**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1，荆瑞勇2，王光华1, \*

1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；2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，以期为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)
13. 克隆质粒 (pMD18-T，TaKaRa，Dalian，China，catalog number: D101A)
14. DNase和RNase酶 (全式金生物科技有限公司)
15. 蛋白酶K (全式金生物科技有限公司)
16. CTAB/NaCl (见溶液配方)
17. Na2EDTA
18. 氯仿
19. 异戊醇
20. 苯酚
21. Acetate
22. Tris
23. Acrylamide
24. Bis-Acrylamide (N,N’-methylene-bis- Acrylamide)
25. SDS
26. Formamide
27. Urea
28. TE缓冲液 (见溶液配方)
29. PCI (见溶液配方)
30. CIA (见溶液配方)
31. TE saturated phenol (见溶液配方)
32. 50× TAE (见溶液配方)
33. 10% SDS缓冲液 (见溶液配方)
34. 40% (w/w) 丙烯酰胺 (见溶液配方)
35. DGGE凝胶 (见溶液配方)

**仪器设备**

1. 高压灭菌锅(BKQ-B50Ⅱ)
2. 烘箱(AHS-562)
3. Eppendorf移液器 (100μl和1000μl)
4. 0.45 μm、0.2 μm和0.02 μm微孔滤膜 (Lablead)
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 ~~(Qbiogene 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 μl Phosphate buffer，再加入122 μl MT buffer，在Fast Prep®-24振荡器6.0, 震荡45 s。
2. 14,000 *× 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 μl PPS缓冲液，用手轻摇10次。
4. 14,000 *× 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 μl上清液后将溶液混匀，小心吸取600 μl溶液到SPIN Filter中14,000 *× 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 μl SEWS-M 并用冲力将沉淀物冲洗几遍，14,000 *× 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-1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-1)。
  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 μl为例：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ex-Taq Buffer | 5 μl | |
| dNTP (2.5 mM) | 5 μl | |
| Primer F (10 mM) | 2 μl | |
| Primer R (10 mM) | 2 μl | |
| 模板DNA (100 ng/μl) | 2 μl | |
| Ex-Taq polymerse (TaKaRa) DNA聚合酶 | 1 μl | |
| 无菌水 | 33 μl | |
| PCR反应程序 (35循环)： |  | |
| Step 1: 94 °C | 5 min | 预变性 |
| Step 2: 94 °C | 1 min | 变性 |
| Step 3: 55 °C | 1 min | 退火 |
| Step 4: 72 °C | 1 min | 延伸 |
| Step 5: go to Steps 2~4 | 35个循环 | 循环扩增 |
| Step 6: 72 °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* DH5α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
2. 克隆反应体系 (以pMD18-T载体为例)：

pMD18-T Vector (TaKaRa) 1 μl

DNA 1 μl

超纯水 3 μl

Solution I 5 μl

终体积 10 μl

* 1. 16 °C恒温反应30 min。
  2. 取100 μl大肠杆菌感受态加入到步骤1.1中的反应体系，冰浴30 min。
  3. 42 °C水浴45 s，再冰浴1 min。
  4. 加入890 μl的SOC溶液，37 °C摇床培养1 h。
  5. 转入到含抗生素 (IPTG、AMP、X-Gal) 的LB平板上，37 °C培养14~16 h。
  6. 挑取白斑进行PCR检测。

1. 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**

* 1. 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。
  2. 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 μl体系可添加0.5μl 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 Na2EDTA 0.2 ml

终体积 100 ml

1. 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

1. CIA

氯仿 (Chloroform) 96 ml

异戊醇 (Isoamylalcohol) 4 ml

室温保存

1. TE saturated phenol

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 1 mol/L Trish (pH = 0.8)，混匀，去掉上层，各加200 ml TE buffer，4 °C保存。

1. 50× TAE

Tris 242 g

Acetate 57.1 g

Na2EDTA 7.43 g

终体积1,000 ml

1. 40% (w/w)丙烯酰胺 (Acrylamide)

Acrylamide 38.93 g

Bis-Acrylamide (N,N’-methylene-bis- Acrylamide) 1.07 g

终体积 100 ml

4 °C保存

1. 10% SDS

SDS 10 g

超纯水 90 ml

终体积 100 ml

pH 7.2

室温保存

1. CTAB/NaCl

CTAB 10 g

NaCl 4.1 g

超纯水 80 ml

终体积 100 ml

1. DGGE凝胶~~配方~~

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 变性梯度 | |
| A：20%  Denaturing solution | B：80%  Denaturing solution |
| 40% Acrylamide/Bis  50× TAE  Formamide  Urea  MilliQW | 3.2 ml  0.32 ml  1.28 ml  1.35 g  定容到16 ml | 3.2 ml  0.32 ml  5.12 ml  5.4 g  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.](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=wsxb201106006&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ) *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.](http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1119.P.20200605.1035.002.html) *土壤学报*
3. Breitbart, M., Miyake, J. H. and Rohwer, F. (2004). [Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15251204/)*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.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16116082/) *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.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476143/) *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.](https://www.nature.com/articles/ismej201154) *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.](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071711001982) *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.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16156724/) *Environ Microbiol* 7(10): 1505-1513.