

以非放射性核酸探針定量土壤中的脫氮菌 第二部分 土壤中脫氮菌之定量

吳秋暉¹ 梁志欽²

摘要

以最大可能計數法測定脫氮菌數需兩周才能得到測定值，因此本研究嘗試建立以DNA探針定量土壤脫氮菌數。首先以來自 *Alcaligenes eutrophus* CCRC 13036 的核酸探針 (781 bp) 與不同菌體濃度的 *A. eutrophus* 進行雜交後，以密度掃描儀掃描定量，顯示菌體濃度在 1.522×10^6 與 3.805×10^7 cell number ml^{-1} 間，迴歸直線的 R^2 值為 0.99。以此核酸探針定量土壤脫氮菌，結果顯示以此探針不能測出壽豐系與龍崗系土壤脫氮菌數，但能測定到二水系每克土壤含有約 3.01×10^6 個 *A. eutrophus* 等量菌數，此數目約為以最大可能計數法測定的脫氮菌數的 1000 倍。此差異性可能是由於最大可能計數法測定為活菌，其數量決定於培養基的組成，因此測定值會小於實際值。而以核酸探針則無法區別活菌與死菌，所以其值會較實際值高。

關鍵字：脫氮菌定量、核酸探針

¹ 中州科技大學餐飲廚藝系 cywu4212@dragon.ccut.edu.tw

² 大葉大學生物資源學系 zcliang@mail.dyu.edu.tw



壹、緒論

傳統上定量微生物生質的方法有四 (Wang et al., 1991)：(一)鏡檢法(二)培養法(三)測定化學組成(四)測定生質生化特性。定量脫氮菌數最常用的方法是以培養法-最大可能計數法測定(Tiedje, 1982)，以此方法定量脫氮菌需要 2 週，非常耗時，因此本研究欲利用核酸探針建立脫氮菌定量法，以縮短定量脫氮菌菌數所需的時間。

自土壤抽取 DNA 的方法可分為兩種 (Tsai et al., 1992, Roose-Amsaleg et al., 2001)，一是先將細菌由土壤分離，再將細胞水解後回收 DNA，稱為細胞抽取法 (cell extraction method) (Torsvik, 1980)，另一是直接由土壤抽取 DNA，稱為直接抽取法 (direct extraction method) (Ogram et al., 1987)，兩種方法的得到的 DNA 量，以直接抽取法得到的 DNA 量較細胞抽取法高 (Steffan et al, 1988)。

先前的研究顯示以 *Alcaligenes eutrophus* CCRC 13036 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，可與較多屬具有 cytochrome *c_{d1}* 型或 Cu 型亞硝酸還原酵素的脫氮菌雜交。因此本研究將以直接抽取法進行土壤 DNA 抽取後，再以上述核酸片段進行雜交定量的土壤脫氮菌數，並與前述培養法-最大可能計數法測定之脫氮菌數比較，以評估此方法定量土壤脫氮菌數之可行性。

貳、研究方法

一、材料

土壤樣品的來源(吳先琪, 1993)分別是溼地的未耕土壤：黏板岩沖積土 (二水系, Es)；丘陵地的未耕土壤：紅壤 (龍崗系, Lk)；休耕土壤：片岩沖積土 (壽豐系, Sf)。

二、實驗方法

(一)土壤樣品之前處理，將土壤風乾至可磨碎的程度後，過篩 (2 mm) 並充分混合。

(二)以最大可能計數法測定土壤樣品之脫氮菌數是根據 Tiedje (1982) 的方法進行，即土壤樣品經連續稀釋後，培養在內有醱酵小管 (Durham tube) 的 Hungate tube 中，nutrient broth (Difco) 另外添加 KNO_3 5 g/L 為培養基，培養兩週後，觀察醱酵小管內有無氣泡產生及硝酸態氮或亞硝酸態氮是否消失，而得到計數結果。

(三)土壤 DNA 抽取

土壤加入 0.4 M NaOH、10 mM EDTA 混合液，混合液體積與土壤比為 2，置於 100 °C 加熱 10 分鐘，冷卻後，加入 100 ml 5M NaCl 及 80 ml CTAB (40% CTAB [hexadecyl trimethylammonium bromide] 溶於 0.7 M NaCl)，於 65 °C 水浴 10 分鐘，加入等體積的 chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1 (v/v) 混合溶液，混合均勻，離心 10 分鐘，取上層液，

再同樣加入等體積的 chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1 (v/v) 混合溶液，混合均勻，離心 10 分鐘，取上層液後，置於真空抽氣機中進行濃縮，濃縮至體積為 0.5 ml。

