

适用于竹林土壤 PCR-DGGE 分析用的微生物 总 DNA 提取及纯化方法

何沙娥, 张智俊

(浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了获得完整、高纯度的竹林土壤微生物总 DNA, 采用改良的十二烷基硫酸钠-高盐抽提法对 5 种竹林土壤进行 DNA 提取, 通过 DNA 凝胶回收试剂盒纯化粗提的 DNA, 利用细菌 16 S rDNA 基因的 V3 区引物对纯化的 DNA 进行了聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 验证。结果表明, 该方法所需土壤样品少, 抽提的 DNA 片段均在 23 kb 以上, 完整性好; 采用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化能够有效去除粗提 DNA 中大部分杂质, 获得高质量的 DNA; 以此 DNA 为模板进行 DGGE 检测所反映的微生物信息量丰富。图 3 表 1 参 15

关键词: 微生物学; 竹林土壤; 微生物; DNA 提取; 聚合酶链反应-变性梯度胶电泳

中图分类号: S718.4; Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)02-0164-05

Extraction and purification of microbacterial total DNA from bamboo soil for PCR-DGGE analysis

HE Sha-e, ZHANG Zhi-jun

(The Key Laboratory for Modern Sivicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College,
Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: An improved SDS-extraction method was used to obtain high quality DNA from five different bamboo soil samples. The crude DNA was purified by a simple method with DNA gel extraction kit, amplified with 16 S rDNA-based primers in V3 region by use of the polymerase chain reaction (PCR), and then the products of PCR was identified by denature gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that the DNA extracted from a little soil by this method was greater than 23 kb in size. The simple purification method we described here can remove greater part of contaminants from crude DNA and obtain high purity DNA. DGGE analysis patterns of amplified DNA presented abundant fragments. The extraction and purification method was considered to be an effective method for DNA isolation and purification from bamboo soil. It can be used to help characterize the biological composition and diversity of the microbial population in bamboo soil samples. [Ch, 3 fig. 1 tab. 15 ref.]

Key words: microbiology; bamboo soil; microbial; DNA extraction; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术从 1993 年被引入微生物生态学以来, 已经普遍应用于微生物研究, 成为微生物群落遗传多样性和动态分析的强有力工具之一^[1]。获得样品中所有种类微生物的 DNA 是应用 DGGE 技术的前提和关键。然而, 来自环境中的样品含有

收稿日期: 2008-06-06; 修回日期: 2008-09-28

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y307469); 浙江省现代森林培育技术重点实验室开放基金资助项目(200605)

作者简介: 何沙娥, 从事植物分子生物学研究。E-mail: shasha-ping@163.com.cn。通信作者: 张智俊, 副教授, 博士, 从事植物分子生物学和生物信息学研究。E-mail: csfuzzj@yahoo.com.cn

非常复杂的成分,尤其是土壤中的腐植酸类物质很难去除。另外,实际样品中微生物细胞壁的坚实度不同,如不注意就会选择性地获得那些易破细胞壁的微生物 DNA,而且有些样品 DNA 回收率低,造成重复性降低^[2]。因此,需要摸索适合具体样品的 DNA 提取方法。近 30 a 来,国内外在这方面作了大量研究,如 Porteous 等^[3]使用加热-酶-异硫氰酸胍裂解细胞提取总 DNA; Zhou 等^[4]使用蛋白酶 K 和十二烷基硫酸钠(SDS)破解细胞提取总 DNA。这些方法提取的土壤微生物 DNA 产量高,但杂质也多,其中以腐植酸污染最为严重,直接影响后续聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)实验的准确性。鉴于此,人们又尝试许多方法去除腐植酸的影响,如 He 等^[5]使用磷酸盐缓冲液预洗土壤后再提取 DNA, Dong 等^[6]尝试采用 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 去除土壤 DNA 中的腐植酸,获得良好效果。目前,针对竹林土壤微生物总 DNA 提取以及利用 PCR-DGGE 分析竹林土壤微生物群落多样性的研究还未见报道。笔者拟在以往研究的基础上,通过摸索和改进^[4,7-8],建立一种适应于竹林土壤 PCR-DGGE 分析用的 DNA 提取和纯化方法,为进一步研究竹林土壤微生物群落结构和多样性打下良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验土样于 2007 年 8 月取自浙江林学院吉永竹园。分别采集了雷竹 *Phyllostachys praecox*, 紫竹 *Phyllostachys nigra*, 刚竹 *Phyllostachys sulphurea*, 龟甲竹 *Phyllostachys heterocycla* 和黄秆乌哺鸡 *Phyllostachys vivax* 等 5 种竹林的土壤,采样深度为 0 ~ 10 cm,按五点法采样,四分法混匀放入保鲜袋中,封口后,带回实验室,4 °C 保存。

