

# 土壤和水体环境 T4 型细菌病毒 g23 基因多样性研究

## Genetic Diversity of the Major Capsid Genes (g23) of T4-type Bacteriophages in Soil and Water Environments

刘俊杰<sup>1</sup>, 荆瑞勇<sup>2</sup>, 王光华<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> 黑土区农业生态重点实验室, 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨, 黑龙江; <sup>2</sup> 生命科学技术学院, 黑龙江省八一农垦大学, 大庆, 黑龙江

\*通讯作者邮箱: [wanggh@iga.ac.cn](mailto:wanggh@iga.ac.cn)

**摘要:** 2005 年 Filée 等人首次报道了编码主要壳蛋白的 g23 基因可用于解析海洋水体 T4 型细菌病毒基因多样性。随后众多研究表明, 该基因还可以应用于其他环境中细菌病毒多样性和群落结构组成分析 (王光华等, 2020)。本文介绍了基于 g23 基因解析土壤和水体环境中 T4 型细菌病毒多样性的方法, 以期利用该基因及其他分子标记基因解析环境中细菌病毒多样性和群落结构组成提供参考。

**关键词:** 噬菌体, g23 基因, PCR 扩增, 克隆测序

### 材料与试剂

1. 无菌枪头 (100μl 和 1000μl)
2. 离心管 (2 ml, 15 ml)
3. *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞 (全式金生物科技有限公司)
4. DNA 模板
5. DNA 聚合酶 (TaKaRa, Dalian, China)
6. BSA (TaKaRa, Dalian, China)
7. dNTP (TaKaRa, Dalian, China)
8. 引物
9. 无菌水
10. Fast DNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒 (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA)
11. 琼脂糖
12. 核酸染料 (Gel Red)

- 31 13. 克隆质粒 (pMD18-T, TaKaRa, Dalian, China, catalog number: D101A)
- 32 14. DNase 和 RNase 酶 (全式金生物科技有限公司)
- 33 15. 蛋白酶 K (全式金生物科技有限公司)
- 34 16. CTAB/NaCl (见溶液配方)
- 35 17. Na<sub>2</sub>EDTA
- 36 18. 氯仿
- 37 19. 异戊醇
- 38 20. 苯酚
- 39 21. Acetate
- 40 22. Tris
- 41 23. Acrylamide
- 42 24. Bis-Acrylamide (N,N'-methylene-bis- Acrylamide)
- 43 25. SDS
- 44 26. Formamide
- 45 27. Urea
- 46 28. TE 缓冲液 (见溶液配方)
- 47 29. PCI (见溶液配方)
- 48 30. CIA (见溶液配方)
- 49 31. TE saturated phenol (见溶液配方)
- 50 32. 50× TAE (见溶液配方)
- 51 33. 10% SDS 缓冲液 (见溶液配方)
- 52 34. 40% (w/w) 丙烯酰胺 (见溶液配方)
- 53 35. DGGE 凝胶 (见溶液配方)

54

## 55 仪器设备

- 56 1. 高压灭菌锅(BKQ-B50 II)
- 57 2. 烘箱(AHS-562)
- 58 3. Eppendorf 移液器 (100μl 和 1000μl)
- 59 4. 0.45 μm、0.2 μm 和 0.02 μm 微孔滤膜 (Lablead)
- 60 5. DGW-80 微型离心机 (TGL-16G-A)

6. Fast Prep®-24 振荡器
7. 可见紫外分光光度计 (TECHOMP UV7500)
8. DYY-CC 型电泳仪
9. PCR 仪 (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystem)
10. 变形梯度凝胶电泳仪 (BIO-RAD)
11. 显影仪 (BIO-RAD)
12. Nanodrop 2000 (Thermo)
13. 超纯水制备仪 (Milli-Q Advantage)
14. 超净工作台 (DL-CJ-N)
15. 数显恒温水浴锅 (W-201B)
16. B-100 自动颗粒制冰机 (太华)

## 实验步骤

### 一、土壤 DNA 提取

采用土壤总 DNA 进行相关噬菌体标记基因研究, 总 DNA 提取使用 Fast DNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒 (~~Qiogene Inc., Carlsbad, CA, USA~~), 操作步骤如下:

