

以非放射性核酸探針定量環境中的脫氮菌

第一部分 核酸探針的篩選

吳秋暉¹ 梁志欽²

¹ 中州科技大學餐飲廚藝系

² 大葉大學生物資源學系

摘要

本研究之目的在篩選分別能與具有 cytochrome *c,d1* 型或 Cu 型亞硝酸還原酵素的脫氮菌雜交的核酸探針。該核酸探針是以基因序列 (5'→3') 分別為 GTC AAG GTG GAA CTG GTC AA 與 CCT GTT GGC TTG CGA ATG AA 作為聚合酵素連鎖反應中的引子,14 株具有 Cu 型亞硝酸還原酵素的脫氮菌之 DNA 做為模板,進行聚合酵素連鎖反應後,純化聚合酵素連鎖反應產物做為核酸探針,分別與實驗菌株進行雜交試驗。雜交結果顯示,以 *Alcaligenes eutrophus* BCRC 13036 之 DNA 為模板, Mg^{2+} 濃度為 1.2 mM, 鍊合溫度為 42.5°C, 複製出約 781 bp 的 Cu 型亞硝酸還原酵素的基因片段,作為核酸探針,可與具有 cytochrome *c,d1* 型或 Cu 型亞硝酸還原酵素的多種不同屬之脫氮菌雜交。

關鍵字：脫氮菌、亞硝酸還原酵素、核酸探針

壹、前言

脫氮作用是微生物在無氧狀態,將硝酸態氮代替氧接受電子,還原成氣體形式的氮(一氧化氮、一氧化二氮、氮氣)之一連串氧化還原反應的過程[1,2]。這些還原反應,分別由異化性硝酸還原酵素(dissimilatory nitrate reductase, dNar)、亞硝酸還原酵素(nitrite reductase, dNir)、一氧化氮還原酵素(nitric oxide reductase, dNor)、一氧化二氮還原酵素(nitrous oxide reductase, dNos)進行。其中異化性亞硝酸還原酵素的作用是脫氮作用的控制步驟 [3]。

通訊作者

姓名：吳秋暉

E-mail：cywu4212@dragom.ccut.edu.tw

以核酸探針偵測微生物最好尋找特定關鍵酵素作為定量指標。亞硝酸還原酵素 (nitrite reductase) 是脫氮作用反應的關鍵酵素 (key enzyme)，1992年Smith等[4]是以位在 *Pseudomonas stutzeri* JM300 的亞硝酸還原酵素C端的1.2 kb基因片段作為核酸探針；1993年Ye等[5]將 *Pseudomonas* sp. strain G-179的DNA，以限制酵素EcoR I與BamH I處理，得到1.9 kb基因片段作為核酸探針。本研究則是將脫氮菌株如含有cytochrome *c*,*d1*型亞硝酸還原酵素的有 *Pseudomonas stutzeri* JM300 [4]、*Pseudomonas aeruginosa* [6]、*Pseudomonas stutzeri* ZoBell [7]，另外含有Cu型亞硝酸還原酵素有 *Achromobacter cycloclasters* [8]、*Pseudomonas* sp. strain G-179 [5]，其亞硝酸還原酵素胺基酸序列分別進行比對，將相似性較高的胺基酸序列的區域，首尾胺基酸序列反轉譯為基因序列，作為聚合酵素連鎖反應中的引子 (primer)，以脫氮菌DNA作為模版 (template)，複製出亞硝酸還原酵素的基因片段，以這些基因片段作為核酸探針，分別與具有 cytochrome *c*,*d1*型或Cu型亞硝酸還原酵素的脫氮菌雜交，篩選出分別能與具有 cytochrome *c*,*d1*型或Cu型亞硝酸還原酵素的脫氮菌雜交的的核酸探針。

