

## 转基因棉花根际土壤 DNA 的提取方法研究\*

李长林<sup>1\*\*</sup> 吴建波<sup>2</sup> 杨殿林<sup>1</sup> 刘万华<sup>3</sup>

(农业部环境保护科研监测所 天津 300191) (南开大学生命科学学院 天津 300071)

(武清区农业技术推广中心 天津 301700)

**摘要** 采用直接裂解方式,通过玻璃珠、溶菌酶和 SDS 共同作用直接从转基因棉花 SGK321 和中棉所 41 的根际土壤中提取微生物 DNA。结果表明,该方法能从两种转基因棉花根际土壤中提取到 20kb 大小的完整的 DNA 片段。所得 DNA 完全适用于 PCR 扩增和酶切的要求。

**关键词** 转基因棉花 根际土壤微生物 RFLP

**中图分类号** Q75 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(2007)05-0943-03

## Study on DNA Extraction Method in Rhizosphere Soil of Transgenic Cotton\*

LI Chang-Lin<sup>1\*\*</sup> WU Jian-Bo<sup>2</sup> YANG Dian-Lin<sup>1</sup>, LIU Wan-Hua<sup>3</sup>

(Agro-environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191)

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

(Agro-technique Extension Center, Wuqing District, Tianjin 301700)

**Abstract** A direct lysis manner for extracting DNA directly from rhizosphere soil of transgenic cotton SGK321 and Zhongmiansuo 41 was designed by glass bead-lysozyme-SDS method. The results showed that intact DNA fragments over 20 kb were gained from rhizosphere soil planted two cultivars of transgenic cotton. DNA extracted suited to PCR amplification and RFLP.

**Key words** Transgenic cotton, Rhizosphere soil microorganism, RFLP

植物根际土壤(Rhizosphere soil)是植物能量和物质代谢最活跃的部位之一。在植物根际土壤中生存着大量的微生物,其数量远高于非根际土壤<sup>[1]</sup>,在土壤的生物化学过程中发挥着重要作用,影响着植物的生长、发育。植物根际土壤微生物研究一直是倍受关注的热点问题,尤其随着分子生物学的发展,一些不依赖培养的土壤微生物学研究方法的出现,例如 G + C、DGGE、SSCP、ARDRA、T-RFLP<sup>[2-3]</sup>,突破了传统的依赖于培养的研究方法的局限,拓展了土壤微生物的研究范围,深入了土壤微生物区系、功能、动态的研究。高质量的 DNA

提取是应用这些研究手段的前提,也是关键所在。尤其是根际土壤富含大分子的腐殖酸,植物根分泌物如何减少这些物质对 DNA 的污染,降低其对 PCR 扩增的干扰变得尤为重要<sup>[4-5]</sup>。以往对土壤微生物 DNA 的提取方法的探讨多限于植物根周土<sup>[6-8]</sup>,而就某一种植物根际土壤微生物 DNA 的提取报道较少。本研究尝试采用简便易行的方法采集转基因棉花根际土壤,应用直接裂解方式从其中提取满足核酸分析的微生物 DNA,以期应用分子生物学方法研究转基因棉花根际土壤微生物群落多样性提供可行的方法。

\* 农业部环境保护科研监测所所长基金

\*\* 通讯作者 Tel 022-23003119, E-mail: changlinli@eyou.com

收稿日期:2006-12-18,修回日期:2007-04-05

1 材料和方法

1.1 样品采集

根际土壤样品于 2006 年 8 月采于天津武清区转基因棉花试验田。转基因棉花品种 SGK321 和中棉所 41 由中国农科院棉花研究所提供。每个转基因棉花品种取 3 株,抖落根周土,然后将带有根际土的棉花根系用硫酸纸包裹放入液氮,带回实验室转入 -70℃ 冰箱保存。

1.2 根际土壤 DNA 提取

1.2.1 根际土壤的收集:取 1.5mL TENP buffer (50mmol/L Tris[ pH 8.0 ],20mmol/L disodium EDTA ,100mmol/L NaCl ,1% [ W/V ] PVP)于 2mL 离心管中,将带有根际土的棉花根系在其中搅动,洗掉粘附在其表面的根际土壤,其质量控制在 200mg 左右,然后 1000r/min 15℃ 离心 10min ,弃上清液,重复 1 次。

