



稳定同位素核酸探针技术 (DNA-SIP/RNA-SIP) 原理及实验介绍

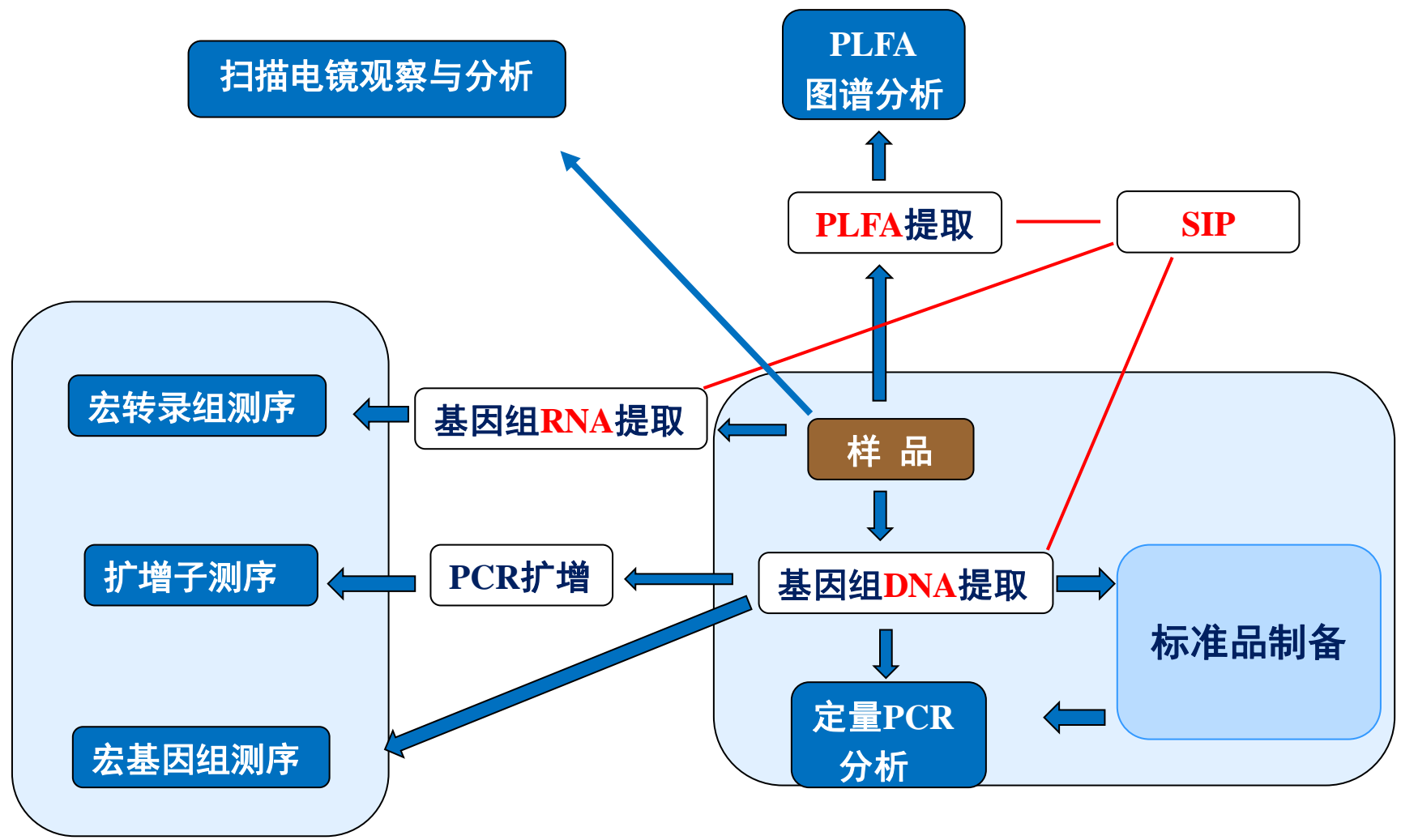
分子生物学实验室
微生物资源与生态组
所级公共技术中心

苏振成

2024-12-4



环境样品分子生态学技术





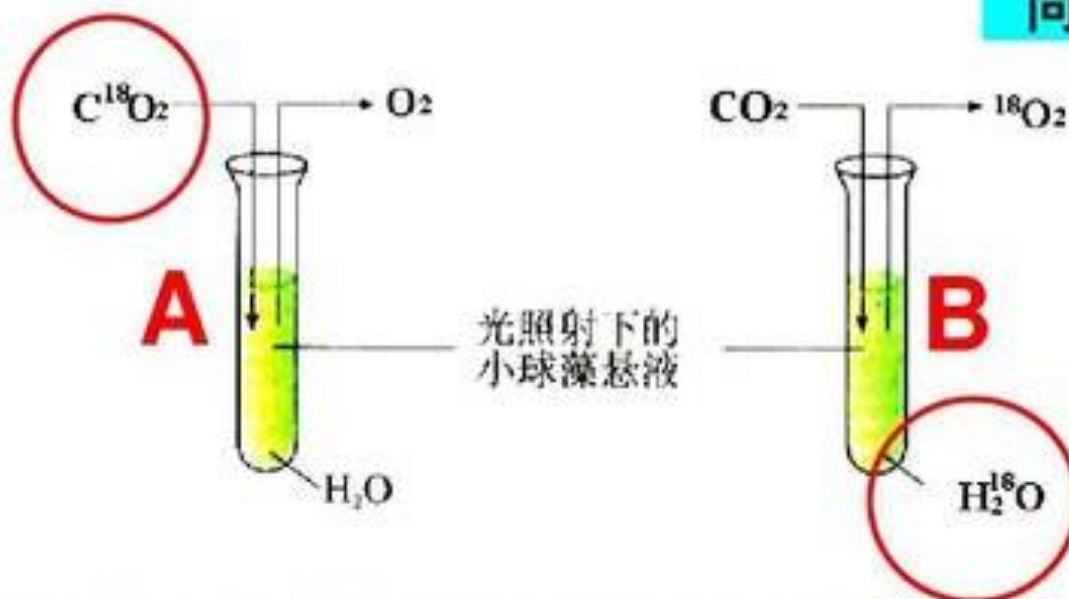
同位素基本概念

同位素示踪实验

光合作用释放的 O_2 是来自 CO_2 吗？

1939年，美国鲁宾和卡门的实验

同位素标记法

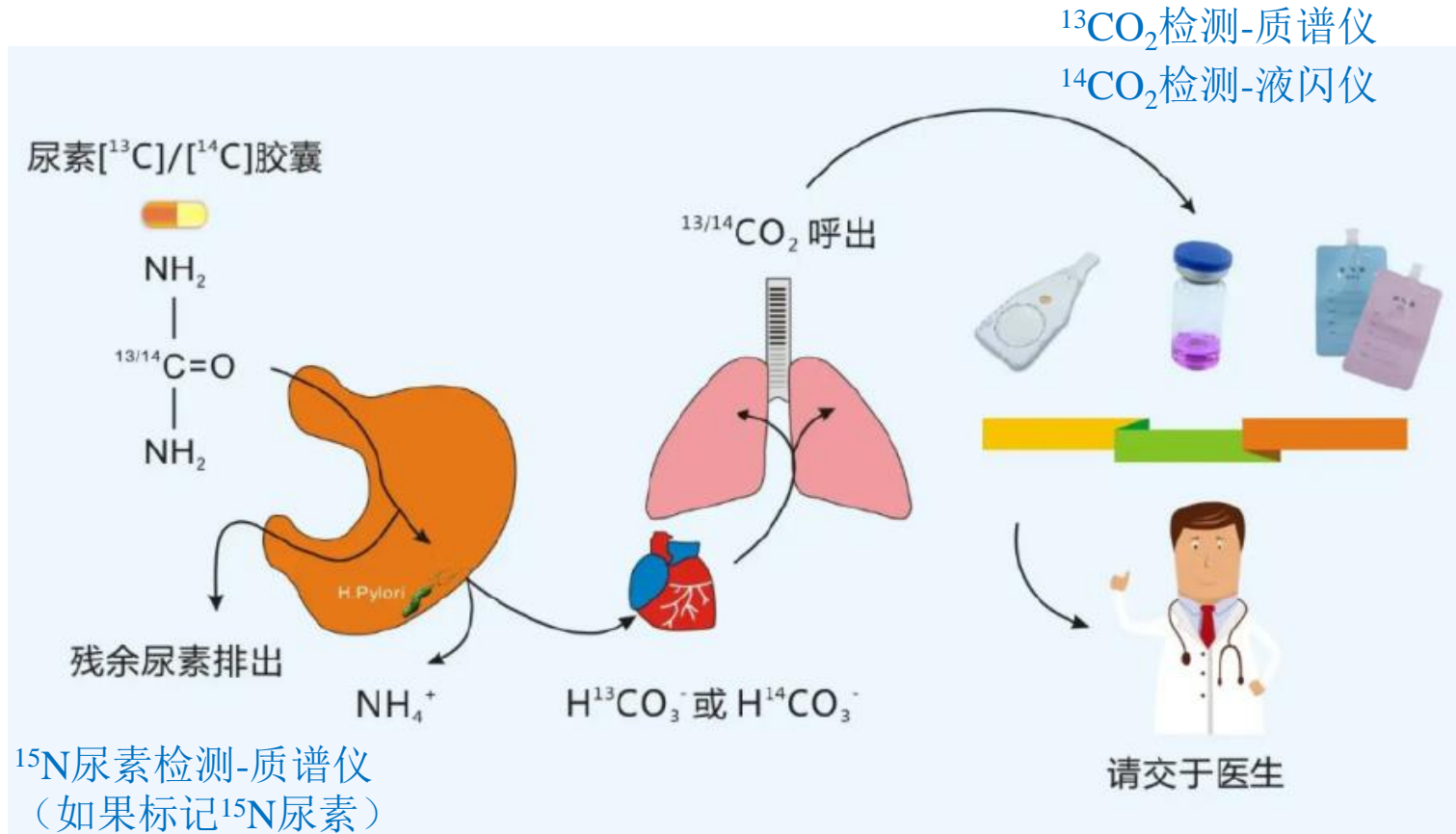


结论：光合作用释放的氧全部来自参加反应的水。



同位素基本概念

同位素示踪应用-幽门螺旋杆菌检测原理



原理：幽门螺旋杆菌Hp产生的尿素酶可将尿素分解为氨气（ NH_3 ）和二氧化碳（ CO_2 ）， CO_2 在胃肠道吸收后进入血液循环，经肺呼出。当被检测者口服 ^{13}C 或 ^{14}C 核素标记的尿素后，若胃内有Hp，带标记的尿素被分解为带标记的 CO_2 呼出，通过检测呼出气体中的核素标记 CO_2 ，即可判断是否存在Hp感染。



