粪便总 DNA, CH-1 和 CH-2 为鸡粪便总 DNA。图 4、图 5 同

图 3 引物 1(Bac41F/PS183R)扩增结果

Figure 3 Amplification of Primer 1(Bac41F/PS183R)

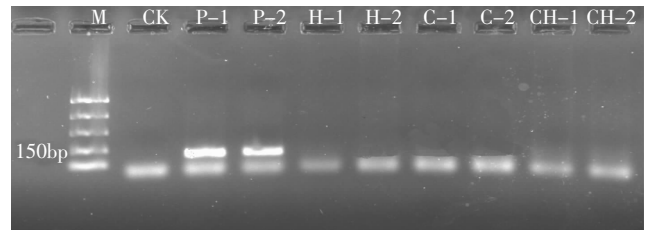


图 4 引物 2(Bac32F/Bac108R)扩增结果

Figure 4 Amplification of Primer 2(Bac32F/Bac108R)

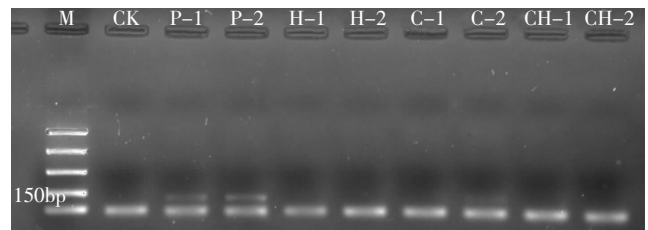


图 5 引物 3(Bac41F/Bac163R)扩增结果

Figure 5 Amplification of Primer 3(Bac41F/Bac163R)

GTA-3', 片段大小为 146 bp, 与 Okabe 等^[12]所述 145 bp 大小一致, NCBI 上的比对结果显示为以猪为宿主的拟杆菌属。引物 2 扩增产物测序结果为:5'-AAC GCTAGCTACAGGCTTAACACATGGAGGGGCACAAG TCGCATTTATCGAAGCTTGTCTTTGATAGATGGCGACC GGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTTCCCC ATAGTCAGGAATAGCCCG-3', 片段大小为 128 bp, 与文献^[13]所述 129 bp 大小一致, NCBI 上的比对结果显示有分属于以牛、大猩猩、大蝙蝠等为宿主的拟杆菌属。引物 3 扩增产物测序为:5'-ACCTCATACG GTATTAATCCGCCTTTTCGACGGGCTATCCCGTGGAC AGGGGAAGGTTGGATACGCGTTACTCACCCGTGCG CCGGTCGCCATCAAATTTAGCAAGCTAAATTCATG C-3', 片段大小为 117 bp, 与 Mieszkin 等研究结果^[13]一致, NCBI 上的比对结果显示为以猪为宿主的拟杆菌属。

序列比对分析结果显示,引物 1 和引物 3 的特异性好于引物 2。

2.2.3 qPCR 验证不同引物特异性结果

如 1.6 中所述的 qPCR 反应体系及扩增条件,分别用 3 对引物对 4 种样品进行扩增,各样品 2 次重复,结果表明(表 3),3 对引物都能通过 qPCR 检出猪场粪水中的拟杆菌。引物 1 对 H-1、H-2 和 CH-2,引物 2 对 H-2 和 C-2,引物 3 对 H-1 和 H-2 皆有小于 10^2 的检出,但只有引物 2 对 H-2 样品在做溶解曲线时于 84 ℃有峰出现,说明除引物 2 对 H-2 的扩增为特异性扩增外,其他小于 10^2 的检出为非特异性检出,可能是引物二聚体的影响。因此,qPCR 验证结果显示引物 1 和引物 3 的特异性好于引物 2。

综合上述 3 种方法的引物特异性检测结果可知, 引物 3 的特异性好, 更适于后续实验。

2.3 qPCR 检测方法灵敏性结果

利用两种方法检测 qPCR 的灵敏性。方法一:将

猪场粪水原液按 10 倍梯度稀释, 按 1.3 所述方法进行预处理 (过滤体积为 30 mL), 提取总 DNA, 将总 DNA 稀释 10 倍后取 1.5 μ L 用于 qPCR 检测, 检测结果见表 4。方法二: 将提取的猪场粪水原液总基因组 DNA 按 10 倍梯度稀释, 然后利用 qPCR 进行检测, 检测结果见表 5。两种方法的检测结果表明, 改良 CTAB 法提取的猪场粪水总基因组不能直接用于 qPCR 扩增, 要将其予以适当稀释, 降低杂质浓度后才能正常扩增, 计算拷贝数时要乘以相应的稀释倍数。利用 qPCR, 引物 3 可检出拷贝数高于 $4.09\text{E}+02 \sim 1.60\text{E}+03$ 的猪源拟杆菌属特异性生物标记, 检出上限至少为 $6.59\text{E}+07$ 拷贝数。

