

湿地土壤微生物 DNA 提取及其脱腐技术

李靖宇¹ 赵吉^{2*} 边玉² 武琳慧² 于景丽²

(1. 内蒙古大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010021)

(2. 内蒙古大学环境与资源学院 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: DNA 分子生物学技术的广泛应用, 为全面了解微生物群落提供了有力的工具。本文建立了一种新的从湿地土壤中提取微生物总 DNA 的方法, 即氯化钙-SDS-酶法。在直接提取 DNA 过程中采用氯化钙去除腐殖酸, DNA 提取缓冲液中不使用 EDTA 螯合剂, 提取过程用时 4 h 左右。与其他两种方法相比, 该方法高效去除湿地土壤腐殖酸, 纯度较高, 满足 PCR 扩增, 为微生物生态学研究提供了一种高效的湿地土壤微生物总 DNA 提取和纯化技术。

关键词: 湿地土壤, DNA 提取, 腐殖酸, PCR 扩增, 氯化钙-SDS-酶法

DNA Extraction and Removing Humic Substance from Wetland Soil

LI Jing-Yu¹ ZHAO Ji^{2*} BIAN Yu² WU Lin-Hui² YU Jing-Li²

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot, Inner Mongolia 010021, China)

(2. College of Environment & Resources, Inner Mongolia University, Huhhot, Inner Mongolia 010021, China)

Abstract: DNA-based molecular biology techniques have widely been used as a powerful tool to understand the microbial community. In this paper, a new method to extract microbial genomic DNA from wetland soil was established, namely Calcium Chloride-SDS-Enzymatic. Calcium chloride rather than EDTA chelating agent was used to remove humic acids in the process of direct DNA extraction. The extracting time is less than 4 hours. In comparing with other two methods, this method is more efficient in removing humic acids from wetland soil, and the purity of extracted DNA is higher which can be applied to PCR amplification. It provides an efficient technology to extract and purify microbial genome DNA from soil for microbial ecological studies.

Keywords: Wetland soil, DNA extraction, Humic acid, PCR amplification, Calcium chloride-SDS-enzymatic

从土壤和沉积物样品中提取微生物总 DNA 是研究微生物多样性的前提和基础, 方法大致可以分为直接提取和间接提取两大类^[1]。直接提取法获得 DNA 的量较大, 但腐殖酸的存在会影响到下游的分

析^[2]。为了获得纯度较高的微生物总 DNA, 需要对其进行纯化处理。纯化处理的方法有硫酸铝捕获腐殖酸法^[3]、PVPP 纯化法^[4]、CTAB 法^[5]、氯化铯密度梯度离心法^[6]、交联葡聚糖和琼脂糖凝胶过滤树

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项项目(No. 2009CB125909)

* 通讯作者: Tel: 86-471-4991676; ✉: ndzj@imu.edu.cn

收稿日期: 2010-01-25; 接受日期: 2010-05-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

脂^[7]、离子交换和高效分子量排阻层析^[8]、电洗脱^[9]、琼脂糖凝胶电泳^[10]和醋酸铵沉淀^[10]。但这些纯化处理增加了复杂性,且费时费力。*Taq* DNA 聚合酶基因突变^[11]可增加对腐殖酸等 PCR 抑制物的抗性,不需要对基因组 DNA 进行纯化就可以进行后续的生物分子生物学分析。

本文旨在细胞裂解前去除腐殖酸获得较纯的 DNA 提取物,探索能够满足后续生物分子生物学分析的微生物总 DNA 提取方法。土壤中腐殖酸含有大量的活性功能基团,如羧基和羟基^[12],具有很强的与环境中离子反应和结合的能力^[13]。本文通过二价阳离子与腐殖酸的结合反应,最终获得一种高效去除腐殖酸的可用于微生物分子生态多样性研究的土壤微生物总 DNA 提取新方法。

1 材料与方法

1.1 土样采集和保藏

供试土样采集于内蒙古高原天然湿地,包括:锡林郭勒典型草原(恢复草原土壤-1和退化草原土壤-2) 2个参比土样以及锡林河中游(河边底泥-3、河中心沉积物-4、牛厄湖塔头间土壤-5、河堆积岸灯芯草土壤-6) 4个湿地土样,共6个样品,分别记为 W1、W2、W3、W4、W5、W6,对应于图2至图7中的1、2、3、4、5、6。采集深度:0–10 cm。6种土壤样品的部分理化性质见表1。

