

环境样本中原核生物的总量测定—16SrRNA 基因荧光定量 PCR (SYBR Green 染料法)

Determination of Total Prokaryotes in Environmental Samples- Quantitative Real-time PCR of 16SrRNA Gene (SYBR Green)

何晴^{1,2,#}, 王尚¹, 邓晔^{1,2,*}

¹ 中国科学院环境生物技术重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085;

² 中国科学院大学资源与环境学院, 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者邮箱: yedeng@rcees.ac.cn

摘要: 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR) 是目前主流的原核微生物绝对定量方法^[1,2]。该技术得到结果与其他生物量测定方法 (如 ATP、流式细胞及 PLFA) 得到的结果一致性较好^[2]。另外, 最新研究表明 qPCR 在研究单个微生物绝对丰度方面表现出绝对优势, 即通过 qPCR (细菌或古菌总量) 与高通量扩增子测序 (各类微生物的相对丰度) 的结合, 可以获得某一类群的绝对丰度, 这避免了针对单个微生物类群设计特异性探针的麻烦^[3]。对于相对丰度大于 10% 的微生物来说, 这种方法获得的绝对丰度可以代替靶向 qPCR 的检测结果。该技术通过 PCR 扩增过程中荧光化学信号的累积对 PCR 反应产物进行实时监测, 利用公式换算实现对单位体积 (或质量) 环境样本中原核生物总量的定量分析。该技术主要分为 SYBR Green 染料法和 Taqman 探针法, 本文主要介绍 SYBR Green 染料法实验流程及其应用。

关键词: 实时荧光定量 PCR, 16SrRNA, SYBR Green 染料法

材料与试剂

1. 16SrRNA 引物: 以 515F-806R 为例

515F: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA

806R: GGACTACNVGGGTWTCTAAT

2. DNA 模板

3. 含有目标片段的标准品 (一般情况下是含有目标片段的克隆质粒)

4. 各种型号的枪头

5. PCR 八连管

6. SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 (SYBR Green) 试剂盒 (TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD, FP205)

试剂盒中包含：

6.1 2xSuperReal PreMix Plus (SYBR Green)

SuperReal PreMix Plus 采用了独特的双组分热启动 DNA 聚合酶 (化学修饰的 HotStar Taq DNA 聚合酶和抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶)，从而构成酶活自动调节系统，配合精心优化 buffer 体系，具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。

该产品 Buffer 体系平衡了 K^+ 和 NH_4^+ 的比例，还特别添加了独创的 H-Bond 因子，能协同调整反应体系中的氢键能力，使引物模板退火条件更加严谨，反应的专一性增强，重复性更好。

SuperReal PreMix Plus 中预混有 SYBR Green I，PCR 反应液配制时，只需加入模板，引物，灭菌蒸馏水便可进行 Real Time PCR 反应。

6.2 50xROX Reference Dye

该产品附带 ROX Reference Dye，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，针对不同型号的荧光定量 PCR 仪时选择对应浓度使用。

6.3 RNase-Free ddH₂O

仪器设备

1. Bio-Rad CFX96™ Real-Time System

2. PCR 管离心机

3. 2ml 离心管离心机

软件和数据库

需安装软件：

Bio-Rad CFX96™ Real-Time System 的所有配套软件

实验步骤

1. 建立 Real-Time PCR 反应体系

1.1 溶解 2xSuperReal PreMix Plus 和 50xROX Reference Dye，模板，引物和 RNase-Free ddH₂O，并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。

注：2xSuperReal PreMix Plus 中含有荧光染料 SYBR Green I，保存该产品或配置 PCR 反应液时应避免强光照射；如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。

1.2 建议置于冰上进行反应体系的配置

常用反应体系配置如下表 1：

表 1. 常用反应体系配置

组成成分	50 μ l 体系	25 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2x SuperReal PreMix Plus	25 μ l	12.5 μ l	10 μ l	1x
正向引物 (10 μ M)	1.5 μ l	0.75 μ l	0.6 μ l	0.3 μ M
反向引物 (10 μ M)	1.5 μ l	0.75 μ l	0.6 μ l	0.3 μ M
cDNA 模板	-	-	-	-
50xROX Reference Dye	-	-	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	至 50 μ l	至 25 μ l	至 20 μ l	-