貳、材料與方法

(一) 材料

1. 菌種來源

本研究使用的菌株共有 35 株，其中 24 株菌株名稱如下，*Achromobacter cycloclastes* ATCC 21921、*Alcaligenes eutrophus* BCRC 13036、*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* BCRC 10828、*Bacillus subtilis* BCRC 10255、*Escherichia coli* BCRC 10675、*Hydrogenophaga pseudoflava* BCRC 13892、*Paracoccus denitrificans* BCRC 12285、*Pseudomonas aeruginosa* BCRC 10944、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388、*Pseudomonas alcaligenes* ATCC 14909、*Pseudomonas alcaligenes* BCRC 13909、*Pseudomonas aureofaciens* BCRC 11057、*Pseudomonas azotoformans* BCRC 11021、*Pseudomonas chlororaphis* BCRC 11566、*Pseudomonas fluorescens* BCRC 11028、*Pseudomonas indigofera* ATCC 19706、*Pseudomonas mendocina* BCRC 10458、*Pseudomonas plantarii* JCM 5492、*Pseudomonas stutzeri* JCM 5965、*Pseudomonas stutzeri* BCRC 14821、*Rhodococcus erythropolis* DSM 763、*Rhodococcus rhodochrous* DSM 363、*Thiobacillus denitrificans* BCRC 13020、*Thiosphaera pantotropha* LMD82.5 ATCC 35512，其中 *Alcaligenes* 屬、*Paracoccus denitrificans* 及 *Thiobacillus denitrificans* 由臺大植物系蔡珊珊教授贈送，DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Germany) 菌株則由德國 Göttingen 大學 H. G. Schlegel 教授贈送。由於上述菌株多為格蘭氏陰性菌種，因此又自臺灣地區壽豐及二水系 [9] 土壤篩選出格蘭氏陽性的脫氮菌株 [10]，共 11 株，代號如下，*Bacillus* s1U1、*Bacillus* s1U2、1U4、1U12、1U14、*Bacillus* s1U15、1U15-1、*Bacillus* s1M4、*Bacillus* s1D2、*Bacillus* s1D20、*Bacillus* s2D2。



2. 培養基

本研究使用的脫氮菌培養基為 1 L 水中含 0.5 g KNO_3 及 8 g nutrient broth (Difco)。

3. 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 所使用的引子共有兩組 (dNir1, dNir2 及 Cu-dNir1, Cu-dNir2)，皆委託台北磐亞公司合成，其序列 (5'→3') dNir1、dNir2 分別為 TAC CAC CCG GAA CCG、TGC CGT CGC CCA GGT；而 Cu-dNir1, Cu-dNir2 則為 GTC AAG GTG GAA CTG GTC AA、CCT GTT GGC TTG CGA ATG AA。相關實驗試劑皆購自 Perkin Elmer 公司。

(二) 實驗方法

1. 亞硝酸還原酵素型態的區別法

改良自 Shapleigh 等人的方法[11]，將脫氮菌接於 10 mL 脫氮菌培養基中，30°C 靜置培養 24-36 小時，離心後，以 0.1 M pH 7 磷酸緩衝液清洗菌體，再次沉澱菌體後，加入磷酸緩衝液，製成菌體懸浮液，以超音波細胞破碎機 (Heat Systems XL2020) 打破菌體，破菌條件：輸出能量鈕調為 7，超音震盪 30 秒，暫停 1 分鐘，在冰浴下反覆上述步驟至菌液澄清，離心，取上層液，即得粗酵素液。

粗酵素液加入 diethyldithiocarbamate (DDC, Sigma)，與銅離子結合，DDC 的最後的濃度是 10 mM，置於 4°C，90 分鐘後，取 0.9 mL DDC 與粗酵素的混合液，加入 sodium ascorbate 及 phenazine methosulfate，其最後的濃度分別是 10 mM 及 0.5 mM，通氮氣，加入亞硝酸鈉，最後的濃度是 10 mM，30°C 培養，於 3、6 小時分別取樣，以氣相層析儀測定一氧化二氮；對照組則不加入 DDC，其餘步驟相同。

2. 製備菌體 DNA

將菌株在 5 mL 脫氮菌培養基中，於 27°C 振盪培養 24-36 小時後，取 1.5 mL 菌液於微量離心管中，離心 (microcentrifuge, Hermile Z230MA, Germany) 5 分鐘，沉澱菌體，再將菌體懸浮在 567 μL TE 緩衝液 (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl、1mM EDTA) 後，再根據 Ausubel 等人的方法[12]萃取出菌體的 DNA。

