



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111235146 B

(45) 授权公告日 2022.02.08

(21) 申请号 202010240059.3	C12Q 1/6851 (2018.01)
(22) 申请日 2020.03.30	(56) 对比文件
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111235146 A	CN 108569831 A, 2018.09.25 CN 106480015 A, 2017.03.08 CN 104911178 A, 2015.09.16
(43) 申请公布日 2020.06.05	Shivani Chandra等. A Rapid and Efficient DNA Extraction Method for PCR Based Assays in Activated Sludge.《The Journal of Plant Science Research》.2010, 第26卷(第2期), 第213-218页.
(73) 专利权人 南华大学 地址 421001 湖南省衡阳市蒸湘区常胜西 路28号	唐安平. 城市污泥处理过程中抗性污染研究 现状与展望.《天津化工》.2018, 第32卷(第3期), 第6-8页.
(72) 发明人 周帅 张雨 高媛媛 唐振平 刘金香	审查员 王婷
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限 公司 11227 代理人 温可睿	
(51) Int. Cl. C12N 15/10 (2006.01)	权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

污泥中胞内外DNA的分离方法及其携带耐药基因的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及污水处理技术领域, 尤其涉及分离污泥中胞内外DNA的方法及污泥中胞内外耐药基因的检测方法。本发明提供的方法联合离子交换树脂法和十二烷基苯磺酸钠-高盐法提取污泥胞外、胞内DNA, 该方法提取获得的胞内外DNA无明显交叉污染。采用特异性引物对提取产物扩增, 可成功区分污泥中胞内外耐药基因, 有望用于探究污泥中不同形态耐药基因的时空分布特征, 并为今后开发相应的耐药基因风险评估方案和消除手段提供依据。

1. 分离污泥中胞内外DNA的方法,其特征在于,包括:

污泥沉淀与磷酸盐缓冲液重悬后与活化后的阳离子交换树脂混合,0~4℃600rpm搅拌反应6h后,离心分离上清液a和沉淀a;所述阳离子交换树脂为Dowex Marathon C钠型,每g挥发性污泥混合液悬浮固体与70g所述阳离子交换树脂混合;所述污泥沉淀是指污泥样品经离心后所得的沉淀;

所述上清液a经醋酸纤维膜过滤,获得污泥胞外DNA粗提取液;

所述污泥胞外DNA粗提取液依次经十六烷基三甲基溴化铵、高盐TE缓冲液、异丙醇、苯酚-氯仿-异戊醇、氯仿-异戊醇处理后,以乙酸钠-无水乙醇沉淀,再以70vol%乙醇洗涤,获得胞外DNA;

所述沉淀a与胞内DNA抽提缓冲液和蛋白酶K混合,酶解后经三次十二烷基苯磺酸钠处理,分离上清液b,获得污泥胞内DNA粗提取液;

所述三次十二烷基苯磺酸钠处理包括:

第一次处理:酶解产物与20wt%十二烷基苯磺酸钠溶液混合,65℃孵育2h后,10000 rpm离心10 min,分离沉淀和上清液c;

第二次处理:将第一次处理后的沉淀与20wt%十二烷基苯磺酸钠溶液-DNA抽提缓冲液混合,65℃孵育10min后,10000 rpm离心10 min,分离沉淀和上清液d;

第三次处理:将第二次处理后的沉淀与20wt%十二烷基苯磺酸钠溶液-DNA抽提缓冲液混合,65℃孵育10min后,10000 rpm离心10 min,取上清液e;

合并上清液c、d、e为上清液b;

所述污泥胞内DNA粗提取液依次经苯酚-氯仿-异戊醇、氯仿-异戊醇处理后,以异丙醇沉淀后,再以70vol%乙醇洗涤,获得胞内DNA。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述提取过程中,以活/死细胞染色法评估胞外DNA是否受到胞内DNA的污染。

3. 一种污泥中胞内外耐药基因的检测方法,其特征在于,以权利要求1~2任一项所述的方法分离污泥中胞内外DNA;分别以目的耐药基因的引物进行扩增,根据扩增结果分析污泥中胞内外耐药基因的存在情况。

4. 根据权利要求3所述的检测方法,其特征在于,所述耐药基因包括: *sul1*、*sul2*、*tetC*、*tetM*、*tetO*和*tetX*。

5. 根据权利要求3所述的检测方法,其特征在于,所述扩增的体系包括:

Power SYBR® Green PCR Master Mix2×	10μL;
正向引物10 μmol/L	0.6μL;
反向引物10 μmol/L	0.6μL;
污泥中胞内外DNA1 ng/μL	2μL;
无菌无酶水	6.8μL;

所述扩增程序包括:

50℃尿嘧啶-DNA糖基化酶处理2 min;

95℃ Dual-Lock™ Taq DNA 聚合酶热启动2 min;

95℃变性15 s,退火15 s,72℃延伸1 min,共40个循环。

污泥中胞内外DNA的分离方法及其携带耐药基因的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及污水处理技术领域,尤其涉及污泥中胞内外DNA的分离方法及其携带耐药基因的检测方法。

背景技术

[0002] 世界卫生组织和美国疾病与控制中心等组织一致将细菌“耐药性”列为二十一世纪人类健康的最大威胁之一。联合国环境署则将“耐药性”列为全球六大新兴环境问题之一。耐药基因是细菌获得耐药性的根本原因,故耐药基因的准确定量对于开发耐药性的风险评估方案和消除手段至关重要。在众多环境介质中,污水处理系统被证明是耐药基因重要储存库之一。

[0003] 在污水处理系统中,污泥内耐药基因按物理学形态可分为细胞内耐药基因和细胞外耐药基因。耐药基因形态不同,其环境行为特征亦不相同。然而,目前有关污水处理系统中耐药基因分布规律和消长特性的研究几乎均将污泥这一研究对象视作整体予以考虑,而未区分其形态。不同形态耐药基因的研究主要涉及前期不同形态DNA提取和后期不同形态耐药基因的定量检测。耐药基因的定量检测手段相对较为成熟和统一,但能够实现完整、无交叉污染的不同形态DNA的提取至今仍是一项极具挑战的任务。考虑到污泥中胞内和胞外耐药基因不同的繁殖模式、传播模式和消除难度,有必要开发不同形态耐药基因的定量检测方法。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供污泥中胞内外DNA的分离方法及其携带耐药基因的检测方法,该方法能够实现对胞内外DNA的良好分离,不存在显著交叉污染,因此能够实现对污泥中胞内外抗生素基因的准确检测。

[0005] 本发明提供了分离污泥中胞内外DNA的方法,其特征在于,包括:

[0006] 污泥沉淀与活化后的阳离子交换树脂(CER)混合,0~4℃500~800rpm搅拌反应4~8h后,离心分离上清液a和沉淀a;

[0007] 所述上清液a经醋酸纤维膜过滤,获得污泥胞外DNA粗提取液;