注：引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。20 μ l 反应体系中，基因组 DNA 或 cDNA 模板的使用量一般小于 100 ng。不同仪器的最适 ROX Reference Dye 浓度请参考试剂盒说明书。引物终浓度在 0.3 μ M 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果，扩增效率不高时，可增加 PCR 反应体系中的引物浓度；发生非特异性扩增时，可适当减少 PCR 反应体系中的引物浓度，需要进一步优化引物浓度的，可在 0.2-0.5 μ M 范围内调整。

2. 进行 Real time PCR 反应

两步法反应程序如下表 2：

表 2. 两步法 qPCR 程序设置

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1x	95 ℃	15 min	预变性	否
PCR 反应	40x	95 ℃	10 s	变性	否
		60-66 ℃	20-32 s	退火/延伸	是
溶解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

三步法反应程序如下表 3:

表 3. 三步法 qPCR 程序设置

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1x	95 °C	15 min	预变性	否
PCR 反应	40x	95 °C	10 s	变性	否
		50-60 °C	20 s	退火	否
		72 °C	20-32 s	延伸	是
溶解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

注: 建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应。当出现模板浓度过低引起非特异性扩增, 引物 T_m 值较低导致的扩增效率低下或扩增曲线重现性不佳等现象时, 建议尝试进三步法 PCR 扩增反应。PCR 反应的预变性条件必须设定为 95 °C 15 min, 用以充分激活热启动酶。

3. 盖上反应管, 轻柔混匀。可短暂离心, 确保所有组分均在管底。

4. 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中, 开始反应。

5. 用上述体系及反应条件构建标准曲线

制备含有 16SrRNA 基因目标片段的质粒并测定其浓度。根据如下公式计算质粒的基因拷贝数:

$$\text{copies/ul} = \frac{(6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng/ul} \times 10^{-9})}{(\text{DNA length} \times 660)}$$

对质粒进行 10 倍稀释, 将其稀释至少 5 个梯度。每个梯度的质粒做 3 个重复, 最终 R^2 高于 0.99, E 值在 90%-110% 的标准曲线即为合格。