3. 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增殖

進行聚合酵素連鎖反應的儀器為高效能溫度循環反應器 (OmniGene- Thermal Cycler, Hybaid)，聚合酵素連鎖反應各試劑最終濃度為 200 μM dNTP、0.5 μM primers、1x PCR Buffer (50 mM KCl、10 mM Tris HCl、0.1% Triton X-100)、0.025 U/ μL Taq polymerase、1-10 ng/ μL Template DNA， Mg^{2+} 濃度分別為 2.0 mM (對 dNir1 及 dNir2)，1.2 mM (對 Cu-dNir1 及 Cu-dNir2)，總反應溶液體積為 25 μL ，最後加入等體積的礦物油 (Sigma, USA)。反應條件：變性 (denaturation) 的溫度及時間為 95 °C、1 分鐘；鍊合 (annealing)

的溫度及時間分別為 57 °C、1 分鐘（對 dNir1 及 dNir2），42.5°C、1 分鐘（對 Cu-dNir1 及 Cu-dNir2）；延長（extension）的溫度及時間為 72°C、1 分鐘，進行 35 個循環。

4.瓊脂膠體電泳分析

取適量的瓊脂（agarose, BDH）溶在 1x TAE（pH 8.0，0.04 M Tris-Acetate、0.001 M EDTA）緩衝液中，加熱溶解成透明的溶液，在室溫下冷卻至約 50°C 時倒入製膠容器中，待膠片凝固後，取出 comb，將膠片連同 tray 一起放入電泳槽（Mupid II, Advance）中，並在電泳槽內加入 1x TAE 緩衝液，分別將 DNA 樣品溶液和 DNA 標準分子量與 1 倍體積的追蹤染劑混合均勻後，加入膠片的 wells 中，以 100 伏特（volt）的電壓通電進行電泳，待追蹤染劑跑到既定位置時，關掉電源，取出膠片，置入含有 0.5 µg/ ml ethidium bromide 的 TAE 緩衝液中，染色 20 分鐘後，置於 UV 下觀察結果，並拍照記錄。

5.聚合酵素連鎖反應後的產物純化

將經電泳分離的聚合酵素連鎖反應產物的膠片切割下來置於 1.5 mL 的小離心管中，加入 Magic PCR Preps Resin（Wizard™ PCR Preps DNA Purification System, Promega），於 65°C 水浴中溶解，準備一體積為 3 mL 的注射筒，裝在 Magic Minicolumn 上，將 Resin/DNA 的混合液吸至注射筒內，然後以推桿慢慢將混合液壓縮出去，DNA 則停留在 Magic Minicolumn 內的濾紙上。取 2 mL 80 % isopropanol 以上述方式清洗 DNA，然後將 Magic Minicolumn 置入小離心管，離心 20 秒，取 50 µL H₂O 加入 Magic Minicolumn 中，靜置 1 分鐘，以使 DNA 溶出，將 Magic Minicolumn 置入小離心管，離心 20 秒，離心液即為純化後的 DNA 溶液。

6.以非放射性物質 DIG-dUTP 標記探針

聚合酵素連鎖反應所複製的 DNA 片段以非放射性物質 DIG-dUTP 標記（DIG DNA random primer labeling kit, Boehringer Mannheim, Germany），方法如下：DNA 在 100°C 加熱 10 分鐘，立刻至冰浴中冷卻 5 分鐘，加入 2 µL hexanucleotide mixture、2 µL dNTP labeling mixture 及去離子水直至總體積達到 19 µL，再加入 1 µL Klenow enzyme，在 37°C 下作用 20 小時以上，加入 2 µL 0.2 M pH 8.0 EDTA 溶液停止反應，再加入 2.5 µL 4 M LiCl 和 75 µL 預冷（-20°C）的酒精，混合均勻後，置於-20°C 至少 2 小時以上，以 12000 xg 離心 10 分鐘，沉澱物以 70%（v/v）預冷的酒精清洗，乾燥，然後溶於 50 µL TE 緩衝液，在 37°C 水浴中作用 30 分鐘。

7.點雜交（dot blotting hybridization）

將 NaOH、EDTA 加至培養 24 - 36 小時的菌體懸浮液（菌體濃度在 10⁶ 與 10⁸ cell mL⁻¹ 之間）中，其最終濃度為 0.4 M NaOH、10 mM EDTA（最後體積為 0.5 mL），置於 100°C 加熱 10 分鐘，打破菌體，將適當大小的 Zeta-Probe membrane（Bio-Rad Lab., USA）先以無菌水潤濕，再移到 microfiltration apparatus（Bio-Rad Lab., USA）組合好，並以無菌