[0008] 所述沉淀a与胞内DNA抽提缓冲液混合,依次经蛋白酶K酶解、十二烷基苯磺酸钠(SDS)处理、SDS-DNA抽提缓冲液处理后,分离上清液b获得污泥胞内DNA粗提取液。

[0009] 本发明中,所述污泥沉淀与磷酸盐缓冲液重悬后,与活化的CER混合。所述污泥沉淀是指污泥样品经离心后所得的沉淀,其体积与污泥样品相等。所述磷酸盐缓冲液的包括:水和137mmol/L NaCl、2.7mmol/L KCl、10mmol/L Na_2HPO_4 和1.8mmol/L KH_2PO_4 组成。所述缓冲盐的pH值为7.2。

[0010] 本发明中,所述CER为Dowex Marathon C钠型,每g挥发性污泥混合液悬浮固体(MLVSS)与60~80g所述CER混合。所述树脂的活化试剂采用磷酸盐缓冲液,活化在室温下进行,具体为18~30℃。活化时间为1h。活化后,10,000g、4℃离心5min,移除上清液,获得活化

的树脂。

[0011] 具体实施例中,污泥与磷酸盐的混合液于4℃、600rpm搅拌反应6h后,10,000g、4℃离心15min离心分离上清液a和沉淀a;

[0012] 所述上清液a经醋酸纤维膜过滤时,滤膜孔径为0.22 μ m。

[0013] 所述沉淀a与胞内DNA抽提缓冲液和蛋白酶K混合,酶解后经三次SDS处理;

[0014] 所述沉淀a、DNA抽提缓冲液、蛋白酶K的比例为1g(湿重):2.7mL:10 μ L;

[0015] 所述胞内DNA抽提缓冲液包括水和100mM Tris-HCl、100mM EDTA、100mM Na₂HPO₄、1.5M NaCl和1%CTAB,pH值为8.0。

[0016] 所述蛋白酶K的浓度为10mg/mL,所述酶解的条件为37℃,225rpm搅拌30min。酶解后,离心弃上清获得所述酶解产物。

[0017] 所述三次SDS处理包括:

[0018] 第一次处理:酶解产物与20wt% SDS溶液混合,65℃孵育2h后,10000rpm离心10min,分离沉淀和上清液c;

[0019] 第二次处理:将第一次处理后的沉淀与20wt% SDS-DNA抽提缓冲液混合,65℃孵育10min后,10000rpm离心10min,分离沉淀和上清液d;

[0020] 第三次处理:将第二次处理后的沉淀与20wt% SDS-DNA抽提缓冲液混合,65℃孵育10min后,10000rpm离心10min,取上清液e;

[0021] 合并上清液c、d、e为上清液b。

[0022] 所述第一次SDS处理中,酶解产物与20wt% SDS溶液的比例为1g:0.3mL;

[0023] 所述第二次SDS处理中,沉淀与20wt% SDS-DNA抽提缓冲液的比例为1g(湿重):0.1mL;

[0024] 所述第二次SDS处理中,沉淀与20wt% SDS-DNA抽提缓冲液的比例为1g(湿重):0.1mL。

[0025] 所述20wt% SDS-DNA抽提缓冲液为20wt% SDS溶液与DNA抽提缓冲液以体积比1:9混合获得。

[0026] 本发明中,所述污泥胞内外DNA粗提取物还经过纯化的步骤。

[0027] 本发明中,所述污泥胞外DNA粗提取液依次经十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、高盐TE缓冲液、异丙醇、苯酚-氯仿-异戊醇、氯仿-异戊醇处理后,以乙酸钠-无水乙醇沉淀,再以乙醇溶液洗涤,最终获得纯化的胞外DNA。

[0028] 一些实施例中,所述CTAB处理包括:污泥胞外粗提取液与等体积的浓度为1wt%的CTAB溶液混合,65℃静置30min,然后于10,000g、4℃离心10min,取沉淀b。

[0029] 一些实施例中,所述高盐TE缓冲液处理包括:将沉淀b与高盐TE缓冲液混合在加入无水异丙醇后,0℃~4℃放置1h后10,000g、4℃离心10min,取沉淀c。其中,所述高盐TE缓冲液包括水和10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、1M NaCl,pH为8.0;高盐TE缓冲液的体积与CTAB溶液相等,异丙酮与高盐TE缓冲液的体积比为0.6:1。

[0030] 一些实施例中,所述苯酚-氯仿-异戊醇处理包括:将沉淀c与TE缓冲液混合后,加入苯酚:氯仿:异戊醇混合液。混匀后于4℃、10,000rpm离心10min,然后取上层水相a。所述TE缓冲液包括水和10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA组成,pH值为8.0;所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液体积比为25:24:1;所述TE缓冲液与苯酚:氯仿:异戊醇混合液的体积比为1:1。

[0031] 一些实施例中,所述氯仿-异戊醇处理包括:将上层水相a与氯仿-异戊醇混合,4℃、10,000rpm离心5min,取上层水相b;所述氯仿:异戊醇混合液体积比为24:1;所述氯仿:异戊醇混合液与上层水相a的体积比为1:1。

[0032] 一些实施例中,所述以乙酸钠-无水乙醇沉淀处理包括:将上层水相b与3mol/L乙酸钠溶液和预冷无水乙醇混合,0℃~4℃静置1h后,经14,000g、4℃离心10min,,取沉淀d。所述上层水相b、乙醇钠溶液和无水乙醇的体积比为10:1:20。

[0033] 一些实施例中,所述以乙醇洗涤处理包括:以乙醇溶液洗涤沉淀d。所述乙醇溶液浓度为70vol%,乙醇溶液洗涤次数为2次。

[0034] 本发明中,所述污泥胞内DNA粗提取液依次经苯酚-氯仿-异戊醇、氯仿-异戊醇处理后,以异丙醇沉淀后,再以乙醇溶液洗涤,获得纯化的胞内DNA。

[0035] 一些实施例中,所述苯酚-氯仿-异戊醇处理包括:将污泥胞内DNA粗提取液与苯酚:氯仿:异戊醇混合液混合,然后4℃、10,000rpm离心10min,取上层水相c。所述混合步骤为颠倒混匀,颠倒次数为5~10次。所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液体积比为25:24:1;所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液与污泥胞内DNA粗提取液的体积比为1:1。

[0036] 一些实施例中,所述氯仿-异戊醇处理包括:将所述上层水相c与氯仿-异戊醇混合液等体积混合后,室温10,000g离心10min,取上层水相d。所述所述氯仿:异戊醇混合液体积比为24:1。

[0037] 一些实施例中,以异丙醇沉淀包括:将上层水相d与异丙醇混合,室温沉淀1h后,于室温14,000rpm离心10min移除上清液。所述上层水相d与异丙醇的体积比为1:0.6。