6. 对环境样本中原核生物的总量进行测定

将合格标准曲线的质粒，环境样本和空白对照同时运用上述反应体系及反应条件来测定环境样本中原核生物的总量。环境样本也需做 3 个重复。

结果与分析

1. 标准曲线的结果如下图 1：

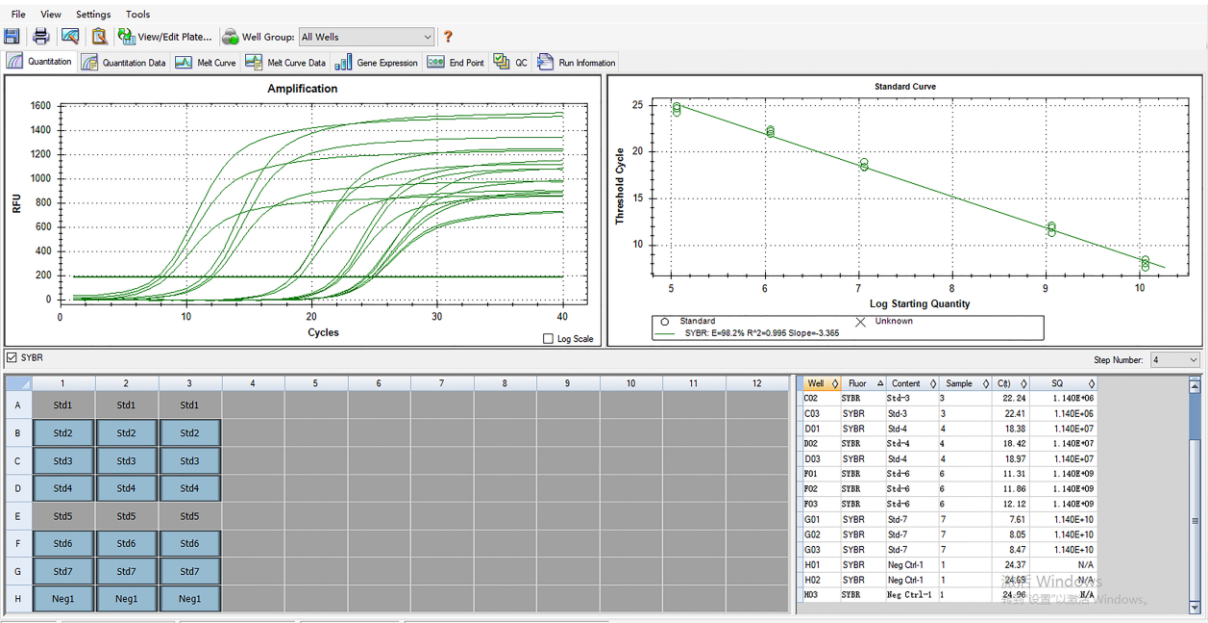


图 1. 标准曲线

2. 环境样本中原核生物的总量测定

2.1 单位体积液体环境样本中原核生物的总量：

$$y = \frac{x \times v_1}{v_2}$$

y: 单位体积液体环境样本中原核生物的总量 (copies/mL)

x: 单位体积提取的 DNA 中原核生物基因拷贝数 (copies/μL)

v₁: 从环境样本中提取的 DNA 体积 (μL)

v₂: 提取 v₁ 体积 DNA 所需过滤的液体环境样本体积 (mL)

示例：每毫升热泉水中原核生物的总量：

使用 Mobio 试剂盒对过滤不同体积 (mL) 热泉水样的 0.22 μm 滤膜进行 DNA 提取，最终获得 100 μL DNA。吸取 1 μL DNA 配置 qPCR 反应体系，直接得到 1 μL DNA 中原核生物的基因拷贝数 (3 个平行样本的平均值)，再通过上述公

式换算，最终得到每毫升热泉水中原核生物的总量，结果如下图 2。

	A	B	C
1	Sample	1μLDNA中原核生物的基因拷贝数	1mL热泉水中原核生物的基因拷贝数
2	F_DGG1	4.411633E+07	3.836203E+07
3	F_DGGB	6.601480E+07	3.883224E+07
4	F_GMQP	6.032333E+06	2.010778E+06
5	F_GMQS	3.072978E+06	2.672155E+05
6	F_GXS	1.779307E+08	1.423446E+07
7	F_HMZ	2.851793E+07	2.193687E+07
8	F_HTJL	6.538650E+05	6.538650E+04
9	F_HTJR	1.664267E+07	8.321333E+06
10	F_JMQL	8.995500E+04	5.622188E+03
11	F_JMQR	4.187401E+05	9.305336E+04
12	F_JZL	1.551085E+08	3.102169E+07
13	F_SRBZ	1.851169E+08	4.113708E+07
14	F_WGT	2.729129E+06	3.898756E+05

图 2. qPCR 得到的热泉水样中的生物量

2.2 单位质量固体环境样本中原核生物的总量：

$$y = \frac{x \times v}{m}$$

y : 单位质量固体环境样本中原核生物的总量 (copies/g)

x : 单位体积提取的 DNA 中原核生物基因拷贝数 (copies/μL)

v : 从环境样本中提取的 DNA 体积 (μL)

m : 提取 v 体积 DNA 所需的固体环境样本质量 (g)

示例：每克热泉沉积物中原核生物的总量：

使用 Mobio 试剂盒对 0.3 g 热泉沉积物进行 DNA 提取，最终获得 100 μL DNA。

吸取 1 μL DNA 配置 qPCR 反应体系，直接得到 1 μL DNA 中原核生物的基因拷贝数 (3 个平行样本的平均值)，再通过上述公式换算，最终得到每克热泉沉积物中原核生物的总量，结果如下图 3。

	A	B	C
1	Sample	1μLDNA中原核生物的基因拷贝数	1g热泉沉积物中原核生物的基因拷贝数
2	S_DGG1	8.771600E+06	2.923867E+08
3	S_DGGB	1.805533E+08	6.018443E+09
4	S_GMQP	1.587057E+06	5.290189E+07
5	S_GMQS	2.360100E+05	7.867000E+06
6	S_GXS	6.194800E+06	2.064933E+08
7	S_HMZ	8.418757E+08	2.806252E+10
8	S_JMQR	5.351050E+05	1.783683E+07
9	S_JMQZ	2.443667E+05	8.145556E+06
10	S_JZL	1.636033E+05	5.453444E+06
11	S_SRBZ	1.449768E+07	4.832559E+08
12	S_WGT	1.396017E+07	4.653389E+08
13	S_ZZQL	1.269033E+06	4.230111E+07
14	S_ZZQR	2.786097E+04	9.286989E+05