1.2.2 根际土壤 DNA 粗提取:在装有根际土壤的 2mL 离心管中加入 0.2g 灭过菌的玻璃珠(直径约 1mm)和 0.5mL DNA 提取液(100mmol/L Tris[ pH 8.0 ],100mmol/L disodium EDTA ,200mmol/L NaCl ,2% [ W/V ] PVP ,2% [ W/V ] CTAB)高强度旋涡震荡 10min ,加入 50μL 溶菌酶(100mg/mL),37℃ 水浴 40min ,上下颠倒离心管 4 次,水浴结束后加入 0.5mL SDS buffer (100mmol/L Tris [ pH 8.0 ],100mmol/L disodium EDTA ,200mmol/L NaCl ,2% [ W/V ] SDS ),68℃ 水浴 40min ,上下颠倒离心管 4 次,1000r/min 15℃ 离心 10min ,收集上清液<sup>[6,7]</sup>。按上述方法再把残渣抽提一次。在上清液中加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1, V/V),颠倒混匀放置 10min ,1000r/min 15℃ 离心 15min ,收集上清液。加入 2/3 倍体积的异丙醇,-20℃ 沉淀 2h ,1000r/min 15℃ 离心 15min ,弃上清液。沉淀用 70% 乙醇洗涤 1 次,冷冻干燥后溶于 30μL TE buffer 中,将同一土壤样品提取的 DNA 合并在一个离心管中,-20℃ 保存。

1.2.3 DNA 纯化:采用上海申能博彩 3s spin DNA Purification Kit 试剂盒纯化。

1.3 DNA 的定量和纯度检测

用 Eppendorf 公司的 biophotometer DNA 定量仪测定 DNA 含量,以  $OD_{260}/OD_{280}$  比值评价纯度。

1.4 PCR 扩增反应

扩增采用细菌 16S rDNA 的通用引物 BSF 和

BSR。PCR 体系(25μL):模板 DNA 40ng ,1 × PCR 缓冲液 ,MgCl<sub>2</sub> 50nmol ,引物各 15 pmol ,Taq DNA 聚合酶 2 U ,dNTP 5 nmol ,加水补足 25μL。PCR 扩增条件:94℃ 初始变性 5min ,94℃ 变性 44s ,57℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 2min ,35 个循环 ;72℃ 延伸 5min。反应结束后,取 2μL PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.5 RFLP 分析

用限制性内切酶 *Hae* III 对 16S rDNA PCR 扩增产物进行消化。酶切反应总体积为 20μL ,含 8μL PCR 反应产物 ,1U 的内切酶和 2μL 的 10 × 反应缓冲液。37℃ 水浴 4h 后 ,65℃ 水浴 20min 终止反应 ,取 8μL 酶切产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

2 实验结果

2.1 所提取的土壤 DNA 产率及质量

通过直接裂解方式均从两个转基因棉花根际土壤中提取出 DNA ,其大小为 20kb 左右 ,DNA 主带较亮,无明显的弥散现象(图 1),说明所提取的 DNA 较为完整,无明显降解。从 SGK321 根际土壤提取的 DNA 产率平均为 10.65μg/gDW , $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.39 ,中棉所 41 根际土壤提取的 DNA 产率平均为 9.15μg/gDW , $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.42(表 1)。

表 1 根际土壤微生物 DNA 的产率及纯度

样品	$OD_{260}/OD_{280}$	DNA 产率(μg/gDW soil)
SGK321	1.39	10.65
中棉所 41	1.42	9.15

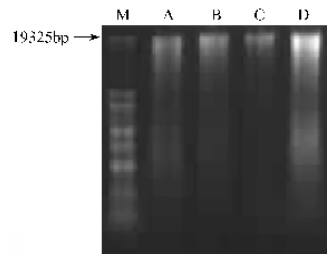


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳

M DNA marker ;A ~ B 从 SGK321 根际土壤提取的 DNA ;  
C ~ D 从中棉所 41 根际土壤提取的 DNA

2.2 16S rDNA 扩增

4 个样品中同一品种根际土壤微生物 DNA 合并在一起,稀释到 20ng/μL 进行 PCR 扩增,均在约 1.5kb 处得到较亮的条带,与预期大小一致(图 2)。

### 2.3 16S rDNA 限制性酶切

利用限制性内切酶 *Hae* III 对扩增片段进行酶切。经电泳发现产生了丰富的谱带类型,SGK321 和中棉所 41 根际土壤微生物 DNA 16S rDNA 扩增产物酶切后均产生了 4 种类型,最大的酶切片段为 600bp,具有多态性(图 3),表明两种转基因棉花品种根际土壤微生物区系具有明显不同。

