

文章编号: 1003-8701(2015)03-0026-04

一种高纯度提取草地土壤微生物DNA方法的建立

姚望^{1,2}, 孙盛楠^{2,3}, 袁翠平², 董英山², 邢福³, 赵洪锟^{2,3*}, 龚束芳^{1*}(1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150000; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033;
3. 东北师范大学生命科学学院, 长春 132000)**摘要:** 本文研究建立一套高效、简便的草地土壤微生物DNA的提取和纯化方法。提取的微生物总DNA片段大小在23 kb左右, 纯化后的DNA产量为 $(7.76 \pm 1.53) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.78 ± 0.04 , $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 为 1.76 ± 0.02 。**关键词:** 草地土壤; 微生物总DNA; 提取; 纯化

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.03.007

A High Purity Method for DNA Extraction from Soil Microorganisms of Grassland

YAO Wang^{1,2}, SUN Sheng-nan^{2,3}, YUAN Cui-ping², DONG Ying-shan², Xing Fu³,
ZHAO Hong-kun^{2,3*}, GONG Shu-fang^{1*}

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150000; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 3. College of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 132000, China)

Abstract: The aim of the study was to establish a highly efficient, simple method to extract and purify soil microbial DNA. The extraction of microbial DNA fragment was about 23 kb in size, the yield of DNA solution after purification was $(7.76 \pm 1.53) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ was 1.78 ± 0.04 , $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ was 1.76 ± 0.02 .**Keywords:** Grassland soil; Microbial DNA; Extraction; Purification

土壤是一个复杂的生态系统, 富含大量相互联系和相互作用的微生物。土壤中的微生物对各种物质的生物降解和无机物循环起着非常重要的作用^[1]。土壤微生物多样性分析是微生物生态学研究的最重要的方向之一, 严格意义上说也是最具挑战的任务之一。一般认为能用传统的实验室分离培养方法培养的微生物仅占微生物总种类数的1%左右^[2], 而借助分子生物学的研究方法如PCR-SSCP(单链构象多态性, Single-Strand Conformation Polymorphism)、PCR-RFLP(限制性内切酶片段长度多态性, Restriction Fragment Length Polymorphism)、PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)等方法避免了传统方法的缺陷, 可以更充分地反映土壤微生物种群的真实情况。从样本中提取和纯化DNA是土壤微生物多样性分析众多程序中的

第一步, 受土壤理化特性高度可变、特别是其有机碳结构变化的影响, 目前尚没有土壤微生物DNA提取的通用方法, 不同的DNA提取和纯化方法所提示土壤微生物群落结构的状况不同。

本文优化了Brady^[3]提出的土壤微生物DNA直接提取方法, 与试剂盒提取方法相结合进行DNA的纯化, 并通过16S rDNA扩增和PCR-TTGE(瞬时温度梯度电泳, Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)检测DNA提取质量, 旨在研究建立一套高效、简便的偏碱性草地土壤微生物DNA提取和纯化方法, 为更好地揭示草地土壤微生物的多样性水平提供保证和依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品采集

2009年8月份采集, 样地位于中国东北松嫩草地西南部($122^{\circ}02' \sim 123^{\circ}30' \text{N}$, $44^{\circ}13' \sim 45^{\circ}16' \text{E}$), 吉林省通榆县新华镇境内的中科院大气物理所通榆观测站内。采样点选取虎尾草(*Chloris virgata* Sw.) (pH 9.5)及黄蒿(*Artemisia annua* Linn) (pH8.0)的单优群落, 虎尾草单优群落样品

收稿日期: 2014-12-31

作者简介: 姚望(1988-), 女, 在读硕士, 主要从事土壤微生物多样性研究。

通讯作者: 赵洪锟, 女, 在读博士, 研究员, E-mail: zhaohk99@126.com

龚束芳, 女, 博士, 教授, E-mail: shufangong@yahoo.com.cn

分别选自围封3年围栏、围封8年围栏、自由放牧区,编号为1、2、3,黄蒿单优群落样品分别选自围封3年围栏、围封8年围栏、自由放牧区,编号为4、5、6(表1),在10~20 cm土层中取土样200 g,过60~80目筛,并利用塑料棒静电去除肉眼可见须根。

表1 样品采集概况

编号	取样地	植被
1	围封3年围栏	虎尾草
2	围封8年围栏	虎尾草
3	自由放牧区	虎尾草
4	围封3年围栏	黄蒿
5	围封8年围栏	黄蒿
6	自由放牧区	黄蒿

1.2 DNA提取

1.2.1 DNA粗提

参照Brady^[3]方法,并做适当修改,具体操作过程如下:

(1)各取样品10 g于50 mL离心管中,加入20 mL 70℃预热的裂解液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol EDTA, 1.5 mol/L NaCl, 1%CTAB, 2%SDS),轻轻混匀。