1.2 DNA 提取新方法

- (1) 取 1 g 过筛的土样(一般 0.5–1.5 g)于 2 mL 离心管中,加入 1.5 mL 脱腐缓冲液(100 mmol/L Tris, 100 mmol/L Na₄PO₇, 100 mmol/L Na₂EDTA, 1.0% PVP, 100 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, pH 10.0), 涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清。
- (2) 加入 1 mL 0.5 mol/L 的氯化钙溶液, 涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清。
- (3) 加入 1 mL 0.05 mol/L 的草酸钠溶液(pH 7.96), 涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清。
- (4) 加入 700 μL DNA 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, pH 8.0), 涡旋混匀, 加入 100 μL 溶菌酶溶液(100 g/L), 颠倒几次, 37°C、200 r/min 温育 30 min, 每隔 10 min 取出颠倒混匀一次。
- (5) 加入 200 μL SDS 溶液(20%), 颠倒混匀, 65°C 温育 1 h, 每隔 10 min 取出颠倒混匀一次。
- (6) 12000 r/min 离心 5 min; 取上清 950 μL 上清液于 1.5 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 5 min。
- (7) 取上清 900 μL 于 2 mL 离心管中, 加入等体积的酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1), 12000 r/min 离心 5 min。
- (8) 取上清 800 μL 于 2 mL 离心管中, 加入等体积的酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1), 12000 r/min 离心 5 min。

表 1 土壤样品的基本理化性质
Table 1 Properties of soil sample used in DNA extraction

基本理化性质 Basal physical and chemical properties	W1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6
1000 μm	100	100	100	99.10	100	100
500 μm	99.89	99.67	93.73	79.91	100	100
250 μm	96.80	90.31	52.18	18.93	91.56	93.43
粒度(μm)和百分比 Size and percentage	100 μm	68.62	53.37	17.15	5.75	30.71
	50 μm	47.23	33.12	9.13	2.281	15.28
	10 μm	16.62	13.70	0.661	0	3.79
	5 μm	7.86	6.49	0	0	0.98
	2 μm	1.298	0.93	0	0	0
有机碳(g/kg) Organic carbon (g/kg)	70.69	62.60	25.08	23.01	27.53	18.09
全氮(g/kg) Total nitrogen (g/kg)	2.115	2.037	1.089	0.271	1.179	0.976
微生物生物量 C (μg/g) Microbial biomass carbon (μg/g)	987.01	731.21	246.35	191.88	622.13	442.80

(9) 取上清 700 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的氯仿 : 异戊醇(24 : 1), 12000 r/min 离心 5 min。

(10) 取上清 600 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的氯仿 : 异戊醇(24 : 1), 12000 r/min 离心 5 min。

(11) 取上清 500 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 冰浴 20 min, 12000 r/min 离心 10 min。

(12) 弃上清, 用 70% 的酒精洗沉淀 2-3 次, 自然干燥。

(13) 50 μL TE 溶解沉淀。

1.3 DNA 提取方法二

使用北京百泰克生物技术有限公司生产的土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型), 稍作修改。准确称量 0.5 g 的新鲜土样到 1.5 mL 灭菌的干净离心管中, 加入 1 mL 的抽提液, 加入 5 μL 的溶液 A, 振荡 1 min, 充分混匀后 37°C 水浴 10 min (每隔 3 min 剧烈振荡混匀); 加入 100 μL 溶液 B, 振荡 1 min, 充分混匀后 65°C 水浴 10 min (每隔 3 min 剧烈振荡混匀); 10000 r/min 离心 10 min 取上清到新的 1.5 mL 的离心管中; 加入 1/3 体积蛋白质沉淀液, 充分颠倒混匀; 冰浴 8 min, 13000 r/min 离心 10 min 取上清; 纯化柱的处理: 在纯化柱中间加入 500 μL 溶液 C, 静置 1 min, 10000 r/min 离心过滤; 将上一步得到的上清液加入到处理过的纯化柱中, 低速离心 (2000 g) 过滤, 收集下滤液(含有 DNA); 准确估计下滤液的体积, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 充分混匀, 13000 r/min 离心 10 min, 小心倒掉上层滤液, 倒扣离心管直到晾干, 最后用 50 μL TE 溶解。

1.4 DNA 提取方法三

采用中国科学院沈阳应用生态研究所分子生物学实验室微生物资源与生态组 2006 年东北三省微生物分子生态学研究技术培训班实验讲义中环境样品总 DNA 提取方法, 稍加修改。取 1 g 土壤样品加 900 μL 提取 Buffer (100 mmol/L Tris + 100 mmol/L EDTA + 1.5 mol/L NaCl), 涡旋 5 min; 加 50 μL 溶菌酶(100 g/L)涡旋混匀, 37°C、200 r/min、30 min, 每隔 10 min 取出颠倒混匀一次; 加入 100 μL 20% SDS, 65°C、30 min 混匀, 每隔 10 min 颠倒混匀一次; 降至室温, 8000 r/min 离心 10 min; 取上清 800 μL 加入 0.2 倍体积 KAc (8 mol/L), 冰浴 10 min, 室温下