水加入 well (0.5 mL/well) 中，抽氣以確定裝置是否緊密，將上述處理過的菌體懸浮液加至 well 中，抽氣使 DNA 附著在漬片 (membrane) 上，再加入 0.4 M NaOH 至每個 well (0.5 mL/well) 中，抽氣至漬片非常乾，以 2x SSC (20x SSPE: 3.6 M NaCl、0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O、20 mM EDTA) 潤濕 30 秒，風乾備用。將上述製備好的漬片置於雜交袋中，添加 20 mL 預雜交溶液 (1 mM EDTA、0.5 M pH 7.2 Na₂HPO₄、7 % SDS)，封袋後，於 65°C 進行預雜交 5 分鐘。預雜交液倒出，再加入雜交溶液及變性好的以 DIG 標記好的探針 (在 95°C 進行變性 10 分鐘，迅速取出移至冰浴 5 分鐘) 後，進行雜交 (65°C，18 至 24 小時)。雜交後以洗滌液 I (1 mM EDTA、40 mM pH 7.2 Na₂HPO₄、5 % SDS) 於 65°C 培養 30 分鐘，重複 2 次。再以洗滌液 II (1 mM EDTA、40 mM Na₂HPO₄、1 % SDS) 於 65°C 培養 30 分鐘，重複 2 次，以去除非特異性雜交。

8. 顯像反應

漬片以 washing buffer (1x maleic acid buffer [1x maleic acid buffer: pH 7.5, 0.1 M maleic acid、0.15 M NaCl] 及 0.03 % Tween-20) 在室溫下搖洗 2 分鐘後，置於塑膠袋中，加入 10 ml 1x blocking buffer (10x blocking solution 為 10 % blocking reagent 溶於 1x maleic acid buffer) 在室溫下搖洗 30 分鐘，再加入 10 mL antibody solution (anti-DIG-AP conjugate 以 1000 倍稀釋於 1x blocking buffer 中) 在室溫下培養 30 分鐘，以 100 mL washing buffer 在室溫下搖洗 15 分鐘 (2 次) 後，以 20 mL detection buffer (pH 9.5, 0.1 M Tris-HCl、0.1 M NaCl、50 mM MgCl₂) 在室溫下，靜置 3 分鐘，置於塑膠袋中，加入 0.5 mL CSPD (disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate, 100 倍稀釋於 detection buffer) ，37°C 反應 5 分鐘後，以 X-Omat x-ray film 感光，沖片後觀察其訊號。

參、結果與討論

(一) 以 diethyldithiocarbamate 抑制法區別實驗用的脫氮菌亞硝酸還原酵素的型態

35 株實驗菌株除因 *Rhodococcus erythropolis* DSM 763、*Rhodococcus rhodochrous* DSM 363、*Bacillus subtilis* BCRC 10255 與 *Escherichia coli* BCRC10675 不屬脫氮菌，其餘菌株皆利用 diethyldithiocarbamate 與 Cu 型亞硝酸還原酵素中的 Cu 離子結合之後，Cu 型亞硝酸還原酵素會失去活性，而 cytochrome *c*, *d1* 型亞硝酸還原酵素仍會維持活性的特性，而被區分出具有 cytochrome *c*, *d1* 型亞硝酸還原酵素的脫氮菌有 17 株，Cu 型亞硝酸還原酵素的脫氮菌有 14 株，見表一。

(二)含有 cytochrome c,d1 型或 Cu 型亞硝酸還原酵素的脫氮菌株之聚合酵素連鎖反應(PCR)的產物

由圖一及圖二顯示，兩組引子分別對不同的脫氮菌株複製出長度不同亞硝酸還原酵素的基因片段，且在不同種 (species) 之間，每一種都有不同型態的電泳圖譜。因此以dNir1及dNir2為引子， Mg^{2+} 濃度為2.0 mM，鍊合溫度為57°C。以Cu-dNir1及Cu-dNir2為引子， Mg^{2+} 濃度為1.2mM，鍊合溫度為42.5°C 進行聚合酵素連鎖反應，由產物的電泳圖譜，分別可作為具有 cytochrome c,d1型或Cu型亞硝酸還原酵素的脫氮菌株分類依據。