(四)製作非放射性物質 DIG-dUTP 標記探針

聚合酵素連鎖反應所複製的DNA片段(吳秋暉，2012)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 μ L hexanucleotide mixture、2 μ L dNTP labeling mixture及去離子水直至總體積達到19 μ L，再加入1 μ L Klenow enzyme，在 37 °C 下作用20小時以上，加入2 μ L 0.2 M pH 8.0 EDTA溶液停止反應，再加入2.5 μ L 4 M LiCl 和75 μ L 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 g 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 μ L TE緩衝液，在37 °C水浴中作用30分鐘。

(五)土壤 DNA 以非放射性核酸探針雜交定量

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，並以無菌水加入孔中 (0.5 ml/孔)，抽氣以確定是否緊密，將上述處理過的土壤DNA溶液與稀釋成不同濃度處理過的*Alcaligenes eutrophus* 菌體懸浮液 (菌體稀釋度在 10^6 與 10^8 cell ml^{-1} 之間) 分別加至well中，抽氣使DNA附著在漬片 (membrane) 上，再加入0.4 M NaOH 至每個孔中 (0.5 ml/孔)，抽氣至漬片非常乾，以2x SSC (20x SSPE : 3.6 M NaCl、0.2 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 、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 (pH 7.2, 1 mM EDTA、0.5 M Na_2HPO_4 、7% SDS)，封袋後，於65 °C進行預雜交5分鐘。預雜交液倒出，再加入雜交溶液及前述變性好的以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 (pH 7.2, 1 mM EDTA、40 mM Na_2HPO_4 、5% SDS) 於65 °C培養30分鐘，重覆上述步驟 2 次。再以洗滌液II (1 mM EDTA、40 mM Na_2HPO_4 、1% SDS) 於65 °C培養30分鐘，重覆上述步驟2次，以去除非特异性雜交。進行顯像反應，顯像後的x光底片以密度掃描儀 (Personal densitometer SI-PC, Molecular dynamics, Sunny Vale, CA, USA) 分析影像。

(六)顯像反應

漬片以洗滌緩衝液 (1x maleic acid buffer [1x maleic acid buffer : pH7.5, 0.1 M maleic acid、0.15 M NaCl]、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終止緩衝液 (10x 終止緩衝液為10%終止試劑溶於 1x maleic acid buffer) 在室溫下搖洗30分鐘，再加入10 ml抗體溶液 (anti-DIG-AP conjugate以1000倍稀釋於1x終止緩衝液中) 在室溫下培養30分鐘，以100 ml洗滌緩衝液在室溫下搖洗15分鐘 (2次) 後，以20 ml偵測緩衝液 (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 倍稀釋於偵測緩衝液)，37 °C 反應 5 分鐘後，進行顯像反應。

參、結果與討論

一、*A. eutrophus* 菌體濃度之迴歸直線

先以來自 *A. eutrophus* 長度約為 781 bp 的基因片段作為核酸探針與不同菌體濃度的 *A. eutrophus* 進行雜交後，以密度掃描儀掃描定量，Y 軸等於掃描值減去背景值，X 軸為對應的 *A. eutrophus* 菌體濃度的對數值的結果，顯示當菌體濃度 (cell number ml⁻¹) 介在 1.522×10⁶ 與 3.805×10⁷ 間，與掃描值有線性關係存在，迴歸直線的 R² 值為 0.99 (圖一)。