14000 r/min 离心 20 min; 取 800 μL 上清加入 0.5 倍体积 PEG (50%), 加入 0.1 倍体积的 NaCl (5 mol/L) 混匀, 4°C 放置 2 h; 室温下 14000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 加入 70% 的乙醇洗涤沉淀; 室温干燥后, 700 μL TE 溶解核酸; 加入等体积的酚 : 氯仿 : 异戊醇(25 : 24 : 1), 轻轻颠倒混匀, 室温下 12000 r/min 离心 10 min; 取 600 μL 上清, 加入等体积的氯仿 : 异戊醇(24 : 1), 轻轻颠倒混匀, 室温下 12000 r/min 离心 10 min; 取 500 μL 上清, 加入 0.1 倍体积的 NaAc (3 mol/L), 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀, 4°C 沉淀 2 h; 室温下 14000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 70% 乙醇洗沉淀, 室温下 14000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 干燥后加入 50 μL TE 溶解。

1.5 氯化钙去除腐殖酸试验

取 2 g 湿地土壤样品平均分成两份分别置于 2 mL 的离心管中, 分别加入 1.5 mL 的脱腐缓冲液, 涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 取 1.5 mL 上层液体于另外一支新的 1.5 mL 离心管中; 取 750 μL 上层液体于另外一支新的 1.5 mL 离心管中, 且同时加入 750 μL 0.5 mol/L 的氯化钙溶液, 颠倒几次混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 然后转移液体到一支新的 1.5 mL 离心管中, 分别稀释 3 倍后在 320 nm 处测其光吸收值。

1.6 16S rDNA PCR 扩增

反应体系: dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL 、27F (10 mmol/L) 1.0 μL 、1492R (10 mmol/L) 1.0 μL 、10 × Buffer (Promega) 2.5 μL 、Taq 酶(5 U/ μL) 0.2 μL 、模板 1 μL 、加 ddH₂O 到 25 μL 。通用引物^[16]: 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3')。反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 80 s, 30 个循环; 72°C 10 min。

1.7 紫外线光谱法测定 DNA 的产量和纯度

利用 NanoDrop® ND-1000 紫外-可见分光光度计 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, USA) 测定 DNA 提取样品在 230 nm、260 nm 和 280 nm 下的 OD 值。基因组 DNA 未经过纯化和稀释直接取 2 μL DNA 的 TE 溶液进行测定。

1.8 基因组 DNA 和 16S rDNA 的琼脂糖凝胶电泳

1.8.1 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳: 取 5 μL DNA 提取液与 1 μL 6 × 上样缓冲液点样于 0.8% 琼

脂糖凝胶上, 置于 TBE 缓冲液(pH 8.3)进行电泳。100 V 50 min, EB 染色 5 min, 利用 UVItc DBT-08 凝胶图像分析系统成像。

1.8.2 16S rDNA 的琼脂糖凝胶电泳: 取 5 μ L 16S rDNA 扩增产物与 1 μ L 6 \times 上样缓冲液点样于 1%琼脂糖凝胶上, 置于 TBE 缓冲液(pH 8.3)进行电泳。EB 染色 5 min, 利用 UVItc DBT-08 凝胶图像分析系统成像。

2 结果与讨论

2.1 氯化钙-SDS-酶法建立依据

加入脱腐缓冲液^[15]可以在细胞裂解前去除一部分腐殖酸, 同时增加样品洗脱步骤, 可以去除可溶性的抑制物和胞外 DNA^[16]。对于腐殖质中弱酸基团, 较高的钙离子表面络合常数($\log K^{\text{int}} = -0.52$)表明与腐殖质有很强的亲合力, 能形成稳定的金属-腐殖质化合物^[17]。氯化钙与腐殖质反应生成沉淀能有效去除腐殖质, 效果见图 1, 320 nm 处光吸收值 $A_1 = 3.777$, $A_2 = 0.531$, 去除率为 85.93%。加入草酸钠能螯合多余的钙离子和其他金属离子。



图 1 氯化钙去除腐殖酸效果

Fig. 1 Effectiveness of humic acid removal by Calcium Chloride

注: A1: 处理前; A2: 处理后。

Note: A1: Pre-treatment; A2: Post-treatment.