同位素基本概念

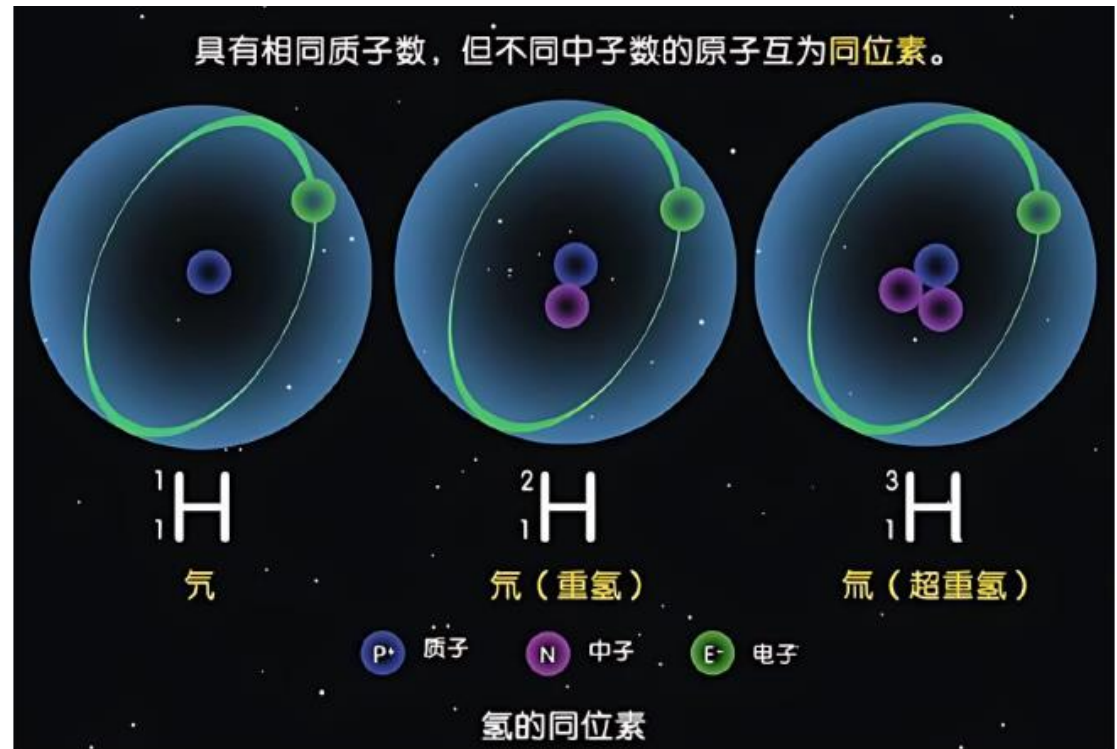
同位素，具有相同质子数，不同中子数的同一元素的不同原子互为同位素，在元素周期表上占有同一位置，由于最外电子数相等，所以化学性质是相同的，只是原子的质量不同。

六同：

- ✓ 同一元素，
- ✓ 质子数相同，
- ✓ 核电荷数相同，
- ✓ 核外电子数相同，
- ✓ 在周期表的位置相同，
- ✓ 化学性质相同。

三不同：

- ✓ 中子数不同，
- ✓ 质量数不同，
- ✓ 物理性质不同。





同位素基本概念

稳定性同位素：原子核结构稳定，**不发生衰变**，没有放射性的同位素，无辐照伤害、安全、不受半衰期的影响，可适用于长时间的示踪实验。目前有**300多个**。同种元素，可以有若干种不同的核素。绝大多数的元素有同位素，只较少数的没有，如：**Na、Al、F**等。

(目前元素周期表：118种元素，1800种核素)。

放射性同位素：原子核结构不稳定，**自发进行核衰变**，发射出粒子或射线并释放一定能量，如放出 α 、 β 、 γ 等射线，直至变成另一种稳定元素，具有一定的半衰期。属毒类，对人体有辐射损伤作用，应用要比稳定同位素广泛。已发现有**1200个以上**。

(原子序数83以后的所有元素都具有天然放射性)

(稳定同位素中部分是由放射性同位素通过衰变后形成的稳定产物)

如：碳有3种常见的同位素，碳-12、碳-13和碳-14 (C-12、C-13、C-14)，C-12和碳C-13是稳定的同位素，也就是过多少年它都还在那里；($> 10^{17}a$) C-14则为放射性元素，不稳定，自发衰变，半衰期为5730年，也就是过了5730年后，C-14就会有一半衰变成了氮-14。

(C-14的是由宇宙射线中的中子轰击氮-14原子核，使其转变为碳-14)



放射性同位素基本概念

放射性元素的衰变

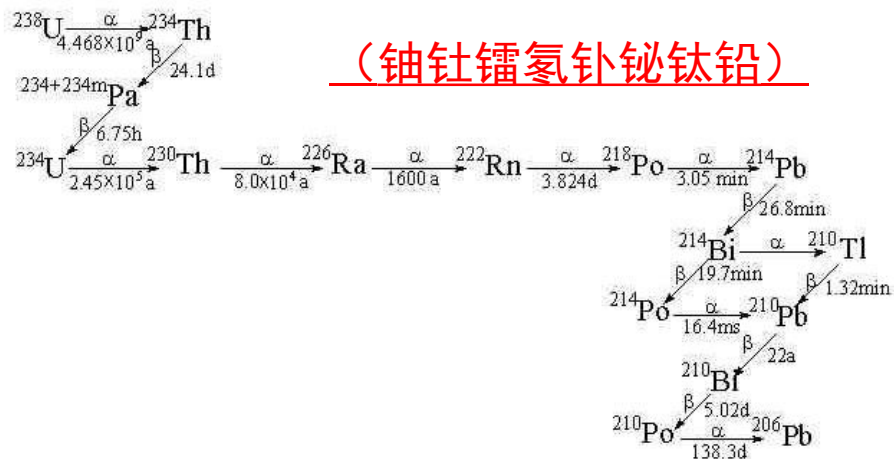
原子核放出 α 粒子或 β 粒子，由于核电荷数变了，它在周期表中的位置就变了，变成另一种原子核。

定义：一种元素经过放射过程变成另一种元素的现象。

放射性元素衰变的三大规律：

1. 衰变过程遵循质量数守恒和电荷数守恒，
2. 每发生一次 α 衰变，质子数、中子数均减少2。
3. 每发生一次 β 衰变，中子数减少1，质子数增加1。

铀经过8次 α 衰变和6次 β 衰变后，**变成铅**，用时约45亿年。





稳定同位素基本概念

Periodic Table of the Elements

1 H																	2 He																												
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne																												
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar																												
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr																												
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe																												
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn																												
87 Fr	88 Ra	89 Ac	104 Unq	105 Unp	106 Unh	107 Uns	108 Uno	109 Une	110 Unn																																				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>58 Ce</td><td>59 Pr</td><td>60 Nd</td><td>61 Pm</td><td>62 Sm</td><td>63 Eu</td><td>64 Gd</td><td>65 Tb</td><td>66 Dy</td><td>67 Ho</td><td>68 Er</td><td>69 Tm</td><td>70 Yb</td><td>71 Lu</td> </tr> <tr> <td>90 Th</td><td>91 Pa</td><td>92 U</td><td>93 Np</td><td>94 Pu</td><td>95 Am</td><td>96 Cm</td><td>97 Bk</td><td>98 Cf</td><td>99 Es</td><td>100 Fm</td><td>101 Md</td><td>102 No</td><td>103 Lr</td> </tr> </table>																		58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr
58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu																																
90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr																																

Legend:

- hydrogen (black)
- alkali metals (orange)
- alkali earth metals (red)
- transition metals (purple)
- poor metals (green)
- nonmetals (blue)
- noble gases (pink)
- rare earth metals (teal)



传统的稳定同位素



非传统的稳定同位素

由于分析精度有限，早期质谱仪多用于C、H、O、N和S等较轻元素而较少用于重元素的同位素测定，该几种元素也因此很长时间内被学界默认为**传统稳定同位素**。



稳定同位素技术分类

根据应用原理可分为两种：

富集稳定同位素示踪技术

将特异性富集了某同位素的物质加入到各种化学的、生物的研究体系中，并检测含有特定同位素的化合物，可以示踪该元素的转化过程，反映其环境行为。

如：将稳定同位素 ^{13}C 的自然丰度值1.108%atom增高到5.108%atom 以上，含此同位素 ^{13}C 的化合物即可作为 ^{13}C 标记物，将其加入到研究体系中，通过检测含 ^{13}C 的物质可了解该元素在各库中的迁移、转化过程。

稳定同位素自然丰度技术

利用测定化合物中特定元素的天然稳定同位素组成的变化开展研究。

由于同位素原子或化合物之间存在物理化学性质上的差异，在物理、化学及生物作用过程中同位素会以不同比例分配于不同物质中，即发生**同位素分馏效应**。将化合物元素的同位素组成作为一种**指纹特征**，就可以获取化合物的环境行为信息。

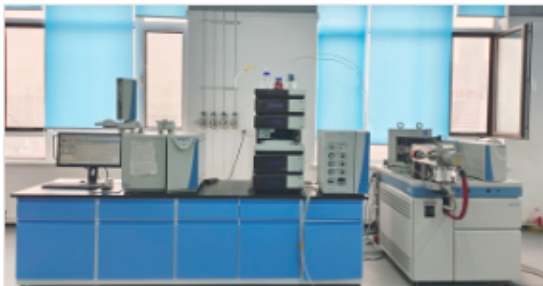
一般化学反应中，轻元素分子比重同位素分子要易于发生反应

如：在碳的有机循环中，轻同位素容易摄入有机质（如烃、石油中富含 ^{12}C ）中，而在无机循环中，重同位素倾向于富集在无机盐（如碳酸盐富含 ^{13}C ）中，导致碳同位素出现明显的分馏现象。



稳定同位素自然丰度技术

- **同位素丰度**：指自然界存在的某一元素中各同位素所占的原子百分比
如： $^{16}\text{O}=99.762\%$ ， $^{17}\text{O}=0.038\%$ ， $^{18}\text{O}=0.204\%$
- **R值-同位素比值**：某一元素相对丰度的比值=重同位素丰度/轻同位素丰度=R
如： $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}=0.200/99.762=0.002$
(R值非常低、冗长，不便于比较，实际常采用 δ 值来表示同位素组成。)
- **δ 值**：样品的同位素比值 (R_{sp}) 与标准物质的同位素比值 (R_{st}) 的千分差值：
$$\delta (\%) = \frac{R_{\text{样品}} - R_{\text{标准}}}{R_{\text{标准}}} \times 1000 = [(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}) - 1] \times 1000$$
- **同位素组成**：指样品中某一种元素的各种同位素的相对含量。
可用丰度表示，也可用比值R或 δ 值表示。
- **δ 值的测定**：稳定同位素比值质谱仪 (**IRMS**) 精确测量样品中同位素的相对丰度。



稳定同位素比值质谱仪 (Thermo Fisher MAT 253)

仪器配置：主机、接口、Flash EA、LC-Isolink

应用范围：土壤和植物等固体样品中 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ ，水中 δD 、 $\delta^{18}\text{O}$ ，水中DOC、可溶性糖、有机酸等水溶性化合物单体中 $\delta^{13}\text{C}$ 等测定

技术指标：质量范围 (m/z) 1-150，加速电压10kV，精度 LC-Isolink
 $\delta^{13}\text{C} \leq 0.3\text{‰}$ ，Flash EA $\delta^{13}\text{C} \leq 0.2\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N} \leq 0.3\text{‰}$ ， $\delta^{18}\text{O} \leq 0.3\text{‰}$ 、 $\delta\text{D} \leq 2.0\text{‰}$



稳定同位素自然丰度技术

δ 值为正值时，样品同位素丰度高于标准样品，为负值时则反。

定义 δ 值的意义：① 因为自然界的稳定同位素组成的变化很微小，用 δ 值可以明显表示变化的差异；② 便于全世界范围内数据大小的对比。

元素	δ 符号	测量比率(R)	国际标准物质	R值, 国际标准
H	δD	$^2D/^1H$	标准平均大洋海水 (SMOW)	0.00015575
			标准南极轻降水 (SLAP)	0.000089089
C	$\delta^{13}C$	$^{13}C/^{12}C$	Pee Dee Belemnite (PDB) [美国南卡罗来纳州白垩纪皮狄组层位中的拟箭石化石]	0.0112372
N	$\delta^{15}N$	$^{15}N/^{14}N$	大气氮气	0.0036765
O	$\delta^{18}O$	$^{18}O/^{16}O$	标准平均大洋海水 (SMOW)	0.0020052
			Pee Dee Belemnite (PDB) [碳酸盐样品氧同位素分析]	0.0020671
			标准南极轻降水(SLAP)	0.0018939
S	$\delta^{34}S$	$^{34}S/^{32}S$	Canyon Diablo Triolite (CDT) 铁陨石中的陨硫铁	0.0450045

国际原子能委员会 (IAEA)；美国国家标准和技术研究所 (NIST)

