

一种适宜于文库构建的土壤微生物总 DNA 提取方法

高岳 (苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008)

摘要 采用改良的方法提取 2 种土壤微生物总 DNA, 并采用透析法对提取的 DNA 进行纯化, 与 MO BIO 公司 PowerSoil DNA isolation Kit 试剂盒法进行比较, 结果表明, 改良的土壤微生物总 DNA 提取方法提取到的 DNA 明显高于试剂盒提取的 DNA, 且 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 与试剂盒提取的相差不大, 片段也较大, 是一种经济方便的土壤微生物总 DNA 提取方法, 比较适合用于构建高质量的宏基因组文库。

关键词 土壤微生物; 透析法; DNA 含量; 宏基因组文库

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12041-02

A Suitable Total Microbial DNA Extraction Method for Building Genomic Library

GAO Yue (Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, Jiangsu 215008)

Abstract Improved method was used to extract soil microbial total DNA, and the dialysis method was adopted to purify DNA. Compared with PowerSoil DNA isolation Kit of MO BIO company, the obtained DNA was analyzed. DNA per gram of soil is obviously higher than that of kit method. A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} also achieves the ideal level, the segment is larger and less impurities, indicating that it is an economic and convenient soil microbes total DNA extraction method, and is more suitable for building high quality metagenomic library.

Key words Soil microbes; Dialysis method; DNA content; Metagenomic library

微生物次级代谢产物已经被证明是开发新抗菌药物的重要来源^[1]。对环境样品中未培养微生物的分析表明, 在实验室中采用传统的培养微生物方法来筛选微生物代谢物可能已经错过了发现绝大多数微生物自然产品的机会^[2-3]。在大多数环境中, 不能被培养的微生物比能进行培养的微生物至少要多 2~3 个数量级^[2-5]。同时纯培养技术也容易得到重复的菌种, 传统的筛选方法得到相同代谢产物的几率很高。宏基因组技术可以有效地解决上述问题, Handelman 于 1998 年首次提出宏基因组的概念, 可以通过提取环境样品中的 DNA, 选择合适的载体和宿主, 将 DNA 转化克隆到宿主细菌建立宏基因组文库, 进而对文库进行筛选。此方法不需要经过纯培养方法同样可以对微生物的多样性及功能进行研究, 扩大了微生物代谢产物及生物活性物质的筛选平台。近年来, 研究者已构建了各种环境样品的宏基因组文库, 并从中筛选到多种生物活性物质。Brady 等^[6]构建了凤梨科植物树茎流出液宏基因组文库, 通过异源表达, 获得具有抗菌活性的化合物 palmitoylputrescine。Lim 等^[7]构建了森林土壤宏基因组文库, 通过抗枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 活性筛选, 获得了 indirubin and indigo。Kim 等^[8]构建了稻田土壤宏基因组文库, 基于功能筛选, 获得了 coproporphyrin III。

DNA 的提取方法主要有直接(原位)裂解法和间接(异位)裂解法 2 种, 间接(异位)裂解法虽然能获得大片段的 DNA (20~500 kb), 纯度高, 杂质少, 但操作繁琐, 成本高, 得率低, 且用此法获得的 DNA 全面性差, 不适用于构建宏基因组文库。而直接(原位)裂解法是直接对环境样品中的微生物细胞进行 DNA 提取, 提出的 DNA 片段较小 (1~50 kb), 此法操作简单、成本低、得率高, 且 DNA 更具有代表性, 比较适宜构建宏基因组文库, 但用此法容易残留样品中的腐殖酸、棕黄酸等杂质。

笔者通过改良的土壤微生物总 DNA 提取方法, 提取到片段较大的 DNA 分子, 并用透析的方法对提取的 DNA 进行纯化, 对最终的 DNA 用 Nanodrop 2000 进行含量和纯度的检测, 得到的 DNA 的含量和纯度都达到文库构建的要求, 为宏基因组文库的构建及后续利用文库筛选活性物质奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品。供试土壤样品采集于不同地区, 共 2 种土壤样品。采样时间是 2014 年 6 月, 采集深度为 10 cm, 采集后马上密封于塑料封口袋中, 于 -20℃ 下保存待用。