目前 DNA 提取缓冲液中加入 EDTA 螯合剂^[5,9,14,18-19], 未加入 EDTA 螯合剂的比较研究未见报道^[10]。DNA 提取缓冲液加入到土壤样品在氯化钙与土壤腐殖酸反应生成沉淀之后, 如果 DNA 提取缓冲液中加入 EDTA 螯合剂, EDTA 可以将氯化钙与腐殖酸形成的沉淀溶解, 释放出腐殖酸, 降低了氯化钙去除腐殖酸的效率, 影响 DNA 提取纯度, 故本方法在 DNA 提取缓冲液中未加 EDTA 螯合剂。

细胞裂解破壁通常结合化学裂解与酶裂解进行, 主要是变性剂和细胞裂解酶结合使用。变性剂使用最广泛的是 SDS^[5,9-10,20-21], 细胞裂解酶使用最多的是溶菌酶^[22-23]。所以, 为了该提取方法更加普遍和适用, 本文采用了 SDS 与溶菌酶相结合的方法裂解细胞。

DNA 的沉淀可以使用乙醇、聚乙二醇 8000 和异丙醇, 使用聚乙二醇 8000 和异丙醇的 DNA 产量少于使用乙醇的产量, 且聚乙二醇可能影响 PCR, 乙醇沉淀 DNA 有利于腐殖酸的共沉淀, 所以选择异丙醇沉淀 DNA。本法在提取土壤基因组 DNA 过程中, 去除腐殖质的关键步骤是脱腐缓冲液和氯化钙溶液的使用。

2.2 氯化钙-SDS-酶法与其他两种方法对 6 种不同土壤基因组 DNA 提取纯度和 PCR 扩增

氯化钙-SDS-酶法和其他两种土壤基因组 DNA 提取方法提取基因组 DNA 结果分别见图 2、3、4, 3 个重复。结果表明, 3 种方法提取土壤微生物基因组 DNA 的重复性都很高。基因组 DNA 的 OD 值测定结果见表 2, 新方法提取 DNA 的 260/280 值与其他两种方法提取 DNA 的 260/280 值差异显著, 除 W6 号样品差异不显著外, 新方法的 260/280 值高于其他两种方法的 260/280 值, 且比 Zhou J 等^[5]、Dave S Bachoon 等^[24]报道的高, 比 C Yeates 等^[25]稀释 100 倍后高, C Yeates 等^[25]稀释 100 倍仅有 1.69 这个值高于本文的所有值。新方法提取 DNA 的 260/230 值与方法二提取 DNA 的 260/230 值差异极显著, 260/230 值高于方法二; 新方法提取 DNA 的 260/230 值与方法三提取 DNA 的 260/230 值差异显著, 除 W6 号样品差异不显著外, 260/230 值都高于方法三, 且比 Jackson CR 等^[7]报道的高, Dave S Bachoon 等^[24]报道的 260/230 值最小为 1.09, 最大为 1.35, C Yeates 等^[25]稀释 100 倍后最小为 1.10, 最大值是 1.69, 而该法最小 0.89, 最大 1.97。

PCR 扩增是土壤 DNA 提取的主要用途, *Taq* DNA 聚合酶对腐殖酸很敏感, 腐殖酸的存在影响扩增反应^[5], 成功的 PCR 扩增通常作为一种合适的土壤 DNA 纯度指标^[26]。16S rDNA 扩增时, 新方法提取 DNA 样品 W1、W2、W5 稀释 25 倍, W3、W4、W6 稀释 5 倍, 3 个重复, PCR 结果见图 5, 结果表明氯化钙-SDS-酶法所提取的基因组 DNA 可以用于扩增 16S rDNA, 重复性高。方法二和方法三分别提取

的 6 个 DNA 样品在原始浓度、稀释 5 倍、25 倍和 100 倍下进行 PCR, 结果分别见图 6、图 7。图 6 结果表明, W4 号样品在 5 倍、25 倍和 100 倍稀释下有条带, 且在 100 倍稀释下, 条带最亮; W3 和 W5 号样品在 100 倍稀释下有条带。图 7 结果表明, W1 号样品在 25 倍和 100 倍稀释下有条带, 且在 100 倍稀释下条带亮; W2 号样品在 25 倍稀释下有条带; W3 号样品在原始浓度和 5 倍稀释下有条带; W5 号样品在 25 倍和 100 倍稀释下有条带, 条带都比较亮; W6 号样品在 5 倍和 25 倍稀释下有条带。