(2)70℃水浴2 h,每隔30 min用手轻混离心管,使其中的液体与土样成悬浊液。

(3)自然状态下晾至室温,3500 r/min, 10 min, 4℃。

(4)将上清液倒入新的50 mL离心管中,继续3500 r/min, 10 min, 4℃。

(5)将上清液转入新的50 mL离心管中,加入15 mL异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置30 min, 3500 r/min, 15 min, 4℃。倒掉上清液。

(6)加入30 mL 70%酒精,4000 r/min, 10 min, 4℃。重复2次。倒掉上清液,室温晾至无酒精气味。

(7)在沉淀中加入500 μL ddH₂O,轻轻振荡溶解成悬浊液。50℃水浴5 min,然后将悬浊液转移至1.5 mL灭菌离心管中,即得到DNA粗提液。

(8)0.8%琼脂糖凝胶电泳,80V约2 h,检测粗提DNA效果。

1.2.2 粗提DNA的纯化

采用德国MACHEREY-NAGEL Genomic DNA from soil试剂盒,按照说明书操作规程进行。

(1)在500 μL粗提液中加入250 μL SB,混匀,移入吸附柱及收集管中,11 000 r/min, 1 min。倒掉收集管中溶液。

(2)在吸附柱中加入500 μL SB, 11 000 r/min, 1 min。倒掉收集管中溶液。

在吸附柱中加入550 μL SW1, 11 000 r/min, 1 min。倒掉收集管中溶液。

在吸附柱中加入700 μL SW2, 11 000 r/min, 1 min。倒掉收集管中溶液。

在吸附柱中加入700 μL SW2, 11 000 r/min, 1 min。倒掉收集管中溶液。11 000 r/min,空转2 min。

(3)将吸附柱移入新的1.5 mL灭菌离心管中,室温敞盖晾至无酒精气味。

(4)在滤膜上加入80 μL ddH₂O, 37℃水浴2 min, 11 000 r/min, 1 min。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 DNA的纯度及定量检测

NANODROP 2000c 测量DNA溶液在波长为230 nm、260 nm、280 nm下的OD值。对照为ddH₂O,根据 $[dsDNA]=50 \times OD_{260} \times \text{稀释倍数}$,计算DNA的浓度(单位为μg/mL),换算出每克干土提取DNA的量^[4]。

1.3 PCR-TTGE检测

引物选择细菌V3区通用引物,F338GC和R518,对应序列分别为:5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTA - CGGGAGGCAGCAG-3'、5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3',上海生工合成。

PCR扩增体系(50 μL):模板1.5 μL, ddH₂O 17.5 μL, 2×Taq PCR Green MIX 25 μL,引物各3 μL (1 μmol/L)。

PCR反应体系:94℃, 5 min; (94℃, 1 min; 50℃, 1 min; 72℃, 40 s) ×35; 72℃, 10 min。预期PCR产物大小为230 bp左右,PCR产物结果1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

以PCR产物为模板,点样35 μL。9%聚丙烯酰胺凝胶中含有8 mol/L尿素。温度梯度设为T₁=65.6℃, T₂=70℃,升温速度0.2℃/h,电压90V。使用SYBR GREEN(SYBR GREEN:1×TAE, 1:10 000)对TTGE凝胶染色30 min,并对染色结果拍照保存。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总DNA提取

粗提DNA片段长度大约在23 kb左右(图1、图2和图3),DNA粗提液为黄褐色,电泳谱带暗淡,有拖尾,腐殖酸等杂质污染较严重;纯化后,DNA溶液无色、澄清,片段长度仍大约在23 kb左右,条带清晰,无明显拖带现象。可见,DNA提纯效果较好,无明显的断裂及降解。