(三)脫氮菌的亞硝酸還原酵素核酸探針的篩選

上述不同長度亞硝酸還原酵素基因片段的電泳膠片 (圖一及圖二)，在紫外光燈下將強度較強的色帶割下，經純化，標記，製成探針，基因片段的長度如表二所示，將這些探針分別與脫氮菌進行雜交。實驗上使用的探針雜交結果整理如表三所列。綜合雜交結果顯示以來自 *Alcaligenes eutrophus* 長度約為 781 bp 的基因片段能與較多的脫氮菌屬雜交，包括 *Pseudomonas*屬具有cytochrome c,d1-dNirs或Cu-dNirs的脫氮菌，及具有脫氮能力的*Paracoccus denitrificans*、*Thiobacillus denitrificans*、*Escherichia coli*進行雜交，但對於*Hydrogenophaga pseudoflava*、部份*Bacillus* 屬及*Rhodococcus*屬沒有雜交正反應，見圖三。將此結果與文獻中脫氮菌雜交結果進行比較，Ye等[5]將*Pseudomonas* sp. strain G-179的DNA以*EcoRI-BamHI*得到1.9-kb片段，只能對與具有Cu型亞硝酸還原酵素的脫氮菌有雜交正反應；Smith等[4]以得自*Pseudomonas stutzeri nir* C端的1.2-kb片段篩選出的探針卻只能與具有cytochrome c,d1型亞硝酸還原酵素的脫氮菌進行雜交，而本研究篩選出的探針卻能與具有cytochrome c,d1型或Cu型亞硝酸還原酵素的脫氮菌進行雜交。

參考文獻

1. R. Knowles, 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46 : 43-70.
2. B. A. Averill, J. M. Tiedje. 1982. The chemical mechanism of microbial denitrification. *FEBS Letters.* 138 : 8-12.
3. A. H. Stouthamer. (1988). Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. In : A. J. B. Zehnder (Eds.) *Biology of anaerobic microorganisms.* John Wiley and Sons, New York.
4. G. B. Smith, J. M. Tiedje. 1992. Isolation and characterization of a nitrite reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 376-384.
5. R. W. Ye, M. R. Fries, S. G. Bezborodikov, B. A. Averill, J. M. Tiedje. 1993. Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 250-254.
6. M. C. Silvestrini, C. L. Caleotti, M. Gervais, E. Schinina, D. Barra, F. Bossa, M. Brunori. 1989. Nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* : sequence of the gene and the protein. *FEBS Letters.* 254 : 33-38.



7. A. Jungst, S. Wakabayashi, H. Matsubara, W. G. Zumft. 1991. The nir STBM region coding for cytochrome *cd1*-dependent nitrite respiration of *Pseudomonas stutzeri* consists of a cluster of mono-, di- and tetraheme proteins. FEBS. 279 : 205-209.
8. F. F. Fenderson, S. Kumar, E. T. Adman, M.-Y. Liu, W. J. Payne, J. LeGall. 1991. Amino acid sequence of nitrite reductase : a copper protein from *Achromobacter cycloclasters*. Biochem. 30 : 7180-7185.
9. 吳先琪 (1993): 臺灣地區土壤自淨能力及污染評估方法之研究, 附錄二。行政院環保署研究報告。EPA-82-E3H1-09-01- (1)。
10. 吳秋擘 (1995): 臺灣地區三種土壤之脫氮作用及以核酸探針定量土壤脫氮菌。國立臺灣大學農業化學研究所博士論文。
11. J. P. Shapleigh, W. J. Payne. 1985. Differentiation of *c,d1* cytochrome and copper nitrite reductase production in denitrifiers. FEMS Microbiol. Lett. 26 : 275-279.
12. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl. (1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.