[0038] 一些实施例中,所述以乙醇洗涤处理包括:以乙醇溶液洗涤沉淀d。所述乙醇溶液浓度为70vol%,乙醇溶液洗涤次数为2次。

[0039] 本发明中,所述提取后,还包括以活/死细胞染色法评估胞外DNA是否受到胞内DNA的污染。

[0040] 本发明提供了一种污泥中胞内外耐药基因的检测方法,其以本发明所述的方法分离得到的污泥胞内外DNA为模板;分别以目的耐药基因的引物进行荧光定量聚合酶链式(qPCR)扩增,根据扩增结果分析污泥中胞内外耐药基因的分布情况。

[0041] 本发明中,所述耐药基因包括:sul1、sul2、tetC、tetM、tetO和tetX。

[0042] 本发明中,所述扩增的体系包括:

[0043]	Power SYBR® Green PCR Master Mix (2 ×)	10 μL;
	正向引物 (10 μmol/L)	0.6 μL;
	反向引物 (10 μmol/L)	0.6 μL;
[0044]	污泥中胞内外 DNA (1 ng/μL)	2 μL;
	无菌无酶水	6.8 μL;

[0045] 所述扩增程序包括:

[0046] 50℃尿嘧啶-DNA糖基化酶处理2min;

[0047] 95℃Dual-Lock™ Taq DNA聚合酶热启动2min;

[0048] 95℃变性15s,退火15s,72℃延伸1min,共40个循环。

- [0049] 所述qPCR测试中引物序列为：
- [0050] su11上游引物核苷酸序列为CGCACCGGAAACATCGCTGCAC；
- [0051] su11下游引物核苷酸序列为TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG；
- [0052] su12上游引物核苷酸序列为TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG；
- [0053] su12下游引物核苷酸序列为CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG；
- [0054] tetC上游引物核苷酸序列为CTTGAGAGCCTTCAACCCAG；
- [0055] tetC下游引物核苷酸序列为ATGGTCGTCATCTACCTGCC；
- [0056] tetM上游引物核苷酸序列为ACAGAAAGCTTATTATATAAC；
- [0057] tetM下游引物核苷酸序列为TGGCGTGTCTATGATGTTTAC；
- [0058] tet0上游引物核苷酸序列为ACGGARAGTTTATTGTATAACC；
- [0059] tet0下游引物核苷酸序列为TGGCGTATCTATAATGTTGAC；
- [0060] tetX上游引物核苷酸序列为AGCCTTACCAATGGGTGTAAA；
- [0061] tetX下游引物核苷酸序列为TTCTTACCTTGACATCCCG；
- [0062] 16S rDNA上游引物核苷酸序列为ACTCCTACGGGAGGCAGCAG；
- [0063] 16S rDNA下游引物核苷酸引物序列为ATTACCGCGGCTGCTGG。

[0064] 本发明联合离子交换树脂法和SDS-高盐法提取污泥胞外、胞内DNA。离子交换树脂法能够通过化学作用去除污泥胞外基质中Ca²⁺和Mg²⁺等骨架离子，高效破坏胞外DNA与其他聚合物之间的相互作用，且对细胞完整性的影响较小；而SDS-高盐法提取的胞内DNA回收率高。采用CTAB与/或苯酚-氯仿-异戊醇法纯化的污泥胞外、胞内DNA纯度高，适用于qPCR检测耐药基因。因此，本发明能够满足污泥中胞内外DNA提取的基本要求：(1) 胞外DNA回收率高，能够代表胞外DNA库，且无胞内DNA污染；(2) 胞内、外DNA同时回收；(3) 胞内、外DNA纯度高，适用于后续分子生物学研究。本发明可成功区分污泥中胞内外耐药基因，有望用于探究污泥中不同形态耐药基因的时空分布特征，并为今后开发相应的耐药基因风险评估方案和消除手段提供依据。

附图说明

- [0065] 图1是均质提取法中污泥胞内DNA提取量和细胞完整性(提取基质为0.1M磷酸盐，pH8.0，误差棒表示3个平行样的标准差)；
- [0066] 图2是酶促降解提取法中污泥胞内DNA提取量和细胞完整性(误差棒表示3个平行样的标准差)；
- [0067] 图3是CER提取法中污泥胞内DNA提取量和细胞完整性(误差棒表示3个平行样的标准差)；
- [0068] 图4是16S rDNA、su11、su12、tetC、tetM、tet0和tetX的qPCR测试代表性定量标准曲线；
- [0069] 图5是六座实际污水厂内污泥胞外耐药基因的相对浓度；
- [0070] 图6是六座实际污水厂内污泥胞内耐药基因的相对浓度。

具体实施方式

- [0071] 本发明提供了污泥中胞内外DNA的分离方法及其携带耐药基因的检测方法，本领域

域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0072] 本发明的目的在于提供一种污泥中胞内外DNA的分离方法及其携带耐药基因的定量检测方法。本发明采用如下技术方案:

[0073] (1) 污泥样品预处理

[0074] 取实际污水厂中污泥混合液样品,进行离心分离。小心移除上清液,保留污泥沉淀,存于冰箱。

[0075] (2) 污泥胞外DNA的提取

[0076] ①称取CER,置于离心管A内,加入磷酸盐缓冲液,摇匀后静置。待CER活化结束后,小心移除部分上清液;

[0077] ②取适量污泥混合液,置于离心管B内。离心后小心移除全部上清液,补充磷酸盐缓冲液。混匀后,将污泥混合液转移至步骤①离心管A内;

[0078] ③将步骤②离心管A内污泥混合液和CER转移至广口平底玻璃瓶,加入转子,置于磁力搅拌水浴槽内进行反应;

[0079] ④待反应结束后,将混合液污泥和CER转移至离心管C内。离心后,小心移取上清液,过膜处理,即得污泥胞外DNA粗提取液。

[0080] (3) 污泥胞外DNA的纯化

[0081] ①取污泥胞外DNA粗提取液,置于离心管D内。加入CTAB,颠倒混匀后静置于水浴锅。离心后,小心移除上清液;

[0082] ②往步骤①中离心管D加入高盐TE缓冲液。颠倒混匀后,加入预冷异丙醇。再次颠倒混匀后,于冰上静置。离心后,小心移除上清液;

[0083] ③往步骤②中离心管D加入TE缓冲液,颠倒混匀。加入苯酚:氯仿:异戊醇混合液,再次颠倒混匀。离心后,将上层水相小心转移至离心管E中;

[0084] ④往步骤③中离心管E加入氯仿:异戊醇。颠倒混匀。离心后,将上层水相小心转移至离心管F中;

[0085] ⑤往步骤④中离心管F加入乙酸钠和预冷无水乙醇,颠倒混匀后冰上静置。离心后,小心移除上清液;

[0086] ⑥往步骤⑤中离心管F中加入乙醇。离心后,小心移除上清液,保留DNA沉淀。

[0087] ⑦重复步骤⑥一次;

[0088] ⑧往步骤⑦中装有DNA沉淀的离心管F内加入无菌无酶水,即得纯化的污泥胞外DNA溶液。

[0089] (4) 污泥胞内DNA的提取

[0090] ①小心移除步骤(2)-④中离心管C内CER后,将污泥沉淀转移至离心管G;