二、以核酸探針及最大可能計數法測定壽豐系、二水系與龍崗系土壤的脫氮菌數

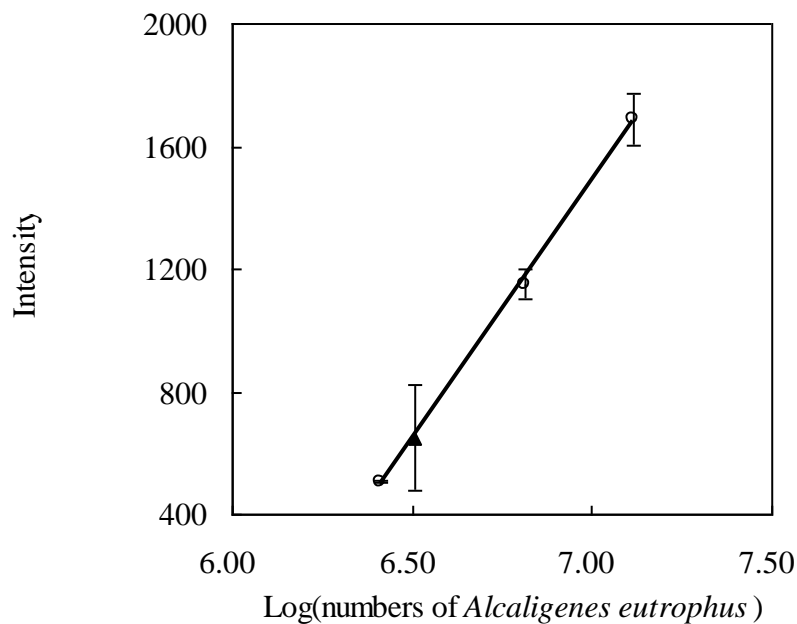
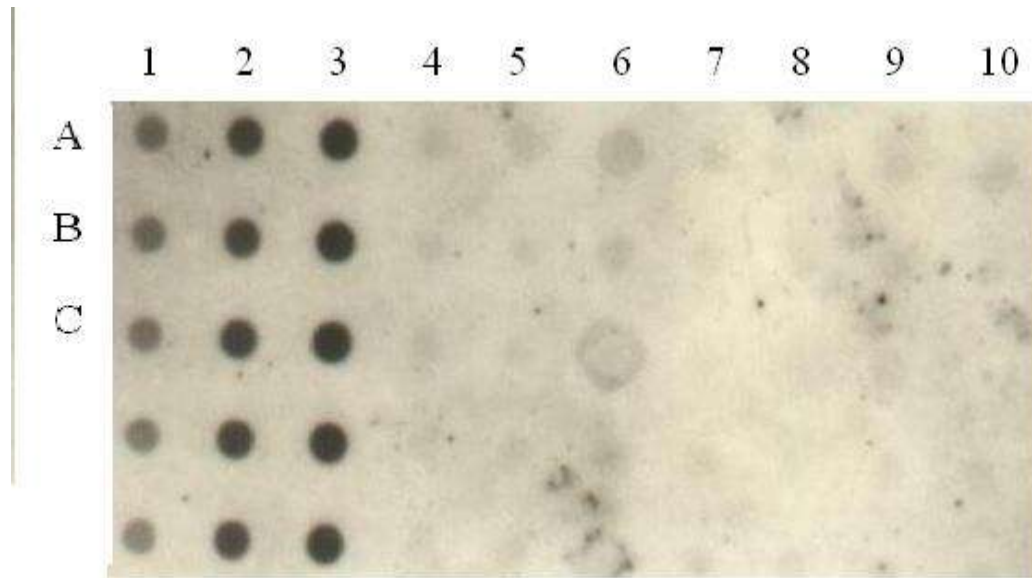
壽豐系、二水系與龍崗系土壤經上述土壤 DNA 抽取方法處理，得到萃取液分別測定波長為 260 與 280 nm 時的吸光值，得到壽豐系、二水系與龍崗系土壤 OD₂₆₀ 對 OD₂₈₀ 的比值各為 1.00、1.01、1.00，即核酸與蛋白質萃取物在波長 260 與 280 nm 之吸光值比值為接近 1。當以來自 *A. eutrophus*，長度約為 781 bp 的基因片段作為核酸探針測定三種土壤脫氮菌數，顯示以此探針不能測出經風乾前處理壽豐系與龍崗系土壤的脫氮菌數，但可測得二水系每克土壤含有約 3.01 × 10⁶ 個 *A. eutrophus* 等量細胞 (圖一)，此可能為壽豐系與龍崗系土壤的脫氮菌相不同於前述研究(吳秋曄，2012)之脫氮菌相，而二水系土壤的脫氮菌相則較相似。

表一為三種土壤分別以最大可能計數 (MPN) 法與上述核酸探針測定的脫氮菌數比較。二水系土壤以上述核酸探針測定的脫氮菌數約為以最大可能計數法測定的脫氮菌數 (約為每克土壤 3.00 × 10³ 個脫氮菌) 的 1000 倍。最大可能計數值是一種定量微生物生質的培養法，培養基組成決定計數的微生物相，計數值可能為低估。本研究以核酸探針測定脫氮菌，雖然在雜交試驗中較不會與非脫氮菌株雜交，但是試驗菌株太少，計數結果仍可能為高估值。由此可推論二水系土壤脫氮菌數是介於 3.00 × 10³ cells g⁻¹ soil (以最大可能計數法測定) 與 3.01 × 10⁶ cells of *A. eutrophus* g⁻¹ soil (以 *A. eutrophus* 核酸探針測定) 之間。

