

革兰氏阳性与阴性细菌基因组 DNA 提取方法的优化

云飞¹, 梁林², 鲍彦彬², 石雅丽^{2*}, 孙亚超², 李永丽², 兰辉²

(1. 内蒙古工业大学矿业学院, 内蒙古呼和浩特 010051; 2. 内蒙古工业大学化工学院, 内蒙古呼和浩特 010051)

摘要 在分析现有提取微生物基因组 DNA 的原理和方法基础上, 对 SDS-NaCl 法进行了改良, 以商品化微生物基因组提取试剂盒提取的基因组结果为对照, 利用改良的 SDS-NaCl 法, 分别提取大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的基因组 DNA。结果表明, 改良的 SDS-NaCl 法提取的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分别为 1.88、1.89、1.81, 浓度分别为 61.67、64.32、53.22 μg/mL; 而商品化试剂盒提取大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分别为 1.85、1.87、1.83, 浓度分别为 64.07、58.43、52.34 μg/mL。结果证明改良 SDS-NaCl 法提取的革兰氏阳性和阴性细菌的基因组 DNA 可用于后续试验如全基因组测序和 PCR 等, 同时可快速获得大量的高质量微生物基因组。

关键词 细菌基因组 DNA; 革兰氏阳性细菌; 革兰氏阴性细菌; SDS-NaCl 法

中图分类号 Q 933 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)10-0098-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.10.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Methods for Genomic DNA Extraction from Bacteria

YUN Fei¹, LIANG Lin², BAO Yan-bin² et al (1. Department of Mining Technology, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot, Inner Mongolia 010051)

Abstract Based on the analysis of the principles and methods of genomic DNA extraction, the SDS-NaCl method was modified. The results of genomic DNA extraction by commercial genomic extraction kit were compared with those by SDS-NaCl method modified by our laboratory. The results showed that the OD₂₆₀/OD₂₈₀ of the genomic DNA of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were 1.88, 1.89 and 1.81, and the concentration were 61.67, 64.32 and 53.22 μg/mL respectively. The OD₂₆₀/OD₂₈₀ by commercial genomic extraction kit were 1.85, 1.87 and 1.83, and the concentration were 64.07, 58.43 and 52.34 μg/mL respectively. The results showed that the genomic DNA extracted by the modified nacl method could be used in subsequent experiments such as whole genome sequencing and PCR, and a large number of high quality microbial genomes could be obtained rapidly.

Key words Genomic DNA; Gram positive bacterium; Gram negative bacterium; SDS-NaCl method

目前, 随着高通量测序技术日益成熟, 微生物全基因组 DNA 的完成图测序和重测序已成为微生物分子生物学与代谢组学研究中的重要手段, 其中微生物基因组 DNA 的质量对测序结果影响很大。

目前, 提取微生物基因组 DNA 的方法主要有液氮研磨法^[1-4]、冻融法^[5]、加热煮沸法^[6]、碱裂解法、溶菌酶法^[7-9]、SDS(十二烷基硫酸钠)法^[6,10]、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法^[10]、Chelex-100 煮沸法^[11]、吸附柱法^[12]、磁珠法^[13-14]。SDS-NaCl 法具有裂解细菌彻底和提取基因组 DNA 纯度较好的特点。笔者利用改良的 SDS-NaCl 法, 分别提取大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的基因组 DNA (其中大肠杆菌是革兰氏阴性菌, 枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性菌), 同时以商品化细菌基因组提取试剂盒提取结果为对照, 通过与商品化试剂盒提取效果进行比较, 获得一种操作简单、成本低廉, 且可快速获得较高质量的革兰氏阳性和阴性细菌的基因组 DNA。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂 菌种来自内蒙古工业大学基因工程实验室保存的大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购买于北京天根生化科技有限公司。蛋白酶 K、溶菌酶、SDS、苯酚、氯仿和无水乙醇均为国产试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 商品化试剂盒的提取。 提取步骤参见北京天根生化科技有限公司细菌基因组 DNA 试剂盒说明书。