表 2 3 种方法对 6 种不同土壤提取的微生物基因组 DNA 的产量和纯度							
Table 2 Yield and purity of extracted microbial genomic DNA from six different soils by three methods							
Sample	Method	DNA Yield (mg/L)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	Valid N
W 1	1	113.81 ^{Aa} ± 7.87	2.28 ^{Aa} ± 0.16	1.41 ^{Aa} ± 0.09	1.61 ^{Aa} ± 0.01	1.32 ^{Aa} ± 0.07	3
W 1	2	505.74 ^{Bb} ± 15.07	10.11 ^{Bb} ± 0.30	8.15 ^{Bb} ± 0.44	1.24 ^{Bb} ± 0.04	1.03 ^{Bb} ± 0.10	3
W 1	3	57.10 ^{Ac} ± 45.50	1.14 ^{Ac} ± 0.91	0.75 ^{Aa} ± 0.56	1.49 ^{Ac} ± 0.09	1.14 ^{ABb} ± 0.02	3
W 2	1	72.68 ^A ± 8.19	1.45 ^A ± 0.16	0.93 ^{Aa} ± 0.10	1.56 ^{Aa} ± 0.01	1.31 ^{Aa} ± 0.14	5
W 2	2	127.16 ^B ± 18.97	2.54 ^B ± 0.38	1.78 ^{Bb} ± 0.31	1.43 ^{Bb} ± 0.04	0.74 ^{Bb} ± 0.02	3
W 2	3	37.82 ^C ± 6.13	0.76 ^C ± 0.12	0.52 ^{Ac} ± 0.08	1.46 ^{Bb} ± 0.02	0.89 ^{Bb} ± 0.09	3
W 3	1	94.45 ^{Aa} ± 17.67	1.89 ^{Aa} ± 0.35	1.13 ^{Aa} ± 0.20	1.67 ^a ± 0.03	1.81 ^A ± 0.10	3
W 3	2	53.75 ^{Ab} ± 15.05	1.08 ^{Ab} ± 0.03	0.74 ^{Ab} ± 0.23	1.46 ^{ab} ± 0.04	0.57 ^B ± 0.06	3
W 3	3	9.30 ^{Bc} ± 2.68	0.19 ^{Bc} ± 0.05	0.14 ^{Bc} ± 0.05	1.36 ^b ± 0.22	1.04 ^C ± 0.11	3
W 4	1	44.27 ^{Aa} ± 9.07	0.89 ^{Aa} ± 0.18	0.58 ^{Aa} ± 0.11	1.52 ^{Aa} ± 0.06	1.97 ^{Aa} ± 0.62	5
W 4	2	39.78 ^{Aa} ± 4.75	0.80 ^{Aa} ± 0.10	0.56 ^{Aa} ± 0.05	1.41 ^{Aa} ± 0.07	0.58 ^{Bb} ± 0.03	3
W 4	3	6.74 ^{Bb} ± 3.00	0.13 ^{Bb} ± 0.06	0.14 ^{Bb} ± 0.08	1.05 ^{Bb} ± 0.19	0.91 ^{Bb} ± 0.19	3
W 5	1	199.82 ± 12.65	4.00 ± 0.25	2.66 ± 0.21	1.50 ^{Aa} ± 0.04	0.92 ^{Aa} ± 0.06	4
W 5	2	239.29 ± 91.52	4.79 ± 1.83	3.50 ± 1.36	1.37 ^{Bb} ± 0.01	0.70 ^{Bb} ± 0.02	3
W 5	3	172.90 ± 56.71	3.46 ± 1.13	2.31 ± 0.81	1.51 ^{Aa} ± 0.05	0.72 ^{ABb} ± 0.12	3
W 6	1	72.16 ^A ± 12.01	1.44 ^A ± 0.24	1.01 ^A ± 0.17	1.43 ± 0.00	0.89 ^{Aa} ± 0.07	5
W 6	2	130.36 ^B ± 12.90	2.61 ^B ± 0.26	1.93 ^B ± 0.18	1.35 ± 0.01	0.72 ^{Bb} ± 0.02	3
W 6	3	10.45 ^C ± 3.08	0.21 ^C ± 0.06	0.17 ^C ± 0.05	1.27 ± 0.24	0.95 ^{Aa} ± 0.08	3

注: 大写字母表示差异极显著($P < 0.01$), 小写字母表示差异显著($P < 0.05$).
Note: Uppercase letters represent most significantly different ($P < 0.01$), and lowercase letters represent significantly different ($P < 0.05$).