图 3. qPCR 得到热泉沉积物中的生物量

热泉每毫升水中原核生物的总量和每克沉积物中原核生物的总量对比，结果如下图

4:

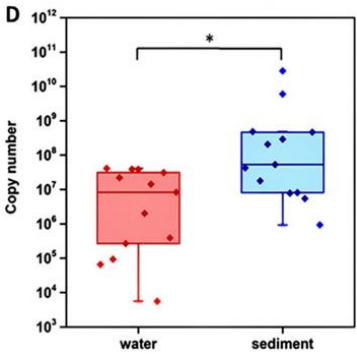


图 4. 热泉水和沉积物中生物量的对比

失败经验

荧光定量 PCR 实验中常见的问题及解决方法

1. 无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体，可能原因及相应解决方法如下表 4:

表 4. 样品扩增存在问题的解决方法

原因	解决方法
DNA 模板中存在抑制剂	重新纯化模板或降低模板使用量
Mg ²⁺ 浓度不合适	使用 2xSuperReal PreMix Plus 时，PCR 反应体系中 Mg ²⁺ 的终浓度为 2mM。对有些扩

	增体系，可以将 Mg^{2+} 终浓度提高到 5 mM。进行 Mg^{2+} 终浓度优化时，建议每次增加 0.5 mM Mg^{2+} 浓度进行实验。
加样错误或试剂问题	检查试剂浓度和保存条件，包括所使用的引物和模板。重复进行实验。
热启动酶未能激活	使用试剂时，请确保预变性条件为 95 °C 15 min，用以有效激活热启动 DNA 聚合酶。
PCR 条件、引物序列或浓度不当	请确认引物未发生降解，引物浓度及 PCR 条件，扩增不好时，通常先尝试降低退火温度，延长退火时间和提高引物浓度，有时也可以提高退火温度，增加延伸时间，降低升温速度。对于 GC 含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。
起始模板问题	检查起始模板的浓度，保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释，并用新稀释模板进行实验。增加起始模板使用量。

2. NTC 出现较高的荧光值的可能原因和解决方法如下表 5

表 5. 空白对照存在问题的解决方法

原因	解决方法
试剂污染	使用新试剂进行实验
PCR 反应液配制时发生污染	采取必要的防污染策略

3. 出现引物二聚体和（或）非特异性扩增的可能原因和解决方法如下表 6:

表 6. 非特异性扩增问题的解决方法

原因	解决方法
Mg^{2+} 浓度不合适	使用 2xSuperReal PreMix Plus 时，PCR 反应体系中 Mg^{2+} 的终浓度为 2 mM。对有些扩增体系，可以将 Mg^{2+} 终浓度提高到 5 mM。进行 Mg^{2+} 终浓度优化时，建议每次增加 0.5 mM Mg^{2+} 浓度进行实验。

PCR 退火温度太低	建议每次增加 2 °C 进行退火温度优化
引物设计不合适	考虑重新设计引物序列
PCR 产物太长	荧光定量 PCR 产物长度最好
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降

4. 定量值重现性差的可能原因和解决方法如下表 7:

表 7. 同一样品重现性不好的解决方法

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差
稀释的模板放置太久	通过梯度稀释的模板最好现配现用
引物质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原本质量好的引物做为对照
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的 PCR 较容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或 PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的 GC 含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。

参考文献

- Wei, Z. Y., Liu, Y. Y., Feng, K., Li, S. Z., Wang, S., Jin, D. C., Zhang, Y., Chen, H. R., Yin, H. Q. and Xu, M. Y. (2018). [The divergence between fungal and bacterial communities in seasonal and spatial variations of wastewater treatment plants.](#) *Sci Total Environ* 628-629:969-978.
- Zhang, Z. J., Qu, Y. Y., Li, S. Z., Feng, K., Wang, S., Cai, W. W., Liang, Y. T., Li, H.; Xu, M. Y. and Yin, H.Q. (2017) [Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa.](#) *Sci Rep* 7:4837.

- 170 3. Tettamanti Boshier, F. A., Srinivasan, S., Lopez, A., Hoffman, N. G., Proll, S., Fredricks, D. N.,
171 Schiffer, J. T. and Caporaso, J. G. (2020). [Complementing 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing](#)
172 [with Total Bacterial Load To Infer Absolute Species Concentrations in the Vaginal Microbiome.](#)
173 *mSystems* 5:2.