1.2 竹林土壤微生物总 DNA 提取方法

1.2.1 粗提 首先按照 Zhou 等^[4]报道的 SDS 高盐抽提法(简称常规法)提取了 5 种竹林土壤微生物的总 DNA,作为对照。采用的改良 SDS 高盐抽提法(简称改良法)参照常规法修订而成,即在高盐提取液中添加石英砂,以反复冻融代替水浴破碎细胞,并且在氯仿-异戊醇抽提过程增加了 NaCl/CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)溶液 2 次抽提的步骤。具体操作如下:称取 1.0 g 土壤样品,与 4.5 mL DNA 提取缓冲液(Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹, EDTA 100 mmol·L⁻¹, Na₃PO₄ 100 mmol·L⁻¹, NaCl 1.5 mol·L⁻¹, 10.0 g·kg⁻¹CTAB, pH 8.0)混合,加少许石英砂,于 230 r·min⁻¹摇床上 37 °C 摇动 30 min;随后加入 0.5 mL 200 g·kg⁻¹SDS,混合物于 65 °C 水浴 20 min(每隔 10~15 min 轻轻上下颠倒几次),-80 °C 冷冻 15 min,反复冻融 2 次。室温 6 000 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清,加入 1/10 体积 65 °C 预热的 NaCl/CTAB 溶液(100 g·kg⁻¹CTAB, 0.7 mol·L⁻¹ NaCl)和等体积的氯仿-异戊醇,轻摇混匀,室温下 10 000 r·min⁻¹离心 6 min,吸取上层水相。重复抽提 1~2 次,吸取水相转移至新离心管中,加入 0.6 倍体积的异丙醇,室温沉淀 15 min,10 000 r·min⁻¹离心 10 min 收集核酸沉淀。用体积分数为 70%乙醇洗涤 2 次,室温风干,用 200 μL TE 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0)溶解沉淀,4 °C 保存。

1.2.2 DNA 的纯化 采用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化粗提 DNA。具体操作与试剂盒说明略有差异:将粗提的 DNA 与溶液 I 以 3:1 混合,室温放置 10 min,然后将混合液加入到回收柱中,静置 2 min,离心。用 0.5 mL 体积分数为 75%乙醇清洗 2 次,最后用 100 μL TE 缓冲液洗脱回收柱中的 DNA。

1.3 土壤 DNA 的质量检测

1.3.1 紫外分光光度计检测 采用美国 Nanodrop 公司的 ND-1000 紫外分光光度计测定粗提 DNA 在 230, 260, 280 nm 处的光密度值。以 1 μL DNA 直接上样进行测定,其中 DNA 浓度可以直接读数,并以 A_{260} / A_{230} (DNA/腐植酸)和 A_{260} / A_{280} (DNA/蛋白质)的比值来评价 DNA 的纯度。

1.3.2 PCR-DGGE 检测 为了进一步检测改良法提取的 DNA 是否能反映微生物群落信息,以上述经过纯化的土壤微生物 DNA 为模板,采用 16 S rDNA V3 区通用引物进行扩增,并进行 DGGE 分析。扩增正向引物为 16 S rDNA V3 区通用带 GC 发夹引物 F341-GC,序列为:5'(CGCCC GCCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCACGGGG G)CCT ACG GGA GGC AGC AG3';反向引物 R518 序列为:5'ATTACC GCG GCT GCT GG 3'。PCR 反应体系:10×缓冲液 5 μL, 3.2 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 0.8 mmol·L⁻¹