1. 取 0.5 g 新鲜土壤于 (Lysing Matrix E tube) 配套的小管中, 加入 978  $\mu$ l Phosphate buffer, 再加入 122  $\mu$ l MT buffer, 在 Fast Prep®-24 振荡器 6.0, 震荡 45 s。
2. 14,000  $\times g$  离心 15 min 小心吸取上清液。
3. 上清液转移到无菌的 2.0 ml 离心管中, 加入 250  $\mu$ l PPS 缓冲液, 用手轻摇 10 次。
4. 14,000  $\times g$  离心 5 min, 将上清液转移到 2.0 ml 离心管中(15 ml 离心管可以增加 DNA 的提取效率), 加入 1 ml Binding Matrix 用手上下摇动 2 min 后室温静止 3 min。
5. 小心移去 500  $\mu$ l 上清液后将溶液混匀, 小心吸取 600  $\mu$ l 溶液到 SPIN Filter 中 14,000  $\times g$  离心 1 min, 将接替管中的残液倒掉。重复此操作步骤(2-3 次), 直至全部溶液完成离心步骤。
6. 向离心管中加入 500  $\mu$ l SEWS-M 并用冲力将沉淀物冲洗几遍, 14,000  $\times g$  离心 1 min, 将接替管(Catch tube)中的残液倒掉。

7. 14,000 × *g* 离心 2 min, 将原接替管(Catch tube)及其残液去除, 更换新的接替管 (Catch tube)后, 将 SPIN Filter 在室温条件静止 5 min 后加入 50 μl DES 保存于-20 °C 备用。

## 二、水体 DNA 提取

1. 取 300 ml 水样, 在 10,000 × *g*、4 °C 条件下离心 10 min, 以除去土壤颗粒、浮游生物等。
2. 上清液分别过 0.45 μm 和 0.2 μm 的微孔滤膜, 以去除病毒颗粒以外的微生物。病毒颗粒然后采用减压过滤的方式收集到 0.02 μm 的滤膜上。
3. 将滤膜放在灭菌的 2 ml 离心管中, 加入 700 μl 10mM Tris-HCl (pH, 7.5) 获得病毒浓缩液。
4. 向离心管中加入 DNase 和 RNase 酶溶液分别达到浓度 10 μg ml<sup>-1</sup> 后, 病毒浓缩液在 37 °C 水浴条件下培养 4~5 h, 以消解游离的寄主 DNA 和 RNA。采用细菌的通用引物对消解后的病毒浓缩液进行 PCR 检测, 验证游离的胞外遗传物质是否去除干净。
5. 再向离心管中分别加入 38 μl 的 10% SDS, 7.5 μl 的 1M Tris-HCl, 15 μl 的 0.5 M EDTA 和 2 μl 的蛋白酶 K (10 mg ml<sup>-1</sup>)。
6. 混匀后在 55 °C 条件下水浴 30 min, 然后再加入 140 μl 的 5 M NaCl 和 150 μl 的 CTAB/NaCl 溶液, 再在 65 °C 水浴 10 min。
7. 病毒 DNA 采用 PCI 溶液和 CIA 溶液萃取, 萃取的水相加入体积 0.6 倍的 Isopropanol 溶液 1,8000 × *g*、4 °C 条件下离心 20 min, DNA 沉淀经 70%乙醇洗净后, 干燥、溶于 TE buffer 中。

## 三、PCR 引物

上述提取的土壤或水体 DNA, 用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 对 DNA 质量进行检测, 合格的 DNA 采用简并引物 MZIA1bis (5'-GAT ATT TGI GGI GTT CAG CCI ATG A-3')和 MZIA6 (5'-CGC GGT TGA TTT CCA GCA TGA TTT C-3') (Filée 等, 2005) 扩增 *g23* 基因片段。

#### 四、PCR 扩增体系及步骤

PCR 反应体系按照 50  $\mu$ l 为例:

Ex-Taq Buffer	5 $\mu$ l
dNTP (2.5 mM)	5 $\mu$ l
Primer F (10 mM)	2 $\mu$ l
Primer R (10 mM)	2 $\mu$ l
模板 DNA (100 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Ex-Taq polymerase (TaKaRa) DNA 聚合酶	1 $\mu$ l
无菌水	33 $\mu$ l

PCR 反应程序 (35 循环):

Step 1: 94 $^{\circ}$ C	5 min	预变性
Step 2: 94 $^{\circ}$ C	1 min	变性
Step 3: 55 $^{\circ}$ C	1 min	退火
Step 4: 72 $^{\circ}$ C	1 min	延伸
Step 5: go to Steps 2~4	35 个循环	循环扩增
Step 6: 72 $^{\circ}$ C	10 min	充分延伸