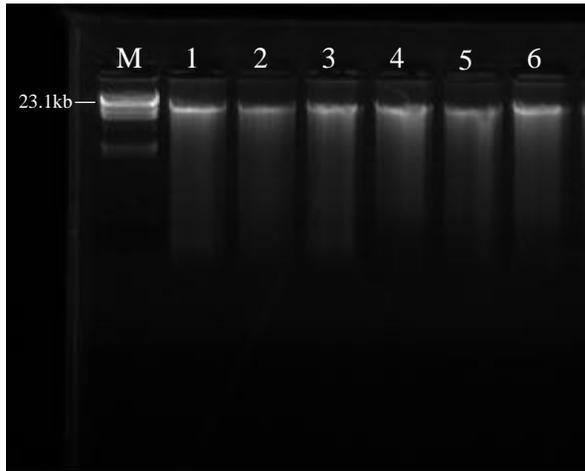


图1 粗提DNA琼脂糖电泳结果

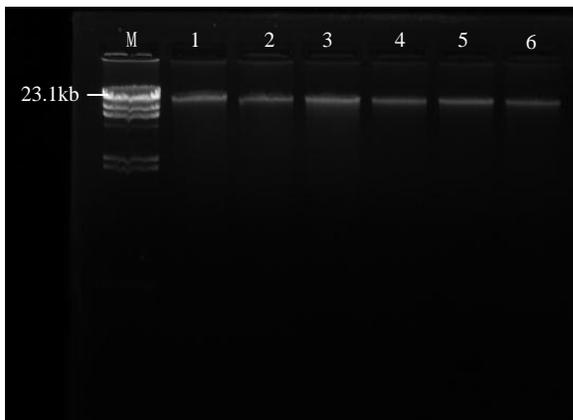


图2 纯化后的DNA琼脂糖电泳结果

图3 纯化前后DNA溶液颜色比较图
左:DNA粗提液;右:纯化后DNA溶液

2.2 总DNA的提取量和纯度检测

采用NANODROP 2000c检测粗提DNA溶液及纯化后DNA溶液光密度值 OD_{260} 、 OD_{230} 、 OD_{280} 进行总DNA提取量和纯度的分析。DNA粗提液的

提取量在 $(43.83 \pm 0.74) \sim (52.33 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,纯化后DNA溶液的产量在 $(6.12 \pm 0.16) \sim (10.40 \pm 0.58) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (表2)。

表2 DNA纯化效率比较

编号	初始DNA提取量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	纯化后DNA产量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	纯化率 (%)
1	49.15 ± 0.73	7.27 ± 0.07	14.80
2	52.33 ± 0.07	10.40 ± 0.58	19.88
3	50.22 ± 0.28	8.52 ± 0.13	16.97
4	46.00 ± 0.64	7.64 ± 0.05	16.61
5	46.05 ± 1.85	6.61 ± 0.31	14.36
6	43.83 ± 0.74	6.12 ± 0.16	13.97

一般来说,纯DNA的 OD_{260}/OD_{280} 值约为1.8,当 OD_{260}/OD_{280} 值 >1.9 ,表明有RNA污染;而 OD_{260}/OD_{280} 值 <1.6 ,表明有酚、蛋白质等污染^[5]。腐殖酸在 OD_{230} nm处有个吸收峰, OD_{260}/OD_{230} 值越高,表明DNA纯度越纯,反之,腐殖酸污染越严重^[6]。张于光^[7]等用凝胶电泳加树脂和2次树脂柱纯化获得的 OD_{260}/OD_{280} 值在1.44~1.62和1.20~1.34之间, OD_{260}/OD_{230} 值在1.11~1.28和0.95~1.12之间。本文提出的研究方法中,DNA粗提液的 OD_{260}/OD_{280} 值在 $(1.30 \pm 0.01) \sim (1.57 \pm 0.02)$ 之间,纯化后的DNA溶液的 OD_{260}/OD_{280} 值在 $(1.73 \pm 0.02) \sim (1.83 \pm 0.01)$ 之间;DNA粗提液的 OD_{260}/OD_{230} 值在 $(0.78 \pm 0) \sim (0.99 \pm 0.01)$ 之间,提纯后的DNA溶液的 OD_{260}/OD_{280} 值在 $(1.75 \pm 0.01) \sim (1.80 \pm 0.03)$ 之间(表3)。可见,本文提出的方法,可有效去除DNA中腐殖酸、RNA、蛋白质和酚的污染。

表3 DNA纯化效果比较

编号	DNA粗提液		DNA纯化液	
	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}
1	1.30 ± 0.01	0.82 ± 0.01	1.73 ± 0.02	1.76 ± 0.02
2	1.33 ± 0.01	0.78 ± 0	1.83 ± 0.01	1.75 ± 0.01
3	1.44 ± 0	0.90 ± 0.01	1.83 ± 0.01	1.80 ± 0.03
4	1.57 ± 0.02	0.99 ± 0.01	1.77 ± 0	1.76 ± 0.01
5	1.30 ± 0.01	0.81 ± 0.01	1.83 ± 0.01	1.75 ± 0.03
6	1.36 ± 0.01	0.78 ± 0	1.74 ± 0.01	1.76 ± 0.01

2.3 TTGE检测

对6个样品的16S rDNA V3区进行PCR扩增进一步确定提取DNA的质量。琼脂糖泳和TTGE电泳结果均显示出谱带带型整齐、清晰,扩增到的目的片段也同预期片段大小230 bp相一致(图4,图5)。TTGE电泳泳道1条带32条,主要条带21条;泳道2条带30条,主要条带10条;泳道3条