作标准的样品应具备同位素成分均匀、数量大、便于采样和同位素成分测定等特点。



稳定同位素自然丰度技术

应用举例：

鉴别真假大闸蟹



同一只中华绒螯蟹不同部位
锶 (Sr) 同位素组成一致。
来自同一产地的中华绒螯蟹
Sr同位素组成均一，而不同
产地的中华绒螯蟹具有不同的
Sr同位素组成。进一步研究
发现，中华绒螯蟹的Sr同
位素组成与产地的水源相似，
不受外来饲料的影响。螃蟹
的Sr同位素组成完全由生长
长期所饮用的水源决定。

也就是说，通过标定一只螃
蟹中的Sr同位素含量，就能
准确鉴别出这只蟹是否为真
正的阳澄湖大闸蟹。

最近，有地质学家利用Sr同位素对中华绒螯蟹进行了溯源，获得了很好的效果。研究者采集了四个湖区（阳澄湖、太湖、固城湖及兴化）57个中华绒螯蟹及其生长水域的水样和饲料样品，对其进行了精细的Sr同位素分析。



中国科学技术大学地球和空间科学学院黄方教授课题组长期研究结果。

Hao-Ming Yin, Fang Huang, Jun Shen, Hui-Min Yu. Using Sr isotopes to trace the geographic origins of Chinese mitten crabs[J]. Acta Geochimica, 2020, 39(03): 326-336



富集稳定同位素示踪技术

SIP技术基本原理:

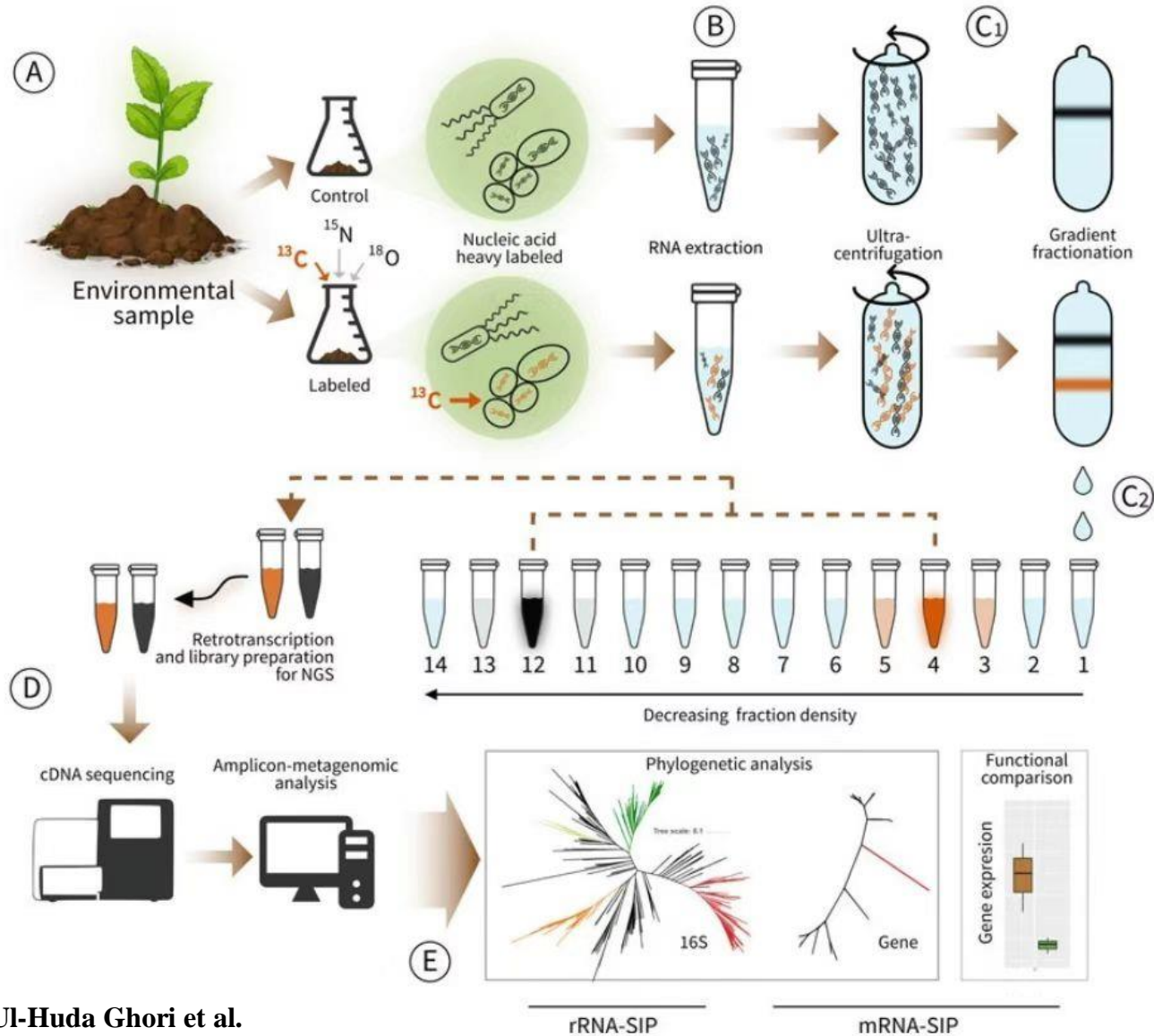
在土壤中添加含有稳定性同位素标记的代谢底物，土壤中利用该标记底物的微生物细胞在其生长繁殖过程中同化合成含标记元素的生物标志物(DNA、RNA及 P LFA)。通过对生物标志物进行提取、分离、鉴定和比对分析，鉴别土壤中驱动特定生态过程的功能微生物。

常用作SIP标记的元素及其自然丰度

元素	同位素	自然丰度	样品来源
C	^{12}C	98.892	捷克扑利兹石灰石
	^{13}C	1.108	
N	^{14}N	99.635	大气中的氮气
	^{15}N	0.365	
O	^{16}O	99.762	大气中的氧气
	^{17}O	0.0374	
	^{18}O	0.2039	

- 规范术语：核素 ^{15}N 和核素 ^{13}C ，或氮的同位素 ^{15}N 和碳的同位素 ^{13}C

SIP技术实验流程

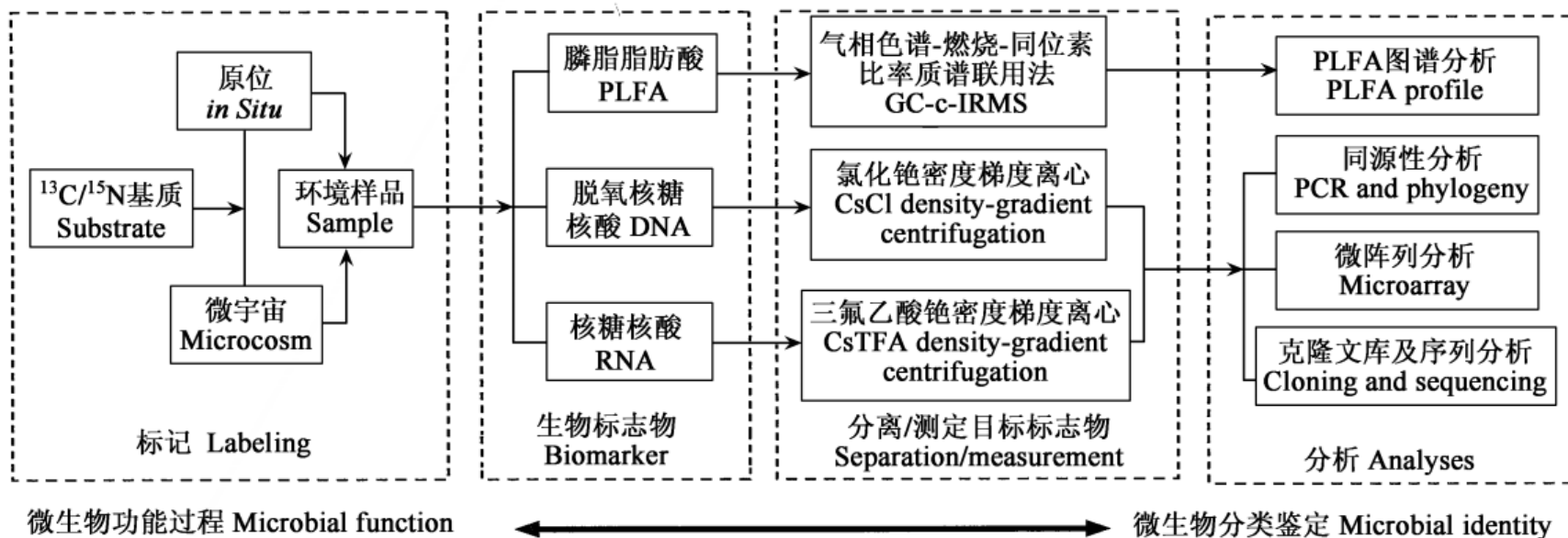




富集稳定同位素示踪技术

SIP技术路线：

SIP研究中常采用的生物标志物有三大类：**DNA** **RNA** **PLFA**





常采用的生物标志物

标志物	优点	缺点
DNA	<p>标记的^{13}C-DNA一定来自新产生的子代微生物细胞，是证明微生物原位生长并驱动生态过程的最直接证据。</p> <p>DNA的双链结构保证了遗传物质的稳定</p>	<p>经验表明，环境微生物基因组总DNA中^{13}C-DNA丰度达到20%，或者^{15}N-DNA达到50%，才可从环境微生物基因组总DNA中将标记DNA有效分离。</p> <p>自然环境中能被微生物利用的底物浓度通常很低，微生物大量分裂繁殖的可能性低。</p>
^{13}C 标记DNA 偏少解决办法	<ol style="list-style-type: none"> 1、增加同位素标记底物的浓度。但会产生富集偏差，即不能反映自然状态下目标污染物的代谢途径 2、延长SIP实验的培养时间。但是有可能出现交叉喂食的情况 3、向Cs CI 梯度溶液中加入合成或者天然^{13}C载体DNA (酵母菌或者古菌) 	



常采用的生物标志物

标志物	优点	缺点
RNA	<p>可以独立于细胞分裂而进行复制，因此可以在较短时间内灵敏的反映环境样品中功能微生物对同位素标记基质的利用状况。</p> <p>对环境样品中基质被同位素标记的程度以及浓度要求低，研究结果更接近原位状况。</p>	<p>一般来说从污泥、淤泥、森林土壤、河边土壤、稻田泥土、草地、池塘泥土等样品提取RNA比较难，RNA非常容易降解，对提取RNA非常不利的腐植酸还会影响后续的实验，限制了RNA—SIP的实际应用。</p>
解决办法	<p>Manefield等从¹³C-Phenol培养的环境样品中分离出DNA和RNA，发现¹³C-RNA合成的速度比¹³C—DNA快十倍，并且¹³C-RNA的合成与¹³C—Phenol降解关系密切。</p> <p>DNA-SIP和RNA-SIP联合应用可以相得益彰，在探查环境中功能微生物方面具有很大的潜力。</p>	



常采用的生物标志物

标志物	优点	缺点
PLFA	<p>不需密度梯度离心，可以减少操作过程中样品的损失。具有灵敏度高、重复性</p> <p>GC-C-IRMS对^c同位素丰度的分辨率可达到千分之一，即使很小的¹³C含量的差别也可以通过此方法分辨开。</p>	<p>PLFA特异性不高。不同种类的微生物可以合成相同的PLFA，同一种微生物在不同的环境条件中产生的PLFA也可能不同；对于缺乏PLFA图谱的微生物无法获知其具体的微生物种类。</p> <p>无法在更精细的微生物分类水平(种)上辨识区分，很难明确特定微生物类群。</p>
适合	<p>该技术较适用于环境样品中功能微生物数目少,生长速率低、只能同化吸收少量标记基质的情况，如：山地土壤微生物对大气中甲烷的利用、细胞数目较少，导致碳吸收利用率低的水体环境中微生物群落的研究。</p>	



SIP技术常用 ^{13}C -标记物

主要有三大类:

$^{13}\text{CO}_2$, 多用于植物-微生物相互作用对陆地生态系统碳循环、土壤中碳周转速率、稻田产甲烷机理及产甲烷菌的研究;

^{13}C -甲基化合物($^{13}\text{CH}_4$ 、 $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ 、 $^{13}\text{CH}_3\text{Br}$ 和 $^{13}\text{CH}_3\text{Cl}$), 多用于甲基营养菌(甲烷营养菌、甲醇营养菌、卤化甲烷营养菌)的研究;

^{13}C -多碳化合物(^{13}C -乙酸、 ^{13}C -葡萄糖、 ^{13}C -咖啡因、 ^{13}C -萘、 ^{13}C -菲、 ^{13}C -甲苯、 ^{13}C -苯酚、 ^{13}C -丙酸盐)。多用于多氯联苯(PCBs)、多环芳烃(PAHs)等有机污染物的生物降解过程和机理的研究。



SIP技术常用的标记物

标记物 (底物)	研究目的
葡萄糖、氨基酸	微生物对外源简单碳源的利用
秸秆、生物炭	微生物对外源复杂碳源的利用
有机污染物 (菲、五氯酚、多氯联苯等)	有机污染物的微生物降解
甲烷	甲烷氧化微生物研究
葡萄糖、蔗糖、纤维素、玉米 秸秆	参与土壤有机质激发分解 (激发效应) 的 微生物研究
$^{13}\text{CO}_2$ 标记植物	光合同化碳的根际微生物利用



常用标记物市场价格

您好，想问下 13C 同味素标记葡萄糖什么价

3000 元每克

15N 尿素？

10% 的尿素 80 元每克，50 克起售

13C, CO₂

3000 元每升

5L 以上 2500 元每升

货期多长时间？

现货

非常规定购，如 13C 标记一种农药？纤维素？

这个要看具体要求

13C 标记产品

- 1、葡萄糖 1900元/g
- 2、碳酸钠 360元/g
- 3、二氧化碳气体 2000元/L
- 4、甲烷气体 2000元/L

15N 标记

- 1、氯化铵 285元/g
- 2、氮气 3000元/L

18O 标记

- 1、水 245元/g
- 2、氧气 2500元/L

常用标记物种类

- 1、美国剑桥同位素**CIL** — 全国授权总代理
- 2、 ^{13}C 、 ^{18}O 、 ^{15}N 标记**试剂**和**气体**
- 3、稳定同位素 ^{13}C 、 ^{15}N **单标**或**双标**秸秆

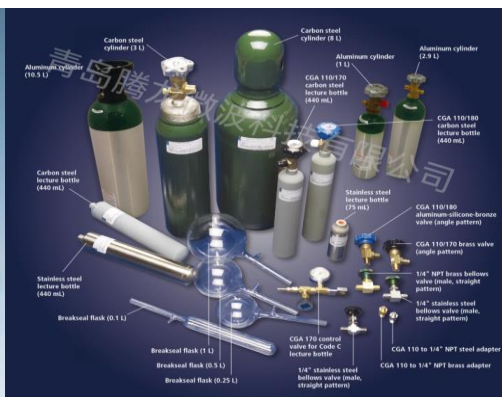
适用领域

土壤碳循环：有机质转化、起爆效应、土壤呼吸析源、 CH_4 排放析源、 CH_4 产生-传输过程。

土壤氮循环：秸秆氮去向、植物利用率、 NH_3 挥发、氮淋溶、硝化-反硝化过程。

动物秸秆代谢：碳、氮转化及利用效率、反刍动物和非反刍动物秸秆转化。

微生物：碳转化微生物、氮转化微生物、肠道微生物、碳利用效率、氮利用效率、微生物碳析源、微生物氮析源。





SIP技术存在的难题

- 与自然丰度同位素(^{12}C 、 ^{14}N)组成的DNA相比,
 ^{13}C 取代 ^{12}C 导致DNA分子量增加约2.8%-3.1%,浮力密度增加大约为0.051 g/mL;
 ^{15}N 取代 ^{14}N 导致DNA分子量增加约0.62%-1.51%,浮力密度约增加0.02 g/mL。
- DNA在氯化铯介质中的浮力密度与其GC含量呈正比
环境中微生物DNA的GC含量可能在30%-70%,其浮力密度之差可达0.0392 g/mL,几乎是 ^{15}N -DNA浮力密度增加量的两倍。

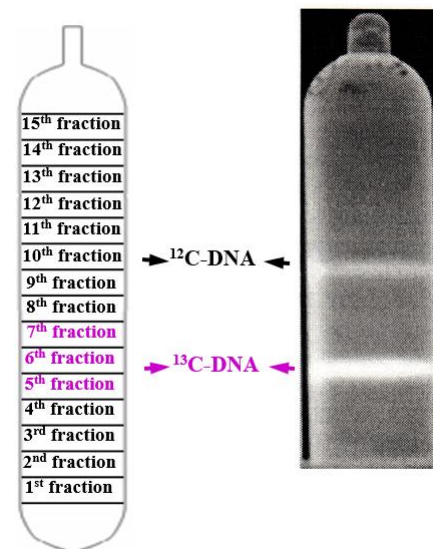
(贾仲君,2011,微生物学报)

- 氯化铯介质中超高速离心后2个相邻梯度区带的浮力密度差为0.004~0.006 g/mL。理论上,浮力密度差大于0.012 g/mL的两种DNA离心后相隔一个区带,能被有效分离。

(刘天琳、贾仲君等,2019,环境科学)

SIP技术使用过程中存在的3个难题:

- 1、标记和未标记DNA浮力密度梯度区域的模糊界定;
- 2、微生物基因组中具有高GC含量的非标记DNA组分对超高速密度梯度离心过程中分层的干扰;
- 3、鉴别低GC含量且分布在轻浮力密度梯度区的重要微生物类群。





定量稳定同位素示踪技术- qSIP

SIP技术与qSIP技术

SIP 技术—稳定性同位素探针技术

能够**鉴定**某些利用特定标记底物的微生物，但**不能定量分析**在同位素吸收过程中发生变化的所有微生物类群，通常被认为是一种**定性技术**。

qSIP 技术—定量稳定性同位素探针技术

对所有组分微生物类群进行**绝对定量和测序分析**，基于 GC 含量和未标记处理 DNA 密度曲线量化参与吸收转化的 DNA 同位素丰度。

qSIP技术消除了 SIP 技术使用过程中存在的 3 个难题：

- 1) 标记和未标记 DNA 浮力密度梯度区域的模糊界定；
- 2) 微生物基因组中具有**高 GC 含量**的非标记 DNA 组分对超高速密度梯度离心过程中分层的干扰；
- 3) 鉴别**低 GC 含量**且分布在轻浮力密度梯度区的重要微生物类群。

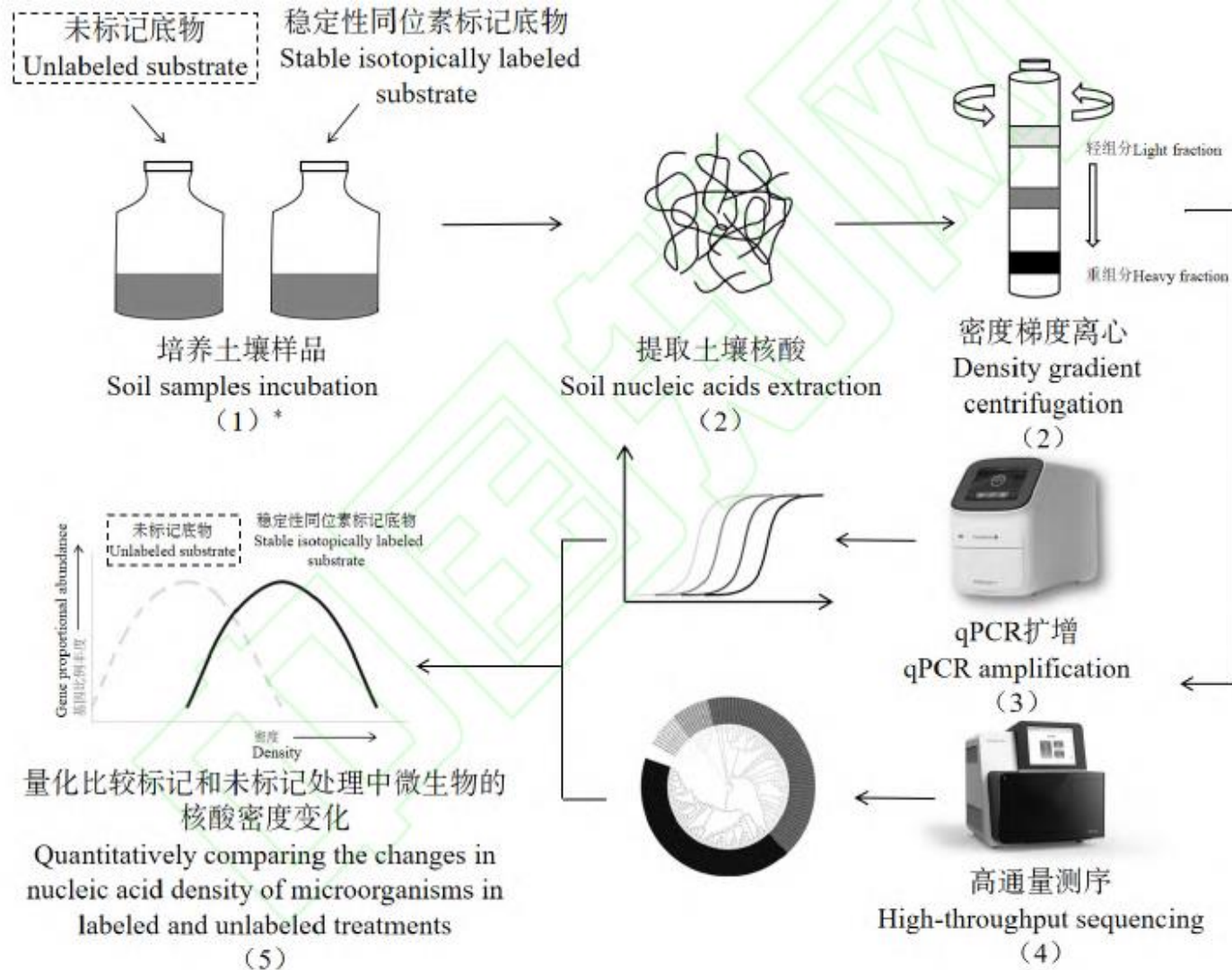


SIP与qSIP技术实验步骤

技术主要步骤：

- qSIP
- SIP
- 1、在原位环境或者实验室微宇宙条件下，向一部分土壤样品添加稳定性同位素，另一部分土壤样品设置为对照组并添加未被标记的底物；
 - 2、将两组土壤样品培养一定时段后提取微生物生物标记物，经超速离心、分级、纯化后，制备 DNA 或 cDNA 文库；
 - 3、使用特定引物，利用 qPCR 技术测定各密度组分中微生物目标基因总拷贝数；
 - 4、通过高通量测序平台，对各密度组分含有的目标基因进行测序；
 - 5、根据 GC 含量和序列信息计算样本中各微生物类群的核酸加权平均密度及其变化。

qSIP技术实验流程



(定量数据分析见Hungate BA, *et al*, 2015, AEM)

图1 qSIP 技术实验步骤示意图
Fig.1 A schematic diagram of qSIP technique.