2.4 混合污水中猪源拟杆菌特异性生物标记 qPCR 检测结果

以未过滤猪场粪水原液稀释 10 倍作为对照 (CK), 处理组分别为: (1) 单一加入人、牛、鸡粪便至终浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; (2) 加入人+牛、人+鸡、牛+鸡粪便

表 3 3 对引物 qPCR 扩增 4 种样品结果

Table 3 Specificity test for 3 primers by using qPCR and 4 samples

编号	引物 1			引物 2			引物 3		
	拷贝数	Ct 值	Tm 值	拷贝数	Ct 值	Tm 值	拷贝数	Ct 值	Tm 值
P-1	3.12E+06	23.02	84.5	4.14E+05	25.5	83.5	3.01E+06	24	84.5
P-2	2.86E+06	23.13	84.5	1.11E+06	27.03	83.5	1.22E+06	25.37	84
H-1	2.94E+02	35.79	None	ND	ND	None	2.94E+02	38	None
H-2	8.52E+01	37.5	None	5.44E+02	37.3	84	1.24E+02	38.82	None
C-1	ND	N/A	None	ND	N/A	None	ND	N/A	None
C-2	ND	N/A	None	1.16E+02	37.3	None	ND	N/A	None
CH-1	4.32E+01	38.43	None	ND	N/A	None	ND	N/A	None
CH-2	ND	N/A	None	ND	N/A	None	ND	N/A	None

注:ND 为 Not Detected;N/A 为 Not Available。

表 4 猪场粪水原液梯度稀释检测引物 3 灵敏性

Table 4 The sensitivity of primer 3 tested by serial dilutions of piggery wastewater

稀释倍数	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	CK
检出拷贝数	6.59E+07	7.87E+06	5.61E+05	4.08E+04	6.32E+03	4.09E+02	ND	ND
每毫升所含拷贝数	4.39E+08	5.25E+07	3.74E+06	2.72E+05	4.21E+04	2.73E+03	ND	ND
Ct 值	20.34	23.31	27	30.67	33.27	37.1	N/A	N/A
Tm 值	84	84	84	84	84	84	None	None

表 5 猪场粪水原液总 DNA 梯度稀释检测引物 3 灵敏度

Table 5 The sensitivity of primer 3 tested by serial dilutions of total DNA extracted from piggery wastewater

[illegible]

至每种粪便至终浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (3)加入人+牛+鸡粪便至每种粪便终浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 1.3 所述方法进行预处理(过滤体积为 20 mL),提取总基因组,将总基因组稀释 10 倍,取 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 用于 qPCR 检测,结果见表 6。通过表 6 数据可以看出各处理下人、牛、鸡粪便的加入未显著增加特异性生物标记的拷贝数,实验检出拷贝数在 CK 的基础上未有明显变化,故其他粪便的加入不影响原污水中猪源特异性生物标记基因拷贝数的检出效率,具很好的特异性,排除了其他粪便的影响,可以实际应用对环境中某一未知水体中以猪为宿主拟杆菌特异性生物标记数量的检测。

3 讨论

(1)CTAB 法用于粪水 DNA 提取的效果不理想,本研究参考赵勇等^[14]土壤总 DNA 提取过程中对土壤样品预处理的方法对 CTAB 法进行改良,利用 TENP 缓冲液对研磨滤膜进行预处理。预实验证明利用 TENP 对研磨好的滤膜进行预处理,能很好地去除猪场废水中的可溶性无机物、有机物污染,尤其是色素类和腐植酸类物质。

(2)猪场粪水总 DNA 的提取率虽然比较理想,但其中的杂质在 DNA 直接进行 PCR 扩增时对反应有干扰^[15]。为降低杂质干扰,实验对提取的总 DNA 进行了 10 倍梯度稀释,稀释后的 qPCR 反应 Ct 值的线性方程为 $y=2.795x+18.43(R^2=0.98)$,表明稀释后各梯度样品线性关系较好,故稀释对定量初始样品中的 DNA 含量影响不大,可以利用梯度稀释的方法来降低初始样品中杂质对 PCR 的干扰。

(3)本文通过两种方法验证了引物 3(Bac32F/Bac108R)的灵敏性,其检出下限在 $4.09\text{E}+02\sim 1.60\text{E}+03$ 拷贝数之间,检出上限至少为 $6.59\text{E}+07$ 拷贝数。实验结果与 Mieszkin 等^[13]研究结果检出下限为 $3.6\log_{10}\sim$

$4.1\log_{10}$ 一致。此外,由于检测样品为水样,故当水样中以猪为宿主拟杆菌属特异性生物标记拷贝数低于检出限时可通过增加过滤水样体积,使待测样品满足检出限要求,浓度高时则可通过稀释调整待测样拷贝数以满足检出限要求,因此该法对污染物浓度的范围无限制性要求,具广泛的适用性。