带36条,主要条带16条;泳道4条带34条,主要条带9条;泳道5条带29条,主要条带18条;泳道6条带34条,主要条带20条,可明显区分样本间的差异。

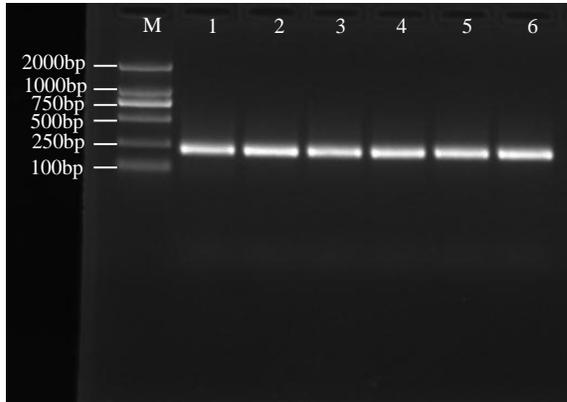


图4 PCR扩增效果

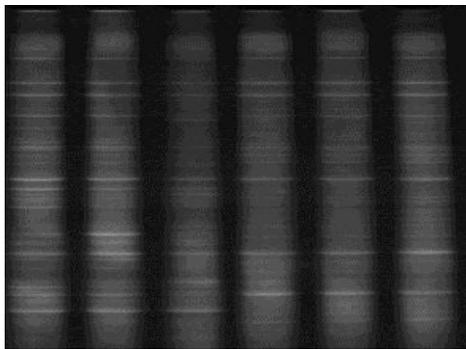


图5 TTGE电泳图

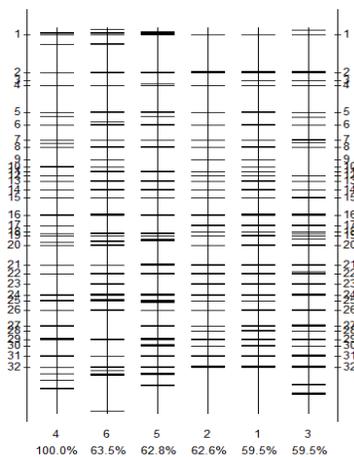


图6 TTGE图谱

3 讨论

土壤微生物DNA的提取方法分为两类:一是直接法,即在土中直接裂解微生物,提取DNA;二

是间接法,先将微生物菌体与土壤颗粒分开,再提取DNA^[8]。本文采用第一种方法。裂解液中高浓度的EDTA是部分二价金属离子的螯合剂,能抑制DNA酶的活性,防止DNA在下一步的提取中被降解。CTAB也能够去除腐殖酸^[9]。

经过结合的方法提取的微生物DNA片段大小在23 kb左右,与陈旭玉^[10]、张瑞福^[11]等人的研究结果相吻合。DNA粗提液为黄褐色,OD₂₆₀/OD₂₃₀为0.84±0.08,纯化后的DNA溶液为无色、澄清的溶液,OD₂₆₀/OD₂₃₀为1.76±0.02,DNA提取液黄褐色越深,腐殖酸污染程度越重,与Nalin^[9]等的研究结果相吻合。

此方法提取微生物DNA的优点体现:提取前无需特别处理,设备要求低,操作简便,提取时间较短,提取的微生物DNA片段大小在23 kb左右,纯度高,完整性强。解决了直接法DNA提取量大,但腐植酸等杂质污染严重;试剂盒法直接土壤微生物DNA提取质量相对较好,但产量低的问题,特别是本方法适用于对纯度要求较高的分子生物学研究。

参考文献:

- [1] 杨海君,肖启明,刘安元.土壤微生物多样性及其作用研究[J].华南大学学报,2005,19(4):21-26.
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [3] Sean F Brady. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules[J]. Nature Protocols, 2007, 2(5): 1297-1305.
- [4] 吴冠芸,潘华珍.生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M].北京:科学出版社,1999:249-250.
- [5] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, et al. Methods for Microbial DNA Extraction from Soil for PCR Amplification[J]. Biol Proced Online, 1998, 1(1): 40-47.
- [6] 顾华杰,李玉祥,赵明文,等.几种水稻田土壤微生物总DNA提取方法的比较[J].江苏大学学报(医学版),2005,15(4):300-305.
- [7] 张于光,李迪强,王慧敏,等.用于分子生态学研究的土壤微生物DNA提取方法[J].应用生态学报,2005,16(5):956-960.
- [8] 魏志琴,曾秀敏,宋培勇.土壤微生物DNA提取方法研究进展[J].遵义师范学院学报,2006,8(4):53-56.
- [9] Robe P, Nalin R, Capellano C. Extraction of DNA from soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2003, 39(4): 183-190.
- [10] 陈旭玉,周亚奎,余贤美,等.一种直接用于PCR的土壤微生物DNA提取方法[J].中国农学通报,2008,24(4):33-36.
- [11] 张瑞福,曹慧,崔中利,等.土壤微生物总DNA的提取和纯化[J].微生物学报,2003,43(2):276-282.