(邹文萱等, 2021, 应用生态学报)



qSIP

定量数据分析步骤

(Hungate BA, et al, 2015, AEM)

1、(序号1~4)

根据细菌拷贝数和基于测序的细菌类群相对丰度计算特定标记细菌类群核酸同位素密度变化；

2、(序号5~9)

根据浮力密度计算特定细菌类群GC含量和DNA单链分子量；

3、(序号10~12)

根据标记和未标记DNA密度变化曲线计算被标记的同位素元素丰度。

量化环境样品特定微生物吸收的同位素。

生物地球化学组 王超团队

表1 基于¹³C、¹⁸O标记处理qSIP数据分析步骤
Table 1 Calculation step of qSIP based on ¹³C and ¹⁸O isotope probing

序号 No.	参数 Parameter	公式 Formula*	说明 Explanation
1	计算细菌类群 <i>i</i> 的第 <i>j</i> 个重复第 <i>k</i> 个密度组分16S rRNA基因拷贝数 To calculate the total number of 16S rRNA gene copies per μL for bacterial taxon <i>i</i> in density fraction <i>k</i> of replicate <i>j</i>	$y_{ijk} = p_{ijk} \cdot f_{jk}$	<i>p_{ijk}</i> 指细菌类群 <i>i</i> 第 <i>j</i> 个重复第 <i>k</i> 个密度梯度16S rRNA基因序列相对丰度 Proportion of the total number of 16S rRNA gene copies per μL that are taxon <i>i</i> in fraction <i>k</i> of replicate <i>j</i> (unitless); <i>f_{jk}</i> 指第 <i>j</i> 个重复第 <i>k</i> 个密度组分16S rRNA基因拷贝数 Total number of 16S rRNA gene copies per μL (all taxa combined) in fraction <i>k</i> of replicate <i>j</i> (copies · μL ⁻¹)
2	计算细菌类群 <i>i</i> 第 <i>j</i> 个重复所有密度组分16S rRNA基因总拷贝数 To calculate total number of 16S rRNA gene copies per μL of taxon <i>i</i> in replicate <i>j</i> (copies · μL ⁻¹)	$y_{ij} = \sum_{k=1}^K y_{ijk}$	
3	计算细菌类群 <i>i</i> 重复 <i>j</i> 的密度 To calculate the density for bacterial taxon <i>i</i> of replicate <i>j</i>	$W_{ij} = \sum_{k=1}^K x_{jk} \cdot \left(\frac{y_{ijk}}{y_{ij}} \right)$	<i>x_{jk}</i> 指细菌类群第 <i>j</i> 个重复第 <i>k</i> 个密度梯度的密度系数 Density of fraction <i>k</i> of replicate <i>j</i> (g · cm ⁻³)
4	计算某一细菌类群同位素标记处理和未标记处理间密度差异 To calculate difference in observed densities of taxon <i>i</i> for the labeled and unlabeled treatments (g · cm ⁻³)	$Z_i = W_{LABi} - W_{LIGHTi}$	<i>W_{LABi}</i> 指同位素标记处理的所有重复的加权平均密度 Mean observed weighted average density for taxon <i>i</i> in the labeled treatment (g · cm ⁻³); <i>W_{LIGHTi}</i> 指未标记处理的所有重复的加权平均密度 Mean observed weighted average density for taxon <i>i</i> in the unlabeled (g · cm ⁻³)
5	计算每个细菌分类单元 <i>i</i> 的GC含量 To calculate guanine-plus-cytosine content of taxon <i>i</i> (unitless)	$G_i = \frac{1}{0.083506} \cdot (W_{LIGHTi} - 1.646057)$	基于纯菌培养试验的GC含量与未标记处理浮力密度线性关系 The linear relationship between GC content (<i>G_i</i> , expressed as a proportion) and unlabeled buoyant density (<i>W_{LIGHTi}</i>) based on pure culture
6	计算未标记处理DNA的平均分子量 To calculate the average molecular weight of a single strand of DNA	$M_{LIGHTi} = 0.496G_i + 307.691$	根据GC含量计算 Calculation based on GC content
7	包含16S rRNA基因的细菌类群 <i>i</i> 被 ¹⁸ O完全标记后的DNA理论分子量 Theoretical mol wt of the DNA fragment containing the 16S rRNA gene for taxon <i>i</i> assuming maximum labeling by the heavy isotope (g · mol ⁻¹)	$M_{HEAVYMAXi} = 12.07747 + M_{LIGHTi}$	每个DNA核苷酸对共有12个O原子，同时基于每个额外的中子质量数为1.008665 g · mol ⁻¹ 计算，因此增加的最大分子数为12.07747 g · mol ⁻¹ There are 12 oxygen atoms per DNA nucleotide pair, and given the molecular weight of each additional neutron is 1.008665 g · mol ⁻¹ , the maximal increase in molecular weight is 12.07747 g · mol ⁻¹
8	计算分类单元 <i>i</i> 的每个DNA核苷酸中平均碳原子数 To calculate the average number of carbon atoms per DNA nucleotide for taxon <i>i</i>	$H_{CARBONI} = -0.5G_i + 10$	每个DNA核苷酸的碳原子随GC含量变化。G、A、T中有10个碳原子，C中只有9个碳原子 The number of carbon atoms per DNA nucleotide varies with GC content. There are 10 carbon atoms in G, A, and T but only 9 in C
9	包含16S rRNA基因的细菌类群 <i>i</i> 的DNA核苷酸被 ¹³ C完全标记的理论分子量 Theoretical mol wt of the DNA fragment containing the 16S rRNA gene for taxon <i>i</i> assuming maximum labeling by the heavy isotope (g · mol ⁻¹)	$M_{HEAVYMAXi} = -0.4987282G_i + 9.974564 + M_{LIGHTi}$	¹³ C完全取代碳原子会使G、A和T的分子量增加9.974564 g · mol ⁻¹ ，而使C的分子量增加8.977107 g · mol ⁻¹ Complete replacement of carbon atoms with ¹³ C increases the molecular weight by 9.974564 g · mol ⁻¹ for G, A, and T and by 8.977107 g · mol ⁻¹ for C
10	计算同位素标记处理的细菌类群 <i>i</i> 的DNA分子量 To calculate the molecular weight of DNA for taxon <i>i</i> in the labeled treatment	$M_{LABi} = \left(\frac{Z_i}{W_{LIGHTi}} + 1 \right) \cdot M_{LIGHTi}$	

(邹文萱等, 2021, 应用生态学报)



DNA-SIP实验操作流程

标记（微宇宙培养实验）



超高速密度梯度离心

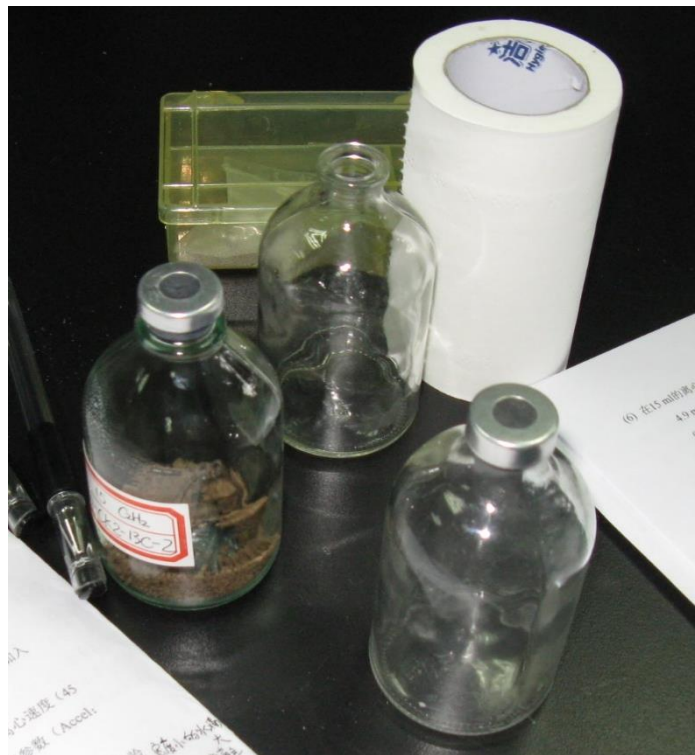


DNA回收及检测



定量PCR判定富集程度

微宇宙培养实验



取定量新鲜土壤（5.0g干土）置于瓶中，调节到田间土壤最大持水量的**60%**，用橡胶塞密封。

用注射器打入标记的**CO₂**，每隔1周换气，重新打入标记的**CO₂**，连续培养**8**周。

培养结束后，土壤在**-20℃**保存，进行后续实验。

微宇宙培养实验

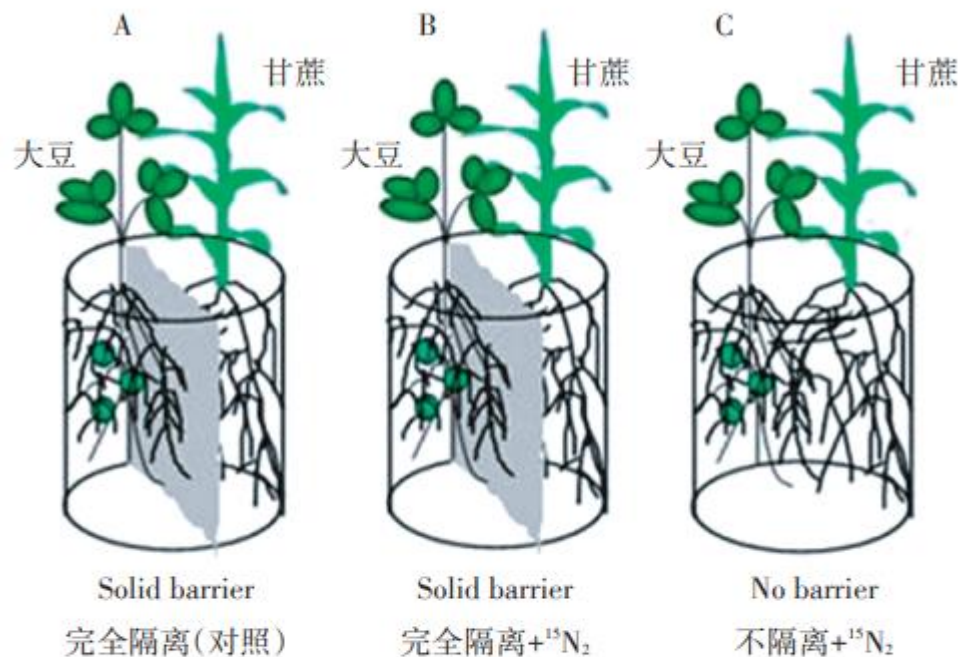
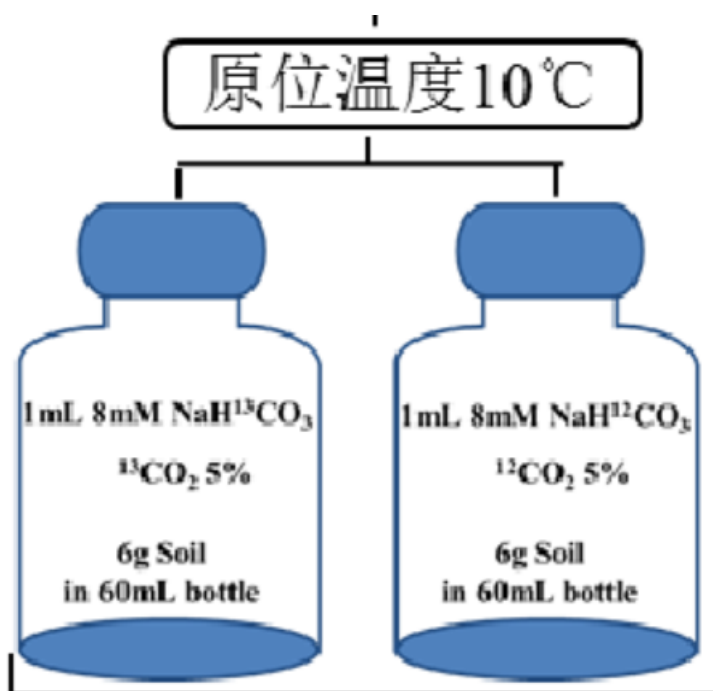
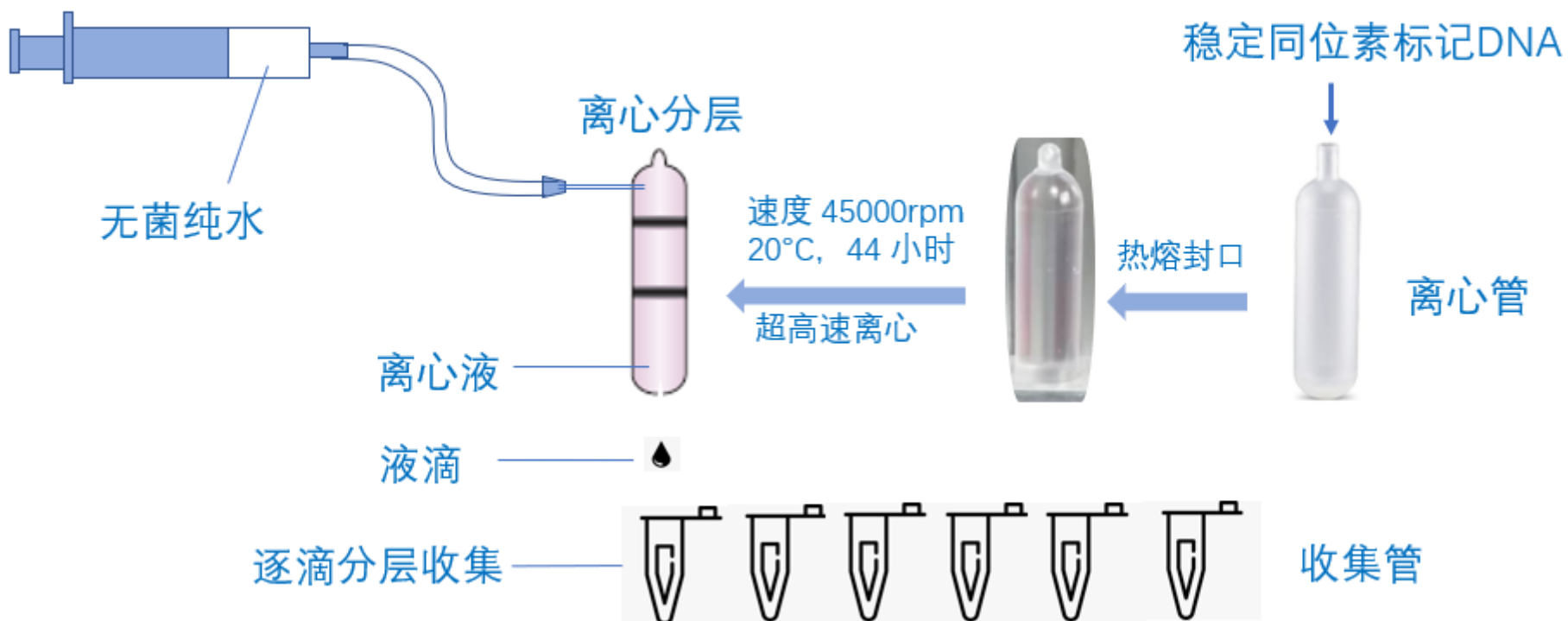