[0091] ②往离心管G加入DNA抽提缓冲液和蛋白酶K,振荡处理;

[0092] ③往离心管G继续加入SDS,于水浴锅静置处理,间隔颠倒数次;

[0093] ④水浴结束后进行离心处理,保留污泥沉淀于离心管G内,将上清液转移至离心管H中;

[0094] ⑤往离心管D继续加入DNA抽提缓冲液和SDS。轻微涡旋混匀后,于水浴锅静置处理;

[0095] ⑥水浴结束后进行离心处理,保留污泥沉淀于离心管G内,并将上清液转移至步骤④离心管H中;

[0096] ⑦重复步骤⑤~⑥一次。最终,离心管H内上清液即为污泥胞内DNA粗提取液。

[0097] (5) 污泥胞内DNA的纯化

[0098] ①取污泥胞内DNA粗提取液,置于离心管I内。加入苯酚:氯仿:异戊醇混合液,颠倒混匀。离心后,将上层水相小心转移至离心管J中;

[0099] ②往离心管J中加入氯仿:异戊醇。颠倒混匀。离心后,将上层水相小心转移至离心管K中;

[0100] ③往离心管K中继续加入异丙醇,室温静置沉淀。离心后,小心移除上清液;

[0101] ④往离心管K中加入乙醇。离心后,小心移除上清液,保留DNA沉淀;

[0102] ⑤重复步骤④一次。

[0103] ⑥往步骤⑤中装有DNA沉淀的离心管K内加入无菌无酶水,即得纯化的污泥胞内DNA溶液。

[0104] (6) 污泥胞内外耐药基因的检测

[0105] ①以步骤(3)纯污泥胞外DNA或(5)纯污泥胞内DNA为模板,采用qPCR对实际污水厂中耐药基因和16S rDNA进行扩增;

[0106] ②以耐药基因和16S rDNA的质粒标准品为模板,进行qPCR实验。根据质粒标准品拷贝数浓度和耐药基因或16S rDNA扩增荧光阈值循环数的对应关系,绘制耐药基因和16S rDNA的定量标准曲线;

[0107] 备注说明:质粒标准品制备步骤包括以污泥DNA为模板,采用普通PCR扩增目的基因;普通PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下割取目的基因条带,采用凝胶纯化试剂盒进一步纯化;将凝胶纯化的目的基因调节至合适浓度后,连接至质粒载体,并将其转化入感受态细胞。挑取阳性克隆转化子后,用质粒提取试剂盒抽提质粒标准品,并保存至冰箱。

[0108] ③对照耐药基因和16S rDNA的定量标准曲线,根据污泥胞内或胞外DNA中耐药基因和16S rDNA的扩增荧光阈值,获取模板污泥胞内或胞外DNA中耐药基因和16S rDNA的拷贝数浓度,并计算污泥胞内或胞外耐药基因的相对浓度。

[0109] 在步骤(1)中,所述污泥混合液取自于实际污水厂;污泥混合液置于灭菌棕色玻璃瓶中,并采用冰袋运输至实验室;离心条件为:5000g、4℃、5min;冰箱温度设置为4℃。

[0110] 在步骤(2)中,所述离心管A、B和C体积为10mL。其子步骤①所述CER品牌、型号为Dowex Marathon C钠型,20~50目;所述CER质量为2g;所述磷酸盐缓冲液由137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄和1.8mM KH₂PO₄组成,水浴采用NaOH和HCl调整pH至7.2;所述磷酸盐缓冲液体积为5mL;所述CER活化时间为1h;所述移除的上清液体积为4mL。其子步骤②所述MLVSS为约29mg(按70g CER/g MLVSS计);所述补充磷酸盐缓冲液体积为4mL。其子步骤③所述广口平底玻璃瓶体积为20mL;所述转子直径为1.5mm;所述水浴温度为4℃;所述磁力搅拌器转速为600rpm;所述反应时间为6h;其子步骤④中离心条件为:10000g、4℃、15min;所述滤膜孔径为0.22μm。

[0111] 在步骤(3)中,所述离心管D、E和F体积为2mL;所述颠倒混匀次数为5~10次;其子步骤③、④、⑤和⑥所述离心条件为14000g、4℃、5min。其子步骤①所述胞外DNA粗提取液体积为0.5mL;所述CTAB质量浓度为1%;所述CTAB体积为0.5mL;所述水浴温度为65℃;所述水浴时间为30min;离心条件为10000g、20℃、10min。其子步骤②所述高盐TE缓冲液由10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA和1M NaCl组成,采用NaOH和HCl调整pH至8.0;所述高盐TE缓冲液体积为0.5mL;所述无水异丙醇体积为0.3mL;所述无水异丙醇预冷温度为4℃;所述冰浴时间为1h;所述离心条件为10000g、4℃、10min。其子步骤③所述步骤TE缓冲液由10mM Tris-HCl和0.1mM EDTA组成,采用NaOH和HCl调整pH至8.0;所述TE缓冲液体积为0.6mL;所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液体积比为25:24:1;所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液体积为0.6mL;所述转移的上层水相体积为0.5mL。其子步骤④所述氯仿:异戊醇混合液体积比为24:1;所述氯仿:异戊醇混合液体积为0.5mL;所述转移的上层水相体积为0.4mL。其子步骤⑤所述乙酸钠浓度为3M;所述乙酸钠体积为40μL;所述乙醇预冷温度为4℃;所述乙醇体积为0.88mL;所述冰浴时间为1h。其子步骤⑥所述乙醇预冷温度为4℃;所述乙醇浓度为70vol%;所述乙醇体积为1mL。其子步骤⑧所述无菌无酶水体积为50~100μL。

[0112] 在步骤(4)中,所述离心管G和H体积为2mL。其子步骤②和⑤所述DNA抽提缓冲液由100mM Tris-HCl、100mM EDTA、100mM Na₂HPO₄、1.5M NaCl和1%CTAB组成,采用NaOH和HCl调整pH至8.0。其子步骤④和⑥所述离心条件为:10000g、20℃、10min。其子步骤②所述DNA抽提缓冲液体积为810μL(按2.7mL DNA抽提缓冲液/g湿污泥计);所述蛋白酶K浓度为10mg/mL;所述蛋白酶K体积为3μL;所述振荡温度为37℃;所述振荡转速为225rpm;所述振荡时间为30min。其子步骤③所述SDS质量浓度为20%;所述SDS体积为90μL;所述水浴温度为65℃;所述水浴时间为2h;所述颠倒混匀的时间间隔为15min。其子步骤⑤所述DNA抽提缓冲液体积为270μL(按2.7mL DNA抽提缓冲液/g湿污泥计);所述SDS质量浓度为20%;所述SDS体积为30μL;所述水浴锅温度为65℃;所述水浴时间为10min。