表一 實驗菌株之亞硝酸還原酵素的型態

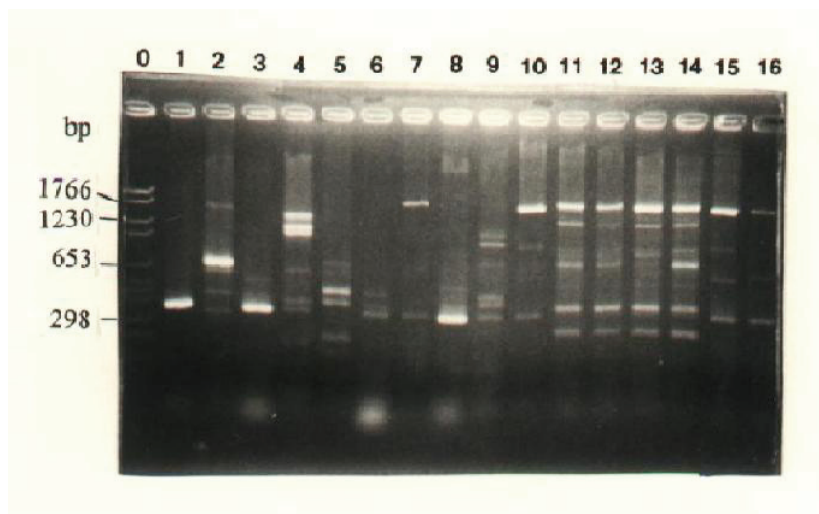
Table 1. The types of nitrite reductase of microorganisms used in this study

Strains	dNir type	Strains	dNir type
<i>Achromobacter cycloclastes</i>	Cu*	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Nd**
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Cu	<i>R. rhodochrous</i>	Nd
<i>A. faecalis subsp. faecalis</i>	Cu	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Cu
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	Cu	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	Cu
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Cu	LMD82.5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	c,d1	<i>Bacillus</i> s1U1	c,d1
BCRC 10944		<i>Bacillus</i> s1U2	Cu
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13388	c,d1	1U4	c,d1
<i>P. alcaligenes</i> BCRC 13909	Cu	1U12	c,d1
<i>P. alcaligenes</i> ATCC 14909	Cu	1U14	c,d1
<i>P. aureofaciens</i>	c,d1	<i>Bacillus</i> s1U15	Cu
<i>P. azotoformans</i>	c,d1	1U15-1	c,d1
<i>P. chlororaphis</i>	c,d1	<i>Bacillus</i> s1M4	c,d1
<i>P. fluorescens</i>	c,d1	<i>Bacillus</i> s1D2	c,d1
<i>P. indigofera</i>	Cu	<i>Bacillus</i> s1D20	Cu
<i>P. mendocina</i>	c,d1	<i>Bacillus</i> s2D2	c,d1
<i>P. plantarii</i>	Cu	<i>Escherichia coli</i>	Nd
<i>P. stutzeri</i> JCM 5965	c,d1	<i>Bacillus subtilis</i>	Nd
<i>P. stutzeri</i> BCRC 14821	c,d1		

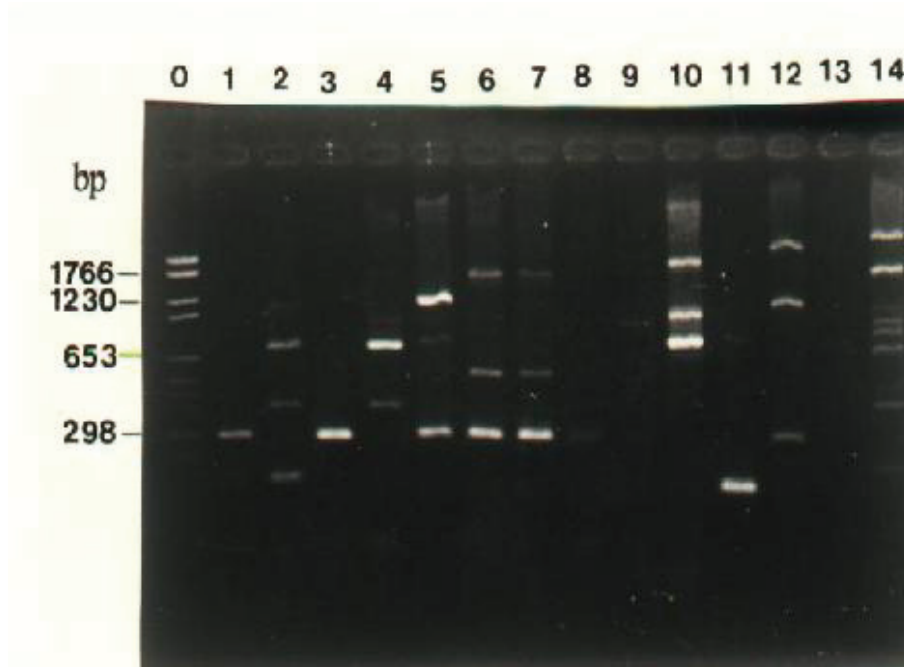
* Ye et al. (5)