dNTPs, PCR 引物各 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 41.7 nkat *Taq* 酶, 模板(纯化的土壤微生物 DNA) 120 ng , 总反应体积 $50 \mu\text{L}$ 。反应参数: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ; $92 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s ; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s , 30 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 完全延伸 5 min 。DGGE 分析采用美国 BIO-RAD 公司 DCODE™ 的基因突变检测系统进行。用于分离的聚丙烯酰胺凝胶质量分数为 $80 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 变性剂梯度为 $35\% \sim 55\%$ (100% 变性剂浓度为 $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素和 $400 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的去离子甲酰胺的混合物), 在每个加样孔加入上述 PCR 样品 $200 \sim 300 \text{ ng}$ 。电泳条件: $1 \times \text{TAE}$ 电泳缓冲液, $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 65 V , 13 h 。电泳结束后, 按快速银染法染色^[9]: 凝胶在固定液 ($75.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的冰乙酸) 固定 15 min , 加入 $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的硝酸银染色 15 min , 然后在显色液 ($30.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氢氧化钠, $5.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 甲醛) 中显色 5 min , 最后加固定液终止反应。每一步均用去离子水冲洗胶面 $2 \sim 3$ 遍, 在 Bio-Rad 公司凝胶成像系统 Gel Doc2000 中成像。

2 结果与分析

2.1 不同竹林土壤中微生物基因组 DNA 提取

分别用常规法和改良法提取了 5 种竹林土壤微生物总 DNA。从琼脂糖电泳图上可以看出(图 1), 改良法从 5 种竹林土壤中都提取出了 DNA, 且 DNA 带型清晰完整, 其片段大于 23 kb , 无明显降解。常规法提取的 1 号和 2 号样品 DNA 没有明显电泳条带, 3 号、4 号和 5 号样品 DNA 也只有较弱的电泳条带, 说明 DNA 提取量低。因为提取 DNA 所用的土壤都是 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存的鲜土, 所以所得 DNA 产量为所测 DNA 质量/鲜土质量。腐植酸和蛋白质分别在 230 nm 和 280 nm 处有吸收峰^[10], 可以通过测定 A_{260}/A_{230} (DNA/腐植酸) 和 A_{260}/A_{280} (DNA/蛋白质) 的比值来评价 DNA 的纯度: A_{260}/A_{230} 比值越大, 腐植酸污染越少, DNA 越纯; 一般认为, A_{260}/A_{280} 比值大于 1.8 时, DNA 较纯, 否则有蛋白质污染^[11]。本实验中, 改良法提取的 DNA 产率在 $10.53 \sim 23.71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 3 号土样 DNA 提取率最高, 达 $23.71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 4 号土样的提取率相对较低, 但是都获得了较高的提取率, 而常规法提取的 DNA 产率非常低, 得率最高的仅 $4.44 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值显示, 2 种方法提取的 DNA 均存在一定程度的腐植酸和蛋白质等杂质污染, 但改良法的比值明显优于常规法, 特别是 A_{260}/A_{230} 的比值远远高于常规法(表 1)。

表 1 用 2 种方法粗提的 5 种竹林土壤样品中 DNA 产量和纯度比较

Table 1 Comparison of yield and purity of crude DNA of five bamboo soil samples extracted by two methods

土壤样品号	常规 SDS 法			改良 SDS 法		
	DNA 产量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA 产量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	2.42	0.90	0.04	13.02	1.57	0.82
2	2.93	0.76	0.06	18.08	1.38	1.19
3	3.86	1.00	0.05	23.71	1.31	1.45
4	4.44	1.38	0.24	10.53	1.60	0.91
5	2.64	1.10	0.27	16.27	1.59	0.70

2.2 土壤基因组 DNA 的纯化和 PCR-DGGE 检测

在上述 DNA 提取过程中虽然除去了部分污染物, 但所提 DNA 中仍然有不同程度的腐植酸等杂质, 而低量的腐植酸也会干扰下一步的操作, 如 PCR 扩增、杂交等。在实验中, 我们试图以粗提的 DNA 为模板直接进行 PCR 扩增, 但部分土样扩增效果欠佳(电泳图未给出)。为了获得理想的扩增效果, 保证后续实验的可靠性和扩大该方法的适用性, 本实验采用 DNA 凝胶回收试剂盒直接纯化粗提的土壤微生物总 DNA。图 2 中显示, 所有以改良法总 DNA 纯化产物为模板的 PCR 反应都获得特异性扩增片段, 常规法 3 号、4 号和 5 号样品 DNA 有较弱的扩增条带。将各个样品扩增产物作为变性梯度凝胶电泳(DGGE)的样品, 所得微生物信息图谱如图 3 所示。在相同的电泳条件下, 改良法所提的土壤样品微生物总 DNA 经过 DGGE 都可以分离出数目不等的电泳条带, 各样品之间表现出了不