1.2.2 改良的 SDS-NaCl 法。 将细菌在 LB 培养基中(酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 1 000 mL 去离子水, 用 5 mol/L 的 NaOH 调节其 pH 至 7.0, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min)培养 8~10 h 后, 取 1 mL 新鲜菌液放入离心管, 10 000 r/min 离心 1 min 后尽可能除净上清; 加入 200 μL 溶菌酶, 悬浮菌体; 加入 10 μL RNaseA 轻轻混匀; 加入 20 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 室温静置 1 min; 然后加入 500 μL 的裂解液 (100 mmol/L pH 7.0 Tris-HCl, 500 mmol/L pH 8.0 EDTA, 20 mmol/L NaCl, 10% SDS), 50 °C 温浴 20 min; 加入 300 μL 的苯酚, 上下混匀; 再加入氯仿 300 μL, 混匀; 10 000 r/min, 5 min; 转移上清液至新离心管; 加入 300 μL 的氯仿, 混匀, 离心 10 000 r/min, 5 min, 转移上清液到新离心管; 加入 1 mL 无水乙醇, 在 -20 °C 中沉淀 10 min; 离心 10 000 r/min, 15 min, 弃上清液; 加入 1 mL 70% 的乙醇洗涤, 离心

基金项目 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS03030); 内蒙古工业大学科学研究项目(ZD201703, ZD201524); 内蒙古工业大学科研启动金项目; 内蒙古自治区级创新创业训练计划项目(201910128009); 内蒙古工业大学校级大学生创新实验计划项目(2019053010, 2019053008)。

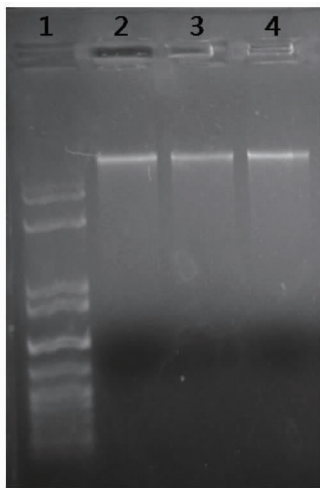
作者简介 云飞(1981—), 男, 内蒙古土默特人, 讲师, 博士, 从事古生物学研究。* 通信作者, 讲师, 博士, 硕士生导师, 从事基因工程研究。

收稿日期 2020-09-11

10 000 r/min, 5 min, 弃上清液; 在室温下干燥 15 min; 然后加入 30 μ L ddH₂O。取 1 μ L DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳, 同时通过紫外分光光度计检测浓度。

2 结果与分析

2.1 商品化试剂盒提取的 3 种细菌基因组 DNA 利用商品化试剂盒提取大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的基因组 DNA, 经凝胶电泳后检测 DNA 的质量, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 3 种细菌的基因组 DNA 经电泳后条带整齐清晰, 无蛋白和 RNA 残留, DNA 质量较好。



注: 1. Marker; 2. 大肠杆菌基因组 DNA; 3. 枯草芽孢杆菌基因组 DNA; 4. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA

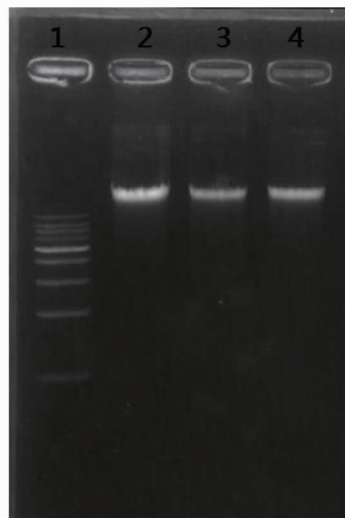
Note: 1. Marker; 2. *Escherichia coli* genomic DNA; 3. *Bacillus subtilis* genomic DNA; 4. *Staphylococcus aureus* genomic DNA