1.1.2 主要仪器及试剂。PCR 扩增仪 (Eppendorf); DYY-6C 电泳仪 (北京六一仪器厂); 凝胶成像系统 (美国 UVP); Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) 高速冷冻离心机 (Eppendorf)。

裂解缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L Na EDTA; 1.5 mol/L NaCl, 1% (W/V) cetyl trimethyl ammonium bromide); 10% SDS (pH 8.0); 异丙醇; 70% 乙醇; TE (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8)。

1.2 试验方法

1.2.1 改良土壤微生物总 DNA 提取法。

1.2.1.1 土壤 DNA 的提取。样品过筛去除杂质, 称取 125 g 土样加入 150 ml 裂解液, 37℃、125 r/min 离心约 30 min。加入 30 ml 10% SDS, 70℃ 水浴 2 h, 每 6~7 min 缓慢摇匀。待样品冷却后 4℃、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 4℃、10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 量体积后加入 0.7 倍体积的异丙醇, 轻轻混匀室温放置 30 min 后 4℃、10 000 r/min 离心 30 min。弃上清液 (完全去除液体), 加入 100 ml 70% 乙醇, 4℃、10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 自然晾干, 使样品完全没有乙醇味 (可能需要放置过夜)。用 5 ml TE 重悬浮 DNA (必要时可适当多加 TE), 轻轻翻动离心瓶, 使 DNA 完全溶解, 可在 50℃ 下加热 20~30 min, 以加快溶解。

1.2.1.2 土壤 DNA 的纯化及浓缩。制一块 1% 的琼脂糖凝

作者简介 高岳 (1979-), 男, 江苏苏州人, 讲师, 硕士, 从事微生物分子生物学与基因工程研究。

收稿日期 2014-10-27

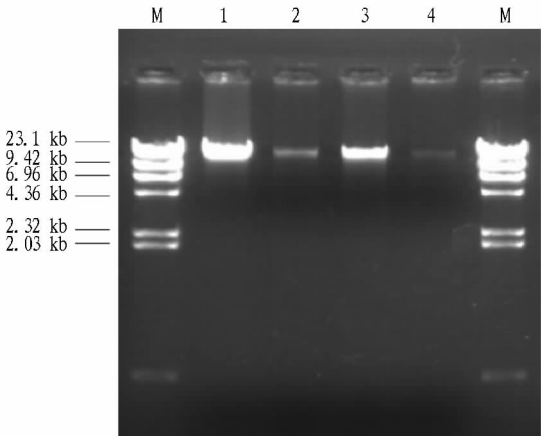
胶,胶孔需能容纳 1.0~1.5 ml DNA 粗体液,将粗提液预热至 50 ℃后,全部加入胶孔中,135 V 电压下 1 h 后,将电压降至 60 V 4~5 h,用 0.5×TBE buffer 清洗胶孔后,换掉胶槽中原有的 TBE。将电压降至 35 V 过夜(约 10 h),将胶两边各切下 2.5 cm 宽(其中 1 cm 宽含 DNA),用 EB 染色 30 min,在紫外灯下确定 DNA 条带位置,在原来胶上相应位置切下 1 cm 宽,包含 DNA 的胶条。将胶条放入透析袋中,加入 10 ml 的 0.5×TBE,排除气泡,100 V 下 3 h,再 30~40 V 反向 1 min。将透析袋中的 TBE 转移到 50 ml 离心管中,再用 5 ml 的 TBE 洗一遍透析袋后,转移到同一离心管中,5 400 r/min 下离心 20 min。将上清液转移到 50 ml 离心浓缩管中,5 400 r/min 下离心 10 min,多次离心使最后体积降至 1 ml 以下。在样品中加入 15 ml TE,5 400 r/min 下离心 10 min,多次离心使体积降至 250~500 μl,重复此步骤 2~3 次。用切口枪头轻柔地冲洗浓缩管膜几次,转移浓缩 DNA 至灭菌 1.5 ml 离心管中,再用 500 μl TE 冲洗浓缩管膜后,转移到另一 1.5 ml 离心管中。

1.2.2 PowerSoil DNA isolation Kit 试剂盒法。参照试剂盒相关说明书进行提取。

1.3 土壤 DNA 的含量及纯度检测 采用 Thermo Scientific 公司的 Spectrophotometer Nanodrop 2000 测定 DNA 含量,并测定 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 的比值以确定提取 DNA 的纯度。