同竹种竹林微生物群体差异。常规法的 5 号样品分离出少量微弱的条带, 其他样品则没有检测到条带。PCR 和 DGGE 的电泳图上第 11 泳道为以无菌水为模板的阴性对照, 没有检测到微生物信息, 表明实验过程无微生物污染干扰。

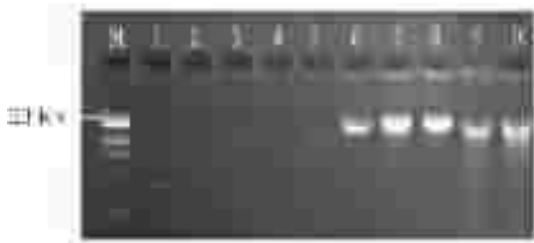


图 1 5 种竹林土壤微生物总 DNA 琼脂糖电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total microbial DNA extracted from five bamboo soil samples



图 2 16 S rDNA V3 片段 PCR 扩增琼脂糖电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of V3 variable region on 16 S rDNA amplified from five bamboo soil samples

3 讨论

从土壤中充分裂解微生物, 获得总微生物 DNA 是研究土壤微生物的关键。微生物细胞与土壤粘附较牢, 不易分开, 导致靶微生物丢失较多。Zhou 等^[4]认为, 从砂质土壤中释放微生物要比黏性土壤容易。常用机械破碎方法如玻璃珠振荡法^[12]、超声波法^[3]、液氮研磨法^[13], 或是几种方法的组合来破碎细胞^[14], 但过度剧烈的机械破碎法易导致 DNA 片段的断裂, 而在分子生态学研究, 大片段的 DNA 是用于进一步的分子生物学操作的保证。改良法中采用振荡的方法结合反复冻融, 并且加入石英砂, 增加了土壤的砂性, 获得了良好的细胞裂解效果, 不仅所得 DNA 产率高, 也有利于提高 DNA 的纯度。实验中避免了超声波等处理, 所得 DNA 的完整性也很好。

在土壤微生物 DNA 抽提中最主要的污染物是腐植酸, 其结构千差万别, 可以整合 Mg^{2+} 或是和 DNA 或蛋白质发生共价结合, 从而抑制酶的活性, 影响后续的实验操作。并且, 对于不同的土壤, 腐植酸组成和特点不同。因此, 一种方法处理不同的土壤, 会有不同的提取效果。CTAB 可用于细胞裂解, 还有助于去除腐植酸^[4]。在加入酸类或者高浓度的盐类物质时可使腐植酸产生凝絮^[15]。改良法针对竹林土壤, 在提取液和抽提液中都使用了 CTAB, NaCl/CTAB 抽提液还提供了高盐环境。在改良法的抽提过程中, 可以看到水相和有机相之间有一层絮状物, 很有可能是絮凝的腐植酸类物质。根据粗提 DNA 紫外扫描的 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值可以看出, 常规法提取的 DNA 中蛋白质和腐植酸污染严重,



图 3 5 种竹林土壤 DNA 的 16 S rDNA V3 片段 DGGE 图谱
Figure 3 DGGE profiles of 16 S rDNA V3 region genes of bacterial communities from five bamboo soil samples

而改良法粗提的 DNA 中污染物较少,很可能是上述抽提过程中去除了大部分的腐植酸等杂质。粗提的 DNA 可采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行过柱纯化,过柱纯化时不需要电泳割胶等繁琐操作,且纯化后 DNA 的 PCR 扩增效果良好,表明过柱纯化可进一步有效去除 DNA 中少量的腐植酸等杂质,是一种获得高纯度土壤微生物总 DNA 的有效手段。除了浓度和纯度外,在后续 DGGE 实验中,要进行微生物多样性和群体结构的分析还要求所得 DNA 包含样品中绝大部分微生物的信息。本文通过改良法提取的土壤样品 PCR-DGGE 实验均可分离出数目不等的电泳条带,且各个条带的强度和迁移率各不相同,说明各样品之间能够表现出一定的微生物群体差异,故该方法抽提的土壤微生物基因组 DNA 可作为 PCR-DGGE 实验的模板,用于对竹林土壤微生物群体的多样性分析。