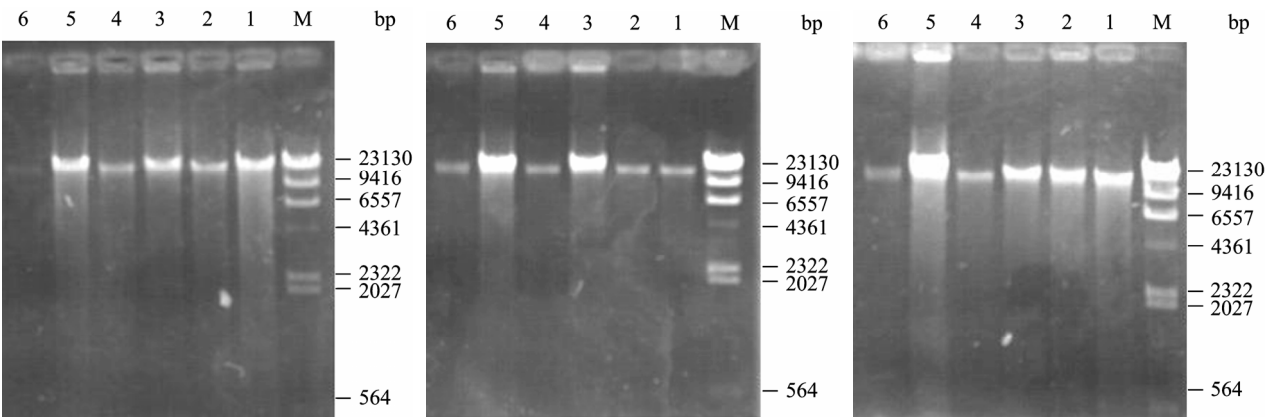


图 2 6 种不同土壤微生物基因组 DNA 电泳图(3 个重复)-新方法
Fig. 2 Gel electrophoresis of microbial genomic DNA (three duplicates) from six different soils by new method

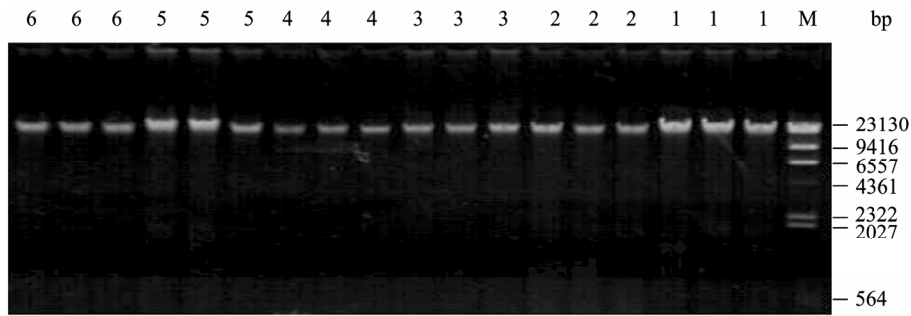


图 3 6 种不同土壤微生物基因组 DNA 电泳图(3 个重复)-方法 2

Fig. 3 Gel electrophoresis of microbial genomic DNA (three duplicates) from six different soils by method two

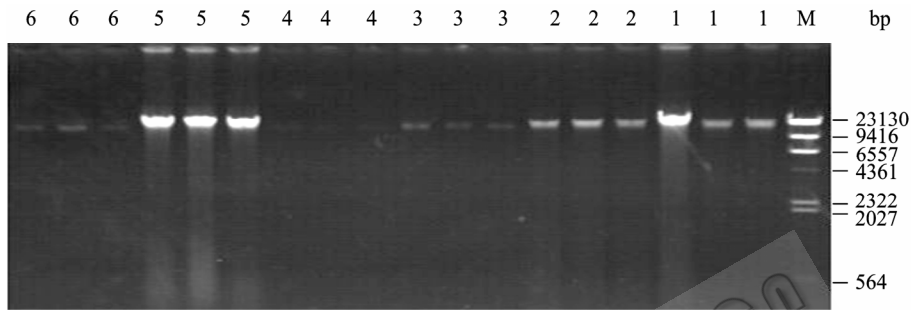


图 4 6 种不同土壤微生物基因组 DNA 电泳图(3 个重复)-方法 3

Fig. 4 Gel electrophoresis of microbial genomic DNA (three duplicates) from six different soils by method three