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 电泳结果 为了更好地为后续宏基因组文库的构建服务,土壤总 DNA 的大小应在 23 kb 以上。从图 1 可以看出,2 个样品、2 种提取方法的 DNA 大小都在 23 kb 以上,符合建库要求,但改良法提取的 DNA 条带明显比试剂盒的条带亮,说明提取的 DNA 含量较高;2 种方法提取的 DNA 条带都较均匀且均无明显杂带,说明 2 种方法提取到的 DNA 相对较纯,且无明显杂质。



注:1,3 为改良法提取的 DNA,2,4 为试剂盒法提取的 DNA。M=λHind III。

图 1 2 种方法所获得的土壤总 DNA 的凝胶电泳分析

2.2 土壤总 DNA 的得率和纯度 从表 1 可以看出,改良提取法的 DNA 获得率较高,提取的 DNA 浓度均在 70 μg 以上/g 土壤,而用试剂盒法提取的 DNA 浓度在 40 μg 左

右/g 土壤。

表 1 2 种方法提取 2 种土壤样品的 DNA 得率 μg/g

土壤样品	DNA 含量	
	改良法	试剂盒法
1	75.65±0.54	36.37±0.45
2	73.12±0.35	33.17±0.19
平均	74.385	34.77

在土壤样品提取过程中,一些杂蛋白、腐殖酸和酚类等物质往往会残留在 DNA 中而影响后期的文库构建等。通常检测 DNA 样品纯度的指标有 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} ,前者主要用来检测蛋白质和酚类物质的残留情况,比值在 1.8~2.0 较理想;后者用来检测糖类、盐类等有机物残留情况,比值在 2.0~2.5 较理想。从表 2 可以看出,2 种提取方法提取的 DNA 纯度都较高, A_{260}/A_{280} 都达到了 1.6 以上,而 A_{260}/A_{230} 也达到了 1.7 以上,比较接近理想水平。

表 2 2 种方法提取 2 种土壤样品的 DNA 纯度分析

方法	A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{230}	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
改良法	1.64±0.17	1.61±0.07	1.75±0.12	1.73±0.11
试剂盒法	1.68±0.09	1.66±0.05	1.81±0.04	1.78±0.06

3 结论

在基因组文库构建过程中,土壤 DNA 的片段大小以及 DNA 的纯度,都直接影响文库的质量,并影响后续文库的筛选。该研究采用改进的土壤总 DNA 提取法,提取的土壤 DNA 得率高,且相同重量的土壤,提取到的 DNA 量大,从而在一定程度上减少了非优势菌种的损失;同时改良法获得的 DNA 在片段大小以及纯度上也基本达到了理想水平。且采用改良法提取土壤 DNA 在同等条件下所需的费用比试剂盒法低很多,能节约大量的研究经费。综合各方面因素,该研究所使用的改良法是一种经济、高效的提取土壤总 DNA 的方法,提取的 DNA 能很好地用于构建高质量的宏基因组文库。

参考文献

- [1] NEWMAN D J,CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years[J]. J Nat Prod,2007,70:461-477.
- [2] HUGENHOLTZ P,GOEBEL B M,PACE N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. J Bacteriol,1998,180:4765-4774.
- [3] RAPPE M S,GIOVANNONI S J. The uncultured microbial majority[J]. Annu Rev Microbiol,2003,57:369-394.
- [4] TORSVIK V,GOKSOYR J,DAAE F L. High diversity in DNA of soil bacteria[J]. Appl Environ Microbiol,1990,56:782-787.
- [5] TORSVIK V,DAAE F L,SANDAA R A,et al. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments[J]. J Biotechnol,1998,64:53-62.
- [6] BRADY S F,CLARDY J. Palmitoylputrescine, an antibiotic isolated from the heterologous expression of DNA extracted from bromeliad tank water[J]. J Nat Prod,2004,67(8):1283-1286.
- [7] LIM H K,CHUNG E J,KIM J C,et al. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on Escherichia coli[J]. Appl Environ Microbiol,2005,71(12):7768-7777.
- [8] KIM J S,LIM H K,LEE M H,et al. Production of porphyrin intermediates in Escherichia coli carrying soil metagenomic genes[J]. FEMS Microbiol Lett,2009,295(1):42-49.