参考文献:

- [1] KORNELIA S, MIRUNA O S, ANNETT M, *et al.* Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16 S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?[J]. *J Microb Meth*, 2007, **69**: 470 - 479.
- [2] PATRICK R, RENAUD N, CARMELA C, *et al.* Extraction of DNA from soil[J]. *Eur J Soil Biol*, 2003, **39**: 183 - 190.
- [3] PORTEOUS A L, AMSTRONG J L, AMSTRONG R J, *et al.* An Effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis[J]. *Curr Microb*, 1994, **29**: 301 - 307.
- [4] ZHOU Jizhong, MARY A B, JAMES T M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Appl Environ Microb*, 1996, **62**: 316 - 322.
- [5] HE Jizheng, XU Zhihong, HUGHES J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**: 2337 - 2341.
- [6] DONG Dexian, YANG An, LI Haiming, *et al.* Removal of humic substances from soil DNA using aluminum sulfate[J]. *J Microb Meth*, 2006, **66**: 217 - 222.
- [7] 张温典, 姚刚乾, 陆丙社. 从土壤中提取 DNA 方法的研究进展[J]. 河北林果研究, 2003, **18** (3): 300 - 305.
ZHANG Wendian, YAO Gangqian, LU Binshe. The progress of the study on the method of distilling of DNA from soil[J]. *Hebei J For Orchard Res*, 2003, **18** (3): 300 - 305.
- [8] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 提取和纯化[J]. 微生物学报, 2003, **43** (2): 276 - 281.
ZHANG Ruifu, CAO Hui, CUI Zhongli, *et al.* Extraction and purification of soil microbial total DNA[J]. *Acta Microbiol Sin*, 2003, **43** (2): 276 - 281.
- [9] 石鹏君, 柏映国, 袁铁铮, 等. 应用 rpo B 和 16 S rDNA 基因的变性梯度凝胶电泳技术对山羊瘤胃细菌多样性的研究[J]. 微生物学报, 2007, **47** (2): 285 - 289.
SHI Pengjun, BO Yingguo, YUAN Tiezheng, *et al.* Use of rpoB and 16 S rDNA gene to analyze rumen bacterial diversity of goat using PCR and DGGE[J]. *Acta Microb Sin*, 2007, **47** (2): 285 - 289.
- [10] 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): 301 - 305.
GU Huajie, LI Yuxiang, ZHAO Mingwen, *et al.* Comparison of methods of DNA extraction from paddy soil[J]. *J Jiangsu Univ Med*, 2005, **15** (4): 301 - 305.
- [11] YEAST C, GILLINGS M R, DAVISON A D, *et al.* Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. *Biol Proc Online*, 1998, **1** (1): 40 - 45.
- [12] 马万里, JOSQUIN T, MARK A. 土壤微生物多样性研究的新方法[J]. 土壤学报, 2004, **41** (1): 103 - 107.
MA Wanli, JOSQUIN T, MARK A. A new method for research on soil microbial diversity[J]. *Acta Pedol Sin*, 2004, **41** (1): 103 - 107.
- [13] VOLOSSIOUK T, ROBB E I, NAZAR R N. Direct DNA extraction for PCR-Mediated assays of soil organisms[J]. *Appl Environ Microb*, 1995, **61** (11): 3972 - 3976.
- [14] PATRICK R, RENAUD N, CARMELA C, *et al.* Extraction of DNA from soil[J]. *Eur J Soil Biol*, 2003, **39**: 183 - 190.
- [15] 李钧敏, 金则新. 一种高效可直接用于 PCR 分析的土壤总微生物 DNA 抽提方法[J]. 应用生态学报, 2006, **17** (11): 2107 - 2111.
LI Junmin, JIN Zexin. A highly effective extraction method for PCR analysis of soil microbial DNA[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2006, **17** (11): 2107 - 2111.