图1 根系隔离 ^{15}N 标记盆栽试验模式图^[17]

Figure 1 Schematic diagram of ^{15}N label and root separation in pots^[17]



超高速离心分层收集离心液的流程





超密度离心溶液配制

1、超密度离心溶液所需试剂

氯化铯溶液 (1.85g/ml密度)

DNA样品 (2-5ug)

Gradient Buffer (GB) (0.1M Tris-HCL, 0.1MKCL, 1.0mM EDTA)

2、在15ml离心管中，依次加入：

4.9ml CsCl

1.0ml GB

2.0ug DNA

用涡旋混合器混合均匀。

3、混合液折光率测定

采用折光仪测定：超高速离心溶液目标折射率：

nD-TC模式下， 1.4029 ± 0.0002

- 如值偏大，添加GB (20u约为一个添加单位)
- 如值偏小，添加CsCl GB(20ul约为一个添加单位)





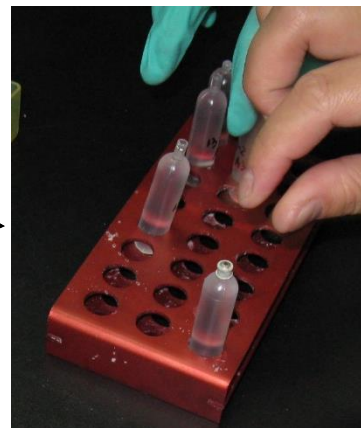
超密度离心溶液配制

4、 将调好折光率的
溶液由注射器转移到
5.1ml的超高速
离心管中。



超密度离心溶液配制

5、配平（两管之差小于0.01g）和封口



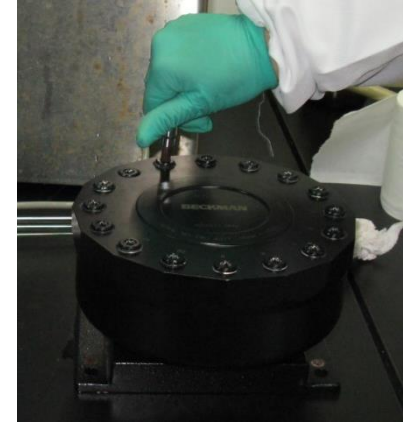
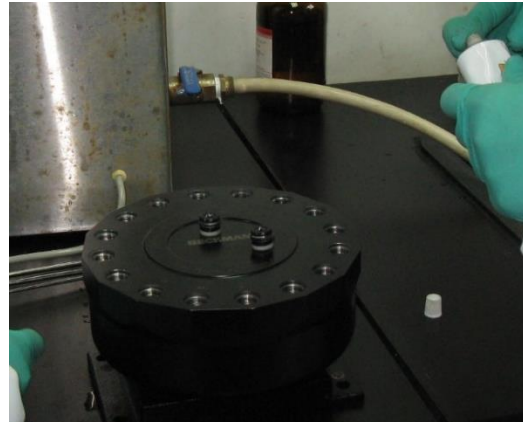
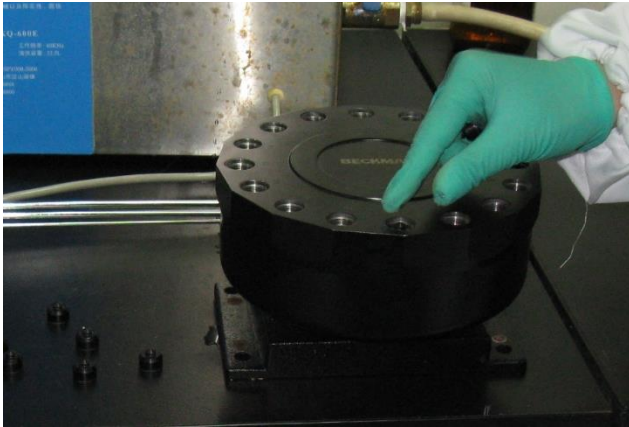
超高速密度梯度离心



基本参数是：

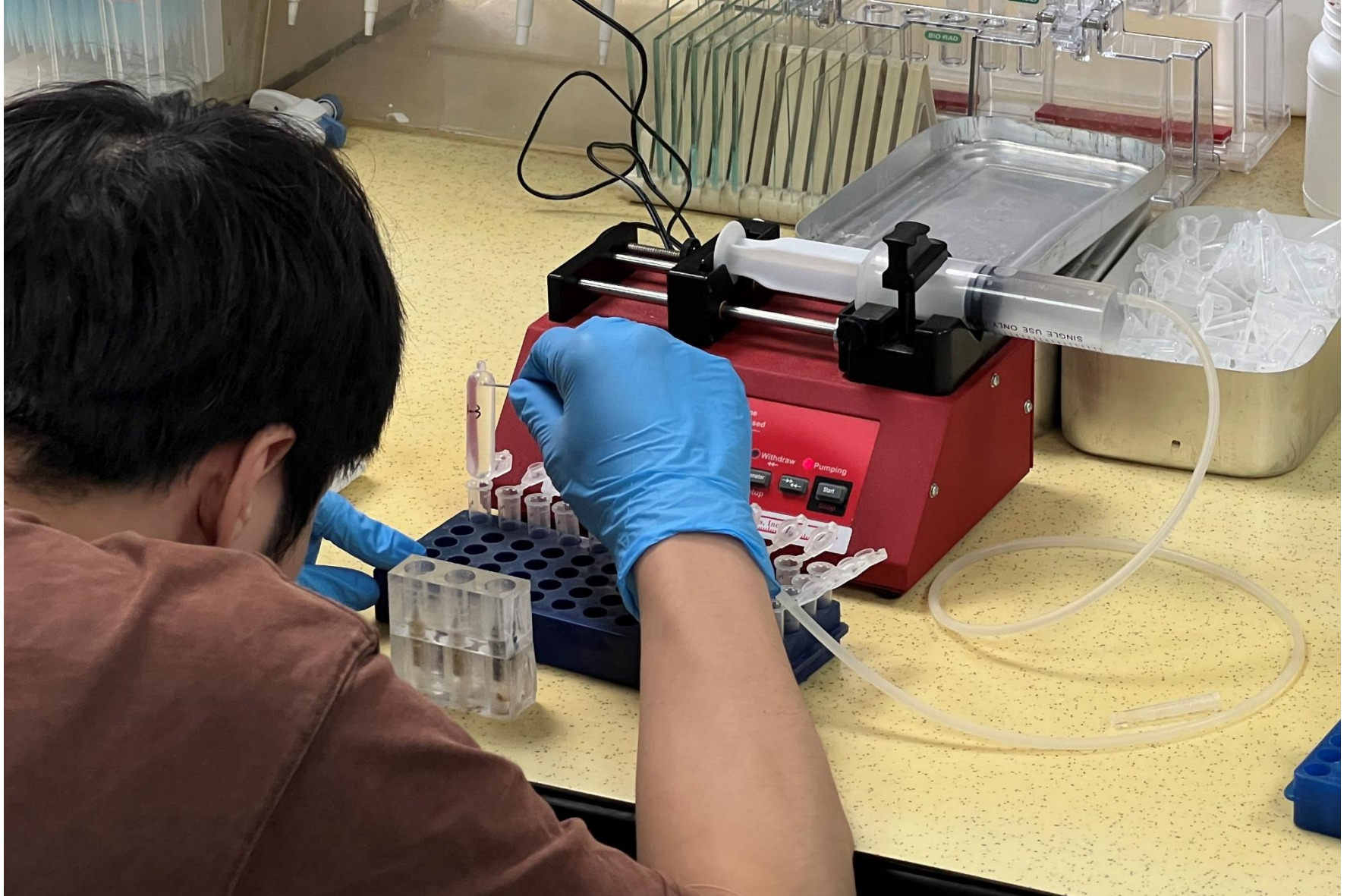
- 44小时，
- 20°C，
- 速度45 krpm (190000×g)
- time: hold，
- Accel: 9；
- Decel: no break
(Neufeld, et al., 2007)。