图 1 商品化试剂盒提取基因组 DNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis of genomic DNA extracted by commercial kits

2.2 改良 SDS-NaCl 法提取的 3 种细菌基因组 DNA 利用改良 SDS-NaCl 法提取大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的基因组 DNA, 经凝胶电泳后检测 DNA 的质量, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 3 种细菌的基因组 DNA 经电泳后条带整齐清晰, 与商品化试剂盒提取结果相比, DNA 条带较

粗, 说明改良 SDS-NaCl 法提取 DNA 的量更多, DNA 的质量更好。



注: 1. Marker; 2. 大肠杆菌基因组 DNA; 3. 枯草芽孢杆菌基因组 DNA; 4. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA

Note: 1. Marker; 2. *Escherichia coli* genomic DNA; 3. *Bacillus subtilis* genomic DNA; 4. *Staphylococcus aureus* genomic DNA

图 2 改良 SDS-NaCl 法提取细菌基因组 DNA 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of bacterial genomic DNA extracted by modified SDS-NaCl method

2.3 基因组 DNA 的浓度及纯度 根据紫外分光光度法结果 (表 1) 分析这 2 种方法提取细菌基因组 DNA 的质量, 商品化试剂盒法提取大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分别是 1.85、1.87 和 1.83, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 分别是 2.06、1.94 和 2.02, 浓度分别是 64.07、58.43 和 52.34 ng/mL; 改良 SDS 法提取的大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分别是 1.88、1.89 和 1.81, 浓度分别是 61.67、64.32 和 53.22 ng/mL。结果表明, 经改良的 SDS 法提取的 3 种细菌基因组 DNA 纯度和浓度均较好 (图 3), 且操作步骤简单, 成本低, 可用于大量提取细菌基因组 DNA。

表 1 商品化试剂盒与改良 SDS-NaCl 法提取细菌基因组 DNA 的质量

Table 1 Quality of bacterial genomic DNA extracted by commercial kit and improved SDS-NaCl method

菌种 Strain	商品化试剂盒 Commercial kit			改良 SDS-NaCl 法 Improved SDS-NaCl method		
	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	浓度 Concentration μ g/mL	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	浓度 Concentration μ g/mL
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	1.85	2.06	64.07	1.88	1.91	61.67
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	1.87	1.94	58.43	1.89	2.02	64.32
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.83	2.02	52.34	1.81	2.03	53.22

3 结论

微生物基因组提取是进行微生物分子生物学与代谢分析的基本操作, 基因组的质量与数量直接影响下游试验的结果, 因此根据试验样品的特点对微生物基因组提取方法进行

不断改良是必需的, 这样可以有效提高试验结果的准确性与可信度。如对于特殊环境微生物基因组的提取, 如瘤胃微生物等, 就必须对试验方法进行改良。该研究将目前常用的微生物基因组提取方法进行比较, 同时将革兰氏阳性细菌与阴