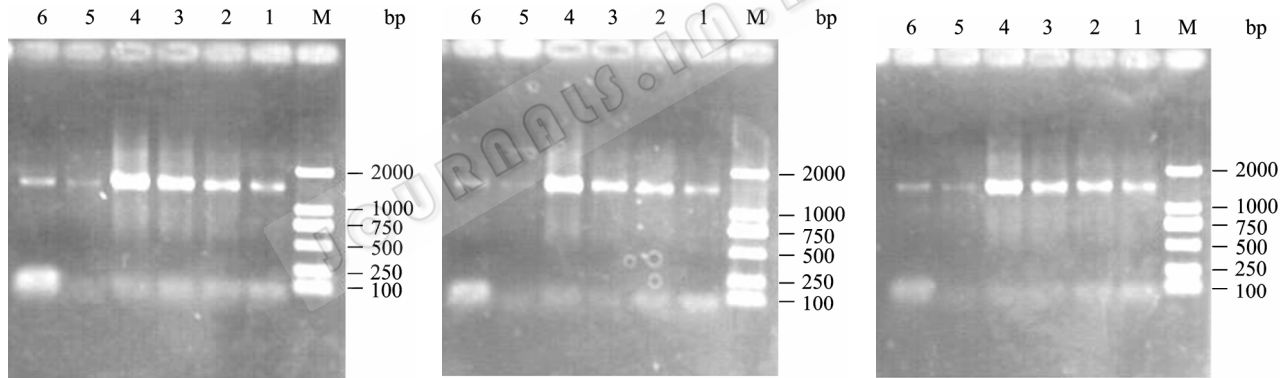


图 5 6 种不同土壤微生物基因组 16S rDNA 扩增电泳图(3 个重复)-新方法

Fig. 5 Gel electrophoresis of microbial genomic 16S rDNA amplification (with different dilutions) from six different soils by new method

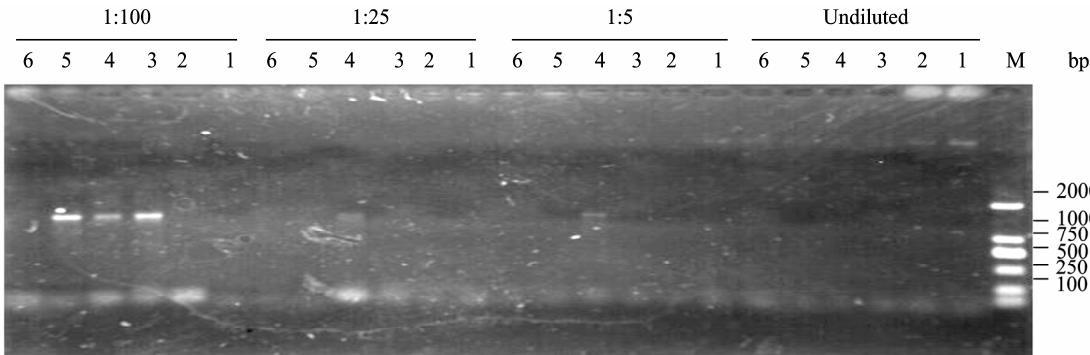


图 6 6 种不同土壤微生物基因组 16S rDNA 在不同稀释倍数下扩增电泳图-方法 2

Fig. 6 Gel electrophoresis of microbial genomic 16S rDNA amplification (with different dilutions) from six different soils by method two

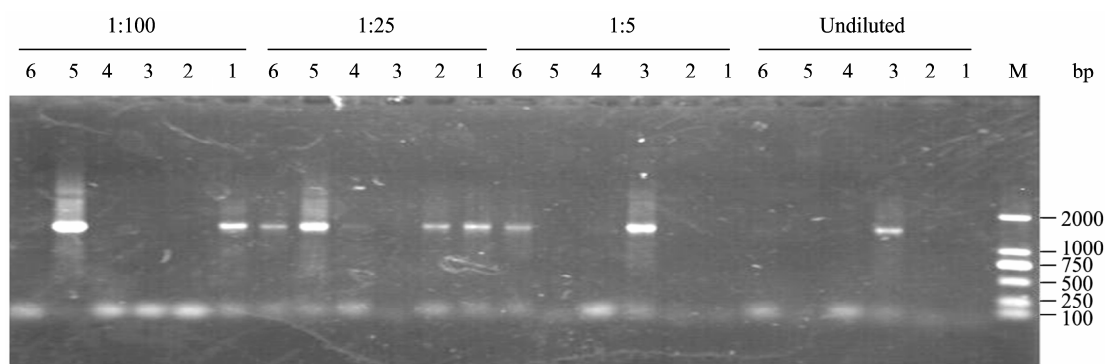


图 7 6 种不同土壤微生物基因组 16S rDNA 在不同稀释倍数下扩增电泳图-方法 3

Fig. 7 Gel electrophoresis of microbial genomic 16S rDNA amplification (with different dilutions) from six different soils by method three