离心机上样和取样



先上内盖适配器，将外盖抹润滑油后拧紧，扭力要到达120

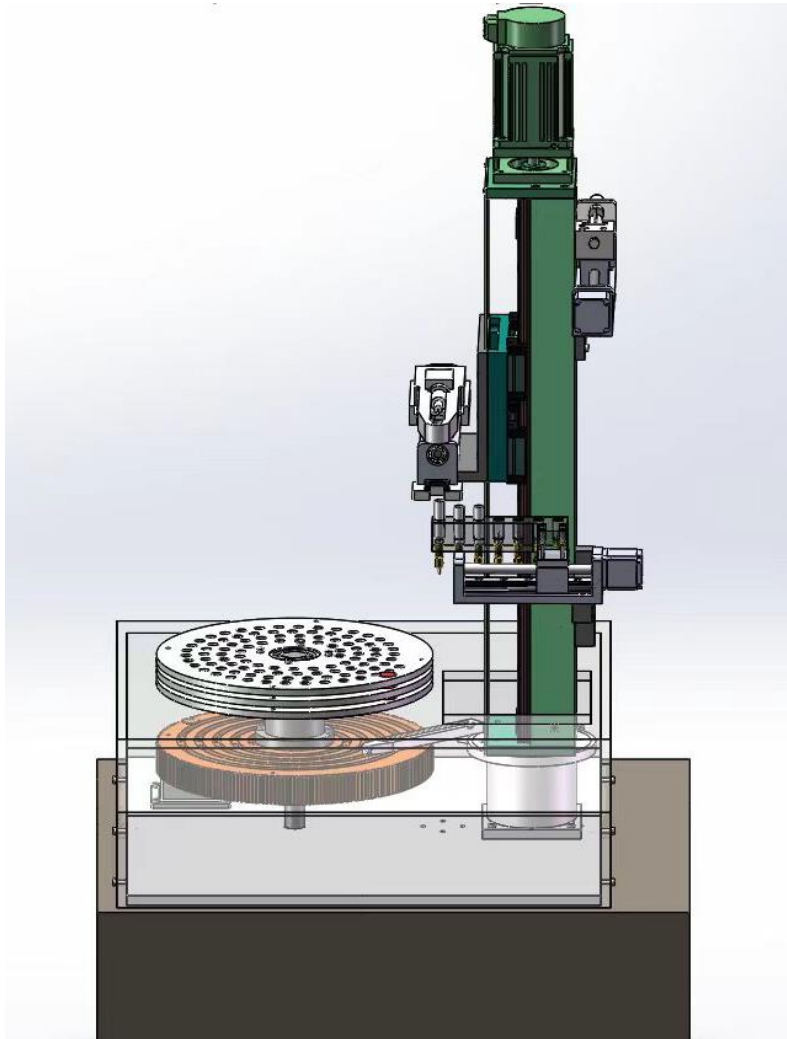
手动收集各层离心液





自动收集各层离心液

自动分层收集器





分层样品测定

- 1、 检测各层折光率， 计算浮力密度
- 2、 各层样品DNA纯化， 测定核酸浓度
- 3、 定量PCR判定 ^{13}C -DNA 富集程度





^{13}C -DNA 鉴定方法

方法一、DNA 浓度分析。

NanoDrop 测定不同浮力密度DNA 的浓度。与 ^{12}C -CH₄对照处理的重浮力密度DNA 相比， ^{13}C -CH₄ 标记处理样品的重浮力密度DNA 数量通常较高，然而，这一指标通常很难作为DNA-SIP 成功的主要标准。

方法二、常规PCR 和实时荧光定量PCR 分析。

^{13}C -CH₄ 标记处理土壤中甲烷氧化微生物DNA 为 ^{13}C 所标记，超高速离心后 ^{13}C -DNA 将在试管下部重浮力密度梯度区带中相对富集，利用甲烷氧化细菌特异的pmoA 功能基因引物，定性（常规PCR）或者定量（实时荧光PCR）分析pmoA 基因在不同浮力密度DNA 中的数量变化规律，并与 ^{12}C -CH₄ 对照处理相比，根据pmoA 功能基因在不同浮力密度梯度区带中的位移，即可准确判定 ^{13}C -DNA 在不同浮力密度区带中的位置及其富集程度。

方法三、高通量测序分析（目前最准确的方法）。

通过454 高通量测序技术，检测各层中微生物16S rRNA 基因组成，分析目标标记微生物占该层总微生物的比列。如果标记成功，目标微生物占每层总微生物的比值会随着浮力密度的增加而显著增加。



各层样品折光率及浮力密度测定

测定15层液体每层的折光率，评价分层效果，并通过离心溶液密度计算的公式推导各层液体的浮力密度；



收集管编号	折光率 (nD-TC)	浮力密度 (g/ml)	标准差
1	1.4056	1.757	0.000129
2	1.4055	1.756	0.000096
3	1.4053	1.754	0.000050
4	1.4051	1.751	0.000050
5	1.4050	1.750	0.000096
6	1.4048	1.748	0.000058
7	1.4045	1.745	0.000050
8	1.4043	1.742	0.000000
9	1.4041	1.740	0.000058
10	1.4038	1.737	0.000050
11	1.4036	1.734	0.000050
12	1.4034	1.732	0.000058
13	1.4032	1.730	0.000058
14	1.4029	1.726	0.000082
15	1.4027	1.724	0.000050

浮力密度 = $-75.9318 + 99.2031x - 31.2551x^2$ x表示折光率



各层DNA纯化及含量测定

1. 每层中加入550 μl 的PEG6000溶液，头尾倒置若干次混匀溶液，室温静置2h或者37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴1h，沉淀DNA；
2. 在15-20 $^{\circ}\text{C}$ 下13000 $\times g$ 高速离心30 min，除去上清液；
3. 加入500 μl 70%乙醇清洗DNA沉淀，离心10 min，除去上清液；
4. 重复步骤3（进一步去除氯化铯，同时去除PEG）；
5. 于室温干燥沉淀DNA 大约15 min；
6. 确保DNA沉淀中无液体存在后，将其溶于30 μl TE缓冲液，零下20摄氏度保存。

可用合适的纯化试剂盒替代PEG沉淀法

收集管 编号	浮力密 度 (g/ml)	核酸 浓度 (ng/ μl)	核酸含 量 (μg)	比值 (%)
1	1.757	2.20	0.76	0.02
2	1.756	0.40	0.14	0.00
3	1.754	0.60	0.20	0.01
4	1.751	1.1	0.37	0.01
5	1.750	0.20	0.07	0.00
6	1.748	0.40	0.14	0.00
7	1.745	0.90	0.30	0.01
8	1.742	2.10	0.69	0.02
9	1.740	8.40	3.00	0.09
10	1.737	16.80	6.37	0.19
11	1.734	30.20	11.82	0.35
12	1.732	14.70	5.84	0.17
13	1.730	7.10	2.81	0.08
14	1.726	3.30	1.30	0.04
15	1.724	0.53	0.20	0.01



常规PCR检测各层基因分布规律

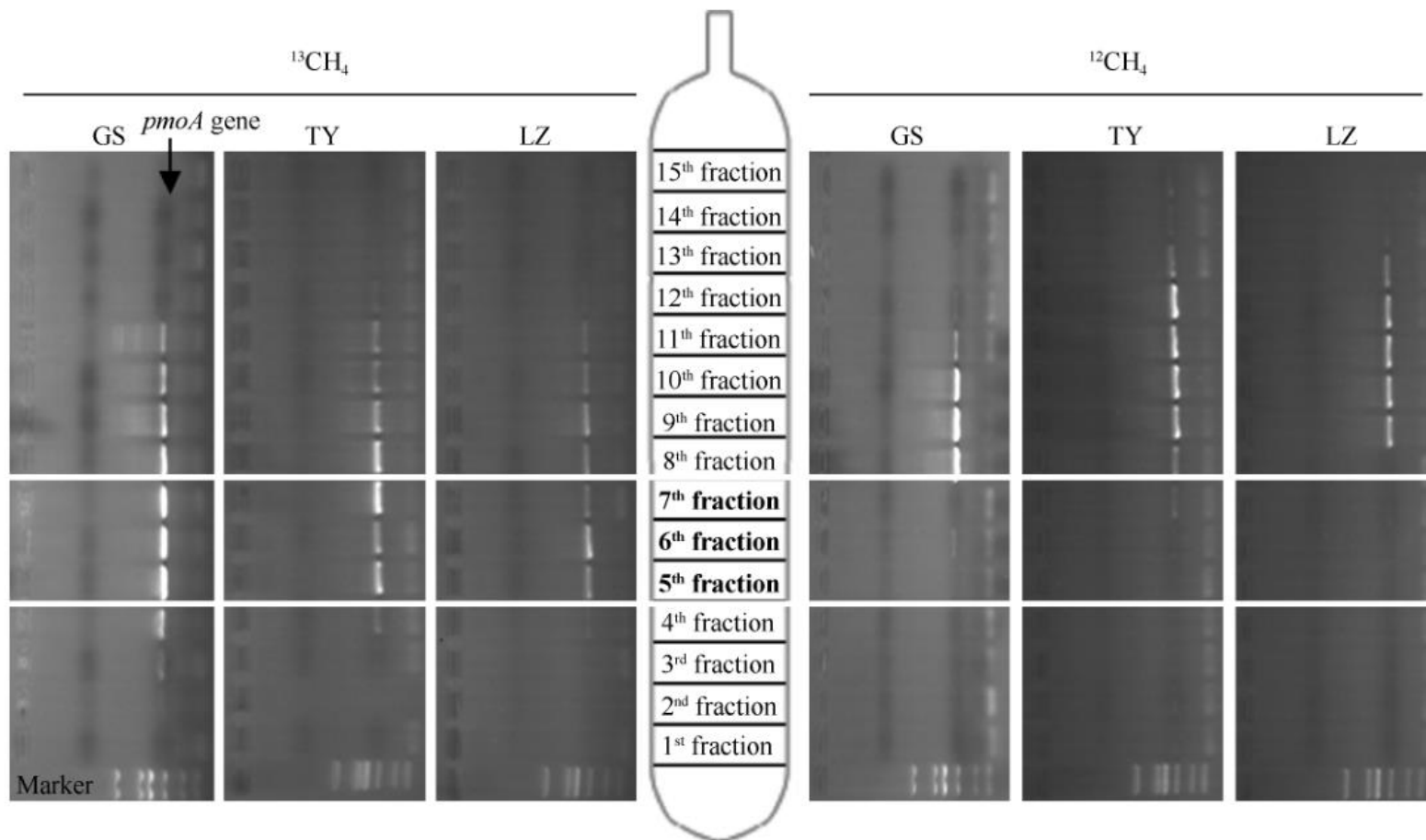


图 4 甲烷氧化菌特异功能基因 *pmoA* 的 PCR 扩增产物在不同浮力密度 DNA 中的分布规律

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of *pmoA* genes amplicons from the ultracentrifuged DNA over the entire density range of SIP gradient from microcosms incubated with $^{13}\text{CH}_4$ and $^{12}\text{CH}_4$.