[0113] 在步骤(5)中,所述离心管I、J和K体积为2mL。其子步骤①所述污泥胞内DNA粗提取液体积为0.8mL;所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液体积比为25:24:1;所述苯酚:氯仿:异戊醇混合液体积为0.8mL;所述颠倒混匀次数为5~10次;所述离心条件为:14000g、4℃、10min;所述转移的上层水相体积为0.7mL。其子步骤②所述氯仿:异戊醇混合液体积比为24:1;所述氯仿:异戊醇混合液体积为0.7mL;所述颠倒混匀次数为5~10次;所述离心条件为:14000g、4℃、10min;所述转移的上层水相体积为0.6mL。其子步骤③所述异丙醇体积为0.36mL;所述沉淀时间为1h;所述离心条件为:14000g、20℃、10min。其子步骤④所述乙醇预冷温度为4℃;所述乙醇浓度为70vol%;所述乙醇体积为1mL;所述离心条件为:14000g、4℃、5min。其子步骤⑥所述无菌无酶水体积为50~100μL。

[0114] 在步骤(6)中,其子步骤②所述耐药基因或16S rDNA质粒标准品的拷贝数浓度范围为10²~10⁸copies,梯度数为6个,梯度值为10倍。

[0115] 在步骤(6)中,其子步骤②备注说明所述普通PCR扩增目的基因包括sul1、sul2和16S rDNA;所述凝胶纯化试剂盒为TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit;所述质粒载体为pMD 18-T;所述感受态细胞为大肠杆菌JM109;所述质粒提取试剂盒为MiniBEST Plasmid Purification Kit;所述冰箱保存温度为-20℃。

[0116] 在步骤(6)中,其子步骤②备注说明所述质粒标准品拷贝数浓度的计算公式为:C₀

$=C_m \times NA / [(L_{pMD18-T} + L_x) \times M_0]$, 式中 C_c 为质粒标准品拷贝数浓度, copies/ μ L; C_m 为质粒标准品质量浓度, ng/ μ L; $L_{pMD18-T}$ 为 pMD 18-T 质粒载体长度, 2692bp; L_x 为插入的目的基因长度, bp; M_0 为每对碱基的平均分子量, 660g/M; NA 为阿伏伽德罗常数, 6.02×10^{23} 。

[0117] 在步骤(6)中, 其子步骤②备注说明所述普通PCR反应条件为: 95℃预变性5min; 95℃变性30s, 退火30s, 72℃延伸30s, 共35个循环; 72℃延伸7min。

[0118] 在步骤(6)中, 其子步骤③所述污泥中胞内外耐药基因相对浓度的计算公式为: 耐药基因相对浓度 = 耐药基因的拷贝数浓度 / 16S rDNA拷贝数浓度。

[0119] 本发明采用的试材皆为普通市售品, 皆可于市场购得。下面结合实施例, 进一步阐述本发明:

[0120] 实施例1污泥胞内外DNA提取与纯化

[0121] 1、离子交换树脂提取污泥胞外DNA

[0122] (1) 称取30份2g CER, 置于30个10mL离心管内, 加入5mL磷酸盐缓冲液, 摇匀后静置活化树脂1h。

[0123] (2) 于10,000g、4℃离心5min后, 小心移除上清液4mL。

[0124] (3) 取适量体积污泥混合液(含29mg MLVSS), 于4,000g、4℃离心5min后, 小心移除上清液。补充磷酸盐缓冲液至5mL。混匀后, 转移至上述装有CER的离心管内。

[0125] (4) 将CER-污泥混合液转移至20mL平底瓶, 加入1.5mm转子, 置于4℃磁力水浴槽内。

[0126] (5) 分别于0.5、1、2、3、4、5、6、7和8h将树脂-污泥混合液转移至10mL离心管内, 于10,000g、4℃离心15min后, 小心取出上清液过0.22 μ m醋酸纤维膜, 即为污泥胞外DNA粗提取液。

[0127] 2、污泥胞外DNA纯化

[0128] (1) 取0.5mL污泥胞外DNA粗提取液置于1.5mL离心管, 加0.5mL 1%CTAB, 摇匀后于65℃静置30min。

[0129] (2) 于10,000g、4℃离心10min后, 小心移除上清液。

[0130] (3) 往步骤(2)沉淀中加0.5mL高盐TE缓冲液。颠倒混匀后加入0.3mL预冷(4℃)异丙醇。再次颠倒混匀后于冰上静置1h。

[0131] (4) 于10,000g、4℃离心10min后, 小心移除上清液。

[0132] (5) 往步骤(4)沉淀中加入0.6mL TE缓冲液后, 颠倒混匀。加入0.6mL酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, v/v)后, 再次颠倒混匀。

[0133] (6) 于4℃、10,000rpm离心10min后, 小心移取上层水相(约0.5mL)至新的2mL离心管中。

[0134] (7) 往步骤(6)2mL离心管中加入等体积氯仿:异戊醇(24:1, v/v)。颠倒混匀后, 于4℃10,000rpm离心5min。再次转移上层水相(约0.4mL)至新的2mL离心管中。