4 结论

(1)利用 TENP 缓冲液对研磨后的滤膜进行预处理,能够有效去除猪场废水中的杂质,提高总 DNA 的提取质量。

(2)提取的总 DNA 经梯度稀释后进行 qPCR,能够降低杂质对 PCR 过程的干扰,且梯度稀释后对猪源宿主特异性生物标记定量检测结果的线性相关性高,稀释对定量结果影响不大。

(3)引物 3(Bac32F/Bac108R)特异性好,灵敏度能满足实验要求。利用特异性引物 3 经 qPCR 可对水体中猪源拟杆菌属特异性生物标记进行准确定量。

参考文献:

[1] Stoner N, Dorfman M. Testing the waters: A Guide to water quality at vacation beaches. Natural Resources Defense Council[EB/OL]. (2007-08) [2010-12-08]http://www.nrdc.org/water/oceans/ttw/ttw2007.pdf
[2] Carson C A, Shear B L, Ellersieck M R, et al. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:1836-1839.
[3] Bernhard A E, Field K G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S rDNA genetic markers from fecal anaerobes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4):1587-1594.
[4] 张 曦,朱昌雄,朱红惠,等. 利用拟杆菌分子标记物对粪便污染溯源的研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 51(7):863-868.
ZHANG Xi, ZHU Chang-xiong, ZHU Hong-hui, et al. Uncultivated

表 6 混合污水中以猪源拟杆菌特异性生物标记量检测结果
Table 6 The results of quantify the pig-specific *Bacteroidales* biomarkers in mixed sewage

处理	样品	实验检出拷贝数	每毫升猪粪水所含拷贝数	Ct 值	Tm 值
CK	猪粪便	1.06E+06	1.06E+07	23.67	84.5
处理 1	猪粪便+人粪便	8.21E+05	8.21E+06	24.01	84.5
	猪粪便+牛粪便	1.13E+06	1.13E+07	23.59	84.5
	猪粪便+鸡粪便	1.19E+06	1.19E+07	23.52	84.5
	猪粪便+人粪便+牛粪便	8.80E+05	8.80E+06	23.92	84.5
处理 2	猪粪便+人粪便+鸡粪便	6.78E+05	6.78E+06	24.26	84.5
	猪粪便+牛粪便+鸡粪便	9.52E+05	9.52E+06	23.81	84.5
	猪粪便+人粪便+牛粪便+鸡粪便	8.12E+05	8.12E+06	24.02	84

- host-specific *Bacteroidales* markers for identification of fecal source pollution: A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(7):863–868.
- [5] 张 曦, 朱昌雄, 冯广达, 等. 基于拟杆菌特异性 16S rRNA 基因的塘坝型饮用水污染溯源研究 [J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(9):1880–1887.
- ZHANG Xi, ZHU Chang-xiong, FENG Guang-da, et al. Potential use of *Bacteroidales* specific 16S rRNA in tracking the rural pond-drinking Water[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(9):1880–1887.
- [6] Kildare B J, Leutenegger C M, McSwain B S, et al. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A bayesian approach[J]. *Water Research*, 2007, 41(16):3701–3715.
- [7] Fogarty L R, Mary A V. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10):5999–6007.
- [8] 杨晶艳, 陈智瑾, 丁晓贝, 等. 拟杆菌作为粪便污染指示微生物的初探[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(3):230–234.
- YANG Jing-yan, CHEN Zhi-jin, DING Xiao-bei, et al. Preliminary study on *Bacteriodes* as the potential fecal contamination indicator bacteria[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2011, 45(3):230–234.
- [9] Lamendella R, Santo Domingo J W, Yannarell A C, et al. Evaluation of swine-specific PCR assays used for fecal source tracking and analysis of molecular diversity of swine-specific "*Bacteroidales*" populations [J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2009, 75(18):5787–5796.
- [10] 赵晓祥, 庞晓倩, 庄惠生, 等. 荧光定量 PCR 技术在环境监测中的应用研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12):125–128.
- ZHAO Xiao-xiang, PANG Xiao-qian, ZHUANG Hui-sheng, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in environmental monitoring[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 32(12):125–128.
- [11] 张 曦. 拟杆菌 16S rRNA 基因在饮用水污染溯源方法中的应用研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.
- ZHANG Xi. Application of *Bacteroidales* 16S rRNA gene in tracking the drinking water pollution[D]. Beijing: CAAS, 2011.
- [12] Okabe S, Okayama N, Savichtcheva O, et al. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 74(4):890–901.
- [13] Mieszkis S, Furet J P, Corthier G, et al. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2009, 75(10):3045–3054.
- [14] 赵 勇, 周志华, 李 武, 等. 土壤微生物分子生态学研究中的总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5):854–860.
- ZHAO Yong, ZHOU Zhi-hua, LI Wu, et al. DNA extraction from soil for molecular microbial community analysis[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(5):854–860.
- [15] LaMontagne M G, Michel Jr F C, Holden P A, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. *J Micro Methods*, 2002, 49:255–264.