#### 五、PCR 产物纯化

利用 1.5%琼脂糖凝胶进行 PCR 产物电泳检测, 参照 DNA Marker 条带的分子量大小, 初步判断扩增条带是否是 *g23* 基因片段。根据笔者经验, 不同环境样本中 *g23* 基因片段大小在 350~600 bp 之间。将目的片段位置合格的样本, 用无菌手术刀切取目的条带, 参照胶回收试剂盒的操作说明进行基因片段的纯化, 用 NanoDrop 2000 测定产物浓度后, 进行下游实验。

#### 六、克隆、变形梯度凝胶电泳 (DGGE)及测序

将纯化后的产物连接到质粒 pMD18-T (TaKaRa, Dalian, China)上, 导入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 将阳性克隆 PCR 扩增后, 通过 DGGE 筛选单一条带的方法, 去掉重复序列, 将单一的克隆产物进行 Sanger 测序分析。

## 1. PCR产物克隆

### 1.1 克隆反应体系 (以pMD18-T载体为例):

pMD18-T Vector (TaKaRa)	1 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
超纯水	3 $\mu$ l
Solution I	5 $\mu$ l
终体积	10 $\mu$ l

### 1.2 16 °C恒温反应30 min。

### 1.3 取100 $\mu$ l大肠杆菌感受态加入到步骤1.1中的反应体系，冰浴30 min。

### 1.4 42 °C水浴45 s，再冰浴1 min。

### 1.5 加入890 $\mu$ l的SOC溶液，37 °C摇床培养1 h。

### 1.6 转入到含抗生素 (IPTG、AMP、X-Gal) 的LB平板上，37 °C培养14~16 h。

### 1.7 挑取白斑进行PCR检测。

## 2. DGGE筛选单一条带后测序

将挑选的阳性克隆样品作为模板，用引物MZIA1bis-MZIA6进行PCR扩增，扩增条件同步骤四，扩增循环数降到25个。筛选扩增成功的PCR产物进行DGGE分析 (变性剂浓度为20%~80%)，电泳条件为150 V、60 °C、泳动15 h。电泳结束后，筛选DGGE图谱中不同条带位置所对应的阳性克隆，摇菌扩繁后进行Sanger测序 (Liu 等, 2011)。

## 注意事项

- 本研究是以 T4 型细菌病毒 g23 为例，介绍了环境噬菌体多样性的研究方法。读者根据实验目的，采用相同的研究方法，可对环境噬菌体的其他标记基因作为研究对象，如噬菌体的 *psbA*、*psbD* (Zeidner 等, 2003)及蓝藻噬菌体的 *g20* (Jameson 等, 2011), *DNA pol* (Breitbart 等, 2004)和 *phoH* (Goldsmith 等, 2015) 等基因。其他标记基因的 PCR 反应体系及扩增条件请参照上述文献报道。
- 关于 PCR 反应。由于 T4 型细菌病毒 DNA 只占提取土壤微生物总 DNA 的很小一部分，所以土壤总 DNA 纯度高低直接影响 PCR 效果。对于没有无法获得 PCR 产物的样品 DNA，可通过 DNA 纯化或调整模板用量的方法予以解决 (王光华等,

2011)。此外，为减低土壤腐殖酸等干扰物对 PCR 扩增的干扰，每 50  $\mu$ l 体系可添加 0.5 $\mu$ l BSA 来提高 PCR 扩增效率。

3. 关于 PCR 产物。引物 MZIA1Bis 和 MZIA6 是简并引物，专一性不强。环境中 g23 基因被扩增出来的同时，一些非 g23 基因的其它 DNA 片段也可能被扩增出来。剔除这些非 g23 基因的方法，可采用看是否可以翻译成氨基酸序列，以及氨基酸序列通过 GenBank 上的 BLASTp 比对看是否是 T4 型细菌病毒 g23 家族的基因来解决。
4. 关于扩增的 g23 基因片段大小。g23 是编码 T4 型细菌病毒头部主要壳蛋白的结构基因，细菌病毒不同，则 g23 基因长度也有差异，g23 基因编码氨基酸长度与病毒颗粒头部大小有一定的关系。目前的研究结果表明，引物 MZIA1Bis 和 MZIA6 扩增的 g23 基因片段长度相差很大，编码的氨基酸 (未含引物部分) 最长的可达到 198 个，最短的为 103 个，但绝大部分集中在 120~150 个氨基酸之间。根据笔者的经验，PCR 产物小于 300 bp 和大于 700 bp 的扩增产物均不是 g23 基因，可以在后续研究中不予考虑。
5. 研究中涉及含水量较大，如湿地和稻田环境土壤，提取 DNA 前需要对新鲜土壤样本进行冷冻干燥，降低其含水量。此外，为增加水体 DNA 的提取效率，可将 300 ml 水体过滤样本增加到 500~1,000 ml。