[0135] (8) 往步骤(7)2mL离心管中加入40 μ L3M乙酸钠和0.88mL预冷(4℃)无水乙醇, 颠倒混匀后冰上静置1h。

[0136] (9) 于14,000g、4℃离心10min后, 小心移除上清液。

[0137] (10) 往步骤(9)沉淀中加入1mL预冷(4℃)70%乙醇。于4℃、14,000rpm离心5min后, 小心移除上清液。

- [0138] (11) 重复步骤(10)一次。
- [0139] (12) 往离心获得的沉淀加入100 μ L无菌无酶水,即获得纯污泥胞内DNA溶液。
- [0140] 3、污泥胞内DNA提取与纯化
- [0141] 污泥胞外DNA提取结束时离心后的污泥沉淀继续用于提取污泥胞内DNA。污泥胞内DNA提取方法,根据湿污泥沉淀质量等比例添加污泥胞外DNA提取试剂,此处以300mg湿泥为例。污泥胞内DNA抽提缓冲液包括水和100mM Tris-HCl、100mM EDTA、100mM Na₂HPO₄、1.5M NaCl和1%CTAB,pH值为8.0。
- [0142] (1) 加入810 μ L污泥胞内DNA抽提缓冲液和3 μ L蛋白酶K(10mg/mL),于37 $^{\circ}$ C 225rpm水平振荡30min。
- [0143] (2) 加入90 μ L20%SDS,于65 $^{\circ}$ C水浴锅中水浴2h,间隔15min颠倒5~10次。
- [0144] (3) 于室温10,000rpm离心10min,将上清液转移至新的2mL离心管中。
- [0145] (4) 往步骤(3)沉淀中再加入270 μ L抽提缓冲液和30 μ L 20%SDS。轻微涡旋混匀后,于65 $^{\circ}$ C水浴锅中水浴10min。
- [0146] (5) 于室温10,000rpm离心10min,将上清液转移至步骤(3)中的2mL离心管。
- [0147] (6) 重复步骤(4)和(5)一次。合并3次提取所获得的上清液,即为污泥胞内DNA粗提取液。
- [0148] (7) 取0.8mL污泥胞内DNA粗提取液,与等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,v/v)颠倒混匀。于4 $^{\circ}$ C、10,000rpm离心5min后,将上层水相(0.7mL)小心转移至新的2mL离心管中。
- [0149] (8) 往步骤(7)2mL离心管中加入0.7mL氯仿:异戊醇(24:1,v/v)。颠倒混匀后于室温10,000g离心5min。再次转移上层水相(0.6mL)至新2mL离心管中。
- [0150] (9) 往步骤(8)2mL离心管中加入0.6mL异丙醇室温沉淀1h。于室温14,000rpm离心10min后,小心移除上清液。
- [0151] (10) 加入1mL预冷(4 $^{\circ}$ C)70vol%乙醇。于4 $^{\circ}$ C、14,000rpm离心5min后,小心移除上清液。
- [0152] (11) 重复步骤(10)一次。
- [0153] (12) 往离心获得的沉淀加入100 μ L无菌无酶水,即获得纯污泥胞内DNA溶液。
- [0154] 对比例1
- [0155] 本对比例与实施例1不同之处在于:采用均质法提取污泥胞外DNA。其他步骤同实施例1。均质法提取污泥胞外DNA的具体步骤为:
- [0156] 取适量体积污泥混合液(含29mg MLVSS)于10mL离心管中,于4 $^{\circ}$ C、4000rpm离心5min。弃上清液后;
- [0157] 采用0.12M NaH₂PO₄(pH 8.0)于250rpm、25 $^{\circ}$ C处理10min;于4 $^{\circ}$ C、10,000rpm离心5min后取上清液;重复此操作3次后,合并3次上清液,过0.22 μ m醋酸纤维膜,即获得污泥胞外DNA粗提取液。
- [0158] 对比例2
- [0159] 本对比例与实施例1不同之处在于:采用酶促降解提取污泥胞外DNA。其他步骤同实施例1。酶促降解提取污泥胞外DNA的具体步骤为:
- [0160] 取适量体积污泥混合液(含29mg MLVSS)于10mL离心管中,于4 $^{\circ}$ C、4000rpm离心

5min。弃上清液后,分别加入含5、50、100、200和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶K的0.85%NaCl溶液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 处理1h。之后,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下10,000rpm离心15min,取上清液过0.22 μm 醋酸纤维膜,即获得污泥胞外DNA粗提取液。

[0161] 污泥胞内外DNA交叉污染评估

[0162] 采用活/死细胞染色法评估污泥胞外DNA提取过程中的污泥胞内DNA交叉污染。采用试剂盒LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits开展活/死细胞染色实验。

[0163] 结果表明:实施例1及对比例1~2提取方法中污泥胞外DNA提取量和细胞完整性如图1~3所示。CER提取法、均质提取法(提取介质为0.1M磷酸盐,pH8.0)对污泥胞外DNA的提取效率较高。均质提取法中污泥胞外DNA提取量可达到3.8mg/g MLVSS,且未观察到明显的细胞裂解现象。酶促降解提取污泥胞外DNA效果较差(图2),这可能是因为蛋白酶K未能彻底消除蛋白质与污泥胞内DNA之间的相互作用。对于CER法提取法,在提取6h后接近最大提取量5.6mg/g MLVSS,且在6h内未出现明显细胞裂解(图3)。这表明,CER提取法能够通过化学作用去除污泥胞外基质中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等骨架离子破坏污泥胞外DNA与其他聚合物之间的相互作用,且对细胞完整性的影响较小。

[0164] 综上可知,CER对胞外DNA的提取效果较均质法和酶促法好。CER提取法需要控制CER投加量、搅拌强度和提取时间。当采用70g CER/MLVSS,600rpm和6h这一提取条件时,污泥胞外DNA提取量较高(达到5.6mg/g MLVSS),且未引起明显的污泥胞内DNA交叉污染。

[0165] 实施例2污泥胞内外耐药基因的检测

[0166] (1)以实施例1中纯污泥胞外DNA或纯污泥胞内DNA为模板,采用qPCR对实际污水厂中污泥胞内外耐药基因(sul1、sul2、tetC、tetM、tetO和tetX)和16S rDNA进行扩增;

[0167] 所述qPCR测试中引物序列为:

[0168] sul1上游引物核苷酸序列为CGCACCGGAAACATCGCTGCAC;

[0169] sul1下游引物核苷酸序列为TGAAGTTCGCCCGCAAGGCTCG;

[0170] sul2上游引物核苷酸序列为TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG;

[0171] sul2下游引物核苷酸序列为CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG;

[0172] tetC上游引物核苷酸序列为CTTGAGAGCCTTCAACCCAG;

[0173] tetC下游引物核苷酸序列为ATGGTCGTCATCTACCTGCC;

[0174] tetM上游引物核苷酸序列为ACAGAAAGCTTATTATATAAC;

[0175] tetM下游引物核苷酸序列为TGGCGTGTCTATGATGTTAC;

[0176] tetO上游引物核苷酸序列为ACGGARAGTTTATTGTATACC;

[0177] tetO下游引物核苷酸序列为TGGCGTATCTATAATGTTGAC;

[0178] tetX上游引物核苷酸序列为AGCCTTACCAATGGGTGTA AAA;

[0179] tetX下游引物核苷酸序列为TTCTTACCTTGACATCCCG;

[0180] 16S rDNA上游引物核苷酸序列为ACTCCTACGGGAGGCAGCAG;

[0181] 16S rDNA下游引物核苷酸引物序列为ATTACCGCGGCTGCTGG。

[0182] 所述qPCR测试条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 尿嘧啶-DNA糖基化酶处理2min;95 $^{\circ}\text{C}$ Dual-LockTM Taq DNA聚合酶热启动2min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15s,退火15s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1min,共40个循环。sul1、sul2、tetC和tetX的退火温度为60 $^{\circ}\text{C}$,tetM、tetO和16S rDNA的退火温度为55 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0183] 所述qPCR测试反应体系体积为20 μL ,具体组成如下:

试剂	体积 (μL)
Power SYBR® Green PCR Master Mix (2×)	10
正向引物 (10 μM)	0.6
[0184] 反向引物 (10 μM)	0.6
DNA 模板 (1 ng/μL)	2
无菌无酶水	6.8
合计	20

[0185] (2) 制备耐药基因 (sul1、sul2、tetC、tetM、tetO 和 tetX) 和 16S rDNA 质粒标准品, 并计算质粒标准品的拷贝数浓度。将已知拷贝数的质粒标准品依次进行 10 倍梯度稀释, 选取浓度范围位于 $10^8 \sim 10^2$ copies 六个梯度的质粒标准品进行 qPCR 测试。根据质粒标准品拷贝数浓度和耐药基因或 16S rDNA 扩增荧光阈值循环数的对应关系, 绘制耐药基因和 16S rDNA 的定量标准曲线, 代表性定量标准曲线如图 4 所示。

[0186] 备注说明:

[0187] ① 质粒标准品拷贝数浓度的计算公式为: $C_e = C_m \times NA / [(L_{pMD18-T} + L_x) \times M_0]$, 式中 C_e 为质粒标准品拷贝数浓度, copies/μL; C_m 为质粒标准品质量浓度, ng/μL; $L_{pMD18-T}$ 为 pMD 18-T 质粒载体长度, 2692bp; L_x 为插入的目的基因长度, bp; M_0 为每对碱基的平均分子量, 660g/M; NA 为阿伏伽德罗常数, 6.02×10^{23} 。

[0188] ② 质粒标准品制备步骤包括: 以纯化的胞内外 DNA 为模板, 采用普通 PCR 扩增目的基因 (sul1、sul2、tetC、tetM、tetO、tetX 和 16S rDNA); 普通 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪下割取目的基因条带, 采用凝胶纯化试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit) 进行纯化; 将凝胶纯化的目的基因调节至合适浓度后, 连接至质粒载体 (pMD 18-T), 并将其转化入感受态细胞 (大肠杆菌 JM109)。挑取阳性克隆转化子后, 用质粒提取试剂盒抽 (MiniBEST Plasmid Purification Kit) 提质粒标准品, 并保存至 -20℃ 冰箱。

[0189] ③ 质粒标准品制备中, 普通 PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 30s, 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 7min。

[0190] ④ 质粒标准品制备中, 普通 PCR 反应体系体积采用 20uL, 具体组成为:

试剂	体积 (μL)
Ex Taq (5 U/μL)	0.1
10×Ex Taq Buffer (含 20 mM Mg ²⁺)	2
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	1.6
[0191] 正向引物 (10 μM)	0.4
反向引物 (10 μM)	0.4
DNA 模板 (1 ng/μL)	1
无菌无酶水	14.5
合计	20

[0192] (3) 对照耐药基因和16S rDNA的定量标准曲线,根据污泥胞内或胞外DNA中耐药基因和16S rDNA的扩增荧光阈值,获取模板污泥胞内或胞外DNA中耐药基因和16S rDNA的拷贝数浓度,并计算污泥胞内或胞外耐药基因的相对浓度(见图5和图6)。结果显示,实际污水厂中污泥胞外sul1、sul2、tetC、tetM、tetO和tetX的相对浓度均值分别为:0.087~3.156、0.351~2.955、0.016~0.130、 6.9×10^{-4} ~0.011、 3.3×10^{-4} ~0.011、0.005~0.092copies/copies 16S rDNA;污泥胞内sul1、sul2、tetC、tetM、tetO和tetX的相对浓度均值分别为:0.133~7.152、0.461~13.946、0.005~1.403、 4.2×10^{-4} ~1.405、0.001~0.448、0.007~4.771copies/copies 16S rDNA。