性细菌的基因组提取特点进行比较,以便今后对于特殊环境 微生物基因组进行提取方法的摸索与改良。

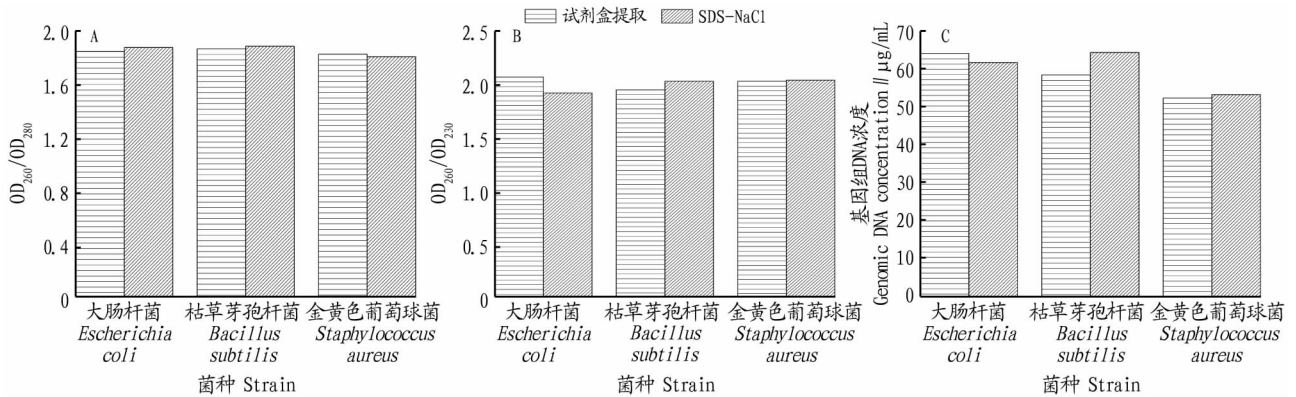


图3 商品化试剂盒与改良 SDS-NaCl 法提取基因组 DNA 质量的比较

Fig.3 Comparison of quality of genomic DNA extracted by commercial kit and modified SDS-NaCl method

参考文献

- [1] ZHAO X M, DUSZYNSKI D W, LOKER E S. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species [J]. *Journal of microbiological methods*, 2001, 44(2): 131-137.
- [2] 刘国兴, 刘源涌, 张辉, 等. 东北梅花鹿瘤胃微生物基因组的 DNA 提取 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(11): 227-229.
- [3] 刘水平, 罗志勇. 分子生物学实验中使用液氮研磨组织的方法 [J]. *实验教学与仪器*, 2005, 22(3): 29.
- [4] 刘薇, 方国庆, 刘立成, 等. 奶牛瘤胃微生物 DNA 提取法的研究与优化 [J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(13): 71-75.
- [5] 冯唐楷, 赵文亮. 细菌基因组 DNA 提取方法简化的研究 [J]. *景德镇学院学报*, 2014, 29(6): 42, 47.
- [6] 高秋月, 景奉香, 李海燕, 等. 基于磁珠的细菌基因组 DNA 快速提取方法 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(21): 11071-11074.
- [7] 常健, 王琪. 晋西北酸沼发酵过程中微生物基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(2): 209-212, 233.
- [8] 戴方伟, 宋晓明, 周莎柔, 等. 大鼠肠内容物细菌基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 246-249.
- [9] 夏涵, 府伟灵, 陈鸣, 等. 快速提取细菌 DNA 方法的研究 [J]. *现代预防医学*, 2005, 32(5): 571-573.
- [10] 刘晓侠, 林建平, 岑沛霖. 微生物基因组 DNA 提取方法的比较与改进 [J]. *嘉兴学院学报*, 2007, 19(3): 48-50.
- [11] 陶兴玲, 雷琼, 马立安. 一种快速提取土壤微生物 DNA 的方法 [J]. *长江大学学报(自科版)*, 2018, 15(2): 54-58.
- [12] PANOVA M, ARONSSON H, CAMERON R A, et al. DNA extraction protocols for whole-genome sequencing in marine organisms [J]. *Methods in molecular biology*, 2016, 1452: 13-44.
- [13] OLSON N D, MORROW J B. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation [J]. *BMC Research Notes*, 2012, 5(1): 668.
- [14] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied & environmental microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [15] 孙儒泳. 动物生态学原理 [M]. 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1992: 356-357.
- [16] 况琪军, 马沛明, 胡征宇, 等. 湖泊富营养化的藻类生物学评价与治理研究进展 [J]. *安全与环境学报*, 2005, 5(2): 87-91.
- [17] 王雨, 卢昌义, 谭凤仪, 等. 深圳红树林水体浮游植物多样性与营养状态评价 [J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(1): 17-21, 26.
- [18] 刘冲钲, 葛世斌, 何宁, 等. 碳、氮、磷营养对 7 种海洋微藻种群增长的影响研究 [J]. *南方水产科学*, 2020, 16(1): 87-97.
- [19] 李亚军, 王先明, 程贤松, 等. 美济礁近岸海域夏季浮游植物群落结构特征及其与环境因子的关系 [J]. *热带作物学报*, 2020, 41(3): 615-621.
- [20] 陶志英, 陈文静, 余智杰, 等. 太湖浮游植物群落结构特征及其与环境因子相关性分析 [J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(3): 63-67, 106.
- [21] 徐琼, 贾克力, 李文宝, 等. 达里诺尔湖夏季浮游植物群落结构及分布特征 [J]. *水生态学杂志*, 2016, 37(6): 14-22.
- [22] DAVISON I R. Environmental effects on algal photosynthesis: Temperature [J]. *J Phycol*, 1991, 27(1): 2-8.
- [23] 丁蕾, 文崇远. 环境对硅藻的影响及硅藻对环境的监测 [J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 24(3): 13-16.
- [24] 舒卫先, 张云舒, 韦翠珍. 洪泽湖浮游藻类变化动态及影响因素 [J]. *水资源保护*, 2016, 32(5): 115-122.
- [25] ZHANG M, SHI X L, YANG Z, et al. Long-term dynamics and drivers of phytoplankton biomass in eutrophic Lake Taihu [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 645: 876-886.
- [26] 许海, 秦伯强, 朱广伟. 太湖不同湖区夏季蓝藻生长的营养盐限制研究 [J]. *中国环境科学*, 2012, 32(12): 2230-2236.
- [27] 郑丙辉, 田自强, 张雷, 等. 太湖西岸湖滨带水生生物分布特征及水质营养状况 [J]. *生态学报*, 2007, 27(10): 4214-4223.
- [28] 张家路, 王银平, 蔺丹清, 等. 安庆新洲水域浮游植物群落结构特征 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 680-688.