## 溶液配方

### 1. TE缓冲液

1 M (pH = 8.0)	1 ml
0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA	0.2 ml
终体积	100 ml

### 2. PCI

TE saturated phenol (TE饱和酚溶液)	100 ml
氯仿 (Chloroform)	96 ml
异戊醇 (Isoamylalcohol)	4 ml
TE buffer	100 ml
4 °C保存	

### 3. CIA

氯仿 (Chloroform)	96 ml
-----------------	-------

- 191 异戊醇 (Isoamylalcohol) 4 ml
- 192 室温保存
- 193 4. TE saturated phenol
- 194 称500 g苯酚溶在水中，60 °C水浴，称1 g 8-quinolinol分装2个烧瓶，各加200 ml
- 195 1 mol/L Trish (pH = 0.8)，混匀，去掉上层，各加200 ml TE buffer，4 °C保存。
- 196 5. 50× TAE
- 197 Tris 242 g
- 198 Acetate 57.1 g
- 199 Na<sub>2</sub>EDTA 7.43 g
- 200 终体积 1,000 ml
- 201 6. 40% (w/w)丙烯酰胺 (Acrylamide)
- 202 Acrylamide 38.93 g
- 203 Bis-Acrylamide (N,N'-methylene-bis- Acrylamide) 1.07 g
- 204 终体积 100 ml
- 205 4 °C 保存
- 206 7. 10% SDS
- 207 SDS 10 g
- 208 超纯水 90 ml
- 209 终体积 100 ml
- 210 pH 7.2
- 211 室温保存
- 212 8. CTAB/NaCl
- 213 CTAB 10 g
- 214 NaCl 4.1 g
- 215 超纯水 80 ml
- 216 终体积 100 ml
- 217
- 218 9. DGGE凝胶配方
- 219

---

变性梯度

---



	A: 20%	B: 80%
	Denaturing solution	Denaturing solution
40% Acrylamide/Bis	3.2 ml	3.2 ml
50× TAE	0.32 ml	0.32 ml
Formamide	1.28 ml	5.12 ml
Urea	1.35 g	5.4 g
MilliQW	定容到 16 ml	定容到 16 ml

## 参考文献

1. 王光华, 刘俊杰, Makoto Kimura. (2011). [自然环境中 T4 型噬菌体 g23 基因多样性研究进展](#). *微生物学报* 51(6) : 732-739.
2. 王光华, 刘俊杰, 朱冬, 叶茂, 朱永官. (2020). [土壤病毒的研究进展与挑战](#). *土壤学报*
3. Breitbart, M., Miyake, J. H. and Rohwer, F. (2004). [Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences](#). *FEMS Microbiol Lett* 236(2): 249-256.
4. Filée, J., Tétart, F., Suttle, C. A. and Krisch, H. M. (2005). [Marine T4 type bacteriophages a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere](#). *Proc Natl Acad Sci USA* 102(35): 12471-12476.
5. Goldsmith, D. B., Parsons, R. J. and Beyene, D. (2015). [Deep sequencing of the viral \*phoH\* gene reveals temporal variation, depth-specific composition, and persistent dominance of the same viral \*phoH\* genes in the Sargasso Sea](#). *Peer J* 3: e997.
6. Jameson, E., Mann, N. H., Joint, I., Sambles, C. and Muehling, M. (2011). [The diversity of cyanomyovirus populations along a North-South Atlantic Ocean transect](#). *Isme J* 5(11): 1713-1721.
7. Liu, J. J., Wang, G. H., Zheng, C. Y., Yuan, X. H., Jian, Jin. and Liu, X. B. (2011). [Specific assemblages of major capsid genes \(\*g23\*\) of T4-type bacteriophages isolated from upland black soils in Northeast China](#). *Soil Biol Biochem* 43(9): 1980-1984.
8. Zeidner, G., Bielawski, J. P., Shmoish, M., Scanlan, D. J., Sabehi, G. and Beja, O. (2005). [Potential photosynthesis gene recombination between \*Prochlorococcus\* and \*Synechococcus\* via viral intermediates](#). *Environ Microbiol* 7(10): 1505-1513.