[0193] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

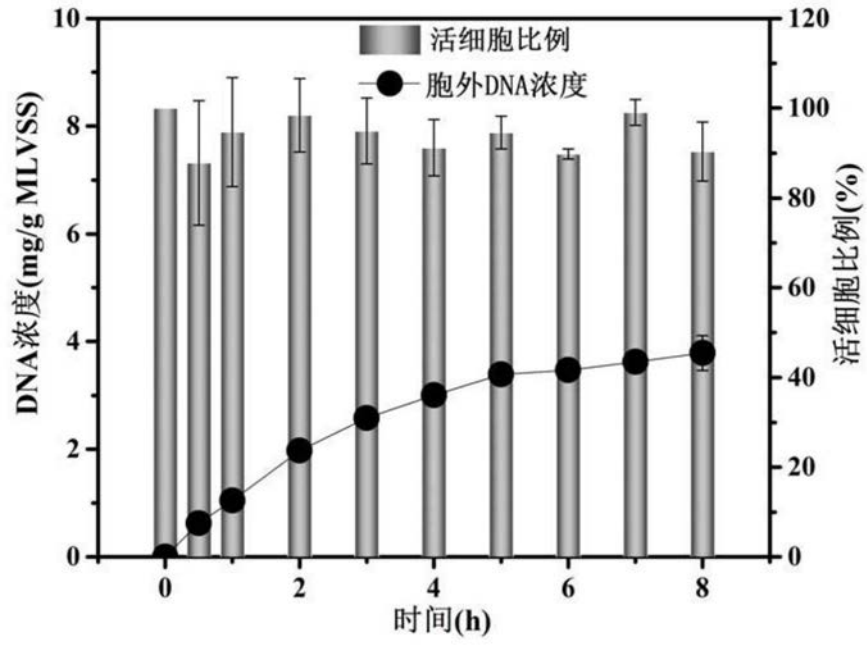


图1

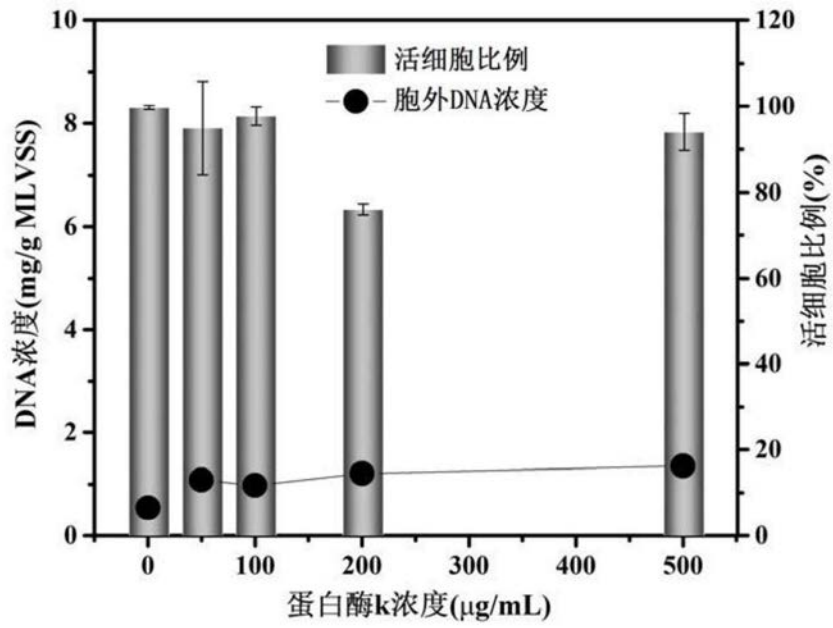


图2

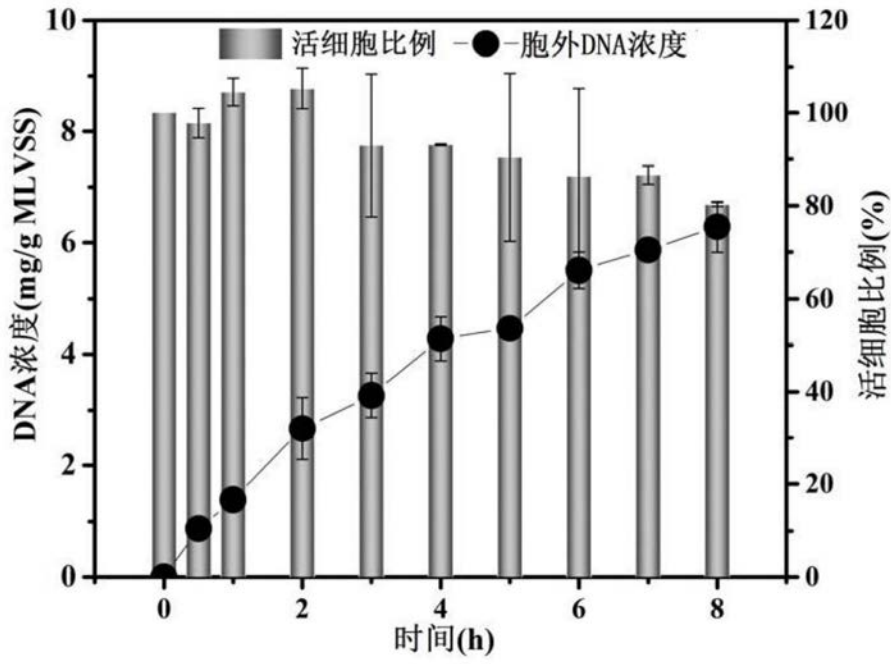


图3

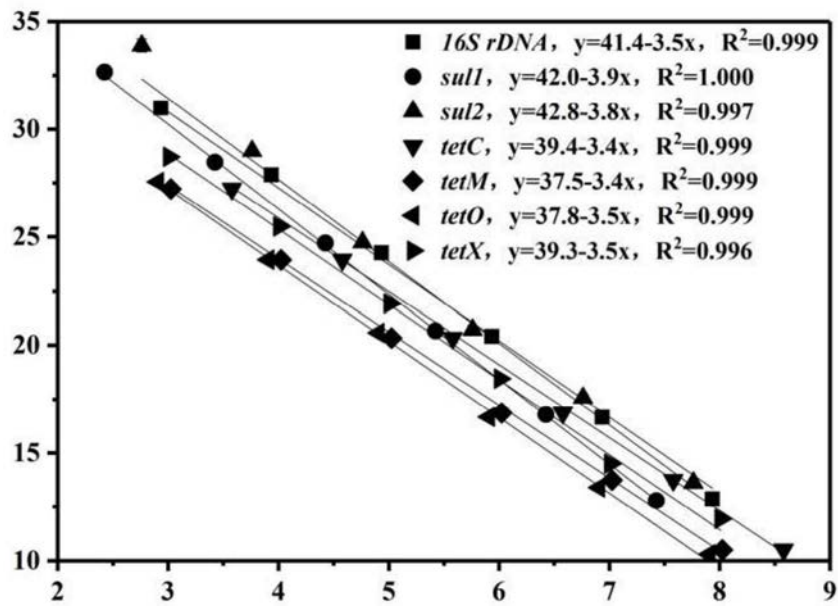


图4

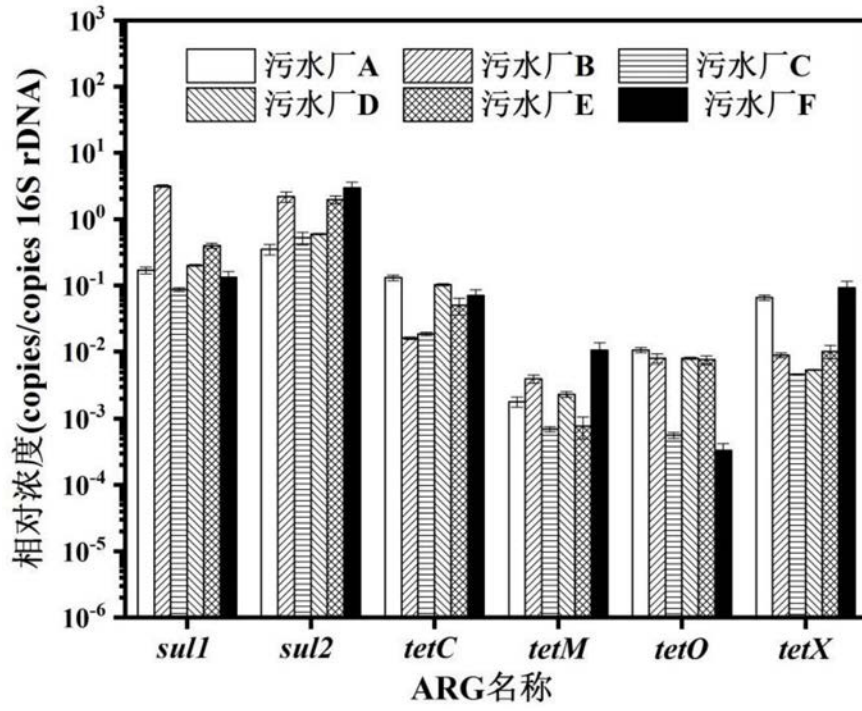


图5

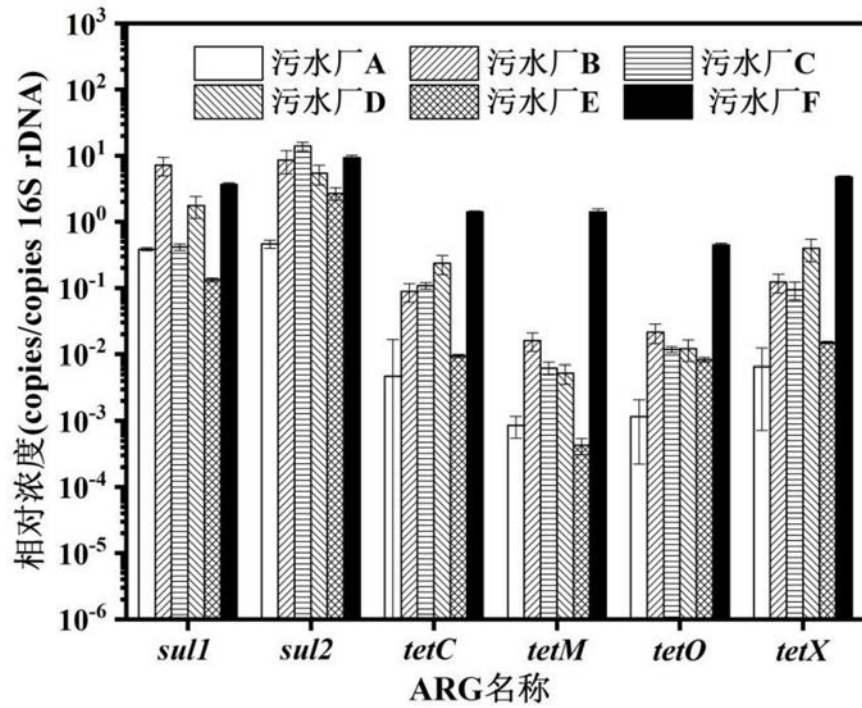


图6