** Nd, not done.





圖一 含cytochrome *c,d1*型亞硝酸還原酵素的脫氮菌株聚合酵素連鎖反應產物之洋菜膠電泳
Fi. 1. Agarose gel of PCR products. Genomic DNAs of *c,d1*-dNir denitrifiers were used as template. Lanes : 0. size markers (mixture of fragments from cleavage of pBR328 DNA with restriction endonuclease *Bgl* I and *Hinf* I) ; 1. *Pseudomonas stutzeri* JCM5965 ; 2. *P. mendocina* BCRC10458 ; 3. *P. aeruginosa* BCRC10944 ; 4. *P. fluorescens* BCRC11028 ; 5. *P. aureofaciens* BCRC11057 ; 6. *P. chlororaphis* BCRC11566 ; 7. *P. aeruginosa* ATCC13388 ; 8. *P. stutzeri* BCRC14821 ; 9. *Bacillus* s1U1 ; 10. 1U4 ; 11. 1U12 ; 12. 1U14 ; 13. 1U15-1 ; 14. *Bacillus* s1M4 ; 15. *Bacillus* s1D2. ; 16. *Bacillus* s2D2.



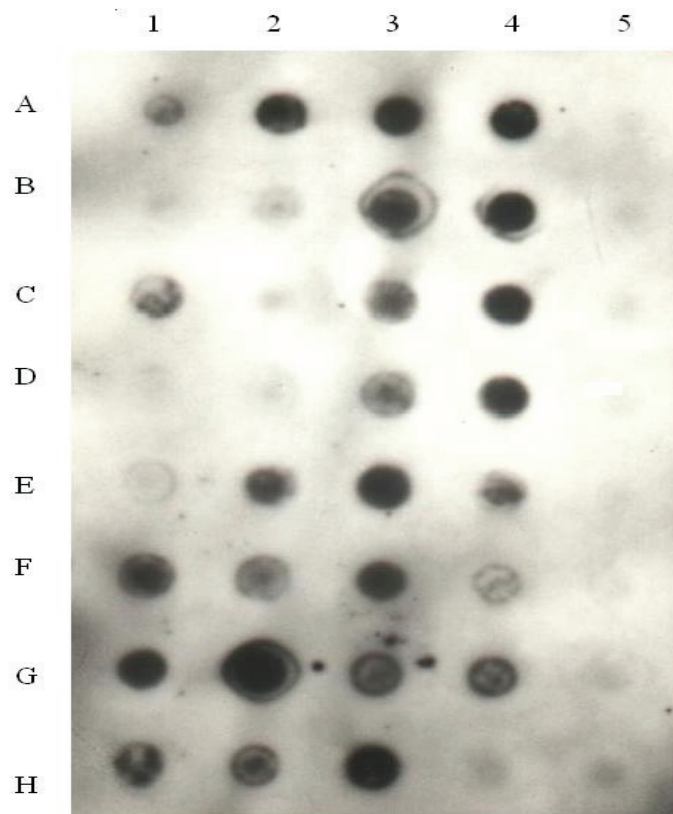
圖二 含Cu型亞硝酸還原酵素的脫氮菌株聚合酵素連鎖反應產物之洋菜膠電泳

Fig. 2. Agarose gel of PCR products. Genomic DNAs of Cu-dNir denitrifiers were used as template. Lanes : 0. size markers (mixture of fragments from cleavage of pBR328 DNA with restriction endonuclease *Bgl* I and *Hinf* I) ; 1. *Pseudomonas plantarii* JCM5492 ; 2. *Alcaligenes faecalis subsp. faecalis* BCRC10828 ; 3. *P. aztoformans* BCRC11021 ; 4. *A. eutrophus* BCRC13036 ; 5. *Hydrogenophaga pseudoflava* BCRC13892 ; 6. *P. alcaligenes* BCRC13909 ; 7. *P. alcaligenes* ATCC14909 ; 8. *P. indigofera* ATCC19706 ; 9. *Achromobacter cycloclastes* ATCC21921 ; 10. *Thiobacillus denitrificans* BCRC13020 ; 11. *Paracoccus denitrificans* BCRC12251 ; 12. *Bacillus* s1U2 ; 13. 1U15 ; 14. *Bacillus* s1D20.