參考文獻

- 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)。
- 吳秋暉、梁志欽(2012)。以非放射性核酸探針定量土壤中的脫氮菌 第一部分核酸探針的篩選。健康與照顧科學學刊。1:131-143。
- Ogram, A., Sayler, G. S., Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods.* 7 : 57-66
- Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil Ecol.* 18: 47-60.
- Steffan, R. J., Gokphary, J., Bej, A. K., Atlas, R. M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2908-2915.
- Tiedje, J. M. (1982). Dentrification. In A. L. Page (Eds.), *Method of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties.* 2nd ed., pp. 1011-1026. Madison, U. S.A.
- Torsvik, V. L. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 12 : 15-21.
- Tsai, Y. L., Olson, B. H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1070-1074.
- Wang, H. H., Hsu, J. P. (1991). Improved processing of agricultural products using solid state fermentation. *Trans. Mycol. Soc. R.O. C.* 6 : 18-35.





圖一、以密度掃描儀定量壽豐系、二水系與龍崗系土壤的脫氮菌數。(A) x 光片第一欄至第三欄 *A. eutrophus* 菌數分別為 2.600×10^6 、 6.500×10^6 與 1.300×10^7 cell ml⁻¹；6A 到 6C 為二水系土壤；8A 到 8C 為壽豐系土壤；10A 到 10C 為龍崗系土壤。(B) 密度掃描儀測定結果，○ 為 *A. eutrophus* 菌數；▲ 為二水系土壤菌數。

Figure 1. The numbers of denitrifiers in Shoufeng, 8A and 8C, Shoufeng soil; 10A and 10C, Lungkang soil Erhshui and Lungkang soils by densitometric measurement. (A) Lane 1 to 3: the number of *A. eutrophus* was 2.600×10^6 , 6.500×10^6 , 1.300×10^7 cell ml⁻¹, 6A and 6C, Erhshui soil; 8A and 8C, Shoufeng soil; 10A and 10C, Lungkang soil, respectively. (B) The result of densitometric measurement, among these data, background values were reduced. ○, the number of *A. eutrophus*; ▲, Erhshui soil.

表一 以最大可能計數法與 *Alcaligenes eutrophus* 核酸探針測定壽豐系、二水系與龍崗系土壤的脫氮菌

Table 1. The numbers of denitrifiers in Shoufeng, Erhshui and Lungkang soils were determined by the most probable number (MPN) method and by 781 bp of PCR product from *A. eutrophus*.

Soil series	The number of denitrifiers was determined by	
	MPN (cells g ⁻¹ soil)	781 bp of PCR product from <i>A. eutrophus</i> (cells of <i>A. eutrophus</i> g ⁻¹ soil)
Shoufeng	1.40×10 ¹	Nd ^a
Erhshui	3.00×10 ³	3.01×10 ⁶
Lungkang	1.40×10 ¹	Nd

^a Nd, not detected.



Quantification of Soil Denitrifier by Non-Isotope Nucleic Acid Probe

Part II. Quantification of Soil Denitrifier

Chiu-Yeh Wu¹, Zeng-Chin Liang²

Abstract

Generally, it takes two weeks for determination of denitrifiers by the most probable number (MPN) method. Therefore the quantification method of soil denitrifier by a DNA probe was established in the present study. First we used the 781-bp fragment of *Alcaligenes eutrophus* CCRC 13036 to detect different concentrations of *A. eutrophus* cell. The results showed that a linear relationship for the quantitation of *A. eutrophus* between 1.522×10^6 and 3.805×10^7 cell number ml^{-1} by the densitometric measurement was found. A direct extraction of DNA from Shoufeng, Erhshui and Lungkang soils was applied for the quantification by the probe. The numbers of denitrifiers in Erhshui soil detected by hybridization with the probe was equivalent to 3.01×10^6 cells of *A. eutrophus* g^{-1} soil, however, the denitrifiers in Shoufeng and Lungkang soils could not be determined by the probe. The number of denitrifiers in Erhshui soil was 1000 times of those determined previously by MPN method. MPN is one kind of cultural methods. The community of grown microorganisms was defined by the compositions of the medium used. Therefore the numbers of denitrifiers measured by MPN method may be generally lower than the numbers existed in the soil. Although there was few hybridization with a nondenitrifying bacterium in the early study, the numbers of denitrifiers determined by the probe may be higher than the numbers existed in the soil.

Key words : Quantification of denitrifier, Nucleic acid probe.

¹ Department of Culinary Arts, Chung Chou University of Science and Technology

² Department of Bioresources, Da-Yeh University