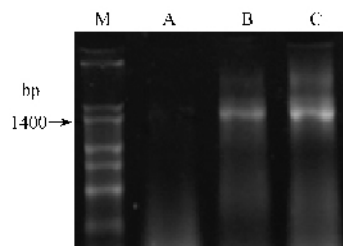


图 2 16S rDNA 扩增产物的电泳图谱

M DNA marker ;A 阴性对照 ;B SGK321 根际土壤 DNA 16S rDNA 扩增产物 ;C 中棉所 41 根际土壤 DNA 16S rDNA 扩增产物

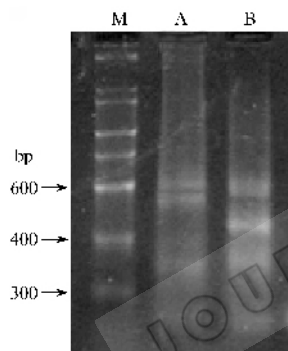


图 3 16S rDNA 的 *Hae* III 限制性酶切图谱

M DNA marker ;A SGK321 根际土壤 DNA16S rDNA 序列酶切产物 ;  
B 中棉所 41 根际土壤 DNA16S rDNA 序列酶切产物

### 3 讨论

植物根际土壤(Rhizosphere soil)是粘附在植物根系表面的土壤。以往研究中大多采用抖落法,取根系表层 1mm~2mm 土壤<sup>[9]</sup>,而在实际研究中这是很难操作的。本研究通过将低温保存的带有根际土壤的棉花根系在加入含有 DNase 抑制剂的 TENP buffer 2mL 离心管中搅动收集根际土壤,减少了样品的解冻时间,最大限度的降低了 DNA 降解,而且根系取出后立即放入无菌的 TENP buffer 避免了环境的污染,更为主要的是该方法所需样品很少,一般从 1g~2g 棉花根系表面即可收集到 200mg 的土壤,足够满足 DNA 提取的需要。

土壤 DNA 的提取主要包括 2 个关键步骤:①细胞的裂解;②土壤杂质的去除。研究表明玻璃珠、溶菌酶和 SDS 共同作用的方法,能有效的裂解土壤微生物<sup>[6,7]</sup>释放其 DNA。该方法从 4 个样品中均提取出大小约为 20 kb 的完整 DNA 片段,其产率在 9μg/gDW 以上,表明通过这种方式能有效的裂解土壤微生物细胞,释放其基因组 DNA,这与前人的研究结果相一致<sup>[6,7]</sup>。土壤中尤其是根际土壤中含有大量的腐殖酸,这些物质若混入 DNA 将有可能抑制 DNA 聚合酶的活性,导致 PCR 扩增失败。本研究中通过 3 种途径除掉根际土壤中的杂质。1)根际土壤样品的洗涤,为了防止 DNA 降解,样品洗涤过程中采用 TENP buffer 而未采用 PBS buffer,两次洗涤上清液均呈黑褐色,其作用可见一斑。2)DNA 粗提液的纯化。经过酚、氯仿、3S 柱纯化后,转基因棉花 SGK321 和中棉所 41 根际土壤 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值分别为 1.39 和 1.42,颜色透明,表明大量的蛋白质、腐殖酸已经除去。3)DNA 原液的高度稀释。DNA 原液若要稀释到 20 ng/μL,一般要稀释 40~50 倍,大大降低了原液中腐殖酸的浓度。PCR 扩增和酶切均获得理想的结果,所提取的 DNA 已经达到了土壤微生物分子生物学的需要。

致谢 本研究主要实验是在南开大学生命科学学院高玉葆教授实验室完成,谨在此表示感谢!

### 参考文献

- [1] 鲁如坤.土壤-植物营养学.北京:化学工业出版社,1998.
- [2] Jennifer L K, Lee A B, Miranda H, et al. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58:169~188.
- [3] Lynch J M, Benedetti A, Insam H, et al. Biol Fertil Soils, 2004, 40:363~385.
- [4] Jia X, Han S J, Zhao Y H, et al. Journal of Forestry Research, 2006, 17(1):31~34.
- [5] Smalla K, Cresswell N, Hagler L C M, et al. Appl Bacteriol, 1993, 74:78~85.
- [6] 赵勇,周志华,李武,等.农业环境科学学报.2005, 24(5):854~860.
- [7] 陈敏.微生物学杂志,2005, 25(5):101~104.
- [8] 宋培勇.微生物学杂志,2006, 26(1):109~112.
- [9] Brusetti L, Francia P, Bertolini C, et al. Plant and Soil, 2005, 266(12):11~21.