表二 探針長度

Table 2. The length of probes used in the present study

Strains	Length (bp)	Primers used
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	781	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>A. faecalis subsp. faecalis</i>	653	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	653	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>P. alcaligenes</i> BCRC13909	298	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>Thiobacillus denitrificans</i> (I)	1766	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>Thiobacillus denitrificans</i> (II)	916	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>Thiobacillus denitrificans</i> (III)	743	Cu-dNir1, Cu-dNir2
<i>P. fluorescens</i> (I)	1103	dNir1, dNir2
1U4	1916	dNir1, dNir2



圖三 dNir 探針專一性之點雜交分析

Fig. 3. Dot blotting analysis of probe dNir specificity. Probe dNir was 781 bp of PCR product from *Alcaligenes eutrophus* and microbial DNA was immobilized on the Zeta-Probe membrane. 1A : *Pseudomonas plantarii* ; 1B : *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* ; 1C : *P. aztoformans* ; 1D : *A. eutrophus* ; 1E : *Hydrogenophaga pseudoflava* ; 1F : *P. alcaligenes* BCRC13909 ; 1G : *P. alcaligenes* ATCC14909 ; 1H : *P. indigofera* ; 2A : *Achromobacter cycloclastes* ; 2B : *Thiosphaera pantotropha* ; 2C : *Thiobacillus denitrificans* ; 2D : *Paracoccus denitrificans* ; 2E : *Bacillus* s1U2 ; 2F : *Bacillus* s1M15 ; 2G : *Bacillus* s1D20 ; 2H : *P. stutzeri* JCM5965 ; 3A : *P. mendocina* ; 3B : *P. aeruginosa* BCRC10944 ; 3C : *P. fluorescens* ; 3D : *P. aureofaciens* ; 3E : *P. chloroaphis* ; 3F : *P. aeruginosa* ATCC13388 ; 3G : *P. stutzeri* BCRC14821 ; 3H : *Bacillus* s1U1 ; 4A : 1U4 ; 4B : 1U12 ; 4C : 1U14 ; 4D : 1U15-1 ; 4E : *Bacillus* s1M4 ; 4F : *Bacillus* s1D2 ; 4G : *Bacillus* s2D2 ; 5A : *Rhodococcus erythropolis* ; 5B : *R. rhodochrous* ; 5C : *E. coli* ; 5D : *B. subtilis*.

Quantification of Soil Denitrifiers by Non-Isotope Nucleic Acid Probe

Part I. Screen of Nucleic Acid Probe for Denitrifiers

Chiu-Yeh Wu¹ Zeng-Chin Liang²

¹ Department of Culinary Arts, ChungChou University of Science and Technology

² Department of Bioresources, Da-Yeh University

Abstract

A DNA probe for determination of denitrifiers was screened in the present study. We synthesized a pair of primers for the polymerase chain reaction, the 5'→3' sequences of primers separately were GTC AAG GTG GAA CTG GTC AA and CCT GTT GGC TTG CGA ATG AA. The templates of the polymerase chain reaction were used the DNAs from the 14 strains of denitrifiers containing copper-type nitrite reductase. Under the following amplification conditions, 1.2 mM Mg²⁺, 42.5°C annealing temperature for the primers were required. The amplified fragments were purified to used as probes. The probes were labeled by digoxigenin-dUTP. Further confirmation of specificity to denitrifying bacteria for probes was performed by dot blotting hybridization. The results showed that the 781-bp fragment of *Alcaligenes eutrophus* BCRC 13036 detected more genera of denitrifiers containing copper-type or cytochrome *c,d1* nitrite reductase than other probes.

Key words : Denitrifier, Nitrite reductase, Nucleic acid probe