定量PCR检测各层基因拷贝数

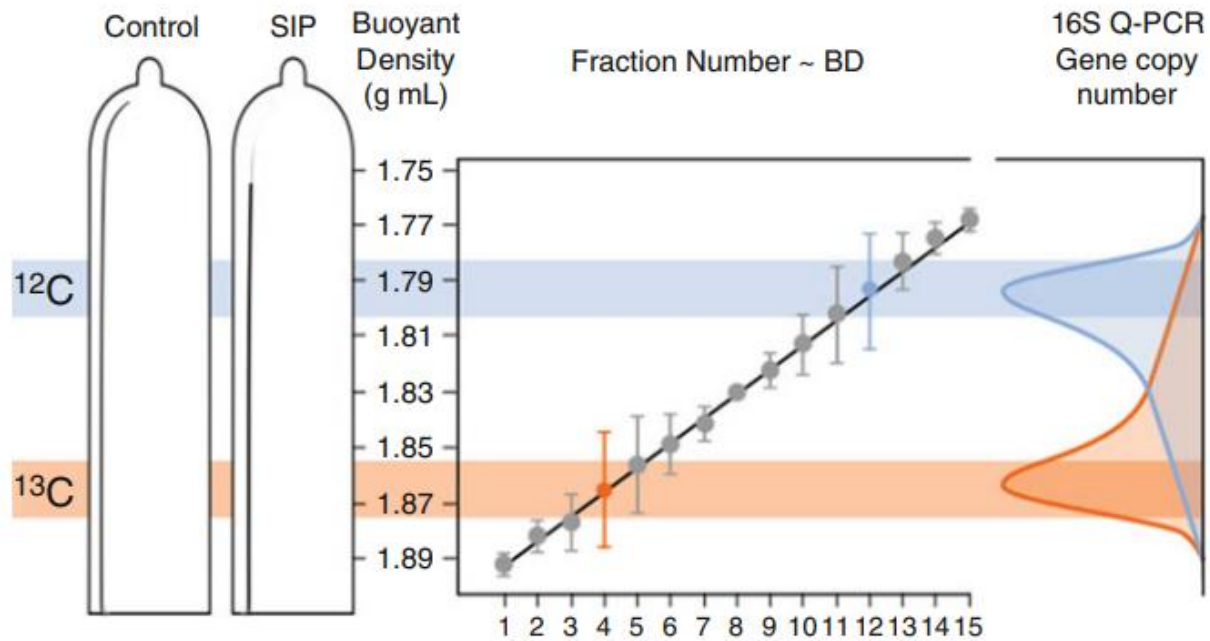
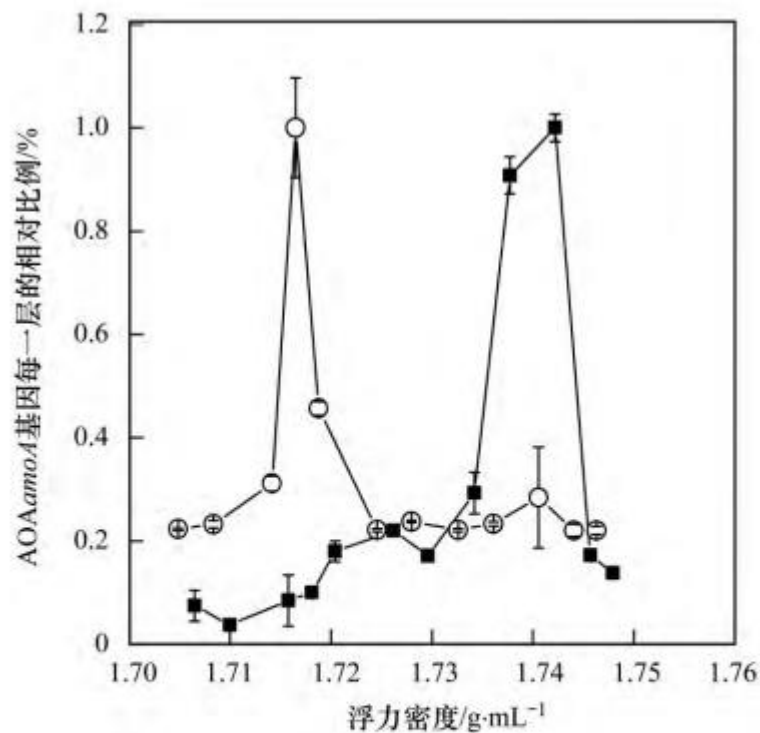
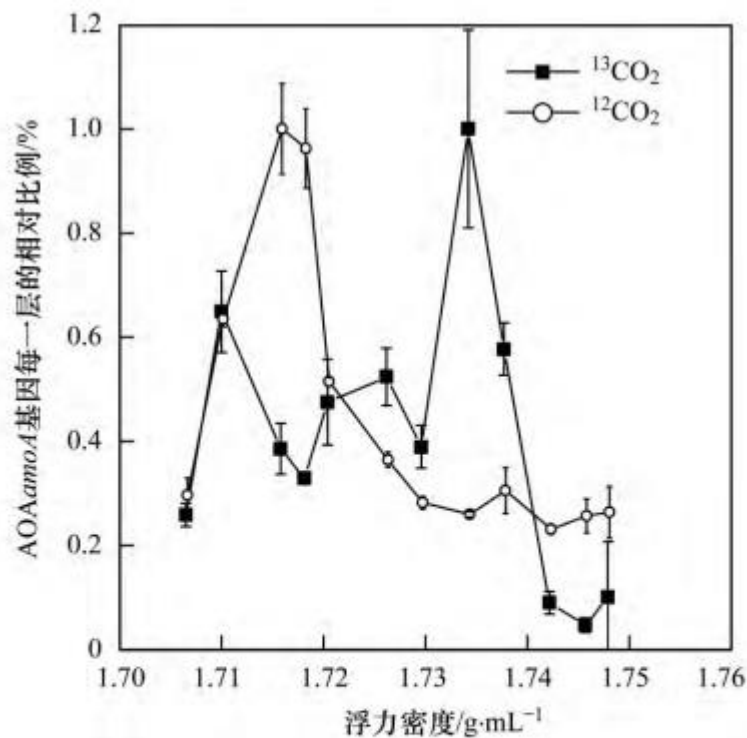


Fig. 2 Typical 2.2-mL volume gradient fraction analysis by density and qRT-PCR of RNA locations for control and labeled isotope SIP tubes

(2015, Noor-Ul-Huda Ghori et al.)



定量PCR检测各层基因拷贝数



误差线表示标准差

图3 中性紫色土各处理分层后氨氧化古菌(AOA) *amoA* 和氨氧化细菌(AOB) *amoA* 功能基因拷贝数比例分布

Fig. 3 Quantitative distribution of the archaeal and bacterial *amoA* genes across the entire buoyant density gradient of the DNA fractions in the neutral purple soil

氯化铯介质中超高速离心后2个相邻梯度区带的浮力密度差为0.004~0.006 g/mL。理论上，浮力密度差大于0.012 g/mL的两种DNA离心后相隔一个区带，能被有效分离。

(刘天琳、贾仲君等, 2019, 环境科学)



RNA-SIP实验操作流程

一. 样品总RNA提取

使用RNA提取试剂盒提取RNA，提取最后一步使用RNA保护剂进行洗脱并保存，可有效避免RNA降解。

二. 等密度超速离心

1. 配制密度梯度混合液

(1) 向15ml离心管中依次添加5 ml CsTFA (约2g/ml)，185 ul Hi-Di Formamide 和 1ml GB 梯度缓冲液 (5微克RNA)。梯度缓冲液与RNA总体积为1 ml，即梯度缓冲液实际添加体积为1ml GB-RNA 添加体积；

CsTFA (2g/ml) 配置：50g CsTFA 溶于约15ml GB，测定折光率，灭菌。

GB 梯度缓冲液配置：0.1 M Tris-HCl (pH 8)，0.1 M KCl 及 1 mM EDTA；试剂及水须无核酸酶，配制后用0.2微滤膜或滤头过滤并灭菌。

当使用新配制的梯度缓冲液和新的CsTFA溶液或Hi-Di Formamide时，需验证验证折光率或重新建立标准曲线。

(2) 拧紧管盖，轻轻翻转几次离心管以混合均匀，取75微用数字折光仪测定折光率。在折光率-温度校正模式下 (nD-TC, 20 °C)，依照配制的密度梯度混合液读数应为 1.3724 ± 0.0001 ，密度约为1.8 g/ml，若数值偏高或偏低，可加入适量 (20-100微) 梯度缓冲液或CsTFA溶液调整浮力密度并重复测量折光率直至调至目标范围；

(3) 使用10 ml 注射器搭配120 mm 针头将混合液移入5.1 ml 密封离心管，加液过程中应避免气泡，混合液加至管颈下缘处；

(4) 将所有离心管两两配平至 ± 10 mg；

(5) 使用密封器将离心管热封，密封过程中应小心避免热熔离心管上部圆面。

2. 等密度梯度离心

将离心管小心对称放入Vti65.2垂直转头中，加盖管帽，旋紧旋盖，空孔无需加盖。设置190000xg，20°C 离心44h，加速度设为最大，减速度设为无刹车。

三. 密度梯度区带分离

使用本实验室自研分层仪器进行分层操作。

四. RNA纯化

使用合适的试剂盒进行纯化回收。



不同技术方法检测成本 (2023)

自拍照 300元/小时 5张照片
 实验室拍照 500元/小时 10张照片

扫描电镜观察与分析

PLFA提取 150元/样品
 上机检测 80元/样品

**PLFA
图谱分析**

C13标记葡萄糖 3000元/g
 C13标记二氧化碳 3000元/L
 N15标记尿素10% 80元/g*50g

PLFA

SIP

6G 数据量 2500元/样品
 12G 数据量 3000元/样品

宏转录组测序

提取 200元/样品
基因组RNA

离心管 50元/只
 超高速1000元/44小时

细/真/古 3万条 250元/样品
 功能基因 1.6万条 250元/样品

扩增子测序

PCR扩增

基因组DNA

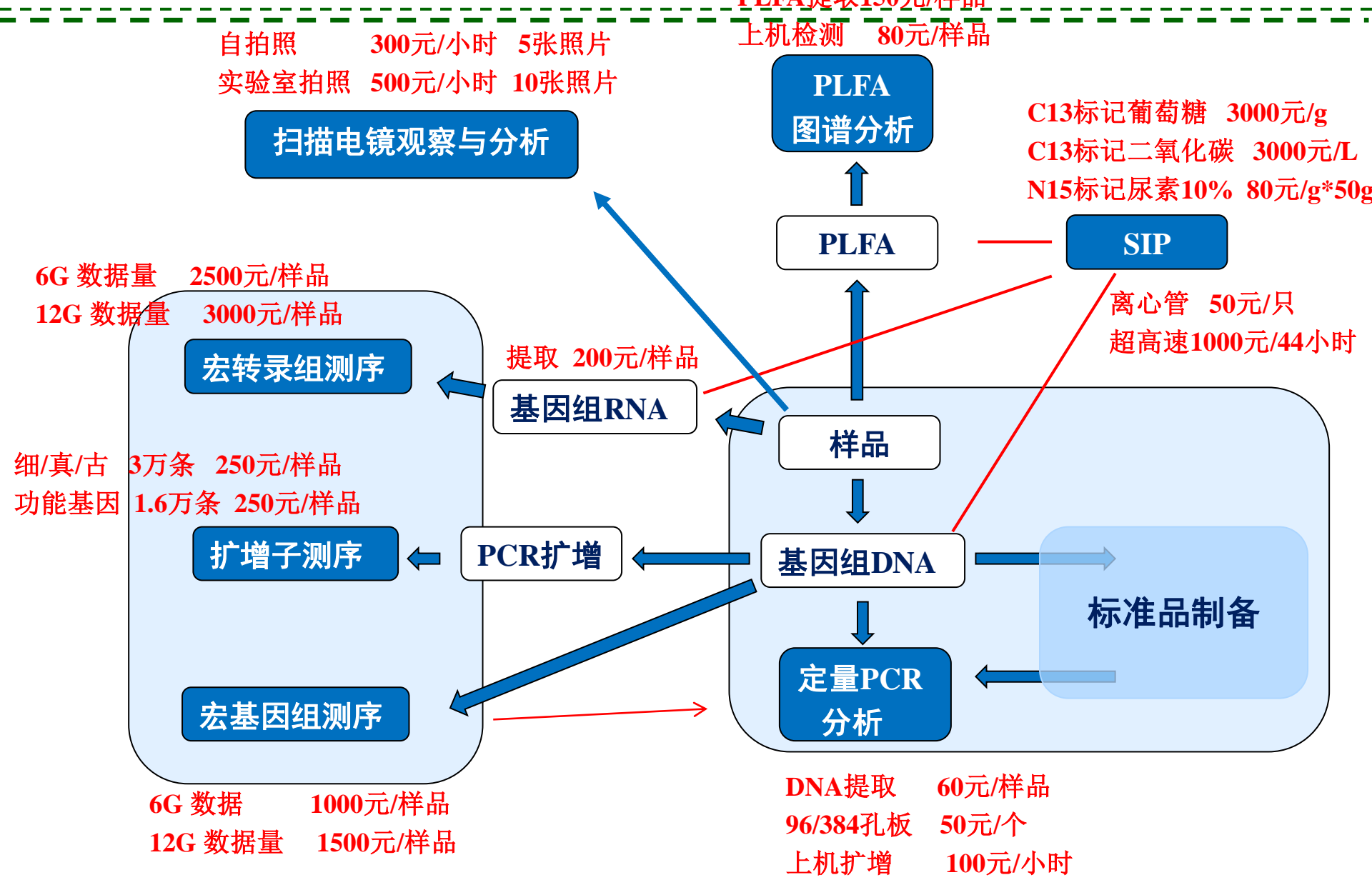
标准品制备

宏基因组测序

**定量PCR
分析**

6G 数据 1000元/样品
 12G 数据量 1500元/样品

DNA提取 60元/样品
 96/384孔板 50元/个
 上机扩增 100元/小时





谢谢！