3 结论

氯化钙-SDS-酶法可以高效去除腐殖酸, 所提取的 DNA 纯度较高, 片段大小约为 23 kb 左右, 可用于扩增 16S rDNA, 且耗时短, 大约 4 h 左右完成 DNA 的提取, 可应用于草原、湿地或沉积物等富含腐殖质环境中的微生物群落结构研究。

参 考 文 献

- [1] Patrick Robe, Renaud Nalin, Carmela Capellano, *et al.* Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 2003(39): 183–190.
- [2] Zipper H, Buta C, Lammle K, *et al.* Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(7): e39.
- [3] Persoh D, Theuerl S, Buscot F, *et al.* Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *J Microbiol Methods*, 2008(75): 19–24.
- [4] Mendum TA, Sockett RE, Hirsch PR. The detection of gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 1998(164): 369–373.
- [5] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316–322.
- [6] Holben WE, Jansson JK, Chelm BK, *et al.* DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(3): 703–711.
- [7] Jackson CR, Harper JP, Willoughby D, *et al.* A simple efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(12): 4993–4995.
- [8] Hurt RA, Qiu X, Wu L, *et al.* Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10): 4495–4503.
- [9] Jens Kallmeyer, David C Smith. An improved electroelution method for separation of DNA from humic substances in marine sediment DNA extracts. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009(69): 125–131.
- [10] D N Miller, JE Bryant, EL Madsen, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(11): 4715–4724.
- [11] Milko B Kermekchiev, Lyubka I Kirilova, Erika E Vail, *et al.* Mutants of *Taq* DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 2009, **37**(5): 2–14.
- [12] Jin Nan Wang, Ai Min Li, Yang Zhou, *et al.* Study on the influence of humic acid of different molecular weight on basic ion exchange resin's adsorption capacity. *Chinese Chemical Letters*, 2009(20): 1478–1482.
- [13] Xing BS, Liu JD, Liu XB, *et al.* Extraction and characterization of humic acids and humin fractions from a black soil of China. *Pedosphere*, 2005, **15**(1): 1–8.
- [14] F Martin-Laurent, L Philippot, S Hallet, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(5): 2354–2359.
- [15] 席峰, 傅莲英, 王桂忠, 等. 海洋沉积物 DNA 提取前的简易脱腐方法研究. *高技术通讯*, 2006, **16**(5): 539–544.
- [16] G Pietramellara, J Ascher, F Borgogni, *et al.* Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biol Fertil Soils*, 2009(45): 219–235.
- [17] Ping Zhou, Hui Yan, Baohua Gu. Competitive complexation of metal ions with humic substances. *Chemosphere*, 2005(58): 1327–1337.
- [18] 陈邦, 范代娣, 王琰. 土壤微生物 DNA 提取方法的研究

- 究. 西北大学学报: 自然科学版, 2009, **39**(5): 785–788.
- [19] 王丽娜, 许修宏, 宛煜嵩. 三种土壤微生物总 DNA 提取方法的比较. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(2): 331–334.
- [20] Marketa SM, Ladislav C, Jitka N, *et al.* Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(9): 2902–2907.
- [21] Liang Wu, Fenge Li, Changyan Deng, *et al.* A method for obtaining DNA from compost. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009(84): 389–395.
- [22] Mark RL, Lynn LW, Jitsupang R, *et al.* Recovery, Purification, and cloning of high-molecular-weight DNA from soil microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(10): 3302–3305.
- [23] MK Purohit, SP Singh. Assessment of various methods for extraction of metagenomic DNA from saline habitats of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, **49**(3): 338–344.
- [24] Dave S Bachoon, Ernesto Otero, Robert E Hodson. Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 2001(47): 73–82.
- [25] C Yeates, MR Gillings, AD Davison, *et al.* Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1998, **1**(1): 40–47.
- [26] Cullen DW, Hirsch PR. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol Biochem*, 1998(30): 983–993.

2010 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
大豆科学	14-95	双月刊	60	http://ddkx.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4606693	dadoukx@sina.com
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	210	http://dwzzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	120	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫学报	2-153	月刊	420	www.insect.org.cn	kctxb@ioz.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	150	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linyikx@forestry.ac.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
山地农业生物学报	66-66	双月	100	http://web.gzu.edu.cn/jou/jou	Sd.xb@163.com
生命科学	4-628	月刊	360	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300	http://swjstb.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4615630	biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net
生物信息学	14-14	季刊	48	http://xxsw.chinajournal.net.cn	cjbioinformatics@yahoo.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn	actamicro@im.ac.cn