(上接第 82 页)

响浮游植物群落结构的主要因素, 而秋季盐度、电导率和 pH 是影响浮游植物群落结构的主要显著因子, 在水质方面, 浮游植物主要的影响因子是氨氮、总氮和总磷。

参考文献

- [1] CHEN B H, XU Z H, ZHOU Q L, et al. Long-term changes of phytoplankton community in Xiagu waters of Xiamen, China [J]. *Acta Oceanol Sin*, 2010, 29(6): 104-114.
- [2] YEANNY M S. Phytoplankton community as bioindicator of fertility in belawan river [J]. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2018, 130(1): e012030.
- [3] DAVID C P C, STA MARIA Y Y, SIRINGAN F P, et al. Coastal pollution due to increasing nutrient flux in aquaculture sites [J]. *Environ Geol*, 2009, 58(2): 447-454.
- [4] ACEVEDO-TREJOS E, MARAÑÓN E, MERICO A. Phytoplankton size diversity and ecosystem function relationships across oceanic regions [J]. *Proc Biol Sci*, 2018, 285: 1-9.
- [5] 朱佳志, 刘明典, 黄福江, 等. 西双版纳南腊河浮游植物群落结构及其与水环境因子的关系 [J]. *淡水渔业*, 2015, 45(6): 39-45, 69.
- [6] 胡勤海, 余伟, 朱荫涓, 等. 钱塘江水系富春江段水污染现状调查研究 [J]. *环境污染与防治*, 1997, 19(6): 16-20.
- [7] 于一雷, 郭菊兰, 武高洁, 等. 清澜港红树林浮游植物群落结构及水质对应分析 [J]. *水资源保护*, 2018, 34(2): 102-110.
- [8] SHANNON C E, WEAVER W. The mathematical theory of communication [M]. Urbana IL: The University of Illinois Press, 1949: 1-125.
- [9] PIELOU E C. An introduction to mathematical ecology [M]. New York: Wiley Interscience, 1969: 1-286.
- [10] MARGALEF R. La teoría de la información en ecología [J]. *Memorias de la real academia de ciencias y artes de barcelona*, 1957, 32(13): 373-449.